

00570

3

2ej

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**



**“ ESTRUCTURA Y ESTEREOQUIMICA DE LA PECTINOLIDA, UNA  
NUEVA 5,6-DIHIRO- $\alpha$ -PIRONA CON PROPIEDADES ANTI-  
MICROBIANAS DE Hyptis Pectinata (L.) Poit. ”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS**

**(FARMACIA - QUIMICA FARMACEUTICA)**

P R E S E N T A:

**MARIA DE LOURDES HERNANDEZ DE JESUS**

TESIS CON  
FALLA LE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis 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

	Página
LISTA DE CUADROS .....	i
LISTA DE FIGURAS .....	iii
LISTA DE ESPECTROS .....	vii
1. INTRODUCCION .....	1
2. OBJETIVOS .....	5
2.1 Objetivo general .....	5
2.2 Objetivos específicos .....	6
3. ANTECEDENTES .....	7
3.1 Distribución de las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas	
Naturales .....	7
3.1.1 6-Alquil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas .....	7
3.1.2 6-Alquenil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas .....	16
3.1.3 6-Aril-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas .....	23
3.2 Actividad biológica de las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas	
naturales .....	28
3.3 Generalidades sobre <i>Hyptis pectinata</i> .....	31
4. PARTE EXPERIMENTAL .....	33
4.1 Técnicas analíticas .....	33
4.1.1 Procedimientos generales .....	33
4.1.2 Análisis por cromatografía de gases-	
espectrometría de masas (CG-EM).	
Condiciones Generales .....	33
4.2 Material vegetal .....	34
4.3 Extracción y Purificación de los constituyentes	
antimicrobianos .....	34

	Pagina
4.3.1 Metodología de extracción y fraccionamiento biodirigido .....	34
4.3.2 Purificación de la pectinólida .....	35
4.3.3 Purificación de la hiptólida .....	36
4.4 Monitoreo de la actividad antimicrobiana .....	37
4.4.1 Microorganismos de prueba .....	37
4.4.2 Preparación de los inóculos .....	38
4.4.3 Análisis cualitativo antimicrobiano .....	38
4.4.3.1 Preparación de la muestra de prueba .....	38
4.4.3.2 Procedimientos de ensayo .....	39
4.4.4 Análisis cuantitativo antimicrobiano .....	39
4.5 Preparación de derivados .....	41
4.5.1 Reacciones de oxidación de la pectinólida	41
4.5.1.1 Reacciones con ácido m-cloroperbenzoico .....	41
4.5.1.1.1 Reacción No. 1 .....	41
4.5.1.1.2 Reacción No. 2 .....	42
4.5.1.1.3 Reacción No. 3 .....	43
4.5.1.1.4 Reacción No. 4 .....	43
4.5.1.2 Reacción con tetróxido de osmio.	44
4.5.2 Reacción de acetilación .....	44
4.5.2.1 Reacción No. 1 .....	44
4.5.2.2 Reacción No. 2 .....	45
4.5.2.3 Reacción No. 3 .....	46
4.5.3 Hidrólisis de la pectinólida .....	46

	Página
4.5.4 Degradación oxidativa de la pectinólida .	46
5. RESULTADOS Y DISCUSION .....	48
5.1 Fraccionamiento biodeguido y evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana .....	48
5.2 Caracterización de la hiptólida .....	55
5.3 Elucidación estructural y estereoquímica de la pectinólida .....	66
5.4 Semisíntesis de análogos de la asperlina .....	80
5.5 Evaluación cuantitativa de la actividad antimicrobiana de la pectinólida y algunas 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas relacionadas .....	113
6. CONCLUSIONES .....	119
7. ESPECTROS .....	121
8. BIBLIOGRAFIA .....	136

## LISTA DE CUADROS

	Página
CUADRO 1. Fraccionamiento biodirigido del extracto clorofórmico de <i>Hyptis pectinata</i> .....	49
CUADRO 2. Evaluación preliminar cualitativa de la actividad antimicrobiana .....	51
CUADRO 3. Rendimiento de los metabolitos aislados de <i>H. pectinata</i> .....	54
CUADRO 4. Constantes físicas y espectroscópicas de la hiptólida .....	65
CUADRO 5. Desplazamientos químicos y multiplicidades para los núcleos de hidrógeno de la pectinólida .....	67
CUADRO 6. Desplazamientos químicos para los núcleos de $^{13}\text{C}$ de la pectinólida (I) y la umuravumbólida (32) .....	76
CUADRO 7. Estereoquímica absoluta para el centro C-6 de las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas aisladas de la familia Lamiaceae y su correlación con el efecto COTTON observado en el Dicroísmo Circular .....	79
CUADRO 8. Constantes físicas y espectroscópicas de la pectinólida .....	81
CUADRO 9. Desplazamientos químicos y multiplicidades para los núcleos de hidrógeno del compuesto Ib .....	86

CUADRO 10.	Desplazamientos químicos para los núcleos de $^{13}\text{C}$ del derivado Ib, la desacetilboronólida (8) y la 1,2-desacetilboronólida (9) .....	89
CUADRO 11.	Desplazamientos químicos y multiplicidades para los núcleos de hidrógeno del acetato Ic y la boronólida (7) .....	94
CUADRO 12.	Desplazamientos químicos para los núcleos de $^{13}\text{C}$ del tetracetato Ic y la boronólida (7) ..	99
CUADRO 13.	Desplazamientos químicos de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ (constantes de acoplamiento $^1\text{H-H}$ $J=\text{Hz}$ ) del carbonato Ia .....	104
CUADRO 14.	Desplazamientos químicos de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ (constantes de acoplamiento $^1\text{H-H}$ $J=\text{Hz}$ ) del éster cíclico de osmio Id .....	109
CUADRO 15.	Desplazamientos químicos de $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ (constantes de acoplamiento $^1\text{H-H}$ $J=\text{Hz}$ ) del producto de hidrólisis Ie .....	112
CUADRO 16.	Evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana de algunas 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) .....	116
CUADRO 17.	Evaluación cuantitativa de la actividad antimicrobiana. Concentración mínima inhibitoria ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) de los compuestos activos .....	117

## LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Constituyentes citotóxicos del género <i>Hyptis</i>	4
FIGURA 2. Fraccionamiento bioridrigido del extracto cloroformico de <i>Hyptis pectinata</i> .....	53
FIGURA 3. Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (APT) de la hiptólida ...	57
FIGURA 4. Región vinilica del espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la hiptólida .....	59
FIGURA 5. Multiplicidad observada para el núcleo H-6 de la hiptólida .....	60
FIGURA 6. Conformación de pseudosilla del núcleo de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona .....	61
FIGURA 7. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (2D-COSY) de la hiptólida.	62
FIGURA 8. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la hiptólida generado por el desacoplamiento diferencial del grupo metileno en H-4 <sup>1</sup> . Irradiación A: en $\delta$ 1.8; B: en $\delta$ 2.0 .....	64
FIGURA 9. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (90 MHz) de la pectinólida	68
FIGURA 10. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la olguina .....	70
FIGURA 11. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la asperlina .....	70
FIGURA 12. Espectro de RMN- <sup>13</sup> C (APT) de la pectinólida .	71
FIGURA 13. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (2D-COSY) de la pectinólida .....	73
FIGURA 14. Región vinilica del espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la pectinólida .....	74

FIGURA 15.	Multiplicidades observadas para los carbonos quirales de la pectinólida en el espectro de RMN- <sup>13</sup> C totalmente acoplado con el núcleo de hidrógeno ( $J_{C-H}$ ) .....	74
FIGURA 16.	Conformaciones enantioméricas alternativas para el núcleo de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona de la pectinólida .....	77
FIGURA 17.	Curva de dicroísmo circular de la pectinólida .....	77
FIGURA 18.	Alternativas de la esteoquímica para el centro quiral C-3' de la pectinólida .....	78
FIGURA 19.	Secuencia de reacciones degradativas de la pectinólida .....	80
FIGURA 20.	Propuesta experimental para la funcionalización del doble enlace de la cadena lateral de la pectinólida .....	82
FIGURA 21.	Cromatografía en capa fina de la mezcla de oxidación de la pectinólida .....	83
FIGURA 22.	Análisis en cromatografía de gases de la mezcla de oxidación de la pectinólida .....	84
FIGURA 23.	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (2D-COSY) del diol Ib ....	87
FIGURA 24.	Multiplicidades observadas para los metinos quirales del diol Ib. A: CHCl <sub>3</sub> ; B: CHCl <sub>3</sub> + D <sub>2</sub> O .....	89
FIGURA 25.	Posibilidades conformacionales de la pectinólida .....	90

FIGURA 26.	Mecanismo de reacción para la generación del diol Ib .....	91
FIGURA 27.	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (2D-COSY) del tetracetato Ic .....	92
FIGURA 28.	Proyecciones de Newman para los enlaces C <sub>1</sub> -C <sub>2</sub> , y C <sub>2</sub> -C <sub>3</sub> , del tetracetato Ic (A) y de la boronólida (B) .....	95
FIGURA 29.	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del tetracetato Ic generado por el desacoplamiento diferencial del protón H-6 .....	96
FIGURA 30.	Espectro de RMN HETCOR ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C) del tetracetato Ic .....	98
FIGURA 31.	Multiplicidades observadas en la RMN- <sup>1</sup> H para los metinos quirales de los derivados Ia (A) y Ib (B) .....	100
FIGURA 32.	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (2D-COSY) del derivado Ia.	101
FIGURA 33.	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de los dioles derivados Ia (A) y Ib (B) .....	103
FIGURA 34.	Proyección de Newman para el enlace C <sub>1</sub> -C <sub>2</sub> , del diol Ib .....	105
FIGURA 35.	Secuencia mecanística para la transposición de Baeyer-Villiger .....	105
FIGURA 36.	Análisis en cromatografía de gases-espectrometría de masas de la mezcla de oxidación de la pectinólida .....	107

FIGURA 37. Análisis en cromatografía de gases- espectrometría de masas del producto de acetilación de la mezcla de oxidación de la pectinólida .....	108
FIGURA 38. Efecto $\gamma$ - <i>gauche</i> observado sobre el C-6 del éster cíclico de osmio Id .....	110
FIGURA 39. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H (2D-COSY) del éster cíclico de osmio Id .....	111
FIGURA 40. Estructuras de las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas de prueba en la evaluación cuantitativa de la actividad antimicrobiana .....	114

## LISTA DE ESPECTROS

	Pagina
ESPECTRO 1. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la hiptólida (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , TMS) .....	121
ESPECTRO 2. Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de la hiptólida (75.4 MHz, CDCl <sub>3</sub> , TMS) .....	122
ESPECTRO 3. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la pectinólida (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , TMS) .....	123
ESPECTRO 4. Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de la pectinólida (75.4 MHz, CDCl <sub>3</sub> , TMS) .....	124
ESPECTRO 5. Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del compuesto Ib (75.4 MHz, CDCl <sub>3</sub> , TMS) .....	125
ESPECTRO 6. Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de la desacetil- boronólida (8) (75.4 MHz, CDCl <sub>3</sub> , TMS) ....	126
ESPECTRO 7. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del acetato Ic (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , TMS) .....	127
ESPECTRO 8. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la boronólida (7) (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , TMS) .....	128
ESPECTRO 9. Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del tetracetato Ic (75.4 MHz, CDCl <sub>3</sub> , TMS) .....	129
ESPECTRO 10. Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de la boronólida (7) (75.4 MHz, CDCl <sub>3</sub> , TMS) .....	130
ESPECTRO 11. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del carbonato Ia (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , TMS) .....	131
ESPECTRO 12. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del éster cíclico de osmio Id (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , TMS) .....	132

ESPECTRO 13.	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del éster cíclico de osmio Id (75.4 MHz, CDCl <sub>3</sub> , TMS) .....	133
ESPECTRO 14.	Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del producto de hidrólisis Ie (300 MHz, CDCl <sub>3</sub> , TMS) .....	134
ESPECTRO 15.	Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del producto de hidrólisis Ie (75.4 MHz, CDCl <sub>3</sub> , TMS) .....	135

## 1. INTRODUCCION.

El origen de las enfermedades infecciosas es tan antiguo como el genero humano y el uso de los extractos vegetales para la terapia de infecciones se ha transmitido de generacion en generacion desde tiempos inmemoriales hasta nuestros dias. El tratamiento de infecciones con algunos agentes quimicos naturales, como la quinina, la emetina y la sanguinarina, ha sobrevivido<sup>1</sup> a pesar de que en la actualidad el empleo de los antibioticos y algunos de sus derivados sinteticos ha disminuido el interes por realizar nuevas investigaciones de agentes antiinfecciosos a partir de otras fuentes naturales diferentes a las fermentaciones microbianas<sup>2</sup>. La aplicacion de tecnicas microbiologicas contemporaneas en los estudios fitoquimicos ha demostrado el potencial de las plantas superiores como una fuente de novedosos agentes antimicrobianos y fungicidas<sup>3-6</sup>. En numerosas ocasiones, estas investigaciones han confirmado el empleo tradicional de preparaciones a partir de plantas medicinales con propiedades antisépticas para el tratamiento de enfermedades infecciosas<sup>4,7-9</sup>. Es interesante destacar que muchas de estas sustancias de origen vegetal poseen una moderada actividad antimicrobiana en comparacion con la potencia demostrada por los antibioticos derivados de microorganismos. Sin embargo, investigaciones recientes han comprobado el posible papel que estas sustancias biologicamente activas desempeñan en la ecologia de las plantas que los producen y, por lo tanto, representan

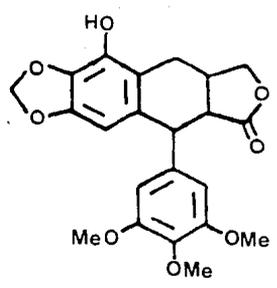
modelos para el estudio de actividades adicionales. Algunas de estas con propiedades terapéuticas, como la actividad citotóxica<sup>10</sup>, o de interés biológico como la alelopatía<sup>11</sup>.

De la gran riqueza florística mexicana el género *Hyptis* (Lamiaceae) está conformado por un grupo de plantas de gran importancia económica y medicinal en la vida diaria de nuestro pueblo. Algunas de estas especies deben su importancia económica a su empleo tradicional como condimento en la culinaria nacional, por ejemplo la albahaca (*Hyptis mutabilis*), la salvia blanca (*H. albida*) y la chía (*H. suaveolens*). Así como por las propiedades antisépticas<sup>12,13</sup>, antiparasitarias<sup>14</sup>, y tónico estimulantes<sup>14</sup> de las que gozan numerosas especies. Esta diversidad de usos populares de las plantas del género *Hyptis* constituye un indicador de su posible potencialidad farmacológica.

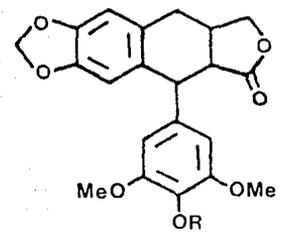
El aislamiento de diversos compuestos asociados con una actividad biológica de interés terapéutico ha marcado la pauta para algunas de las escasas investigaciones fitoquímicas realizadas de especies del género *Hyptis*. El análisis de los aceites esenciales de estas especies ha demostrado que sus propiedades antisépticas son debidas al elevado contenido de monoterpenos como el borneol, el eucaliptol y el timol, entre los principales constituyentes de estas esencias<sup>13,15</sup>. La acumulación de cantidades significativas de estas sustancias activas en los aceites esenciales explica perfectamente la actividad carminativa y analgésico estomacal de los extractos de especies medicinales de este género<sup>16</sup>.

La actividad citotóxica potencial de algunas especies del género *Hyptis* también ha sido investigada. El estudio fitoquímico de los extractos acuosos de las partes aéreas de la hierba martina (*H. verticillata*), una especie utilizada como agente cicatrizante y para los dolores de cabeza, permitió el aislamiento de dos agentes citotóxicos<sup>17</sup>, la  $\beta$ -peltantina y la 4-desmetildesoxipodofilotoxina (Fig. 1). De los diterpenos aislados de la raíz de *H. fruticosa*, la 14-metoxitaxodiona (Fig. 1) no solamente presentó una actividad bacteriostática en contra de bacterias Gram positivas, también resultó efectivo sobre el carcinoma de Erlich en ratas<sup>18</sup>. El extracto etanólico de las partes aéreas de *H. tomentosa* mostró actividad sobre el sistema de leucemia linfocítica PS y sobre el cultivo de células KB. El estudio fitoquímico biodirigido de este extracto mediante el monitoreo de la actividad citotóxica permitió el aislamiento del lignano desoxipodofilotoxina (Fig. 1) como el responsable de la actividad observada<sup>19</sup>. Investigaciones recientes han demostrado que la acumulación de cantidades significativas de constituyentes triterpénicos derivados del ácido ursólico (Fig. 1) es la responsable de la actividad detectada en las evaluaciones de la potencialidad citotóxica de las especies medicinales de este género de labiadas<sup>20</sup>.

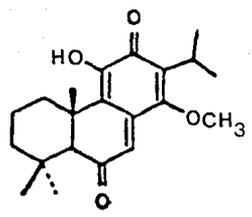
Por consiguiente, las investigaciones fitoquímicas relacionadas con el metabolismo secundario de las especies medicinales del género *Hyptis* representan un extenso panorama para la investigación de productos naturales como fuentes potenciales de sustancias biológicamente activas.



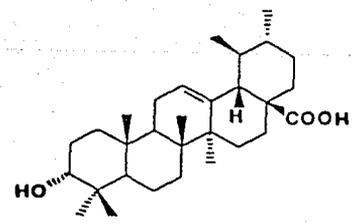
$\beta$ -peltantina



R= H, 4-demetildesoxipodofilotoxina  
R= Me, desoxipodofilotoxina



14-metoxitaxodiona



ácido ursólico

Figura 1. Constituyentes citotóxicos del género Hyptis.

La presente investigación describe el análisis fitoquímico de la hierba del burro (*Hyptis pectinata*) especie utilizada como analgésico estomacal<sup>14</sup> y para el tratamiento de enfermedades infecciosas de la piel y la rinofaringitis<sup>13</sup>, con el propósito de aislar los principios activos responsables de las propiedades antisépticas atribuidas a esta planta por la medicina tradicional de nuestro país.

## 2. OBJETIVOS.

### 2.1 OBJETIVO GENERAL.

El estudio químico de las especies del género *Hyptis* utilizadas en la medicina tradicional ha sido sumamente limitado y, por lo tanto, la información disponible relacionada con el contenido metabólico de estas plantas y la potencialidad farmacológica de las mismas es escasa. En consecuencia, la investigación fitoquímica de este género constituye un punto de partida para el desarrollo de proyectos que contribuyan al conocimiento de la composición química de la flora mexicana de utilidad medicinal y representan alternativas importantes para el descubrimiento y la obtención de metabolitos secundarios con una posible actividad biológica de interés terapéutico.

Dentro de este contexto, el propósito fundamental de la presente investigación es realizar el análisis fitoquímico

biodirigido de la planta medicinal mexicana *Hyptis pectinata* (L.) Poit (Lamiaceae) mediante la determinación cualitativa de la actividad antimicrobiana.

## 2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.

2.2.1 Efectuar las operaciones fitoquímica relacionadas con la extracción, separación y purificación de los constituyentes activos antimicrobianos.

2.2.2 Establecer la estructura molecular de los principios activos mediante la aplicación de técnicas de análisis instrumental contemporaneas.

2.2.3 Realizar la evaluación cualitativa y cuantitativa de las sustancias naturales activas y algunos derivados sintéticos como agentes antimicrobianos potenciales.

### 3. ANTECEDENTES.

Los antecedentes bibliográficos que serán presentados a continuación se relacionan con la distribución en la naturaleza de las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas.

Estas consideraciones presentarán al lector un panorama general de la diversidad estructural y actividades biológicas de este tipo de metabolitos. Al mismo tiempo, esta información constituye los antecedentes fitoquímicos que permitirán discutir la elucidación estructural y la determinación de la configuración absoluta de las dos 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas con actividad antimicrobiana aisladas de *Hyptis pectinata*.

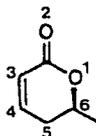
#### 3.1 DISTRIBUCION DE LAS 5,6-DIHIIDRO- $\alpha$ -PIRONAS NATURALES.

Las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas sustituidas en el carbono 6 se encuentran distribuidas en el reino vegetal principalmente en las familias Lamiaceae, Piperaceae, Lauraceae y Annonaceae. Se han aislado en todos los órganos vegetales incluyendo hojas, tallos, flores y frutos. Estos metabolitos también se distribuyen ampliamente en diferentes géneros de hongos.

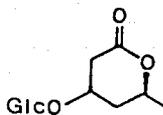
##### 3.1.1 6-ALQUIL-5,6-DIHIIDRO- $\alpha$ -PIRONAS.

El compuesto más simple con este núcleo estructural es el ácido parasorbico (1). Este compuesto volátil fue obtenido por Hofmann en 1859 mediante destilación por arrastre de vapor del extracto acidificado de los frutos de *Sorbus aucuparia* (Rosaceae)<sup>21</sup>. La acción del alcali sobre el ácido parasorbico

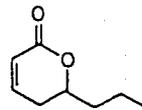
produjo la sal amorfa de un hidroxiaácido insaturado, cuya fórmula molecular se estableció como  $C_6H_{10}O_3$ <sup>22</sup>. Aunque el ácido parasorbico fue una de las primeras  $\delta$ -lactonas,  $\alpha,\beta$ -insaturadas aisladas, tomó más de un siglo para que Kuhn y Jerchel<sup>23</sup> establecieran su estructura como la 6-metil-5,6-dihidro-2H-piran-2-ona. Dos décadas después, las investigaciones de dos grupos independientes establecieron la configuración absoluta (S) para el núcleo 6 del ácido parasorbico mediante degradación de este metabolito al (+)-(S)-hexan-1,5-diol<sup>24</sup> y al ácido (+)-(3S)-hidroxibutírico<sup>25</sup>.



(1)



(2)



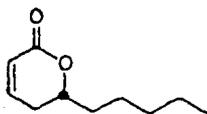
(3)

Numerosas síntesis racémicas del ácido parasorbico han sido descritas en la literatura, sin embargo, la primera síntesis del enantiómero natural (+)-(S), se describió recientemente por Lichtenthaler y colaboradores<sup>26</sup>, quien confirmó la asignación estereoquímica previa. Investigaciones posteriores demostraron que el ácido parasorbico no está presente en la planta como tal, sino en forma de glucósido (2)<sup>27</sup>.

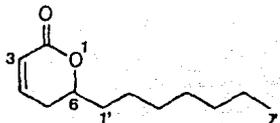
Los homólogos del ácido parasorbico de cadena alquílica corta son volátiles y ampliamente utilizados como componentes aromáticos importantes y saborizantes en alimentos y bebidas<sup>28</sup>.

La 6-propil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona (3) fue detectada por CG-EM como un constituyente aromático neutro del tabaco *Nicotiana tabacum* (Solanaceae)<sup>29</sup>.

La masoilactona (4) fue el primer compuesto encontrado en el aceite esencial obtenido de la cáscara de *Cryptocarya massoi* (Lauraceae), una planta medicinal de Nueva Guinea<sup>30</sup>. La estructura propuesta por Meijr fue confirmada posteriormente por Abe y Sato<sup>31</sup> a través del aislamiento e identificación de los ácidos obtenidos mediante degradación oxidativa.



(4)



(5)

La configuración absoluta R de la masoilactona se asignó al producto natural y que corresponde al enantiómero levógiro<sup>32</sup>. La estereoquímica absoluta se confirmó mediante la síntesis del (+)-(6S) enantiómero a partir del (+)-(R)-gliceraldehído. Pirkle y Adams, también sintetizaron ambos enantiómeros (-)-R y (+)-S de la masoilactona mediante diferentes rutas<sup>33</sup>. Su estrategia consistió en la separación de los derivados diastereoisoméricos de los precursores racémicos de la lactona por HPLC y así se anuló la parcial racemización encontrada por Mori<sup>34</sup>.

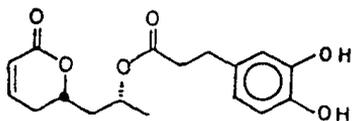
La masoilactona ha sido aislada de flores de nardo<sup>35</sup> del fermentado de la vid<sup>36</sup>, y de dos especies de hormigas

australianas, en las cuales constituye uno de los mecanismos de defensa de estos insectos<sup>37</sup>. Un compuesto similar la 6-heptil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona (5) es un constituyente minoritario volátil de *C. massoi*<sup>37</sup>.

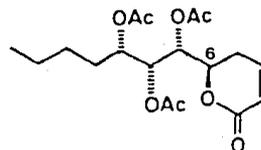
Se conocen diversos compuestos oxigenados en la cadena lateral o en el anillo de la lactona. Bohlmann y Suwita<sup>38</sup> propusieron la estructura (6) para una  $\delta$ -lactona aislada de *Tarchonatus trilobus* (Compositae). Sin embargo, en aquella oportunidad no se estableció la estereoquímica del producto natural. La configuración se obtuvo recientemente por síntesis<sup>39</sup>.

La configuración R para el centro quiral C-6 se propuso para la boronólida (7), aislada por Francay Polonsky<sup>40</sup> de *Tetradenia fruticosa* (Lamiaceae), mediante rotación óptica y difracción de rayos X<sup>41</sup>.

La evidencia química para la configuración 6R de la boronólida aislada de *T. barberae* se obtuvo mediante la degradación oxidativa del derivado desacetilado para generar el ácido D-málico que se identificó por CG-EM<sup>42</sup>.



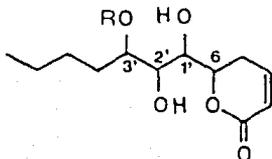
(6)



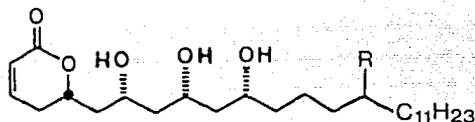
(7)

De la planta medicinal africana *Iboza riparia* (*Tetradenia riparia*) se aislaron dos derivados de la boronólida, la desacetilboronólida (8) y la 1,2-didesacetilboronólida (9).

La estructura de los compuestos (8) y (9) se propusieron con base en el análisis de sus datos espectroscópicos<sup>43</sup>. Paradójicamente, el derivado (8) se describió como un compuesto ópticamente inactivo y el resultado del análisis de CG-EM reveló que se trataba de una mezcla de tres diastereoisómeros<sup>44</sup>. Ninguna evidencia en relación con la estereoquímica para el compuesto (9) se ha presentado en la literatura. Dos lactonas (10,11) poco comunes fueron aisladas de *Eupatorium pilosum* Walt, especie de compuesta norteamericana<sup>45</sup>.



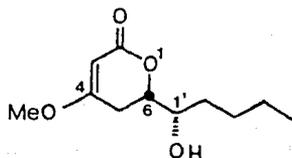
(8) R= H  
(9) R= AcO



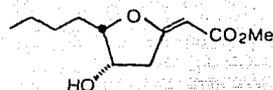
(10) R= H  
(11) R= H

Numerosos metabolitos aislados de hongos poseen uno o más sustituyentes en las diferentes posiciones del anillo de la lactona. Tres de estos compuestos están metoxilados en el C-4. La estructura de la pestalotina (12), un sinergista de giberelinas, la cual se aisló del filtrado de un cultivo del hongo fitopatógeno *Pestalotia cryptomeriaeicola*, se estableció mediante las técnicas de análisis instrumental convencionales<sup>46</sup>. Por otro lado, Ellestad, McGahren y Kunstmann aislaron también la pestalotina de una especie no identificada de *Penicillium* y la denominaron como LL-P880a<sup>47</sup>. La configuración S asignada al C-6 con base en el análisis de los datos de dicroísmo circular se

confirmó con los datos obtenidos por aplicación del método de Horeau para el producto de la hidrólisis básica del compuesto metilado (13) obtenido a partir de LL-P880 $\alpha$ <sup>47</sup>. El mismo método fue empleado para asignar la configuración absoluta 1'S al compuesto LL-P880 $\alpha$ .



(12)

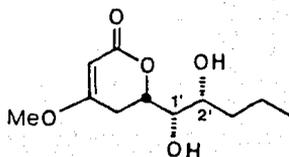


(13)

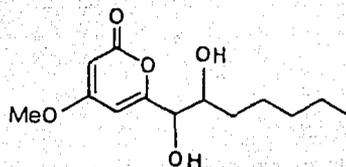
La primera síntesis del compuesto natural (-)-pestalotina fue realizada por Seebach y Meyer quienes confirmaron la asignación esteroquímica de Ellestad y colaboradores<sup>48</sup>. Esta síntesis asimétrica proporcionó la (-)-pestalotina y (-)-epipestalotina la cual fue separada por procesos de cristalización. Además, la síntesis de la (-)-pestalotina fue reportada por Ichimoto y colaboradores a partir de la D-glucosa<sup>49</sup> y por Masaki y colaboradores a partir del (+)-(R,R)-tartrato de dietilo<sup>50</sup>. Los cuatro posibles estereoisómeros de la pestalotina fueron recientemente sintetizados<sup>51</sup>.

Ellestad y colaboradores obtuvieron posteriormente dos metabolitos, el LL-P880 $\beta$  (14) y su análogo insaturado LL-P880 $\gamma$  (15) de la misma especie de *Penicillium* no identificada. La configuración (1'S) y (2'R) del diol vecinal en el compuesto 14 se

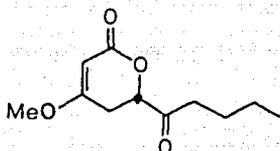
estableció mediante el método de excitación de la quiralidad en el dicroísmo circular<sup>48</sup>.



(14)



(15)

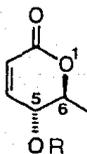


(16)

Strunz y colaboradores aislaron la pestalotina y al 6-[1'-oxo-pentil]-5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona (16) de un hongo no identificado y correlacionaron a este producto natural con el derivado generado por la oxidación de Jones de la lactona (14)<sup>52</sup>.

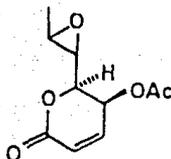
La alquilación en el núcleo C-6 y la oxigenación del carbono 5 de la 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona constituye un rasgo particular de numerosos  $\delta$ -lactonas aisladas tanto en plantas superiores como en los hongos. La alta incidencia de tumores gástricos, posiblemente relacionados con la dieta japonesa, condujo a la investigación de los constituyentes químicos de los helechos comestibles de *Osmunda japonica*, y *O. regalis* variedad *spectabilis* Willd<sup>53</sup>. Los

resultados de los estudios fitoquímicos realizados demostraron que el constituyente mayoritario de estos helechos es la osmundalina (17) y la osmundalactona (18). La configuración absoluta de los centros quirales para los núcleos C-5 y C-6 fue inferida a partir del análisis del dicroísmo circular y confirmado por la síntesis de (18) a partir de la L-ramnosa<sup>54</sup>.

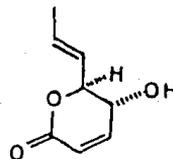


(17) R =  $\beta$ -D-glucosil

(18) R = H



(19)

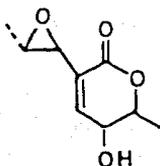


(20)

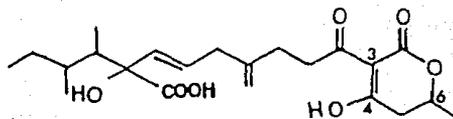
Argoudelis y Zieserl aislaron un antibiótico del hongo *Aspergillus nidulans*, el cual fue denominado como U-13,933 (19)<sup>55</sup>. Este compuesto conocido como la asperlina (19), también ha sido aislado de *A. caespitosus*<sup>56</sup>, *A. carneus*<sup>57</sup> y de la especie de *Aspergillus* NRRL5769<sup>58</sup>. La estructura y estereoquímica relativa se estableció mediante experimentos de desacoplamiento en la RMN-<sup>1</sup>H. Evans, Ellestad y Kunstmann, relacionaron a la asperlina con la fomolactona (20), aislada de una especie de *Nigrospora* no identificada, mediante la oxidación del doble enlace con ácido m-cloroperbenzoico para la formación de la asperlina<sup>59</sup>. El antibiótico fomolactona también ha sido aislado de *Phoma minispora*<sup>60</sup> y de la especie del género *Nigrospora* Z 1276<sup>61</sup>. La

configuración absoluta (S) para los centros quirales en (20) se obtuvo mediante el efecto Cotton observado para este metabolito<sup>59</sup>.

Los hongos *Aspergillus elegans*<sup>57</sup>, *A. ochraceus*<sup>62</sup> y *A. melleus*<sup>63</sup> sintetizan una 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona poco común, la aspirona (21), compuesto relacionado con la asperlina y la fomolactona, cuya estructura y estereoquímica absoluta se confirmó mediante degradación oxidativa para la generación de dos fragmentos quirales, el (-)-1-desoxieritriol y el ácido (-)-2,3-epoxibutírico<sup>64</sup>.



(21)

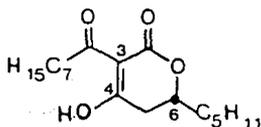


(22)

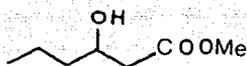
La alquilación del núcleo C-6, la hidroxilación en C-4 y la acilación en C-3 del anillo lactónico constituyen un rasgo común para las  $\delta$ -lactonas que presentan actividad fungicida. El primer compuesto de este tipo identificado, fue el ácido alternárico (22), aislado del hongo *Alternaria solani*<sup>65</sup>. La estructura de la cadena lateral se estableció mediante degradaciones que incluyen hidrólisis alcalina, ozonólisis y oxidaciones con peryodato<sup>66,67</sup>. Otro compuesto similar aislado del hongo *Lachnellula fusc sanguinea*<sup>68</sup> es el ácido lachnelluloico (23).

Las Podoblastinas A, B y C (24-26) son compuestos fungicidas relacionados con los compuestos aislados de hongos y

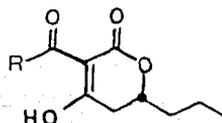
constituyen metabolitos secundarios encontrados en la especie vegetal *Podophyllum peltatum* L. (Berberidaceae)<sup>69</sup>. La estereoquímica del carbono C-6 se confirmó mediante la degradación oxidativa para la obtención del derivado metilado (27)<sup>70</sup>.



(23)



(27)

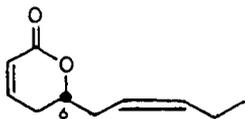
(24) R = CH<sub>3</sub> (CH<sub>2</sub>)<sub>10</sub>-(25) R = H<sub>2</sub>C=CH-(CH<sub>2</sub>)<sub>9</sub>-(26) R = CH<sub>3</sub> (CH<sub>2</sub>)<sub>12</sub>-

### 3.12 6-ALQUENIL-5,6-DIHIDRO- $\alpha$ -PIRONAS.

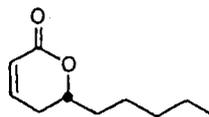
Existen otro tipo de compuestos, las 6-alquenil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas que también representan constituyentes volátiles semejantes a sus análogos saturados. La primera decadienólida encontrada en la naturaleza fue la tuberolactona (28) aislada de las flores del nardo *Polygonatum tuberosum* L. (Amarillidaceae)<sup>34</sup>. La estructura se estableció por estudios de RMN-<sup>1</sup>H y EM. La configuración absoluta R del carbono C-6 se determinó mediante la hidrogenación del producto natural para obtener la (+)-5-decanólida (29), previamente preparada mediante reducción microbiológica a partir del correspondiente cetoácido<sup>71</sup>.

Otro aceite volátil la argenilactona (30) se extrajo de los rizomas de *Aristolochia argentina* Gris (Aristolochiaceae)<sup>72</sup>. La

hidrogenación de este producto natural seguida de una saponificación del anillo de lactona proporcionó el ácido



(28)

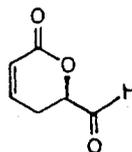


(29)

5-hidroxi-dodecanoico. La configuración *cis* del doble enlace exocíclico y la orientación pseudo-equatorial de la cadena lateral se determinó mediante el signo positivo de la curva de dicroísmo circular que permitió la asignación de la configuración R al único centro quiral de la argentilactona<sup>72</sup>. La configuración absoluta del compuesto natural se confirmó a través de su síntesis a partir del aldehído quiral (31), utilizando una reacción de Wittig para la introducción de la cadena lateral<sup>73</sup>.



(30)



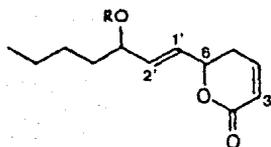
(31)

La familia de las labiadas (Lamiaceae) es la fuente natural de diez 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona con diversos grados de oxigenación en la cadena lateral alquénica.

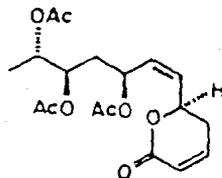
La umuravumbólida (32) y la desacetilumuravumbólida (33) de *Tetradenia riparia*, cuyas estructuras se determinaron mediante

técnicas espectroscópicas, representan las estructuras más simples<sup>49</sup>. La configuración *trans* del doble enlace exocíclico se propuso con base en la intensa absorción observada en el IR con un máximo en  $965\text{ cm}^{-1}$ . De manera sorprendente, estos compuestos no presentaron rotación óptica, postulándose la existencia de estos productos naturales como racematos en *T. riparia*<sup>74</sup>.

La primera 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona sustituida en el núcleo C-6 aislada de la familia Lamiaceae fue la hiptólida (34) de *Hyptis pectinata* (L.) Poit<sup>75</sup>.



(32) R= AcO  
(33) R= H

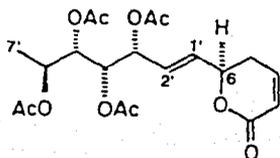


(34)

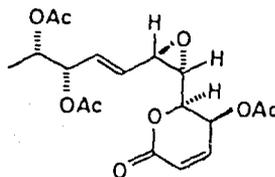
La estereoquímica relativa para los centros quirales de la hiptólida se determinó mediante análisis de Rayos X, el cual también demostró la configuración *cis* del doble enlace exocíclico<sup>76</sup>. La configuración absoluta (6R) se confirmó mediante el efecto Cotton positivo mostrado para la hiptólida<sup>76</sup>.

De especies del género *Hyptis* se han aislado seis alquil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona, las cuales presentan la misma estructura general. Sin embargo, éstas difieren en la estereoquímica de los centros quirales acíclicos. Dos compuestos

la anamarina (35)<sup>77</sup> y la olguina (36)<sup>78</sup> fueron obtenidos de una especie sudamericana no identificada de este género.

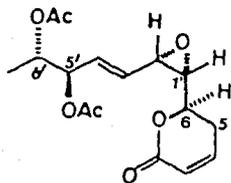


(35)

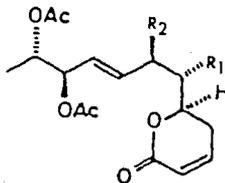


(36)

Un tercer compuesto la 5-desacetoxi-5'-epiolguina (37) se aisló del extracto acetónico de las partes aéreas de la especie mexicana *Hyptis oblongifolia* Benth<sup>79</sup>, su estructura se estableció por difracción de Rayos X.



(37)



(38)  $R_1 = R_2 = \text{OH}$

(39)  $R_1 = R_2 = \text{AcO-}$

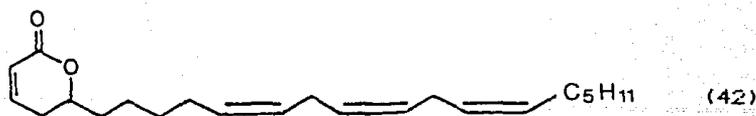
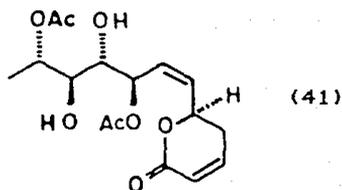
(40)  $R_1 = \text{OH}$   $R_2 = \text{MeO-}$

Otras tres  $\alpha$ -pironas adicionales la 6R-[5R,6S-(diacetiloxi)-1S, 2R-(dihidroxi)-3E-heptenil]-5,6-dihidro-2H-piran-2-ona (38), y su derivado acetilado (39) y la 6R [5R,6S-(diacetiloxi)-1R-

(hidroxi)-2R-(metoxi)-3E-heptenil]-5,6-dihidro-2H-piran-2-ona (40) se caracterizaron durante el estudio fitoquímico de esta especie mexicana utilizada como insecticida. La estructura y estereoquímica de estos metabolitos se obtuvo mediante dicroísmo circular y por correlaciones químicas a partir de la 4-desacetoxi-10-epiolguna<sup>80</sup>.

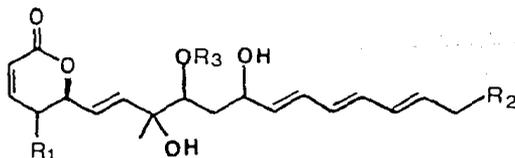
La curva positiva observada en el dicroísmo circular estableció la configuración (R) para el centro quiral C-6 de los productos naturales (37) y (39). De esta manera, la estereoquímica absoluta para estos compuestos y los derivados (38) y (40) se determinó inequívocamente<sup>80</sup>.

La estructura de la 4-desacetoxi-10-epiolguna (37) es similar a la de la olguna (36) y solamente difiere en la ausencia del grupo acetoxilo en C-5 del núcleo de  $\alpha$ -pirona y la configuración inversa del centro C-5' en la cadena lateral. La relación "pref" para C-5' y C-6' en la 4-desacetoxi-10-epiolguna se estableció mediante difracción de Rayos X. Por lo tanto, la configuración (5'R) y (6'S) se asignaron a estos centros quirales<sup>80</sup>.



La sinrotólida (41) fue aislada de *Syncolostemon rotundifolius* y representa una  $\alpha$ -pirona estructuralmente relacionada con los compuestos antes mencionados. Experimentos de desacoplamiento de RMN- $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  permitieron establecer la estructura para este compuesto, en tanto que la estereoquímica de sus centros quirales y la naturaleza *cis* del doble enlace se basó en estudios de cristalografía de Rayos X<sup>81</sup>.

Un compuesto poco común la (5'Z, 8'Z, 11'Z-6-heptadeca-5',8',11'-trienilo)-5,6'dihidro-2H-piran-2-ona (42) se extrajo como un aceite incoloro de la alga roja *Phaeocarpus labillardieri* (Sphaerococaceae) y su estructura se determinó por RMN- $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$ . La posición del sistema triénico homoalílico en la cadena lateral se fundamentó en el aislamiento del hexanal obtenido de la ozonólisis del compuesto (42)<sup>82</sup>. La estereoquímica del C-6 quedó sin resolverse.



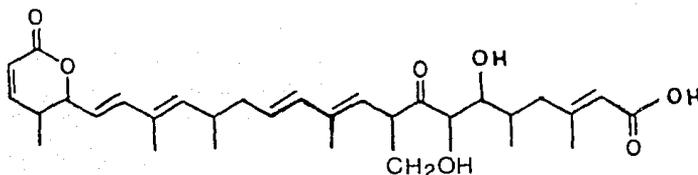
(43)  $R_1 = \text{H}$   $R_2 = \text{OH}$   $R_3 = \text{PO}_3\text{HNa}$

(44)  $R_1 = R_2 = \text{H}$   $R_3 = \text{PO}_3\text{HNa}$

(45)  $R_1 = R_2 = \text{OH}$   $R_3 = \text{PO}_3\text{HNa}$

Tres nuevos agentes antitumorales que contienen fosfato, CI-920 (43), PD113270 (44) y PD113271 (45) fueron aislados de subespecies de *Streptomyces pulveraceus*<sup>83</sup>. La estructura química de estos compuestos fue propuesta por análisis de RMN-<sup>1</sup>H y por degradación química<sup>84</sup>.

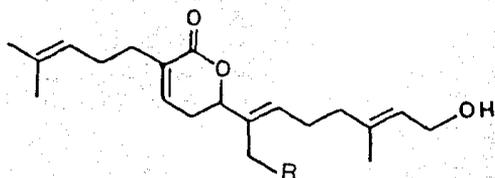
Otro antibiótico antitumoral la kazusamicina B (46), fue obtenido de la especie de *Streptomyces* No. 81-484<sup>85</sup>.



(46)

Seis compuestos todos derivados del geranilnerol, fueron aislados por Bohlmann y colaboradores, de *Ichthyothere ulei* Thumb (compositae). La estructura del compuesto (47) y la ictiouléolida (48) se establecieron por análisis de la RMN-<sup>1</sup>H<sup>86</sup>. El desacoplamiento químico de los protones del espectro de RMN-<sup>1</sup>H del compuesto (49) y (51) revelaron la presencia de un grupo hidroperóxido en la cadena lateral. La adición de trifenilfosfina a la solución de (49) y (51) generó los correspondientes dioles (50) y (52), los cuales también se detectaron como productos naturales en la planta<sup>86</sup>. La configuración del centro quiral C-6 no fue asignada para estos compuestos, cuyas estructuras están estrechamente relacionadas con

la acantoaustralida (53) aislada de *Acanthuspermum australe* (Compositae)<sup>87</sup>.

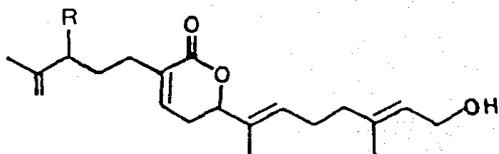
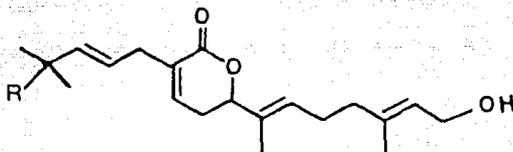


(47) R= H

(48) R= AcO

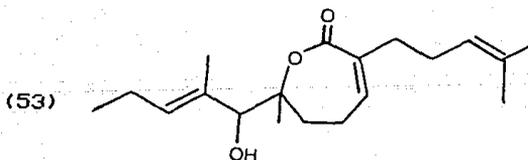
(49) R= OOH

(50) R= OH



(51) R= OOH

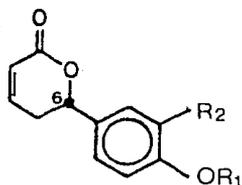
(52) R= OH



### 3.1.3 6-ARIL-5,6-DIHIRO- $\alpha$ -PIRONAS.

Otro tipo de compuestos con núcleo de  $\alpha$ -pirona son las 6-aril-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas como la psilotina (54), originalmente aislada de *Psilotum nudum*<sup>88</sup> y de *Tmesipteris tannensis*<sup>89</sup>, ambas

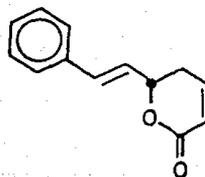
especies de la familia Psilotaceae. De la hidrólisis de la psilotina se obtuvo la aglicona, psilotinina (55), y D-glucosa<sup>90</sup>. La oxidación con trióxido de cromo de la psilotinina generó el ácido p-hidroxibenzóico el cual indicaba la presencia de un anillo bencénico 1,4-disustituido. A pesar de que (55) tiene un solo centro asimétrico, la psilotinina se aisló ópticamente inactiva y, por lo tanto, la racemización debería ocurrir durante la hidrólisis enzimática del producto natural (54). La hidroxipsilotina (56) un constituyente minoritario de *Psilotum nudum* también sufre una racemización similar<sup>91</sup>. La configuración (6S) se estableció para la psilotina mediante estudios de dicroísmo circular y por la síntesis total de la psilotina y su epímero<sup>91</sup>.



(54) R<sub>1</sub> = β-D-glucosil R<sub>2</sub> = H

(55) R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = H

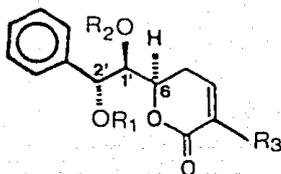
(56) R<sub>1</sub> = H R<sub>2</sub> = OH



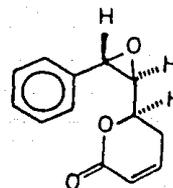
(57)

La goniotalamina (57), una 5,6-dihidro-α-pirona con un estirilo sustituyendo la posición C-6, se ha identificado en cuatro especies de plantas de dos diferentes familias. La primera

oportunidad fue aislada por Hlubucek y Robertson<sup>92</sup> de la corteza de *Cryptocarya caloneura* (Lauraceae), y el empleo de métodos físicos y de RMN-<sup>1</sup>H permitió establecer la presencia de un anillo de  $\delta$ -lactona- $\alpha,\beta$ -insaturada y un anillo de benceno sustituido, el cual fue confirmado por oxidación para generar el ácido benzoico. La configuración *trans* del doble enlace exocíclico fue asignado por la absorbancia en IR a  $973\text{ cm}^{-1}$ .



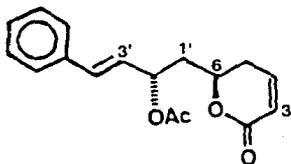
- (58)  $R_1 = R_2 = R_3 = H$   
 (59)  $R_1 = R_3 = H$   $R_2 = \text{AcO}$   
 (60)  $R_1 = R_2 = \text{AcO}$   $R_3 = H$   
 (61)  $R_1 = R_2 = H$   $R_3 = \text{OH}$



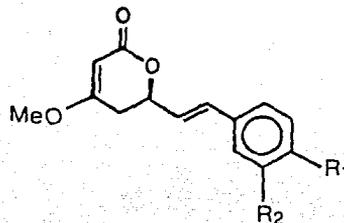
(62)

Las especies del género *Goniothalamus* (Annonaceae) son fuentes ricas de 6-aryl-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas. La goniotalamina (57) se aisló de las especies *G. andersonii*, *G. macrophyllus* y *G. malayanus*<sup>93</sup>. *G. sesquipetalus* y *G. griffithii* proporcionaron cuatro compuestos análogos a la goniotalamina, los cuales difieren en el grado de hidroxilación y/o acetilación de los centros quirales C-1' y C-2', el gonodiol (58), el monoacetilgonodiol (59), el diacetilgonodiol (60) y el gonotriol (61). La estructura

de estos compuestos se estableció mediante análisis de su datos espectroscópicos de RMN-<sup>1</sup>H y espectrométricos<sup>94</sup>. Se demostró que la estereoquímica de los centros C-1' y C-2' era idéntica en los productos naturales (58-61) mediante interconversiones químicas. La configuración (1'S) y (2'S) para los cuatro compuestos se propuso a partir de la hipótesis biosintética que involucraría la epoxidación de la goniotalamina y la subsecuente apertura enzimática del epóxido *trans* para dar el correspondiente diol (58)<sup>95</sup>. El epóxido intermediario (62) se aisló recientemente de *G. macrophyllus*<sup>96</sup>.



(63)

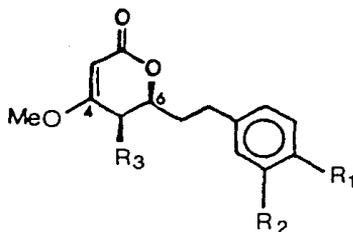
(64)  $R_1 = R_2 = H$ (65)  $R_1 + R_2 = -O-CH_2-O-$ 

La estereoquímica relativa de este epóxido (62) se dedujo a partir del valor de la constante de acoplamiento entre H-1', H-2' y H-1', H-6'<sup>96</sup>.

Del género *Cryptocarya* (Lauraceae) también se aisló una nueva 6-aril-5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona con un doble enlace hexocíclico en la posición 3'. La criptocarialactona (63) se aisló por primera vez de *C. bourdillonii* Gamb<sup>97</sup> y posteriormente de *C. moschata*<sup>98</sup>. La

estructura (63) se propuso por el análisis de sus datos espectroscópicos y espectrométricos<sup>97</sup>.

Un gran número de 6-aril-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas metoxiladas en C-4 se han aislado del arbusto tropical *Piper methysticum* Forst. (Piperaceae), ampliamente conocida en las islas del Pacífico Sur como Kava y Kawa. Esta especie es un importante remedio en la medicina tradicional y constituye la base para la preparación de una bebida ampliamente utilizada en los ritos ceremoniales y sociales de los polinesios<sup>99</sup>.



- (66)  $R_1 = R_2 = R_3 = H$   
 (67)  $R_1 = R_2 = -O-CH_2-O-$   $R_3 = H$   
 (68)  $R_1 = R_2 = H$   $R_3 = OH$   
 (69)  $R_1 = OMe$   $R_2 = R_3 = H$   
 (70)  $R_1 = OH$   $R_2 = OMe$   $R_3 = H$   
 (71)  $R_1 = R_2 = OMe$   $R_3 = H$

La química de las piperólidas o lactonas kawa (64-71) se ha descrito ampliamente en la literatura<sup>99,100</sup>. La estereoquímica absoluta del centro quiral C-6 para las piperólidas se confirmó

mediante dicroísmo circular<sup>101</sup>.

Finalmente, los compuestos (66), (67), (69) y (71) también se aislaron de la especie brasileña *Aniba gigantigolia* (Lauraceae)<sup>102</sup>.

### 3.2 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS 5,6-DIHI-DRO- $\alpha$ -PIRONAS NATURALES.

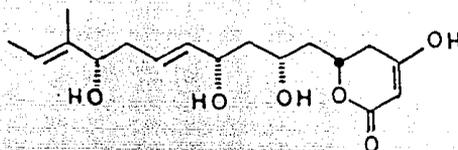
Pocas investigaciones se han realizado conducentes a la evaluación de la actividad biológica potencial de las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas.

Algunas 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas sustituida en el núcleo C-6 han presentado actividad alelopática. El ácido parasórbico (1), la psilotina (54) y la criptocarialactona (63), inhiben la germinación de las semillas y el crecimiento de las plantas<sup>103,104</sup>.

Las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas aisladas de hongos exhiben una gran variedad de actividades biológicas, destacando la actividad antimicrobiana y fungicidas. Los compuestos (19) y (20) aislados de especies de *Aspergillus* y *Nigrospora* presentan actividad antimicrobiana<sup>56,60</sup>.

La asperlina (19) presentó una actividad inhibitoria significativa principalmente contra *Candida albicans* (MIC 75  $\mu\text{g/ml}$ ). La concentración mínima inhibitoria obtenida para estas  $\alpha$ -pironas en contra de *Salmonella paratyphi* fue de 50  $\mu\text{g/ml}$  y para *Trichomonas vaginalis* de 80-90  $\mu\text{g/ml}$ .

La pestalotina (12) estimula el crecimiento vegetal, efecto parecido al ácido giberélico<sup>46</sup> en plantas, mientras que la toxina 1 (72), aislada del hongo *Alternaria citri*, y el ácido alternárico (22), aislado de *A. solani*, son sustancias fitopatógenas<sup>65,105</sup>.



(72)

El compuesto (72) es responsable de las manchas cafés desarrolladas en las hojas de los cítricos, y el ácido alternárico (22) es el responsable del colapso del tejido vegetal y el marchitamiento de plantas económicamente importantes de las familias Solanaceae, Cruciferae y Compositae.

El ácido alternárico (22) y las  $\alpha$ -pironas aciladas en el carbono 3 son toxinas fungicidas específicas<sup>103</sup>. El compuesto (22) inhibe la germinación de las esporas de *Absidia glauca*, *Myrothecium verrucia* y *Stachybotrys atra*, a muy bajas concentraciones<sup>65</sup>.

De las  $\alpha$ -pironas naturales aisladas a partir de plantas superiores, la goniotalamina (57) presentó actividad fungicida.

La actividad embriotóxica y teratogénica demostrada para la goniotalamina (57) y su derivado oxirano (62) justifica el uso popular que las especies del género *Goniothalamus* tienen en

Malasia como agentes abortivos<sup>94</sup>.

El gonotriol (61) presentó toxicidad para las larvas del crustáceo *Artemia salina* (LC<sub>50</sub> 269 ppm), también produce un 38% de inhibición de las agallas inducidas por *Agrobacterium tumefaciens* en la papa y una moderada actividad sobre células tumorales humanas, especialmente significativa para el carcinoma mamario (ED<sub>50</sub> 5.9 µg/ml)<sup>106, 107</sup>.

Las α-pironas (37-40) aisladas del género *Hyptis* también presentaron una moderada actividad tóxica para *Artemia salina* (LC<sub>50</sub> 85-280 ppm) y una actividad citotóxica poco significativa<sup>90</sup>.

La osmundalactona (18) inhibe la alimentación de las larvas de las mariposas *Eurema hecabe mandarina* y, por lo tanto, es el metabolito responsable de la actividad "antialimentaria" del helecho *Osmunda japónica*. De manera interesante, dos especies de hormigas del género *Componotus* emplean la mascoilactona (4) como una sustancia de defensa<sup>91, 97</sup>. Por último, las lactonas kawa (64-71) son algunos de los principios activos de las raíces, rizomas y tallos de *Piper methysticum*<sup>108</sup>. Entre las actividades biológicas descritas para estas 5,6-dihidropironas del género *Piper* se incluyen interesantes actividades farmacológicas, como relajantes del músculo liso, anestésicos locales, antiinflamatorios, antipiréticos, antimicóticos y antiedémicos<sup>108</sup>.

### 3.3 GENERALIDADES SOBRE *HYPTIS PECTINATA*.

*Hyptis pectinata* (L.) Poit. pertenece a la familia Lamiaceae y se conoce comúnmente con los nombres de salvia, hierba del burro y xoltexnuk en el sureste mexicano. Esta especie se encuentra ampliamente difundida como una maleza en las regiones pantropicales, donde es empleada en la medicina tradicional de numerosos pueblos como un remedio para múltiples propósitos, principalmente como analgésico estomacal<sup>14</sup>, antipirético<sup>14</sup>, carminativo<sup>14</sup> y antiparasitario<sup>14</sup>. Infusiones de toda la planta se utilizan para el tratamiento de enfermedades infecciosas de la piel y como cicatrizante<sup>13</sup>. Las hojas frescas se utilizan en inhalaciones en casos de congestión pulmonar<sup>14,13</sup> y rino-faringitis<sup>13</sup>. En nuestro país la hierba del burro destaca por sus propiedades antisépticas y analgésico estomacales en la medicina tradicional de los estados de Veracruz, Tabasco y Oaxaca.

*H. pectinata* es un subarbusto de hasta 3 m de alto, ramificado con tallos leñosos, pubescentes, hojas opuestas, ovadas y dentadas, de 2-4 cm de largo y 1-2 cm de ancho; pecioladas de 4-5 cm de largo; con abundantes flores pequeñas formando glomérulos apretados y en espiga; la corola bilabiada es de color azul; sus semillas son aplanadas, subovales de 4-5 mm y comestibles<sup>109,110</sup>.

En relación con el contenido metabólico de esta planta medicinal, sólo dos estudios químicos previos se han realizado. El primero describe el aislamiento y la elucidación estructural de

una 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona, la hiptólida (34), a partir del extracto clorofórmico obtenido de las partes aéreas<sup>75,76</sup>. Una segunda investigación enfocada al análisis mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas del aceite esencial de *H. pectinata* permitió la caracterización de 32 compuestos monoterpénicos, encontrándose que esta esencia está constituida principalmente por timol (26%) y *p*-cimeno (33.7%)<sup>13</sup>. La evaluación de la actividad antimicrobiana de este aceite corroboró su empleo como un agente antiséptico en la medicina tradicional y sugirió que las cantidades significativas de timol probablemente justifican las propiedades bactericidas observadas para *H. pectinata*<sup>13</sup>.

#### 4. PARTE EXPERIMENTAL.

##### 4.1 TECNICAS ANALITICAS.

###### 4.1.1 PROCEDIMIENTOS GENERALES.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos. Los espectros de IR se registraron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 599B. Los espectros UV se obtuvieron en un espectrofotómetro Beckman DU-7. Los espectros RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se generaron en un aparato Varian VXR-300S, utilizando como disolvente  $\text{CDCl}_3$  y como referencia interna TMS. Los espectros de masas fueron registrados en un aparato Hewlett Packard 5985-B. Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro Perkin-Elmer 241. Las cromatografías en columna se realizaron con gel de sílice 60 Merck (malla 70-230). Se utilizaron cromatofolios de aluminio y cromatoplaques cubiertas con gel de sílice 60-F<sub>254</sub> (Merck) para los análisis y las purificaciones a nivel preparativo en cromatografía en capa fina.

###### 4.1.2 ANALISIS POR CROMATOGRAFIA DE GASES-ESPECTROMETRIA DE MASAS (CG-EM).

###### CONDICIONES INSTRUMENTALES:

Los espectros de masas se registraron con un espectrómetro Hewlett Packard 5988-A equipado con una columna capilar de sílice fundida (10 m x 0.11 mm d.i.) recubierta con silicón OV-101, el

programa de temperatura fue isotérmico a 50°C durante 1 minuto y posteriormente se incrementó a una velocidad de 4.5°/min hasta alcanzar 200°C con un flujo de 1.5 ml/min para el gas He. La temperatura del inyector y la interfase fue de 220°C. Cada espectro se midió por un segundo con un voltaje de ionización de 70 eV y con una temperatura de la fuente iónica de 260°C. Los espectros obtenidos por ionización química se registraron utilizando isobutano, con un voltaje de ionización de 90 eV. La temperatura de la fuente iónica fue de 150°C.

## 4.2 MATERIAL VEGETAL.

Las partes aéreas de una población de *H. pectinata* (L.) Poit (Lamiaceae) se colectaron en noviembre de 1987, en el Km. 9 de la carretera Jalapa-Puerto de Veracruz, estado de Veracruz, México. Un ejemplar de referencia se depositó en el Herbario Nacional, Instituto de Biología, UNAM (M-21853).

## 4.3 EXTRACCION Y PURIFICACION DE LOS CONSTITUYENTES ANTIMICROBIANOS.

### 4.3.1 METODOLOGIA DE EXTRACCION Y FRACCIONAMIENTO BIODIRIGIDO.

Las partes aéreas secas (3.7 Kg) se extrajeron con  $\text{CHCl}_3$  (13 l) a temperatura ambiente durante 5 días. Posteriormente, el disolvente de extracción se decantó y filtró para ser concentrado

por destilación reducida. La concentración final proporcionó 200 g del extracto orgánico total.

Se realizó la evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana del extracto original mediante el método de difusión de agar (ver parte experimental 4.4). La resolución del extracto se efectuó por cromatografía en gel de sílice (2.5 Kg) utilizando como sistema de elución la mezcla de  $\text{CHCl}_3$ - $\text{Me}_2\text{CO}$  de polaridad creciente. El volumen de los eluatos fue de 800 ml y cada uno se concentró al vacío hasta un volumen total de aproximadamente 30 ml. La semejanza y la homogeneidad de los constituyentes observados mediante un análisis en cromatografía en capa fina, permitió la reunión de cada uno de los eluatos, obteniéndose seis fracciones concentradas, que se evaluaron de manera independiente mediante el análisis cualitativo antes mencionado para determinar su potencialidad antimicrobiana.

#### 4.3.2 PURIFICACION DE LA PECTINOLIDA.

La fracción clorofórmica (fracción II, 23.79 g) responsable de una significativa actividad biológica, se recromatografió sobre una columna de gel de sílice (250 g) utilizando n-hexano- $\text{CHCl}_3$  (1:3). El total de los eluatos obtenidos de 150 ml cada uno se reunieron en dos fracciones secundarias.

La purificación de la fracción secundaria de mayor polaridad (subfracción II) se realizó mediante una decoloración de la muestra disuelta en cloroformo con carbón activado. Después de

reposar la suspensión por una hora, se filtró en vacío a través de celita y se efectuaron sucesivos lavados con  $\text{CHCl}_3$ . El filtrado se concentró a presión reducida obteniéndose un aceite amarillo (16 g). Este residuo se sometió a una cromatografía en columna (600 g de gel de sílice), eluida con n-hexano- $\text{CHCl}_3$  (1:3).

La actividad antimicrobiana se detectó en los eluatos de  $R_f=0.52$  ( $\text{CHCl}_3$ -hexano- $\text{Me}_2\text{CO}$ ; 7:2:1), los cuales proporcionaron 5.6 g de un aceite incoloro.

Cromatografías analíticas en capa fina de esta fracción permitieron visualizar, con ayuda de su absorción en el UV, a un solo compuesto el cual desarrolló un color azul con  $\text{CeSO}_4/\text{H}_2\text{SO}_4$ .

#### 4.3.3 PURIFICACION DE LA HIPTOLIDA.

La fracción III (12.6 g) se purificó mediante una columna de gel de sílice (300 g). La actividad biológica correspondió al eluato de  $R_f=0.23$  ( $\text{CHCl}_3$ -hexano- $\text{Me}_2\text{CO}$ ; 7:2:1), obtenido con n-hexano- $\text{CHCl}_3$ , del cual precipitó la hiptólida (42 mg) como un residuo sólido en forma de pequeñas agujas incoloras. La elución con  $\text{CHCl}_3$  proporcionó 5 g del ácido betulínico.

El resto de las fracciones inactivas obtenidas de la columna original, así como todas las subfracciones generadas durante el proceso de purificación de los constituyentes activos, se trataron de manera independiente al presente trabajo con el fin de aislar y purificar los metabolitos mayoritarios<sup>111</sup>.

#### 4.4 MONITOREO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

La evaluación preliminar de la potencialidad antimicrobiana del extracto original, así como de cada una de las fracciones y compuestos puros obtenidos durante los procedimientos de separación, se realizó utilizando las técnicas microbiológicas cualitativas de difusión en agar <sup>112</sup>.

Se determinó el valor de la concentración mínima inhibitoria (MIC) para los compuestos que mostraron una actividad significativa en la evaluación primaria, utilizando las técnicas de análisis cuantitativo antimicrobiano de dilución en caldo nutritivo <sup>113</sup>.

##### 4.4.1 MICROORGANISMOS DE PRUEBA.

Las siguientes cepas se utilizaron como organismos de prueba en las evaluaciones primarias y secundarias.

Microorganismos	ATCC No.	Clasificación
<i>Bacillus subtilis</i>	6633	Gram positivo
<i>Staphylococcus aureus</i>	6538	Gram positivo
<i>Escherichia coli</i>	8739	Gram negativo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9027	Gram negativo
<i>Candida albicans</i>	10231	Levadura

#### 4.4.2 PREPARACION DE LOS INOCULOS.

Las bacterias se prepararon mediante incubación en caldo nutritivo (Merck) durante 24 horas a 37°C. *Candida albicans* se cultivó en caldo-glucosa 2% Saboraud (Merck) y se incubó por 48 horas a 28°C.

La concentración final de organismos en cada uno de los cultivos preparados se ajustó mediante una dilución en solución salina isotónica (NaCl 0.9%) hasta obtener la turbidez equivalente al estándar No. 1 de McFarland (0.1 ml de BaCl<sub>2</sub> 1% y 9.9 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1%)<sup>14</sup>, correspondiente a un número aproximado de 10<sup>6</sup> células ml<sup>-1</sup>.

#### 4.4.3 ANALISIS CUALITATIVO ANTIMICROBIANO.

##### 4.4.3.1 PREPARACION DE LA MUESTRA DE PRUEBA.

Las muestras a evaluar se suspendieron en una solución acuosa de Tween 80 al 1%.

Los extractos y las fracciones se evaluaron a una concentración de 100 y 20 mg ml<sup>-1</sup>, respectivamente. En tanto que los compuestos puros a una concentración de 1 mg ml<sup>-1</sup>.

Los controles positivos se prepararon utilizando 1 mg ml<sup>-1</sup> de sulfato de estreptomycinina y 30 mg ml<sup>-1</sup> de nistatina en solución acuosa.

#### 4.4.3.2 PROCEDIMIENTOS DEL ENSAYO.

Un mililitro de la suspensión bacteriana se sembró de manera uniforme en cada caja Petri (100 x 15 mm) de prueba, conteniendo 15 ml de agar-antibiótico No. 1 (Merck) para las bacterias o agar-sabouraud (Glucosa 4% Merck) para *C. albicans*. Con un horadador cilíndrico se removió el agar de las placas para producir tres perforaciones de un diámetro aproximado de 11 mm. Posteriormente, se adicionaron 100  $\mu$ l del control positivo en una de las perforaciones; 100 y 50  $\mu$ l de la solución muestra se adicionaron de manera independiente en las cavidades restantes. Las placas así preparadas se mantuvieron por un periodo de 1 a 2 horas a temperatura ambiente para facilitar la difusión de las muestras. Transcurrido ese tiempo, las placas se incubaron por 24 horas a 37°C para las bacterias y durante 48 horas a 28°C para la levadura. Para cada muestra de prueba, el ensayo se realizó por duplicado.

La actividad antimicrobiana se registró midiendo la longitud (mm) de la zona de inhibición que circundó a cada una de las perforaciones.

#### 4.4.4 ANALISIS CUANTITATIVO ANTIMICROBIANO.

Para cada una de las determinaciones de la concentración mínima inhibitoria (MIC) se preparó una serie de 10 tubos de ensayo conteniendo caldo nutritivo estéril. El primer tubo en esta serie contenía 4.5 ml de caldo nutritivo y los restantes

2.5 ml cada uno. El compuesto de prueba se disolvió a una concentración de  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  en una mezcla de  $\text{MeOH-H}_2\text{O}$  (1:1) y 0.5 ml de esta solución se transfirieron al primer tubo con agitación vigorosa. 2.5 ml de esta suspensión se transfirieron del primer tubo al segundo mezclando cuidadosamente. Esta misma operación se realizó con el tubo siguiente y así sucesivamente, resultando en una serie de diluciones que correspondieron a las concentraciones de 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39 y  $0.19 \mu\text{g ml}^{-1}$ .

Cada tubo se inoculó con  $10 \mu\text{l}$  de la suspensión del microorganismo de prueba ( $10^6$  células  $\text{ml}^{-1}$ ). Posteriormente, se incubaron a la temperatura y durante el período apropiados. Cada evaluación se realizó por duplicado.

El sulfato de estreptomicina ( $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) se utilizó como un control positivo.

La concentración mínima que inhibió completamente la proliferación del organismo de prueba se registró como la concentración mínima inhibitoria, MIC ( $\mu\text{l mg}^{-1}$ ).

## 4.5 PREPARACION DE DERIVADOS.

### 4.5.1 REACCIONES DE OXIDACION DE LA PECTINOLIDA.

#### 4.5.1.1 REACCION CON ACIDO M-CLOROPERBENZOICO.

##### 4.5.1.1.1 REACCION No. 1.

50 mg de la muestra en  $\text{CHCl}_3$  (5 ml) se trató con 39.5 mg del ácido m-cloroperbenzoico en solución clorofórmica (5 ml). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente por 2 días. Transcurrido ese tiempo, el análisis cromatográfico en capa fina del crudo de reacción indicó que la materia prima continuaba inalterada. Por lo tanto, la reacción se sometió a reflujo ( $35^\circ\text{C}$ ) durante 72 horas. Al cabo de este tiempo, la materia prima se había agotado.

La solución se lavó con  $\text{NaHCO}_3$  al 10% (10 ml x 3) y posteriormente con  $\text{H}_2\text{O}$  (10 ml). La fase orgánica se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se concentró a presión reducida. Una alícuota del crudo de reacción se analizó mediante CG-EM proporcionando un cromatograma constituido por cuatro picos:  $R_t = 13.26, 14.90, 15.33$  y  $17.01$  min.

## 4.5.1.12 REACCION No. 2.

80 mg de la muestra se disolvieron en  $\text{CHCl}_3$  (5 ml) y se adicionaron 65 mg de m-cloroperbenzoico en solución clorofórmica (5 ml). La mezcla de reacción se mantuvo con agitación continua y reflujo ( $35^\circ\text{C}$ ) por 3 días, el desarrollo de la reacción se verificó mediante cromatografía en capa fina.

Posteriormente, la mezcla de reacción se diluyó con  $\text{H}_2\text{O}$  (10 ml) y se extrajo con  $\text{CHCl}_3$  (10 ml). La fase orgánica se trató como se indica en el procedimiento descrito anteriormente (procedimiento 4.5.1.1.1).

El crudo de la reacción (72.3 mg) se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (1.8 g) utilizando como eluyente  $\text{CHCl}_3$  y mezclas de  $\text{CHCl}_3$ - $\text{Me}_2\text{CO}$  (95:5 y 90:10). Se colectaron 70 fracciones de 10 ml cada una. La elución con  $\text{CHCl}_3$  (fracción 9-18) recuperó 28.6 mg de la materia prima ( $R_f = 0.80$ ;  $\text{CHCl}_3$ - $\text{Me}_2\text{CO}$ ; 4:1). Las fracciones 35-41 eluidas con  $\text{CHCl}_3$ - $\text{Me}_2\text{CO}$  (9.5:0.5) proporcionaron 14.6 mg del derivado Ia, en forma de un aceite incoloro ( $R_f = 0.56$ ,  $\text{CHCl}_3$ - $\text{Me}_2\text{CO}$ ; 4:1). Las fracciones consecutivas 42-66, obtenidas en la elución con  $\text{CHCl}_3$ - $\text{Me}_2\text{CO}$  (9:1), permitieron la purificación de un segundo aceite incoloro ( $R_f = 0.47$ ,  $\text{CHCl}_3$ - $\text{Me}_2\text{CO}$ ; 4:1) correspondientes al derivado Ib (22.5 mg). Las fracciones restantes 67-70 (4.3 mg) se analizaron mediante la secuencia instrumental CG-EM proporcionando tres picos:  $R_t = 14.90$ , 15.33 y 17.01 min.

#### 4.5.113 REACCION No. 3.

Se utilizaron 367.3 mg de la pectinólida y 600 mg del reactivo oxidante en una solución de  $\text{CHCl}_3$  (25 ml) bajo las mismas condiciones experimentales descritas en el procedimiento 4.5.1.1.2.

El crudo obtenido 477.8 mg se purificó mediante cromatografía en columna de gel de sílice (14 g) utilizando  $\text{CHCl}_3$ - $\text{Me}_2\text{CO}$  (95:5) y se colectaron 74 fracciones de 10 ml cada una.

Los eluatos 2-8 (fracción I) recuperaron 170.5 mg de un crudo aceitoso con el mismo  $R_f$  de la materia prima. La fracción II, constituida por la combinación de los eluatos 30-47, proporcionó 30.7 mg de la mezcla de derivados Ia y Ib (CG-EM:  $R_t$  13.26 y 15.33 min, respectivamente). Por último la reunión de las subfracciones 48-74 (fracción III), correspondió en su  $R_f$  al derivado Ib ( $R_t$  15.33 min) y a dos subproductos de mayor polaridad ( $R_t$  14.90 y 17.01 min) en un peso total de 81 mg.

#### 4.5.114 REACCION No. 4.

La fracción I (procedimiento 4.5.1.1.3) y 135 mg del agente oxidante se disolvieron en 25 ml de  $\text{CHCl}_3$ , dejándose reaccionar con agitación continua a reflujo ( $35^\circ\text{C}$ ). El curso de la reacción se siguió por cromatografía en capa fina y al cabo de 6 horas la materia prima se había agotado. Posteriormente, se procedió a extraer el producto de reacción siguiendo la metodología descrita en la sección 4.5.1.1.1, obteniéndose un crudo total de 168 mg. La purificación de este residuo se efectuó mediante cromatografía en

columna de gel de sílice (5 g), eluida con  $\text{CHCl}_3\text{-Me}_2\text{CO}$  (9:1). Un total de 30 fracciones de 10 ml cada una se colectaron.

Las fracciones 7-13 permitieron la obtención de 141.9 mg del derivado Ib. La reunión de las fracciones 14-24 (fracción IV) proporcionó 17.5 mg de un crudo aceitoso. El análisis mediante CG-EM permitió la separación de tres picos,  $R_t$  14.90, 15.33 y 17.01 min.

#### 4.5.12 REACCION CON TETROXIDO DE OSMIO.

A 43.1 mg de la pectinólida se adicionaron 2 ml de una solución de  $\text{OsO}_4$  en terbutanol (2.5%) y 0.5 ml de piridina. La mezcla se dejó en agitación continua durante 4 días. Al cabo de este tiempo, se evaporaron los materiales volátiles en un rotaevaporador conectado al alto vacío a una temperatura de  $25^\circ\text{C}$ . El crudo de reacción se purificó utilizando cromatoplasmas de gel de sílice (20 x 20 cm) y como disolvente para la elución, la mezcla  $\text{CHCl}_3\text{:Me}_2\text{CO}$  (9:1). La banda de  $R_f = 0.33$  ( $\text{CHCl}_3\text{-Me}_2\text{CO}$ ; 9:1) proporcionó 25 mg de un sólido amorfo (Id) de color marrón oscuro p.f. =  $56\text{-}58^\circ\text{C}$ .

#### 4.5.2 REACCION DE ACETILACION.

##### 4.5.2.1 REACCION No. 1.

87.2 mg del derivado Ib se disolvieron en 4 ml de piridina y

1 ml de  $\text{Ac}_2\text{O}$ . La mezcla de reacción se dejó con agitación continua y a temperatura ambiente durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se adicionaron 10 ml de agua destilada y se realizaron dos extracciones sucesivas utilizando en cada una volúmenes de 20 ml de  $\text{AcOEt}$ . Las fases orgánicas se reunieron y fueron tratadas con 20 ml de  $\text{HCl}$  1 N, seguido de un tratamiento alcalino con una solución saturada de  $\text{NaHCO}_3$ .

Por último, la fase orgánica se lavó dos veces con volúmenes de 10 ml de agua en cada ocasión, se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se concentró a presión reducida, obteniéndose 96.7 mg de un aceite incoloro. El producto se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (3 g) eluida con  $n$ -hexano- $\text{AcOEt}$  (4:1). El eluato de  $R_f = 0.42$  (hexano- $\text{AcOEt}$ - $\text{Me}_2\text{CO}$ ; 7:2:1) proporcionó 48.8 mg del derivado acetilado Ic (CG-EM:  $R_t = 13.87$  min).

#### 4.5.2.2 REACCION No. 2.

El total de la fracción III (procedimiento 4.5.1.1.3) se trató con 1 ml  $\text{Ac}_2\text{O}$  y 1 ml de piridina de manera análoga al procedimiento seguido para la reacción de acetilación y purificación del derivado Ib. Mediante esta secuencia, se obtuvo un total de 42.5 mg del crudo de reacción. Una alícuota de este residuo aceitoso se analizó mediante CG-EM, obteniéndose un cromatograma compuesto por un solo pico,  $R_t$  13.68 min; EMIQ m/z (% abundancia relativa): 429 (43), 369 (100).

#### 4.5.2.3 REACCION No. 3.

10 mg de la fracción IV (procedimiento 4.5.1.1.4) se disolvieron en 0.5 ml de  $\text{Ac}_2\text{O}$  y 0.5 ml de piridina dejándose reaccionar durante una hora. Posteriormente, se procedió a extraer el producto de reacción según la metodología descrita en la sección 4.5.2.1, obteniéndose 8.3 mg del crudo de reacción. Este producto se analizó mediante CG-EM utilizando como estándar interno el derivado acetilado Ic. El cromatograma obtenido presentó un solo producto ( $R_t$  13.72 min).

#### 4.5.3 HIDROLISIS DE LA PECTINOLIDA.

La saponificación de la pectinólida (50 mg) se realizó con una solución metanólica de KOH 0.1 M (10 ml). La mezcla se dejó en agitación durante 3 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla de reacción se aciduló con 25 ml de HCl 1N y se extrajo con AcOEt (10 ml x 3 veces), la fase orgánica se lavó con agua destilada (5 ml x 2 veces), se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se concentró a presión reducida obteniendo 35 mg de un aceite incoloro. La purificación del crudo de reacción mediante cromatografía en capa fina proporcionó una banda mayoritaria  $R_f$  = 0.45 ( $\text{CHCl}_3$ - $\text{Me}_2\text{CO}$ ; 4:1), obteniéndose 15.8 mg de un aceite incoloro (Ie).

#### 4.5.4 DEGRADACION OXIDATIVA DE LA PECTINOLIDA.

Un exceso de ozono se burbujó durante 2 horas a una solución

de 200 mg de la pectinólida disueltos en 30 ml de  $\text{CHCl}_3$  a temperatura de  $10^\circ\text{C}$ . La mezcla de reacción se trató con  $\text{H}_2\text{O}_2$  y en agitación continua durante 2 horas. Posteriormente, se extrajo con  $\text{CHCl}_3$  (15 ml) y con *n*-BuOH (15 ml). La fase clorofórmica se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  y se concentró a presión reducida, obteniéndose 120 mg de un aceite amarillo, el cual se purificó mediante cromatografía en capa fina proporcionando 80 mg de un aceite incoloro ( $R_f = 0.75$ ,  $\text{CHCl}_3$ - $\text{Me}_2\text{CO}$ ; 9:1). Este producto se caracterizó como el ácido (+)-2-acetiloxihexanoico:

$[\alpha]_D + 2.3$  (c 0.1,  $\text{CHCl}_3$ ); RMN- $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ): 4.95 (1H, t), 2.09 (3H, s), 1.70 (2H, m), 1.48 (2H, m), 1.29 (2H, m), 0.90 (3H, t); EM-IO (90 eV, isobutano) m/z (abundancia rel.): 175 [M+1] (45), 157 [M+1-18] (19), 115 [M+1-60] (100).

Posteriormente, una solución del producto de ozonólisis (70 mg) en 6 ml de  $\text{CHCl}_3$ -MeOH se trató con 0.5 ml de 1M KOH. La mezcla se mantuvo con agitación continua durante dos días. La extracción del producto de hidrólisis se realizó de manera convencional y su purificación se verificó mediante cromatografía en capa fina. De esta manera, se obtuvo un aceite incoloro (32 mg) de  $R_f = 0.35$  ( $\text{CHCl}_3$ -MeCO; 4:1), el cual correspondió al ácido (+)-2-hidroxihexanoico:

$[\alpha]_D + 20.92$  (c 2.3,  $\text{CHCl}_3$ ); EM-IO (90 eV, isobutano) m/z (abundancia rel.): 133 [M+1] (100), 114 [M+1-18] (38).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSION.

### 5.1 FRACCIONAMIENTO BIODIRIGIDO Y EVALUACION CUALITATIVA DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.

El aspecto más importante de la secuencia metodológica desarrollada en la presente investigación consistió en el empleo de un análisis cualitativo preliminar que permitió detectar la actividad antimicrobiana potencial de los extractos preparados a partir de las partes aéreas de *Hyptis pectinata* y, al mismo tiempo, realizar el monitoreo de esta actividad biológica a lo largo de todo el estudio fitoquímico. De esta manera, el plan de trabajo se dividió en dos etapas generales.

La primera consistió en la determinación cualitativa preliminar de la actividad antimicrobiana del extracto total y de cada una de las eluciones resultantes del fraccionamiento del mismo, mediante la técnica de difusión en agar<sup>6,112</sup>, y una segunda parte cuyo objetivo fue la evaluación cuantitativa antimicrobiana, mediante las técnicas microbiológicas de dilución en agar<sup>113</sup> de los compuestos activos aislados y algunos derivados sintéticos preparados. Esta evaluación secundaria se realizó con el objetivo de establecer relaciones de estructura química-actividad biológica.

A partir del material vegetal seco previamente desgrasado se procedió a preparar un extracto clorofórmico utilizando la metodología convencional de extracción. Posteriormente, se evaluó la actividad antimicrobiana del extracto clorofórmico, observándose un efecto significativo sobre las bacterias Gram

Cuadro 1.

Fraccionamiento biodirigido del extracto clorofórmico de Hyptis pectinata.

Eluatos combinados	Número de fracción	Sistema de elución CHCl <sub>3</sub> -Me <sub>2</sub> CO	Peso del residuo	Evaluación antimicrobiana preliminar
1- 14	I	1:0	13.0 g	INACTIVA
15- 57	II	1:0	23.7 g	ACTIVA
58- 67	III	9:1	22.6 g	ACTIVA
59-101	IV	4:1	48.5 g	INACTIVA
102-127	V	1:1	5.4 g	INACTIVA
128-147	VI	1:1	7.8 g	INACTIVA
148-162	Lavado	0:1	-	-

positivas utilizadas como organismos de prueba. Este extracto activo se sometió a una separación mediante cromatografía en columna de gel de sílice y en este proceso de separación todos los eluatos resultantes se analizaron mediante cromatografía en capa fina. Las fracciones se reunieron tomando en cuenta la homogeneidad y la semejanza de los constituyentes presentes en cada una. Las fracciones así obtenidas fueron sometidas de manera independiente a la evaluación de su actividad antimicrobiana mediante el ensayo ya mencionado. El cuadro 1 resume el fraccionamiento biodirigido del extracto total de *H. pectinata*. Esta metodología permitió observar que la actividad biológica se concentró en las fracciones correspondientes a la elución con cloroformo (fracción II y III). Los resultados de la evaluación antimicrobiana preliminar evidenciaron una significativa actividad biológica para la fracción II en contra de bacterias Gram positivas y, en el caso de *Staphylococcus aureus*, el halo de inhibición generado por esta fracción fue comparable con el observado para el estándar de estreptomina. *Bacillus subtilis* fue el único de los microorganismos de prueba que demostró una moderada respuesta inhibitoria a la fracción III.

Las dos fracciones activas se sometieron a procedimientos de purificación adicionales mediante cromatografía en columna, las cuales permitieron el aislamiento de dos constituyentes activos. El de menor polaridad aislado de la fracción II correspondió a un nuevo metabolito secundario y se denominó con el nombre de la pectinólica. En tanto que el segundo compuesto activo de mayor

Cuadro 2.

Evaluación preliminar cualitativa de la Actividad Antimicrobiana.

Muestra <sup>a</sup>	Diámetro de la zona de inhibición, mm	
	B. subtilis (ATCC 6633)	Staph. aureus (ATCC 6538)
Extracto CHCl <sub>3</sub>	7	6
Fracción II	9	8
Fracción III	4	INACTIVA
Pectinólida	10	9
Hiptólida	4	INACTIVA
Estreptomicina	13	7

<sup>a</sup>Todas las muestras fueron inactivas para E. coli, P. aeruginosa y C. albicans.

polaridad, aislado de la fracción III, se caracterizó como la hiptólida (34), una 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona, previamente descrita en esta especie<sup>75</sup>.

Los resultados de la evaluación cualitativa antimicrobiana preliminar del extracto total, las fracciones y los compuestos puros se incluyen en el cuadro 2. La actividad biológica se determinó midiendo el diámetro de la zona de inhibición en milímetros. La pectinólida presentó una mayor actividad biológica que la desarrollada por la hiptólida, resultando especialmente significativo el halo de inhibición generado por la pectinólida en contra de *S. aureus*, que a la concentración de 100 ppm fue superior al desarrollado por la estreptomycinina en esta técnica de difusión en agar.

El resto de las fracciones inactivas obtenidas de la columna original, así como las subfracciones generadas durante el proceso de aislamiento de los constituyentes activos, fueron tratados de manera independiente al presente trabajo<sup>44</sup> con el objetivo de aislar los metabolitos mayoritarios adicionales presentes en el extracto clorofórmico de *H. pectinata*. La figura 2 presenta el fraccionamiento biodirigido mediante la determinación de la actividad antimicrobiana del extracto total. Las fracciones activas se enmarcan con una línea gruesa.

El cuadro 3 enlista los metabolitos aislados, así como su rendimiento expresado en relación al peso seco del material vegetal empleado. Estos resultados permitieron concluir que el alto rendimiento del agente antimicrobiano mayoritario, la

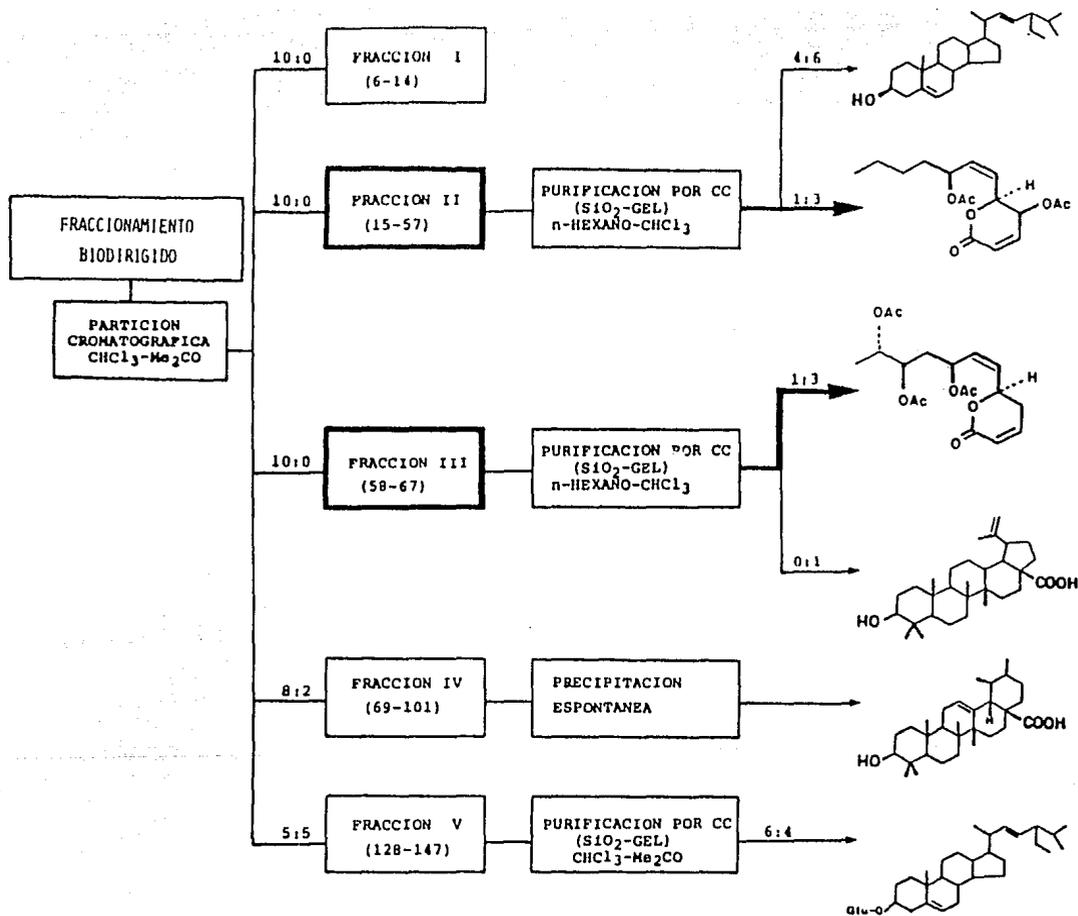


Figura 2. Fraccionamiento biodirigido del extracto clorofórmico de *Hyptis pectinata*.

Cuadro 3.

Rendimiento de los metabolitos aislados de H. pectinata.

---

COMPUESTO AISLADO	RENDIMIENTO	
	gramos	% (peso seco)
ACIDO URSOLICO	27.27	0.7370
PECTINOLIDA	5.6	0.1513
ACIDO BETULINICO	5.0	0.1351
GLUCOSIDO DEL $\beta$ -SITOSTEROL	1.28	0.0346
$\beta$ -SITOSTEROL	0.479	0.0129
HIPTOLIDA	0.042	0.0011

---

pectinólida, justifica las propiedades antisépticas demostradas por las infusiones preparadas con la hierba del burro (*H. pectinata*) y, en especial, su tradicional empleo como agente antimicrobiano cutáneo efectivo en contra de *S. aureus*, microorganismo causante de infecciones y abscesos en la piel<sup>114</sup>.

## 5.2 CARACTERIZACION DE LA HIPTOLIDA.

El componente antimicrobiano de mayor polaridad aislado de *H. pectinata* corresponde a la fórmula molecular  $C_{18}H_{24}O_8$  (análisis elemental). Su espectro de IR presentó absorciones asociadas con la presencia de grupos ésteres ( $\nu$  max  $1736\text{ cm}^{-1}$ ) y dobles enlaces ( $\nu$  max  $3028, 814\text{ cm}^{-1}$ ). La absorción intensa en UV a  $\lambda$  max de  $203\text{ nm}$  ( $\epsilon = 14,300$ ) indicó la presencia de una  $\delta$ -lactona- $\alpha,\beta$ -insaturada.

El espectro de RMN-<sup>1</sup>H presentó resonancias que fácilmente confirmaron la presencia de funciones acetato y del núcleo de una  $\delta$ -lactona- $\alpha,\beta$ -insaturada, mismas que se asignaron de la siguiente manera:

1. Tres singuletes que integraron para tres protones con el desplazamiento característico para los metilos de funciones acetoxilo centrados en  $\delta$  2.03, 2.05 y 2.08.

2. Los protones olefinicos de la  $\delta$ -lactona- $\alpha,\beta$ -insaturada se observaron centrados en  $\delta$  6.04 (1H, ddd, J=9.9, 2.5, 1.2 Hz) y  $\delta$  6.90 (1H, ddd, J=9.9, 5.4, 3 Hz).

3. Por último, se identificó un grupo metilo secundario centrado en  $\delta$  1.20 (3H, d, J=6.5 Hz).

El espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  confirmó las observaciones anteriores y proporcionó información adicional que se interpretó de la siguiente manera:

1. En el espectro de  $^{13}\text{C}$ -APT (Fig. 3) se observaron las resonancias para los núcleos carbonílicos de tres grupos acetoxilo ( $\delta$  170.50, 170.18 y 169.62) y la señal para el carbonilo del núcleo de la 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona ( $\delta$  163.31).

2. Las señales para los átomos de carbonos olefínicos conjugados se observaron en  $\delta$  121.41 y 144.53. El espectro en esta región olefínica presentó dos señales adicionales que evidenciaron la presencia de un doble enlace disustituido, cada uno de ellos en forma de metinos centrados en  $\delta$  130.68 y 131.21.

3. El carbono geminal a la función etérea de la lactona se asignó al metino centrado en  $\delta$  73.77 y, por lo tanto, el núcleo de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona debería estar sustituido por una cadena en la posición C-6. Los carbonos geminales a las funciones acetoxilo correspondían a los tres metinos centrados en  $\delta$  70.91, 70.43 y 66.49.

4. El metileno alílico del núcleo de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona se asignó a la señal centrada en  $\delta$  29.49.

5. Las señales restantes del espectro se asignaron de la siguiente manera: el cuartero para el grupo metilo secundario en  $\delta$  14.70, un metileno en  $\delta$  29.42 y las tres resonancias para los metilos de funcionalidades acetoxilo en  $\delta$  21.08, 21.05, 21.02.

La figura 3 muestra las estructuras parciales que satisfacen los requerimientos para la fórmula molecular  $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{O}_8$  y, al mismo

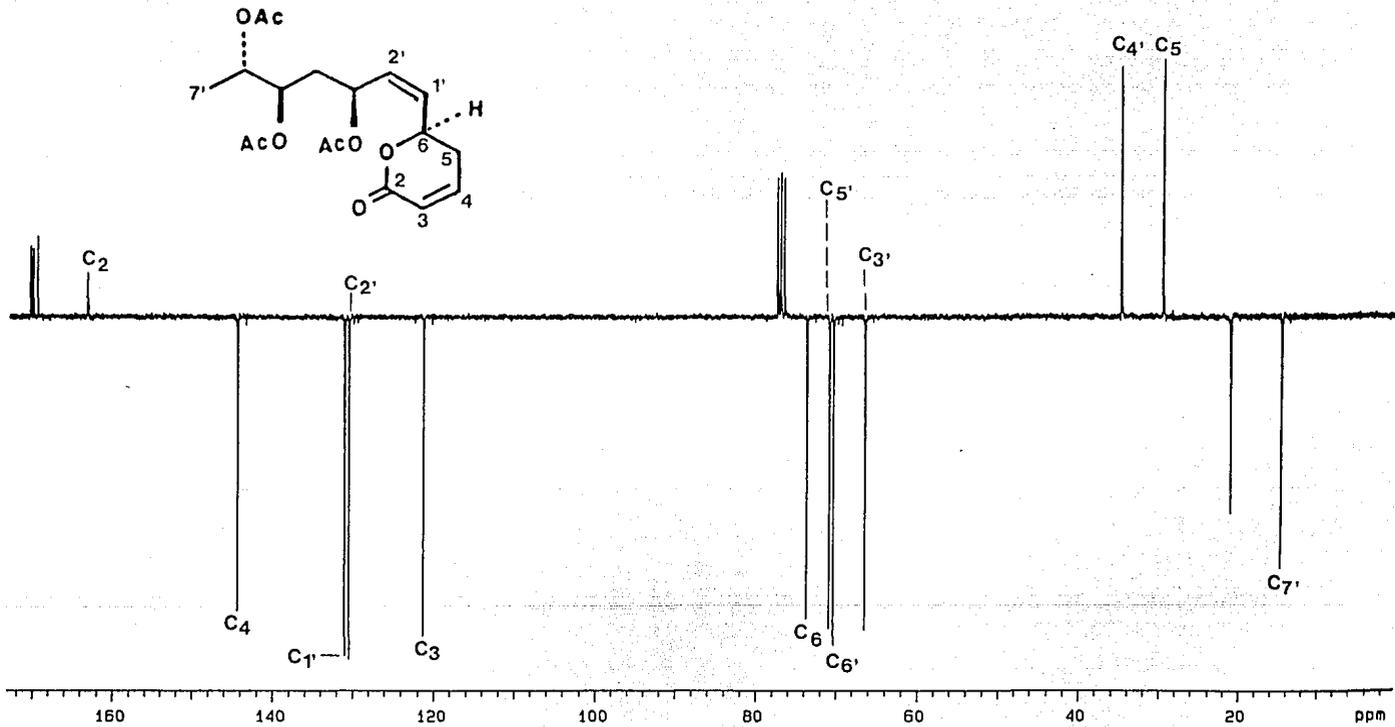


Figura 3. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (APT) de la heptólida.

tiempo, satisfacen las observaciones espectroscópicas discutidas anteriormente.

La correlación bidimensional observada en la RMN- $^1\text{H}$  (2D-COSY) para cada uno de los núcleos de hidrógeno de esta  $\delta$ -lactona antimicrobiana y los experimentos de doble resonancia realizados permitieron establecer la conectividad de cada uno de los fragmentos estructurales identificados de la siguiente manera:

1. La multiplicidad observada para la señal centrada en  $\delta$  6.90 (H-4) correspondió con el acoplamiento olefínico *cis* con el protón en  $\delta$  6.04 (H-3,  $J_{3-4} = 9.9$  Hz). Los dos acoplamientos adicionales que se observaron para esta señal se correlacionaron con el multiplete centrado en  $\delta$  2.43, cuya área de integración correspondía a dos hidrógenos. Esta interacción fácilmente observada en el espectro 2D-COSY permitió asignar inequívocamente al grupo metileno alílico del núcleo de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona. El protón H-4 interacciona con acoplamientos vecinales de  $J_{3-4\beta} = 5.0$  y  $J_{3-4\alpha} = 3$  Hz. Este sistema de multiplicidades ABXY para los núcleos H-3, H-4, H-5 permitió establecer una correlación estructural con la 4-desacetoxi-10-epiolguina (37) y sus congéneres (38-40) aislados de *H. oblongifolia*<sup>80</sup>. La figura 4 muestra el sistema de multiplicidades observado para los protones olefínicos conjugados del núcleo de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona.

2. La interacción restante observada para los protones metilénicos en C-5 correspondía, por lo tanto, al acoplamiento con el protón geminal a la función etérea de la lactona (H-6), cuyo desplazamiento químico se observó en  $\delta$  5.29. El valor observado

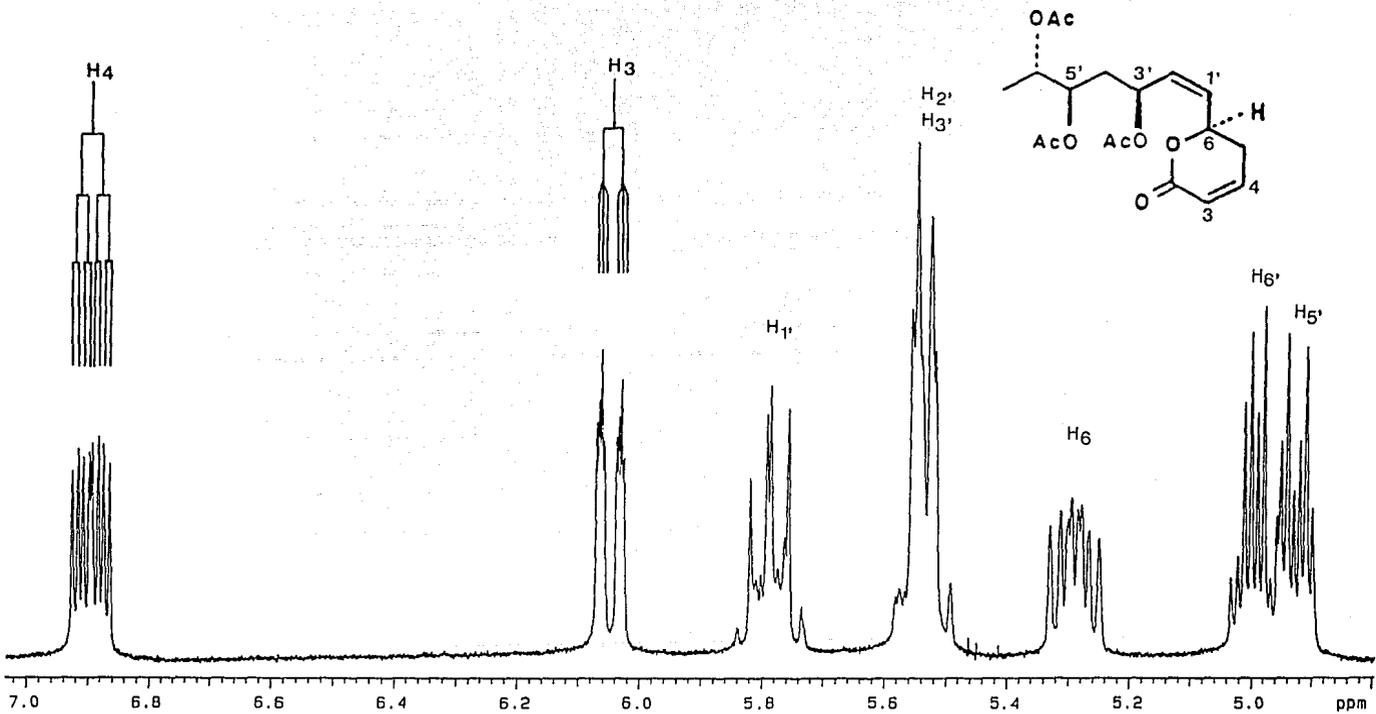


Figura 4. Región vinílica del espectro de RMN- $^1\text{H}$  de la hiptólida.

de 9.9 Hz sugirió una interacción *trans*-diaxial para los protones H-5 $\beta$  y H-6. De esta manera, se estableció la configuración relativa quasi-ecuatorial para la cadena lateral (Fig. 5).

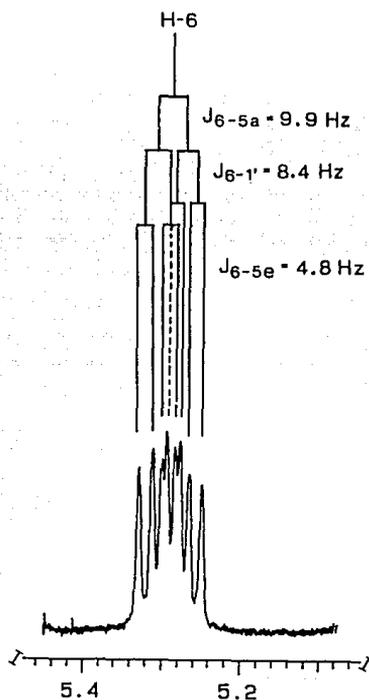


Figura 5. Multiplicidad observada para el núcleo H-6 de la hiptólida.

3. El desacoplamiento diferencial del protón H-6 estableció la interacción vecinal con el protón centrado en  $\delta$  5.79 (1H, dd), el cual colapsó a una señal doble que se asignó al núcleo H-1' ( $J_{6-1'} = 8.4$  Hz) y, por lo tanto, fue posible medir el

acoplamiento adicional olefinico *cis* entre H-1' y H-2' ( $J_{1'-2'} = 10.3$  Hz). Al mismo tiempo, la irradiación de la señal centrada en  $\delta$  5.8 simplificó la resonancia asignada para H-6, verificando las constantes de acoplamiento axial-axial ( $J = 9.9$  Hz) y axial-ecuatorial ( $J = 4.8$  Hz) con el metileno alílico H-5 (Fig. 6).

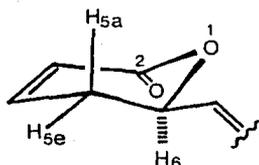


Figura 6. Conformación de pseudosilla del núcleo de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona.

4. El cuadro de conectividad observado en el espectro de RMN bidimensional homonuclear (Fig. 7) entre el protón H-1' y el multiplete centrado en  $\delta$  5.53 permitió asignar el desplazamiento químico para la señal del protón H-2'. Sin embargo, el área de integración para esta señal múltiple correspondía a dos protones, evidenciando la sobreposición de esta señal olefinica con uno de los metinos geminales a una función acetoxilo y, por lo tanto, esta resonancia adicional se asignó al protón H-3'. Este multiplete presentaba acoplamientos adicionales con los hidrógenos centrados en  $\delta$  1.83 y 2.02 que correspondían al grupo metileno no alílico previamente identificado mediante su absorción en el  $^{13}\text{C}$ .

La irradiación del multiplete asignado al protón H-3' produjo la simplificación de los protones en  $\delta$  1.83 y 2.02. De esta manera, se comprobó la asignación previamente descrita (Fig. 7).

5. El desacoplamiento diferencial del metileno 4' produjo la simplificación del multiplete centrado en  $\delta$  4.92, permitiendo la asignación de uno de los protones geminales a los grupos acetoxilo como H-5'. La figura 8 muestra los espectros de RMN- $^1\text{H}$  generados por el desacoplamiento diferencial de los dos protones no equivalentes del grupo metileno H-4'.

6. La correlación bidimensional también mostró el acoplamiento del metino restante centrado en 5 ppm con el grupo metilo terminal ( $\delta$  1.20). Estos experimentos permitieron establecer la estructura del producto natural antimicrobiano de mayor polaridad aislado de *H. pectinata* como la 5,6-dihidro-6-[3,5,6-triacetiloxi-1Z-heptenil]-2H-piran-2-ona.

En el cuadro 4 se incluyen las principales constantes físicas y espectroscópicas de esta  $\delta$ -lactona que corroboran su identidad como la hiptólida<sup>76</sup>, constituyente previamente aislado en el primer estudio fitoquímico realizado de *H. pectinata*. En aquella ocasión, la estereoquímica relativa de este producto natural se estableció mediante difracción de Rayos-X y su configuración absoluta se determinó con base en datos quirópticos como la 6R-(1Z-3S,5R,6S)-5,6-dihidro-6-[3,5,6-triacetiloxi-1-heptenil]-2H-piran-2-ona.

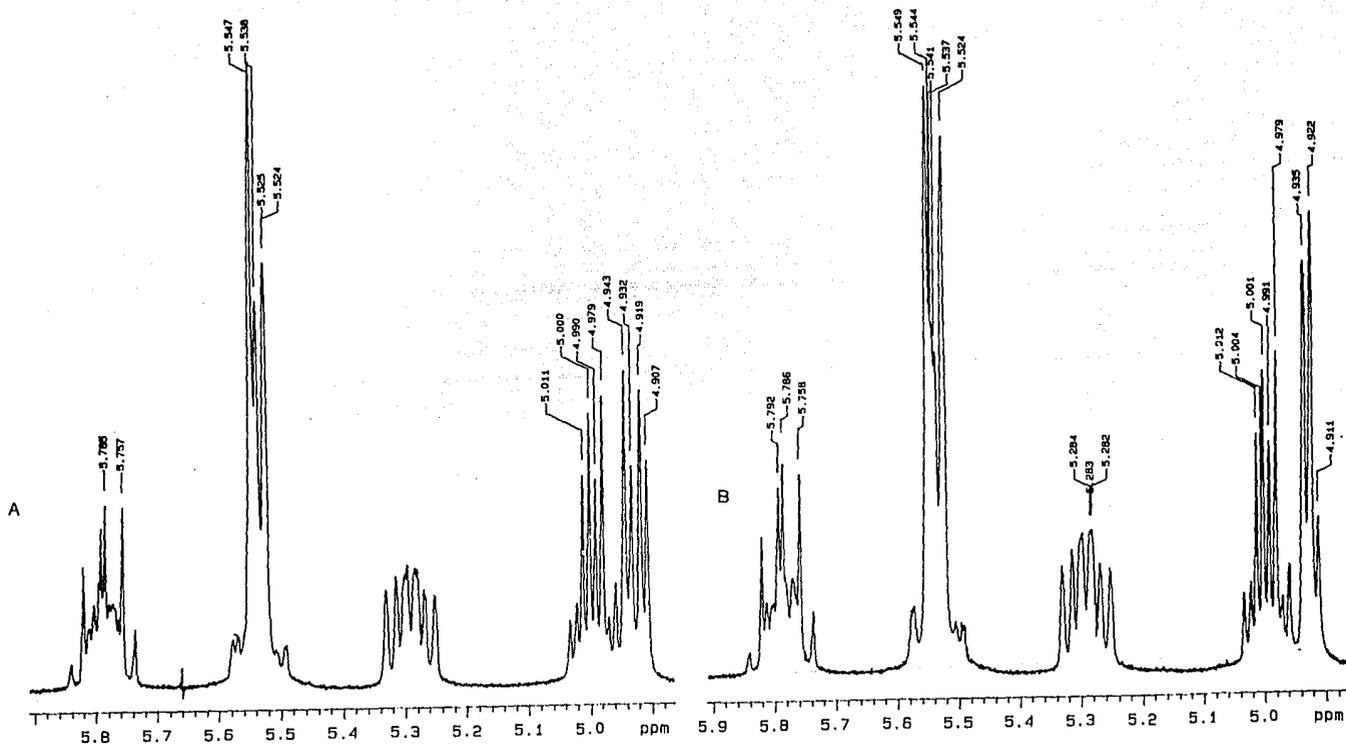
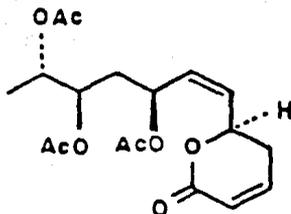


Figura 8. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la hiptólida generado por el desacoplamiento diferencial del grupo metileno en H-4'. Irradiación A: en  $\delta$  1.8; B: en  $\delta$  2.0.

## Constantes físicas y espectroscópicas de la hiptólida.



p.f. = 87-88°C

$[\alpha]_D$  + 11.2 (c=0.6, CHCl<sub>3</sub>)

UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$  203 nm ( $\epsilon=14300$ )

IR  $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$  (cm<sup>-1</sup>): 2920, 1730, 1620, 1365, 1215, 1020, 818.

RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>; TMS) (Espectro 1):  $\delta$  6.90 (1H, ddd, J=9.9, 5.4, 3 Hz, H-4), 6.04 (1H, ddd, J=9.9, 2.5, 1.2 Hz, H-3), 5.78 (1H, dd, J=10.3, 8.4 Hz, H-1'), 5.53 (1H, m, H-2'), 5.53 (1H, m, H-3'), 5.29 (1H, ddd, J=9.9, 4.8, 8.4 Hz, H-6), 5.0 (1H, dc, J=6.5, 2.4 Hz, H-6'), 4.92 (1H, ddd, H-5'), 2.43 (2H, m, H-5), 2.02 (1H, m, H-4b), 1.83 (1H, m, H-4a), 1.20 (3H, d, H-7').

RMN<sup>13</sup>C (75.4 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS) (Espectro 2):  $\delta$  163.31 (C-2), 121.41 (C-3), 144.53 (C-4), 29.49 (C-5), 73.77 (C-6), 131.21 (C-1'), 130.68 (C-2'), 66.49 (C-3'), 34.77 (C-4'), 70.91 (C-5'), 70.43 (C-6'), 14.70 (C-7').

### 5.3 ELUCIDACION ESTRUCTURAL Y ESTEREOQUIMICA DE LA PECTINOLIDA.

El constituyente mayoritario antimicrobiano aislado de *Hyptis pectinata* se denominó con el nombre de pectinólida y se aisló como un aceite ópticamente activo. Su fórmula molecular se estableció por análisis elemental como  $C_{16}H_{22}O_5$ . Al igual que la hiptólida, este constituyente bioactivo presentó las características espectroscópicas asociadas con la presencia del núcleo de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona. El UV presentó un máximo a 208 nm ( $\nu_{max} = 14,200$ ) correspondiente a la transición  $n \rightarrow \pi^*$  de la lactona  $\alpha, \beta$ -insaturada. El espectro de masas obtenido por impacto electrónico corroboró la presencia de dos grupos acetoxilo en la molécula mediante las pérdidas sucesivas de ácido acético ( $m/e$  260) y una molécula de cetena ( $m/e$  208) a partir del ión molecular ( $m/e$  310).

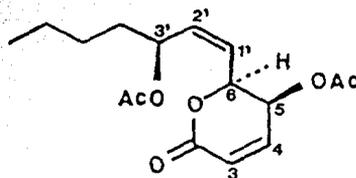
El análisis de RMN de la pectinólida permitió establecer las siguientes conclusiones relacionadas con la naturaleza estructural del compuesto y con la estructura química-actividad biológica observada para este compuesto antimicrobiano. El rasgo más sobresaliente del espectro de RMN- $^1H$  (cuadro 5) consiste en la presencia de las señales para un sistema ABX de una 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona sustituida por un grupo acetoxilo en la posición C-5, correspondiente a los protones vinílicos H-3 ( $\delta$  6.24), H-4 ( $\delta$  6.96) y al protón alílico H-5 ( $\delta$  5.19) (Fig. 9). Este sistema permitió establecer una correlación estructural con las  $\delta$ -lactonas aisladas previamente en otras especies de labiadas y, en especial, con las del género *Hyptis*<sup>76-80</sup>. Las

## Cuadro 5.

Desplazamientos químicos y multiplicidades para los núcleos de hidrógeno de la pectinólida.

Núcleo	$\delta$ /ppm*	multiplicidad J (Hz)
H-3	6.24 (1H, d)	9.7
H-4	6.96 (1H, dd)	9.7, 5.7
H-5	5.19 (1H, dd)	5.7, 2.9
H-6	5.60 (1H, dd)	8.1, 2.9
H-1'	5.73 (1H, dd)	10.5, 8.1
H-2'	5.62 (1H, dd)	10.5, 10.1
H-3'	5.35 (1H, ddd)	10.1, 7.3, 6.6
H-4'	1.70 (2H, m)	
H-5'	1.54 (2H, m)	
H-6'	1.29 (2H, m)	
H-7'	0.90 (3H, t)	6.9
AcO-	2.05 (3H, s)	
AcO-	2.09 (3H, s)	

\*Espectro 3.



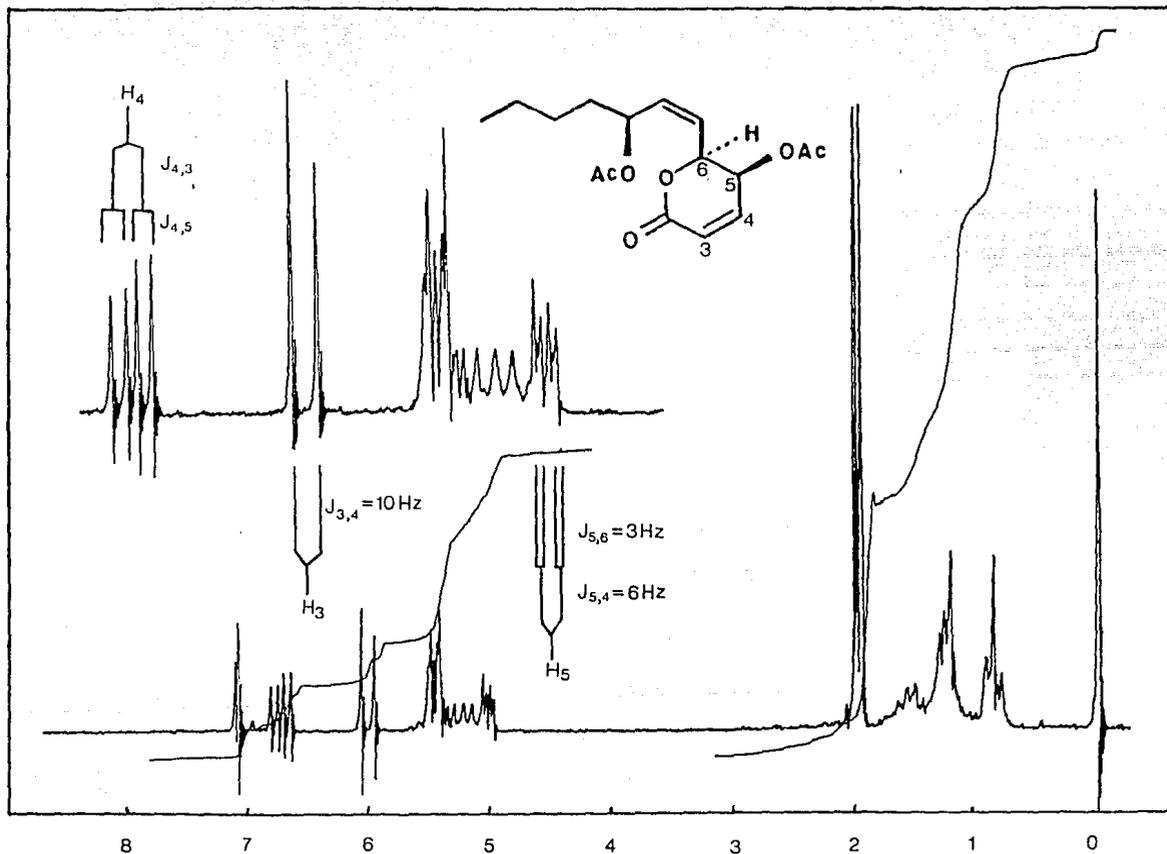


Figura 9. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (90 MHz) de la pectinólida.

multiplicidades de cada una de las resonancias para los protones 1 núcleo de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona de la pectinólida fueron análogas a las observadas para la oliguina (36)<sup>78</sup> (Fig. 10). Por otro lado, la actividad biológica demostrada por la pectinólida se correlacionó con la presencia de la unidad de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona presente también en la asperlina (19), antibiótico aislado de especies de hongos del género *Aspergillus*<sup>55</sup>. La figura 11 muestra el espectro de la asperlina en el cual se observa nuevamente el mismo sistema de multiplicidades ABX para los protones vinílicos y el metino H-5 de la  $\delta$ -lactona- $\alpha,\beta$ -insaturada. Por lo tanto, la pectinólida pertenecía estructuralmente a las 6-alquencil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas de doce átomos de carbono, cuya distribución se limita casi exclusivamente a la familia de las labiadas.

La RMN<sup>13</sup>C confirmó la presencia del núcleo 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona sustituida con una cadena olefínica compuesta de siete átomos de carbono. Las asignaciones realizadas para la cadena lateral indicaron la presencia de una olefina disustituida ( $\delta$  133.17, 126.18), un carbono secundario geminal a uno de los grupos acetoxilo ( $\delta$  64.24) y una cadena alifática lineal de cuatro átomos de carbono. La figura 12 muestra las asignaciones de los núcleos de <sup>13</sup>C de estos fragmentos estructurales que satisfacen los requisitos para la fórmula molecular C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>O<sub>6</sub>.

La correlación bidimensional para las resonancias observadas en el espectro 2D-COSY permitió establecer la conectividad para cada uno de los fragmentos propuestos anteriormente. Así, por

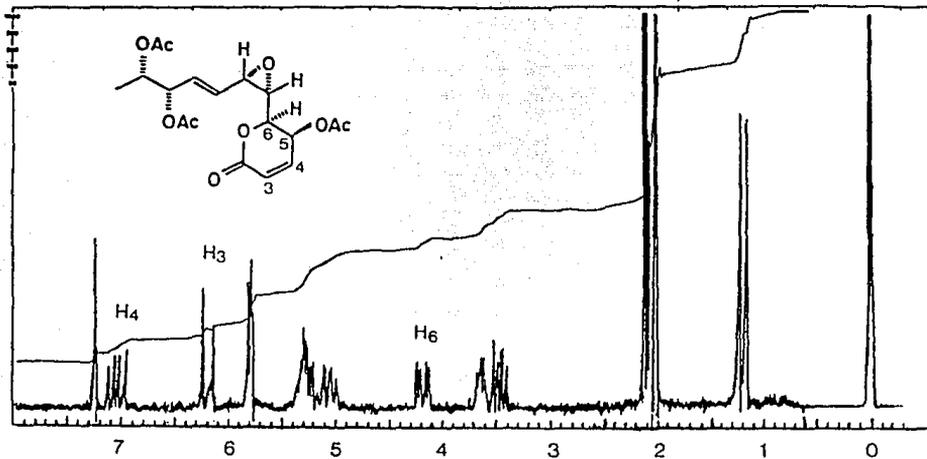


Figura 10. Espectro de  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$  de la alguina.

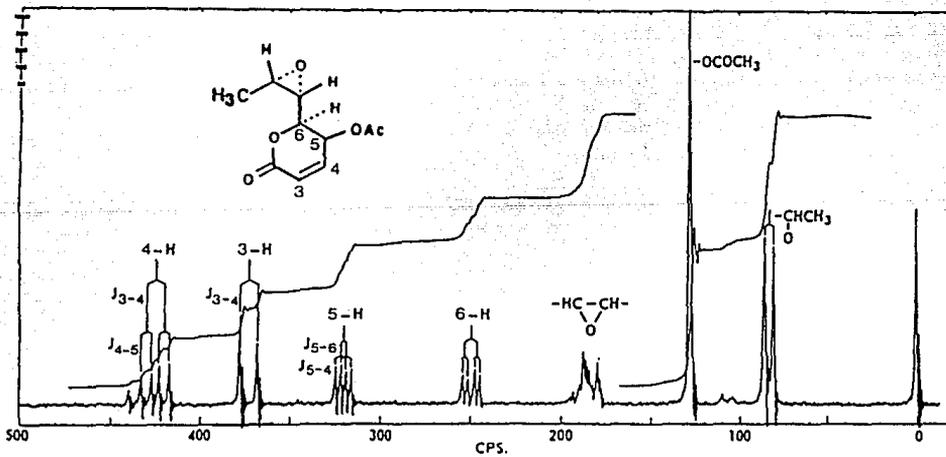


Figura 11. Espectro de  $\text{RMN}^{-1}\text{H}$  de la asperlina.

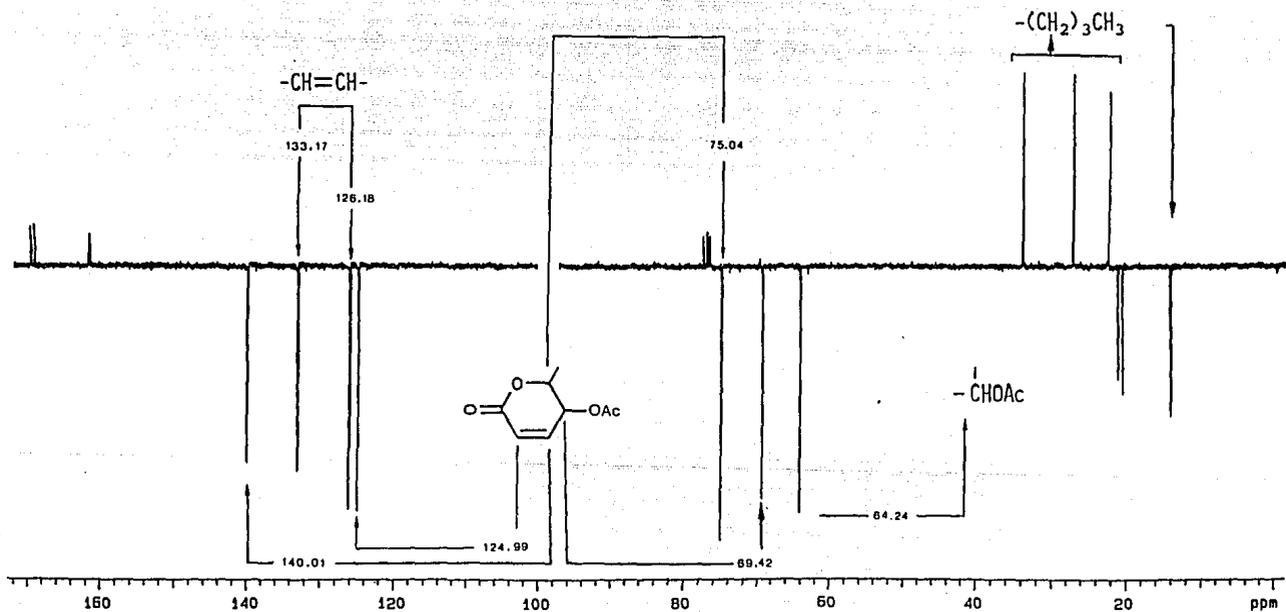


Figura 12. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (APT) de la pectinólida.

ejemplo, la señal compleja concentrada en  $\delta$  5.25 (1H, m), que fue asignada al protón geminal del grupo acetoxilo vinílico de la cadena lateral (H-3'), presentó interacciones vecinales con el metileno centrado en  $\delta$  1.70 (H-4') y con las señales vinílicas del doble enlace de la cadena lateral. De esta manera, se estableció la secuencia de unión de la cadena lateral con el carbono geminal de la función etérea de la lactona ( $\delta$  5.6) a través del protón vinílico centrado en  $\delta$  5.73 (Fig. 13).

La estereoquímica *cis* del doble enlace de la cadena lateral se corroboró mediante el valor de la constante de acoplamiento de 10.5 Hz observada para los protones vinílicos H-1' ( $\delta$  5.73) y H-2' ( $\delta$  5.62). La configuración pseudoecuatorial para la cadena lateral y la orientación axial para el grupo acetoxilo en C-5 se confirmó con el valor de la constante de acoplamiento axial-ecuatorial ( $J=2.9$  Hz) observado para los protones H-5 y H-6 ( $\delta$  5.60). La figura 14 ilustra la expansión del espectro de RMN- $^1\text{H}$  para la región vinílica (5.1-5.8 ppm) de la pectinólida, en la cual se presentan las asignaciones para las multiplicidades de los protones H-5 y H-6 del núcleo de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona y los protones H-1' - H-3' de la cadena lateral.

Las asignaciones propuestas para la RMN- $^{13}\text{C}$  (Cuadro 6) se establecieron por comparación con los datos descritos para la umuravumbólida (32)<sup>49</sup>. La correspondencia encontrada entre los datos espectroscópicos ( $\delta$   $^{13}\text{C}$ ) para la pectinólida con el modelo utilizado constituyó la evidencia en favor de las asignaciones realizadas para los centros asimétricos C-5, C-6 y C-3'. Sin

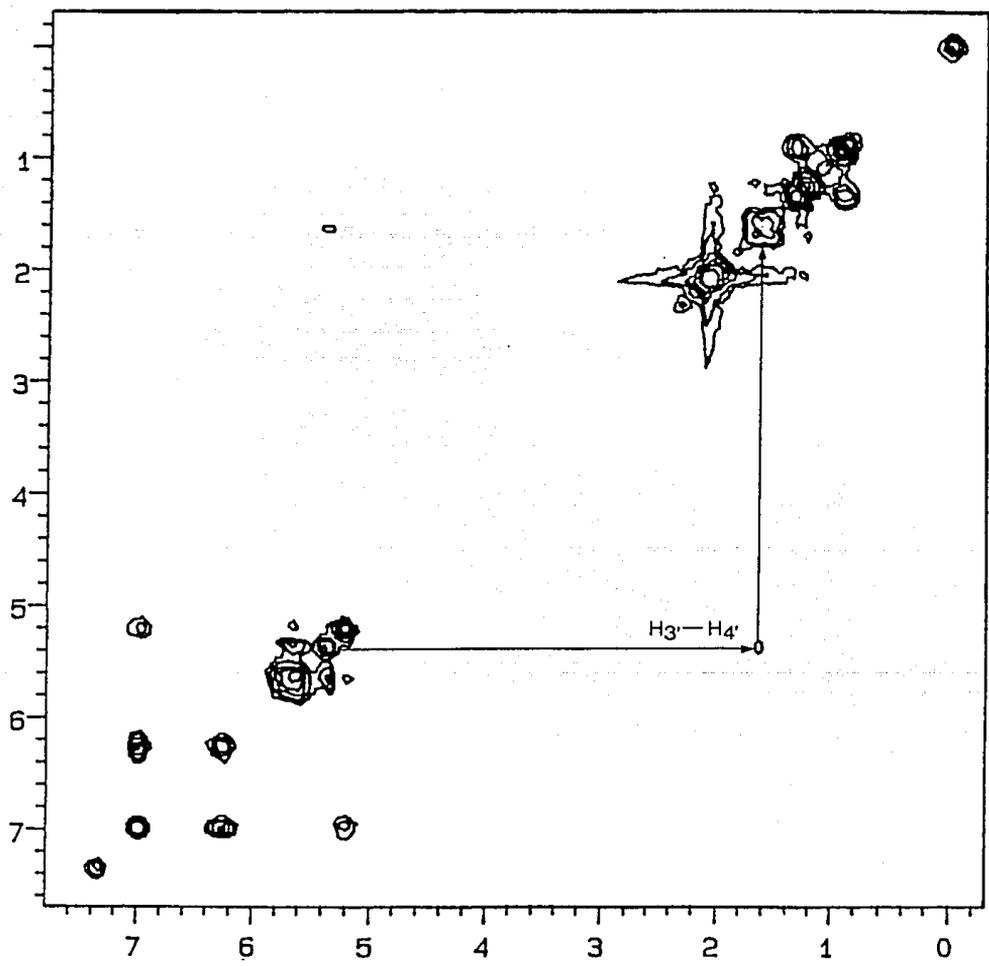
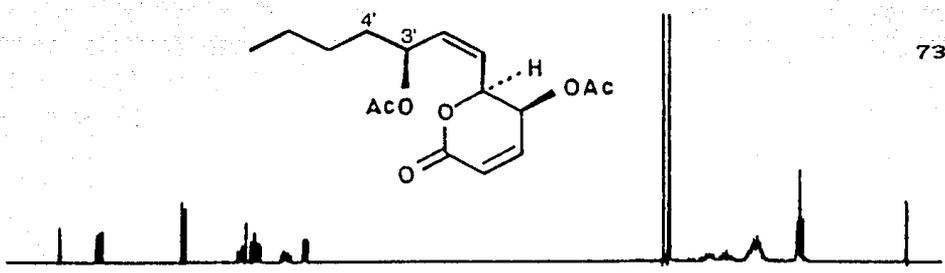
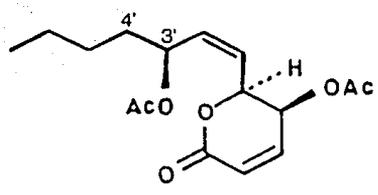


Figura 13. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (2D-COSY) de la pectinólida.

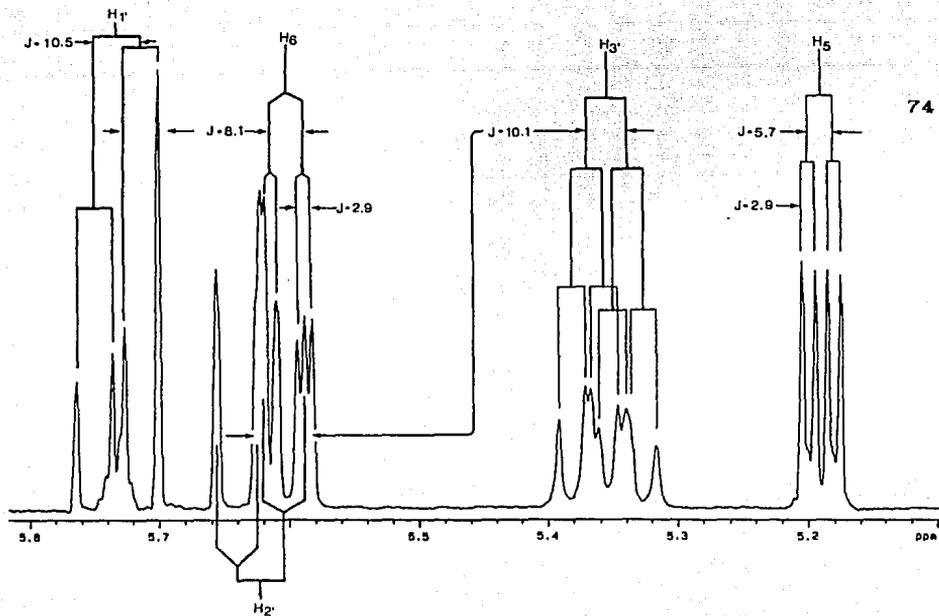


Figura 14. Región vinílica del espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la pectinólida.

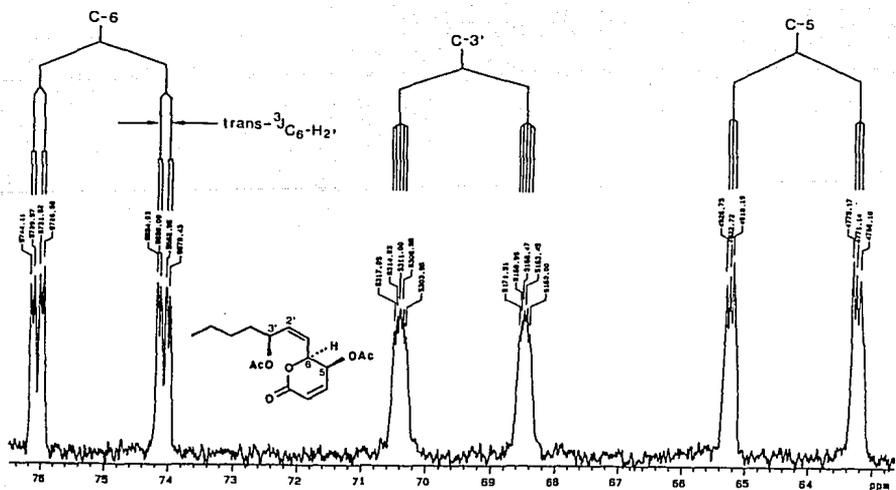


Figura 15. Multiplicidades observadas para los carbonos quirales de la pectinólida en el espectro de RMN-<sup>13</sup>C totalmente acoplado con el núcleo de hidrógeno ( $J_{C-H}$ ).

embargo, con el objeto de verificar de manera inequívoca la asignación para los carbonos C-5 y C-3', los cuales presentan una pequeña diferencia en su desplazamiento químico ( $\Delta\delta$  5.18), se procedió a observar la multiplicidad que presentó cada uno de los carbonos geminales a las funciones oxigenadas en el espectro de  $^{13}\text{C}$  totalmente acoplado con los núcleos de hidrógeno. La figura 15 presenta la expansión del espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  para los metinos quirales de la pectinólida en donde se muestran los acoplamientos totales espín-espín con los hidrógenos geminales ( $^1J_{\text{C-H}}$ ) y los acoplamientos a tres ligaduras ( $^3J_{\text{C-H}}$ ). El doblete centrado en  $\delta$  64.24 ( $^1J_{\text{C-H}_1} = 151.6$  Hz) presentó dos acoplamientos adicionales ( $^3J_{\text{C}_5\text{-H}_3} = ^3J_{\text{C}_5\text{-H}_1} = 4.2$  Hz) y, por lo tanto, esta multiplicidad confirmaba la asignación para la señal del núcleo C-5 de la  $\alpha$ -pirona. En contraste, la resonancia centrada en  $\delta$  69.45 presentó una compleja multiplicidad, como era de esperarse por su asignación al centro quiral alílico C-3' de la cadena lateral. Por otra parte, el acoplamiento *trans*<sup>115</sup> entre el núcleo C-6 y el proton H-2' ( $^3J_{\text{C}_6\text{-H}_2} = 10.8$  Hz) corroboró la naturaleza *cis* del doble enlace de la cadena lateral de la pectinólida.

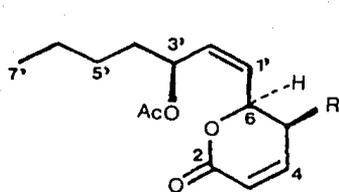
El conjunto de los datos espectroscópicos hasta este punto discutidos permiten concluir que la estructura de la pectinólida correspondiente a la 6-[3-(acetiloxi)-12-heptenil]-5-(acetiloxi)-5,6-dihidro-2H-piran-2-ona.

La orientación pseudoecuatorial de la cadena lateral limita las posibilidades conformacionales de la pectinólida y, así,

Cuadro 6.

Desplazamientos químicos para los núcleos de  $^{13}\text{C}$  de la pectinólida (I) y la umuravumbólida (32)<sup>43</sup>.

C	I	32
2	163.37	162.12
3	121.73	124.99
4	144.15	140.01
5	30.09	64.24
6	74.07	75.04
1'	131.72	133.17
2'	130.12	126.18
3'	69.45	69.42
4'	34.32	34.01
5'	27.60	27.20
6'	22.47	22.40
7'	13.88	13.88



	R
I	OAc
32	H

permitió establecer cualquiera de las dos conformaciones enantioméricas (A o B) ilustradas para el anillo de la  $\delta$ -lactona en la figura 16. El empleo de la regla de Sneath<sup>116,117</sup>

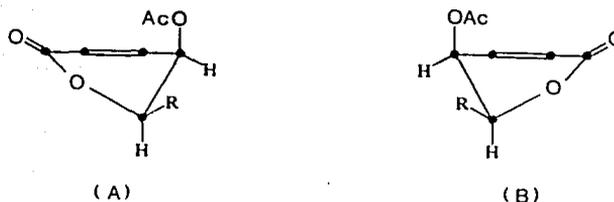


Figura 16. Conformaciones enantioméricas alternativas para el núcleo de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona de la pectinólida.

estableció la esteereoquímica absoluta (S) al centro quiral C-6, mediante la correlación entre el efecto Cotton positivo para la curva obtenida (Fig. 17) en el dicroísmo circular ( $\Delta \epsilon_{256} + 2.4$ ) y

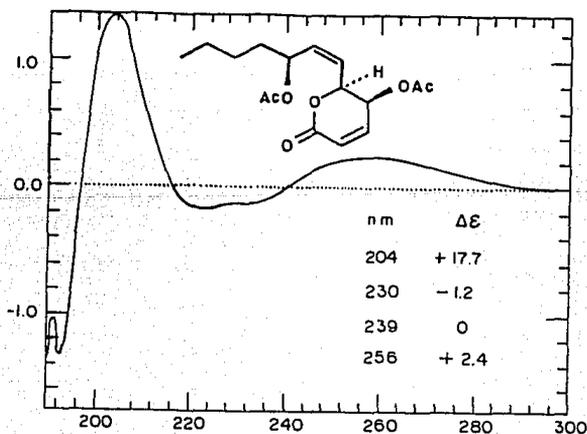


Figura 17. Curva de dicroísmo circular de la pectinólida.

de transición  $n \rightarrow \pi^*$  del carbonilo de la  $\delta$ -lactona, cuya conformación correspondería al enantiómero B (Fig. 16). Al mismo tiempo, la asignación de la configuración absoluta para el centro quiral C-5 automáticamente debería ser designada con el descriptor (S). La estereoquímica absoluta (S) propuesta para el centro quiral C-6 de la pectinólida se fundamenta de manera adicional en relaciones biosintéticas, ya que todas las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas naturales aisladas de las labiadas presentan la misma configuración absoluta<sup>42,80</sup>, deducida a partir de la regla de Sneath para este centro quiral (Cuadro 7). Evidencias adicionales de tipo químico-degradativas<sup>42,44</sup> y cristalográficas<sup>41,81</sup> apoyan estas observaciones.

Finalmente, sólo resta por discutir los argumentos químicos utilizados para establecer la estereoquímica absoluta para el centro quiral alílico C-3' de la cadena lateral. La figura 18 ilustra las dos alternativas que definirían la configuración absoluta de la pectinólida. Con el objeto de diferenciar entre

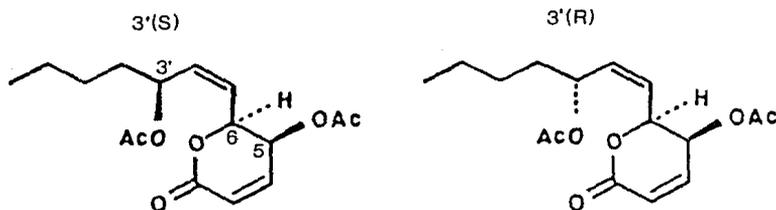


Figura 18. Alternativas de la estereoquímica para el centro quiral C-3' de la pectinólida.

Cuadro 7.

Estereoquímica Absoluta para el Centro C-6 de las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas aisladas de la familia Lamiaceae y su correlación con el efecto COTTON observado en el Dicroísmo Circular.

Compuesto	CD $\Delta \epsilon$	$n \rightarrow \pi^*$ nm	Estereoquímica C-6	Ref.
Anamarina (35)	+ <sup>a</sup>	260	(R)	77
Boronólida (7)	+2.48	256	(R)	42
Desacetilepiolguina (37)	+2.8	257	(R)	80
Hyptólida (34)	+2.3	257	(R)	76
Olguina (36)	+ <sup>a</sup>	270	(R)	78
Sinrotólida (41)	+2.45	266	(R)	81

<sup>a</sup>Valor no descrito en la literatura.

las posibilidades estereoquímicas 5(S), 6(S), 3'(S) y 5(S), 6(S), 3'(R) se procedió a realizar la degradación de la pectinólida mediante una reacción de oxidación con ozono, de tal suerte que el producto mayoritario de la reacción correspondió al ácido 2-acetoxihexanoico derivado de la cadena lateral (Fig. 19). La hidrólisis de este residuo proporcionó el ácido 2-hidroxihexanoico ópticamente activo y el valor positivo de su rotación ( $[\alpha]_D = +20.9$ ) se correlacionó con la configuración (S) observada para todos los ácidos  $\alpha$ -hidroxicarboxílicos de la serie L<sup>118,119</sup>. Por lo tanto, la estructura de la pectinólida, una nueva  $\alpha$ -pirona con propiedades antimicrobianas aislada de *H. pectinata*, corresponde de acuerdo a las recomendaciones de la IUPAC<sup>120</sup> como la 6S-(3S-(acetiloxi)-1Z-heptenil)-5S-(acetiloxi)-5,6-dihidro-2H-piran-2-ona. El cuadro 8 incluye las constantes físicas y las propiedades espectroscópicas de la pectinólida.

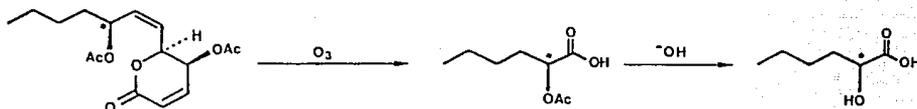
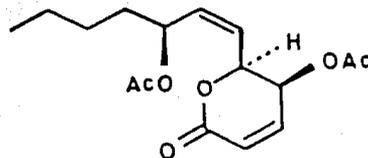


Figura 19. Secuencia de reacciones degradativas de la pectinólida.

#### 5.4 SEMISINTESIS DE ANALOGOS DE LA ASPERLINA.

La similitud estructural de la pectinólida con los metabolitos antimicrobianos de *Aspergillus*<sup>56</sup> (72, 73), y en especial con la asperlina (19), permitió proponer un diseño sintético experimental con el objeto de introducir funcionalizaciones adicionales a partir de la doble ligadura de la

## Constantes físicas y espectroscópicas de la pectinólida.



$[\alpha]_D^{25} + 202$  (c=0.15, MeOH)

UV  $\lambda_{\text{max}}^{\text{MeOH}}$ : 208 nm

IR  $\nu_{\text{max}}^{\text{nujol}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3440, 2925, 2850, 1730, 1620, 1450, 1420, 1360, 1225, 1060, 1020, 940, 818

RMN<sup>1</sup>H (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS) (Espectro 3): Ver Cuadro 5.

RMN<sup>13</sup>C (75.4 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS) (Espectro 4): Ver Cuadro 6.

EM 70 eV m/e (% abund. rel.): 310 [M]<sup>+</sup> (<0.1), 250 [M-OH Ac]<sup>+</sup> (0.1), 226 [M-2 (CH<sub>2</sub>CO)]<sup>+</sup> (0.1), 208 [250-CH<sub>2</sub>CO]<sup>+</sup> (5.0), 155 (3.0), 151 (10.0), 126 (10.0), 125 (9.0), 113 [155-CH<sub>2</sub>CO]<sup>+</sup> (5.6), 84 [126-CH<sub>2</sub>CO]<sup>+</sup> (16.2), 55 (12.2), 43 (100.00), 41 (8.8).

cadena lateral de la pectinólida y conseguir la misma secuencia de oxidación presente en la asperlina (19). Al mismo tiempo, se realizaría la evaluación cuantitativa del potencial antimicrobiano de cada uno de los derivados obtenidos<sup>56</sup>.

La propuesta experimental consistía en la epoxidación del doble enlace de la pectinólida para generar el oxirano correspondiente (Fig. 20), el cual presentaría la secuencia de oxidación observada para la asperlina<sup>56</sup> (19) y la olguina<sup>78</sup> (36) en el núcleo de  $\alpha$ -pirona y en los nuevos centros quirales C-1' y C-2' así generados en la cadena lateral. Este epóxido podría someterse a una apertura catalizada en medio ácido<sup>80</sup> para formar cualquiera de los dioles treos correspondientes (Fig. 20). El

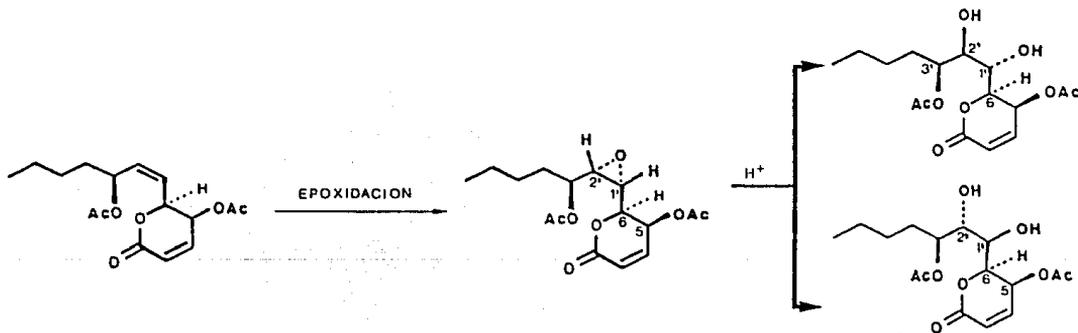


Figura 20. Propuesta experimental para la funcionalización del doble enlace de la cadena lateral de la pectinólida.

diastereoisómero 1'-S, 2'R, 3'S tendría la misma secuencia de oxidación y conformación absoluta para los núcleos quirales de la cadena lateral observada en la boronólida<sup>41,42</sup> (7) y sus

derivados desacetilados<sup>42</sup> (8,9).

El tratamiento de la pectinólida con ácido m-cloroperbenzoico (ácido m-CLPB) a temperatura ambiente durante dos días no provocó ningún cambio aparente en el  $R_f$  de la materia prima. Por lo tanto, se procedió a prolongar el tiempo de reacción bajo condiciones de reflujo. La figura 21 ilustra los cromatogramas generados donde se resumen los resultados de los procedimientos experimentales utilizados (ver parte experimental 4.5.1). De

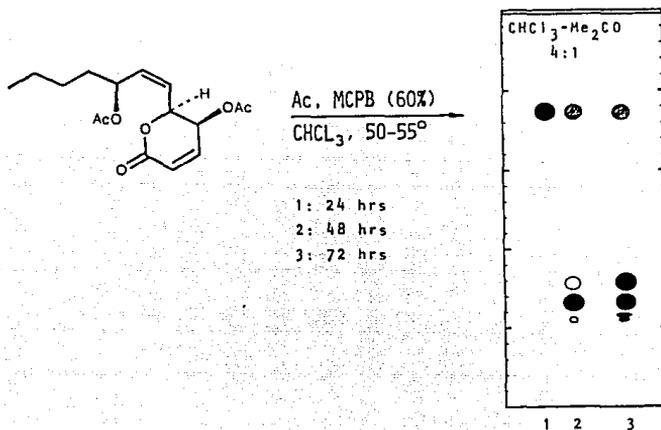


Figura 21. Cromatografía en capa fina de la mezcla de oxidación de la pectinólida.

manera sorprendente, la diferencia en el  $R_f$  de los productos de reacción en relación con la pectinólida indicó *a priori* la ausencia en el crudo de la reacción del epóxido esperado. La mezcla de reacción se sometió a un análisis por cromatografía de gases-espectrometría (CG-EM) con el objeto de verificar la

complejidad en el número de productos generados en la reacción. El cromatograma obtenido se muestra en la Figura 22 y éste resultó constituido por cuatro picos con tiempo de retención correspondientes a 13.26, 14.90, 15.33 y 17.01 min.

La separación de la mezcla de reacción a nivel preparativo, utilizando cromatografía en columna permitió la purificación de tres bandas mayoritarias. La de menor polaridad, que se denominó como Ia, correspondió al  $R_f = 0.56$  ( $\text{CHCl}_3:\text{Me}_2\text{CO}; 4:1$ ). La segunda fracción correspondió al derivado mayoritario Ib, con un  $R_f = 0.47$  ( $\text{CHCl}_3:\text{Me}_2\text{CO}; 4:1$ ). Por último una tercera elución de mayor polaridad con  $R_f = 0.40$  ( $\text{CHCl}_3:\text{Me}_2\text{CO}; 4:1$ ).



Figura 22. Análisis en cromatografía de gases de la mezcla de oxidación de la pectinólida.

El producto mayoritario Ib ( $R_t = 15.3$  min), correspondió a la fórmula molecular  $\text{C}_{16}\text{H}_{24}\text{O}_8$ , calculada mediante análisis elemental. Su espectro de IR presentó absorciones asociadas con la presencia

de grupos hidroxilo ( $\nu_{\text{max}} = 3460 \text{ cm}^{-1}$ ) y grupos carbonilo ( $\nu_{\text{max}} = 1730 \text{ cm}^{-1}$ ). El análisis detallado de sus espectros de RMN permitió establecer las siguientes conclusiones:

1. La comparación de la RMN- $^1\text{H}$  de la pectinólida con el espectro generado por el derivado Ib, en primera instancia, indicó la ausencia de los protones vinílicos de la cadena lateral.

2. Tanto en el espectro de RMN- $^1\text{H}$  (Cuadro 9), como en el de  $^{13}\text{C}$  (Cuadro 10), se asignaron con facilidad las señales correspondientes al núcleo estructural de la 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona y al residuo de 1-acetiloxi-*n*-pentilo de la cadena lateral. La correlación bidimensional homonuclear protónica permitió identificar el sistema ABX formado por los protones H-3 ( $\delta$  6.22, d,  $J = 9.7 \text{ Hz}$ ), H-4 ( $\delta$  7.12, dd,  $J = 9.7, 6.1 \text{ Hz}$ ) y H-5 ( $\delta$  5.4 dd,  $J = 6.1, 2.4 \text{ Hz}$ ).

3. La multiplicidad adicional observada para el protón alílico H-5 se correlacionó con el protón centrado en  $\delta$  4.58 (H-6, dd,  $J = 9.5, 2.4 \text{ Hz}$ ) mediante el cuadro de conectividades ilustrado en la figura 23. Por lo tanto, el acoplamiento de 9.5 Hz observado para el núcleo H-6 correspondía a la interacción espín-espín con el protón H-1' de la cadena lateral, cuyo desplazamiento químico se asignó en  $\delta$  3.92 a través de la correlación bidimensional 2D-COSY (Fig. 23).

4. La interacción observada para el protón H-3' centrado en  $\delta$  5.09 (ddd,  $J_{3'-4'} = J_{3'-2'} = 6.4 \text{ Hz}$ ) con la señal múltiple en  $\delta$  3.99 permitió asignar a esta última como el protón H-2' (Fig. 23).

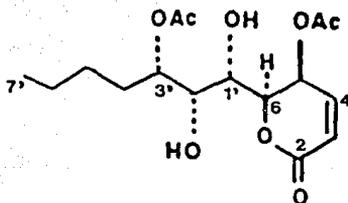
5. El desplazamiento químico observado para los protones

## Cuadro 9.

Desplazamientos químicos y multiplicidades para los núcleos de hidrógeno del compuesto Ib.

Núcleo	$\delta$ /ppm*	Multiplicidades J(Hz)
H-3	6.22 (1H, d)	9.7
H-4	7.12 (1H, dd)	9.7, 6.1
H-5	5.41 (1H, dd)	6.1, 2.4
H-6	4.58 (1H, dd)	9.5, 2.4
H-1'	3.92 (1H, dd)	9.5, 7.1
H-2'	3.99 (1H, dd)	6.4, 6.3
H-3'	5.09 (1H, ddd)	6.4
H-4'	1.68 (2H, m)	
H-5'	1.52 (2H, m)	
H-6	1.29 (2H, m)	
H-7	0.90 (3H, t)	6.9
AcO-	2.10 (3H, s)	
AcO-	2.12 (3H, s)	
1'-OH	3.38 (1H, d)	7.09
2'-OH	3.26 (1H, d)	6.40

\*Espectros 5.



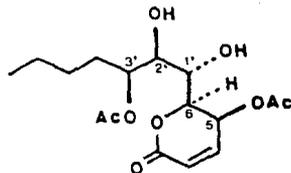
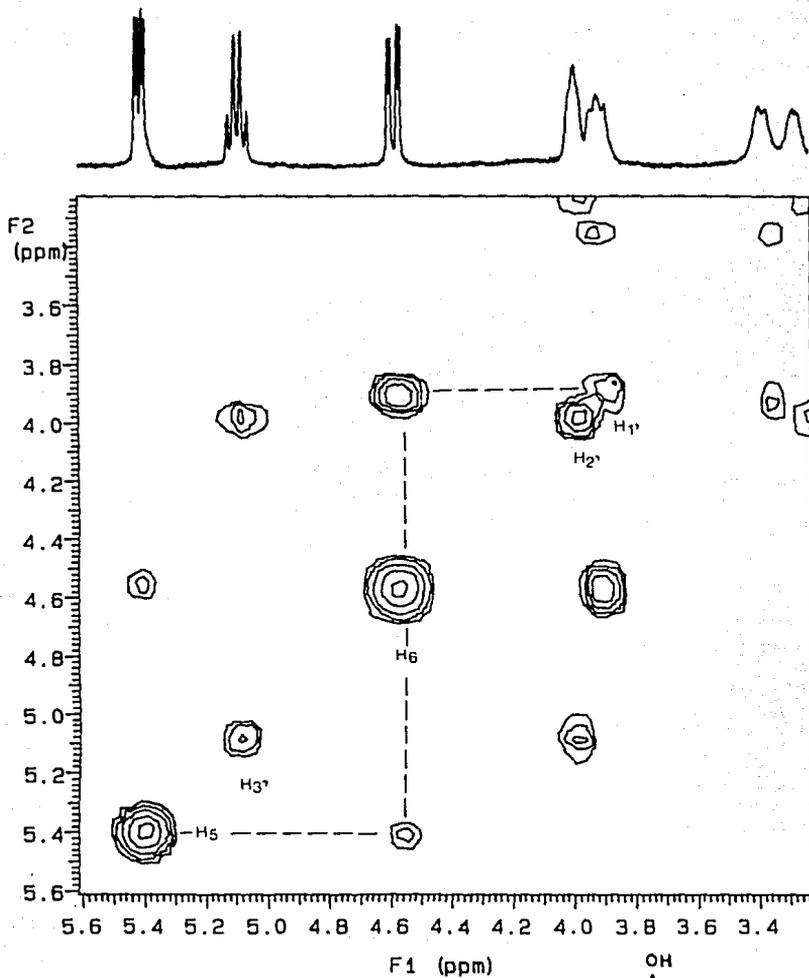


Figura 23. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (2D-COSY) del diol Ib.

H-1' y H-2' indicó su naturaleza carbinólica, ratificada por los desplazamientos químicos para los núcleos de  $^{13}\text{C}$  geminales de estas funciones hidroxiladas. El cuadro 10 incluye los valores para cada una de las resonancias del derivado Ib, utilizando como modelo de asignación la desacetilboronólida<sup>42</sup> (8) y la 1',2'-desacetilboronólida<sup>44</sup> (9).

6. La compleja multiplicidad observada para los hidrógenos H-1' y H-2' surgió de los acoplamiento adicionales con los protones de los sustituyentes hidroxilo. El intercambio con  $\text{D}_2\text{O}$  produjo la desaparición de los multipletes centrados en  $\delta$  3.38 (1'-OH) y 3.26 (2'-OH), así como la simplificación a señales dobles de los núcleos H-1' y H-2' (Fig. 24).

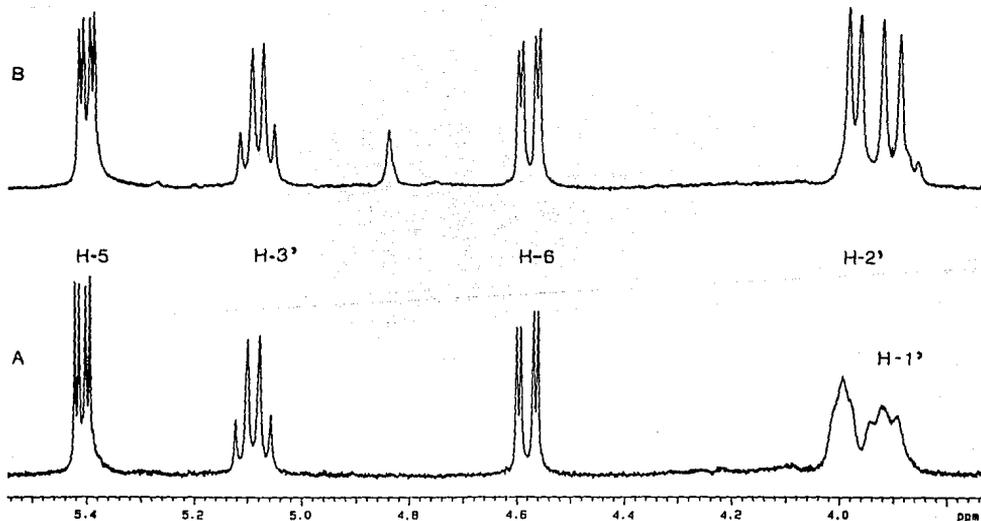


Figura 24. Multiplicidades observadas para los metinos quirales

del diol Ib. A:  $\text{CHCl}_3$ ; B:  $\text{CHCl}_3 + \text{D}_2\text{O}$

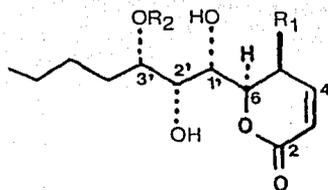
## Cuadro 10.

Desplazamientos químicos para los núcleos de  $^{13}\text{C}$  del derivado Ib, la desacetilboronólida (8)<sup>42</sup> y la 1,2-desacetilboronólida (9)<sup>44</sup>.

C	Ib*	8**	9
2	162.39	163.68	163.40
3	124.89	120.96	121.10
4	140.83	145.83	145.40
5	61.36	25.80	25.46
6	76.90	77.01	77.12
1'	68.20	70.01	70.22
2'	69.93	74.38	72.07
3'	75.61	76.54	75.56
4'	30.54	33.52	30.30
5'	27.31	27.62	27.20
6'	22.48	22.60	22.20
7'	13.92	13.98	13.74

\*Figura 34.

\*\*Espectro 6.



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Ib	OAc	Ac
8	H	H
9	H	Ac

El conjunto de las evidencias anteriormente discutidas indicaron que la estructura del derivado Ib debería representarse como la (6-(3-(acetiloxi)-1,2-(dihidroxi)-heptilo)-5-(acetiloxi)-5,6-dihidro-2H-piran-2-ona. Este producto correspondería al diol treo generado a partir de la apertura catalizada en medio ácido del epóxido intermediario predicho por el ataque del agente epoxidante (ácido *m*-cloroperbenzoico) al doble enlace no conjugado de la pectinólida (Fig. 20).

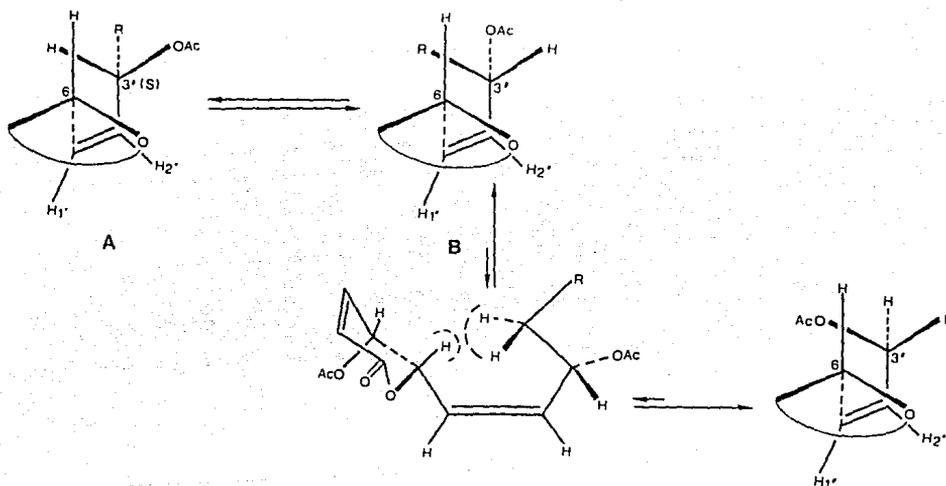


Figura 25. Posibilidades conformacionales de la pectinólida. C

La figura 25 presenta las posibilidades conformacionales para la pectinólida y permite predecir que la epoxidación de la cadena alquénica se realizaría por la cara *re-si* del doble enlace C-1' - C-2'. Este análisis conformacional evidenció que los residuos de acetoxilo y *n*-butilo que sustituyen el centro C-3' ejercen un fuerte impedimento estérico sobre la cara *si-re* del doble enlace

(Fig. 25; A y C). Al mismo tiempo, el enlace etéreo de la lactona provoca un efecto de protección adicional sobre esta cara en las conformaciones de mayor estabilidad (Fig. 25; A-C). De tal suerte que la conformación en la cual el residuo de *n*-butilo se localiza de manera distal al núcleo de la 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona (Fig. 25; A), probabilísticamente, ejerce el menor impedimento estérico sobre la cara 1' (re)-2' (si) del doble enlace, favoreciendo la generación del epóxido intermediario 1'(S)-2'(S). La catálisis de éste sucedió en el medio ácido de la reacción mediante el ataque nucleofílico del agua al centro C-2', el menos impedido, para la formación del diol *trans* 1'(S)-2'(R) (Fig. 26).

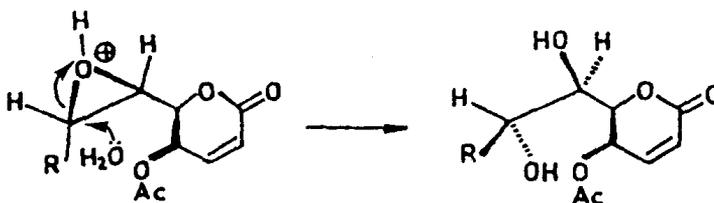


Figura 26. Mecanismo de reacción para la generación del diol Ib.

La acetilación del diol Ib generó el derivado tetracetilado Ic. La asignación de la RMN-<sup>1</sup>H se realizó utilizando el espectro 2D-COSY. En la figura 27 se ilustran los cuadros de conectividad para las interacciones vecinales entre los protones H<sub>5</sub> ( $\delta$  5.26) - H<sub>6</sub> ( $\delta$  4.53), H<sub>5</sub>-H<sub>1</sub>, ( $\delta$  5.43) y H<sub>3</sub>, ( $\delta$  5.01)-H<sub>2</sub>, ( $\delta$  3.46). Se registraron cambios importantes para el derivado Ib en las multiplicidades observadas para los protones de los centros

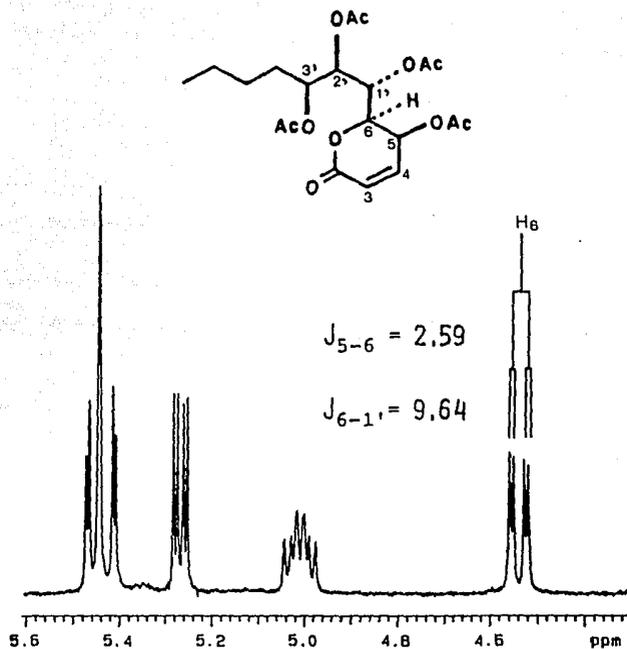
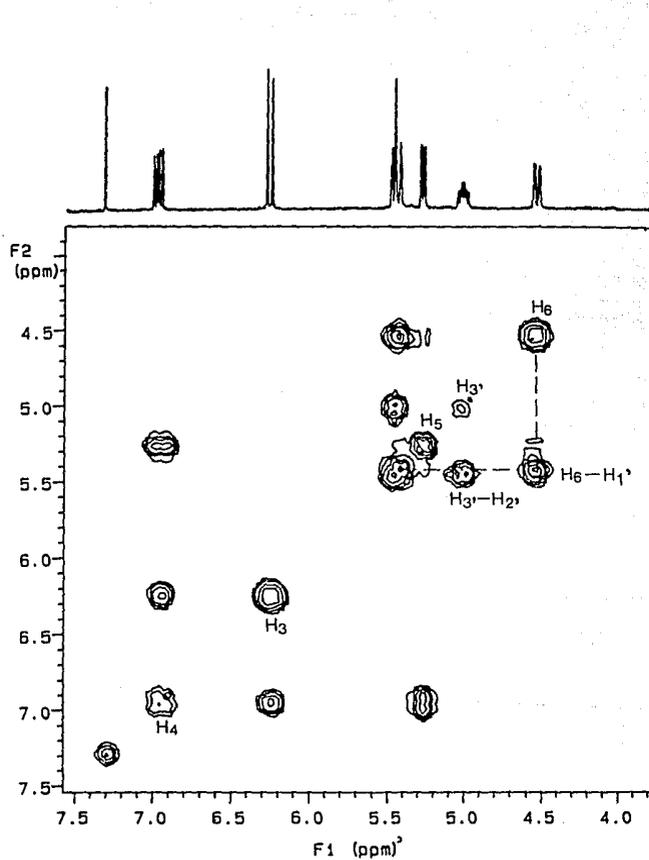


Figura 27. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (2D-COSY) del tetracetato Ic.

quirales en la cadena lateral, los cuales evidentemente se asociaron con la desaparición del puente de hidrógeno entre los grupos hidroxilo C-1' y C-2' presente en el compuesto Ib. El valor de la constante de acoplamiento de 9.6 Hz observado para la interacción entre  $H_6-H_1$ , confirmaba un arreglo antiperiplanar para los respectivos grupos ésteres sustituyentes. La constante de acoplamiento de 2 Hz confirmó la disposición sinclinal para los grupos ésteres internos en C-1' y C-2'. Esta orientación se fundamentó al aplicar la ecuación de Karplus<sup>122</sup> que permitió calcular valores de  $J = 2-5$  Hz para el acoplamiento  $H^1-H^2$  con ángulos entre  $\phi = 52-75^\circ$ . La relación antiperiplanar entre los hidrógenos en C-2' y C-3' se dedujo del valor de la constante de acoplamiento de 7.48 Hz, que indicaba un ángulo  $\phi = 33^\circ$  ( $J_{\text{calc}} = 7.41$  Hz) formado por los protones H-2' y H-3'. El cuadro 11 incluye los valores de los desplazamientos químicos y las multiplicidades para las resonancias de hidrógeno del acetato Ic y, al mismo tiempo, compara los valores descritos para la boronólida (7)<sup>42</sup> cuya estereoquímica corresponde al isómero 6R-(1R,2R,3S-(triacetiloxi)-heptil)-5,6-dihidro-2H-pirán-2-ona. La similitud en los valores para las constantes de acoplamiento entre los protones de los metinos quirales de la cadena lateral de ambas dihidro- $\alpha$ -pironas constituye una evidencia para la estereoquímica absoluta propuesta para Ic. Resulta evidente que la diferencia en los valores de las constantes de acoplamiento para  $H_6-H_1$ , observadas en la boronólida y el acetato Ic surge del cambio conformacional provocado por la presencia del grupo

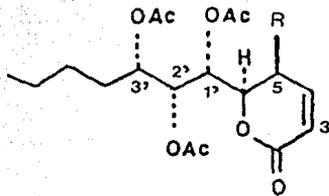
## Cuadro 11.

Desplazamientos químicos y multiplicidades para los núcleos de hidrógeno del acetato Ic y la boronólida (7)<sup>42</sup>.

Núcleo	$\delta$ /ppm (J=Hz) Ic*	$\tau$ **
H-3	6.24 d (9.7)	6.04 ddd (9.7, 2.1, 1.0)
H-4	6.95 dd (9.7, 6.0)	6.88 ddd (9.7, 6.3, 2.4)
H-5	5.27 dd (6.0, 2.6)	2.28 m
H-5	—	2.49 m
H-6	4.54 dd (9.6, 2.6)	4.54 ddd (11.7, 5.1, 4.2)
H-1'	5.44 dd (9.6, 2.1)	5.34 dd (5.1, 4.2)
H-2'	5.46 dd (7.5, 2.1)	5.36 dd (6.3, 4.2)
H-3'	5.01 ddd (8.2, 7.5, 4.5)	5.01 ddd (6.29)

\*Espectro 7.

\*Espectro 8.



	R
Ic	OAc
7	H

acetoxilo C-5 en el derivado Ic. La figura 28 compara los ángulos dihedros para  $H_1'-H_2'$  y  $H_2'-H_3'$  en la conformación preferida de la boronólida, misma que fue establecida por difracción de Rayos  $X^{41}$ , con los establecidos para el derivado Ic mediante el análisis de los datos espectroscópicos de RMN- $^1H$  anteriormente discutidos y los predichos por la ecuación de Karplus.

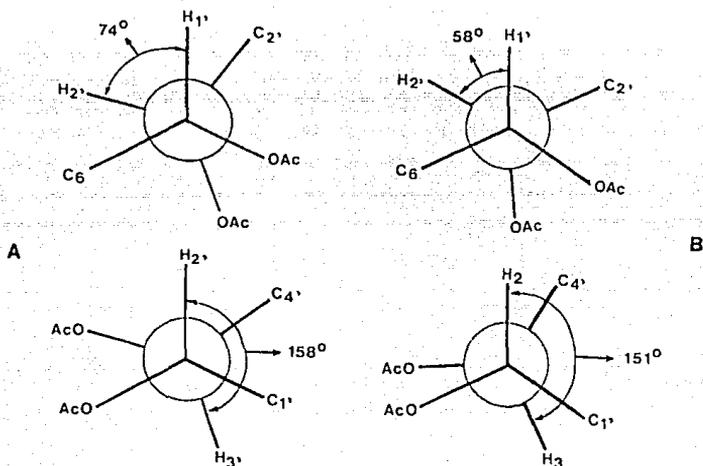
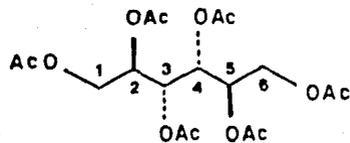


Figura 28. Proyecciones de Newman para los enlaces  $C_1'-C_2'$  y  $C_2'-C_3'$  del tetracetato Ic (A) y de la boronólida (B).

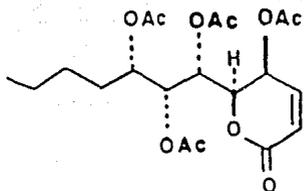
La identificación inequívoca del diastereoisómero  $1'S, 2'R, 3'S$  se realizó al comparar las constantes de acoplamiento observadas para los núcleos H-6, H-1' y H-2' con los valores calculados por mecánica molecular para el  $2R, 3R, 4R, 5R$ -peracetilhexalditol ( $J_{9-4} = 2.4$  y  $J_{4-5} = 9.2$  Hz)<sup>80,123</sup>.



(2R,3R,4R 5R)

$$J_{3-4} = 2.4 \text{ Hz (} J_{\text{CALC.}}, 3.7)$$

$$J_{4-5} = 9.2 \text{ Hz (} J_{\text{CALC.}}, 7.1)$$



$$J_{2'-1'} = 2.09$$

$$J_{6-1'} = 9.64$$

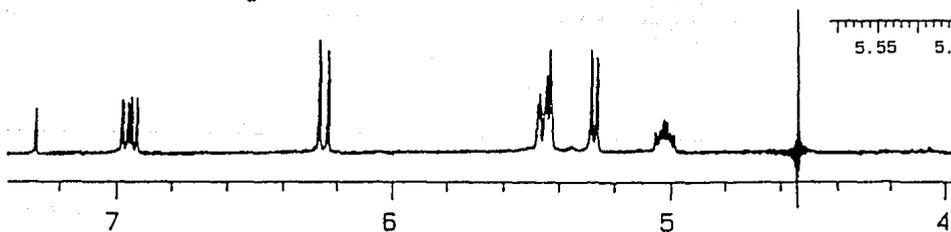
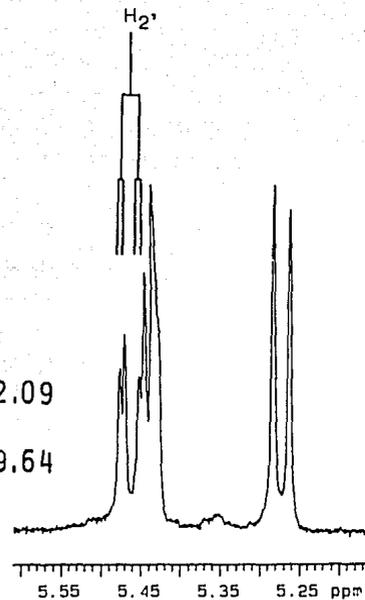


Figura 29. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del teracetato Ic generado por el desacoplamiento diferencial del protón H-6.

Para tal motivo, se procedió a realizar desacoplamientos diferenciales que permitieron calcular las constantes de acoplamiento para la interacción  $H_6-H_1$ , ( $^3J_{6-1} = 9.6$  Hz) y  $H_{2'}-H_1$ , ( $^3J_{2'-1} = 2.1$  Hz) (Fig. 29). De esta manera, la configuración absoluta para los derivados Ib y Ic, corresponde a los descriptores 6(R), 1'(S), 2'(R) y 3'(S). La asignación inequívoca de las resonancias para cada uno de los núcleos de  $^{13}C$  del tetracetato Ic se realizó mediante el análisis de la correlación heteronuclear bidimensional (Fig. 30). El cuadro 12 compara las asignaciones de este espectro con los valores de los desplazamientos químicos para la boronólida (7)<sup>42</sup>.

El segundo compuesto obtenido de manera mayoritaria en la oxidación con ácido *m*-CIPB de la pectinólida, correspondió al derivado Ia ( $R_t = 13.26$  min). Su fórmula molecular se calculó mediante espectrometría de masas por ionización química como  $C_{16}H_{24}O_9$ . Las características espectroscópicas generales de este derivado Ia fueron semejantes a las observadas para el diol (Ib) anteriormente descrito. De manera sorprendente, en la RMN- $^1H$  sólo se observó una señal para un grupo acetato y, en lugar de dos señales presentes tanto en la materia prima como en el otro producto mayoritario de reacción (Ib), se observó una señal simple centrada en  $\delta$  4.1 que integró para tres protones. La figura 31 compara los espectros de RMN- $^1H$  generados por los derivados Ia y Ib, observándose la consistencia en el desplazamiento químico y las multiplicidades para las señales geminales a las funciones oxigenadas de estos compuestos. De nuevo, la resonancia

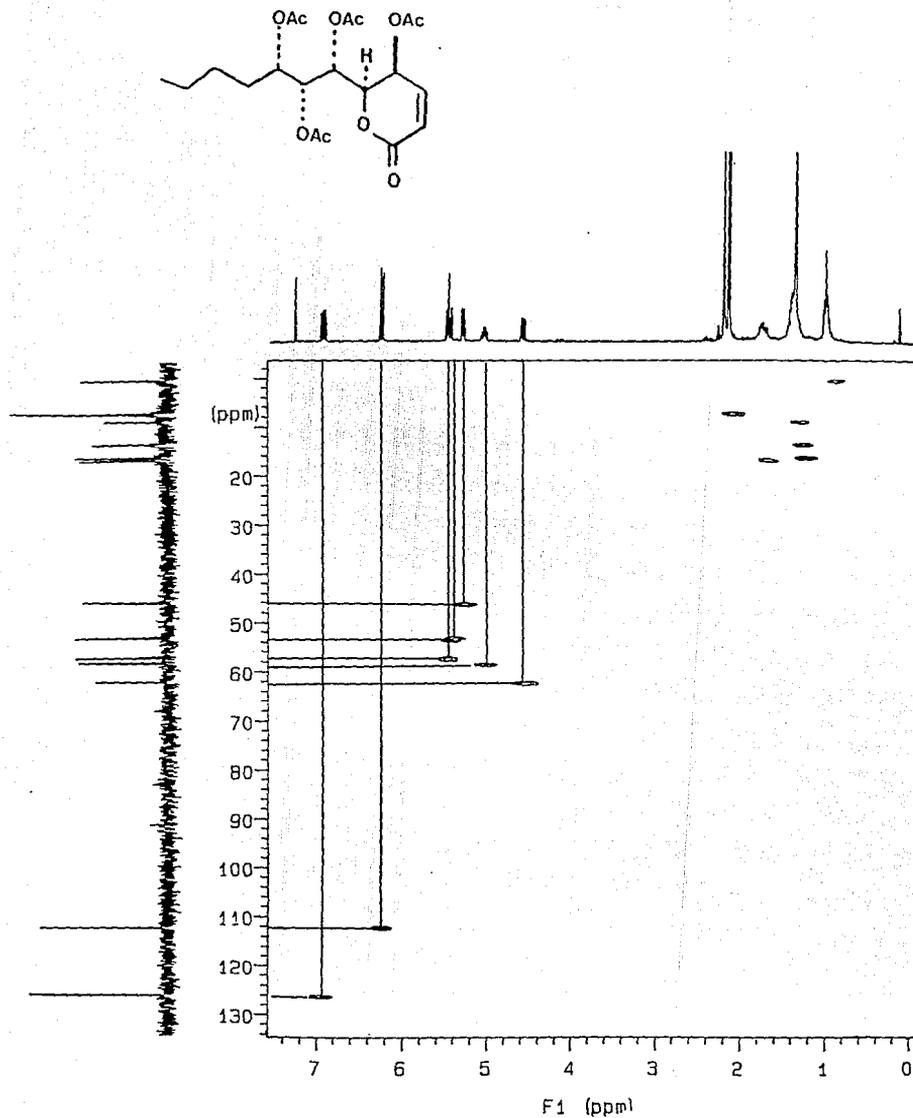


Figura 30. Espectro de RMN HETCOR ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) del tetracetato Ic.

protónica bidimensional permitió establecer inequívocamente las asignaciones para los protones geminales H-1' y H-3' a través de las correlaciones observadas con el protón H-6 del núcleo de la dihidro- $\alpha$ -pirona y con el protón H-3' de la cadena lateral, respectivamente (Fig. 32).

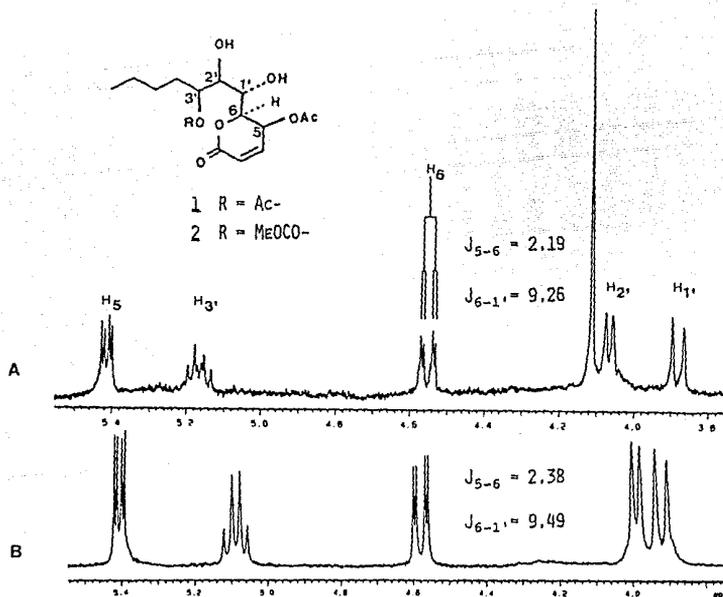


Figura 31. Multiplicidades observadas en la RMN  $^1\text{H}$  para los metinos quirales de los derivados Ia (A) y Ib (B).

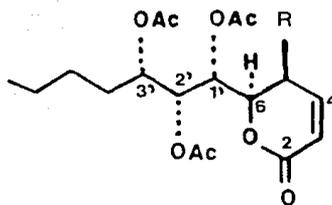
La comparación de la RMN- $^{13}\text{C}$  (Cuadros 10 y 12) de estos derivados mayoritarios permitió concluir de manera inequívoca que

Desplazamientos químicos para los núcleos de  $^{13}\text{C}$  del tetracetato Ic y la boronólida (7)  $^{13}$ .

C	Ic*	$\delta$	7**
2	160.64		162.33
3	125.36		121.41
4	139.32		144.01
5	59.54		25.15
6	75.53		75.13
1'	66.80		70.67
2'	70.72		70.60
3'	71.73		71.62
4'	30.25		30.27
5'	27.03		27.04
6'	22.29		22.37
7'	13.84		13.86

\*Espectro 9.

\*\*Espectro 10.



	R
Ic	OAc
7	H

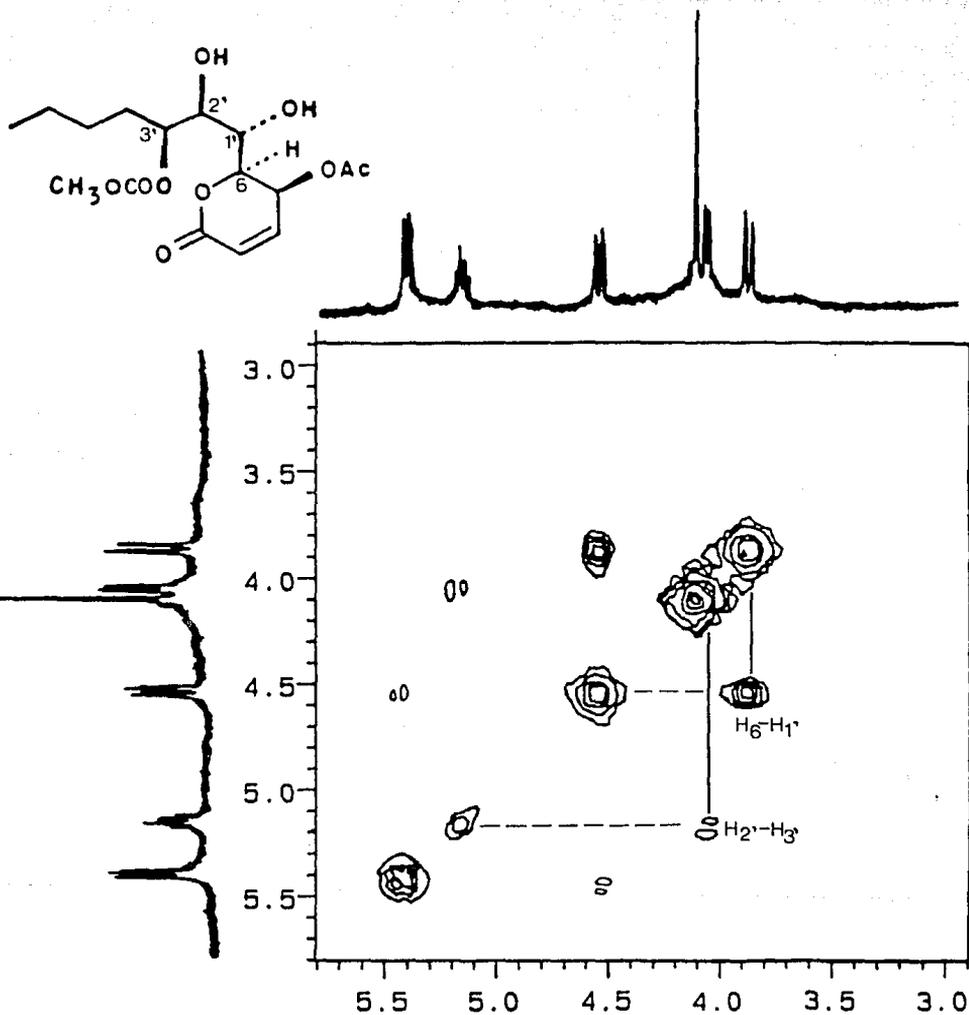


Figura 32. Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (2D-COSY) del derivado Ia.

el grupo acetoxilo en C-3' sufría una oxidación para convertirse en un grupo carbonato, ya que en el derivado Ia se observó un grupo carbonilo en  $\delta$  155.9 y un metoxilo en  $\delta$  54.57, señales que sustituyen a las observadas para uno de los grupos acetoxilo en el derivado Ib (Fig. 33).

El análisis de la RMN- $^1\text{H}$  (Cuadros 9 y 13) permitió establecer la conformación preferida que adoptan ambos derivados en solución. En primer lugar es importante destacar la ausencia de acoplamiento entre los protones H-1' y H-2', situación que comprueba el establecimiento de un puente de hidrógeno entre los dos grupos hidroxilo vecinales y, por lo tanto, la formación de un ángulo de aproximadamente  $90^\circ$  entre estos dos protones (Fig. 34). El valor de la constante de acoplamiento de 9 Hz entre el protón H-1' y el protón H-6 demostraba la formación de un ángulo dihedro cercano a  $180^\circ$  y, así, permitió disponer de manera antiperiplanar a los sustituyentes electroattractores en C-6 y C-1'. Esta conformación permitió visualizar el proceso que sufre el acetoxilo en C-3' para su transformación en la funcionalidad carbonato, mediante el establecimiento de un cetol cíclico intermediario sobre el cual sucedería una transposición de tipo Baeyer-Villiger. El mecanismo para esta transformación en las condiciones ácidas de reacción con ácido m-ClPB se ilustra en la figura 35. Un apoyo bibliográfico para esta secuencia mecanística se obtuvo de la doble reacción de Baeyer-Villiger observada en cetales cíclicos para la generación de ortocarbonatos<sup>121</sup>.

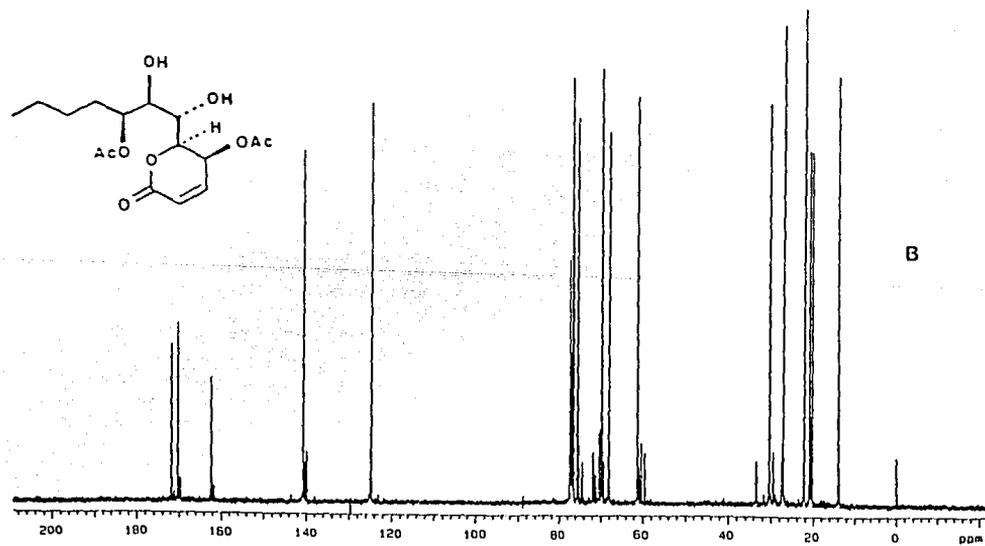
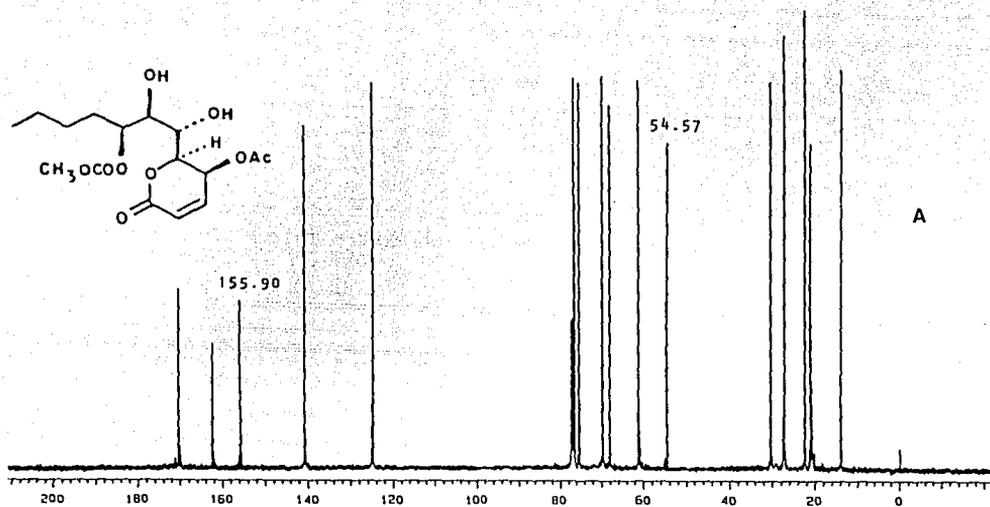


Figura 33. Espectro de RMN-<sup>13</sup>C de los dioles derivados Ia (A) y Ib (B).

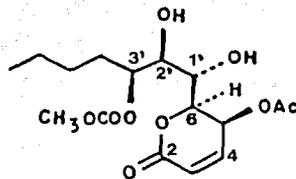
Cuadro 13.

Desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (constantes de acoplamiento  $^1\text{H-H J} = \text{Hz}$ ) del carbonato Ia.

Núcleo	$\delta ^1\text{H}^*$	$\delta ^{13}\text{C}^{**}$
2	—	162.40
3	6.25 d (9.6)	124.96
4	7.08 dd (9.6, 6.1)	139.98
5	5.41 dd (6.1, 2.2)	61.45
6	4.55 dd (9.3, 2.2)	76.98
1'	3.88 dd (9.3, 0.7)	68.60
2'	4.06 dd (5.6, 0.7)	69.73
3'	5.17 ddd (6.4, 5.3)	76.60
4'	1.68 m	30.45
5'	1.52 m	27.31
6'	1.29 m	22.46
7'	0.90 t	13.89
MeOCOO-	4.11 (s)	155.90 54.57
MeCOO-	2.14 (s)	171.80 20.64

\*Espectro 11.

\*\*Figura 34.



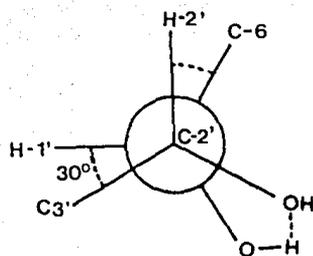


Figura 34. Proyección de Newman para el enlace  $C_1' - C_2'$  del diol.

Ib.

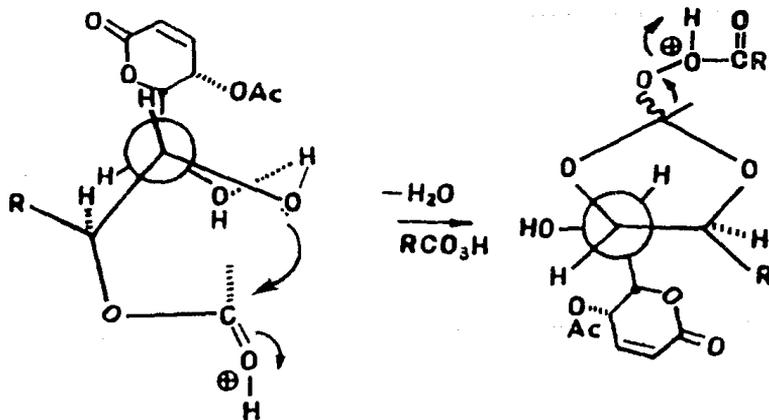
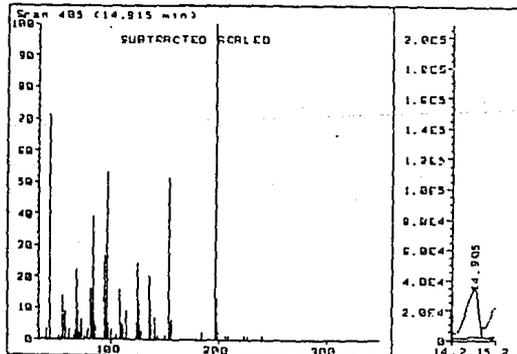
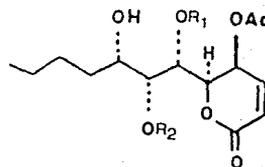
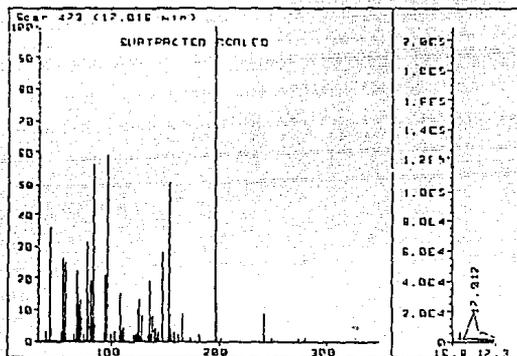
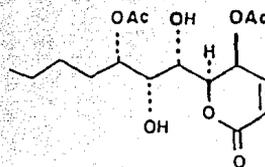
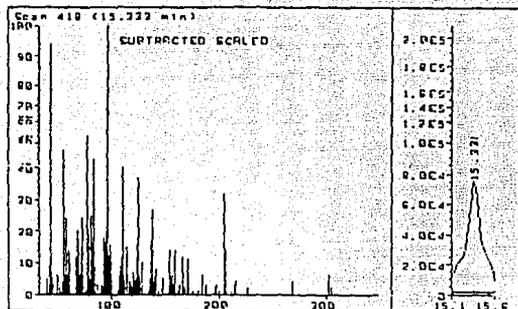


Figura 35. Secuencia mecanística para la transposición de Baeyer-Villiger.

El análisis de la mezcla de oxidación de la pectinólida mediante CG-EM permitió la separación de dos productos adicionales ( $R_t = 14.90$  y  $17.01$  min). Los espectros de masas obtenidos demostraron que estos corresponden a isómeros estructurales del compuesto Ib ya que sólo diferían en las abundancias relativas de los picos observados en el espectro de masas por impacto electrónico (Fig. 36). La fórmula molecular para estos derivados se verificó mediante el registro de sus espectros de masas por ionización química.

La acetilación de la mezcla (parte experimental 4.5.2.2 y 4.5.2.3) constituida por los tres isómeros ( $R_t = 14.9$ ,  $15.3$  y  $17.0$  min) produjo el mismo producto de reacción que el obtenido de manera independiente para el diol mayoritario Ib. Estos resultados se apoyaron mediante el análisis de CG-EM de la mezcla de oxidación y de su producto de acetilación (Fig. 37). Una alícuota del residuo de acetilación se analizó mediante esta técnica obteniéndose un cromatograma compuesto por un sólo pico, cuyo tiempo de retención fue idéntico al desarrollado por el derivado acetilado Ic ( $R_f = 13.68$  min). Este resultado experimental evidenció la generación de productos de *trans*-esterificación a través del establecimiento de cetales cíclicos intermediarios de 5 y 6 miembros en el diol Ib (Fig. 35), mismos que constituyeron el sustrato sobre el cual procedió el rearreglo de Baeyer-Villiger para la generación del carbonato Ia.

El tratamiento de la pectinólida con tetróxido de osmio en piridina generó un sólido amorfo de color café (p.f.  $60-62^\circ\text{C}$ ), el



R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
H	Ac
Ac	H

Figura 36. Análisis en cromatografía de gases-espectrometría de masas de la mezcla de oxidación de la pectinólida.

cual presentó una gran estabilidad al tratamiento básico. El análisis de RMN demostró que este producto (Id) correspondía al éster cíclico de osmio intermediario en la reacción de oxidación y cuya estabilidad era ocasionada por la coordinación con dos moléculas de piridina (Cuadro 14). De manera sorprendente, el ataque del agente electrofílico sucedió sobre el doble enlace conjugado al carbonilo de la  $\delta$ -lactona y, por lo tanto, demostraba una gran flexibilidad en la cadena lateral de la pectinólida. Esta adición se realizó por la cara  $\alpha$  del núcleo de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona, debido al efecto estérico provocado por la orientación  $\beta$ -axial del grupo acetoxilo en C-5 sobre la cara *si-re* del doble enlace  $C_3-C_4$ . La evidencia en favor de la orientación propuesta para la generación del éster de osmio Id se obtuvo al

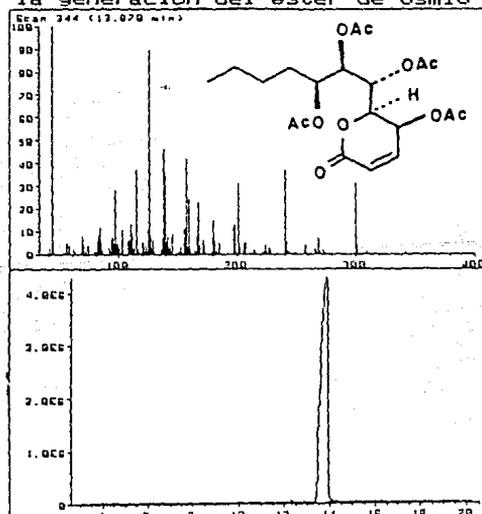


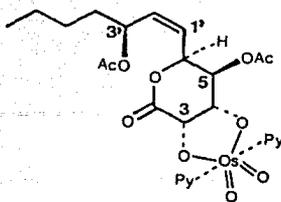
Figura 37. Análisis en cromatografía de gases-espectrometría de masas del producto de acetilación de la mezcla de oxidación de la pectinólida.

Desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (constantes de acoplamiento  $^1\text{H-H J} = \text{Hz}$ ) del éster cíclico de osmio Id.

Núcleo	$\delta^1\text{H}^*$	$\delta^{13}\text{C}^{**}$
2	—	169.52
3	4.98 d (5.13)	87.01
4	4.72 dd (5.13, 2.6)	88.18
5	5.30 dd (2.6, 1.7)	74.22
6	6.11 dd (7.9, 1.7)	73.86
1'	5.65 dd (10.7, 7.9)	132.25
2'	5.56 dd (10.7, 9.3)	126.91
3'	5.61 (9.3, 7.0, 6.5)	70.07
4'	1.66 m	34.36
5'	1.58 m	27.11
6'	1.24 m	22.46
7'	0.91 t	13.97
2"-6"	8.95 d (4H)	149.86, 149.72
3"-5"	7.55 m (4H)	125.64, 125.61
4"	7.92 m (2H)	141.08, 140.99

\*Espectro 12.

\*\*Espectro 13.



observar el fuerte efecto paramagnético en el desplazamiento químico del núcleo H-6 ( $\delta$  6.1), el cual se provocó a través de la polarización  $\gamma$ -*gauche* inducida sobre C-6 por el enlace etéreo que sustituye al centro C-4 (Fig. 38). La secuencia de interacciones espín-espín (2D-COSY) para los núcleos H<sub>3</sub>-H<sub>6</sub> permitió asignar cada una de las resonancias para los protones de la  $\delta$ -lactona como se ilustra en la figura 39.

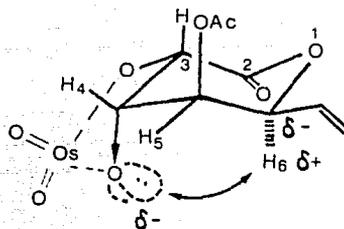


Figura 38. Efecto  $\gamma$ -*gauche* observado sobre el C-6 del éster cíclico de osmio Id.

Por último, las condiciones utilizadas para la hidrólisis de la pectinólida generaron un solo producto mayoritario, el cual fue designado como el derivado Ie. El análisis de la RMN (Cuadro 15) demostró la ausencia de las señales correspondientes al doble enlace conjugado al grupo carbonilo de la  $\delta$ -lactona y la presencia de las señales correspondientes a un grupo metoxilo. Estas observaciones sugirieron un mecanismo de adición nucleofílica de tipo 1,4<sup>124</sup> del metanol, utilizando como disolvente de la reacción, al sistema de dihidro- $\alpha$ -pirona.

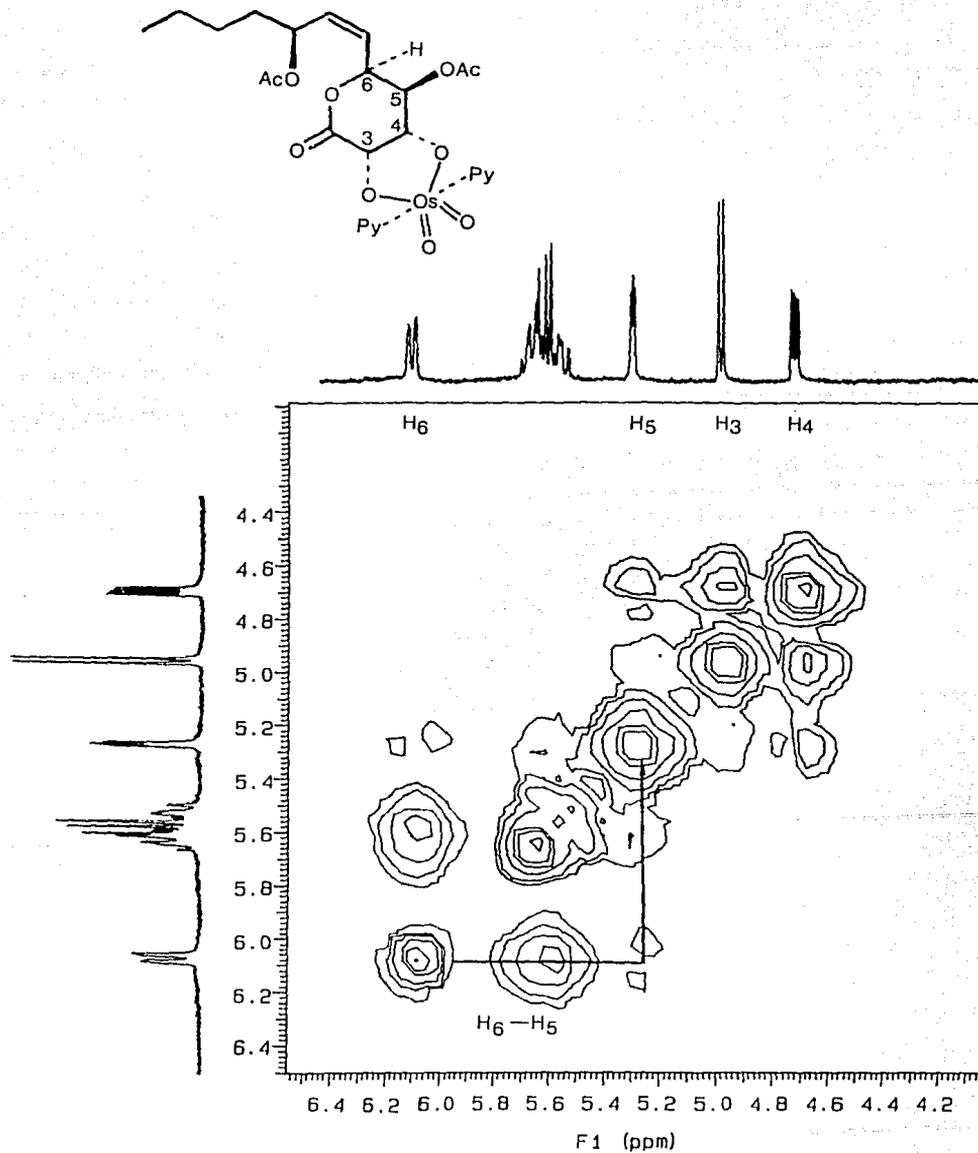


Figura 39. Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (2D-COSY) del éster cíclico de Osmio  
Ib.

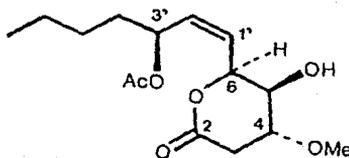
## Cuadro 15.

Desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (constantes de acoplamiento  $^1\text{H-H } J = \text{Hz}$ ) del producto de hidrólisis Ie.

Núcleo	$\delta^1\text{H}^*$	$\delta^{13}\text{C}^{**}$
2	—	171.25
3	2.62 (H $\alpha$ ) dd (17.3, 6.1) 2.67 (H $\beta$ ) dd (17.3, 3.6)	33.82
4	4.12 ddd (6.1, 5.4, 3.6)	84.27
5	4.45 t (5.4)	76.77
6	4.98 dd (8.7, 5.4)	71.05
1'	5.72 dd (10.1, 8.7)	131.71
2'	5.4-5.5 m	129.98
3'	5.4-5.5 m	65.88
4'	1.68 m	34.75
5'	1.57 m	27.16
6'	1.30 m	22.51
7'	0.90 t	13.95
-OMe	3.30 s	57.19
MeCOO-	2.04 s	171.40, 21.34

\*Espectro 14.

\*\*Espectro 15.



La RMN-<sup>1</sup>H del producto de hidrólisis presentó un sistema ABX formado por los protones del metileno C-3, centrados en  $\delta$  2.62 (H-3 $\beta$ ) y  $\delta$  2.67 (H-3 $\alpha$ ), y en el metino secundario C-4 ( $\delta$  4.12).

Los valores observados de  $J_{3\beta-4} = 6.1$  Hz y  $J_{3\alpha-4} = 3.6$  Hz verificaron la orientación axial para el sustituyente metoxilo en C-4, y por lo tanto, la adición nucleofílica de éste procedió por la cara  $\alpha$  del núcleo de dihidro- $\alpha$ -pirona. Este análisis demostró, de manera adicional, la flexibilidad de la cadena lateral, observación que se corroboró a través del proceso de hidrólisis concomitante que sólo sucedió en el grupo acetoxilo en C<sub>5</sub>. De esta manera, la estructura del producto de hidrólisis de la pectinólida se establece como la 6S-(3S-(acetiloxi)-1Z-heptenilo)-4R-(metoxi)-5S-(hidroxil)-tetrahidro-2H-piran-2-ona.

## 5.5 EVALUACION CUANTITATIVA DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LA PECTINOLIDA Y ALGUNAS 5,6-DIHI-DRO- $\alpha$ -PIRONAS RELACIONADAS.

La evaluación preliminar de la actividad antimicrobiana (Capítulo 5.1) de las pironas aisladas de *Hyptis pectinata* demostró una actividad significativa en contra de bacterias Gram-positivas. Esta observación permitió proponer la realización de una evaluación antimicrobiana secundaria mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) para la pectinólida (I) y la hiptólida (II), constituyentes responsables de la actividad antimicrobiana de *H. pectinata* y, al mismo tiempo realizar la evaluación antimicrobiana de cinco  $\alpha$ -pironas naturales (III-VII), todas ellas aisladas de especies de labiadas, y de los

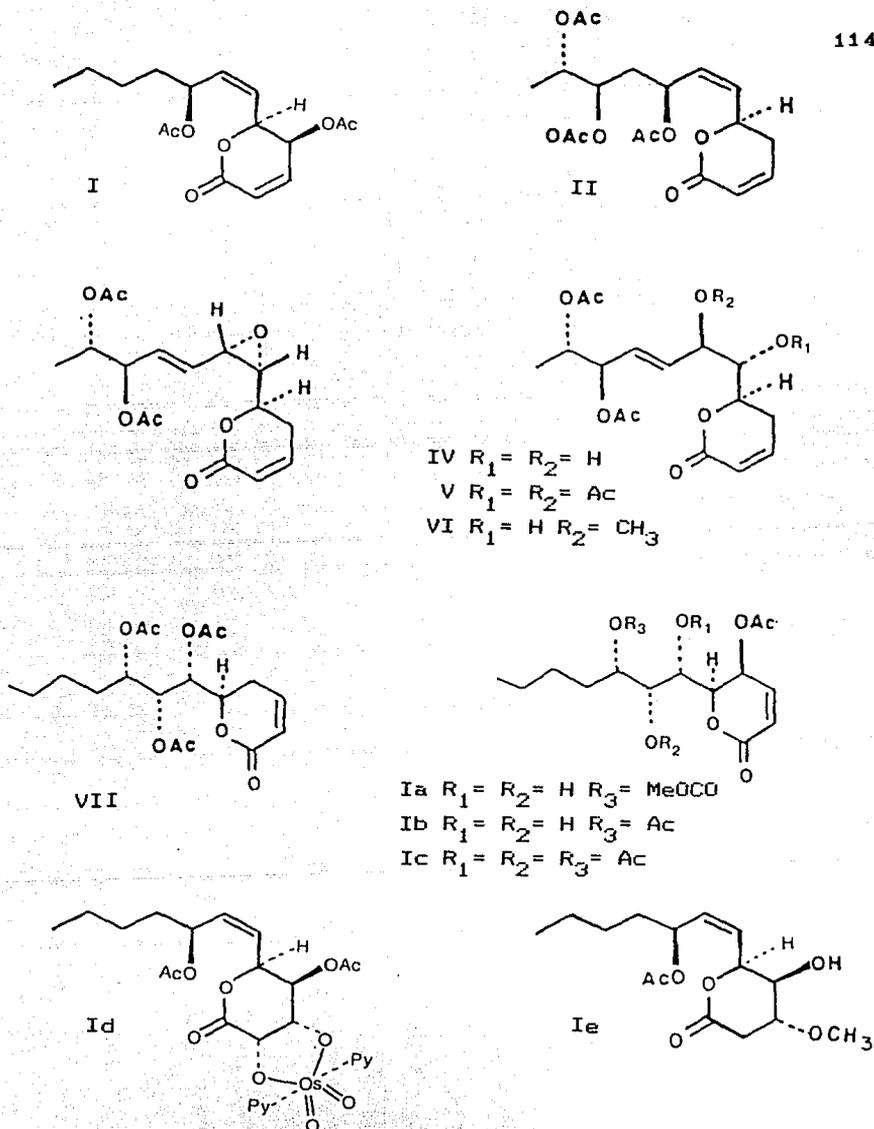


Figura 40. Estructuras de las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas de prueba en la evaluación cuantitativa de la actividad antimicrobiana.

cuatro derivados semisintéticos de la pectinólida (Ia-Ie). La figura 40 incluye las estructuras de estos compuestos. La evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana se realizó mediante el método de difusión en agar y los resultados se presentan en el cuadro 16. Este ensayo preliminar demostró que los productos naturales I-IV y los derivados Ia y Ib inhibían el crecimiento de las bacterias Gram-positivas (*Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*) a concentraciones menores de  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Todas las pironas evaluadas fueron inactivas en contra de *Candida albicans* y bacterias Gram-negativas (*Escherichia coli* y *Pseudomona aeruginosa*) a concentraciones menores de  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ .

Los experimentos para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC) se realizaron únicamente para los compuestos activos en contra de las bacterias que mostraron mayor sensibilidad y estos resultados se presentan en el cuadro 17.

La pectinólida (I) y sus derivados Ia-Ic desarrollaron el mayor efecto inhibitorio con valores de MIC entre  $25-50 \mu\text{g ml}^{-1}$  para *B. subtilis* y de  $50-75 \mu\text{g ml}^{-1}$  para *S. aureus*, en contraposición a la inactividad observada para los derivados Id y Ie. La hiptólida (II) y la desacetilepiolguina (III) presentaron una actividad marginal en contra de *B. subtilis* (MIC =  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) y fueron inactivas en contra de los microorganismos de prueba restantes. Las pironas IV-VI, estructuralmente relacionadas con el compuesto III, presentaron valores de MIC superiores a  $100 \mu\text{g ml}^{-1}$  para la levadura y las bacterias utilizadas.

Cuadro 16.

Evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana de algunas 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ).

Compuesto	<u>B. subtilis</u>		<u>S. aureus</u>		<u>P. aeruginosa</u>		<u>E. coli</u>		<u>C. albicans</u>		
	100	50	100	50	500	250	500	250	300	250	
<b>Productos Naturales:</b>											
I	10	8	9	8	5	2	-	-	4	2	
II	4	3	-	-	-	-	-	-	-	-	
III	5	2	-	-	-	-	-	-	-	-	
IV	5	3	-	-	-	-	-	-	-	-	
V	5	2	-	-	-	-	-	-	-	-	
VI	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
VII	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>Derivados sintéticos:</b>											
Ia	7	5	3	-	-	-	-	-	4	2	
Ib	7	5	3	-	-	-	-	-	4	2	
Ic	5	3	2	-	8	5	3	-	-	-	
Id	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Ie	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<b>Estandar:</b>											
Streptomycin	13		7		7		10		-		
Nistatina	-		-		-		-		5		

Cuadro 17.

Evaluación cuantitativa de la actividad antimicrobiana. Concentración máxima inhibitoria ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) de los compuestos activos.

Compuesto	<u>B. subtilis</u>	<u>S. aureus</u>	<u>P. aeruginosa</u>	<u>E. coli</u>	<u>C. albicans</u>
<b>Productos Naturales:</b>					
I	25	50	200	500	250
II	100	100	-	-	-
III	100	100	-	-	-
IV	100	100	-	-	-
V	100	100	-	-	-
VI	100	100	-	-	-
VII	100	100	-	-	-
<b>Derivados sintéticos:</b>					
Ia	50	75	300	300	200
Ib	50	75	300	300	200
Ic	50	100	200	300	500
<b>Estandar:</b>					
Estreptomicina	3.12	1.56	0.5	10	-
Nistatina	-	-	-	-	10

Las siguientes conclusiones derivan de la correlación entre la estructura química de los compuestos evaluados (I-VII) y la actividad antimicrobiana desarrollada para estas 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas:

1. La presencia del doble enlace conjugado al grupo carbonilo de la  $\alpha$ -pirona constituye un requisito indispensable para la actividad antimicrobiana, como lo demostró la inhibición desarrollada por la pectinólida (I) y sus derivados Ia-Ic. Al parecer, la pérdida del poder alquilante que resultaría de la conjugación del doble enlace A<sup>3</sup> con el carbonilo del núcleo de dihidro- $\alpha$ -pirona es la responsable de la inactividad observada en las pironas Id y Ie.

2. La sustitución de la posición C-5 en el núcleo básico por un grupo acetoxilo con orientación  $\beta$  incrementa la actividad inhibitoria.

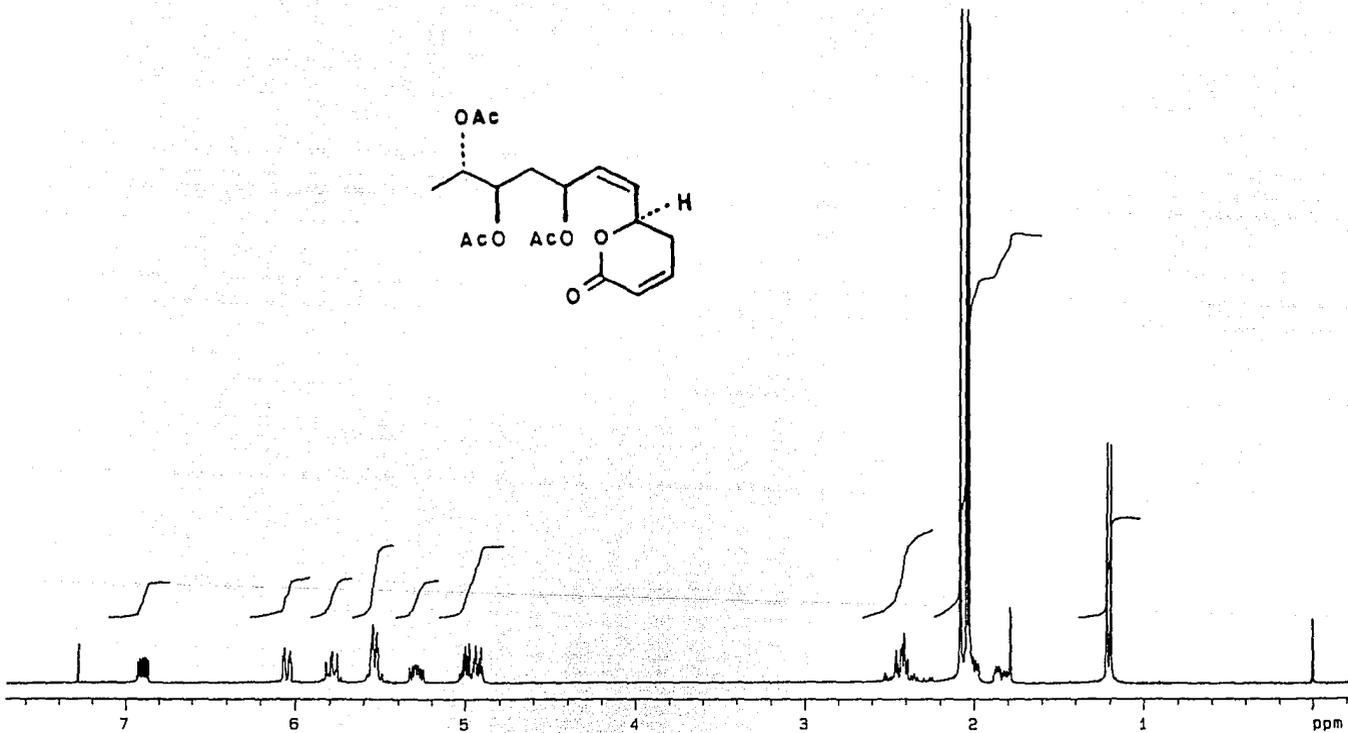
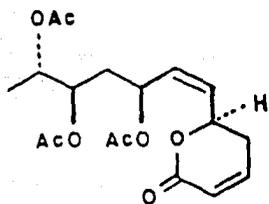
3. La actividad selectiva en contra de bacterias Gram positivas ( $25-100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) al parecer se asocia con la presencia del residuo de 1-acetiloxi-n-pentilo de la cadena lateral en la pectinólida, ya que la asperlina (19) y sus congéneres, como la 6-(1,2-trans-propenilo)-5,6-dihidro-2H-piran-2-ona<sup>55</sup>, no presentan actividad inhibitoria a concentraciones menores a  $500 \mu\text{g ml}^{-1}$ . Por otra parte, la comparación de la estructura química y la actividad anticandida entre la pectinólida (MIC  $250 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) y la asperlina (MIC  $75 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) permite especular que una mayor actividad inhibitoria será desarrollada como resultado de la presencia de una función epoxídica en la posición C1'-C2' de la cadena lateral.

## 6. CONCLUSIONES

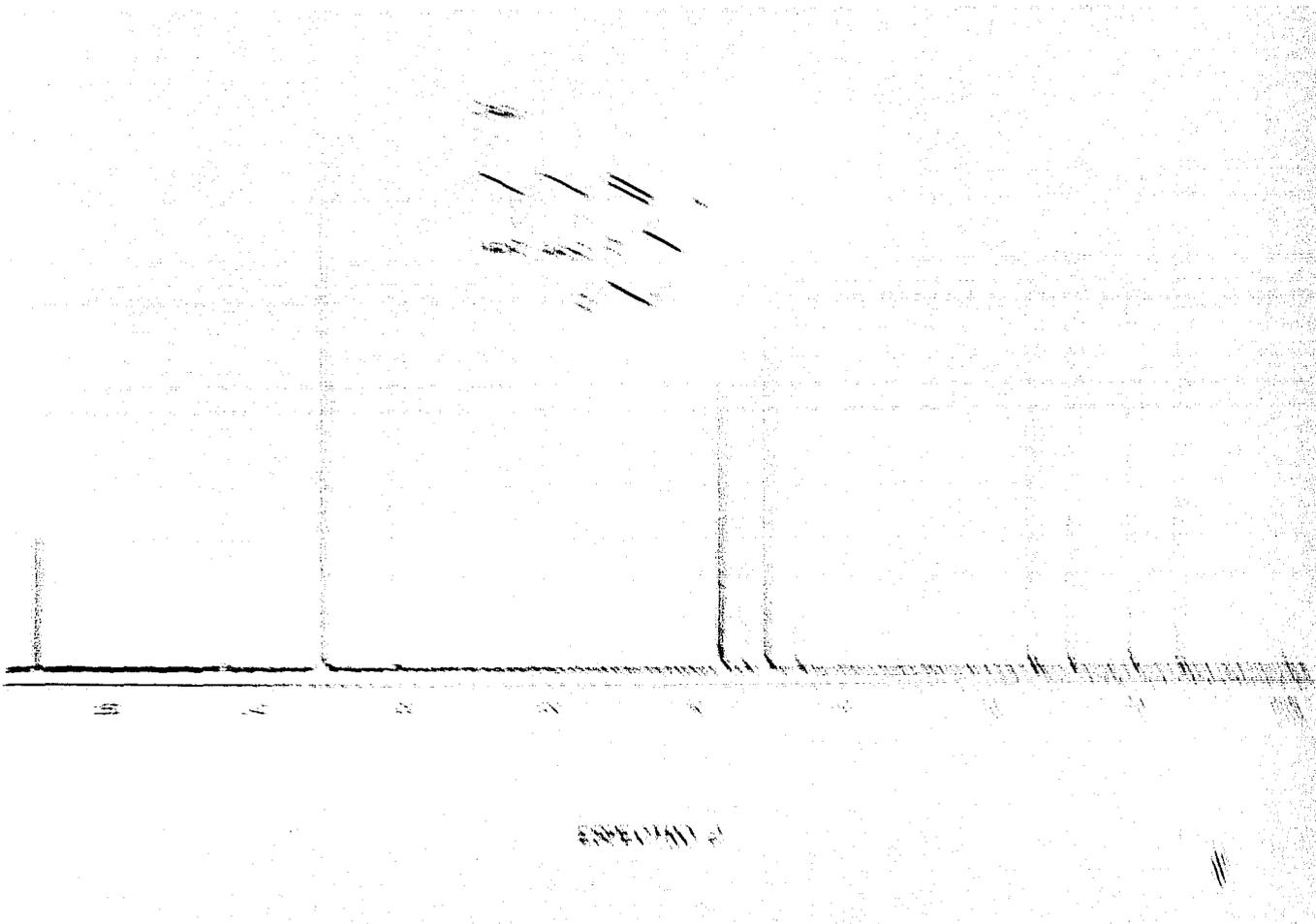
1. La evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana del extracto clorofórmico de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. (Lamiaceae) demostró una actividad inhibitoria significativa sobre bacterias Gram positivas, misma que se correlacionó, mediante un procedimiento de aislamiento biodirigido con un nuevo agente antimicrobiano, la pectinólida. El alto rendimiento de este metabolito secundario justifica ampliamente las propiedades antisépticas demostradas por las infusiones preparadas con la hierba del burro (*H. pectinata*) en la medicina tradicional de nuestro país.
2. La estructura y la estereoquímica absoluta de la pectinólida se establecieron como la 6S-[(3S-acetoxi)-12-heptenil]-5S-(acetiloxi)-5,6-dihidro-2H-piran-2-ona, con base en evidencias espectroscópicas, quirópticas y químicas.
3. La similitud estructural de la pectinólida con los metabolitos antimicrobianos de *Aspergillus* permitió realizar un diseño experimental para la semisíntesis de análogos de la asperlina, a partir de la funcionalización de los dobles enlaces presentes en la pectinólida.

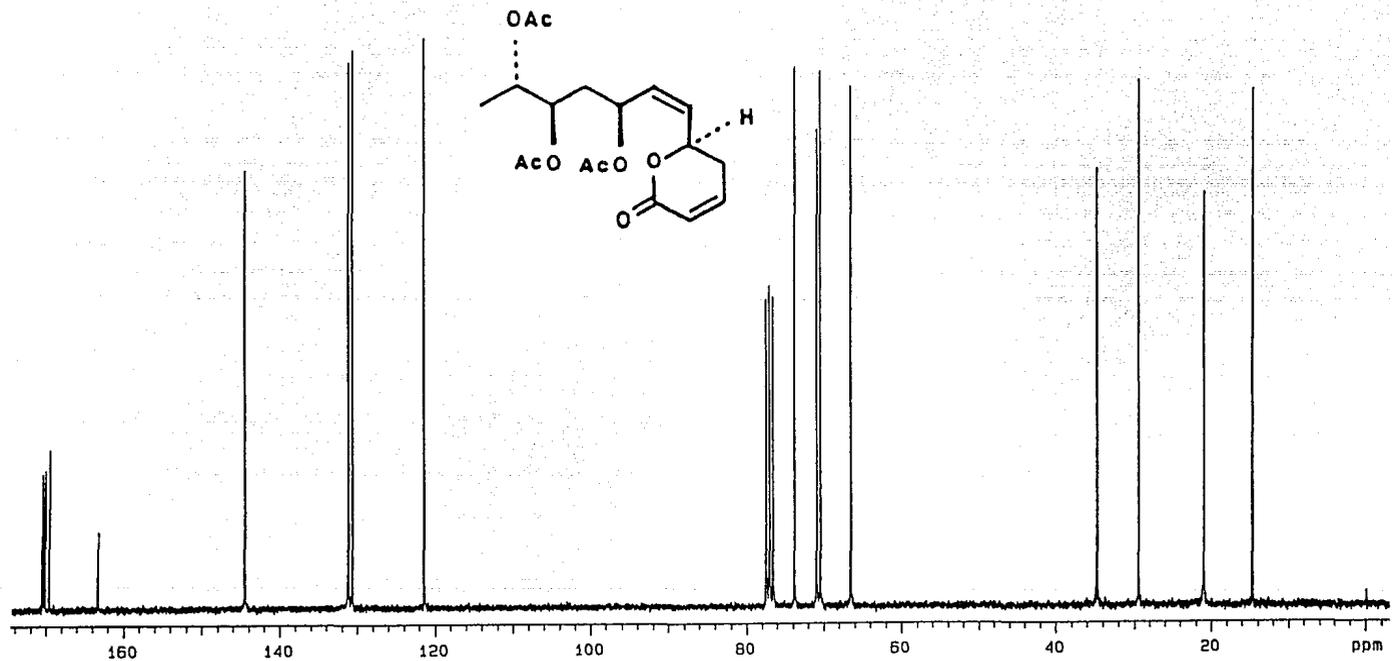
4. La evaluación cuantitativa de la actividad antimicrobiana de la pectinólida y algunas 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas sintéticas y naturales permitió concluir que el efecto inhibitorio demostrado por la pectinólida ( $25-50 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) para *Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus* se asocia con el núcleo de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona sustituido en la posición C-5 por un grupo acetoxilo. Al parecer, la presencia del residuo de 1-acetiloxi-n-pentilo de la pectinólida confiere una actividad selectiva en contra de bacterias Gram positivas.

## ESPECTROS

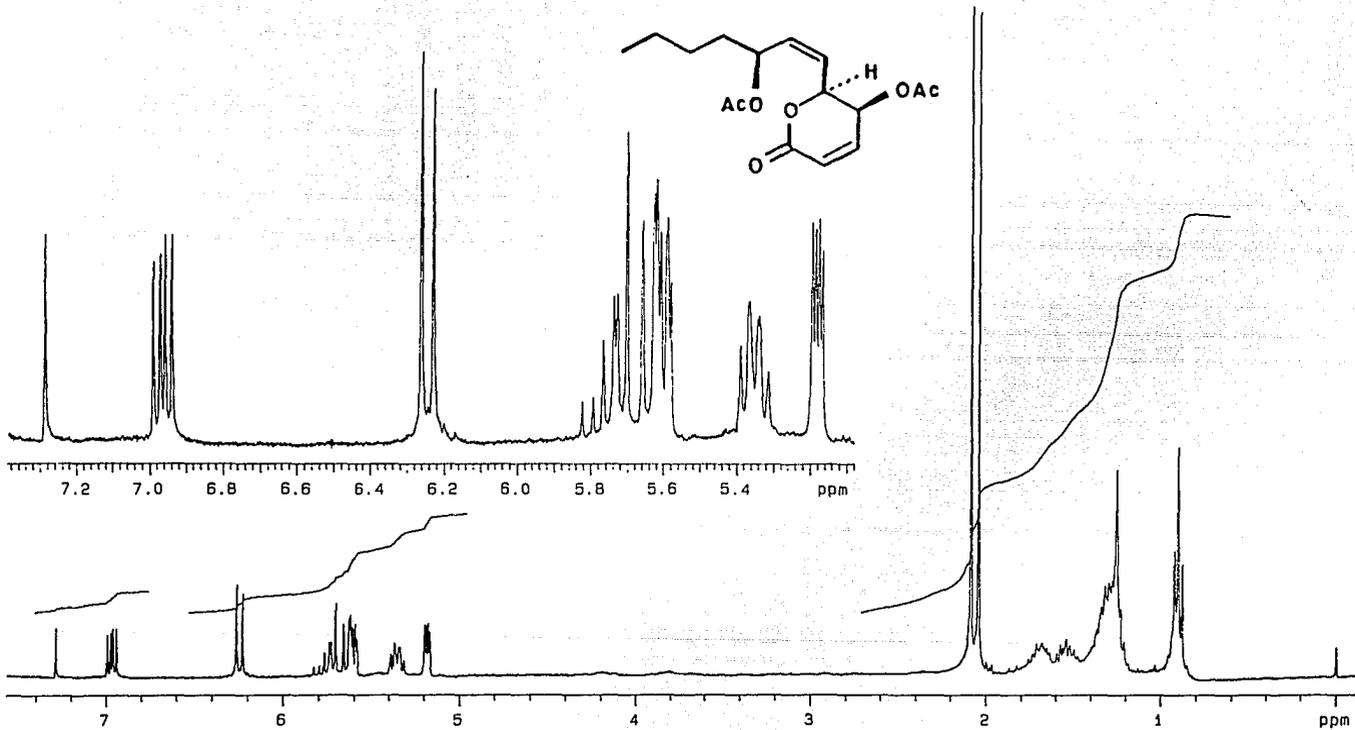


ESPECTRO 1

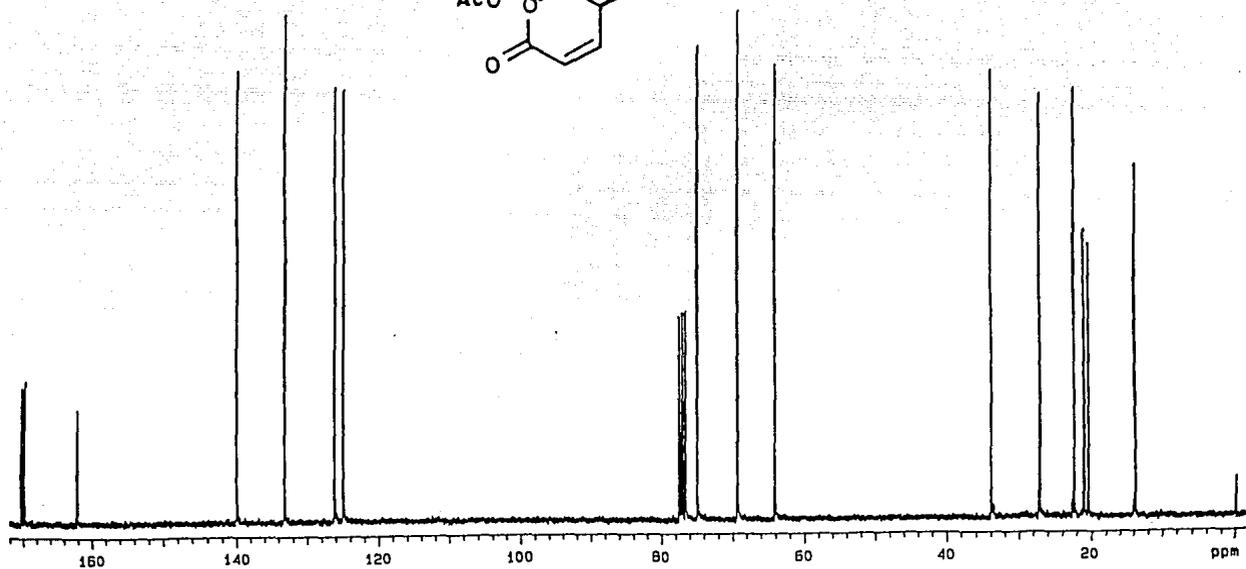
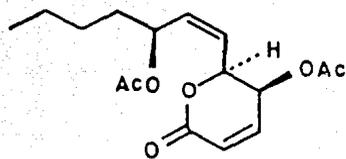




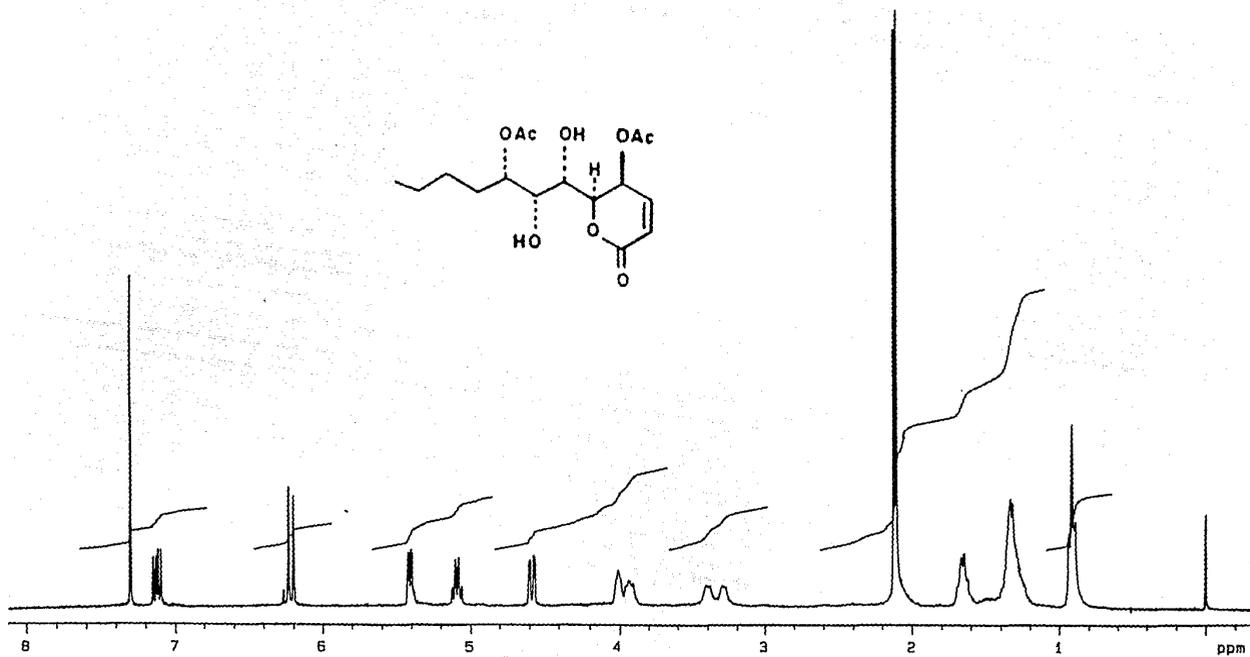
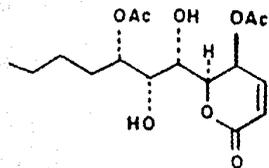
ESPECTRO 2



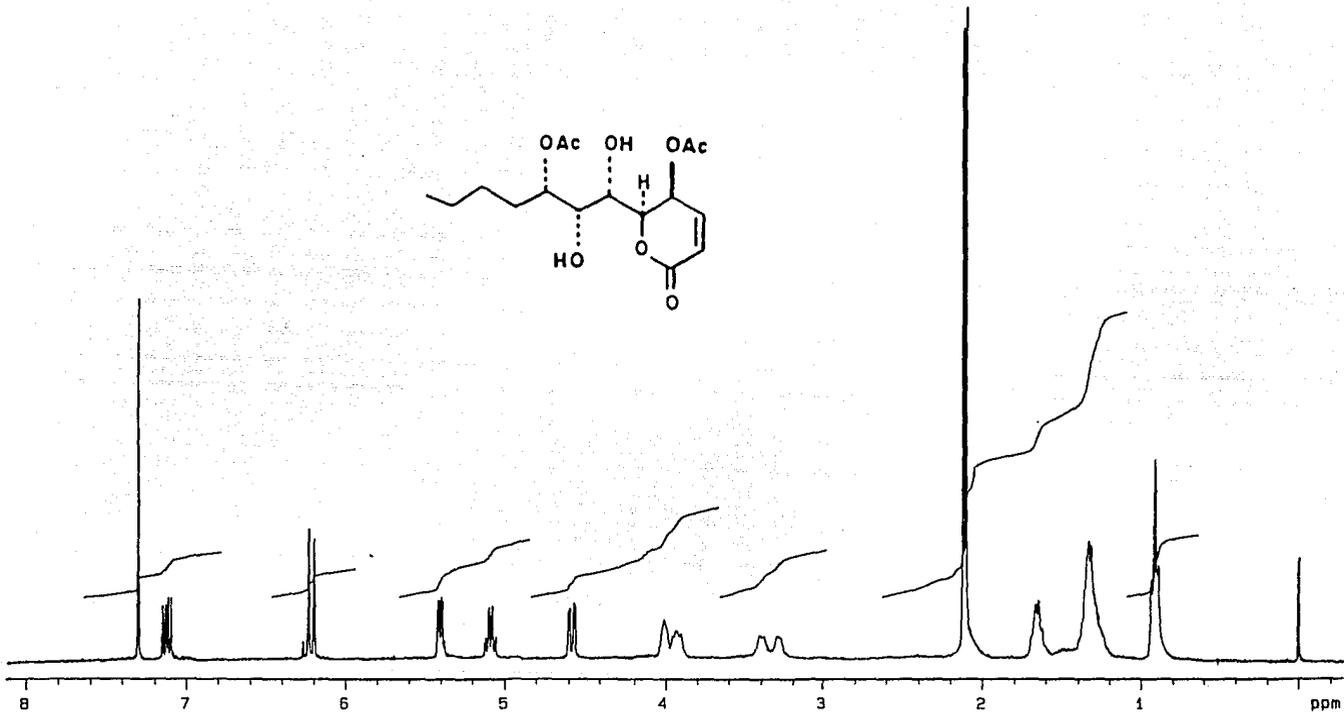
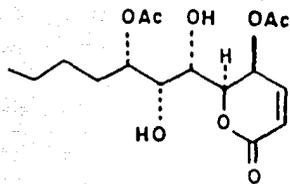
ESPECTRO 3



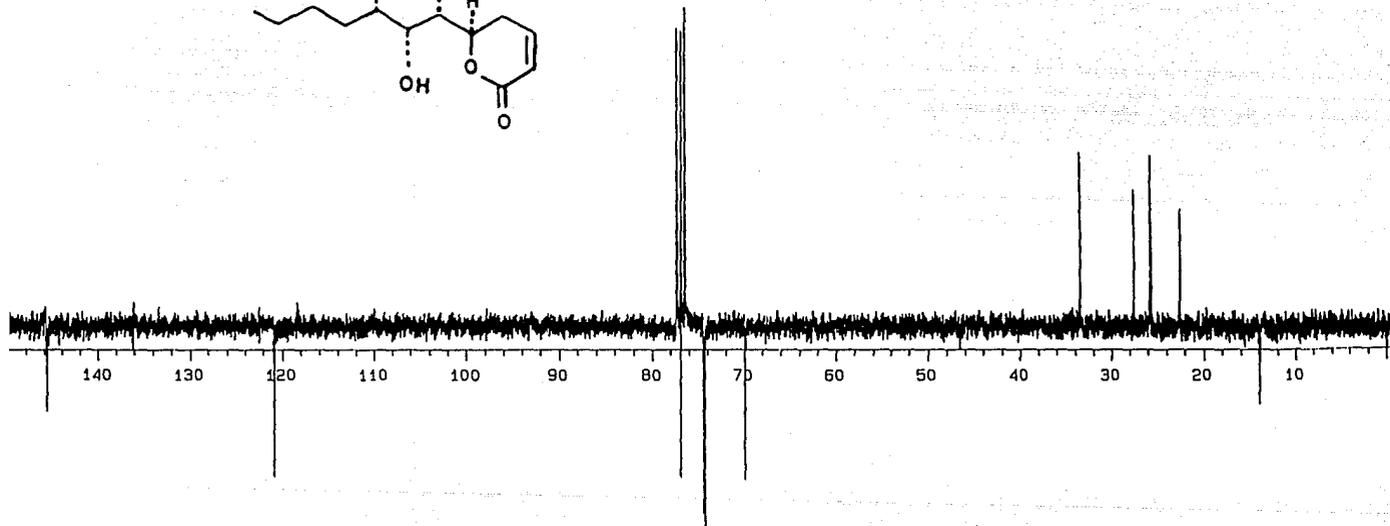
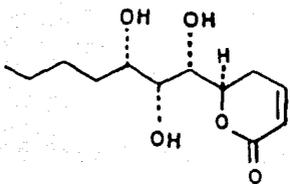
ESPECTRO 4



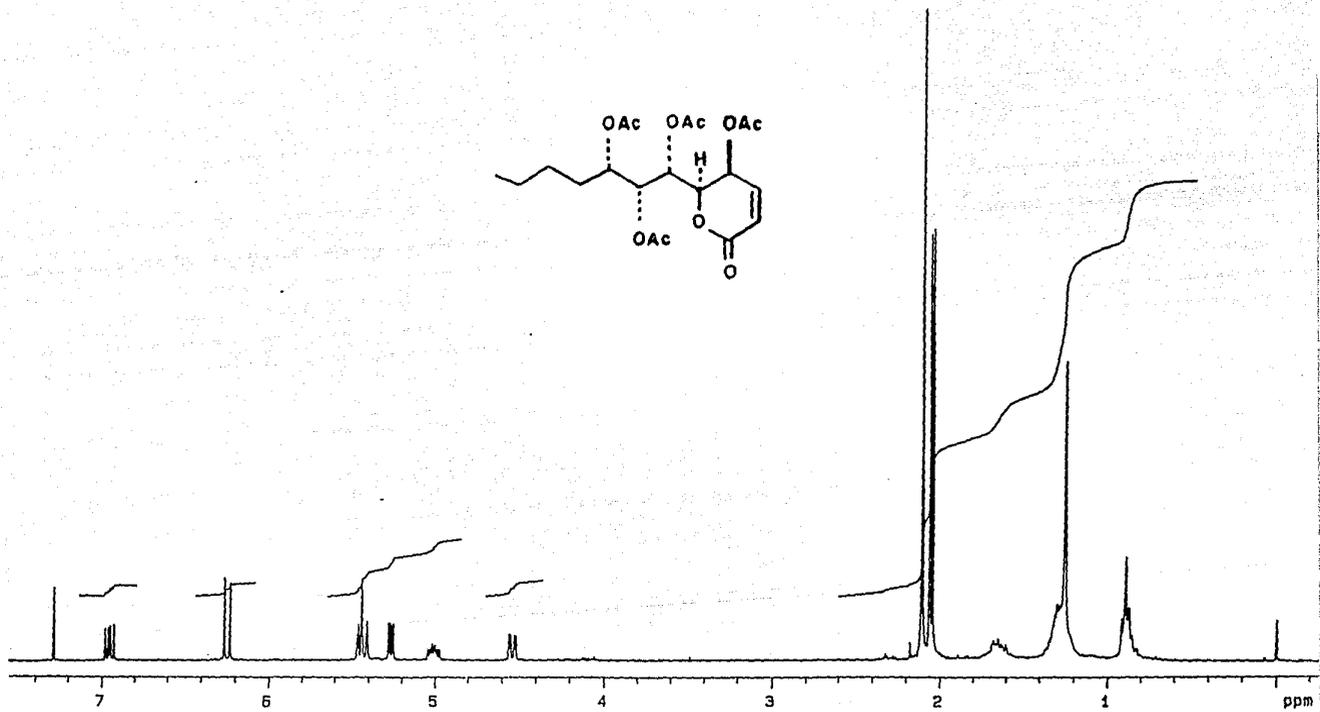
ESPECTRO 5



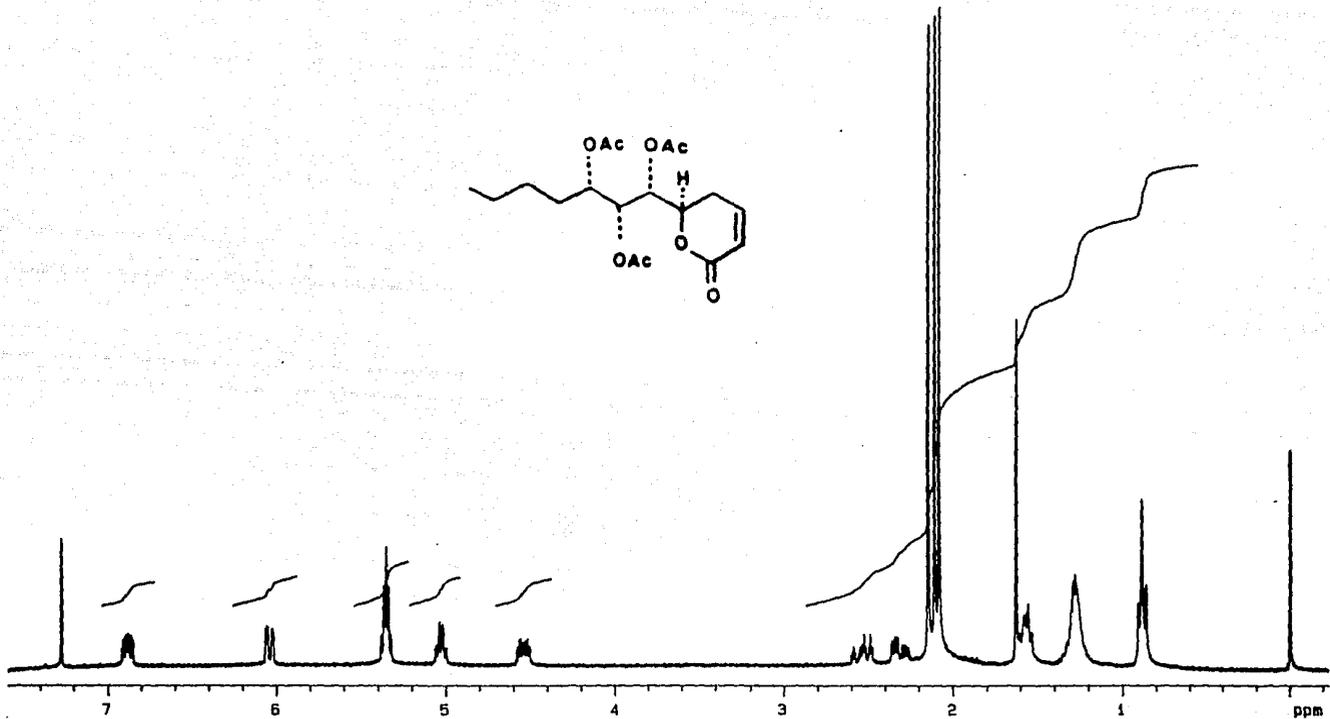
ESPECTRO 5



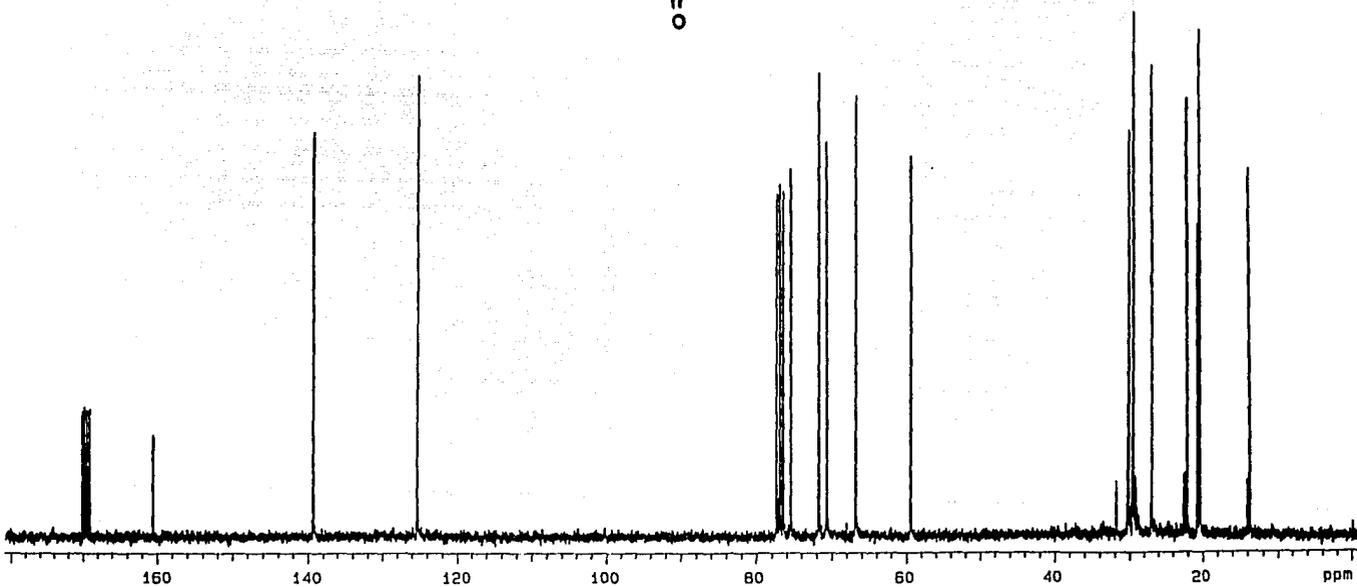
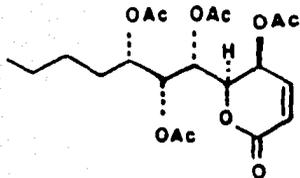
ESPECTRO 6



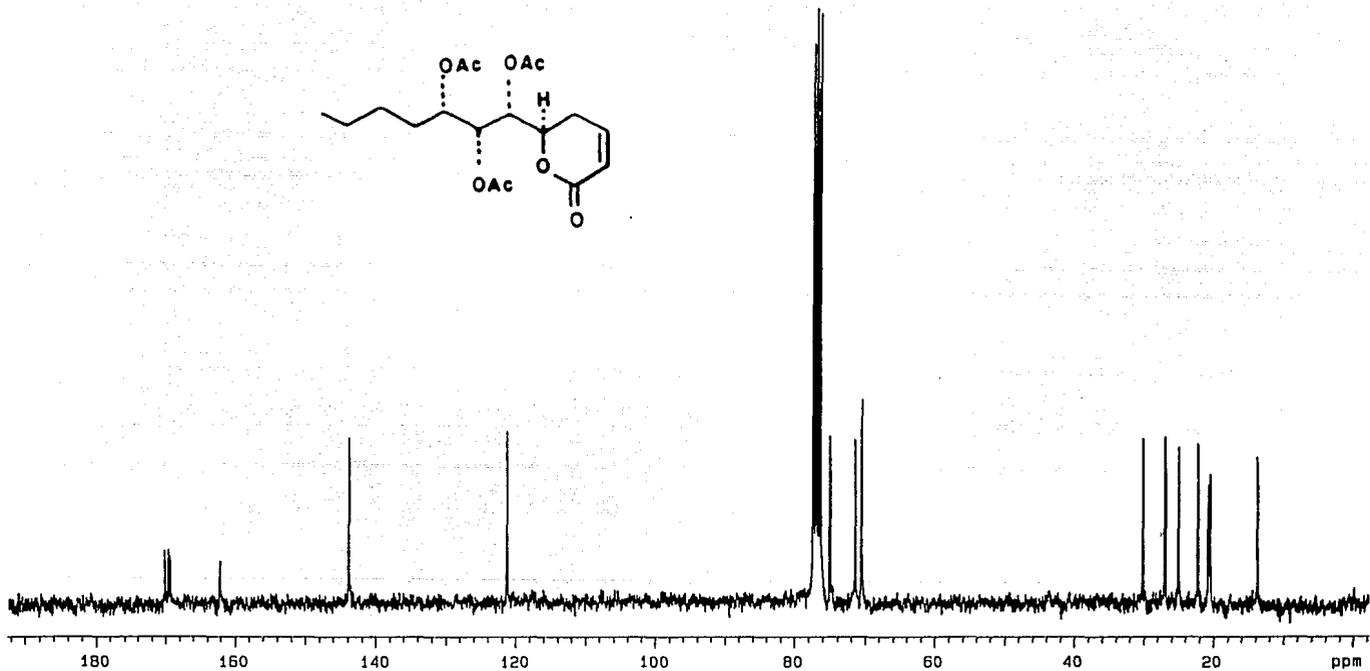
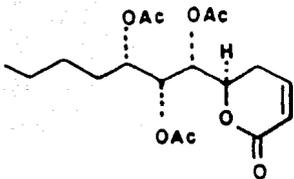
ESPECTRO 7



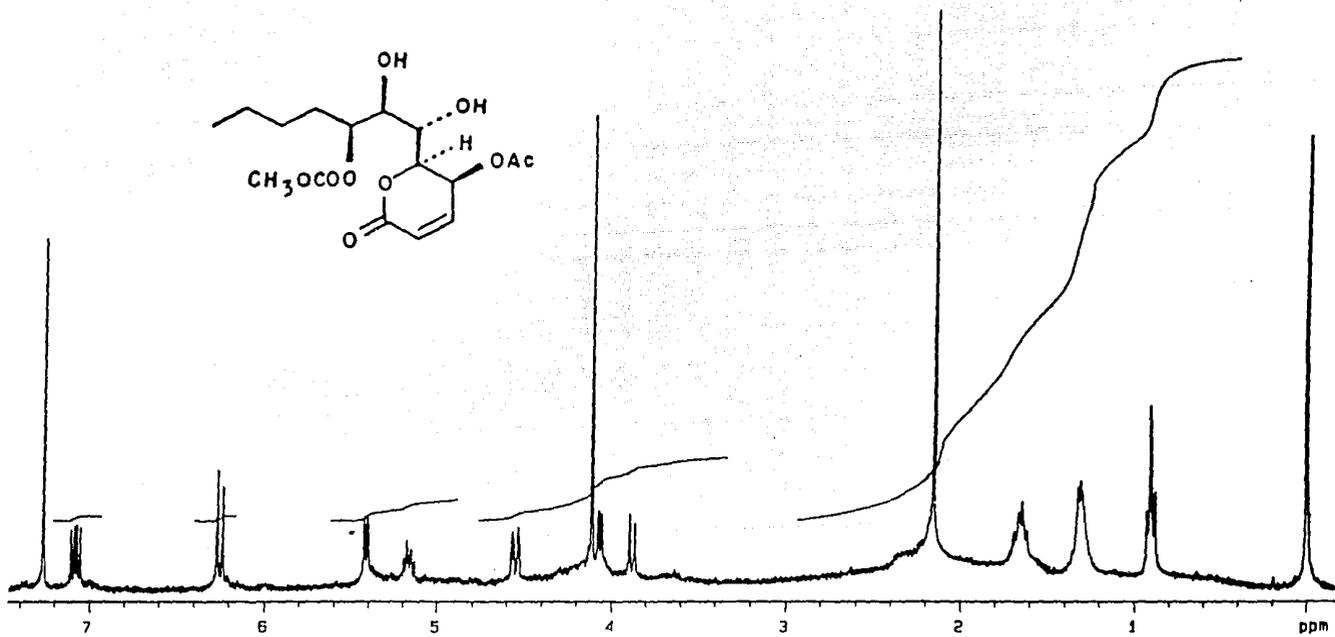
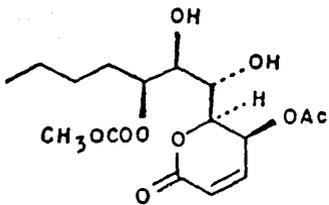
ESPECTRO 8



ESPECTRO 9

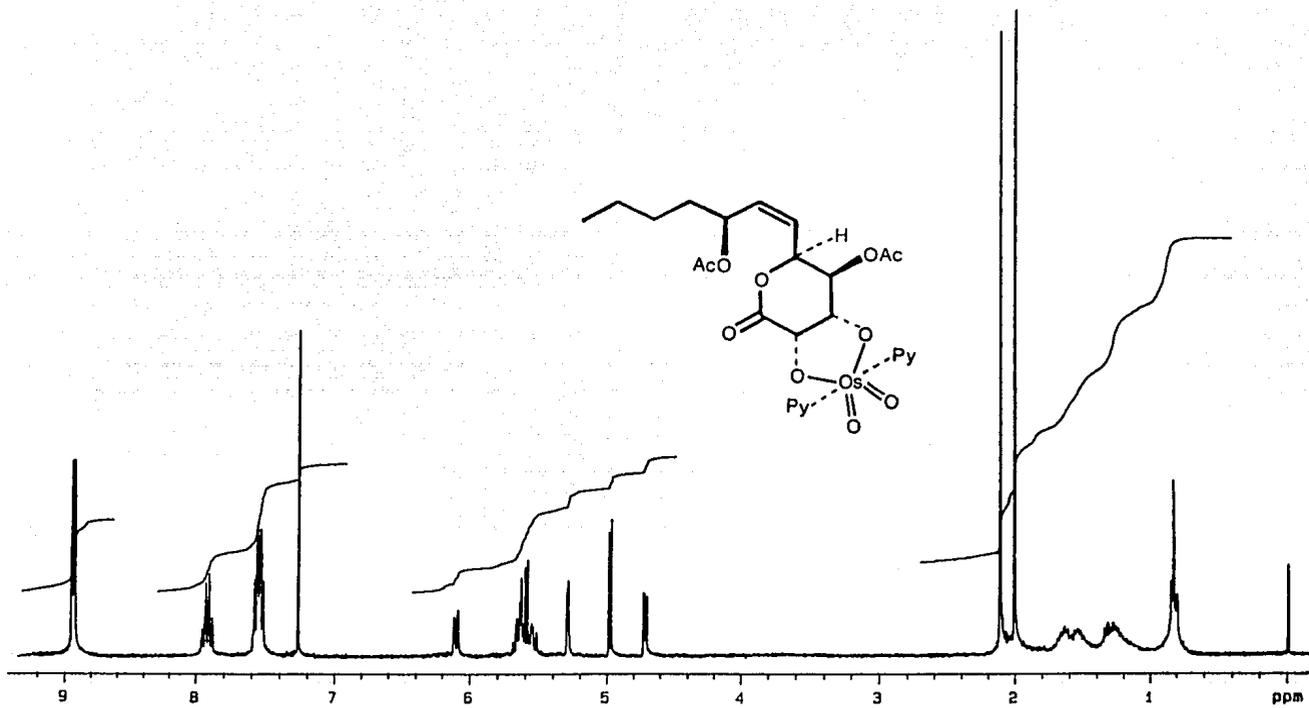


ESPECTRO 10

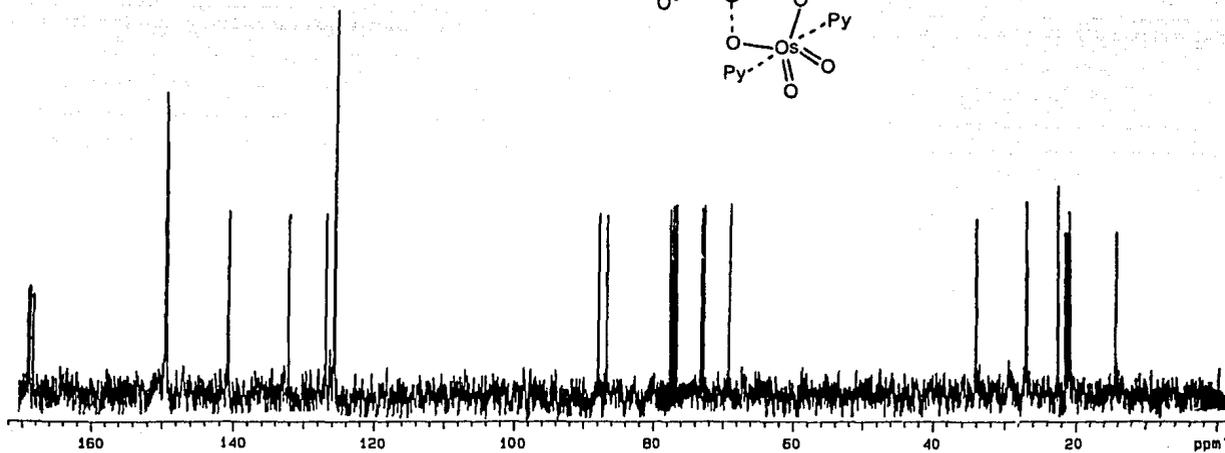
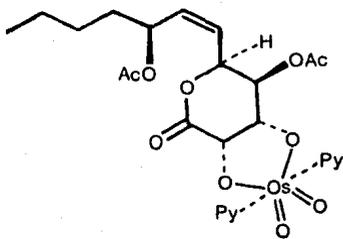


ESPECTRO 11

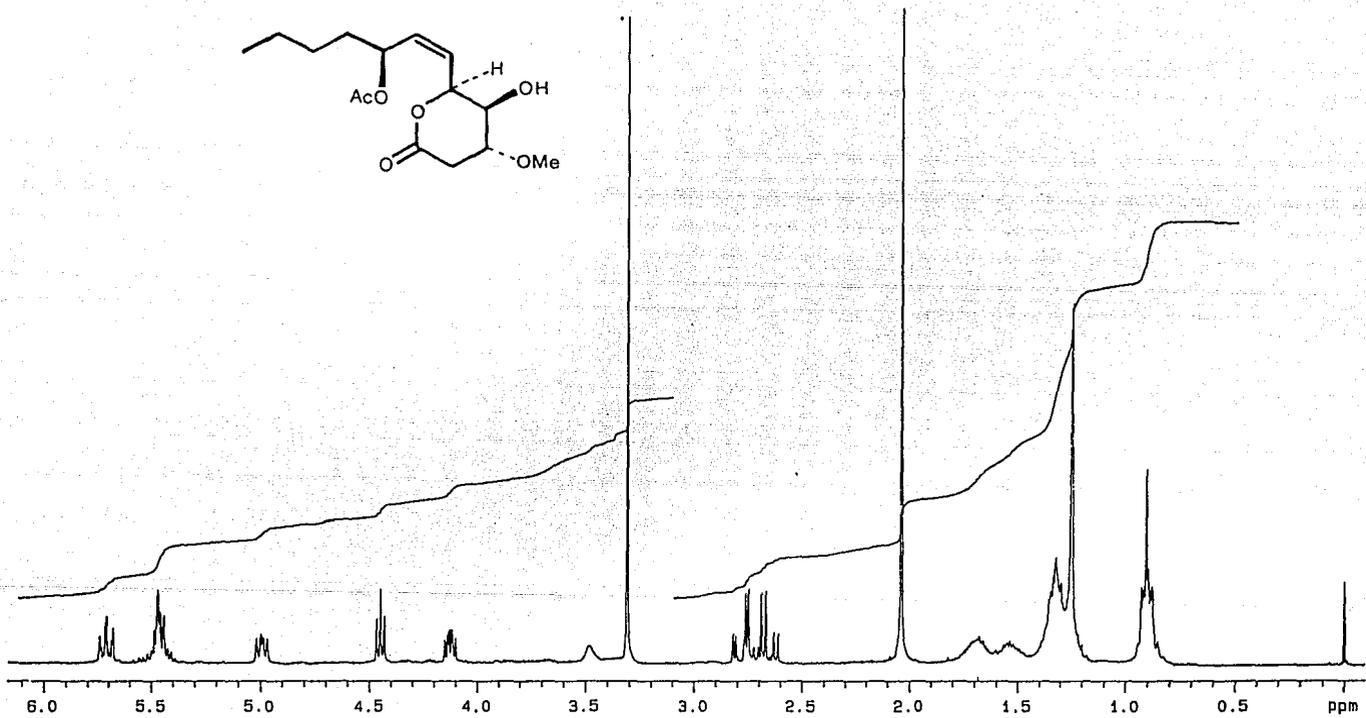
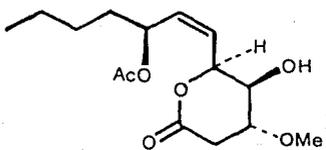
131



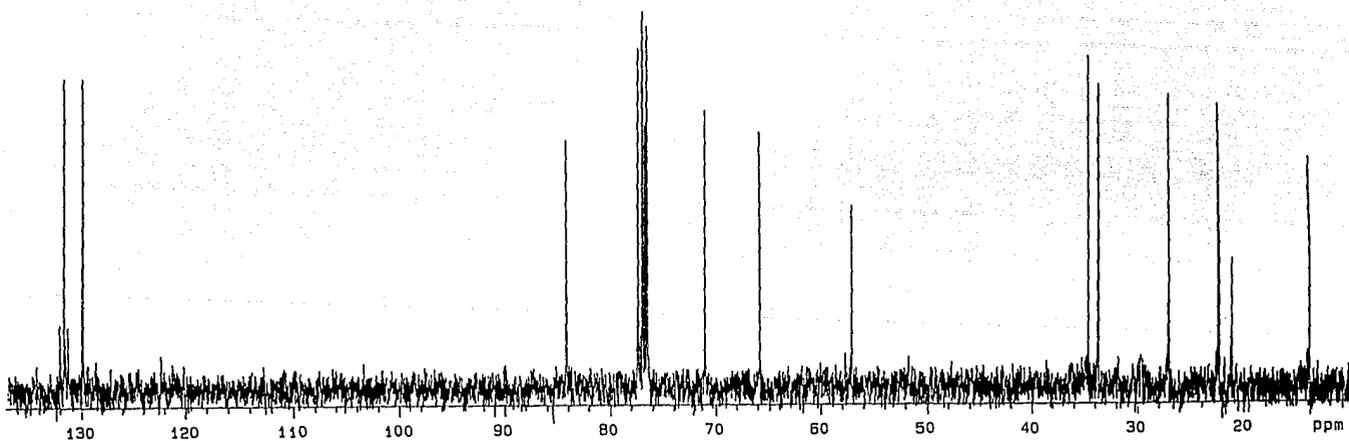
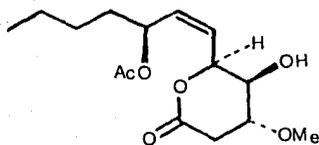
ESPECTRO 12



ESPECTRO 13



ESPECTRO 14



ESPECTRO 15

## 7. BIBLIOGRAFIA

1. V.E. Tyler, L.R. Brady y J.E. Robbers, *Pharmacognosy*, 9a. ed., Lea & Febiger, U.S.A., p. 186-249 (1988).
2. L.A. Mitscher, R. Leu, M.S. Bathala, W. Wu y J.L. Beal, *Lloydia*, 36, 157, (1972).
3. L.A. Mitscher, W. Wu, R.W. Doskotch y J.L. Beal, *Lloydia*, 35, 167 (1972).
4. L.A. Mitscher, S. Drake, R. Sitaraghav, Gollapudi y S.K. Okwute, *J. Nat. Prod.*, 50, 1025 (1987).
5. A. Farouk, A.K. Bashir y A.K.M. Salih, *Fitoterapia*, 54, 3 (1983).
6. J.L. Ríos, M. C. Recio y A. Villar, *J. Ethnopharm.*, 23, 127 (1988).
7. C. Caron, M.J. Hoizey, L. Le Men-Oliver, G. Massiot, M. Zeches, C. Choisy, E. Le Magrex y R. Verpoorte, *Planta Medica*, 54, 409 (1988).
8. J.L. Mensah, I. Lagarde, C. Ceschin, G. Michel, J. Gleye y I. Fouraste, *J. Ethnopharm.*, 28, 129 (1990).
9. S. Habtemariam, A.I. Gray, G.W. Halbert y P.G. Waterman, *Planta Medica*, 56, 187 (1990).
10. M. Suffness en "Biologically Active Natural Products", Ed. K. Hostettmann y P.J. Lea, Clarendon Press, Oxford, Gran Bretaña, pp. 85-104 (1987).

11. A.M. Clark, Ch. D. Hufford, F.S. El-Feraly, D. Mc Chesney en "The Chemistry of Allelopathy", Ed. A.C. Thompson, American Chemical Society, Washington, D.C., p. 327-336 (1985).
12. S.R. Jain, P.R. Jain y M.R. Jain, *Planta Medica*, 26, 196 (1974).
13. K. Malan, V. Pelissier, Ch. Marion, A. Blaise y J.M. Bessiere, *Planta Medica*, 54, 531 (1988).
14. M. Martínez, *Las Plantas Medicinales de México*, 6a. ed., Ed. Botas, México, p. 508 (1989).
15. A.I.R. Luz, M.G.B. Zoghbi, L.S. Ramos, J.G.S. Mata y M.L. da Silva, *J. Nat. Prod.*, 47, 745 (1984).
16. H. Wagner y L. Sprinkmeyer, *Dtsch. Apoth. Ztg.*, 113, 1159 (1973).
17. V.F. German, *J. Pharm. Sci.*, 60, 647 (1971).
18. M.C.M. De Araujo, M.S.B. Cavalcanti, J.F. De Mello y I.L. Albuquerque, *Rev. Inst. Antibiot.*, 14, 10 (1974).
19. D.G.I. Kingston, M.M. Rao y W.V. Zucker, *J. Nat. Prod.*, 42, 496 (1979).
20. K.L. Lee, Y.M. Lin, T.S. Wu, D.C. Zhang, T. Yamagishi, T. Hayashi, I.H. Hall, J.J. Chang, R.Y. Wu y T.H. Yang, *Planta Medica*, 54, 308 (1988).
21. A. W. Hoffmann, *Liebigs Ann. Chem.*, 110, 129 (1859).

22. O. Doebner, Ber. Dtsch. Chem. Ges., 27, 344 (1894).
23. R. Kuhn y D. Jerchel, Ber. Dtsch. Chem. Ges., 76B, 413 (1943).
24. R. Kuhn y K. Kum., Chem. Ber., 95, 2009 (1962).
25. R. Lukes, J. Jary y J. Nemeč, Czech. Chem. Comm., 27, 735 (1962).
26. F.W. Lichtenthaler, F.D. Klingler y P. Jarglis, Carbohydr. Res., 132, C1 (1984).
27. R. Tschesche, H.J. Hoppe, G. Snatzke, G. Wulff y H.W. Fehlhaber, Chem. Ber., 104, 1420 (1971).
28. G. Ohloff, Chem. Organ. Naturstoffe, 35, 431 (1978).
29. T. Fujimori, R. Kasuga, H. Matsushita, H. Kaneko y M. Noguchi, Agric. Biol. Chem., 40, 303 (1976).
30. T.M. Meijr, Rec. Frar. Chim. Pays-Bas, 59, 191 (1940).
31. S. Abe y K. Sato, J. Chem. Soc. Japan, 75, 952 (1954).
32. K. Mori, Agric. Biol. Chem., 40, 1617 (1976).
33. W.H. Pirkley, y P.E. Adams, J. Org. Chem., 45, 4117 (1980).
34. R. Kaiser y D. Lamparsky, Tetrahedron Letters, 1659 (1976).
35. E. Bayer, J. Gas Chromatogr., 4, 67 (1966).

36. T. Hashizume, N. Kikuchi, Y. Sasaki y I. Sakata, *Agric. Biol. Chem.*, 32, 1306 (1968).
37. G.W.K. Cavill, D.V. Clark y F.B. Whitfield, *Aust. J. Chem.*, 21, 2819 (1968).
38. F. Bohlmann y A. Suwita, *Phytochemistry*, 18, 677 (1979).
39. T. Nakata, N. Hata, K. Iida y T. Oishi, *Tetrahedron Letters*, 28, 5661 (1987).
40. N.C. Franca y J. Polonsky, *Acad. Sci.*, 273C, 439 (1971).
41. A. Kjaer, R. Norrestam, J. Polonsky, *Acta Chem. Scand.*, B39, 745 (1985).
42. M.T. Davies-Coleman y D.E.A. Rivett, *Phytochemistry*, 26, 3047 (1987).
43. L. Van Puyvelde, S. Dubé, E. Uwinama, C. Uwera, R.A. Domisse, E.L. Esmans, O. Van Schoor y A.J. Vlietinck, *Phytochemistry*, 18, 1215 (1979).
44. L. Van Puyvelde, N. de Kimpe, S. Dubé, M. Chagnon-Dubé, Y. Boily, F. Borremans, N. Schamp y M.J.O. Anteunis, *Phytochemistry*, 20, 2753 (1981).
45. W. Herz, G. Ramakrishnan, *Phytochemistry*, 17, 1327 (1978).
46. Y. Kimura, K. Katagiri y S. Tamuro, *Tetrahedron Letters*, 3137 (1971).

47. G.A. Ellestad, W.J. Mc Gahren y M.P. Kuntsmann, *J. Org. Chem.*, 37, 2045 (1972).
48. D. Seebah y H. Meyer, *Angew. Chem. Intern. Ed. Engl.*, 13, 77 (1974).
49. S. Hanessian, *Total Synthesis of Natural Products: The Chiron Approach*. Pergamon press, Gran Bretaña, p. 163 (1983).
50. Y. Masaki, K. Nagata, Y. Serizawa y K. Kaji, *Tetrahedron Letters*, 25, 95 (1984).
51. K. Mori, T. Otsuka y M. Oda, *Tetrahedron*, 40, 2929 (1984).
52. G.M. Strunz, C.J. Heissner, M. Kakushima y M.A. Stillwell, *Can. J. Chem.*, 52, 825 (1974).
53. E. Silverberg y A.I. Holleb, *Ca - A Cancer Journal for Clinicians*, 22, 2 (1972).
54. K.H. Hollenbeak y M.E. Kuehne, *Tetrahedron*, 30, 2307 (1974).
55. A.D. Argoudelis y J.F. Zieserl, *Tetrahedron Letters*, 18, 1969 (1966).
56. S. Mizuba, K. Lee y J. Jiu, *Can. J. Microbiol.*, 21, 1781 (1975).
57. I. Yamamoto, H. Suide, T. Hemmi y T. Yamano, *Takeda Kenkusho Ho*, 29, 1 (1970).

58. K. Nukada, O. Yamoto, T. Susuki, M. Takegushi y M. Ohnishi, *Anal. Chem.*, 35, 1892 (1963).
59. R.H. Evans, G.A. Ellestad y M.P. Kunstmann, *Tetrahedron Letters*, 179 (1969).
60. R.J. Ferrier y G.H. Sankey, *J. Chem. Soc. (c)*, 2345 (1966).
61. E.W. Garbisch, *J. Am. Chem. Soc.*, 86, 5561 (1964).
62. J.H. Moore, T.P. Murray y M.E. Marks, *J. Agric. Food Chem.*, 22, 697 (1974).
63. M.J. Garson, J. Staunton y P.G. Jones, *J. Chem. Soc. Perkin Trans, I*, 1021 (1984).
64. W. Rosenbrook y R.E. Carney, *Tetrahedron Letters*, 1867 (1970).
65. P.W. Brian, P.J. Curtis, H.G. Hemming, C.H. Unwin y J.M. Wright, *Nature*, 164, 534 (1949).
66. J.F. Grove, *J. Chem. Soc.*, 4056 (1952).
67. J.R. Bartels-Keith, *J. Chem. Soc.*, 1662 (1960).
68. W.A. Ayer y J.D.F. Villar, *Can. J. Chem.*, 63, 1161 (1985).
69. M. Miyakado, S. Inove, Y Tanabe, K. Watanabe, N. Ohno, H. Yoshioka y T.J. Mabry, *Chem. Lett.*, 1539 (1982).
70. W.H. Pirkle y J.R. Hauske, *J. Org. Chem.*, 42, 1839 (1977).

71. O. Korver, *Tetrahedron*, 26, 2391 (1970).
72. H.A. Priestap, J.D. Bonafede y E.A. Ruveda, *Phytochemistry*, 16, 1579 (1977).
73. B. O'Connor y G. Just., *Tetrahedron Letters*, 27, 5201 (1986).
74. H. Achenbach, J. Witzke, *Z. Naturforsch B: An. Org. Chem. Org. Chem.*, 35, 1459 (1980).
75. A.J. Birch y D.N. Butler, *J. Chem. Soc.*, 4167 (1964).
76. S. Achmed, T. Hoyer, A. Kjaer, L. Makmur y R. Norrestam, *Acta Chem. Scand. B41*, 599 (1987).
77. A. Alemany, C. Marquez, C. Pascual, S. Valverde, M. Martínez-Ripoll, J. Fayos y A. Perales, *Tetrahedron Letters*, 3583 (1979).
78. A. Alemany, C. Marquez, C. Pascual, S. Valverde, A. Perales, J. Fayos y M. Martínez-Ripoll, *Tetrahedron Letters*, 3579 (1979).
79. G. Delgado, R. Pereda-Miranda y A. Romo de Vivar, *Heterocycles*, 23, 1869 (1985).
80. R. Pereda-Miranda, M. García, y G. Delgado, *Phytochemistry*, 29, 2971 (1990).
81. M.T. Davies-Coleman, R.B. English y D.E.A. Rivett, *Phytochemistry*, 26, 1497 (1987).

82. R. Kazlauskas, P.T. Murphy, R.J. Wells, A.J. Blackman, *Aust. J. Chem.*, **35**, 113 (1982).
83. S.S. Stampwala, R.H. Bunge, T.R. Hurley, N.E. Willmer, A.J. Brankiewicz, C.F. Steinman, T.A. Smitka y J.C. French, *J. Antibiot.*, **36**, 1601 (1983).
84. G.C. Hokanson y J.C. French, *J. Org. Chem.*, **50**, 462 (1985).
85. K. Funaishi, K. Kawamura, Y. Sugiura, N. Nakahori, E. Yoshida, M. Okanishi, I. Umezawa, S. Funayama y K. Komiyama, *J. Antibiot.*, **40**, 778 (1987).
86. F. Bohlmann, J. Jakupovic, A. Schuster, R.M. King y H. Robinson, *Phytochemistry*, **21**, 2317 (1982).
87. F. Bohlmann, J. Jakupovic, A.K. Dhar, R.M., King y H. Robinson, *Phytochemistry*, **20**, 1081 (1981).
88. A.G. Mc Innes, S. Yoshida, G.H.N. Towers, *Tetrahedron*, **21**, 2939 (1965).
89. A. Tse y G.H.N. Towers, *Phytochemistry*, **6**, 149 (1967).
90. A.G. Mc Innes, S. Yoshida y G.H.N. Towers, *Tetrahedron*, **21**, 2939 (1965).
91. F. Balza, A.D. Muir y G.H.N. Towers, *Phytochemistry*, **24** (1985).
92. J.R. Hlubucek y A.V. Robertson, *Aust. J. Chem.*, **20**, 2199 (1967).

93. K. Jewers, J.B. Davis, J. Dougan, A.H. Manchanda, G. Blunden, A. Kyi y S. Wetchapinan. *Phytochemistry*, 11, 2025, (1972).
94. S.K. Talapatra, D. Basu, T. Deb, S. Goswami y B. Talapatra, *Indian J. Chem.* 24B, 29 (1985).
95. S.K. Talapatra, L.N. Dutta y B. Talapatra, *Tetrahedron*, 29, 2811 (1973).
96. T.W. Sam, C. Sew-Yeu, S. Matsjeh, E.K. Gan, D. Razak y A.L. Mohamed, *Tetrahedron Letters*, 28, 2541 (1987).
97. T.R. Govindachari y P.C. Parthasarathy, *Tetrahedron Letters*, 3401 (1971).
98. G.F. Spencer, R.E. England y R.B. Wolf, *Phytochemistry*, 23, 2499 (1984).
99. G. Snatzke y R. Hansel, *Tetrahedron Letters*, 1797 (1968).
100. W.B. Mors, M.T. Magalhaes y O.R. Gottlieb, *Fortschr. Chem. Organ. Naturstoffe*, 20, 131 (1962).
101. H. Achenbach y W. Reggel, *Chem. Ber.*, 106, 2648 (1973).
102. N.C. Franca, O.R. Gottlieb y A.M. Puentes Suarez, *Phytochemistry*, 12, 1182 (1973).
103. L.J. Haynes y E.R.H. Jones, *J. Chem. Soc.*, 954 (1946).
104. S.M. Siegel, *Phytochemistry*, 15, 566 (1976).

105. J.M. Gardener, Y. Kono, J.H. Tatum, Y. Susuki y S. Takeuchi, *Phytochemistry*, 24, 2861 (1985).
106. A.A.E. El-Zayat, R. Nelson, Ferrigni, T.G. Mc Cloud, A.T. Mc Kenzie, S.R. Byrn, J.M. Cassady, Ch. Chang y J.R. Mc Laughlin, *Tetrahedron Letters*, 26, 955 (1985).
107. A. Alkofahi, W.W. Ma, A.T. Mc Kensie, S.R. Byrn y J.L. Mc Laughlin, *J. Nat. Prod.*, 52, 1371 (1989).
108. Z.H. Israili y E.E. Smissman, *J. Org. Chem.* 42, 4070 (1976).
109. M. Martinez, *Flora del Estado de México, Biblioteca Enciclopedia del Estado de México, Tomo II, p. 141 (1979).*
110. B.H. Garcia, *Flora Medicinal de Colombia Botánica Médica, Inst. de Ciencias Naturales de la Universidad de Colombia, Tomo III, p. 15 (1975).*
111. P. Ibarra, "Estudio Químico de una Planta Medicinal Mexicana, Hyptis pectinata. (Lamiaceae)". Tesis Profesional, Facultad de Química, UNAM. México (1990).
112. C.D. Hufford, M.J. Funderburk, J.M. Morgan y L. W. Robertson, *J. Pharm. Sci.*, 64, 789 (1975).
113. A.M. Clark, F.S. El-Ferally y Wen-Shyong Li, *J. Pharm. Sci.*, 70, 951 (1981).
114. W.K. Joklik, H.P. Willett, D.B. Amos, *Zinsser Microbiologia*, 17a. ed. Ed. Panamericana, Buenos Aires, 924 pp. (1983).

115. J.L. Walter, Carbon-Carbon and Carbon-Proton NMR Couplings: Applications to Organic Stereochemistry and Conformational Analysis, Verlag Chemie International, U.S.A., pp. 33-38 (1983).
116. G. Snatzke, Angew. Chem. Intern. Ed. Engl., 7, 14 (1968).
117. A.F. Beecham, Tetrahedron, 28, 5543 (1972).
118. W. Klyne, Progress in Stereochemistry, Ed. Butterwoths, London, pp. 177-184 (1954).
119. D. De Keukeleire y M. Verzele, Tetrahedron, 26, 385 (1970).
120. Rigaudy, J., S.P. Klesney, IUPAC Nomenclature of Organic Chemistry, Sections A-H, Pergamon Press, pp. 171-203 (1979).
121. W.F. Bailey y M. Shih, J. Am. Chem. Soc., 104, 1769 (1982).
122. C.A.G. Haasnoot, F.A.A.M. de Leeuw y C. Altona, Tetrahedron, 36, 2783 (1980).
123. S. Masamune, P. Ma., R.E. Moore, T. Fujiyoshi, C. Jaime y E. Osawa, J. Chem. Soc., Chem. Commun, 261 (1986).
124. H.O. House, Modern Synthetic Reaction, 2a. ed. Ed. Benjamin, Inc. U.S.A. pp. 595-623 (1972).