

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA



“Estudio químico de Lippia mexicana”

Tesis que para obtener el título de
Químico Farmacéutico Biólogo

Presenta:

Humberto Díaz Arumir y Gálvez

[México D.F. 2010]



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatorias.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, que desde la Escuela Nacional Preparatoria me ha cobijado en sus aulas, patios y jardines, museos, salas e institutos. Al mas grande orgullo de mi nación producto del arduo trabajo y esfuerzo de millones de Mexicanos, por quienes trabajaré y luchare siempre.

A quienes con su amor infinito y cariño incondicional tejen día con día alrededor mío una hermosa cadena de bellos recuerdos y enseñanzas que embellecen mi vida y la llenan de sentido, mi familia. Desde los días en los que mi mamá y mi papá me llenaron de atención y dedicación hasta el día de hoy en que me regalan respeto, sinceridad y libertad. Días en los que mi hermano Gabriel me ha obsequiado consejos, palabras de aliento y confianza sin importar en que parte del mundo se encuentre, días en los que mi hermana me enseña que la inteligencia, el amor y las sonrisas son cualidades que embellecen y halagan a quien las regala y recibe. Días en los que mi familia se ha visto enriquecida por mi querido cuñado Robert y my muy amada sobrina, Victoria.

A Luisa, que siempre me ha brindado su amor, amistad y compañía, que comparte mis logros y aminora mis fracasos. Luisa, nombre que invoca en mi persona sueños, planes, cálculos, deseos, alegría, análisis, amor, compañerismo y más. La mujer con quien quiero recorrer de la mano el camino que se tiende hacia el horizonte, cruzar los mares futuros, combatir tormentas, planear mi vida y realizarla plenamente.

A Roberto, compañero de mil batallas, disgustos y victorias, amigo de mil paseos, aliado incondicional de millares de fructíferas y largas pláticas donde todo, sin excepción se relaciona. Aquel hombre que siempre está dispuesto a devolver un argumento y aceptar de buena gana alguna conclusión en un principio insospechada. Amigo mío, a ti mi muy sincero agradecimiento por el placer de ser compañeros en estos 8 años y sabernos amigos por el resto del tiempo.

A mis amigos con quienes un café, un auto, varios tacos o cualquier otro escenario merece una plática, amigos con quienes el análisis y el simple gozo de la vida nos reúne de vez en vez, a mis muy queridos compañeros y fieles ayudas Marcela, Frida, Lourdes, Alejandra, Beatriz y Tonatiuh.

A Nancy, mujer sonriente e inteligente que me enseñó a ser feliz sin dejar de vivir, analizar ni dejar de ver la realidad que nos envuelve.

Y sin duda alguna, agradezco a todas las mujeres y hombres que han dedicado su vida a la investigación, enseñanza y divulgación de la ciencia, combatiendo y defendiendo con la verdad a la oscuridad que envuelve al conservadurismo que impide a la humanidad vivir en libertad y armonía.

Agradecimientos.

A mi familia, que en todo momento ha iluminado mi camino.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a la Facultad de Química y al Instituto de Química por permitirme realizar este estudio en sus muy cálidas instalaciones.

A aquellas personas que dieron su vida por esta bellísima casa de estudios, hogar de libertad, valores y conocimiento que hoy comparto y me comprometo a ampliar:

Muchas, muchas gracias a la Maestra en Ciencias Emma Maldonado Jiménez por toda la atención, dedicación, paciencia, interés y libertad recibida a lo largo de la elaboración de este estudio, desde la primera fracción obtenida hasta el último punto de esta tesis, pasando por la primera placa de cromatografía revelada. Muchas gracias. De usted me llevo mucho conocimiento, experiencia y un excelente ejemplo de congruencia y valor universitario.

A mis compañeros de laboratorios que siempre demostraron camaradería y prestaron apoyo en todo momento: Yunuen, Eliu, Sonia, Rodrigo, Cristian, Jonathan,

A las maestras Ana y Emira que siempre aclararon y atendieron cualquier duda y consulta con una sonrisa y excelente disponibilidad.

Agradezco muy sinceramente al M. en C. Antonio Nieto Camacho por la elaboración de las pruebas biológicas y por la atención y camaradería siempre presente en cada consulta.

Agradezco a los técnicos académicos M. en C. Hector Ríos, Dra. Isabel Chávez, Dra. Beatriz Quiroz (RMN), I.Q. Luis Velasco, Dr. Javier Pérez (EM), QFB Rocío Patiño (IR), y al Dr. Alfredo Toscano (Rayos X) por la elaboración de los estudios sin los cuales este trabajo no hubiese sido posible.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	
ABREVIATURAS	
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1 Familia Verbenaceae.....	3
2.2 Género <i>Lippia</i>	4
2.3 Terpenos	19
2.5 Triterpenos	20
3. OBJETIVO	22
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	23
4.1 Material y equipo.....	23
4.2 Material vegetal.	23
4.3 Extracción del material vegetal.....	24
4.4 Aislamiento y purificación.....	25
4.5 Determinación de la actividad antiinflamatoria.....	28
5.1 Elucidación estructural de los compuestos aislados.....	30
5.2 Pruebas biológicas.....	31
6. CONCLUSIONES	46
7. Bibliografía.....	47
ANEXO 1.....	53

ABREVIATURAS

Ø	Diámetro
CCF	Cromatografía en capa fina
CC	Cromatografía en columna
COSY	Espectroscopía de correlación homonuclear (Correlated Spectroscopy)
δ	desplazamiento químico.
d	doblete
dd	doble de doble
ddd	doble de doble de doble
DEPT	Aumento sin distorsión de la transferencia de polarización. (Distortionless Enhancement of Polarization Transfer)
EM-IE	Espectrometría de masas por impacto electrónico.
HMBC	Correlación heteronuclear de enlaces múltiples (² JC-H, ³ JC-H) (Heteronuclear Multiple Bond Coherence)
HRFABMS	Espectrometría de masas de alta resolución por bombardeo de átomos rápidos (High Resolution Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry)
HSQC	Correlación heteronuclear cuántica simple (¹ JC-H), ³ JC-H) (Heteronuclear Single Quantum Coherence)
Hz	Hertz
IC ₅₀	Concentración inhibitoria cincuenta
IR	Espectroscopia de infrarrojo.
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
<i>m</i>	múltiplete
m/z	relación masa carga
M ⁺	ión molecular

RMN	Resonancia Magnética Nuclear
s	singulete
sa	singulete ancho
t	triplete
ta	triplete ancho
td	triplete de doblete
TPA	13-acetato-12-O-tetradecanoilforbol

1. INTRODUCCIÓN

Plantas, microorganismos, animales y minerales han sido fuente de recursos médicos por miles de años. Muchos de los fármacos producidos actualmente por la industria farmacéutica proceden de fuentes naturales y fueron ubicados gracias a referencias del uso tradicional que dichas fuentes recibían en diversas comunidades. En Estados Unidos, tan sólo en el periodo comprendido entre 1983-1994, el 78% de los nuevos fármacos con actividad bactericida son de origen natural, el 61% de los anticancerígenos son derivados de productos naturales y en el caso de los antiinflamatorios solo el 67.5% son de origen sintético.¹

Uno de los primeros ejemplos del uso de compuestos de origen natural por parte de la industria farmacéutica se refiere al uso de la corteza del sauce blanco (*Salix alba*), este recurso se encuentra registrado en textos de Hipócrates y de Dioscórides, pero fue hasta inicios del siglo XX cuando esta planta fue sometida a diversos estudios químicos y farmacológicos gracias a los cuales hoy contamos con el ácido acetilsalicílico (aspirina), producto de la salicina la cual se encuentra en la corteza del sauce.

Éste y muchos otros ejemplos ponen de manifiesto la importancia del estudio organizado y sistemático de la flora, en especial de aquellas especies que son utilizadas por diversas comunidades con fines terapéuticos.

México es poseedor de una gran diversidad vegetal y el uso de la herbolaria con fines terapéuticos es una práctica muy extendida entre la población e incluso en algunas comunidades predomina sobre el uso de la medicina formal

constituyéndose así, en una opción muy importante en el tratamiento y prevención de enfermedades.

Dentro de las plantas utilizadas en México se encuentran varias especies del género *Lippia*, entre las que se encuentra *Lippia mexicana*, utilizada en el Estado de Michoacán para el tratamiento de enfermedades respiratorias crónicas.

Del actual uso de plantas medicinales, así como del importante papel que representan en la industria farmacéutica, surge la necesidad y deriva la importancia de su estudio, tanto desde un enfoque químico como farmacológico. Por lo anterior, se decidió emprender el estudio químico de *Lippia mexicana* y evaluar la actividad antiinflamatoria de los compuestos aislados. Los resultados de estos estudios se presentarán a continuación.

2. ANTECEDENTES

2.1 Familia Verbenaceae.

La familia Verbenaceae cuenta con cerca de 100 géneros y alrededor de 3000 especies.² Se encuentra distribuida en todo el mundo (excepto en las zonas antártica y ártica y en el desierto del Sahara) en especial en zonas tropicales, subtropicales y templadas. En el territorio nacional se tiene registro de 26 géneros pertenecientes a esta familia y 286 especies.³

En esta familia existen varias especies que presentan actividad biológica, una de estas especies es *Vitex mollis* H. B. K., un árbol de aproximadamente 15 m de altura distribuido en los estados de Oaxaca, Guerrero, Michoacán y Jalisco. Las hojas de este árbol son utilizadas como auxiliar en contra de la disentería, como analgésico y antiinflamatorio. Se usa también contra la picadura de alacrán, sin embargo se ha demostrado que carece de este efecto.⁴

Otras verbenáceas con actividad son *Bouchea fluminensis* y *Junellia aspera*, de la primera se aisló la mezcla de los triterpenos ác. ursólico, ác. oleanólico y ác. micromérico (Fig. 1). Esta mezcla presentó actividad antiinflamatoria y analgésica.⁵ De la segunda se aisló el daucosterol y los ácidos maslínico y oleanólico (Fig. 1). Los dos primeros con actividad insecticida.⁶

La composición química de la familia Verbenaceae es diversa, de ella se han aislado monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenos, flavonoides, iridoides y glicósidos de fenilpropanoides, entre otros.

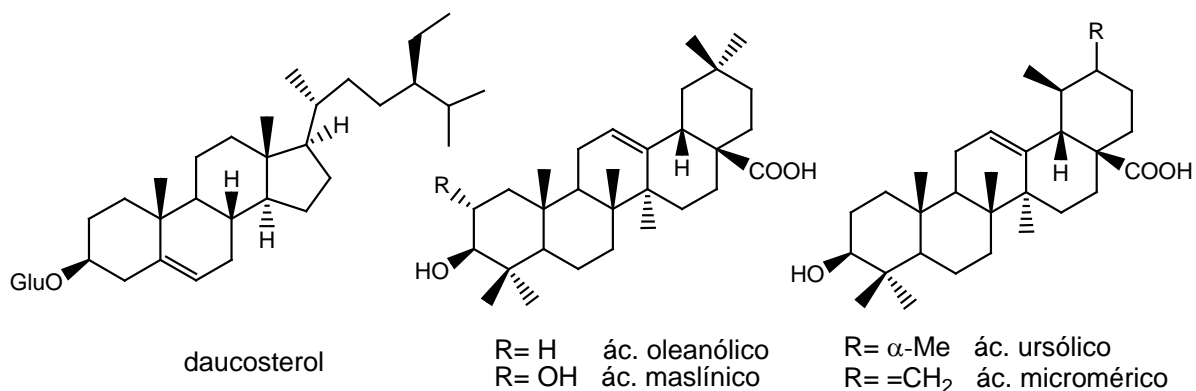


Figura 1. Compuestos biológicamente activos aislados de *B. fluminensis* o *J. aspera*.

2.2 Género *Lippia*.

El género *Lippia* (Verbenaceae) incluye aproximadamente 200 especies y 60 *taxa* infraespecíficos de hierbas, arbustos y pequeños árboles. Se encuentra distribuido desde el sur de Estados Unidos hasta Argentina, así como en la zona tropical de África. Un gran número de especies son utilizadas como remedios para problemas gastrointestinales y respiratorios. Se ha descrito que ciertas especies de *Lippia* presentan actividad antipalúdica⁸, antiviral^{30, 13} y citotóxica¹³. Además varias especies, entre ellas *Lippia graveolens* (sustituto del orégano) son utilizadas con fines gastronómicos como saborizantes, por lo que son importantes en la industria de alimentos.⁷

Los estudios acerca de la composición química del género *Lippia* son escasos, y en la mayoría de los casos se enfocan a los aceites esenciales. La composición química de los aceites esenciales de *Lippia* es variada, sin embargo los compuestos que se han encontrado con una elevada frecuencia son alcanfor, limoneno, α -pineno, β -cariofileno, *p*-cimeno, linalool y timol.⁸ Otros compuestos presentes en extractos orgánicos y acuosos de *Lippia sp.* son sesquiterpenos,

derivados de los ác. cafeico, ferúlico y *p*-cumárico, flavonoides, naftoquinonas, iridoides, triterpenos y esteroides.

A continuación se presentan los resultados de estudios químicos de diferentes especies pertenecientes al género *Lippia*, en orden alfabético y acompañados de una breve revisión de lo reportado en la literatura:

Lippia adoensis Hochst. Ex. Schau. es conocida como “kesse” o “koseret” (Etiopía) y es utilizada como antihelmíntico, para enfermedades oculares y contra la tiña. Se ha reportado que el extracto etanólico de las hojas contiene polifenoles, taninos, esteroides insaturados y triterpenos.⁹ En su aceite esencial, tanto de hojas como de flores, el linalool (Fig. 2) es el componente mayoritario (81.3 % y 94.5 % respectivamente).¹⁰

Figura 2. Monoterpeno presente en muchos aceites esenciales del género *Lippia*.

El género *Lippia* cuenta con 120 especies en el territorio brasileño, una de estas especies es *Lippia alba*, que es conocida por más de 25 nombres comunes, entre ellos “carmelitana”, “erva-cidreira-do-campo” y “falsa melisa”. Al mismo tiempo cuenta con 5 diferentes sinónimos científicos: *Lantana alba* Mill., *Lantana geminata* (Kunth) Spreng., *Lippia geminata* Kunth, *Lippia geminata* var. *microphylla* Griseb., *Lippia globiflora* var. *geminata* (Kunth) Kuntze. Además, existen 4 *taxa* infraespecíficos: *Lippia alba* f. *alba*, *Lippia alba* f. *intermedia*

Moldenke, 1982, *Lippia alba* var. *carterae* Moldenke, 1961, *Lippia alba* var. *globiflora* (L'Hér) Moldenke.¹¹ Es una especie utilizada para el tratamiento de enfermedades respiratorias, también como sedante, espasmolítico, emenagogo, para el tratamiento de la hipertensión y contra la cefalea, entre otros.¹¹⁻¹³ De esta especie se aislaron 3 ésteres del ácido *p*-hidroxicinámico (Fig. 3) que presentan actividad inhibitoria del receptor 5 de quimiocina (CCR5).¹⁴ CCR5 es una proteína en la superficie de algunas células del sistema inmunológico y es uno de los dos correceptores que puede usar el VIH junto con el receptor CD4 para unirse a las células anfitrionas y penetrar en ellas.¹⁴

Figura 3. Dos ésteres (a y b) del ácido *p*-hidroxicinámico, aislados de *Lippia alba*.¹⁴

Los aceites esenciales de *L. alba* (Miller) N. E. Br. y *L. alba* f. fueron activos contra una serie de bacterias y hongos.¹¹ El aceite de *L. alba* (Miller) mostró ser activo contra *Escherichia coli* (*E. coli*) enterotoxigénica, *E. coli* enteropatógena y *E. coli* productora de la toxina shiga¹² y moderadamente activo contra *Candida spp.*¹⁵

Lippia berlandieri v. Shauer es otra de las especies conocida como “orégano”. De esta especie se evaluó la actividad antioxidante de su aceite esencial, que resultó pobre.¹⁶

Lippia chevalieri Moldenke es utilizada en África con fines terapéuticos como antipalúdico, como sedante y en el tratamiento de enfermedades respiratorias. Se

encontró que los compuestos mayoritarios del aceite esencial de las hojas fueron β -cariofileno, elemol y óxido de cariofileno y del aceite esencial de sus flores β -cariofileno, elemol y germacreno D (Fig. 4).¹⁷

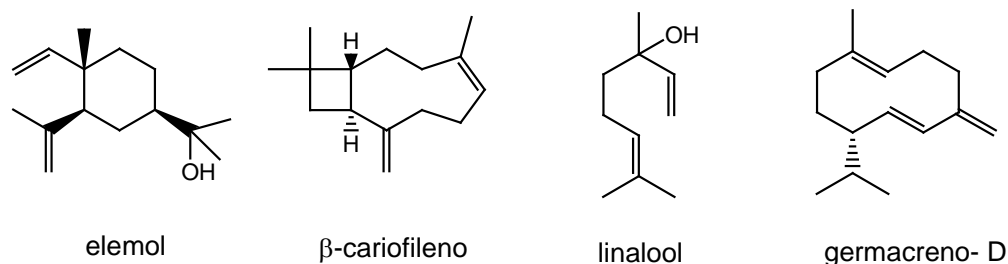


Figura 4. Terpenos aislados presentes en el aceites esencial de *L. chevalieri*.

Se ha descrito también que el aceite esencial de las hojas posee actividad bactericida contra *Bacillus cereus* (*B. cereus*), *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *S. camorum* y *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*).¹⁸

Lippia chiapasensis. En Guatemala, el grupo étnico Quiché de la región de Totonicapán utiliza esta planta para el tratamiento de enfermedades respiratorias y nerviosas. De su aceite esencial se identificaron 142 compuestos, siendo los más abundantes la *trans*-dihidrocarvona (14.2%) y el geraniol (10.1%). El 78.9% del aceite está constituido por monoterpenos y por sesquiterpenos.¹⁹



Figura 5. Monoterpenos más abundantes en el aceite esencial de *L. chiapasensis*.

Lippia citriodora H.B.K., también es conocida como “lemon verbena”. El análisis de

su extracto acuoso reveló que contiene un glicósido de iridoide, un flavonoide y 7 fenilpropanoides. Además este extracto posee actividad antioxidante.²⁰ Derivado de otro estudio del aceite esencial de esta especie, se identificaron 47 compuestos, en su mayoría monoterpenos y sesquiterpenos. De estos 47, geranial, neral y limoneno (Fig. 6) conforman el 66.3% del aceite.²¹ En otros estudios se menciona que su aceite esencial inhibe fuertemente el crecimiento de *S. aureus* mientras que *Listeria innocua* y *E. coli* son sólo “sensibles” al mismo.²²



Figura 6.

Lippia dulcis es un especie utilizada en México y Centroamérica para el tratamiento de tos, resfriados, bronquitis, asma y cólicos.²³ De esta especie se han aislado 2 sesquiterpenos tipo bisabolano, 5 flavonoides, 3 glicósidos de feniletanoides y 2 glucósidos de iridoideas.²⁴ Se ha encontrado que el aceite esencial consta de 47 compuestos (79% sesquiterpenos) siendo los más abundantes (-)-*epi*-hernandulcina (22%) y (+)-hernandulcina (36%) (Fig. 7),²⁵ esta última es 1000 veces más dulce que la sacarosa.⁸ Sin embargo, estos datos contrastan con una composición de 86% de monoterpenos y trazas de hernandulcina reportada con anterioridad, donde de comprobarse la correcta identidad del material vegetal de ambas investigaciones se revelaría la existencia de 2 quimiotipos.²⁵ Por otra parte, se ha reportado que la hernandulcina no

presenta un riesgo tóxico en ratones.²⁶ Se ha reportado que el aceite esencial tiene actividad antihistaminérgica y anticolinérgica (100µg/mL).²³



Figura 7- Glucósido de iridoide, glicósido de feniletanoide y un sesquiterpeno, ejemplo de los compuestos aislados de *L. dulcis*.²⁴

Lippia gracilis H.B.K. es una planta originaria del noroeste de Brasil donde es conocida como “alecrim-da-chapada” y es utilizada para tratar males cutáneos como quemaduras, heridas y úlceras. Acerca de su aceite esencial, en un estudio se ha demostrado que contiene carvacrol, *p*-cimeno, γ -terpineno y timol (Fig. 8) como componentes mayoritarios y que posee actividad antioxidante y una potente actividad larvicida contra las larvas del principal vector del dengue, el mosquito *Aedes aegypti*.²⁷

Se reporta que su aceite esencial está constituido por 15 compuestos, de los cuales el carvacrol constituye del 23.52%²⁷ al 54.4%.²⁸



Figura 8. Monoterpenos presentes en *L. gracilis*.

Lippia graveolens es una hierba utilizada en México como condimento en alimentos y en México es conocida como “orégano”. De esta especie se aislaron 12 flavonoides, además de carvacrol y timol. Además se evaluó la actividad antiinflamatoria y antioxidante de los flavonoides.

Figura 9. Glucósido de flavonoide (a) y flavonoide (b) presentes en *L. graveolens*.

El eridictiol fue el que presentó la mejor actividad antiinflamatoria mientras que la galangina y la 3-hidroxi-floridzina (Fig. 9) presentaron mayor actividad antioxidante que el tocoferol, pero menor que la quercetina los cuales fueron los compuestos de referencia.⁷



Figura 10. Dos compuestos aislados de *L. integrifolia*.²⁹

Del estudio realizado a *L. integrifolia* se aislaron 4 africanenos y 1 asteriscadieno.²⁹

Lippia javanica es originaria del sur de África, donde es utilizada con fines medicinales. Del extracto metanólico de esta especie se han aislado 8 compuestos: 4-etil-nonacosano, 3 monoterpenos y 4 flavonas. Se evaluó la capacidad de estos compuestos para inhibir a la enzima transcriptasa reversa del VIH. Se encontró que los monoterpenos (E)-2(3) epoxitagetenona y la piperitenona (Fig. 11) presentan un porcentaje de inhibición de 91% y 53% respectivamente.³⁰

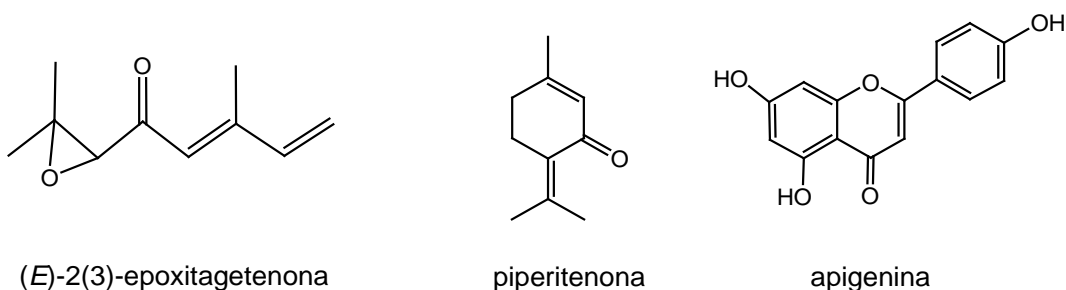


Figura 11. Compuestos aislados de *L. javanica*.³⁰

Se ha identificado la existencia de por lo menos 5 quimiotipos de *L. javanica*: rico en mircenona, rico en carvona, rico en piperitenona, rico en ipsenona y rico en linalool.³¹

Además, se ha reportado que la piperitenona aislada de aceites esenciales de *L. javanica* presenta actividad bactericida contra *Campylobacter* spp., *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Salmonella typhi*, *Micrococcus kristinae* y *Acinetobacter calcoocticus* así como contra el protozoario *Entamoeba histolytica*.³¹

Lippia junelliana es una hierba aromática endémica de Argentina donde es conocida como “salvia mora” o “salvia morada” y sus hojas son utilizadas medicinalmente para problemas abdominales. Se analizó la composición del aceite esencial de 16 lotes de la planta recolectada en diferentes regiones con lo que se proponen los quimiotipos ocimenona, dihidrocarvona, limoneno-piperitona y limoneno-óxido de piperitona. En general la composición de estos aceites consta en su mayoría de monoterpenos (70-94%), seguido de sesquiterpenos (3-10%) y fenilpropanoides (0.2-3%). Aún cuando contienen más de 80 compuestos, son 8 los que representan la mayor parte de la composición.³² Además se encontró que el aceite esencial de esta planta posee actividad nematocida.³³

Lippia multiflora Moldenke es originaria de las zonas tropicales del oeste de África, donde es conocida comúnmente como “té de Gambia”³⁴ ó “té de savane”³⁵ es una especie cuyas hojas son administradas como té para el tratamiento del paludismo, hipertensión, furúnculos, diarrea, como desinfectante bucal, antipirético y diurético.^{34,35} Se han descrito varios quimiotipos de *L. multiflora*.¹⁸ Se ha reportado también que posee actividad como relajante muscular, acción vascular, antimicrobiana, antimalárica, insecticida y antifúngica, entre otras.¹⁸ De sus extractos orgánicos se aisló un triterpeno, el ácido ursólico, y la flavona salvigenina.³⁵

Figura 12: Triterpeno y flavonoide aislados de *L. multiflora*.

Lippia nodiflora crece en zonas cercana a mares y ríos. Del extracto de EtOH:H₂O de las partes aéreas de una población colectada en España se aislaron, 15 flavonoides: 3 flavonas, y las sales de sodio de 7 sulfatos y 5 disulfatos de flavona.³⁶ Se ha reportado que el extracto metanólico ejerce una actividad hepatoprotectora en un modelo de daño hepático ocasionado por paracetamol, al disminuir la actividad de las enzimas séricas glutamato oxalacetato transaminasa (SGOT), glutamato piruvato transaminasa (SGPT) y fosfatasa alcalina (ALP), enzimas que sirven como indicadores de daño hepático.³⁷

Figura 13. 6,7-disulfato de nodifloretina, flavonoide aislado de *L. nodiflora*.³⁶

Lippia origanoides H.B.K, esta especie se encuentra distribuida en México, Cuba, Guatemala y en la región del Amazonas, donde es conocida como “Salva-de-Marajo” y “alecrim-d’Angola”. En México es utilizada con fines gastronómicos como sustituto del orégano (*Lippia graveolens*). Cabe mencionar que según la

literatura, existen por lo menos 39 especies de 16 géneros que en diferentes partes del mundo son llamadas “orégano” y empleados como sustituto del “orégano verdadero” (*Origanum vulgare*, *Origanum virans*). El aceite esencial de *L. origanoides* contiene 38.6% carvacrol y 18.5% de timol y un contenido de 66% de monoterpenos oxigenados.³⁷ Este aceite esencial inhibe el crecimiento de diversas especies de *Candida*, así como el de *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton rubrum*, *Fonsecaea pedrosoi*, *S. aureus*, *Lactobacillus casei* y *Streptococcus mutans*. Esta actividad se atribuyó a la presencia de carvacrol.³⁸



Figura 14. Monoterpenos aislados de *Lippia origanoides* H.B.K

Lippia rehmanii. Se han aislado 4 compuestos de esta especie, el ác. rehmánico, 22 β -angeloiloxioleanólico, 22 β -angeloiloxi-24-hidroxioleanólico e icterogenina.^{39, 40}

Figura 15.

Lippia rugosa A. Chev.(sin *L. adoensis* F.T.W.A., *L. nigeriensis* Moldenke). Sus aceites esenciales contienen de 18.6-93.1% de monoterpenos oxigenados según la parte de la planta y el estado de madurez del material analizado. Entre los monoterpenos oxigenados más abundantes están geraniol (0.4-51.5%), linalool (4.6-32.9%), 1,8-cineol (<0.1-19.1%), nerol (<0.1-18.6%) y geranial (<0.1-16.5%). Las concentraciones de sesquiterpenos (hidrocarbonados y oxigenados) fueron bajas (3.3-28.0%). En este caso los compuestos más abundantes fueron (E)- β -farneseno (0.3-12.1%), germacreno D (1.2%-4.2%) y β -cariofileno (0.8-3.9%).⁴¹

Figura 16. Sesquiterpeno aislados de *Lippia rugosa* A. Chev.

Lippia sidoides Cham., conocida como “alecrim-pimenta”, es originaria de Brasil donde es utilizada como agente antiinfeccioso y antiséptico. Su aceite esencial contiene principalmente timol, *E*-cariofileno, *p*-cimeno^{42,43} y presentó actividad inhibidora del crecimiento promastigotes de *Leishmania chagasi*⁴⁴ y antifúngica contra *Candida sp.* y *Microsporum canis*.⁴⁵ Por sus propiedades y su amplio uso *L. sidoides* fue integrada a los programas gubernamentales de fitoterapia de Brasil e incluso se han investigado técnicas de microencapsulación de sus aceites.⁴⁴ Del extracto de EtOH de esta especie se aislaron triterpenos, naftoquinonas y flavonoides, entre otros, los cuales han sido evaluados en células cancerígenas,

resultando que dos de ellos, tectol y lippsidoquinona (Fig. 17) mostraron una actividad significativa contra líneas celulares HL60 y CEM de leucemia.^{43,46}

Figura 17. Compuestos biológicamente activos aislados de *L. sidoides*.⁴³

Lippia stoechadifolia es una hierba originaria de Puerto Rico, donde es conocida como “poleo”. Es utilizada con fines terapéuticos en baños aromáticos, para aliviar síntomas del resfriado, dolor intestinal y como insecticida o repelente de insectos. Del aceite esencial se aisló un monoterpeno llamado 1,2-epoxi-pulegona, el cual en dosis adecuadas tiene un efecto insecticida.⁴⁷ El epóxido inhibe de manera irreversible las acetilcolinesterasas de la mosca casera, y de las cucarachas de Madagascar *in vitro*. Sin embargo, se observó que no existe correlación entre los ensayos *in vivo* e *in vitro*.⁴⁸

Lippia turbinata se encuentra distribuida principalmente en Argentina, donde es también conocida como “poleo” y utilizada para problemas gastrointestinales y diarrea.⁴⁹ De su extracto de MeOH:CH₂Cl₂ se aislaron 8 triterpenos, 7 de los cuales cuentan con un puente etéreo en el anillo A.⁵⁰ Al evaluarse la actividad anti-tuberculosis así como la toxicidad de estos triterpenos se encontró que el ácido

rehmánico fue el más activo pero también el más tóxico, mientras que el ác. lantanólico (Fig. 18) presentó una actividad pobre.⁵⁰ El aceite esencial está constituido principalmente por limoneno (43.3-60.6 %) y óxido de piperitenona (39.3-17.8%).³³ El aceite esencial mostró actividad bactericida contra de *S. aureus*, *B. cereus*, *E. faecalis* y *P. mirabilis*.⁵¹ Así mismo se ha evaluado la actividad antimicrobial de los flavonoides aislados del extracto metanólico contra *E. coli*, *S. aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Shigella sp.* y *Streptococcus sp.*⁴⁹

Fig. 18. Triterpenos aislados de *L. turbinata*.⁵⁰

Lippia triphylla es una planta utilizada en Perú. De sus partes aéreas se han aislado 25 compuestos identificados como 3 glucósidos de fenilpropanoides, 7 flavonoides, 5 glicósidos de feniletanoides, 5 lignanos, 2 sesquiterpenos y 3 triterpenos (ácidos ursólico, oleanólico y betulínico).⁵² En su extracto de MeOH:H₂O, después de hidrólisis, se detectó la presencia de ácido cafeico, hidroxitirosol, ácido ferúlico, apigenina, ácido o-hidroxibenzoico, ácido hidroxicafeico y ácido 3-nitro-ftálico.⁵³

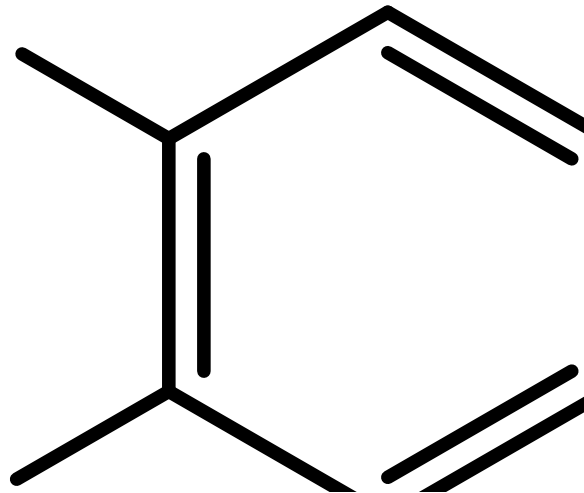


Figura 19. Compuestos aislados de *L. tryphilla*.

2.3 Terpenos

Los isoprenoides o terpenos son un grupo de más de 35 000 productos naturales. Muchos de estos compuestos tienen un importante valor económico, por ejemplo el mentol y el taxol. Muchos terpenos son utilizados como medicamentos, aditivos para alimentos y cosméticos.⁵⁴ Los terpenos forman una gran y diversa familia de compuestos cuyo esqueleto hidrocarbonado deriva de unidades de isopreno (C_5) las cuales se unen cabeza-cola dando lugar a estructuras con esqueletos típicos, que se clasifican según el número de unidades de isopreno que contienen, $(C_5)_n$. De esta forma se clasifican en: hemiterpenos (C_5), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), sesterpenos (C_{25}), triterpenos (C_{30}) y tetraterpenos (C_{40}).⁵⁵ En plantas y organismos fotosintéticos los terpenos son resultado de dos vías biosintéticas, la ruta del acetato mevalonato o del ácido mevalónico (AMV) y la ruta del fosfato de metileritritol (FME) también llamada 1-desoxi-D-xilulosa fosfato (DOXF).^{56,57}

La vía del ácido mevalónico se lleva a cabo en el citoplasma y da origen a triterpenos, sesquiterpenos y esteroides. La ruta de DOXF se lleva a cabo en los plástidos, dando origen a los carotenoides, fitol, plastoquinona-9, mono y diterpenos⁵⁸.

2.5 Triterpenos

Por cerca de media centuria, las ciclaciones del escualeno y del 2,3-óxidoescualeno para formar triterpenos policíclicos ha sido fuente de fascinación en las ciencias moleculares. Estos compuestos son ciclados de manera estereoselectiva por algunos microorganismos y eucariotas formando triterpenos tricíclicos y pentacíclicos incluidos hopeno, diploterol, tetrahimanol, lanosterol, cicloartenol y β -amirina. El origen de los triterpenos se encuentra en la unión de dos moléculas de difosfato de farnesilo (FPP) que da origen al escualeno.⁵⁷

La ciclación del escualeno es producto de una reacción catalizada por una proteína (escualeno epoxidasa) dependiente de O₂ y NADPH como cofactores, que produce al intermediario al (3S)-2,3-óxido de escualeno, el cual por una serie de ciclaciones, seguidas de migraciones de hidruro y metilo resultan en la formación de 3 anillos de 6 carbonos y uno de 5. La estereoquímica está determinada por el plegamiento de la superficie de la enzima lo cual probablemente también limita la extensión de la ciclación. Posteriormente, el catión protoesterilo sufre una serie de migraciones 1, 2 de hidruro y de metilo y la pérdida de H-10 para formar lanosterol, un triterpeno típico en animales y precursor del colesterol y otros esteroides en animales y hongos. En plantas, el papel de intermediario lo cumple el cicloartenol el cual contiene un anillo de ciclopropano, generado por la inclusión del carbono proveniente del metilo en C-10.⁵⁷

Muchos triterpenos y esteroides contienen un grupo 3-hidroxi, el cual proviene del grupo epoxi del óxido de escualeno original. En esencia, el destino final del óxido

de escualeno está determinado por diversas enzimas que varían según el género, la familia y la especie de que se trate.⁵⁷

Figura 20. Biotransformación del escualeno hasta lupeol

3. OBJETIVO

Contribuir al conocimiento químico de la flora de México, a través del aislamiento y la elucidación estructural de los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en las partes aéreas de *Lippia mexicana* G. L. Nesom.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Material y equipo.

Los puntos de fusión fueron determinados por medio de un aparato Fisher-Johns. En las cromatografías en columna (CC) se usó como fase estacionaria sílica gel para cromatografía en placa fina (Merck 60 G). Las cromatografías en capa fina (CCF) fueron realizadas en cromatofolios Alugram Sil G/UV254 de 0.25 mm. En el caso de las cromatografías en placa preparativa se emplearon placas Sil G-100 UV254 de 1.0 mm. Como revelador se utilizó sulfato cérico al 3% en ácido sulfúrico 2N y/o lámpara de UV Spectroline modelo CX-20 a 254 y 366 nm. Los espectros de IR se determinaron en un espectrofotómetro Nicolet FTIR-Magna 750, mediante la técnica de solución. Los espectros de masas se obtuvieron utilizando las técnicas IE, HRFABMS en los espectrómetros JEOL JMS-AX505HA y JEOL JMS-SX102A. Los espectros de RMN fueron determinados en los espectrómetros Varian XR-300 (300 MHz ^1H , 75MHz ^{13}C) y Varian Unity Plus 500 (500 MHz ^1H , 125 MHz ^{13}C). Los desplazamientos químicos (δ) están dados en ppm respecto al tetrametilsilano (TMS) que se usó como referencia interna.

4.2 Material vegetal.

El material vegetal (hojas, flores y ramas pequeñas) utilizado en este proyecto fue recolectado el 15 de Junio del 2006, en el Municipio de Huiramba, Michoacán y fue identificado como *Lippia mexicana* G. L. Nesom. por la Dra. Mahinda Martínez.

Un ejemplar de este material se depositó en el Herbario de la Universidad Autónoma de Querétaro (M. Martínez 6678).

4.3 Extracción del material vegetal

El material vegetal seco fue molido por medio de un molino de cuchillas. El peso del material fue de 866.2 g. Posteriormente, se sometió a una extracción con acetona seguido de una extracción con MeOH. Se obtuvieron 53.18 g y 50.67 g de extractos respectivamente. Ambos extractos fueron reunidos, adsorbidos en celita y sometidos a una cromatografía en columna de sílica gel G (columna A, \varnothing 10.5 cm, h 15 cm). La elución se realizó con un sistema hexano-AcOEt de polaridad creciente, se obtuvieron 132 fracciones de 500 mL de la siguiente manera: Frs. A1-A5 (100:0); frs. A6-A17 (95:5); frs. A18-A43 (90:10); frs. A44-A53 (85:15), frs. A54-A80 (80:20), frs. A81-A85 (70:30), frs. A86-A92 (60:40), frs. A93-101 (40:60), frs. A102-107 (20:80) y frs. 108-121 (0:100).

Durante el desarrollo de la CC se realizaron cromatografías en capa fina de las fracciones obtenidas, se usaron diversos sistemas de elución que permitieron observar el perfil cromatográfico de las fracciones y reunir aquellas que mostraron un perfil similar.

4.4 Aislamiento y purificación

De las fracciones A12-A16 se aisló β -sitosterol (33 mg) por cristalización de EtOH. Las aguas madres de β -sitosterol se reunieron con las fracciones A10-A11 y A15-A19 y se fraccionaron mediante CC (columna B, \varnothing 5.5 cm, h 7.5 cm), la cual se eluyó con un sistema hexano-AcOEt de polaridad creciente (95:5 \rightarrow 80:20). De las fracciones eluidas con hexano-AcOEt (85:15) se aisló β -sitosterol (**1**) por cristalización de EtOH. En total se obtuvieron 166.6 mg de β -sitosterol (0.019 % respecto al peso de la planta seca).

Las fracciones A24-A49 (9.37 g) fueron fraccionadas por CC (columna C, \varnothing 8.5 cm, h 9.0 cm), utilizando como eluyente un sistema hexano-AcOEt de polaridad creciente (90:10 \rightarrow 50:50). Se obtuvieron 119 fracciones. De las fracciones C14-C24 eluidas con hexano-AcOEt (90:10) se aislaron 26.5 mg de cicloart-23-en-3 β ,25-diol (**2**) mediante cristalización de AcOEt-hexano.

Las aguas madres de **2** se reunieron con las fracciones C7-C13 y C25-C47 (3.245 g) para ser purificadas por CC (columna D, \varnothing 4.5 cm, h 6.5 cm) eluida con mezclas de hexano-AcOEt de polaridad creciente (90:10 \rightarrow 75:25). Se obtuvieron 53 fracciones, de las cuales las fracciones D8-D16 (eluidas con hexano-AcOEt 90:10) contenían el compuesto **2** impuro por lo que fueron purificadas por CC (columna E \varnothing 3.5 cm, h 6 cm) que se eluyó con hexano-acetona (95:5). Se obtuvieron 41 fracciones. De las fracciones E21-E24 se obtuvo el compuesto **2** (22.1 mg). Se aislaron en total 48.6 mg del compuesto **2**, lo que representa el 0.0056 % del peso total de la planta seca.

De las fracciones A60-A65 se obtuvo lipiólida (**3**) por sucesivas cristalizaciones de AcOEt-hexano (535.4 mg). Sus aguas madres se reunieron con las fracciones A50-A59 y fueron purificadas mediante CC (columna F, \varnothing 9.0 cm, h 9.0 cm) utilizando como eluyente mezclas de hexano-AcOEt de polaridad creciente (90:10 \rightarrow 50:50). Se obtuvieron 132 fracciones. Las fracciones F33-F118 (3.818 g) se sometieron a CC (columna G \varnothing 5 cm, h 8 cm) eluida con un sistema de hexano-isopropanol (96:4). De las fracciones G8-G11 se aisló mediante cristalización de AcOEt-hexano el compuesto **3** (338.7 mg).

Las aguas madres de **3** y las fracciones G5-G7 (460.5 mg) se fraccionaron por medio de CC (columna H, \varnothing 2.8 cm, h 8.5 cm) utilizando como sistema de elución CH₂Cl₂-acetona (97:3). Se obtuvieron 62 fracciones. De las fracciones H12-H15 se obtuvo nuevamente el compuesto **3** (92.6 mg).

Las fracciones H4-H7 (132.5 mg) fueron reunidas y fraccionadas por CC (columna I, \varnothing 2.0 cm, h 6.0 cm) utilizando el sistema hexano-acetona (80:20). De las fracciones I3 e I4 se purificó por cristalización de AcOEt-hexano, el compuesto **4** (17.6 mg). Posteriormente las fracciones I1, I2, I5, I6 y las aguas madres de **4** se reunieron y se fraccionaron mediante CC (columna J, \varnothing 2.0 cm, h 6.5 cm) eluida con un sistema hexano-acetona (85:15). Se obtuvieron 20 fracciones. El compuesto **4** (11.3 mg) se aisló nuevamente de las fracciones J10-J15. Las aguas madres del compuesto **4** se reunieron con las fracciones J8-J9 y J16-J20 y se purificaron por medio de cromatografía en placa preparativa eluida con hexano-acetona (75:25) con lo que se aislaron 13.6 mg más del compuesto **4**. En total se

obtuvieron 42.5 mg de **4**, lo que representa el 0.00491 % del peso total de la planta seca.

Las fracciones A68-A93 (6.83 g) fueron fraccionadas por CC (columna K, \varnothing 6.0 cm, h 9.6 cm) utilizando como eluyente un sistema hexano-AcOEt de polaridad creciente (80:20 \rightarrow 50:50). De las fracciones K8-K24 se purificó por cristalización de AcOEt-hexano el compuesto **3** (274.4 mg). Las aguas madres de **3** se purificaron por CC (columna L \varnothing 2.8 cm, h 7 cm) utilizando el sistema hexano-isopropanol (97:3) obteniéndose 107 fracciones. De las fracciones L66-L91 se aisló, por cristalización de hexano-AcOEt, el compuesto **3** (128.9 mg). En total se aislaron 1.37 g de **3**, lo que representa el 0.15816 % del peso de la planta seca.

Las fracciones K3 y K4 (476 mg) se decoloraron con carbón activado y fueron fraccionadas por CC (columna M \varnothing 2 cm, h 3.5 cm) utilizando hexano-AcOEt 85:15 como eluyente. Se obtuvieron 27 fracciones. El compuesto **5** (17 mg) se aisló de las fracciones M11-M18. Las fracciones M5-M10, M19-M26 y las aguas madres de **5** fueron reunidas y fraccionadas por CC (columna N \varnothing 2 cm, h 3.5 cm) utilizando una mezcla de hexano-AcOEt (85:15) como eluyente. Se obtuvieron 20 fracciones. De las fracciones N8-N12 se obtuvo el compuesto **5** (10.2 mg). En total se aislaron 27.2 mg del compuesto **5**, lo cual representa 0.00314 % del peso de la planta seca.

Cicloart-23-en-3 β ,25-diol (2), cristales blancos; pf. 201-203°C, IR (solución)

$\nu_{\text{máx}}$: 3603, 3461, 1264, 974 cm^{-1} , RMN¹³C ver tabla 1; EM-IE m/z 442 [M]⁺.

Lippiólida (3), cristales blancos; pf. 244-246°C, $[\alpha]_D^{20} +133.17^\circ$ (c 0.208, CHCl₃), IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx.}}$: 3591, 3432, 3083, 1726, 1653, 999, 914 cm⁻¹. RMN-¹H y RMN-¹³C, ver tabla 2 y 3; HRFABMS m/z 471.3477 [M+H]⁺ (calculado para C₃₀H₄₇O₄, m/z 471.3474 [M+H]⁺).

Ácido lippiolidólico (4), sólido amorfo; $[\alpha]_D^{20} +70^\circ$ (c 0.160, CHCl₃); IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx.}}$: 3512, 3396, 3080, 3046, 1722, 1637, 999, 970 y 914 cm⁻¹, RMN¹H y RMN¹³C, ver tabla 2 y 3; HRFABMS m/z 471.3476 [M+H]⁺ (calculado para C₃₀H₄₇O₄, m/z 471.3474 [M+H]⁺).

Ácido lippiólico (5), cristales blancos; pf. 246-248°C, $[\alpha]_D^{20} + 56.6^\circ$ (c 0.165, CHCl₃), IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx.}}$: 3595, 3399, 3073, 1710, 1637 y 895 cm⁻¹; RMN¹H, RMN¹³C, ver tabla 2 y 3; HRFABMS m/z 457.3678 [M+H]⁺ (calculado para C₃₀H₄₉O₃, m/z 457.3682 [M+H]⁺).

4.5 Determinación de la actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido con TPA (acetato 12-O-tetradecanoilforbol) en oreja de ratón.^{59,60}

Para la realización de la prueba se emplearon ratones macho (n=5) de la cepa CD1 de 25-30 g. de peso. Los animales se mantuvieron en cajas de acrílico transparente a temperatura constante de 24°C, con fotoperiodos de 12/12 horas luz/oscuridad y con alimento y agua *ad libitum*. El tratamiento al que fueron sometidos los animales fue el siguiente:

Tratamiento de la oreja derecha: A los animales anestesiados por administración intraperitoneal de pentobarbital sódico (3.5 mg/kg), se les administraron por vía

tópica 10 µL de solución etanólica de TPA (0.25 mg/mL). Diez minutos después se aplicaron diferentes dosis de cada uno de los compuestos disueltos en 20 µL del vehículo (etanol-CH₂Cl₂ 1:1 o acetona-CH₂Cl₂ 1:1). Al grupo control (C) se le administró la solución etanólica de TPA y 10 min después 20 µL del vehículo.

Tratamiento de la oreja izquierda (oreja control): A los animales anestesiados por administración intraperitoneal de pentobarbital sódico (3.5 mg/mL) se les administraron por vía tópica, 10 µL de etanol y 10 minutos después, 20 µL del vehículo.

Cuatro horas después de la aplicación del TPA, los animales fueron anestesiados con éter y sacrificados por dislocación cervical. Se tomó una muestra de 7 mm de diámetro de ambas orejas. El incremento del peso de la muestra de la oreja derecha con respecto a la muestra de la oreja izquierda representa el edema.

La inhibición del edema se calculó con la fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = [(C-E) / C] 100$$

En donde:

C = Edema del grupo control (tratado con TPA).

E = Edema del grupo experimental (TPA más el compuesto).

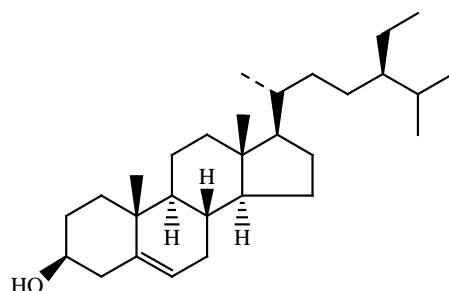
Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de Dunnet de comparación múltiple para aislar los grupos con diferencia estadística significativa ($p \leq 0.05$).⁶¹

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Elucidación estructural de los compuestos aislados

De los extractos de acetona y metanol de partes aéreas de *Lippia mexicana* se aislaron 2 compuestos conocidos que se identificaron como β -sitosterol (**1**) y cicloart-23-en-3 β , 25-diol (**2**). Se aislaron también 3 nuevos triterpenos a los que se les dieron los nombres de lippiólida (**3**), ác. lippiolidólico (**4**) y ác. lippiólico (**5**).

El compuesto **1** fue identificado por medio del análisis de su espectro de RMN-¹H, comparación por CCF con una muestra auténtica y comparación de sus datos espectroscópicos con los reportados en la literatura.⁶²



β -sitosterol (**1**)

El segundo compuesto aislado durante este estudio fue un triterpeno identificado como cicloart-23-en-3 β ,25-diol (**2**) mediante el análisis de sus espectros de IR, RMN (Espectros 1-3), EM y comparación de estos datos con los reportados en la literatura.⁶³ Los datos de RMN¹³C del compuesto **2** y los de la literatura se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Datos espectroscópicos de RMN ¹³C del compuesto **2** (CDCl₃).

¹³ C	2 ^a (lit ⁶³)	2 ^b	¹³ C	2 ^a	2 ^b
1	31.8	32.0	16	26.3	26.4
2	30.2	30.4	17	51.9	52.0
3	78.7	78.8	18	17.9	18.1
4	40.3	40.5	19	29.7	29.9
5	46.0	47.1	20	36.2	36.4
6	20.9	21.1	21	18.6	18.3
7	27.9	28.1	22	38.9	39.0
8	47.8	47.9	23	125.5	125.6
9	19.8	20.0	24	139.2	139.4
10	25.9	26.1	25	70.6	70.7
11	25.8	26.0	26	29.7	29.9
12	35.4	35.6	27	29.8	30.0
13	45.2	45.3	28	19.1	19.3
14	48.7	48.8	29	25.3	25.4
15	32.6	32.8	30	13.8	14.0

^aDeterminado a 100 MHz⁶³; ^bDeterminado a 125 MHz.

cicloart-23-en-3β, 25-diol (**2**).

El compuesto **3**, lipiólida, presenta en su espectro de masas (HRFABMS) un ión pseudomolecular de m/z 471.3474 [M+H]⁺, el cual es congruente con la fórmula molecular C₃₀H₄₆O₄, de la que se deduce un índice de insaturación de 8. El espectro de RMN¹³C (Espectro 4) presenta 30 señales de las cuales 6, según el

espectro DEPT (Espectro 5), corresponden a metilos (uno de ellos vinílico), 11 a metilenos (uno de ellos vinílico), 5 a metinos (uno base de oxígeno) y 8 a carbonos no protonados (uno vinílico, otro hemicetálico y otro correspondiente al carbonilo de una δ -lactona). Por lo anterior, se propuso que el compuesto **3** debía ser un triterpeno policíclico.

Su espectro de IR (Espectro 6) muestra bandas en 3591 y 3432 cm^{-1} , características de grupos hidroxilo, así como una banda en 1726 cm^{-1} atribuida a una δ -lactona y bandas en 3083, 1653, 999 y 914 cm^{-1} que indican la presencia de un doble enlace disustituido geminal. En el espectro de RMN- ^1H (Espectro 7) se observan dos señales en δ 5.06 (sa) y δ 5.01 (ta $J= 1$ Hz), que confirman la presencia del doble enlace y establecen que se trata de un doble enlace disustituido geminal. Se observa también la señal de un metilo vinílico (δ 1.77 sa). En el espectro COSY (Espectro 8) se observan los acoplamientos entre el metilo y los protones vinílicos por lo que se propone que existe un grupo isopropenilo en la molécula y, por lo tanto, se pensó que el esqueleto del compuesto debía ser el lupano, por lo que los protones vinílicos corresponden a H-29 y H-29' y el metilo a CH₃-30.

En el experimento COSY se observa un acoplamiento alílico de H₃-30 con un doblete en δ 4.52 ($J=10$ Hz) asignado a H-19. El desplazamiento de esta señal corresponde al de un protón base de lactona. La señal de C-19 aparece en δ 87.2. En el experimento HMBC (Espectro 9) se observa el acoplamiento de la señal de H-19 con las señales de dos carbonos vinílicos en δ 144.12 y δ 116.9. La primera señal corresponde a un carbono no protonado y se asignó a C-20 en tanto que la segunda corresponde a un metileno y se asignó a C-29. Se observan además correlaciones de H-19 con C-30 (δ 18.7), C-13 (δ 37.2), C-18 (δ 40.8) y con el carbono del carbonilo de la δ -lactona, C-21, (δ 170.3). Lo anterior indica que el anillo E del lupano sufrió una oxidación que lo transformó de un ciclopentano a una δ -lactona.

En el espectro del experimento HMBC se observan correlaciones de C-21 con dos señales en δ 2.33 (d, $J= 17$ Hz) y 2.10 (dd, $J=17, 1$ Hz) que se asignaron a H-22 y H-22'. A su vez estos dos protones correlacionan con el carbono de un metilo que se asignó a C-28 (δ 17.7), con el carbono de un metileno (δ 35.4, C-16) y con un carbono cuaternario (δ 33.6, C-17). Estas correlaciones (Fig. 21) comprueban que en la lippiólida existe una δ -lactona en el anillo E.



Figura 21. Algunas correlaciones observadas en el espectro HMBC de lippiólida (3).

La existencia de un hemiacetal en el compuesto **3** se dedujo de la señal en δ 98.2 observada en el espectro de RMN¹³C. Se propuso que el carbono hemiacetalico corresponde a C-3 porque en el espectro HMBC presenta correlaciones con dos señales que aparecen en δ 2.17 y δ 2.15. Cada una de estas señales corresponde uno de los protones de un metileno y se asignaron a H-1 y H-2, respectivamente. C-3 también correlaciona con los protones de dos grupos metilo cuyas señales aparecen como singuletes en δ 1.02 y δ 0.97. Estas señales se asignaron a los metilos 23 y 24, respectivamente y en el espectro HMBC correlacionan con la señal de un carbono cuaternario en δ 40.4 (C-4) así como con el carbono de un metino en δ 49.5 (C-5). Se observa también una correlación de C-3 con un protón cuya señal aparece en δ 3.71 como doble de doble ($J= 9, 2$ Hz). El desplazamiento de esta señal indica que corresponde a un protón base de función oxigenada. En el experimento COSY este protón correlaciona con otro protón uno cuya señal es un doble de doble en δ 4.24 ($J= 9, 3$ Hz). De acuerdo al experimento HSQC (Espectro 10), estos protones están unidos al carbono cuya señal se ubica en δ 67.8 en el espectro de RMN ¹³C. Estas señales se asignaron al metileno CH₂-25 debido a que C-25 en el espectro HMBC tiene correlaciones con H-1 (δ 2.17 m), con H-5 (δ 1.19 m) y con H-9 (δ 1.42 m). Estas interacciones sustentan la idea de que la señal en δ 67.9 corresponde a C-25, lo cual se comprueba al observar en el experimento HMBC la interacción de C-10 con H-25 (δ 3.71) así como con H-5 y H-9. Las interacciones mencionadas se ilustran en la figura 22a y permiten proponer la estructura parcial que se muestra en la figura 22b.

Figura 22. a) Algunas interacciones observadas en el espectro HMBC del compuesto **3**.

Es importante señalar que la señal de H-25' (δ 3.71) es un doble de doble porque además del acoplamiento con H-25 (δ 4.24) presenta un acoplamiento a 4 enlaces ($J= 2$ Hz) con H-5 por lo que este protón debe ser H-25_{pro-R}. De igual manera, la señal de H-25_{pro-S} (δ 4.24) presenta un acoplamiento en M, a cuatro enlaces, con H-1 α , todo lo cual comprueba la estructura propuesta para el anillo A de la lippiólida. Cabe mencionar que de *Lippia turbinata* se aisló un triterpeno de tipo oleanano que presenta la misma estructura en el anillo A.⁵⁰

Adicionalmente, en el espectro de RMN ¹H se observan 2 singuletes que integran para tres protones cada uno, en δ 0.956 y δ 0.96. La señal en δ 0.956 se asignó a CH₃-26 porque en el espectro HMBC correlaciona con las señales de los carbonos C-7 (δ 31.7), C-8 (δ 40.0), C-9 (δ 44.8) y C-14 (δ 42.0) (Fig. 23). La señal en δ 0.95 se asignó a CH₃-27 debido a que en el espectro HMBC correlaciona con las señales de C-8, C-13 (δ 37.2), C-14 y C-15 (δ 26.2).

Figura 23. Estructura parcial de lippiólida (**3**) en la que se muestran algunas de las correlaciones observadas en el espectro HMBC.

Para asignar la configuración del compuesto **3** se tomó en consideración que en los lupanos los metilos 25, 26 y 28 son β , mientras que C-27 es α , también se consideraron las interacciones observadas en el espectro NOESY (Espectro 11), que se ilustra en la figura 24a. De esta manera se asignó la estructura propuesta, la cual se corroboró por difracción de rayos X (fig. 24b).

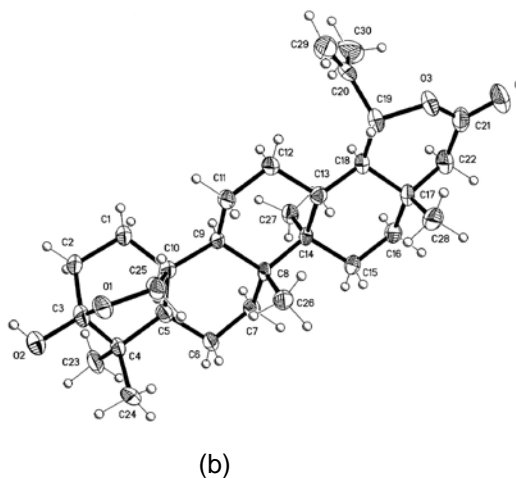


Figura 24. a) Algunas interacciones observadas en el espectro NOESY. b) Difracción de rayos-de lippiólida (**3**).

De todo lo anterior se deduce que la estructura de lippiólida (**3**) es la siguiente:

Lippiólida (3)

El ácido lippiolidólico (4) presentó en su espectro de masas (HRFABMS) un ion pseudomolecular de m/z 471.3474 $[M+H]^+$ y en el espectro de RMN- ^{13}C (Espectro 12) mostró señales para 30 carbonos, por lo que se propone la fórmula molecular $C_{30}H_{46}O_4$ y un índice de insaturación de 8. El espectro de IR (Espectro 13) presenta absorciones para dobles enlaces en 3080, 3046, 1637, 999, 970 y 914 cm^{-1} , una banda ancha (3700-2400 cm^{-1}) con máximos en 3512 y 3396 cm^{-1} que se atribuye a un ácido carboxílico y una banda en 1722 cm^{-1} para grupos carbonilo.

Al analizar los espectros de RMN ^{13}C , 1H , DEPT, HMBC, HSQC y COSY (Espectros 12, 14-18) de 4 se observaron semejanzas con los del compuesto 3, que indican que estos compuestos tienen la misma estructura en los anillos C, D y E. Así la existencia de la δ - lactona y del isopropenilo en el anillo E del compuesto 4 se establece por las señales en δ 4.54 (d, $J= 10$ Hz) para el protón base de lactona (H-19), en δ 5.07 (sa) y 5.03 (t, $J= 1$ Hz) para los protones vinílicos H-29 y H-29'; en δ 1.78 para el metilo vinílico CH_3 -30 y en δ 2.34 (d, $J= 17$ Hz) y 2.11 (dd, $J=17, 1$ Hz) para los protones alfa al carbonilo de la lactona, H-22 y H-22'. En el

espectro de RMN-¹³C se observan señales en δ 87.4 (C-19), δ 144.1 (C-20), δ 170.5 (C-21), δ 46.6 (C-22), δ 117.0 (C-29) y δ 18.7 (C-30).

Los desplazamientos de las señales para los metilos C-26 (δ 15.9), C-27 (δ 14.7) y C-28 (δ 17.7), así como para los carbonos e hidrógenos de los anillos C y D (tabla 2) son similares a los observados para el compuesto **3**, de lo cual se deduce que ambos compuestos son iguales en esta parte de su estructura. Así, la diferencia entre **3** y **4** corresponde al anillo A como se demostrará a continuación.

En el espectro de RMN-¹H se observan señales en δ 4.83 (t, $J= 1.5$ Hz), 4.66 (d, $J= 2$ Hz) y 1.73 (sa, 3H) que se atribuyen a la presencia de un segundo grupo isopropenilo en la molécula y se asignaron a los protones vinílicos H-23 y H-23' y al metilo vinílico CH₃-24, respectivamente. Estas señales muestran correlaciones en el espectro HMBC (figura 18) con la señal del carbono de un metino que aparece en δ 50.3 y que se asignó a C-5 debido a que muestra correlaciones en el espectro HMBC con los protones de un metilo en δ 0.85 (H₃-25), cuyo carbono C-25 (δ 20.1) a su vez correlaciona con los protones de un metileno en δ 1.61 (H-1 y H-1'), con H-9 (δ 1.47, m) y con H-5 (δ 1.94, dd, $J=13, 2.5$ Hz), por lo que el grupo isopropenilo debe estar unido a C-5. Por otra parte, en el espectro de RMN-¹³C se observa una señal en δ 178.0 que se asignó al carbono del carbonilo de un ácido carboxílico. En el espectro HMBC esta señal correlaciona con H-1 y H-1' y con 2 señales en δ 2.38 y 2.17 cuyo desplazamiento indica que son alfa al carbonilo. De estas correlaciones (Fig. 26a) se dedujo que el ácido está en el carbono 3 y que las señales en δ 2.37 y 2.17 corresponden a los protones H-2 y H-2'. Por lo

anterior, se propone que para la formación del ác. lippiolidólico ocurrió una ruptura del enlace C-3-C-4, con lo que la estructura de esta parte de la molécula fue establecida como se muestra en la figura 25b.

Figura 26. a) Algunas interacciones observadas en el espectro HMBC de **4**. b) Estructura parcial propuesta para el ácido lippiolidólico (**4**).

La estereoquímica mostrada en los carbonos C-5 y C-10 se dedujo de las interacciones observadas en el espectro NOESY (Espectro 19) entre H₃-25 con H₃-26 (δ 1.09), H-11 β (δ 1.25), H-1, H-1' y H₃-24. La estereoquímica del resto de la molécula debe ser la misma que la de lippiólida, ya que los desplazamientos tanto de carbono como de hidrógeno muestran gran similitud. Por lo que la estructura propuesta para el compuesto **4** es la siguiente.

Ácido lippiolidólico (**4**).

El ácido lippiólico (**5**) presentó en su espectro de masas (HRFABMS) un ión pseudomolecular de m/z 457.3678 $[M+H]^+$ el cual es congruente con la fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_3$. En el espectro de IR (Espectro 20) se observa una banda ancha ($3550-2400\text{ cm}^{-1}$) con máximos de absorción en 3595 y 3399 cm^{-1} lo cual indica la presencia de un ácido carboxílico. Se observan bandas en 3073 , 1637 y 895 cm^{-1} características de dobles enlaces y una banda en 1710 cm^{-1} que se atribuye al carbonilo del ácido.

Al analizar los espectros de RMN- ^1H y RMN- ^{13}C (Espectro 21 y 22), así como los espectros DEPT, HMBC, HSQC y COSY (Espectros 23-26) se observan señales que indican que este compuesto es también un lupano con la misma estructura que el compuesto **4** en los anillos A (*seco*), B, C y D del esqueleto, como lo demuestra la similitud de las señales para los hidrógenos y carbonos 1-16 y 23-27 (tabla 2 y 3), por lo que las diferencias entre estos compuestos se encuentran en el anillo E. El compuesto **5** al igual que **3** y **4** posee un grupo isopropenilo en C-19 como lo indican las señales en δ 4.81, (d $J= 2$ Hz) y δ 4.69 (sa) y δ 1.71 (s) atribuidas a los protones vinílicos H-29 y H-29' y al metilo vinílico H₃-30, respectivamente. En el experimento HMBC estas señales tienen correlación con la señal en δ 59.4 que se asignó a C-19. Además C-19 correlaciona con H-18 (δ 1.41, t, $J=12$ Hz), el cual a su vez muestra correlaciones con C-12 (δ 24.5), C-13 (δ 37.4), C-14 (δ 42.8), C-16 (δ 35.5), C-17 (δ 41.6), C-20 (δ 148.2), C-22 (δ 49.5), y C-28 (δ 19.4). Además, se observa que las señales de C-17 y C-20 correlacionan con la señal de un protón en δ 3.94 (ddd, $J= 8, 5, 1$ Hz) cuyo desplazamiento indica que es un protón base de alcohol. Se propone que el alcohol está unido a

C-21 (δ 77.2), porque este carbono muestra correlaciones con H-22 (δ 1.57 m), H-22' (δ 1.52 m) y H-19 (δ 2.33 dd $J=$ 12, 5 Hz) (Figura 26).

Figura 27. Algunas interacciones en el anillo E del ácido lippiólico (**5**).

En el espectro NOESY (Espectro 27) se observó interacción entre H-21 y el CH₃-30, por lo que se propone una orientación β del alcohol en C-21. Por lo anterior la estructura propuesta para el compuesto **5** es la siguiente.

Ácido lippiólico (**5**)

Tabla 2. Datos espectroscópicos de RMN ^{13}C de los compuestos **3**, **4** y **5**.
(125 MHz, CDCl_3)

^{13}C		3	4	5^a
1	CH_2	35.2	33.9	33.9
2	CH_2	29.5	28.1	28.1
3	C	98.2	178.0	176.0
4	C	40.4	147.2	147.4
5	CH	49.7	50.3	50.0
6	CH_2	19.6	24.4	24.4
7	CH_2	31.7	32.5	32.4
8	C	40.0	40.7	40.3
9	CH	44.8	40.5	40.4
10	C	35.4	39.2	38.9
11	CH_2	22.1	21.5	21.1
12	CH_2	25.9	25.5	24.5
13	CH	37.2	37.1	37.4
14	C	42.0	42.7	42.8
15	CH_2	26.2	26.1	26.9
16	CH_2	35.4	35.5	35.5
17	C	33.6	33.6	41.6
18	CH	40.8	41.0	47.8
19	CH	87.2	87.4	59.4
20	C	144.0	144.1	148.2
21	C ó CH	170.3	170.5	77.2
22	CH_2	46.6	46.6	49.5
23	CH_3 ó CH_2	26.9	113.7	112.9
24	CH_3	18.3	23.2	23.1
25	CH_2 ó CH_3	67.9	20.1	19.8
26	CH_3	16.3	15.9	15.7
27	CH_3	14.4	14.7	14.2
28	CH_3	17.7	17.7	19.4
29	CH_2	116.9	117.0	110.9
30	CH_3	18.7	18.7	19.6

^a Determinado en $\text{CDCl}_3/\text{DMSO}$ a 125.7 MHz.

Tabla 3. Datos espectroscópicos de RMN ^1H de los compuestos **3**, **4** y **5**
(500 MHz, CDCl_3).

H	3	4	5^a
1	2.17 m	1.61 m	1.58 m
1	1.13 dt (13.3)	1.61 m	1.56 m
2	2.15 m	2.38 m	2.31 m
2'	1.67 m	2.17 m	2.12 m
5	1.19 m	1.94 dd, (13, 2.5)	1.94 dd (12.5, 2.5)
6	1.57 m	1.74 m	1.78 m
6'	1.50 m	1.40 m	1.35 m
7	1.46 m	1.37 m	1.41 m
7'	1.27 m	1.37 m	1.36 m
9	1.42 m	1.47 m	1.49 m
11	1.57 m	1.39 m	1.36 m
11'	1.02 m	1.25 m	1.26 m
12	1.66 m	1.68 m	1.67 m
12'	0.96 m	0.97 m	1.10 m
13	1.74 td (10.5, 3)	1.75 m	1.82 td (12, 3.5)
15	1.66 m	1.72 m	1.69 m
15'	1.19 m	1.15 m	1.04 m
16	1.45 m	1.45 m	1.48 m
16'	1.34 ddd (4.5, 13.5, 3)	1.36 m	1.34 m
18	1.79 t (10.5)	1.77 m	1.41 t (12)
19	4.52 d (10.5)	4.54 d (10)	2.33 dd (12, 4.5)
21	-	-	3.94 ddd (8, 4.5, 1)
22	2.33 d (17)	2.34 d (17)	1.57 m
22'	2.10 dd (17, 1)	2.11 dd (17, 1)	1.52 m
23	1.02 s	4.83 t (1.5)	4.83 sa
23'	-	4.66 d (1.5)	4.66 d (1.5)
24	0.97 s	1.73 s	1.73 s
25	4.24 dd (9, 3)	0.85 s	0.83 s
25'	3.71 dd (9, 2)	-	-
26	0.956 s	1.09 s	1.09 s
27	0.96 s	1.00s	0.96 s
28	1.017 s	1.03 s	1.02 s
29	5.06 s	5.07 s	4.81 d (2)
29'	5.01 ta (1)	5.03 t (1)	4.69 sa
30	1.77 sa	1.78 s	1.71 s

^a Determinado CDCl_3 -DMSO 500 MHz, CO_2H δ 11.4

5.2 Pruebas biológicas

Al realizar la evaluación preliminar de la actividad antiinflamatoria de los compuestos **2**, **3** y **5** (tabla 4) se observó que sólo la lippiolida (**3**) y el ácido lippiólico (**5**) presentaron porcentajes de inhibición mayores al 50%.

Tabla 4. Actividad antiinflamatoria de los compuestos **2**, **3** y **5** (1 μmol /oreja) en el modelo de edema inducido con TPA.

Muestra	Edema (mg)	Inhibición (%)
Control	8.90 \pm 0.35	-
Compuesto 2	5.23 \pm 1.32 **	41.20 **
Compuesto 3	2.23 \pm 0.09 **	74.91 **
Compuesto 5	2.27 \pm 0.65 **	74.53 **

Los datos representan el promedio de tres animales \pm el error estándar de la media ($x \pm \text{EEM}$). Los resultados se analizaron mediante una prueba de *t* de Student, los valores de $p \leq 0.01$ (**) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control.

Se procedió a determinar la IC_{50} de los compuestos activos, mediante la elaboración de una curva dosis respuesta. La IC_{50} de la lippiolida (**3**) resultó de 0.73 μmol /oreja. El ácido lippiólico (**5**) presentó problemas de solubilidad en el vehículo empleado a concentraciones mayores de $1 \mu\text{mol/mL}$, por lo que no fue posible determinar su IC_{50} .

Tabla 5. Determinación de la IC₅₀ de los compuestos 3 y 5.

Muestra	Dosis (μmol/oreja)	Edema (mg)	Inhibición (%)	IC ₅₀
Control (acetona:CH ₂ CL ₂)	-	14.17 ±0.50	-	-
Compuesto 3	0.031	11.34 ±0.98	19.98	0.73 μmol/oreja R=0.96
	0.1	11.33±1.07	20.09	
	0.31	9.40±1.20**	33.67**	
	1	5.56±1.30**	60.77**	
	3.16	4.30±0.95**	69.66**	
Compuesto 5	0.031	11.58 ±0.75	9.99	< 1 μmol/oreja
	0.1	10.93±0.57	14.98	
	0.31	8.53±1.49	33.71*	
	1	5.68±1.30	55.87**	

Los datos representan el promedio de cuatro a siete animales ± el error estándar de la media (x±EEM). Los resultados se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba de Dunnet, los valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control.

6. CONCLUSIONES

Como resultado del estudio químico de partes aéreas (hojas, flores y ramas pequeñas) de *Lippia mexicana*, se aislaron 4 triterpenos y un esterol.

El estudio químico de *Lippia mexicana* permitió determinar que los compuestos mayoritarios en la planta son triterpenos.

Los compuestos aislados se identificaron como β -sitosterol (**1**), cicloart-23-en-3 β , 25-diol (**2**), lippiólida (**3**), ác. lippiolidólico (**4**) y ác. lippiólico (**5**).

Entre los compuestos aislados, tres son nuevos, lippiólida (**3**), ác. lippiolidólico (**4**) y ác. lippiólico (**5**), mientras que los dos restantes, β -sitosterol (**1**) y cicloart-23-en-3 β , 25-diol (**2**), ya habían sido descritos.

Los compuestos nuevos, lippiólida (**3**), ác. lippiolidólico (**4**) y ác. lippiólico (**5**) presentan un esqueleto de lupano y dos de ellos, lippiólida y el ácido lippiolidólico, poseen una estructura novedosa, ya que son los primeros lupanos con una δ -lactona en el anillo E.

En los ensayos de actividad anti-inflamatoria de los compuestos cicloart-23-en-3 β , 25-diol (**2**), lippiólida (**3**) y ác. lippiólico (**5**), los dos últimos mostraron mayor actividad.

7. BIBLIOGRAFÍA

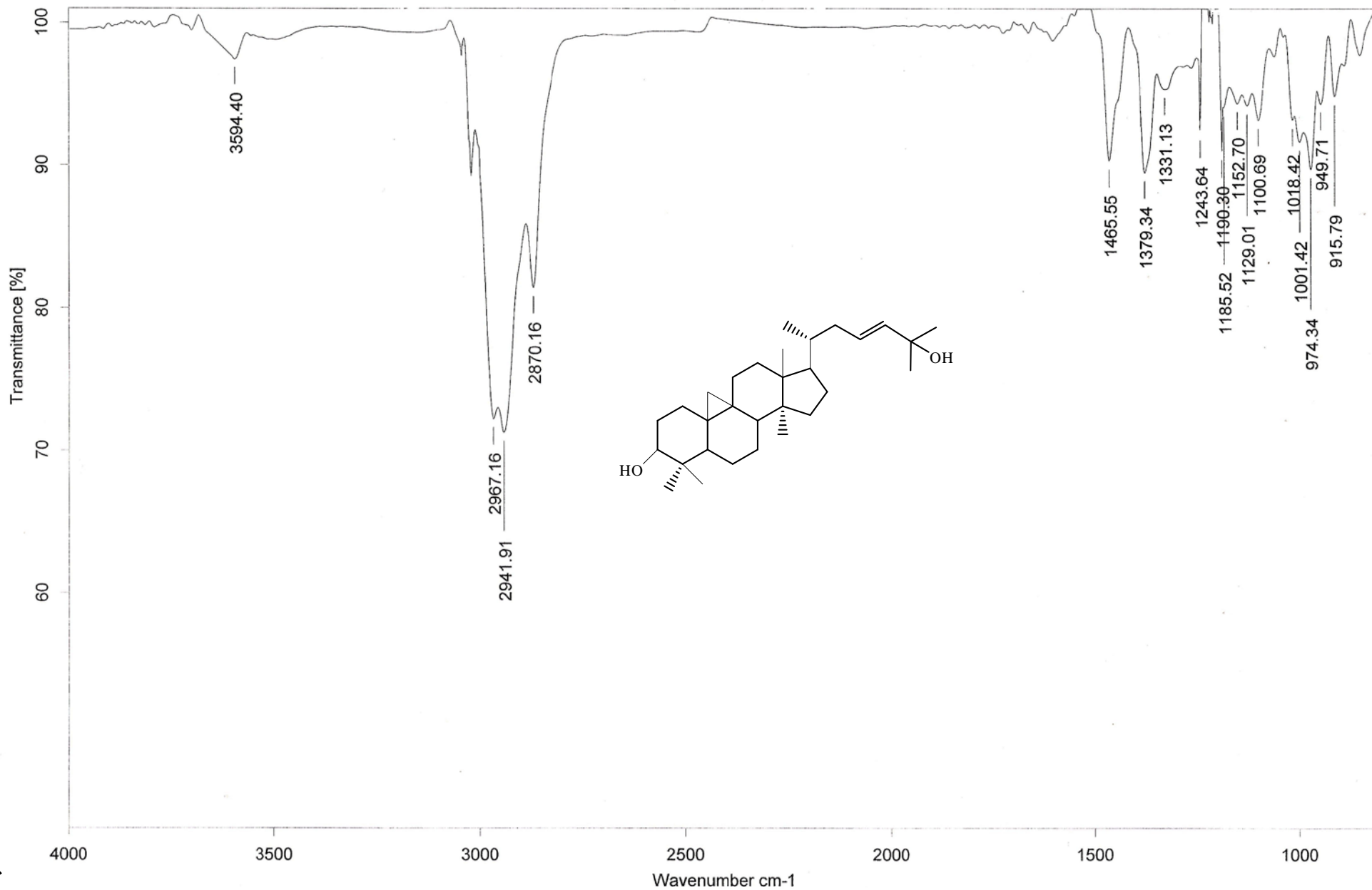
- ¹ Cragg G. M., Newman D. J. y Snader K. *J. Nat. Prod.* **60**, 52-60, 1997.
- ² Martínez W. J., Ferrucci M. S. Estudio florístico del parque Nacional Mburucuyá con énfasis en: Verbenaceae. Universidad Nacional del Nordeste, Comunicaciones Científicas y Tecnológicas 2005. Resumen B-047. www.unne.edu.ar/Web/cyt/com2005/6-Biologia/B-047.pdf. Última revisión 08 de Octubre del 2009.
- ³ Willmann, Schmidt Eva-María, Heinrich Michael, Rimpler Horst. Volumen 27 de Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán. UNAM, México D.F., 7, 2000.
- ⁴ Jiménez-Ferrer J. E., Pérez-Terán Y. Y., Román-Ramos R., Tortoriello J. *Phytomedicine*. **12**, 116-122, 2005.
- ⁵ Costa V. B., Coube C. S., Marinho B. G., Matheus M. E., Leitao S. G., Fernandes P. D. *Fitoterapia*. **74**, 364-371, 2003.
- ⁶ Pungitore C. R., García M., Gianello J. C., Sosa M. E., Tonn C. E. *J. Stored Prod. Res.* **41**, 433–443, 2005.
- ⁷ Amador, Sonia. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México D.F., 2007.
- ⁸ Pascual, M. E. Slowing, K., Carretero, E., Sanchez Mata, D., Villar, A., J. *Ethnopharmacol.* **76**, 201-204, 2001
- ⁹ Geyid A., Abebe D., Debella A., Makonnen Z., Aberra F., Teka F., Kebede T., Urga K., Yersaw K., Biza T., Mariam B. H., Guta M. *J. Ethnopharmacol.* **97**, 421–427, 2005.

- ¹⁰ Elakovich S. D., Oguntimein B. O. *J. Nat. Prod.* **50**, 503-506, 1987.
- ¹¹ Oliveira D. R., Leitao G. G., Santos S., Bizzo H., Lopes D., Alviano C. S., Alviano D. A., Leitao S. G. *J. Ethnopharmacol.* **108**, 103–108, 2006.
- ¹² Duarte M. C. Leme E. E.; Delarmelina C., Soares A. A., Figueria G. M., Sartoratto A. *J. Ethnopharmacol.* **111**, 197–201, 2007.
- ¹³ Hennebelle T., Sahpaz S., Joseph H., Bailleul F. *J. Ethnopharmacol.* **116** 211–222, 2008.
- ¹⁴ Hegde V. R., Pu H., Patel M., Das P. R., Strizki J., Gullo V. P., Chou C-C., Buevich A. V., Chan T. *Bioorgan. Med. Chem. Lett.* **14**, 5339-5342, 2004.
- ¹⁵ Teixeira M., Figueira G. M., Sartoratto A., García V. L., Delarmelina C. *J. Ethnopharmacol.* **97**, 305-311, 2005.
- ¹⁶ Rocha-Guzman N. E., Gallegos-Infante J. A., González-Laredo R. F., Ramos-Gómez M., Rodríguez-Muñoz M. E., Reynoso-Camacho R., Rocha-Uribe A., Roque-Rosales M. R. *Food. Chem.* **102**, 330-335, 2007.
- ¹⁷ Mevy J. P., Bessiere J. M., Dherbomez M., Millogo J., Viano J. *Food Chem.* **101**, 682–685, 2007.
- ¹⁸ Bassole I. H. N., Ouattara A. S., Nebie R., Quattara C. A. T., Kabore Z. I., Traore S. A. *Phytochemistry.* **62**, 209-212, 2003.
- ¹⁹ Hernández-Arteseros J. A., Vila R., Cañigueral S. *J. Essent. Oil Res.* **18**, 6-9, 2006.
- ²⁰ Bilia A. R., Giomi M., Innocenti M., Gallori S., Vincieri F. F. *J. Pharmaceut. Biomed.* **46**, 463-470, 2008.
- ²¹ Argyropoulou C., Daferera D., Terantilis P. A., Fasseas C., Polissiou M. *Biochem. Syst. Ecol.* **35**, 831-837, 2007.

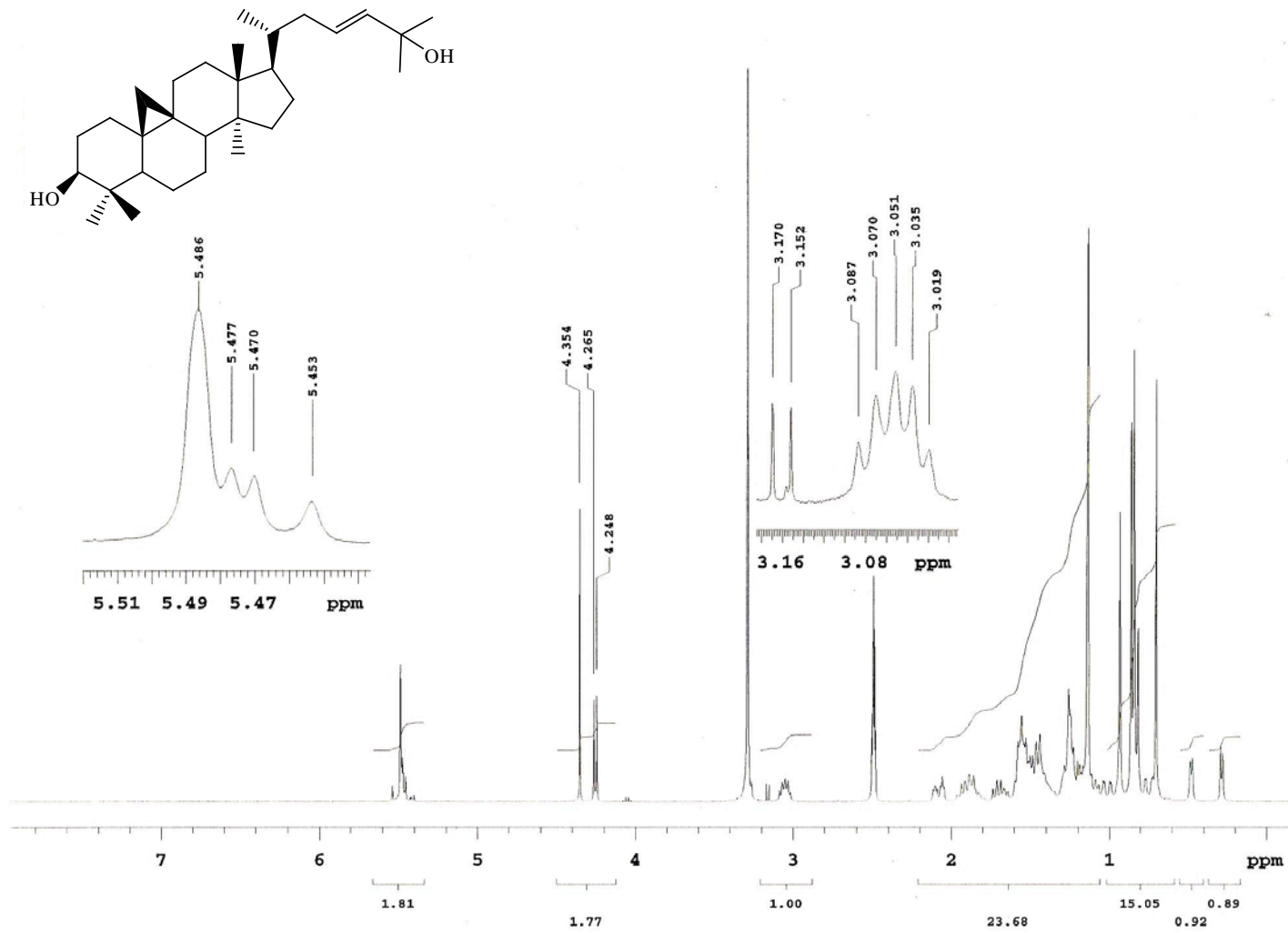
- ²² Romeo F. V., De Luca S., Piscopo A., Poiana M. *J. Essent. Oil Res.* **20**, 373-379, 2008.
- ²³ Görnemann T., Noyal R. Pertz H. H., Melzing M. F. *J. Ethnopharmacol.* **117**, 166-169, 2008.
- ²⁴ Abe F., Nagao T. Okabe H. *Biol. Pharm. Bull* **25**, 920-922, 2002.
- ²⁵ Souto-Bachiller F. A., De Jesús-Echevarría M., Cárdenas-González O. E., Acuña-Rodríguez M. F., Meléndez P. A., Romero-Ramsey L. *Phytochemistry*, **44**, 1077-1086, 1997.
- ²⁶ Compadre C. M., Hussain R. A., Lopez de Compadre L., Pezzuto J. M., Kinghorn A. D. *J. Agr. Food Chem.* **35**, 273-279, 1987
- ²⁷ Marreto R. N., Almeida E. E. C. V., Alves P. B., Niculau E. S., Nunes R. S., Matos C. R. S., Araújo A. A. S. *Thermochim. Acta.* **475**, 53-58, 2008.
- ²⁸ Lima M. C. L., Lemos T. L. G., Pessoa O. D. L., Santiago G. M. P., Matos F. J. A., Arriaga A. M. C., Oliveira J. P. P., Sant'ana A. E. G. *Chem. Nat. Compd.* **44**, 254-256, 2008.
- ²⁹ Fricke C., Hardt I. H., Köning W. A., Joulain D., Zygadlo J. A., Guzman C. A. *J. Nat. Prod.* **62**, 694-969, 1999.
- ³⁰ Mujovo S. F., Hussein A. A., Meyer J. J. M., Fourie B., Muthivhi T., Lall N. *Nat. Prod. Res.* **22**, 1047-1054, 2008.
- ³¹ Samie A., Housein A., Lall N., Meyer J. J. M. *Ann. Trop. Med. Parasit.* **103**, 427-439, 2009.
- ³² Juliani H. R. Jr., Koroch A. R., Juliani H. R., Trippi V. S., Zygadlo J. A. *Biochem. Syst. Ecol.* **30**, 163-170, 2002.

- ³³ Duschatzky C. B., Martinez A. N., Almeida N. V., Bonivardo S. L. *J. Essent. Oil Res.* **16**, 626-628, 2004.
- ³⁴ Abena A. A., Diatewa M., Gakosso G., Gbeassor M., Hondi-Assah Th., Ouamba J. M. *Fitoterapia.* **74**, 231-236, 2003.
- ³⁵ Kanko C., Koukoua G., N' Guessan Y. T., Fournier J., Pradère J. P., Toupet L. *C. R. Chimie.* **7**, 1029–1032, 2004.
- ³⁶ Tomás-Barberán F. A., Harborne J. B., Self R. *Phytochemistry.* **26**, 2281-2284, 1987.
- ³⁷ Durairaj A., Vaiyapuri T. S., Kanti M. U., Malaya G. *Iranian J. Pharmacology & Therapeutics.* **7**, 83-89, 2008.
- ³⁸ Oliveira D. R., Leitão G. G., Bizzo H. R., Lopes D., Alviano D. S., Alviano C. S., Leitão S. G. *Food Chem.* **101**, 236-240, 2007.
- ³⁹ Anderson L. A. P. Koch W. T. de, Enslin P. R. *J. S. Afr. Chem. I.*, **14**, 58-63, 1961.
- ⁴⁰ Barton D. H. R., De Mayo P. *J. Chem Soc.* 887-900, 1954.
- ⁴¹ Ngassoum, M. B., Mapongmetsem P. M., Tatsadjeu L., Jirovetz L., Buchbauer G., Shahabi M. *J. Essent. Oil Res.* **17**, 492-495, 2005.
- ⁴² Fontenelle R. O. S., Morais S. M., Brito E. H. S., Kerntopf M. R., Brilhante R.S., Cordeiro R. A., Tomé A. R., Queiroz M. G. R., Nascimento N. R. F., Sidrim J. J. C., Rocha M. F. G. *J. Antimicrob. Chemoth.* **59**, 934–940, 2007.
- ⁴³ Costa S. M. O., Lemos T. L. G., Pessoa O. D. L., Pessoa C., Montenegro R. C., Braz-Filho R. *J. Nat. Prod.* **64**, 792-795, 2001.
- ⁴⁴ Oliveira V. C., Moura D. M. S., Lopes J. A. D., de Andrade P. P., da Silva N. H., Figueiredo R. C. B. Q. *Parasitol Res.* **104**, 1053–1059, 2009.

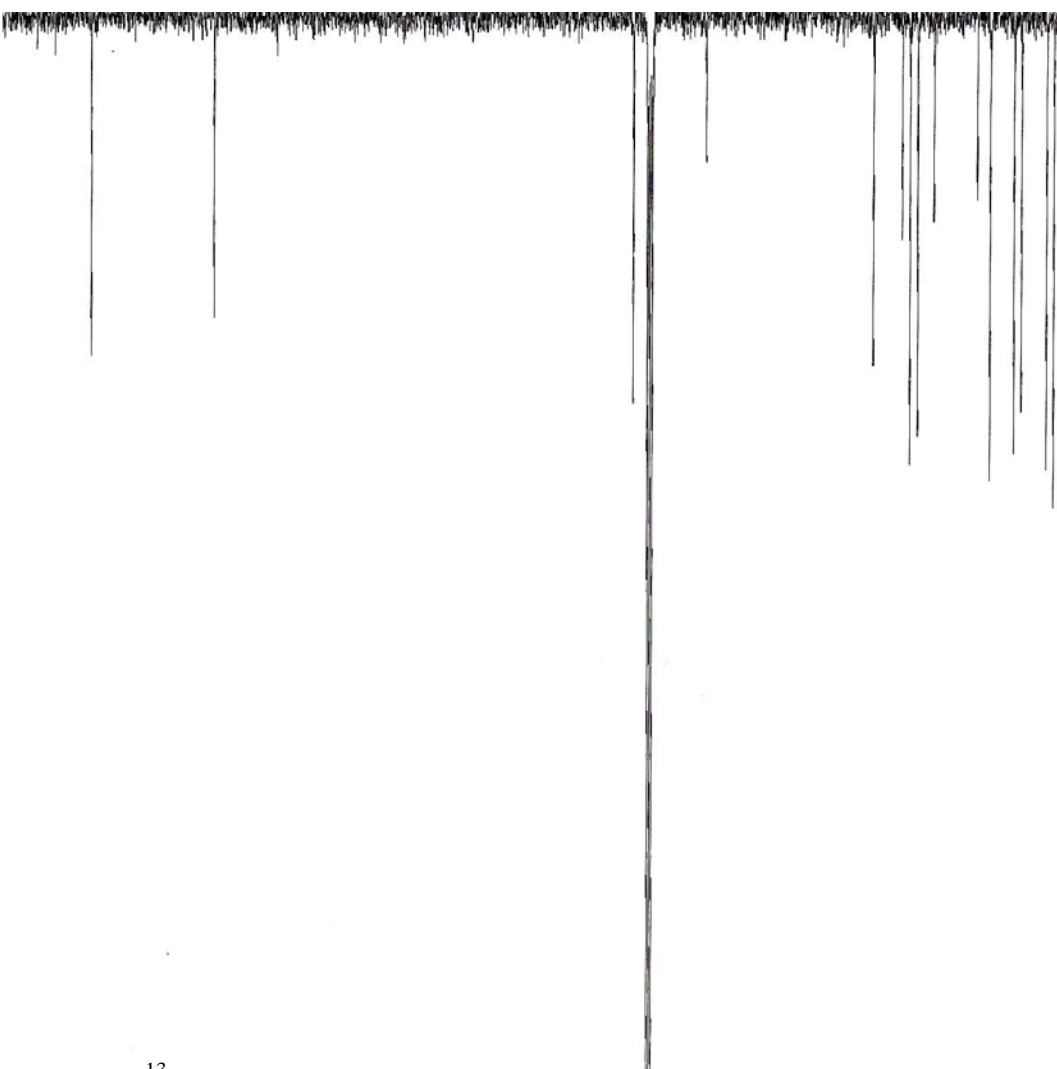
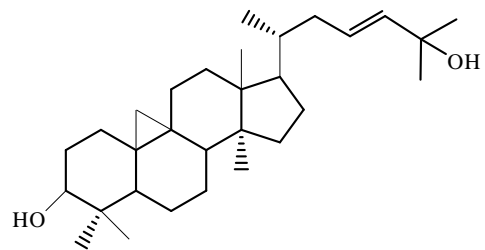
- ⁴⁵ Fernandes L. P., Oliveira W.P., Sztatisz J., Novák Cs. *J. Therm. Anal. Calorim.* **94**, 461-467, 2008.
- ⁴⁶ Lemos T. L. G., Costa S. M. O., Pessoa O. D. L., Braz-Filho R. *Magn. Reson. Chem.* **37**, 908-911, 1999.
- ⁴⁷ Grundy D. L., Still C. C. *Pestic. Biochem. Phys.* **23**, 378-382, 1985.
- ⁴⁸ Grundy D. L., Still C. C. *Pestic. Biochem. Phys.* **23**, 383-388, 1985.
- ⁴⁹ Hernández N. E., Tereschuck M. L., Abdala L. R. *Journal of Ethnopharmacol.* **73**, 317-322, 2000.
- ⁵⁰ Wächter G. A., Valcic S., Franzblau S. G., Suarez E., Timmermann B., N. *J. Nat. Prod.* **64**, 37-41, 2001.
- ⁵¹ Demo M., Oliva M. de las M., López M. L., Zumino M. P., Zygadlo A. *Pharm. Biol.* **43**, 129-137, 2005.
- ⁵² Ono M., Oda E., Tanaka T., Iida Y., Yamasaki T., Masuoka Ch., Ikeda T., Nohara T. *J. Nat. Med.* **62**, 101-106, 2008.
- ⁵³ Proestos C., Sereli D., Komaitis M. *Food Chem.* **95**, 44–52, 2006.
- ⁵⁴ Knöss, W., Reuter, B. *Pharm Acta Helv.* **73**, 45-52, 1998.
- ⁵⁵ Dewick, Paul M. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach.* John Wiley & Sons, 1998.
- ⁵⁶ Mata, R., Rivero, J. F. *Curso teórico de Farmacognosia. Material Didáctico, Segunda versión.* UNAM, México, **2001**, pp. 140
- ⁵⁷ Dewick, P. M. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach.* John Wiley & Sons, 2da edición, 2000.
- ⁵⁸ Lichtenthaler, H. K. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 47–65, 1999.



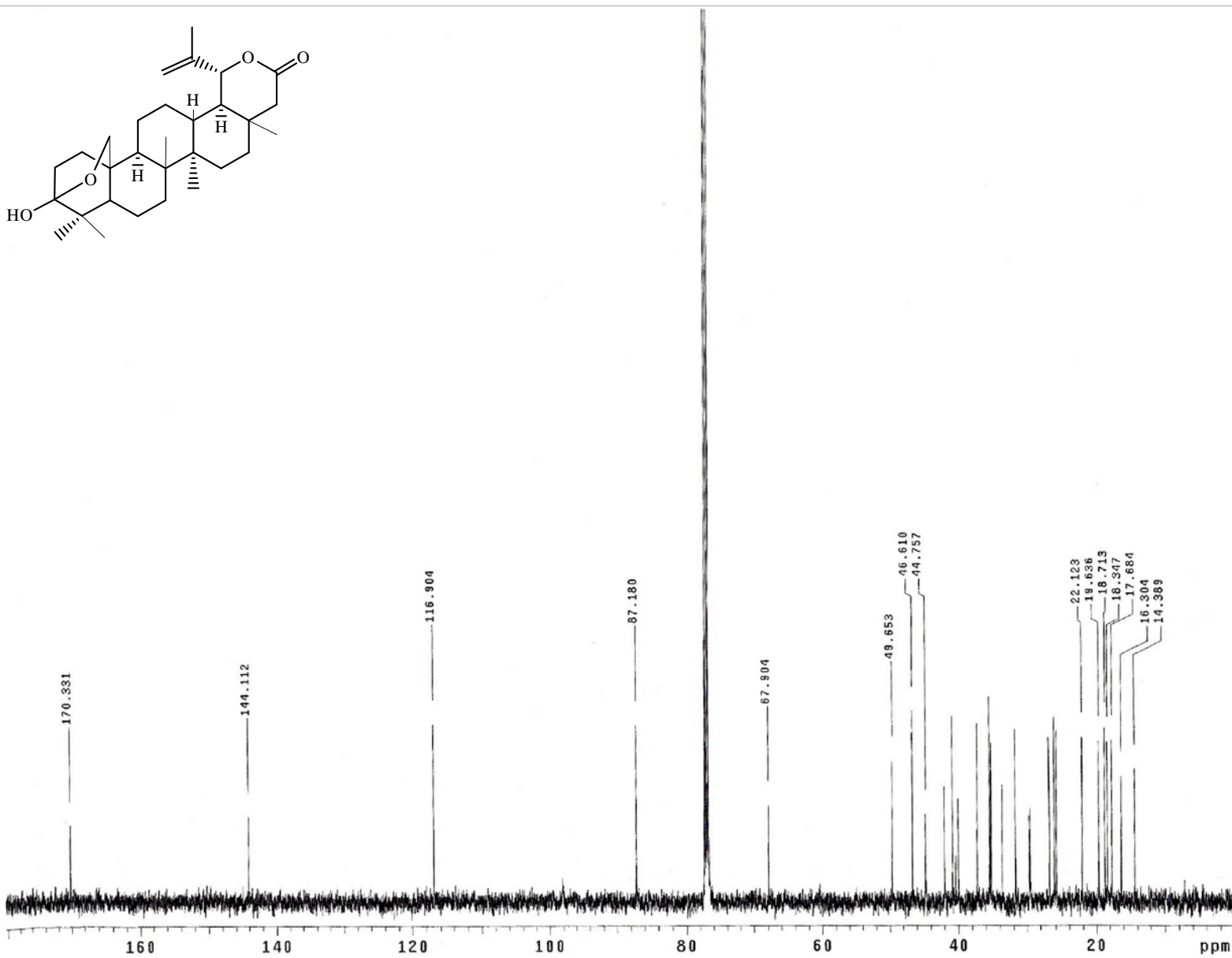
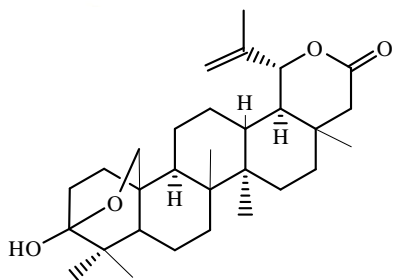
Esquema 1: IR del cicloart-23-en-3β-25-diol (2)



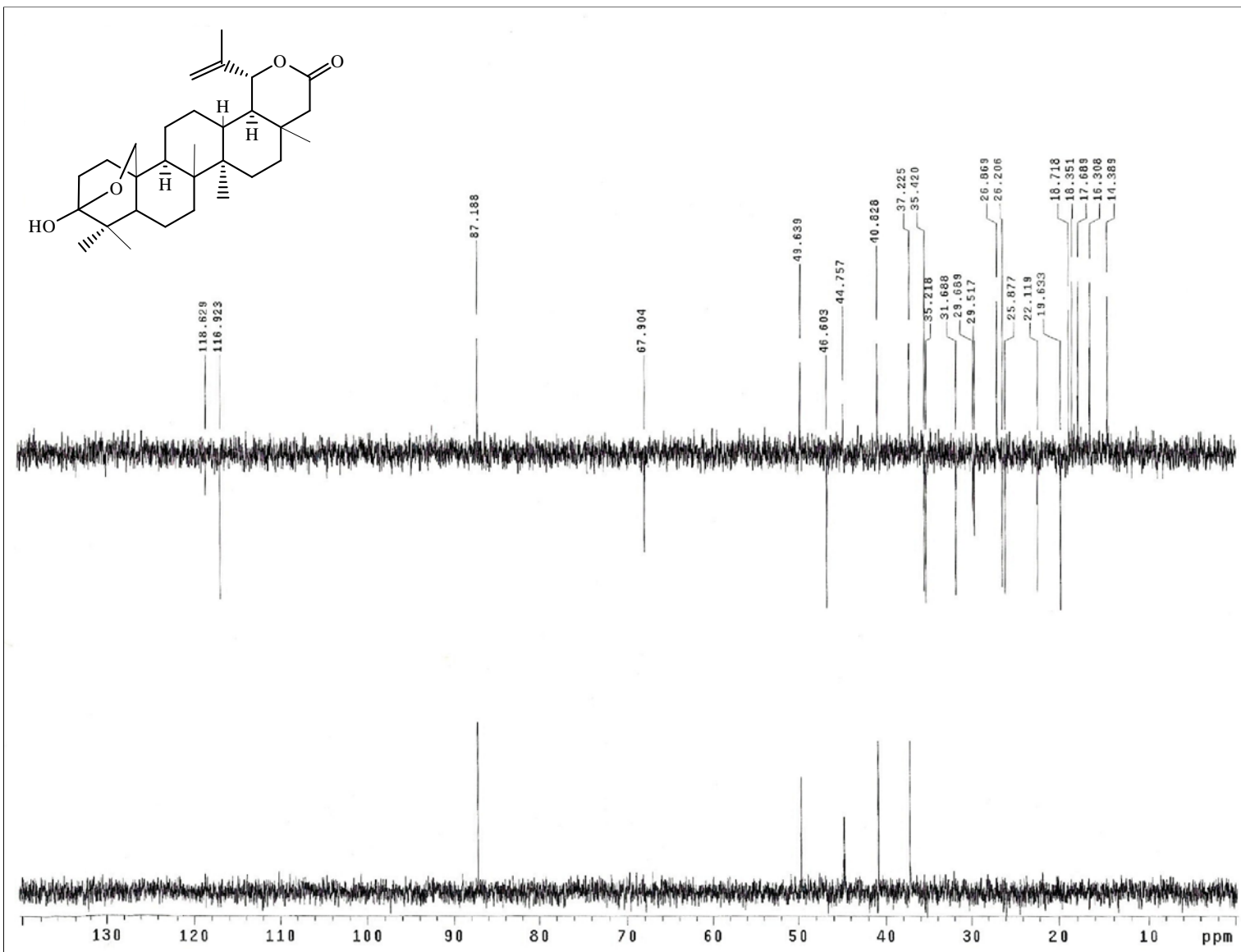
Espectro 2: RMN-¹H del cicloart-23-en-3β, 25-diol (2)



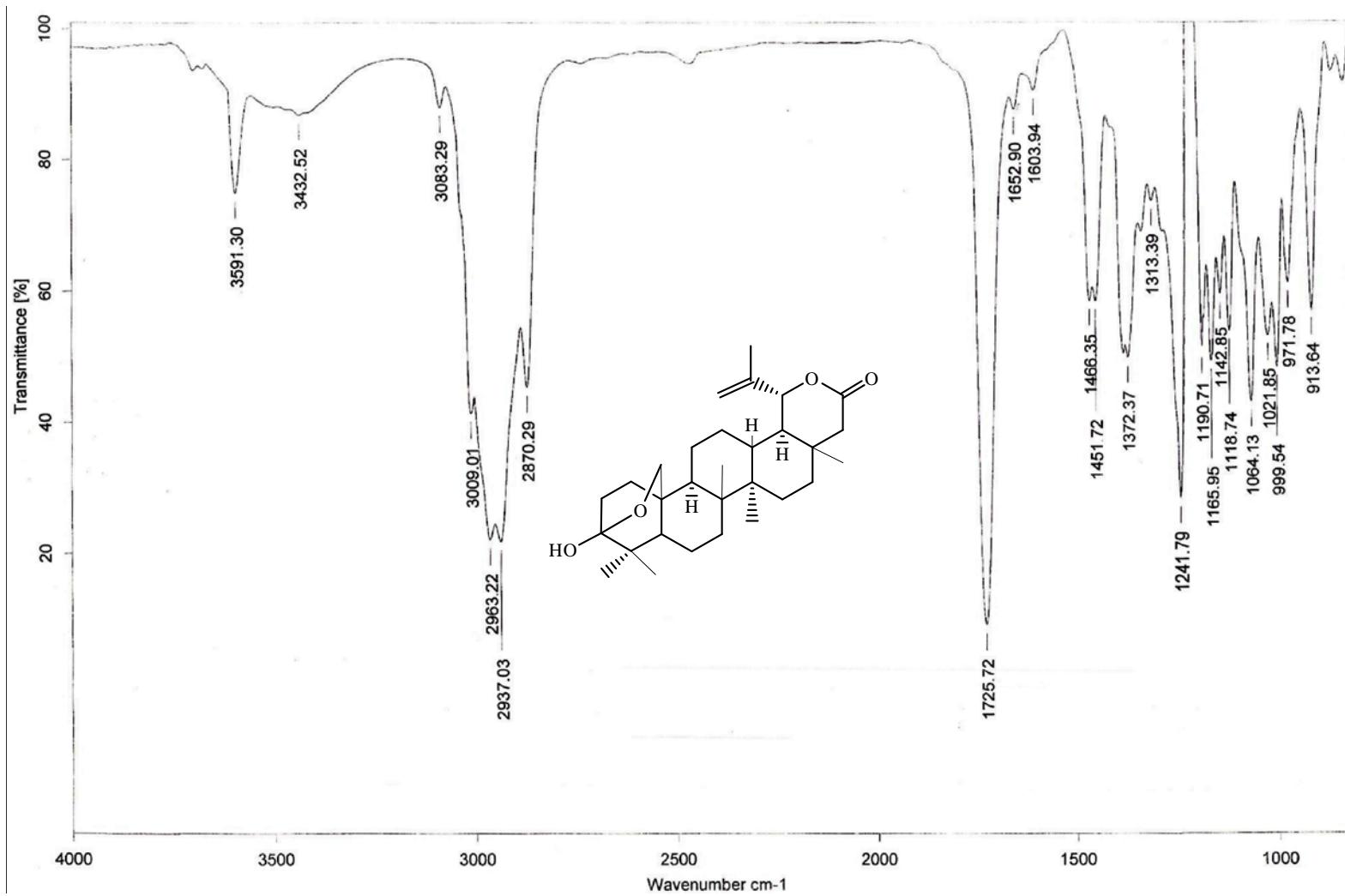
Espectro 3: RMN- ^{13}C del cicloart-23-en-3 β , 25-diol (2)



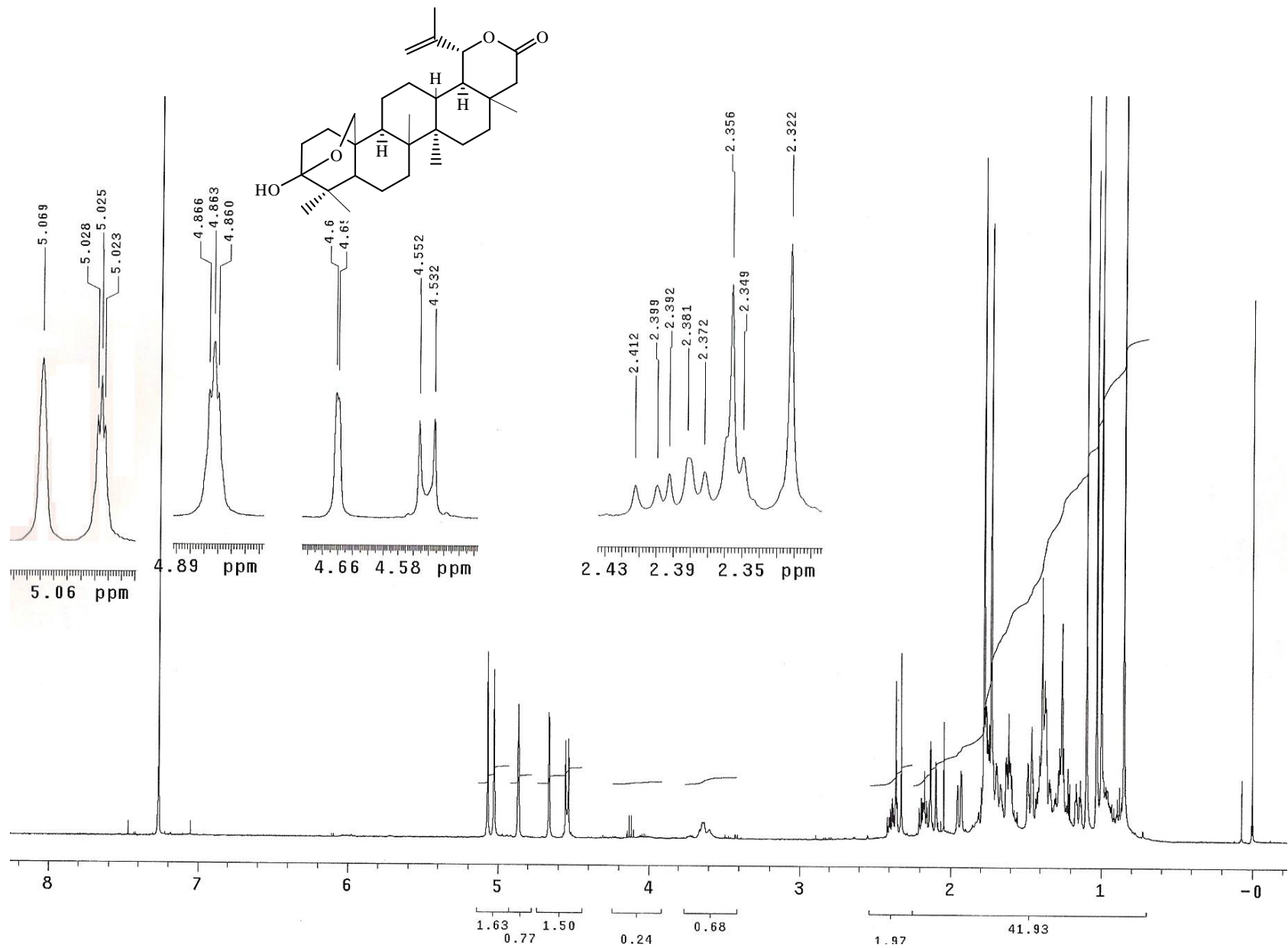
Espectro 4: RMN-¹³C de lippiolida (3)



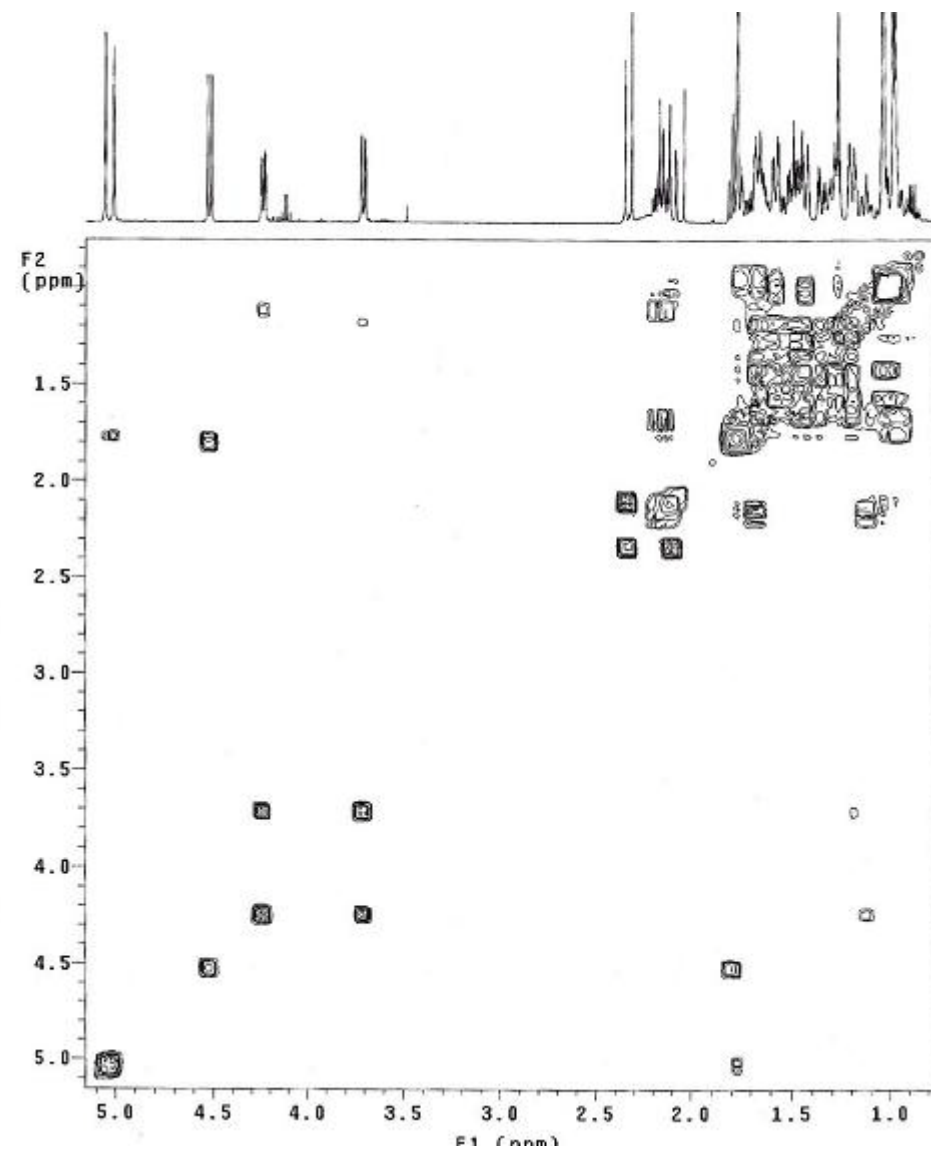
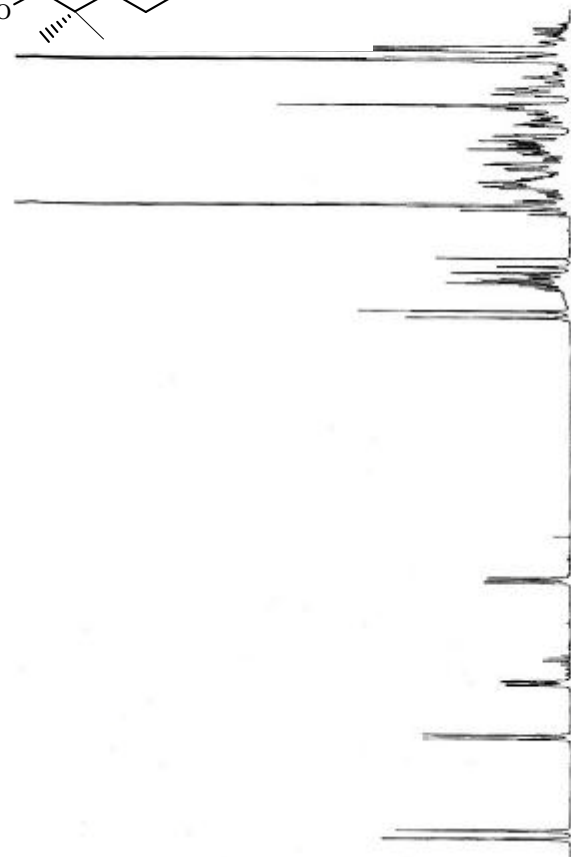
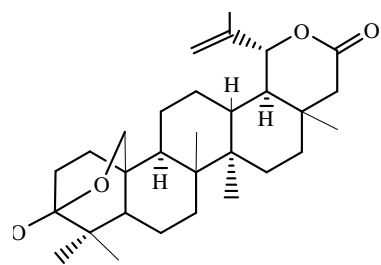
Espectro 5: DEPT de lippiólida (3)



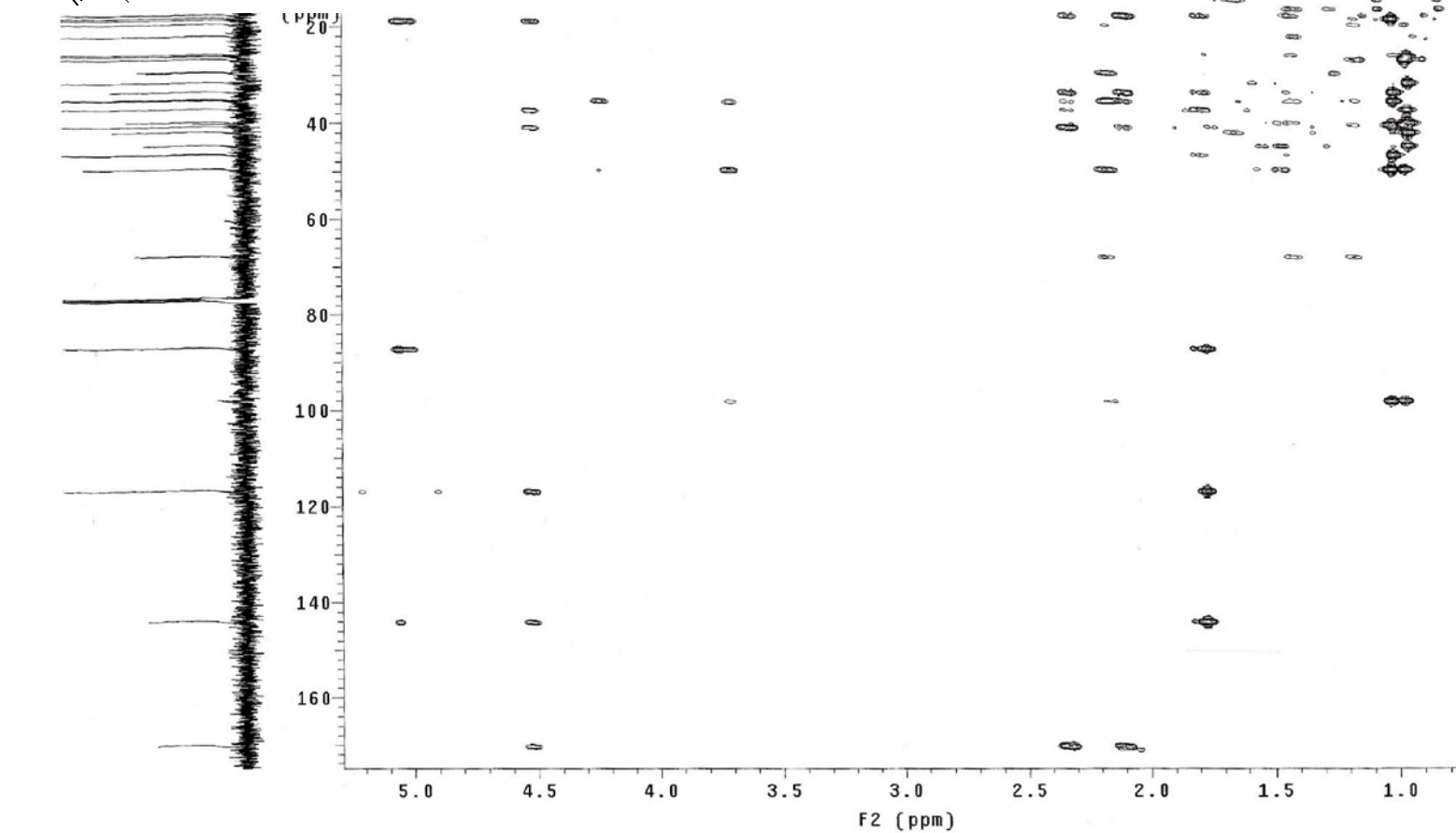
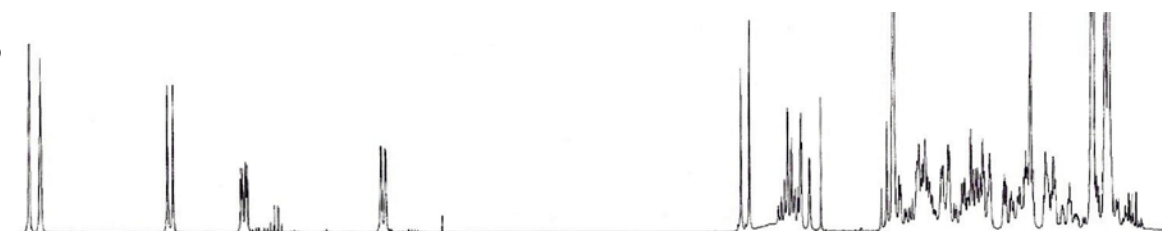
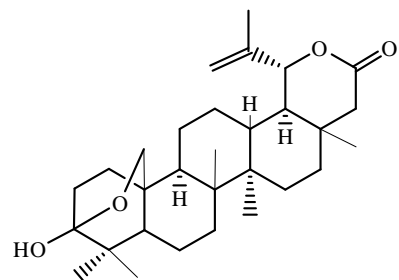
Espectro 6: IR de lippiolida (3)



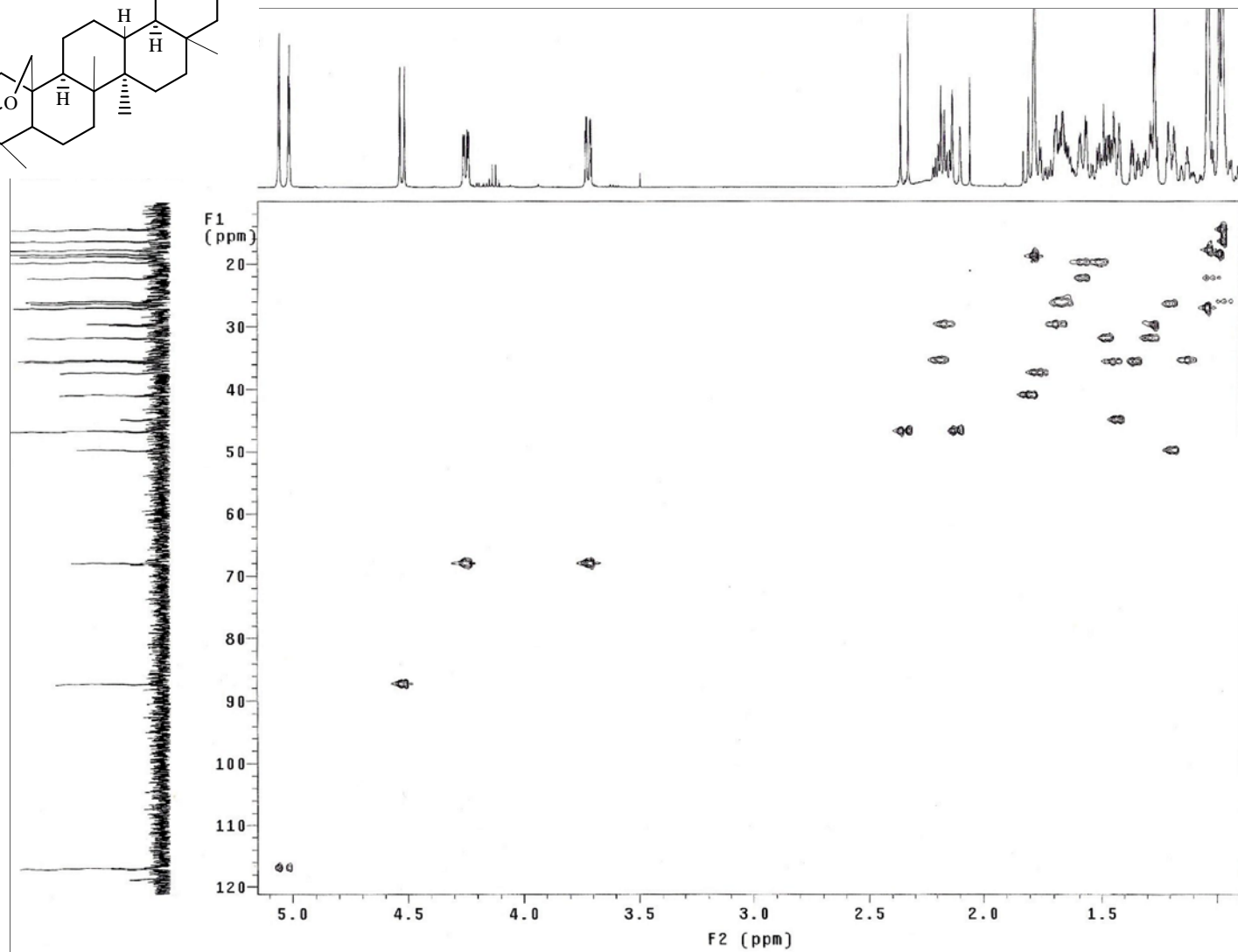
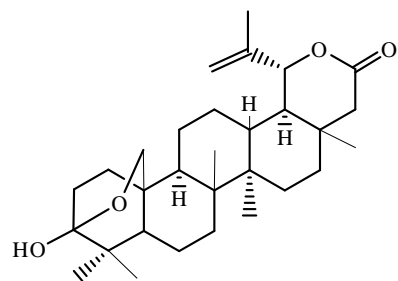
Espectro 7: RMN-H de lippiolida (3)



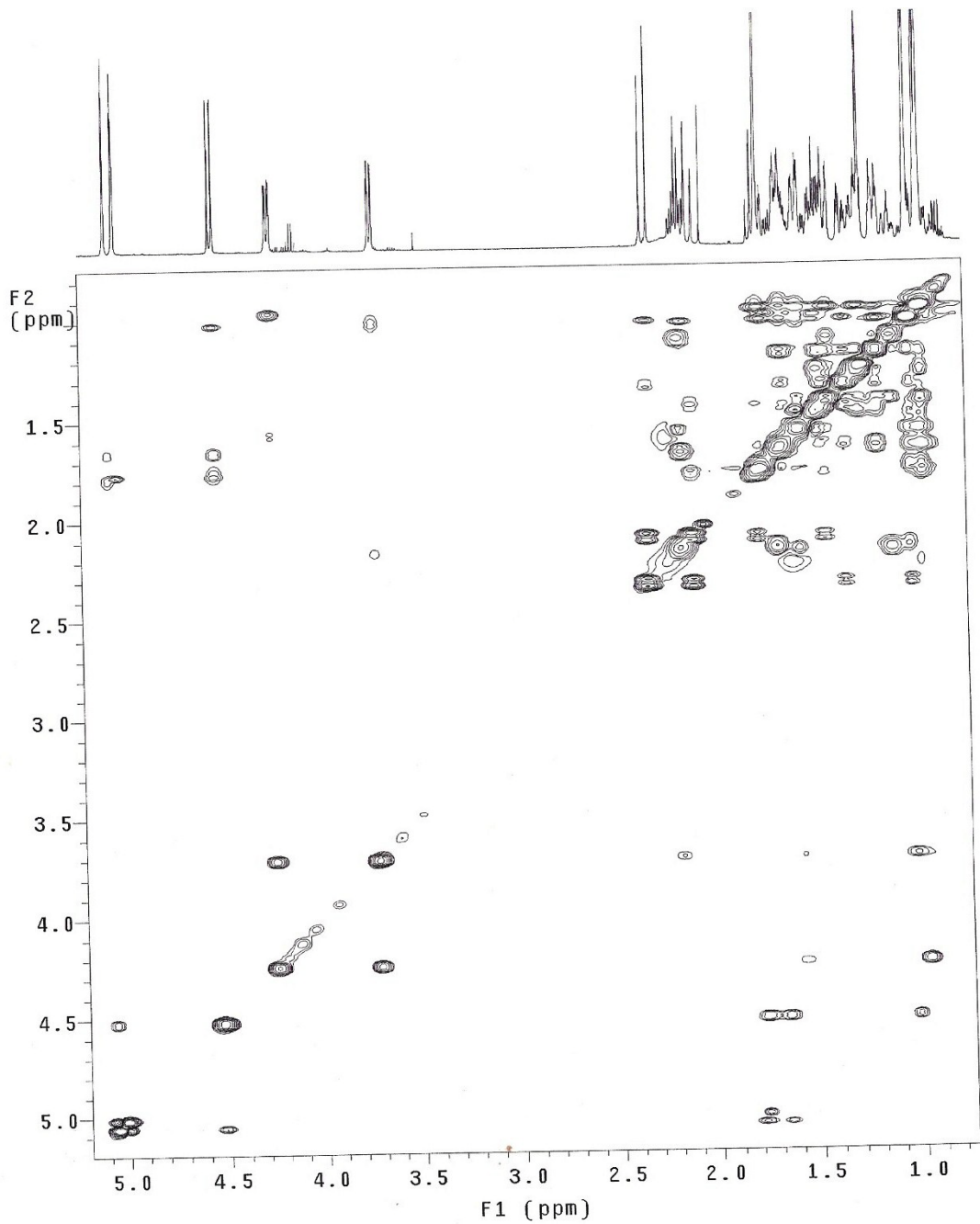
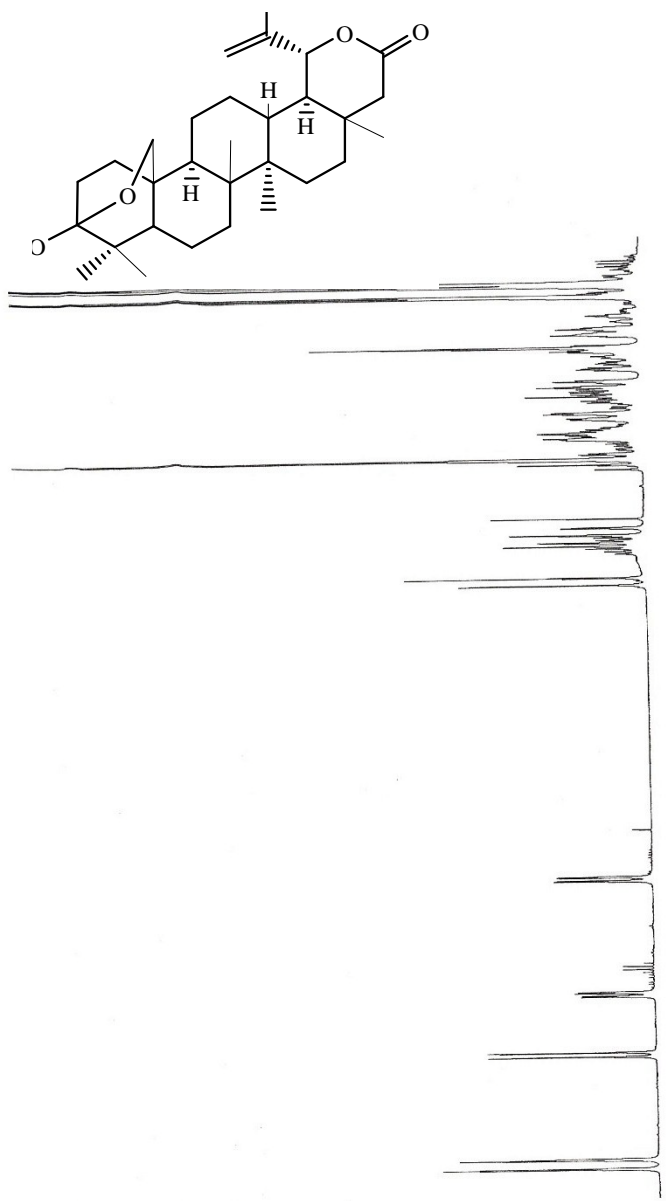
Espectro 8: COSY de lippiolida (3)



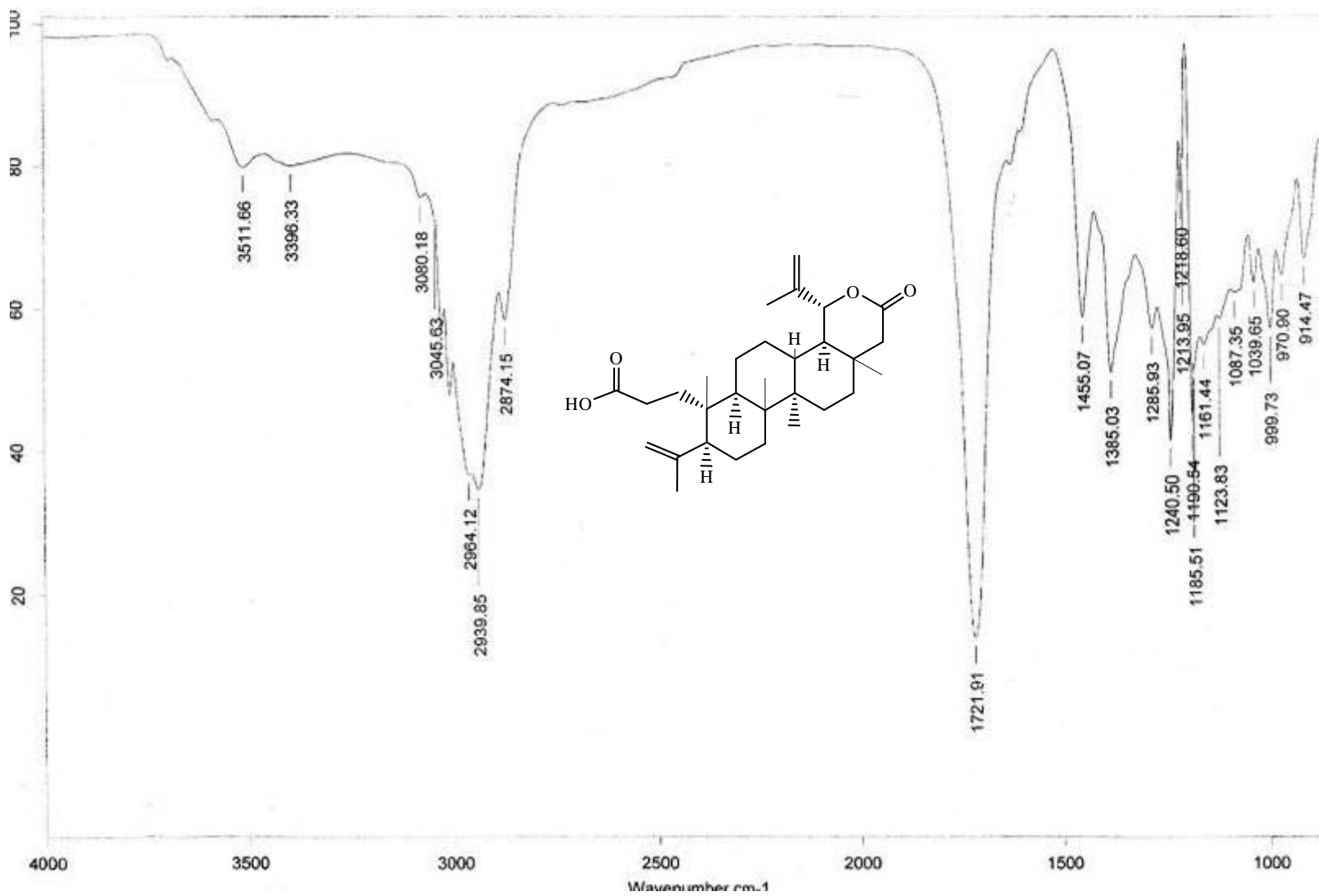
Espectro 9: HMBC de lippiólida (3)



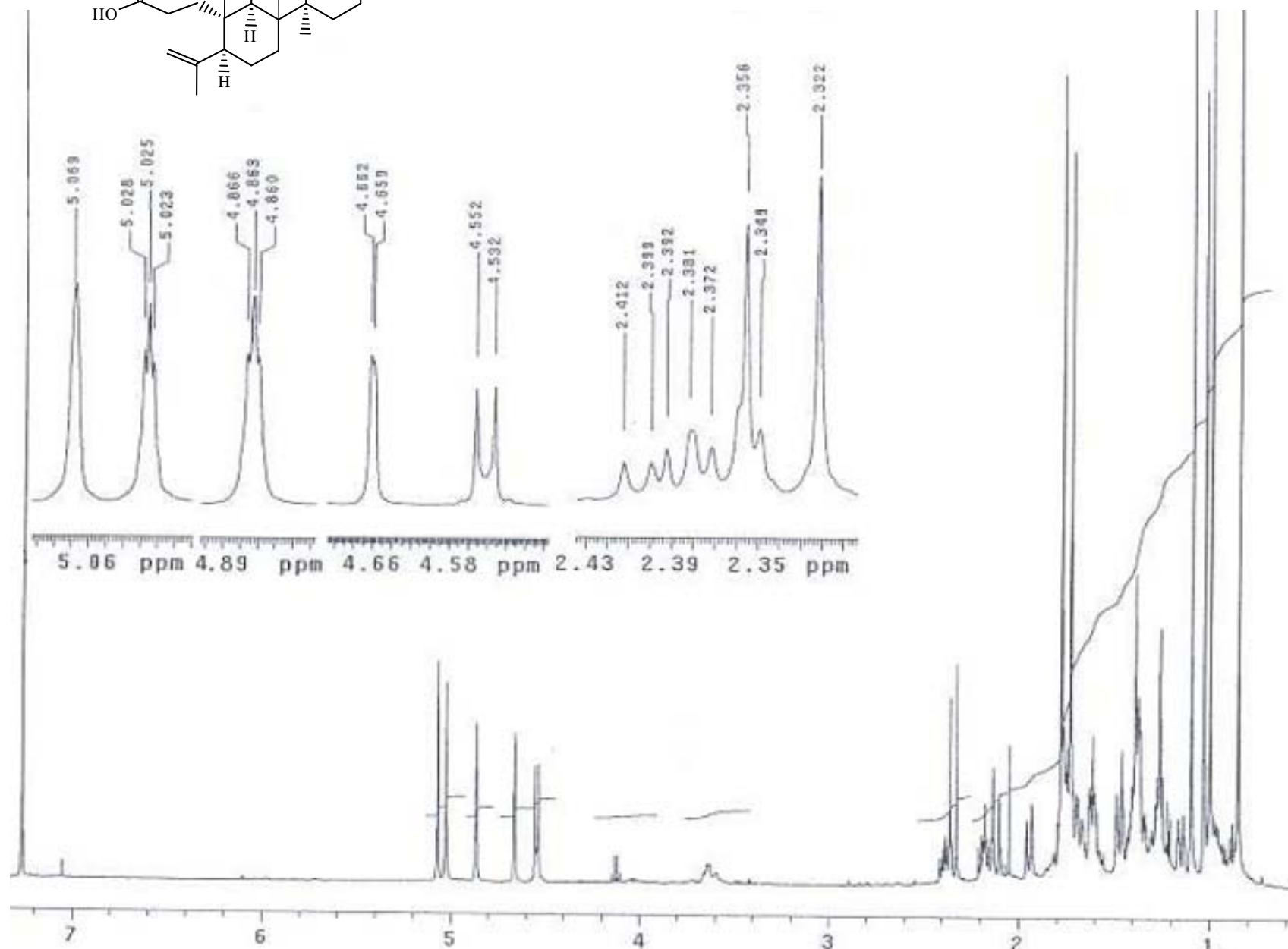
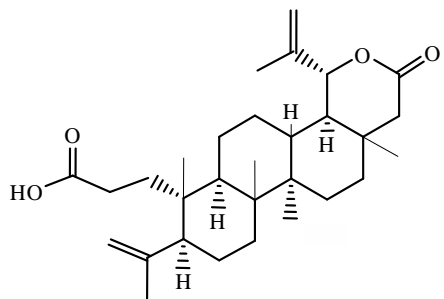
Espectro 10: HSQC de lippiolida (3)



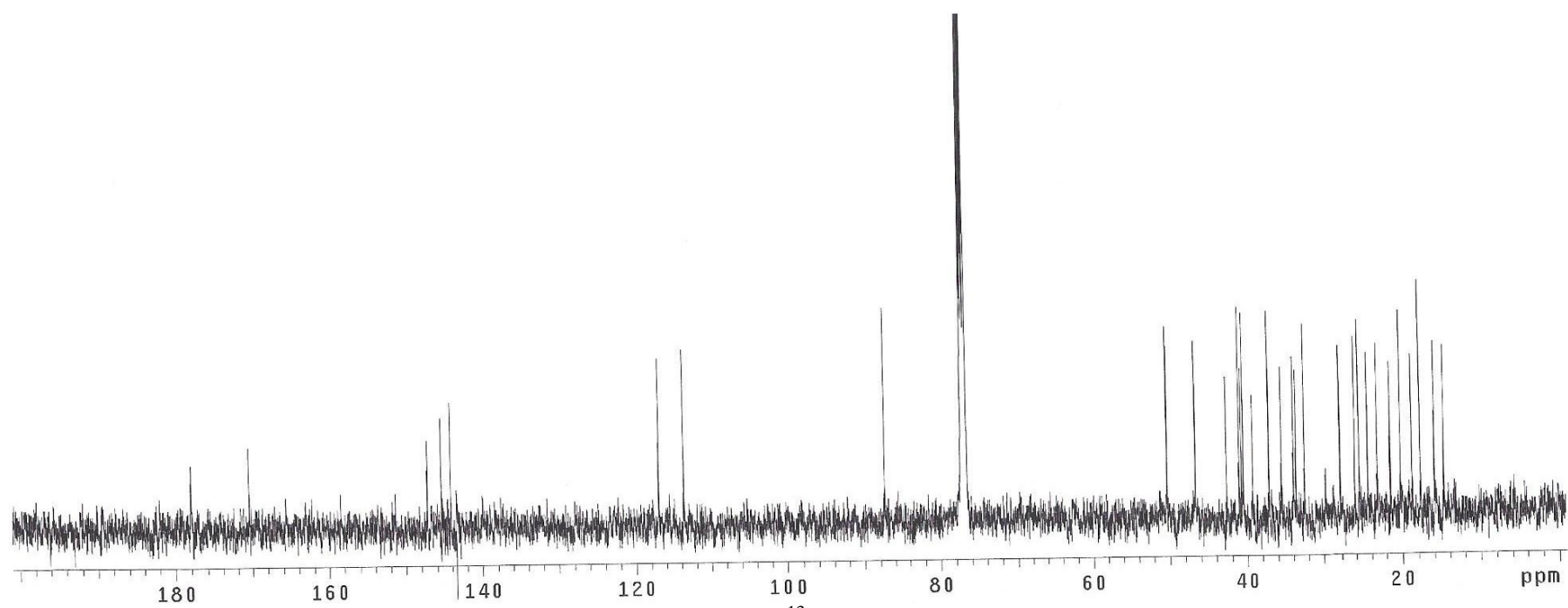
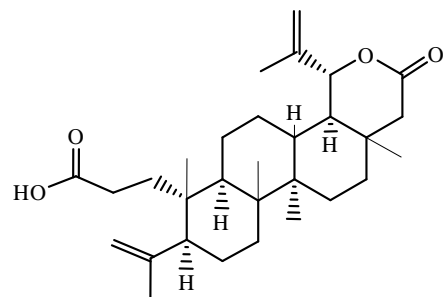
Espectro 11: NOESY de lippiolida (3)



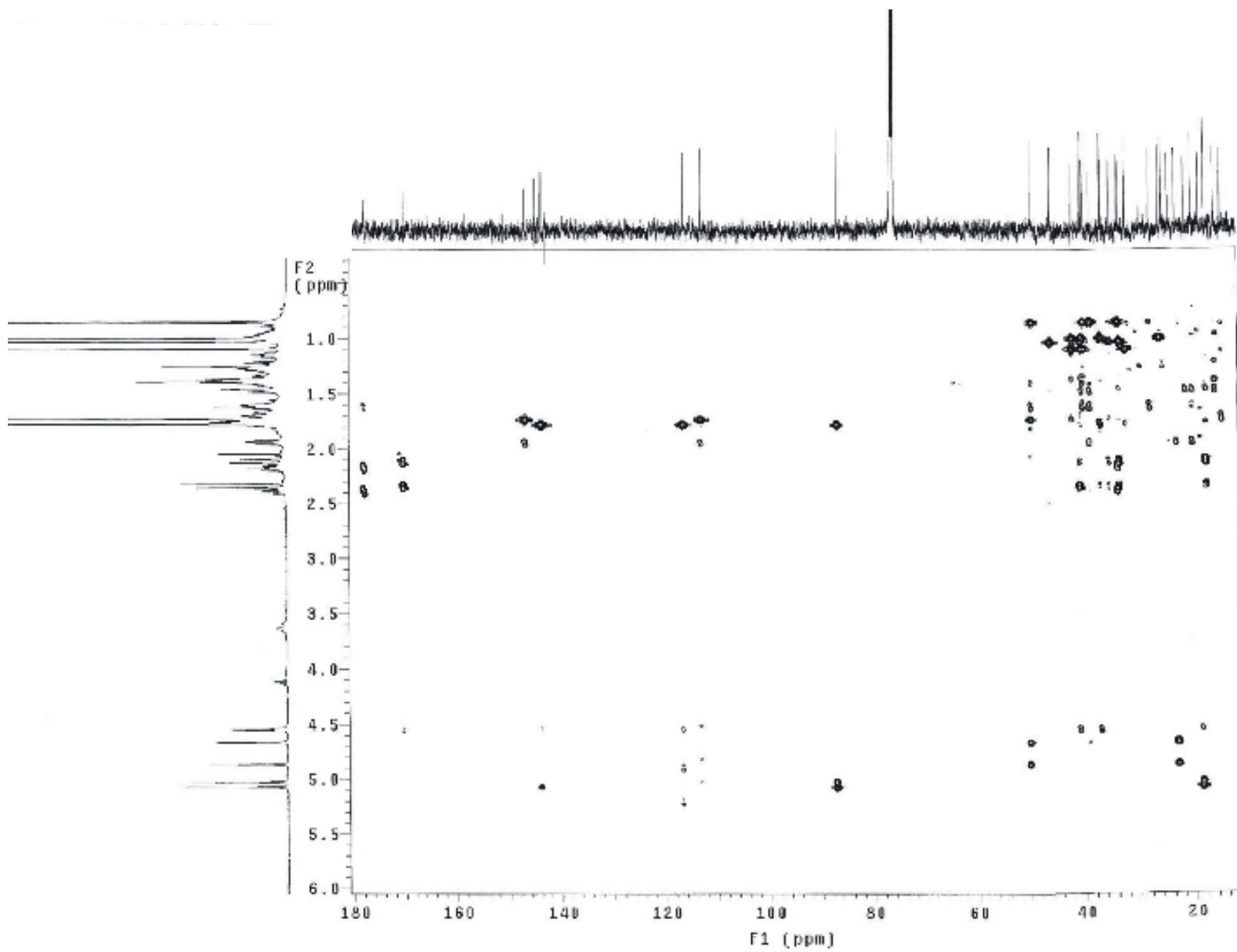
Espectro 13: IR de ácido lippolidóico (4).



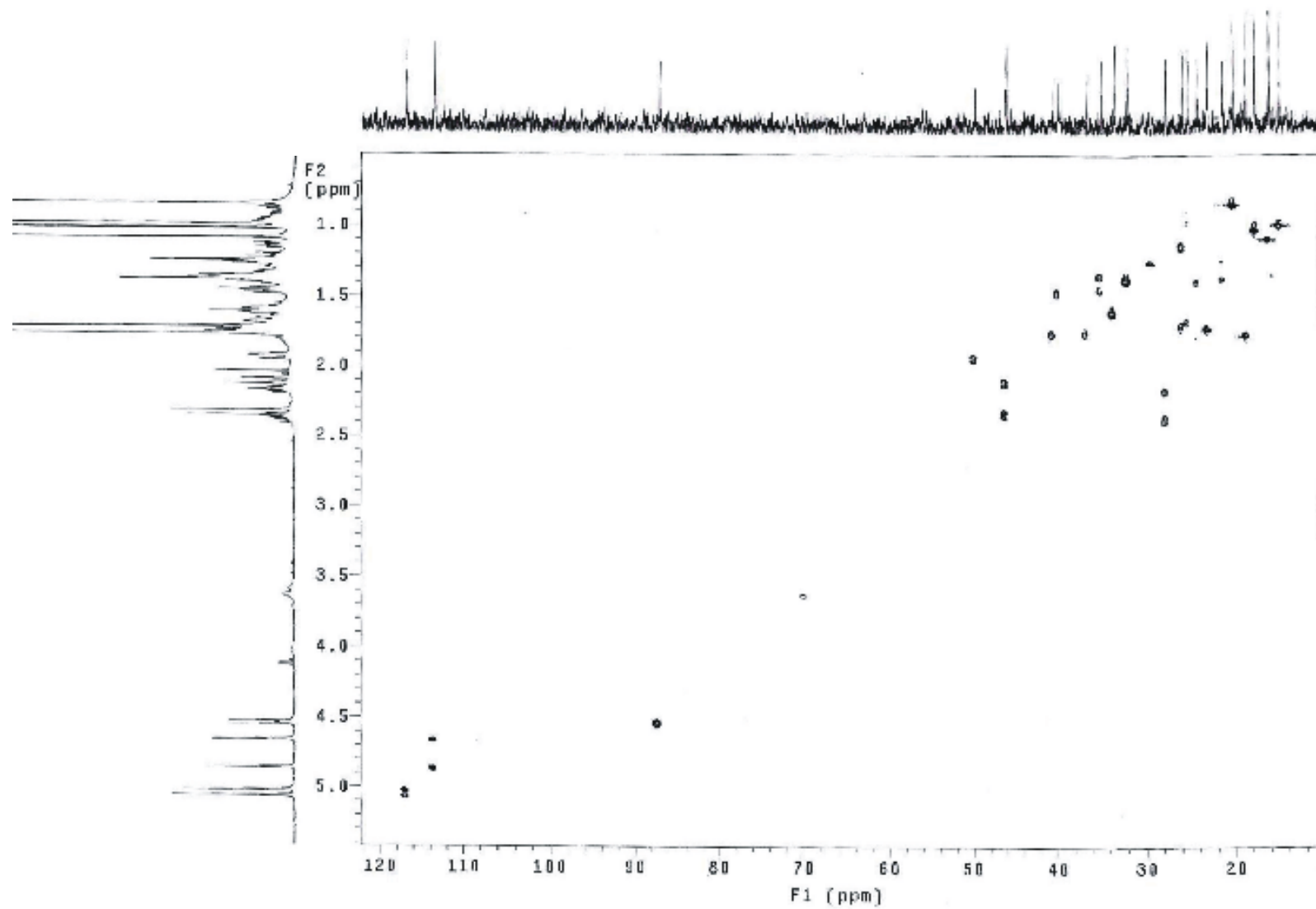
Espectro 14: RMN-¹H de ácido lippolidólico (4).



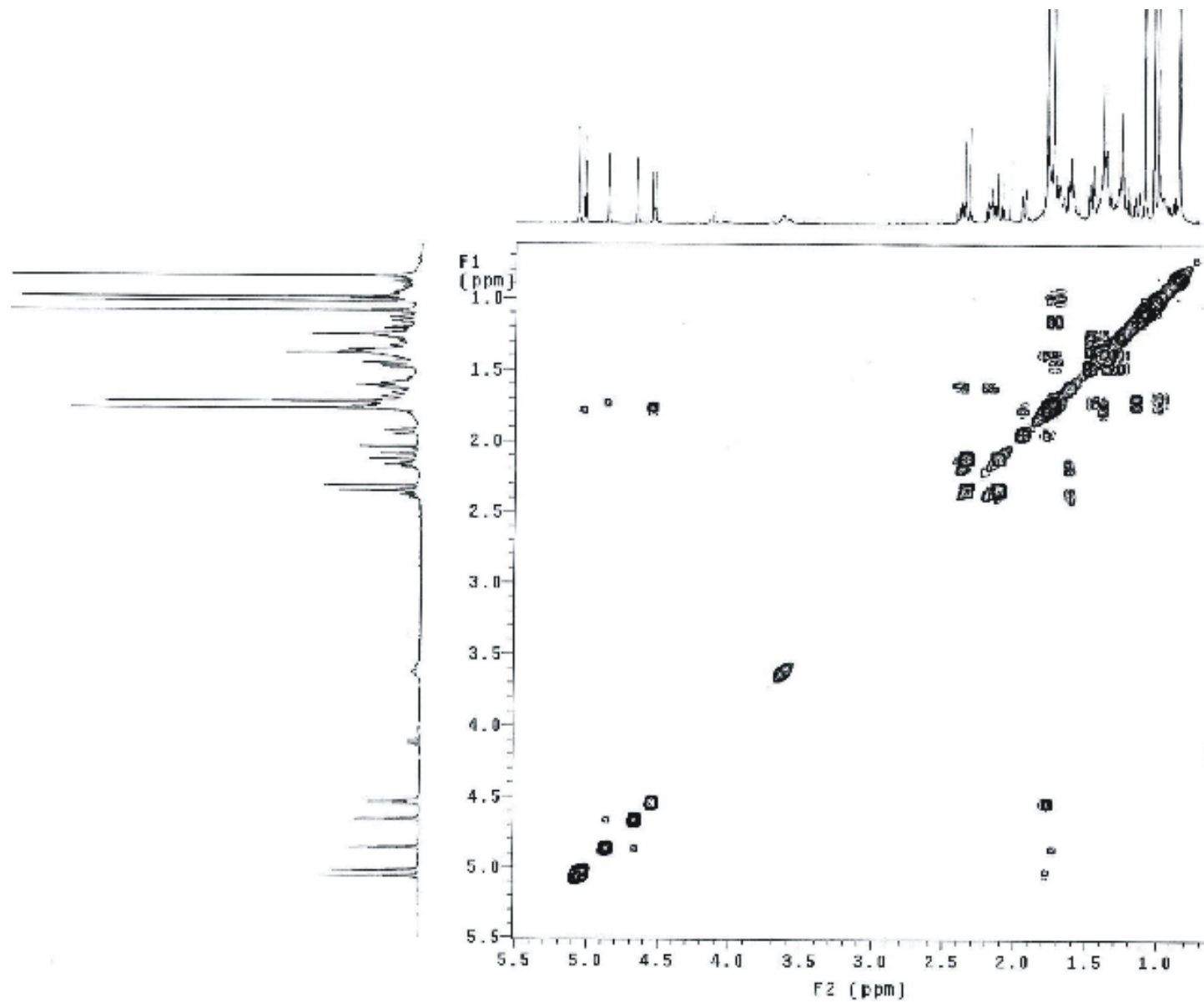
Espectro 15: RMN- ^{13}C de ácido lippolidólico (4).



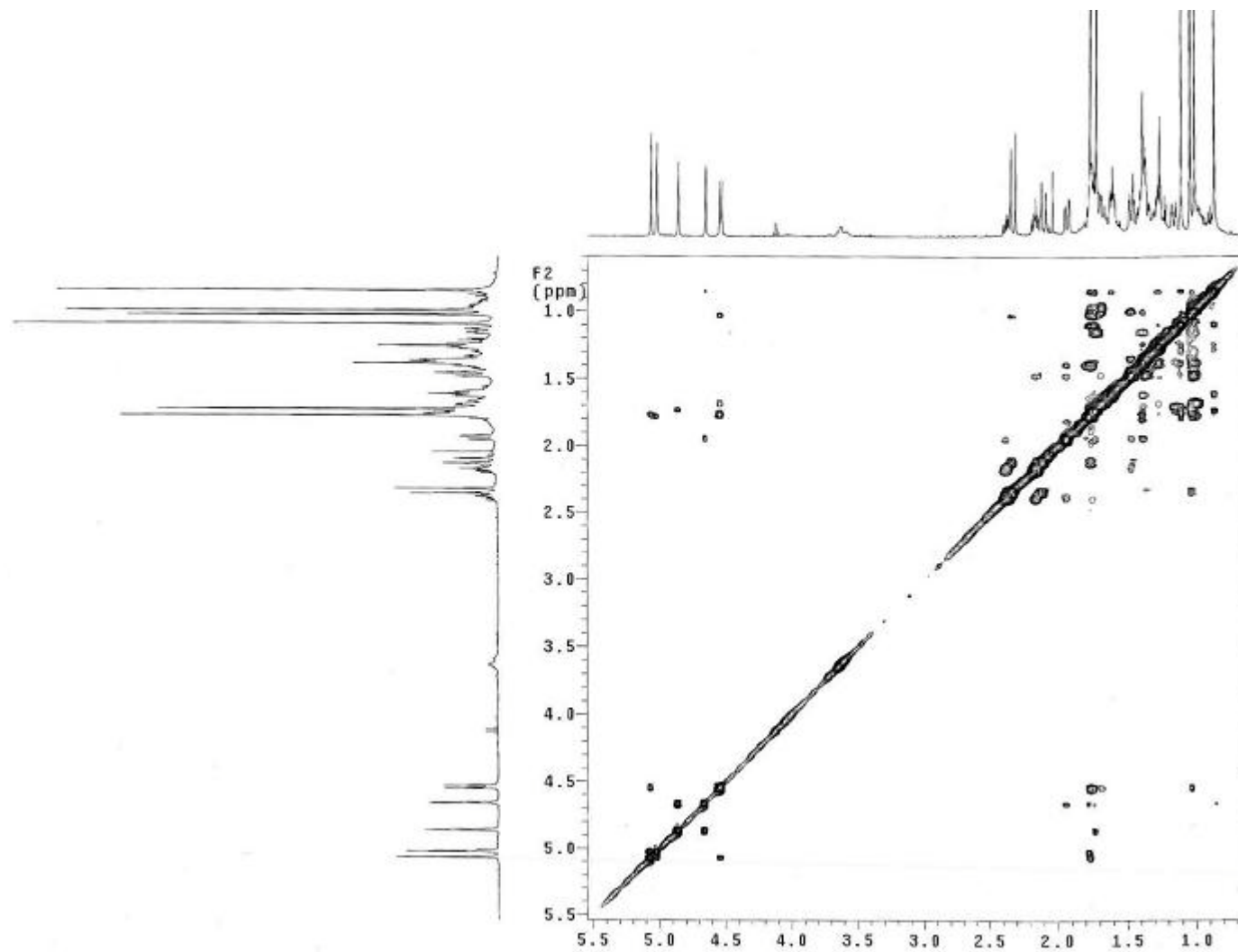
Espectro 16: HMBC ácido lipiolidólico (4).



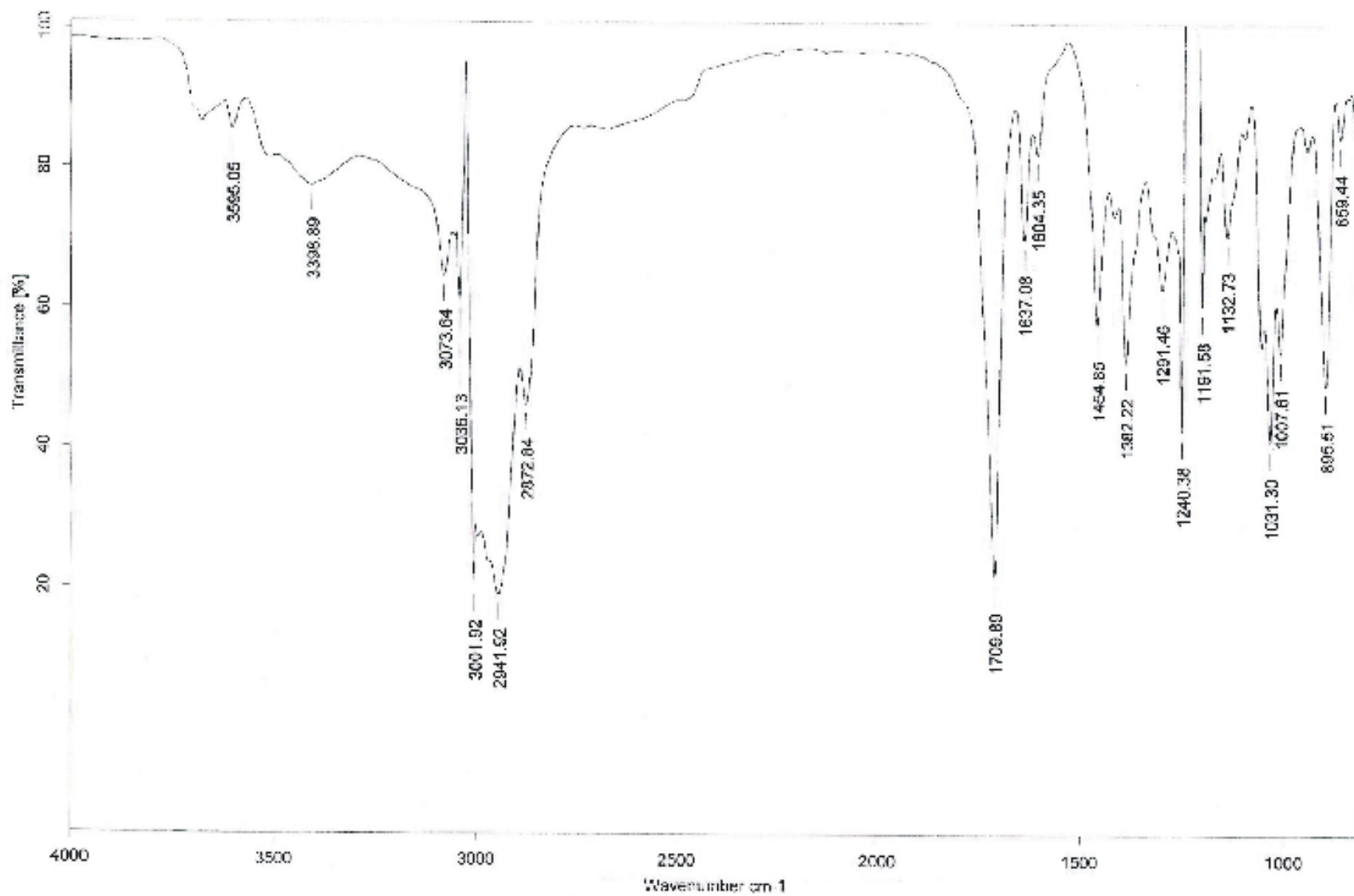
Espectro 17: HSQC del ácido lippiolídico (4).



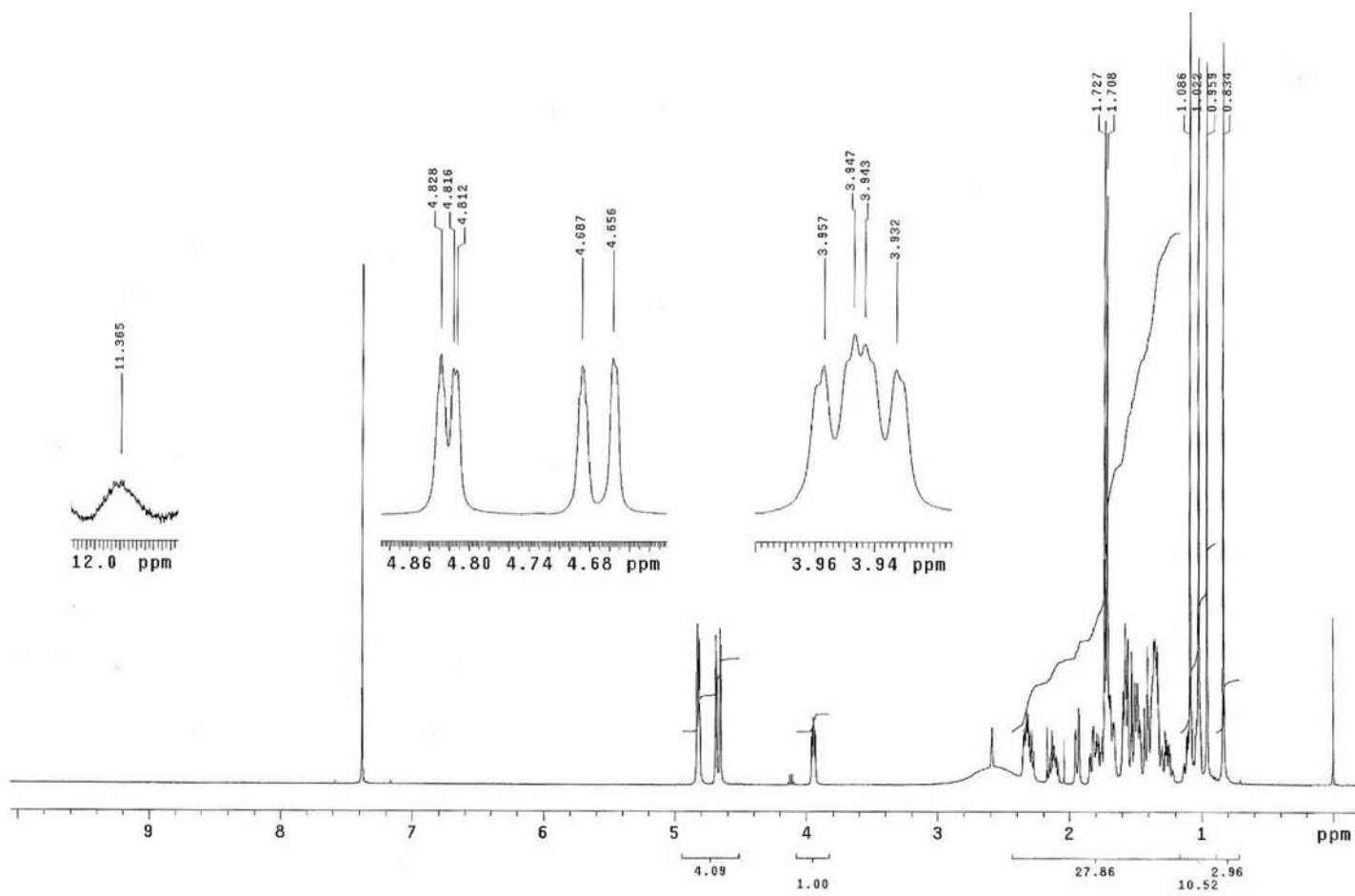
Espectro 18: COSY del ácido lippiolídico (4).



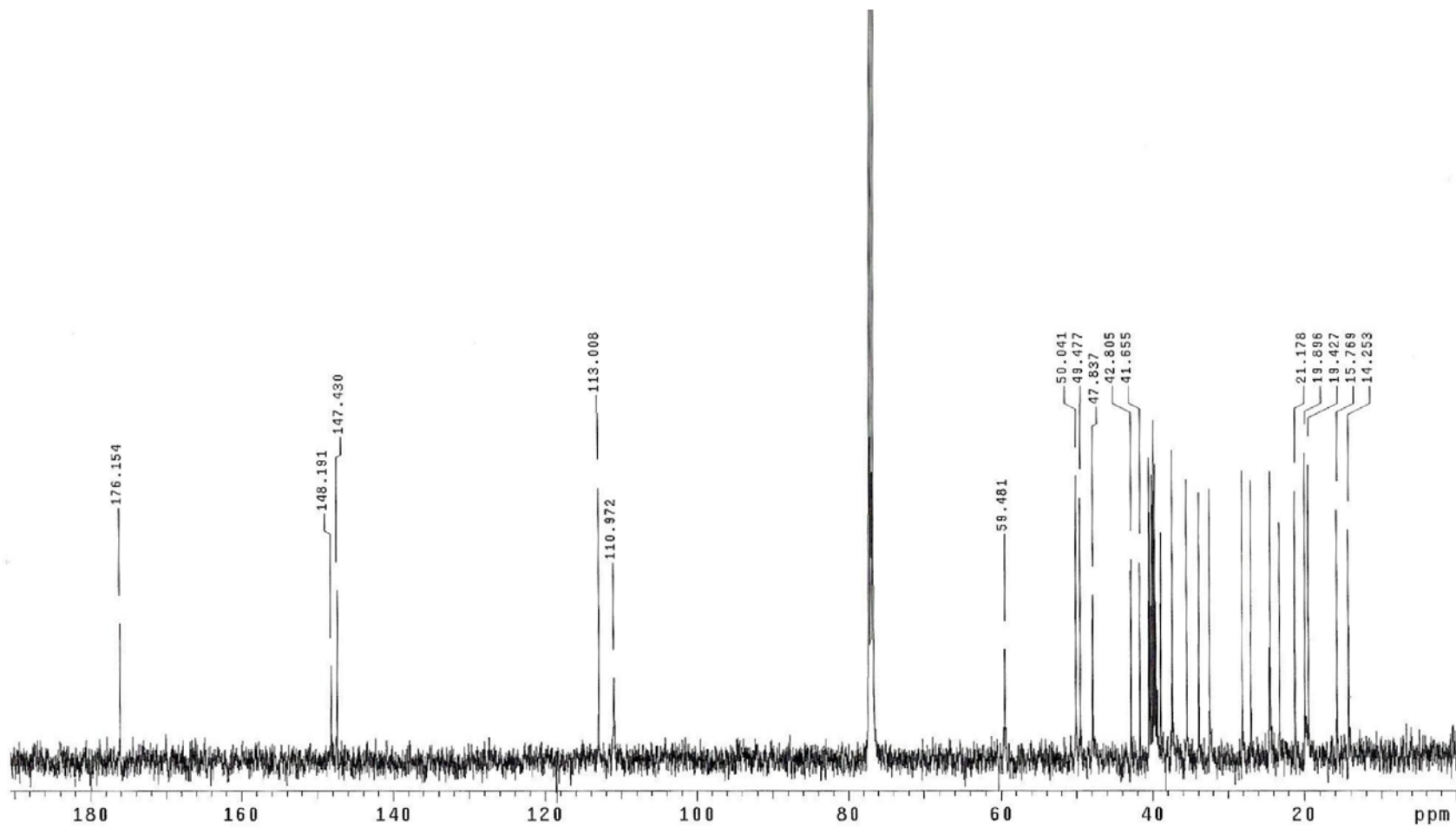
Espectro 19: NOESY del ácido lippolidólico (4).



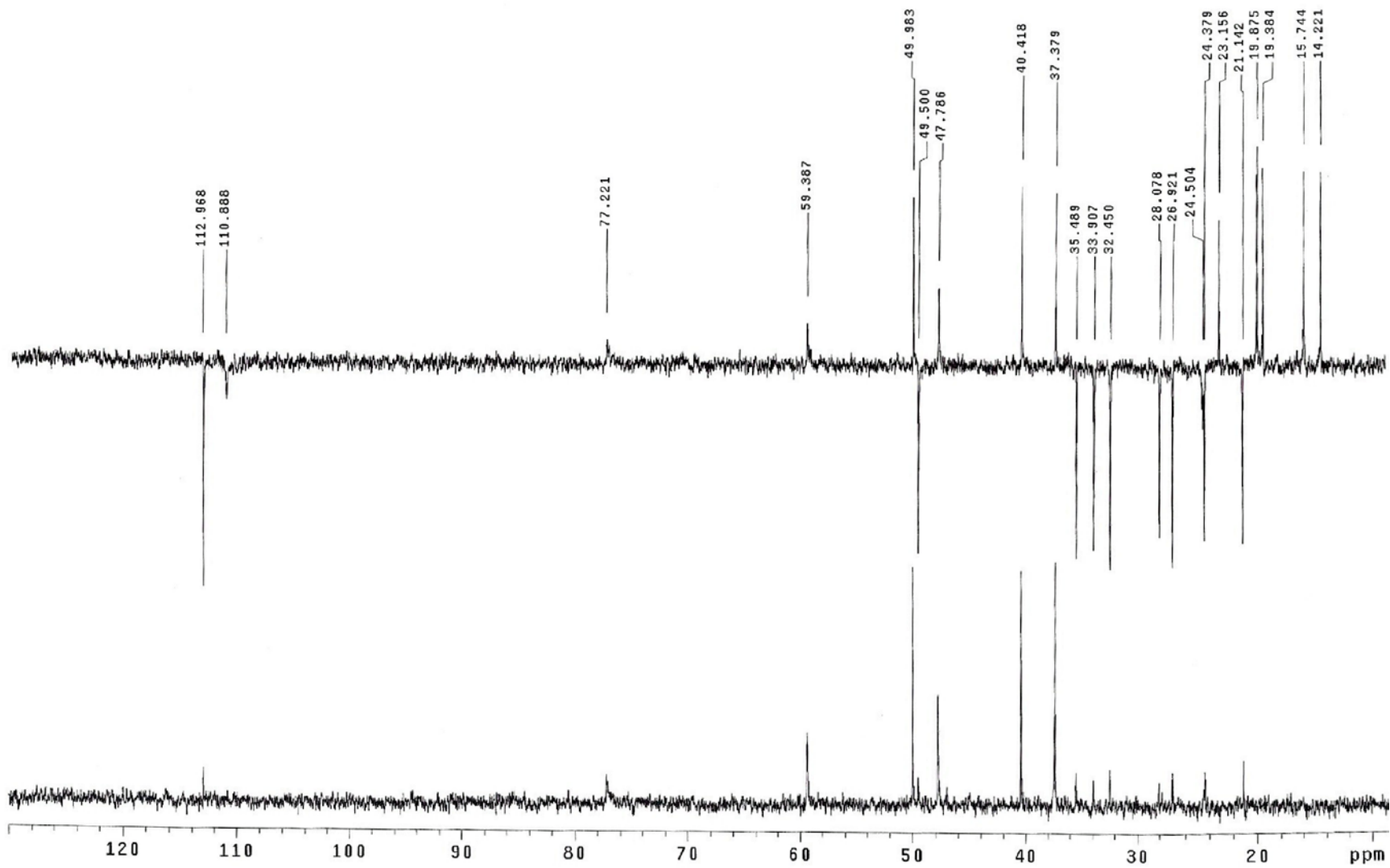
Espectro 20: IR del ácido lipoico (5)



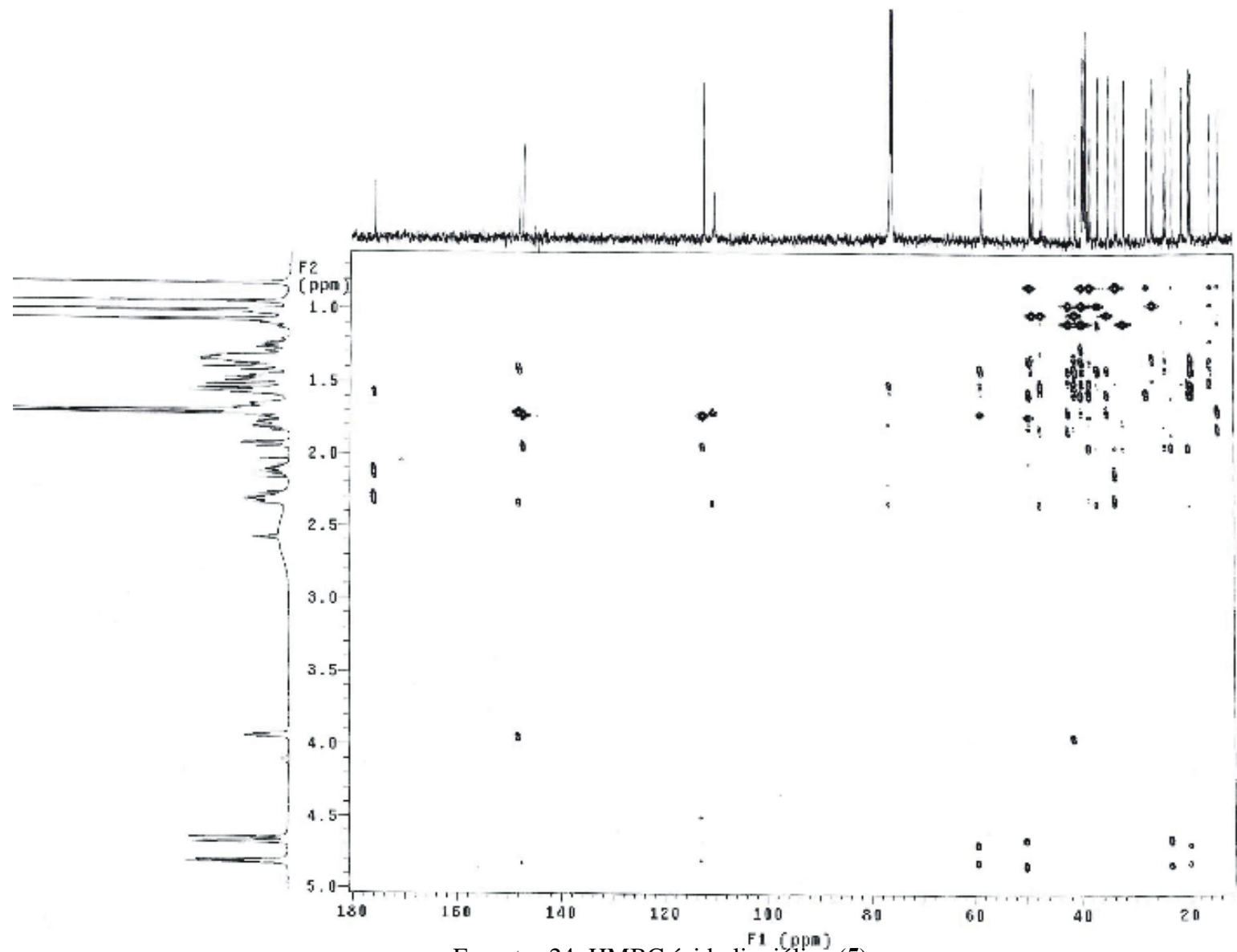
Espectro 21: RMN- ^1H del ácido lipoico (**5**)



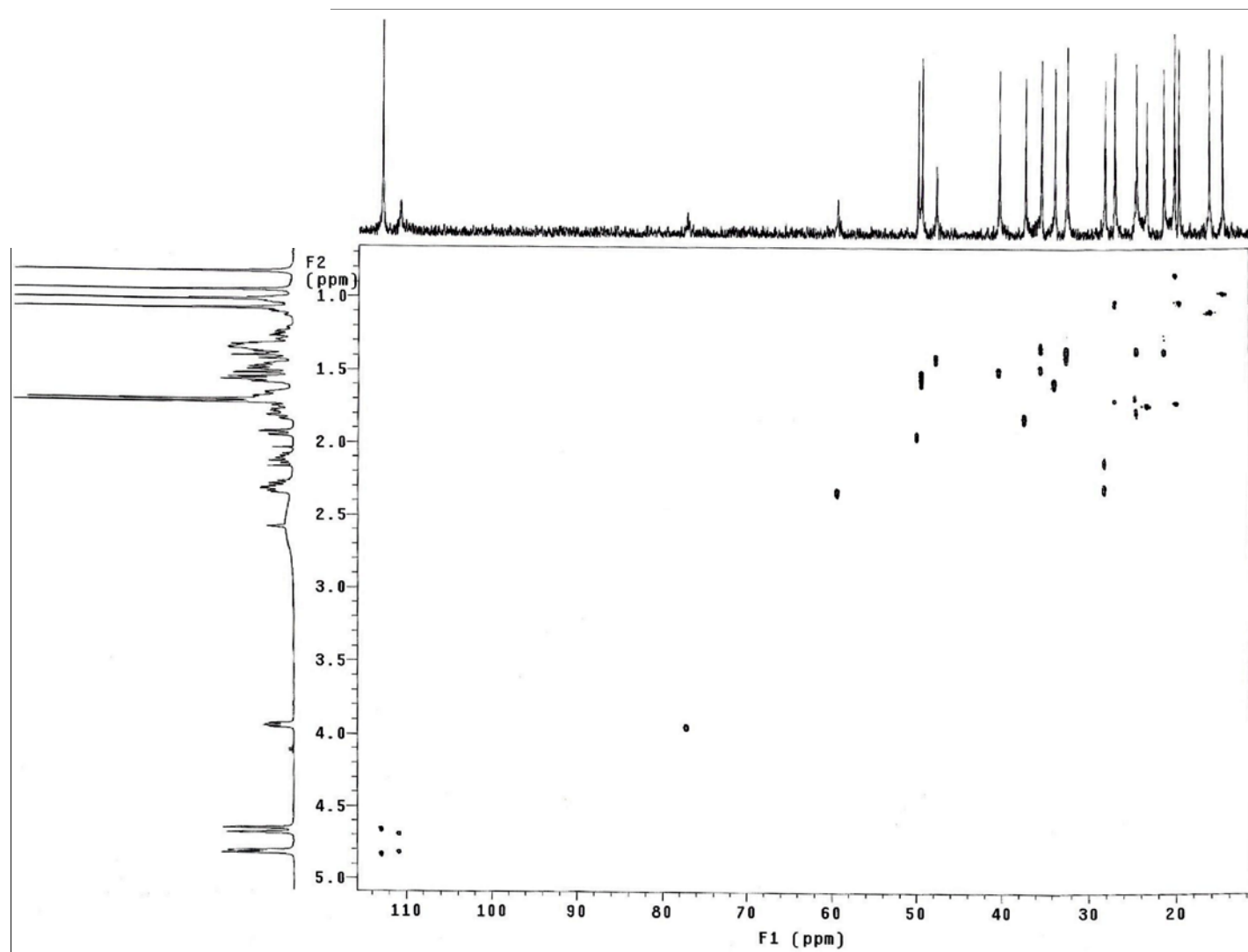
Espectro 22: RMN- ^{13}C del ácido lipoico (5)



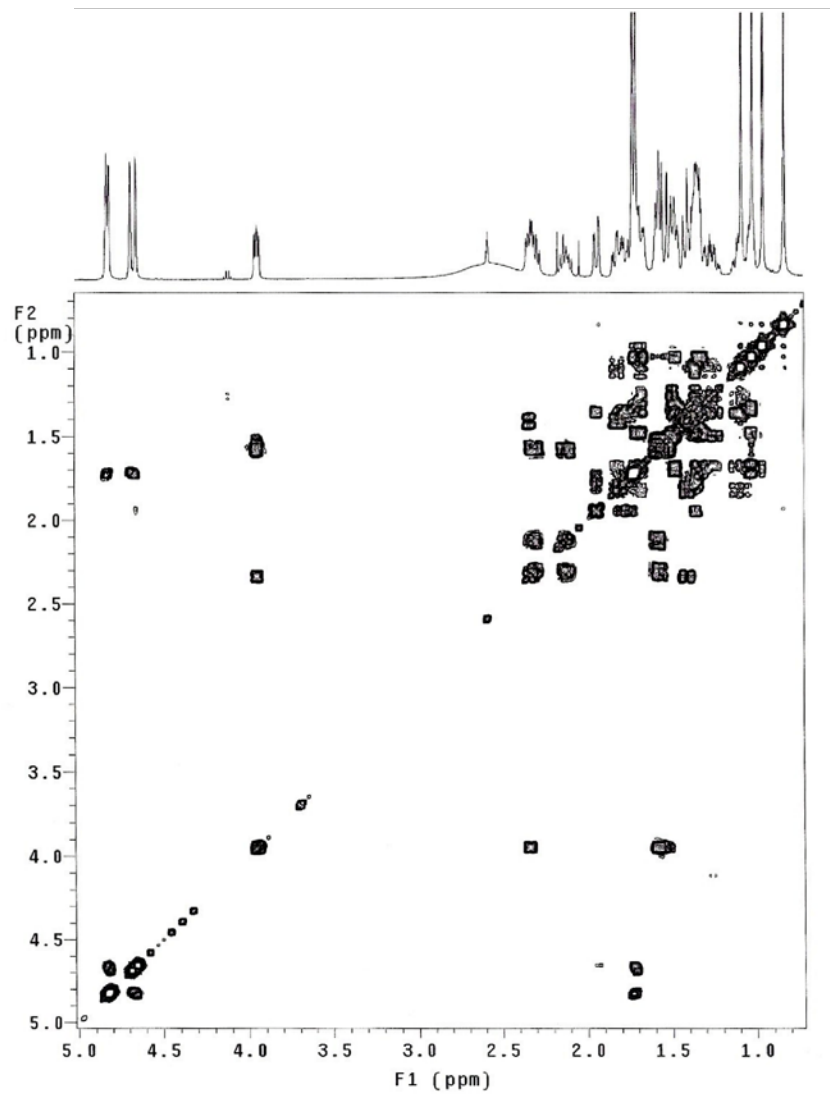
Espectro 23: DEPT del ácido lipoico (5)



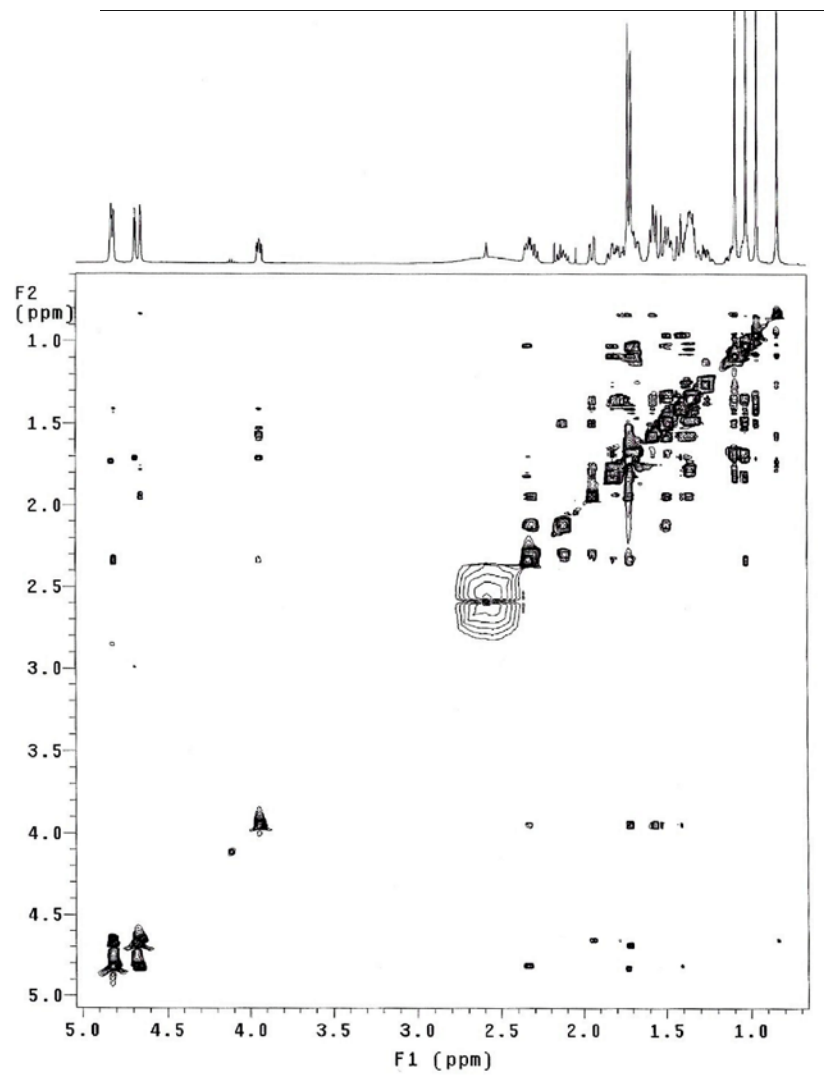
Espectro 24: HMBC ácido lipoico (5).



Espectro 25: HSQC del ácido lipoico (4).



Espectro 26: COSY del ácido lipoico (4).



Espectro 27: NOESY del ácido lippiólico (6)