



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIO QUÍMICO COMPLEMENTARIO DE LAS  
PARTES AERIAS DE LA PLANTA MEDICINAL  
*Verbena carolina* L. (Verbenaceae)**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A:**

**ANA ROSA GARCÍA PÉREZ**



MEXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **JURADO ASIGNADO**

<b>PRESIDENTE:</b>	Dra. María Isabel Aguilar Laurents
<b>VOCAL:</b>	Dr. José Fausto Rivero Cruz
<b>SECRETARIO:</b>	Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz
<b>PRIMER SUPLENTE:</b>	Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano
<b>SEGUNDO SUPLENTE:</b>	M. en C. Abraham Madariaga Mazón

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ LA TESIS:**

Laboratorio 125 del Departamento de Farmacia, conjunto "E", División de Posgrado de la Facultad de Química; UNAM, Ciudad Universitaria.

## **ASESOR**

---

Dra. María Isabel Aguilar Laurents

## **SUSTENTANTE**

---

Ana Rosa García Pérez



## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la oportunidad de pertenecer a la “máxima casa de estudios” y especialmente a la facultad de química por haberme otorgado innumerables conocimientos que me permiten cumplir una más de mis metas y por la oportunidad de tener una formación profesional y poder así forjar un mejor futuro.

Al personal académico de la USAI (Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación), M. en C. Georgina Duarte Lisci, Q. Margarita Guzmán Villanueva, M. en C. Rosa Isela del Villar Morales, QFB Marisela Gutiérrez, Q. Alejandrina Acosta Huerta y Dra. Nuria Esturau por el registro de los espectros para el análisis de espectroscopia.

Al M. en C. Víctor Navarro del Centro de Investigación Biomédica Sur, IMSS por la realización de las pruebas antimicrobianas.

A las M. en C. Margarita Avilés y Macrina Fuentes del Herbario del Instituto Nacional de Antropología e Historia de Morelos. Por la identificación del material vegetal objeto de este estudio (*V. carolina*).

Al Dr. José Fausto Rivero Cruz y a la Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz por sus valiosos comentarios y observaciones durante el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Sobeida Sánchez Nieto por el apoyo técnico para el crecimiento de las bacterias empleadas en esta investigación y la esterilización de los medios de cultivo utilizados.



A mis amigos y compañeros del laboratorio 125 que hicieron mi estancia más agradable y quienes siempre me mostraron su apoyo Dra. Elena Ramírez, Dr. Eugene Bratoeff, Mariana, José, Iván, Paco, Maru, Luis, Fonsi, Gladis. Especialmente a Marcela, Alberto, Dulce, Ileana, Alejandra, Alex y Yazmín por haberme brindado su apoyo incondicional en la realización de este proyecto.

Un agradecimiento muy especial a mi tutora de tesis la Dra. María Isabel Aguilar Laurents, por haberme aceptado en su grupo de trabajo, por brindarme sus conocimientos, paciencia, guía y tiempo durante la realización de esta tesis, agradezco a Dios por haberla puesto en mi camino y permitirme aprender muchas cosas buenas de usted, gracias por todo el apoyo que me otorgo en diversos sentidos, por cada uno de sus consejos y sobre todo por su gran calidad humana en verdad muchas gracias ya que sin su apoyo y compromiso, la realización de este trabajo no habría sido posible

Este trabajo se realizó mediante el apoyo económico otorgado a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT- IN223411.



## DEDICATORIAS

A Dios y la virgen María por estar siempre a mi lado por permitirme llegar a este momento y por ayudarme a superar todas las dificultades que se me han presentado, por darme la oportunidad de concluir esta etapa de mi vida y ayudarme hacer realidad mis sueños.

A mis padres Arnulfo y Edith por todo el amor que han dado, comprensión apoyo, dedicación, tiempo y sobre todo por la paciencia que me han tenido, ya que sin ustedes todo esto no hubiera sido posible, gracias por ayudarme a realizar uno más de mis sueños y por todas esas platicas y consejos que me ayudaron a levantarme y me impulsaron a seguir adelante, gracias por confiar en mí y por escucharme siempre, todo lo que soy se los debo a ustedes. Los amo.

A mis hermanitos Donovan, Julio, Noemí y Elizabeth por estar siempre conmigo, escucharme, hacerme reír y darme ánimos cuando más lo necesito, ustedes son además de mis mejores amigos, el motor que me impulsa a seguir adelante gracias por todos los momentos mágicos e inolvidables que hemos vivido los quiero mucho.

A Javier por el apoyo, cariño, amor, complicidad, consejos y por los días enteros en la escuela llenos de recuerdos inolvidables.

A mis compañeros y amigos Amany, Gabriela Camacho. Sandy Bell, Carmen, Luis, Mónica, Rene, Janeth, Víctor, Juanito, Mar, Xóchitl, Estela, Jessica, Alicia, Karla, José Alberto, gracias por compartir sus sueños conmigo sin ustedes la estancia en la facultad no hubiera sido lo mismo, y un agradecimiento muy especial a mis amiguitas Gabriela García y Fabiola Patiño gracias por los días interminables de estudio en la biblioteca pero sobre todo por su amistad las quiero amigas.



<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>IV</b>
<b>LISTA DE ESPECTROS.....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE TABLAS.....</b>	<b>IX</b>
<b>LISTA DE ESQUEMAS.....</b>	<b>IX</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES .....</b>	<b>4</b>
2.1 <i>Verbena carolina L.</i> .....	4
2.1.1 Familia Verbenaceae .....	4
2.2 Género <i>Verbena</i> .....	4
2.2.1 Distribución y hábitat.....	5
2.2.2 Composición química.....	6
2.3 CARACTERÍSTICAS DE LA ESPECIE VEGETAL <i>Verbena carolina L.</i> .....	9
2.3.1 Clasificación botánica .....	9
2.3.2 Nombres comunes.....	9
2.3.3 Sinonimia botánica .....	10
2.3.4 Usos.....	10
2.3.5 Descripción .....	10
2.4 IRIDOIDES .....	11
2.4.1 Naturaleza química de los iridoides .....	11
2.4.2 Clasificación de los iridoides.....	14
2.4.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE IRIDOIDES.....	18
2.4.3.1 Actividad antitumoral.....	18
2.4.3.2 Actividad antiinflamatoria .....	19
2.4.3.3 Actividad antibacteriana.....	19
2.4.3.4 Actividad antimicrobiana contra <i>Streptococcus mutans</i> .....	20
2.5 CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES POR EL MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEU .....	20



<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>21</b>
3.1 Objetivo principal.....	21
3.2 Objetivos particulares.....	21
<b>4. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>22</b>
4.1 Material y equipo utilizado.....	22
4.2 Recolección e identificación del material vegetal.....	23
4.3 Extracción .....	23
4.4 Fraccionamiento cromatográfico y por partición.....	25
4.5 Reacción general de acetilación .....	26
4.6 Aislamiento e identificación de verbenalina <b>(1)</b> .....	26
4.7 Aislamiento e identificación de verbascósido <b>(2)</b> .....	26
4.8 Aislamiento e identificación de hastatósido <b>(3)</b> .....	27
4.9 Aislamiento e identificación del 7-O- $\alpha$ -D-glucuronopiranosido de 5-hidroxi- 6,4'-dimetoxiflavona <b>(4)</b> .....	29
4.10 Determinación de actividad antimicrobiana contra bacterias cariogénicas	29
4.10.1 Preparación de las muestras .....	29
4.10.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria.....	30
4.10.3 Procedimiento general del ensayo.....	30
4.11 Obtención del aceite esencial. ....	32
4.12 Determinación de fenoles totales. ....	32
4.13 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los compuestos obtenidos ..	33
4.13.1 Microorganismos utilizados.....	33
4.13.2 Preparación de las muestras .....	33
4.13.3 Preparación del inóculo .....	33
4.13.4 Bioensayo .....	34
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>35</b>
5.1 Determinación de actividad antimicrobiana contra bacterias cariogénicas ..	35
5.2 Cuantificación de fenoles totales.....	36
5.3 Aislamiento e identificación de verbenalina <b>(1)</b> .....	36
5.4 Obtención de peracetil verbenalina.....	37





5.5 Aislamiento e identificación de verbascósido <b>(2)</b> .....	38
5.6 Aislamiento e identificación de hastatósido <b>(3)</b> .....	39
5.7 Aislamiento e identificación de 7-O- $\alpha$ -D-glucuronopiranosido de 5-hidroxi-6,4'- dimetoxiflavona <b>(4)</b> .....	40
5.8 Obtención del aceite esencial. ....	44
5.9 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los compuestos obtenidos ....	53
5.9.1 Determinación de la actividad antimicrobiana por medio del análisis de la concentración mínima inhibitoria (CMI, $\mu\text{g/mL}$ ).....	53
<b>6. CONCLUSIONES</b> .....	<b>55</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>56</b>

**LISTA DE ABREVIATURAS**

<b>ABREVIATURA</b>	<b>SIGNIFICADO</b>
<b>AcOEt</b>	Acetato de etilo
<b>CCA</b>	Cromatografía en columna abierta
<b>CCF</b>	Cromatografía en capa fina
<b>CCFP</b>	Cromatografía en capa fina preparativa
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	Cloroformo deuterado
<b>CMI</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>C</b>	Carbono
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	Cloroformo
<b>cm</b>	Centímetros
<b>CG</b>	Cromatografía de gases
<b>J</b>	Constante de acoplamiento
<b>δ</b>	Desplazamiento químico
<b>d</b>	Doblete
<b>dd</b>	Doble de dobles
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido
<b>dm</b>	Doblete multipleteado
<b>HMBC</b>	Espectroscopía Bidimensional de Correlación Heteronuclear de Múltiples ligaduras
<b>COSY</b>	Espectroscopia Bidimensional de Correlación Homonuclear
<b>NOESY</b>	Espectroscopia Bidimensional incrementada por el Efecto Nuclear Overhauser
<b>EM</b>	Espectroscopía de Masas
<b>R.f.</b>	Factor de retención
<b>v<sub>max</sub></b>	Frecuencia máxima



<b>ABREVIATURA</b>	<b>SIGNIFICADO</b>
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>g</b>	Gramos
<b>Hz</b>	Hertz
<b>Hex</b>	Hexano
<b>H</b>	hidrogeno
<b>OH</b>	hidroxilo
<b>Hrs</b>	horas
<b>IE</b>	Impacto electrónico
<b>IR</b>	Infrarrojo
<b>L</b>	Litros
<b>m</b>	multiplete
<b>MHz</b>	Megahertz
<b>MeOH</b>	Metanol
<b>CD<sub>3</sub>OD</b>	Metanol deuterado
<b>µg</b>	Microgramos
<b>µL</b>	Microlitros
<b>mg</b>	Miligramos
<b>mL</b>	Mililitros
<b>mm</b>	Milímetros



ABREVIATURA	SIGNIFICADO
Min	Minutos
Nm	Nanómetros
Op cit.	Obra citada
OMS	Organización Mundial de la Salud
Ppm	Partes por millón
%	Por ciento
RA	Reactivo Analítico
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN- <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear protónica
RMN- <sup>13</sup> C	Resonancia magnética nuclear de carbono trece
S	Singulete
(NH <sub>4</sub> ) <sub>4</sub> Ce(SO <sub>4</sub> ) <sub>4</sub>	Sulfato cérico amoniacal
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato de sodio
SSA	Secretaría de Salud
TMS	Tetrametilsilano
T	Triplet
UV	Espectroscopía en el ultravioleta
UMAS	Unidades de masa atómica
UFC	Unidades formadoras de colonias
<i>et al</i>	Y otros, entre otros

**Índice de espectros**

<b>Espectro 1.</b> Espectro en el IR de la verbenalina (1).....	65
<b>Espectro 2.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la verbenalina (1).....	66
<b>Espectro 3.</b> Espectro en el UV del derivado peracetilado de la verbenalina.....	67
<b>Espectro 4.</b> Espectro en el IR del derivado peracetilado de la verbenalina.....	68
<b>Espectro 5.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del derivado peracetilado de la verbenalina.....	69
<b>Espectro 6.</b> Espectro en el UV del verbascósido (2).....	70
<b>Espectro 7.</b> Espectro en el IR del verbascósido (2).....	71
<b>Espectro 8.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del verbascósido (2).....	72
<b>Espectro 9.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del hastatósido (3).....	73
<b>Espectro 10.</b> Espectro en el UV del 7-O- $\alpha$ -D-glucuronopiranosido de la 5-hidroxi-6,4'-dimetoxiflavona (4).....	74
<b>Espectro 11.</b> Espectro en el IR del 7-O- $\alpha$ -D-glucuronopiranosido de la 5-hidroxi-6,4'-dimetoxiflavona (4).....	75
<b>Espectro 12.</b> Espectro de RMN- <sup>1</sup> H del 7-O- $\alpha$ -D-glucuronopiranosido de la 5-hidroxi-6,4'-dimetoxiflavona (4).....	76
<b>Espectro 13.</b> Espectro de RMN- <sup>13</sup> C del 7-O- $\alpha$ -D-glucuronopiranosido de la 5-hidroxi-6,4'-dimetoxiflavona (4).....	77
<b>Espectro 14.</b> Espectro de HMBC del 7-O- $\alpha$ -D-glucuronopiranosido de la 5-hidroxi-6,4'-dimetoxiflavona (4).....	78
<b>Espectro 15.</b> Espectro de COSY del 7-O- $\alpha$ -D-glucuronopiranosido de la 5-hidroxi-6,4'-dimetoxiflavona (4).....	79
<b>Espectro 16.</b> Espectro de Masas modalidad FAB <sup>+</sup> de la 7-O- $\alpha$ -D-glucuronopiranosido de la 5-hidroxi-6,4'-dimetoxiflavona (4).....	80



---

**Índice de figuras**

<b>Figura 1.</b> Zonas de crecimiento de <i>V. carolina</i> .....	5
<b>Figura 2.</b> Metabolitos secundarios mayoritarios del género <i>Verbena</i> .....	6
<b>Figura 3.</b> <i>Verbena carolina</i> L.(Verbenaceae).....	11
<b>Figura 4.</b> Esqueleto iridiano.....	11
<b>Figura 5.</b> Sistema de numeración para los compuestos de tipo iridoide.....	12
<b>Figura 6.</b> Numeración del esqueleto iridoide y sustituyentes más comunes.....	13
<b>Figura 7.</b> Iridoides presentes en diversas plantas medicinales.....	13
<b>Figura 8.</b> Distribución de los canales en la placa Sarstedt de 96 pozos.....	31
<b>Figura 9.</b> Estructura de la verbenalina (1).....	36
<b>Figura 10.</b> Estructura del verbascósido (2).....	38
<b>Figura 11.</b> Estructura del hastatósido (3).....	40
<b>Figura 12.</b> 7-O- $\alpha$ -D-glucuronopiranosido de la 5-hidroxi-6,4'-dimetoxiflavona.....	42
<b>Figura 13.</b> 6-O- $\alpha$ -D-glucuronopiranosido de la 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona.....	43
<b>Figura 14.</b> 7-O- $\alpha$ -D-glucuronopiranosido de la 5-hidroxi-8,4'-dimetoxiflavona.....	43



### Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Clasificación botánica de <i>Verbena carolina</i> L.....	09
<b>Tabla 2.</b> Clasificación de los iridoides con base en su estructura.....	14
<b>Tabla 3.</b> Ejemplos representativos de iridoides.....	15
<b>Tabla 4.</b> Fraccionamiento cromatográfico del extracto <i>n</i> -butanólico.....	25
<b>Tabla 5.</b> Fraccionamiento cromatográfico de la fracción primaria III.....	28
<b>Tabla 6.</b> Resultados de CMI.....	35
<b>Tabla 7.</b> Constantes espectroscópicas del compuesto <b>(4)</b> .....	44
<b>Tabla 8.</b> Composición química del aceite esencial de <i>V. carolina</i> (fresca).....	46
<b>Tabla 9.</b> Composición química del aceite esencial de <i>V. carolina</i> (seca).....	49
<b>Tabla 10.</b> Evaluación de la CMI de los compuestos puros.....	53

### Índice de esquemas

<b>Esquema 1.</b> Procesamiento de hojas y tallos de <i>Verbena carolina</i> L.....	24
---	----



## 1. INTRODUCCIÓN

El ser humano desde su origen ha procurado su bienestar y una gran parte lo ha encontrado en recursos de la naturaleza. El estudio científico y el uso adecuado de las sustancias de origen natural con fines terapéuticos son sin duda tan antiguos como la astronomía, la física y la medicina. No obstante, muchos de esos conocimientos estuvieron envueltos en un ambiente mágico-religioso que fueron pasando verbalmente generación tras generación hasta consolidarse como una materia de estudio con la finalidad de mantener el bienestar del ser humano y obtener materias primas naturales que le proporcionarán una mejor calidad de vida.<sup>1,2</sup>

Así, diferentes civilizaciones dieron muestra de un profundo conocimiento en el uso y manejo de los recursos naturales para su beneficio, lo cual se puede percibir en registros procedentes de culturas de Asia, África, Europa y América, entre otras. Desde tiempos remotos, las culturas establecidas sabían la importancia que tenía el conocer profundamente las propiedades alimenticias, curativas y tóxicas de las plantas y animales que los rodeaban.

Por ejemplo, en Asia, los ideogramas sumerios, datados aproximadamente 2500 años a.C., mencionan ya varias “medicinas” de origen vegetal. Los formularios terapéuticos mesopotámicos son conocidos en la actualidad gracias a las tablillas en escritura cuneiforme con listas de drogas cuidadosamente redactadas en tiempos de los sumerios. Estos formularios reunían aproximadamente unas 250 plantas, 120 sustancias minerales y 180 remedios.<sup>3</sup>

La cultura china tuvo gran auge en el estudio de las plantas, animales y minerales con fines terapéuticos. Esos conocimientos fueron plasmados en compendios de los cuales el más importante es el llamado *Pen tsao kang-mou* escrito en el año 2697 a.C durante el reinado del emperador Shen Nung. En él se describen aproximadamente 8160 formulaciones medicinales.<sup>4</sup>





Por otro lado, la medicina hindú antigua también se basó principalmente en el uso de las plantas. Los hindúes tenían un gran progreso en cuanto a cirugía se refiere, por ello algunas de las plantas que utilizaban poseían propiedades anestésicas. De hecho, desarrollaron más de cien instrumentos quirúrgicos. Según los reportes de De Mora y Jarocka (2002)<sup>5</sup>, nunca existió el problema de carencia, como en Occidente, ya que se utilizaban drogas que dejaban insensible (o inconsciente) al paciente, y había otras para ayudar a retornar a la conciencia.

Las grandes aportaciones en medicina y farmacia del continente africano nacen principalmente en el antiguo Egipto, cultura cuyo florecimiento se dió a lo largo del río Nilo y de los desiertos cercanos. Los egipcios clasificaron a aquellas plantas y animales que tenían el poder de curar, enfermar o matar. Parte de esos conocimientos quedaron plasmados en grandes compendios que en la actualidad conocemos como papiros. Uno de los papiros más famosos es el de *Ebers* (1550 a.C.) en el cual se describen más de 1000 recetas para tratar diversas enfermedades.<sup>5</sup>

La diversidad biológica y cultural de América fueron elementos que admiraron los europeos desde su llegada al continente, ya que constituyeron una verdadera explosión de nuevas posibilidades económicas y/o terapéuticas. Como resultado de lo anterior, en 1552 aparece un códice escrito en latín llamado *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*, cuya importancia no sólo radica en el vasto contenido herbolario, sino en su carácter artístico al estar ilustrado con dibujos de plantas medicinales a color (mediante pigmentos vegetales y animales), sus nombres en náhuatl, la descripción de sus efectos y su aplicación. La versión en latín fue hecha por el traductor xochimilca Juan Badiano, sobre la información proporcionada por el médico tlaltelolca Martín de la Cruz sobre el uso medicinal de una gran cantidad de especies vegetales. En la actualidad se le conoce a dicho documento como el Códice Badiano-De la Cruz.<sup>6</sup>



Actualmente, las plantas medicinales son usadas con diferentes propósitos tanto en países en vías de desarrollo como en países desarrollados; en algunos casos como remedios caseros, como material de venta libre o como materia prima en la industria farmacéutica. En el mercado mundial, estos medicamentos representan una proporción importante (WHO, 2000).<sup>7</sup> Según la OMS, alrededor del 80% de la población mundial utiliza la medicina tradicional para atender las necesidades primarias de asistencia médica, y existe una marcada tendencia a lo natural lo cual afecta el uso de los recursos vegetales como terapia alternativa para una infinidad de dolencias.<sup>8</sup>

El contar con una amplia variedad de plantas medicinales crea la necesidad de investigar sobre la medicina tradicional para garantizar su aprovechamiento y uso adecuado con base en estudios científicos.



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 *Verbena carolina* L.

#### 2.1.1 Familia verbenaceae

Rzedowski y Rzedowski en sus trabajos sobre la flora mexicana, describen a la familia Verbenaceae como un grupo de taxonomía sumamente complicada, en donde la circunscripción, tanto en la propia familia, como de muchos de sus géneros y especies es incierta. Siguiendo el criterio moderno, aceptado en el trabajo de Thorne, la familia queda formada por unos 35 géneros y poco más de 100 especies distribuidas en regiones templadas y cálidas de ambos hemisferios, principalmente en América.<sup>9</sup>

### 2.2 Género *Verbena*

El género *Verbena* L. (Verbenaceae) fue descritos por Linnaeus (1753) abarcando 14 especies, de las cuales 6 actualmente pertenecen a *Verbena* (*V. bonariensis*, *V. hastata*, *V. officinalis*, *V. spuria*, *V. supina* y *V. urticaefolia*); las restantes fueron re-clasificadas en otros géneros. Comprende hierbas o sufrútices, algunas de ellas importantes como ornamentales y otras como malezas. *Verbena* se distribuye principalmente en América, de donde el género es originario (Lewis y Oliver, 1961). Varias de las especies poseen distribución cosmopolita, como *V. rigida* Spreng., *V. litoralis* Kunth y *V. bonariensis* L. El género *Verbena* L. se ha dividido tradicionalmente en secciones, series o en grupos informales principalmente sobre la base de sus características morfológicas, anatómicas y distribución geográfica. O'Leary y colaboradores reconocen para el género *Verbena* 45 especies y 10 variedades, agrupadas en 2 series: *Verbena* y *Pachystachyae*; la primera integrada por tres grupos informales: *Verbena*, *Hastae* y *Bracteosae* y la segunda por dos subseries: *Pachystachyae* y *Pseudoracemosae*. Estudios filogenéticos previos indican que *Verbena* es monofilética y su grupo hermano es *Glanduria*.<sup>10</sup>



Hasta el momento, los trabajos sobre el género *Verbena* distan de clarificar las complejas relaciones dentro del género y únicamente se cuenta con estudios a nivel regional o catálogos.<sup>11</sup>

### 2.2.1 Distribución y hábitat

El género *Verbena* de origen americano, actualmente se extiende por América tropical y templada, norte de África, Asia, Europa y Australia; crece desde el nivel del mar hasta casi 4000 m.s.n.m., en la región andina de Ecuador, Bolivia y Perú. Existen tres centros de diversidad específica, uno en zonas templado-cálidas del noreste Argentino y del sur de Brasil, taxones principalmente pertenecientes a la serie *Pachystachyae*; el segundo en el sudoeste de los Estados Unidos de América y norte de México, con algunas especies en la zona Pacífica y montañosa; el tercero en la zona templada del este de Estados Unidos de América y sur de Canadá; estos dos últimos centros representados principalmente por taxones pertenecientes a la serie *Verbena*.<sup>11</sup> En la **Figura 1** se muestran algunas zonas de crecimiento de *V. carolina* y *V. ehrenbergiana* en la República Mexicana.

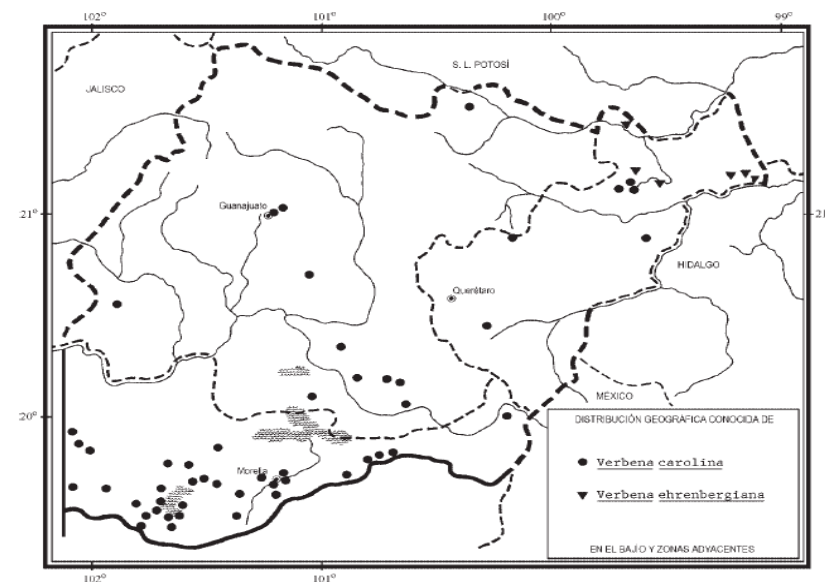
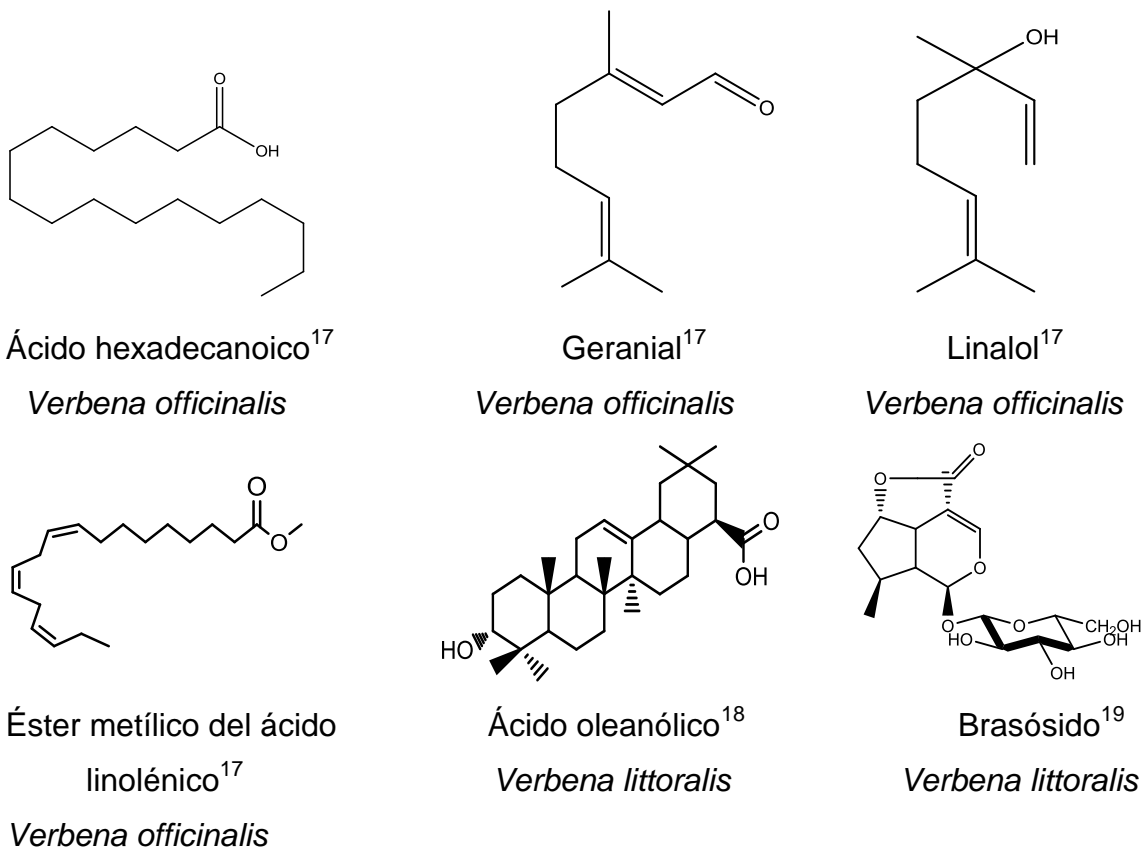


Figura 1. Zonas de crecimiento de *V. carolina*.



### 2.2.2 Composición química

El género *Verbena* biosintetiza diversos tipos de compuestos, como son: algunos derivados glicosilados de iridoides, feniletanoides, flavonoides, triterpenos, esteroides, etc. (**Figura 2**). Dentro de las actividades farmacológicas mencionadas en la literatura para algunos de estos metabolitos o para extractos de *Verbena*, se encuentran reportados los efectos analgésicos, antiinflamatorios<sup>12</sup> hepatoprotectores<sup>13</sup>, antioxidantes<sup>14</sup>, antimicrobianos<sup>15</sup>, así como la actividad promotora del sueño.<sup>16</sup>



**Figura 2.** Metabolitos secundarios mayoritarios del género *Verbena*

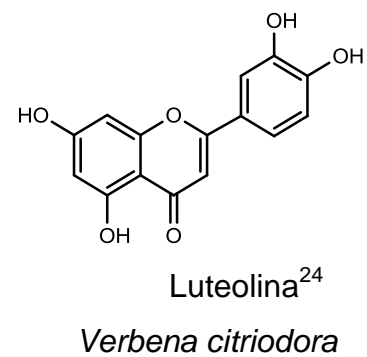
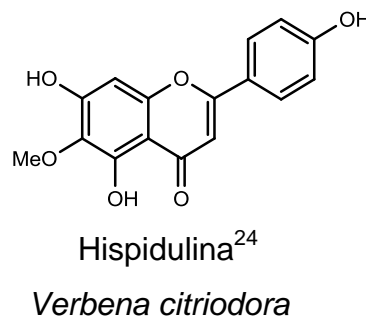
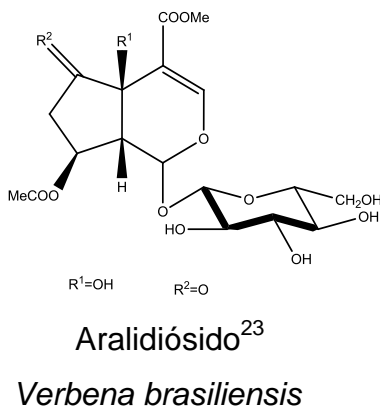
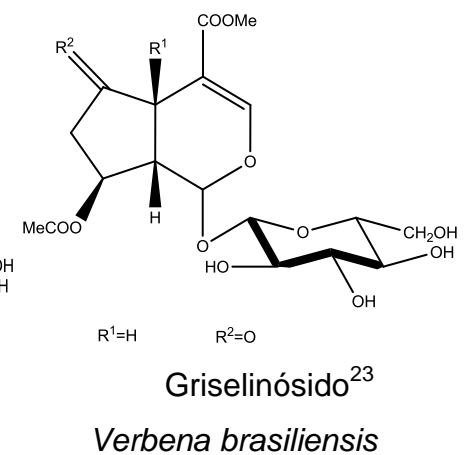
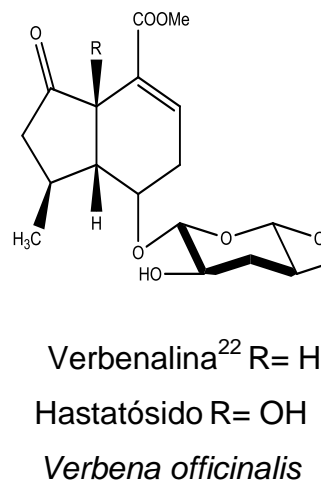
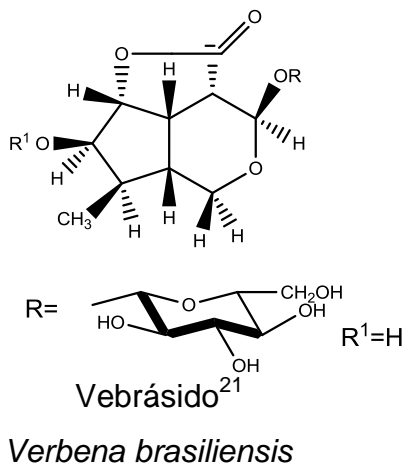
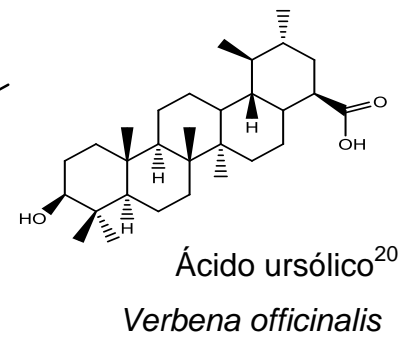
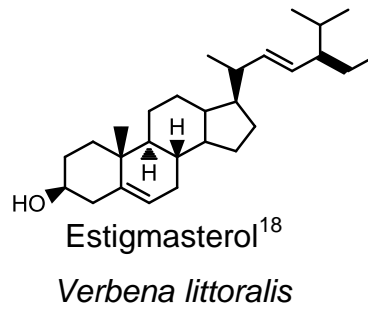
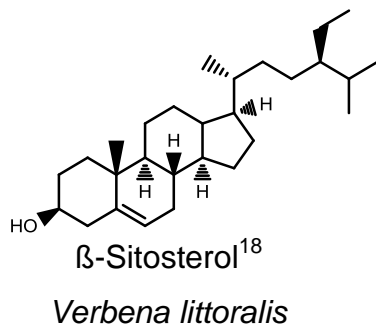
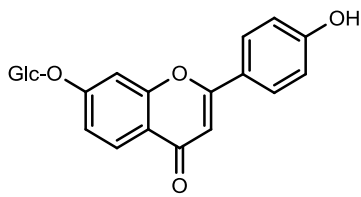
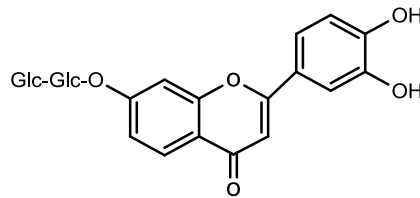


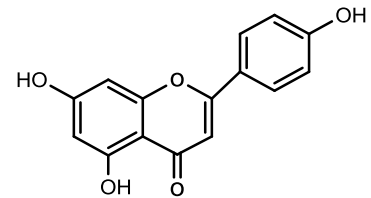
Figura 2. Metabolitos secundarios mayoritarios del género *Verbena*



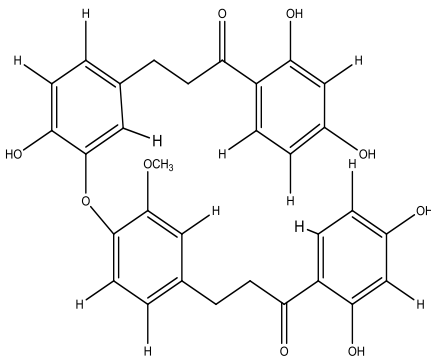
7-glucurónido de la apigenina<sup>25</sup>  
*Verbena officinalis*



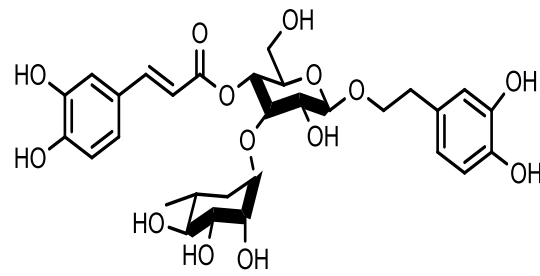
7-glucurónido de la luteolina<sup>25</sup>  
*Verbena officinalis*



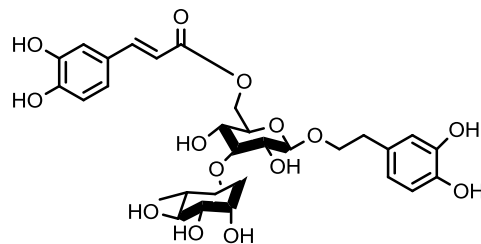
Apigenina<sup>26</sup>  
*Verbena officinalis*



Verbenachalcona<sup>27</sup>  
*Verbena littoralis*



Verbascósido<sup>20</sup>  
*Verbena officinalis*



Isoverbascósido<sup>28</sup>  
*Verbena officinalis*

**Figura 2.** Metabolitos secundarios mayoritarios del género *Verbena* (continuación)



## 2.3 Características botánicas de la especie vegetal *Verbena carolina* L.

### 2.3.1 Clasificación botánica

En la **Tabla 1** se enlista la clasificación botánica obtenida de *Integrated Taxonomic Information System* disponible en <http://www.itis.gov/>.<sup>29</sup>

**Tabla 1.** Clasificación botánica de *Verbena carolina* L.

Clasificación botánica
<b>Reino:</b> Plantae
<b>División:</b> Magnoliophyta
<b>Clase:</b> Magnoliopsida
<b>Orden:</b> Lamiales
<b>Familia:</b> Verbenaceae
<b>Género:</b> Verbena
<b>Especie:</b> <i>Verbena carolina</i> L.



### 2.3.2 Nombres comunes<sup>30</sup>

Nombres comunes
Ajenjo grande
Verbena
Chilillo
Chino
Hierba de San José
Hierba de San Juan
Hierba lengua de perro
Nardo de campo
Poleo negro
San Juan Shihuitl
Verbena corriente





### 2.3.3 Sinonimia botánica<sup>31</sup>

#### **Sinonimia botánica**

<i>Verbena caroliniana</i>	<b>Willd.</b>
<i>Verbena biserrata</i>	<b>Kunth</b>
<i>Verbena polystachya</i>	<b>Kunth</b>
<i>Verbena mollis</i>	<b>Mart. &amp; Galeotti,</b>
<i>Verbena veronicaefolia</i>	<b>Kunth</b>

### 2.3.4 Usos

En los estados de Aguascalientes, Chiapas, Guerrero, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Puebla y Veracruz se indica en padecimientos de tipo digestivo como vómito, diarrea, calor de estómago, disentería, granos en la boca (tipo aftas), además de emplearse como purgante.<sup>33</sup>

La decocción de las ramas se usa contra la irritación del hígado, dolor de la vesícula, enfermedades renales y como cicatrizante de granos y heridas.

En uso externo la verbena suele emplearse en baños de asiento, un manojo de la planta se hierve y con ésta decocción se efectúa el tratamiento. El mismo preparado, pero en forma de lavados, se emplea para aliviar las punzadas de la cabeza, evitar la caída de pelo, caspa, orzuela, salpullido, golpes, infecciones de la piel y contra los piojos.<sup>30</sup> Para curar los granos y heridas se prepara una infusión con la raíz y con el líquido se lava diariamente la parte afectada.

También se utiliza en diversos padecimientos renales: inflamación de los riñones, para disolver piedras en la vejiga, como diurético y cuando hay problemas hepáticos como “secreción del hígado”.<sup>31</sup>

### 2.3.5 Descripción<sup>9</sup>

*Verbena carolina* L. (**Figura 3**) es una planta herbácea perenne, erecta o ascendente, de hasta 75 cm (1.5 m) de alto; tallo por lo general solitario, ramificado, con pelos comúnmente de menos de 1 mm de largo; hojas opuestas, subsésiles, o bien, con peciolos, oblongas, oblongo-lanceoladas o algunas veces



elípticas, de entre 2.7 y 12 cm de longitud por 0.8 a 3 cm de ancho, ápice agudo u obtuso, serrada en el margen, cuneada en la base, con pelos concentrados a lo largo de las nervaduras. Sus flores se disponen en espigas de color morado.

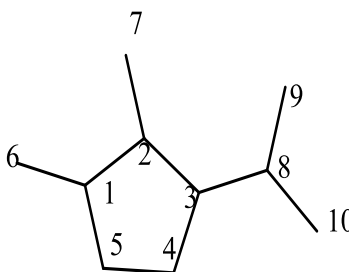


**Figura 3.** *Verbena carolina* L. (Verbenaceae)

## 2.4 IRIDOIDES

### 2.4.1 Naturaleza química de los iridooides

Los iridooides son monoterpenos cíclicos que contienen un esqueleto de 1,2-dimetil-3-isopropilciclopentano, **(Figura 4)**. Se han encontrado como constituyentes naturales en un gran número de familias de plantas, regularmente pero no invariablemente, como glicósidos<sup>35</sup>

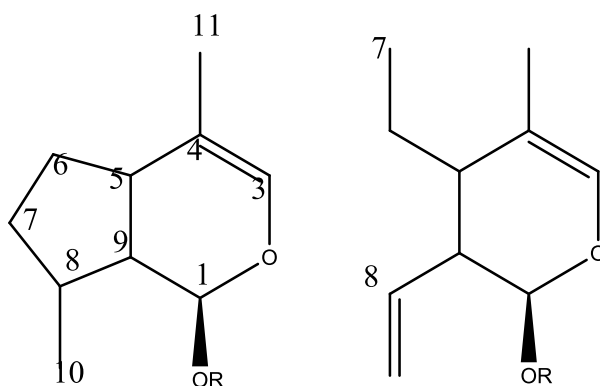


**Figura 4.** Esqueleto de tipo iridano



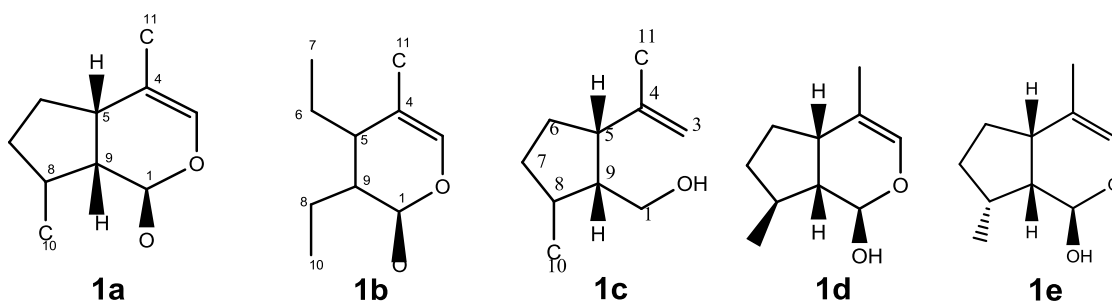
El nombre iridoide se debe a que los primeros compuestos con este esqueleto fueron aislados de la secreción de hormigas pertenecientes al género *Iridomyrmex* las cuales biosintetizan a la iridomirmecina y el iridodial (**1d**) que se encuentran en sus secreciones defensivas.<sup>36</sup>

Los iridoideos representan un gran grupo de ciclopentano-[c]-pirano monoterpenoides.



**Figura 5.** Sistema de numeración para los compuestos de tipo iridoide

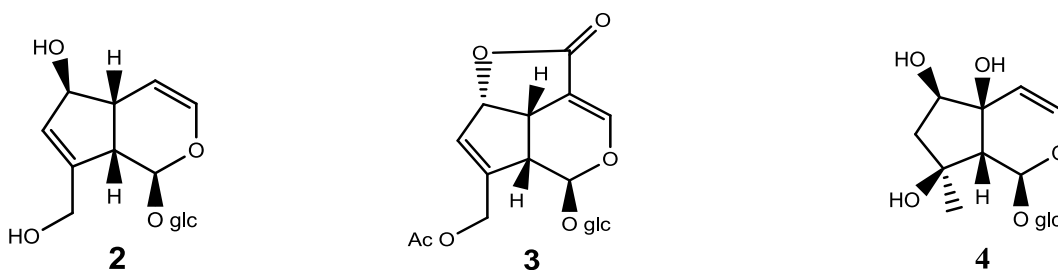
El esqueleto de ciclopentano-[c]-pirano puede consistir de diez, nueve o raramente ocho átomos de carbono, en el cual el C<sub>11</sub> se pierde con más facilidad que el C<sub>10</sub>.<sup>37</sup> (**Figura 5**). Un bicyclo H-5/H-9 $\beta$ ,  $\beta$ -*cis*-fusionado del sistema del anillo ciclopentanopirano **1a** es la característica más común de estos compuestos, sin embargo, varios iridoideos enantioméricos también existen en la naturaleza. La escisión en el anillo de ciclopentano de los iridoideos da lugar a los seco-iridoideos **1b**, mientras que la escisión en el anillo de pirano produce iridoideos derivados de tipo **1c**, por lo tanto, el anillo de ciclopentano es el anillo base del esqueleto de estos compuestos. En el reino vegetal, estos se derivan del 9-hidroxineroil mediante una fosforilación seguida de una ciclización, oxidación y glicosilación en varios pasos. Posiblemente el iridodial o el 8-*epi*-iridodial **1e** son los precursores de los iridoideos en muchas familias de plantas (**Figura 6**).<sup>38</sup>



**Figura 6.** Numeración del esqueleto iridoide y sus derivados más comunes

Los iridoideos están presentes en diversas plantas medicinales utilizadas como tónicos amargos, sedantes, antipiréticos, medicamentos para la tos, remedios contra algunas heridas, trastornos de la piel y como hipotensores. Estudios farmacológicos revelan que estos compuestos presentan una amplia gama de actividades de tipo: cardiovasculares, antihepatotóxicas, coleréticas, hipoglicémicas e hipolipidémicas, antiinflamatorias, antiespasmódicas, antitumorales, antivirales, inmunomoduladoras y purgantes.

Quimiotaxonómicamente son 'útiles marcadores químicos de diversos géneros en varias familias de plantas como la aucubina (**2**) del *Plantago* (Plantaginaceae), asperulósido (**3**) de *Galium* (Rubiaceae) y aucubósido (aucubina) y harpágido (**4**) de *Scrophularia* (Scrophulariaceae) (**Figura 7**).<sup>38</sup>



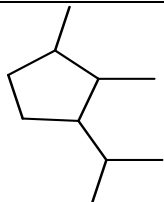
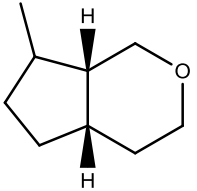
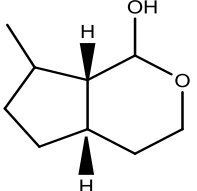
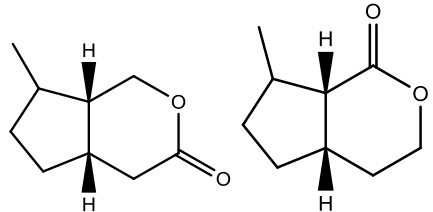
**Figura 7.** Iridoides marcadores presentes en diversas plantas medicinales



## 2.4.2 Clasificación de los Iridoides

Los primeros ejemplos de estos monoterpenos de tipo ciclopentano fueron aislados hace casi cinco décadas y constituyen una amplia clase de compuestos naturales con aproximadamente 1200 miembros que se clasifican de acuerdo a su estructura química en diversos grupos (**Tabla 2**).<sup>39</sup>

**Tabla 2.** Clasificación de iridoides con base a su estructura

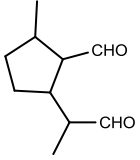
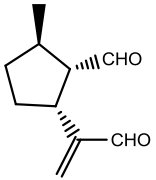
Estructura	Clasificación
 <b>A</b>	Ciclopentano
 <b>B</b>	Ciclopentano <i>cis</i> -fusionado a un anillo de pirano
 <b>C</b>	Ciclopentano <i>cis</i> -fusionado a un $\delta$ -lactol
 <b>Da</b> <b>Db</b>	Ciclopentano <i>cis</i> -fusionado a una $\delta$ -lactona



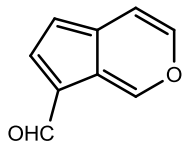
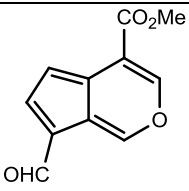
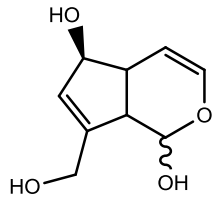
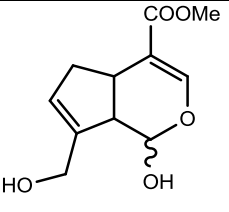
De todos ellos, el grupo más abundante es el que presenta el anillo de ciclopentano *cis* fusionado a una  $\delta$ -lactona, y estos compuestos son comúnmente denominados como ciclopentapiranonas. Dependiendo de la orientación del anillo de *cis*-lactona con respecto al anillo de ciclopentano se pueden subdividir en dos subgrupos (**Da** y **Db**). El subgrupo **Da**, está formado por aquellos iridoides que presentan el grupo carbonilo de la lactona en la posición 3, mientras que en el **Db** se encuentran aquellos iridoides en donde el grupo carbonilo se ubica en la posición 1.<sup>39</sup>

Algunos ejemplos representativos de iridoides pertenecientes a los diferentes grupos mencionados se resumen en la **Tabla 3**.

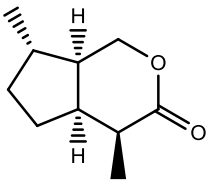
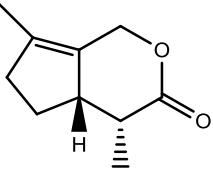
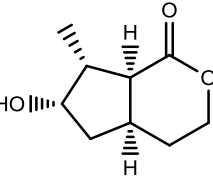
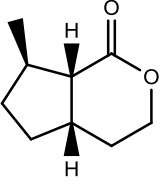
**Tabla 3.** Ejemplos representativos de iridoides.

Estructura	Especie	Referencia
<b>Tipo A</b>		
 Iridoidal <sup>40</sup>	<i>Iridomyrmex</i>	Meinwald <i>et al.</i> , 1977
 Dolicodial <sup>41</sup>	<i>Teucrium marum</i>	Pagnoni <i>et al.</i> , 1976

**Tabla 3.** Ejemplos representativos de iridooides (continuación).

Estructura	Especie	Referencia
<b>Tipo B</b>		
 <p>Norviburtinal<sup>42</sup></p>	<i>Kigelia pinnata</i>	Joshi <i>et al.</i> , 1982
 <p>Cerbinal<sup>43</sup></p>	<i>Cerbera manghas</i> <i>Gardenia jasminoides</i>	Abe <i>et al.</i> ; 1977.
<b>Tipo C</b>		
 <p>Aucubigenina<sup>44</sup></p>	<i>Aucuba japonica</i>	Bartholomaeus <i>et al.</i> ; 1995
 <p>Genipina<sup>45</sup></p>	<i>Gardenia fructus</i>	Yamazak <i>et al.</i> ; 2005

**Tabla 3.** Ejemplos representativos de iridoideas (continuación).

Estructura	Especie	Referencia
<b>Tipo Da</b>		
 Iridomirmecina <sup>46</sup>	<i>Iridomyrmex humilis</i> Mayr	Cavill <i>et al.</i> ; <b>1956</b>
 Deshidroiridomirmecina <sup>47</sup>	<i>Actinidia poligama</i> Miq.	Morota <i>et al.</i> ; <b>1989</b>
<b>Tipo Db</b>		
 Booneina <sup>48</sup>	<i>Alstoina boonei</i>	Marini-Bettolo <i>et al.</i> ; <b>1983</b>
 Mitsugashiwalactona <sup>49</sup>	<i>Boschniakia rossica</i>	Sakan <i>et al.</i> , <b>1969</b>

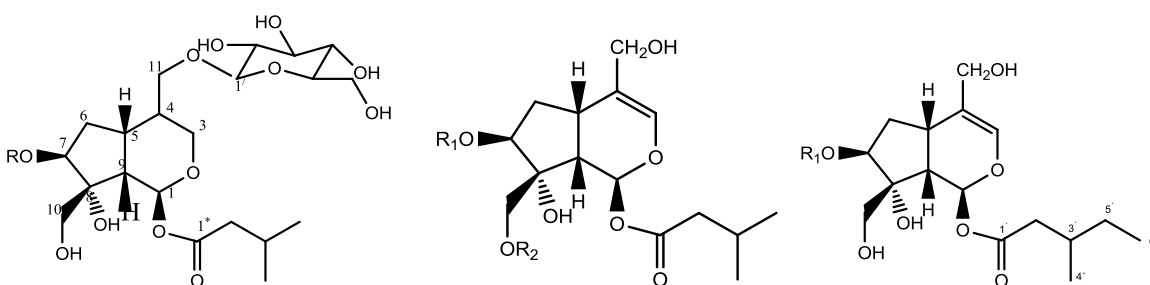




## 2.4.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS IRIDOIDES

### 2.4.3.1 Actividad antitumoral

Los iridooides **I**, **II**, **III**, **IV**, **V**, **VI** y **VII** aislados del extracto metanólico de las hojas de *Viburnum luzonicum* Rolfe,<sup>50</sup> han presentado una actividad citotóxica importante contra células HeLa S3 (línea celular epitelial humana) con valores de  $CI_{50}$  comprendidos entre 3 y 7  $\mu$ M.



**I** R= (*E*)-*p* cumaroílo

**II** R= (*Z*)-*p* cumaroílo

**III** R<sub>1</sub>= (*E*)-*p*-cumaroílo, R<sub>2</sub>=H

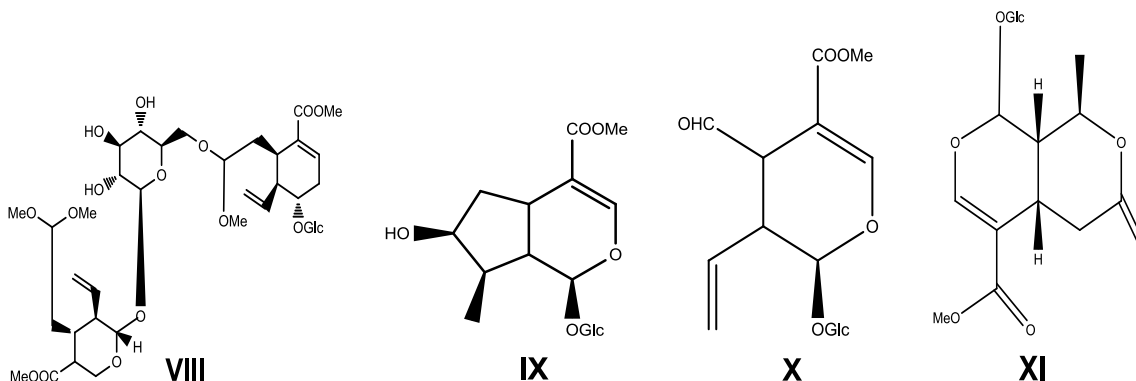
**IV** R<sub>1</sub>= (*E*)-*p*-cumaroílo, R<sub>2</sub>=H

**V** R<sub>1</sub>= H<sub>1</sub> R<sub>2</sub>= (*E*)-*p*-cumaroílo

**VI** R<sub>1</sub>= H<sub>1</sub> R<sub>2</sub>= (*E*)-*p*-cumaroílo

**VII** R= (*E*)-*p*-cumaroílo

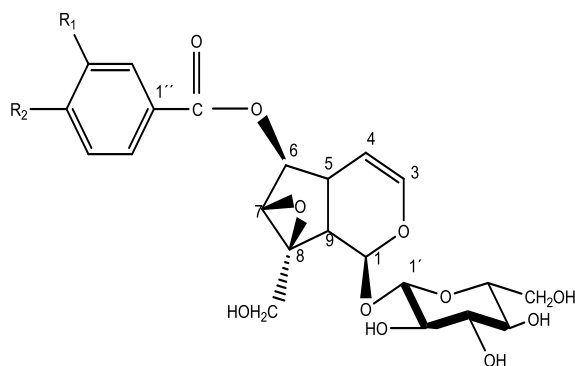
Del extracto metanólico de las hojas de *Lonicera chrysantha*, planta empleada en la medicina popular china, se han aislado a la crisatrina<sup>51</sup> (**VIII**), loganina (**IX**), secologanina (**X**) y el 8-epi-kingísido (**XI**), los cuales han mostrado una actividad antitumoral frente a células HL-60.





### 2.4.3.2 Actividad antiinflamatoria

Los iridoides catalpósido (**XII**) y verprósido (**XIII**), aislados de *Veronica anagallis* L., planta usada en la medicina popular china, han mostrado una actividad antiinflamatoria a la dosis de 500 mg/Kg.<sup>52</sup>

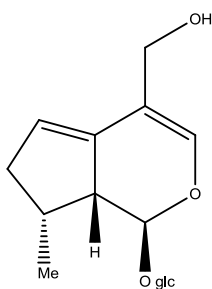


**XII** R<sub>1</sub>=H<sub>1</sub>      R<sub>2</sub>=OH Catalpósido

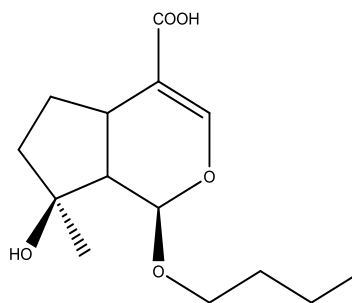
**XIII** R<sub>1</sub>=OH<sub>1</sub>      R<sub>2</sub>=OH Verprósido

### 2.4.3.3 Actividad antibacteriana

El iridoide glicosídico kansuenósido (**XIV**) y la kansuenina (**XV**), aislados de *Pedicularis kansuensis*, presentan una actividad antibacteriana contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* a concentraciones de 100 µg/mL.<sup>53</sup>



**XIV**



**XV**



#### **2.4.3.4 Actividad antimicrobiana contra *Streptococcus mutans***

La detección de actividad antimicrobiana contra *S. mutans* es muy importante para el desarrollo de compuestos provenientes de plantas medicinales, ya que este microorganismo está implicado en el desarrollo de diversas patologías bucales, como son: el desarrollo de caries, la gingivitis y la periodontitis que a su vez pueden derivar hacia otros problemas de salud.<sup>54</sup>

Se ha reportado el uso tradicional de la infusión de *V. carolina* como “enjuagues bucales” por lo que en el presente trabajo se plantea la evaluación de la actividad de los extractos y de los compuestos puros aislados de la planta medicinal objeto de este estudio contra *S. mutans*.

#### **2.5 Cuantificación de fenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu**

Los polifenoles son categorizados como productos naturales importantes para la salud y existe evidencia científica sobre la buena actividad anti oxidante y sobre su eficacia para la prevención de problemas cardiovasculares e inflamatorios, así como prevenir el cáncer. Estudios previos han demostrado la presencia de compuestos polifenólicos en extractos de *V. carolina* por lo que, en el presente trabajo es importante la determinación de fenoles totales por el método mencionado.<sup>55,56</sup>



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo principal

El objetivo principal de este trabajo es realizar el aislamiento y la identificación de los compuestos adicionales presentes en la planta medicinal *Verbena carolina*, así como la evaluación de la actividad antimicrobiana del contenido metabólico mayoritario.

#### 3.2 Objetivos particulares

- a) Preparar el extracto *n*-butanólico a partir del extracto total de la especie vegetal mediante un proceso de maceración y de reparto.
- b) Aislar los metabolitos secundarios mayoritarios y realizar la búsqueda de otros adicionales no identificados en estudios previos empleando los métodos cromatográficos convencionales.
- c) Caracterizar los compuestos aislados mediante el empleo de técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
- d) Evaluar la actividad antimicrobiana de los compuestos mayoritarios contra el microorganismo *Streptococcus mutans*
- e) Obtener los derivados acetilados de los metabolitos secundarios mayoritarios.
- f) Analizar el contenido metabólico del aceite esencial de *V. carolina* obtenido mediante la técnica de arrastre con vapor.
- g) Cuantificar los fenoles totales presentes en el extracto total por el método de Folin-Ciocalteu.



## 4. PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 Material y equipo utilizado

Para la obtención de los metabolitos secundarios descritos en este trabajo se utilizó CCA utilizando como fase estacionaria gel de sílice 60 (malla 0.063-0.200 nm) Merck. El proceso de fraccionamiento fue monitoreado por medio de un análisis en CCF empleando cromatofolios de aluminio Alugram (0.20 mm de sílica gel 60 con indicador UV254 fluorescente) Macherey-Nagel Duren. Como reveladores cromatográficos se emplearon una lámpara de luz UV Spectroline modelo ENF-240c con dos diferentes longitudes de onda a 254 y 365 nm y una solución de sulfato cérico amoniacal  $[(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$  al 1% con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N.

Los disolventes utilizados (hexano, cloroformo, acetato de etilo, acetona y metanol) para las columnas cromatográficas y cámaras de elución fueron grado QP previamente destilados y grado RA para la purificación. Los extractos y fracciones obtenidos, fueron concentrados a presión reducida utilizando un rotaevaporador BÜCHI Waterbath modelo B-480, hasta sequedad.

La reacción de acetilación se realizó en matraces bola de 5 mL, utilizando piridina anhidra y anhídrido acético (J.T.Baker).

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Fisher Johns y no están corregidos.

La identificación molecular de los metabolitos se llevó acabo utilizando diferentes técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

Los espectros en el UV se registraron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 2.



Los espectros en el IR se obtuvieron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Spectrum RX 1 FTIR.

Los espectros de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se determinaron a 400 MHz, en los siguientes equipos: VARIAN INOVA 400MR Mod para  $^1\text{H}$  y VARIAN INOVA 400/100.5 VNMRS Mod. para  $^{13}\text{C}$ . Como disolventes se emplearon  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\text{DMSO-d}_6$  y como referencia interna TMS.

Para el proceso de los espectros de RMN se utilizó el Software MestReNova

Para el análisis de la composición del aceite esencial se utilizó un cromatógrafo Agilent 6890N marca LECO Pegasus 4D y una columna capilar DB-5 (10m X 0.18 mm d.i. y 0.18  $\mu\text{m}$ ); el programa de temperatura desde 40°C-300°C (4°C/min). Se empleó helio como gas acarreador (1 mL/min) y la introducción de la muestra (2 $\mu\text{L}$ ) se realizó en modo split (1:20).

## 4.2 Recolección e identificación del material vegetal

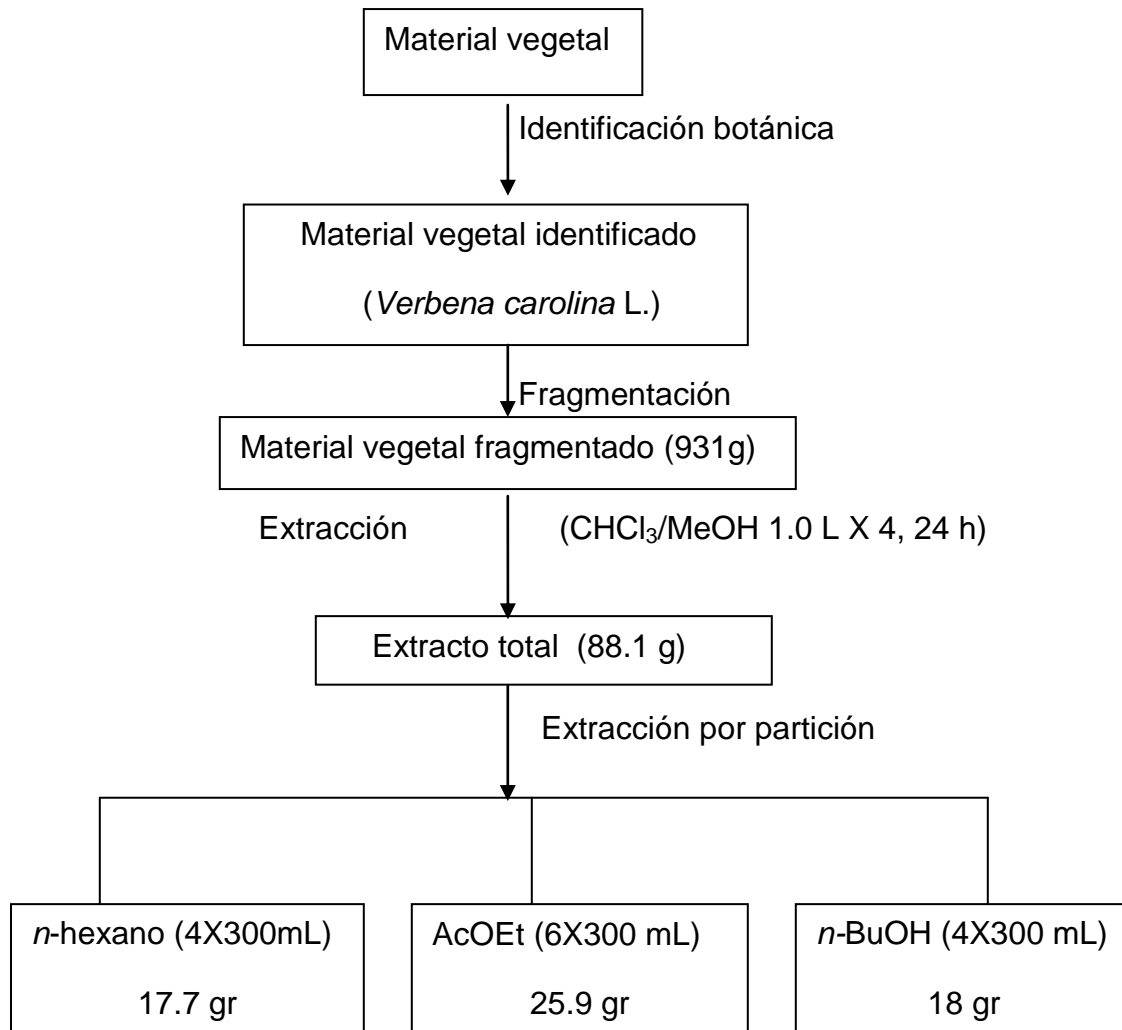
Una parte del material vegetal empleado en esta tesis se recolectó en el municipio de Hueyapan, Morelos en abril del 2005 y fue identificado por la M. en C. Margarita Avilés y la M. en C. Macrina Fuentes. La muestra vegetal fue depositada en el herbario del Instituto Nacional de Antropología e Historia de Morelos, con el siguiente número de voucher: INAHM-2018. El resto del material vegetal *Verbena carolina* fue adquirido comercialmente en el mercado de Sonora y se dejó secar a temperatura ambiente.

## 4.3 Extracción

Las partes aéreas de *Verbena carolina* (INAHM-2018) fueron fragmentadas hasta obtener un total de 931 g los cuales se sometieron a extracción por el método de maceración (**Esquema 1**) en un mezcla de  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (50:50) y el disolvente se eliminó por destilación al vacío obteniéndose 88.1 g de extracto total.



**Esquema 1.** Procesamiento de hojas y tallos de *Verbena carolina* L





#### 4.4 Fraccionamiento cromatográfico y por la técnica de reparto

88.1 g del extracto total de *V. carolina* fueron disueltos en 1.4 L de agua destilada y sometido a un proceso de reparto con *n*-hexano (4 X 300), AcOEt (6 X 300) y *n*-butanol (4 X 300) (**Esquema 1**).

El extracto *n*-butanólico fue secado (18 g) y aplicado en una columna cromatográfica abierta (200.0 g de sílica gel) empleando para la elución mezclas de polaridad creciente de CHCl<sub>3</sub>/MeOH según se indica en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Fraccionamiento cromatográfico del extracto *n*-butanólico.

Sistema de elución	Relación	Fracciones primarias recolectadas (FA)	Fracciones reunidas
CHCl <sub>3</sub>	100%	1-6	12-24 (I)
CHCl <sub>3</sub> /MeOH	95:5	7-17	36-40 (II)
CHCl <sub>3</sub> /MeOH	93:7	18-22	61-76 (III)
CHCl <sub>3</sub> /MeOH	92:8	23-24	77-92 (IV)
CHCl <sub>3</sub> /MeOH	90:10	25-78	93-113 (V)
CHCl <sub>3</sub> /MeOH	85:15	79-142	133-136 (VI)
CHCl <sub>3</sub> /MeOH	80:20	143-154	140-148 (VII)
CHCl <sub>3</sub> /MeOH	70:30	155-174	150-174 (VIII)
CHCl <sub>3</sub> /MeOH	60:40	175-193	175-198 (IX)
MeOH	100%	194-219	200-204 (X)
			206-209 (XI)
			210-220 (XII)





#### 4.5 Reacción general de acetilación<sup>57</sup>

100 mg de compuesto o fracción se disolvieron en 1.0 mL de anhídrido acético y 0.3 mL de piridina a temperatura ambiente y se dejaron con agitación magnética durante 24 h. Transcurrido el tiempo de reacción se adicionaron 5.0 g de agua/hielo y se aciduló con una solución de HCl al 10%. Posteriormente, la solución anterior se extrajo con tres porciones de 15 mL de AcOEt. Las fases orgánicas reunidas se extrajeron con tres porciones de 5 mL de solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y se lavaron dos veces con porciones de 5 mL de H<sub>2</sub>O; finalmente el extracto orgánico se secó sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y por evaporación del disolvente se obtuvieron los productos acetilados.

#### 4.6 Aislamiento e identificación de verbenalina (1)

Las fracciones primarias FA 43-FA 48 eluidas con CHCl<sub>3</sub>/MeOH 90:10 se agruparon, con base en su homogeneidad cromatográfica. En la fracción F-J de la cual cristalizó de manera espontánea un producto blanco que fue purificado por recristalización con AcOEt. Posteriormente, una parte (100 mg) se acetiló por el procedimiento descrito en el punto 4.5 y los compuestos acetilados fueron separados por CCFP utilizando hexano/AcOEt 60:40 como fase móvil. Este producto de acuerdo con sus características físicas y espectroscópicas fue caracterizado como la verbenalina (1).

#### 4.7 Aislamiento e identificación del verbascósido (2).

De la fracción primaria V\* [CHCl<sub>3</sub>/MeOH (85:15)] se obtuvo un compuesto café al cual se le realizaron lavados sucesivos con una mezcla de CHCl<sub>3</sub>/MEOH (50:50). Posteriormente se acetiló utilizando el procedimiento descrito en el punto 4.5 y fue caracterizado como el verbascósido de acuerdo con sus características físicas y espectroscópicas reportadas en la literatura.



#### 4.8 Aislamiento e identificación del hastatóside (3)

La fracción primaria III fue recromatografiada en una CC de la siguiente manera: 415 mg fueron adsorbidos en 300 mg de sílica gel y la mezcla se dejó secar a temperatura ambiente por 24 h; en seguida, la muestra fue aplicada en una columna cromatográfica abierta de vidrio conteniendo 4 gramos de sílica gel, empleando para la elución mezclas de polaridad creciente de  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{CHCl}_3/\text{AcOEt}$  y finalmente se lavó con MeOH, recolectando fracciones de 25 mL cada una. Las fracciones secundarias obtenidas fueron reunidas de acuerdo a la similitud cromatográfica que presentaban, obteniéndose un conjunto de 8 fracciones secundarias según se indica en la **(Tabla 5)**.

**Tabla 5.** Fraccionamiento secundario de la fracción primaria III

Sistema de elución	Relación	Fracciones primarias recolectadas (FAIII)	Fracciones reagrupadas
CHCl <sub>3</sub>	100%	1	3-9 (FAIII-A)
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt	90:10	2	10-11 (FAIII-B)
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt	80:20	3	15-25 (FAIII-CDE)
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt	70:30	4	26-29 (FAIII-F)
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt	60:40	5	30-41 (FAIII-G)
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt	50:50	6	42-47 (FAIII-H)
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt	40:60	7	48-58 (FAIII-I)
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt	30:70	8	59-74 (FAIII-74)
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt	20:80	9	
CHCl <sub>3</sub> /AcOEt	10:90	10	
AcOEt	100%	11-74	
MeOH	100%	75-80	

De la fracción secundaria FAIII-74 se obtuvo un sólido de ámbar el cual por sus características físicas y espectroscópicas observadas se caracterizó como el hastatósido (**3**).



#### **4.9 Aislamiento e identificación del 7-O- $\alpha$ -D-glucuronopiranosido de la 5-hidroxi-6,4'-dimetoxiflavona (7-O- $\alpha$ -D-glucuronopiranosido de la pectolarigenina) (4)**

Las fracciones primarias FA 121-FA 132 [CHCl<sub>3</sub>/MeOH 85:15] se reunieron con base en su contenido químico, visualizado por CCF. Dicha reunión se designó con la clave CVAP, la cual fue sometida a una serie de lavados con una mezcla de CHCl<sub>3</sub>/MeOH 20:80 (grado RA) exhaustivamente y posteriormente con 100% MeOH. El producto de los lavados fue separado de las aguas madres y se dejó secar en el vacío durante 3 días. Los cristales amarillos obtenidos fueron identificados de acuerdo a sus características físicas, espectroscópicas y espectrométricas como el 7-O- $\alpha$ -D-glucuronopiranosido de la 5-hidroxi-6,4'-dimetoxiflavona (4).

#### **4.10 Determinación de la actividad antimicrobiana contra bacterias cariogénicas**

##### **4.10.1 Preparación de las muestras**

Se pesaron entre 1 y 4 mg de la sustancia de prueba y se adicionaron 200  $\mu$ L de DMSO. A la solución anterior se le agregaron 1800  $\mu$ L de agua estéril para obtener una concentración entre 2.0 y 2.5  $\mu$ g/mL.

##### Microorganismo de prueba.

Para realizar el ensayo biológico se utilizó el microorganismo *Streptococcus mutans* (ATCC10499) por tratarse del principal agente patógeno causante de la caries dental. Para desarrollar el crecimiento de *S. mutans* se utilizó caldo de infusión cerebro corazón como medio de cultivo (BHI). El cultivo del microorganismo fue incubado por una noche, posteriormente se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos, se lavó 2 veces con solución amortiguadora de fosfatos



0.05M (PBS,pH 6.8) y en la misma solución se resuspendió. La suspensión celular se ajustó con un espectrofotómetro de la serie Cecil (Milton Roy, Rochester, NY) a la concentración de  $5 \times 10^5$  UFC/mL

#### 4.10.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria.

La actividad antibacteriana, tanto del extracto como de los compuestos se expresó en términos de la concentración mínima inhibitoria y se realizó por el método de micro dilución en una placa estéril de 96 pozos (**Figura 8**). Utilizando la suspensión de células ajustada, cada pozo contenía  $5 \times 10^5$  UFC/mL de *S. mutans*, además del medio de cultivo apropiado y el compuesto de prueba en diluciones seriadas.

#### 4.10.3 Procedimiento general del ensayo

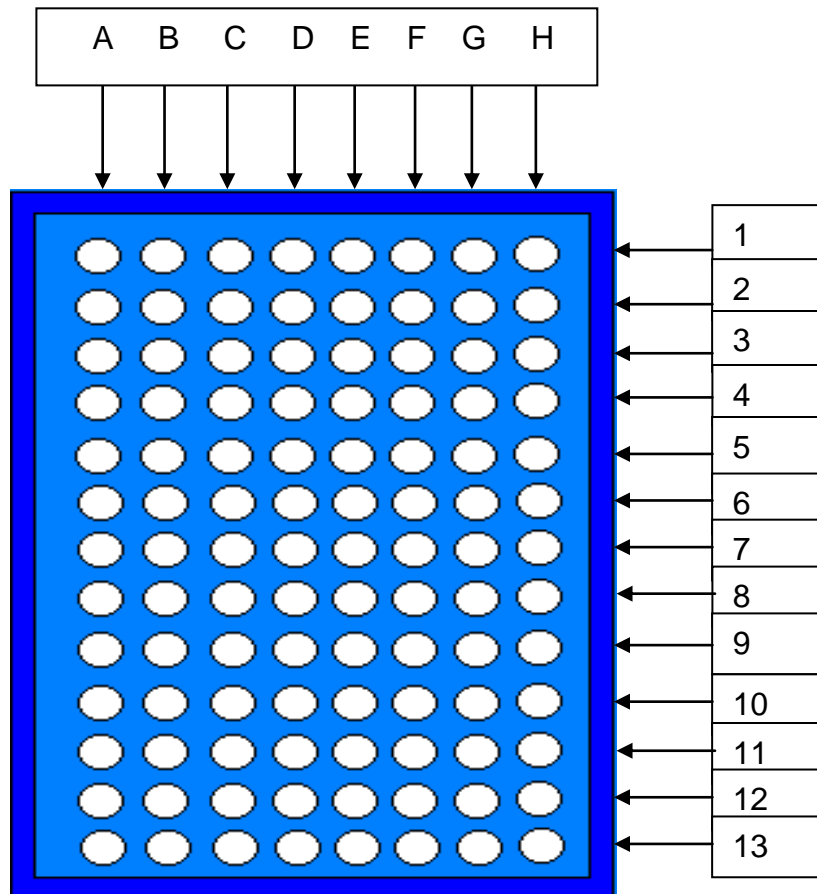
A cada uno de los 96 pozos de la placa se adicionaron 100  $\mu$ L de medio BHI y adicionalmente:

- En el primer pozo del canal A se adicionaron 100  $\mu$ L de CHX
- Canal B se adicionaron 100  $\mu$ L de una solución de DMSO al 10%
- Canal C se adicionaron 100  $\mu$ L del medio BHI.
- Canal D se utilizó como control de células, por lo que sólo se inoculó con *S. mutans* a una concentración de  $1 \times 10^5$  UFC/mL.
- Canales E a H se adicionaron 100  $\mu$ L de la sustancia a evaluar.

Las diluciones seriadas se prepararon, tomando 100  $\mu$ L de los pozos 1 y transfiriéndolos al 2 y así sucesivamente hasta el 12, desechando los últimos 100  $\mu$ L. Se agregaron 80  $\mu$ L (1 % de sacarosa) en cada uno de los 96 pozos.



Finalmente, se adicionaron 20  $\mu\text{L}$  de *S. mutans* a una concentración de  $1 \times 10^5$  UFC/mL.



**Figura 8.** Distribución de los canales en la placa de 96 pozos.

Las placas se incubaron durante 24 h en condiciones aerobias a una temperatura de  $37^\circ$  en una incubadora Labnet 211DS y transcurrido el tiempo se determinó la CMI



Los controles utilizados fueron los siguientes.

- Medio de cultivo inoculado con bacterias de prueba
- Medio sin inocular como control de esterilidad
- DMSO y agua como control de disolvente
- El control positivo fue gluconato de clorhexidina (CHX) el cual inhibió a *S. mutans* con una CMI de 1.2 µg/mL.

#### **4.11 Obtención del aceite esencial.**

187.4 g de partes aéreas de material seco de *V. carolina* y 270 g de partes aéreas frescas, cada una con 1.3 litros de agua destilada fueron sometidas a un proceso de hidrodestilación, por un período de 8 horas; al término de este proceso se obtuvieron 3 y 7 mg de aceite esencial, respectivamente. Los compuestos presentes en el aceite esencial se identificaron por cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas. Los componentes contenidos en la esencia se identificaron por medio de sus espectros de masas y sus índices de retención de Kováts.<sup>58</sup> Los espectros de masas resultantes se compararon con los reportados en la literatura y en las bibliotecas Pherobase y NIST del equipo (National Institute of Standards and Technology) para corroborar la similitud entre los compuestos obtenidos.

#### **4.12 Determinación de fenoles totales**

2.2 mg de extracto total de *V. carolina* se disolvieron en 2 mL de MeOH RA De la solución anterior 100 µL se transfirieron a un tubo de ensaye al cual se le adicionaron 800 µL de agua destilada y 100 µL del reactivo de Folin. Transcurridos 8 minutos se agregaron 50 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20%. Después de dos horas de reposo



en la oscuridad, se cuantificó el contenido de fenoles totales, midiendo la absorbancia a 760 nm utilizando metanol como blanco.

Los resultados se expresan como  $\mu\text{g/mL}$  de equivalentes de ácido gálico (EAG) y se obtienen por interpolación a partir de una curva patrón de ácido gálico.

#### 4.13 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los compuestos obtenidos

##### 4.13.1 Microorganismos utilizados

Microorganismo	Descripción
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacteria Gram ( + )</i>
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacteria Gram ( + )</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacteria Gram ( - )</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Hongo levaduriforme</i>
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Hongo filamentoso</i>
<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Hongo filamentoso</i>

##### 4.13.2 Preparación de las muestras

Los productos puros (10 mg) fueron disueltos en 1 mL de DMSO. A partir de esta solución, se prepararon diluciones para obtener concentraciones finales de 0.00625 a 0.100 mg/mL

##### 4.13.3 Preparación del inóculo

Para activar las cepas, las bacterias se desarrollaron en caldo nutritivo, la levadura y los hongos filamentosos se desarrollaron en agar Sabouraud; posteriormente se





incubaron durante un periodo de 48 horas a 37°C las bacterias y durante 7 días a 28°C los hongos.

El inóculo de cada muestra de bacterias fue preparado a partir de cultivos que contenían  $10^8$  UFC/mL. El inóculo de *Candida albicans* tenía una concentración final de  $10^5$  células/mL y de  $10^6$  esporas/mL para los hongos filamentosos. Las concentraciones de los inóculos fueron establecidas por comparación contra estándares turbidimétricos establecidos (escala de McFarland).

#### **4.13.4 Bioensayo**

Las muestras preparadas a diferentes concentraciones se mezclaron con el medio de cultivo apropiado, en el cual se inoculó con el microorganismo de prueba; después de la incubación se examinó por comparación visual turbidimétrica la cantidad de crecimiento del microorganismo en cada tubo de ensayo, comparando en cada caso la turbidez existente con la de los patrones de turbidez de McFarland. Este procedimiento se efectuó por duplicado. La menor concentración de muestra requerida para la inhibición de crecimiento visible es considerada la concentración mínima inhibitoria (CMI). Como controles positivos se utilizaron gentamicina para las bacterias Gram (+) y Gram (-), miconazol para los hongos filamentosos y nistatina contra el hongo levaduriforme. Adicionalmente se preparó un control de crecimiento negativo.



## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Determinación de la actividad antimicrobiana contra bacterias cariogénicas

En el ensayo biológico de la actividad antimicrobiana, se empleó *Streptococcus mutans* como bacteria cariogénica. Los resultados obtenidos para cada compuesto se muestran en la Tabla 6.

**Tabla 6** CMI de los compuestos mayoritarios obtenidos a partir de *V. carolina* contra *S. mutans*

COMPUESTO DE PRUEBA	Valores de CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )
Verbenalina	>1000
Hispidulina	>1000
Hastatósido	>1000
Verbascósido	600
Extracto total	>1000

Como se observa en la Tabla 6 el extracto total, así como la verbenalina, la hispidulina y el hastatósido muestran una CMI  $>1000\mu\text{g/mL}$  mientras que el verbascósido presenta una actividad inhibitoria de  $600\mu\text{g/mL}$ . Es importante señalar que las muestras son consideradas activas si presenta una CMI menor a  $1000\mu\text{g/mL}$ .<sup>59</sup>

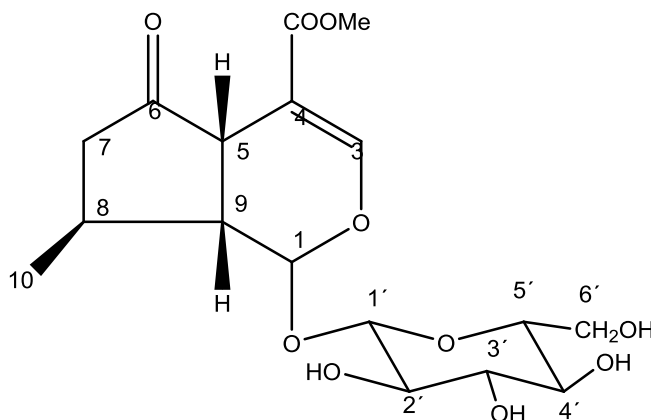


## 5.2 Cuantificación de fenoles totales.

Debido al carácter polar de los compuestos obtenidos, se realizó la cuantificación de fenoles totales en el extracto total obtenido de *V. carolina* por el método de Folin-Ciocalteu, a partir de la curva de calibración de ácido gálico a diferentes concentraciones en la cual se interpola el valor de la absorbancia obtenida para una muestra. Este método nos permite cuantificar la cantidad de compuestos fenólicos presentes en la muestra analizada.<sup>55</sup> El resultado de la cuantificación indica que 200  $\mu\text{g/mL}$  de extracto total contienen 97.09 equivalentes de ácido gálico /mL.

## 5.3 Aislamiento e identificación de la verbenalina (1)

El producto recristalizado de la fracción primaria F-J mostró una pureza cromatográfica ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  70:30, Rf. 0.6) y fue identificado como verbenalina (1) (**Figura 9**) de acuerdo con sus características espectroscópicas y por comparación de éstas con las reportadas en la literatura.<sup>60</sup>



**FIGURA 9.** Estructura de la verbenalina (1)



El compuesto **1** presentó un p.f. de 178-183 °C. El espectro de IR (**Espectro 1**) mostró absorciones para grupos hidroxilo en 3305  $\text{cm}^{-1}$ , 2910 y 2896  $\text{cm}^{-1}$  bandas de C-H alifáticos; en 1736 y 1691  $\text{cm}^{-1}$ ; bandas para un grupo carbonilo de una cetona y para el grupo carboxilo del éster  $\alpha,\beta$ -insaturado, la primera y en 1691  $\text{cm}^{-1}$  una banda de absorción característica del doble enlace vecino al éster. De 1030 a 1072 se observaron 3 bandas intensas correspondientes a la vibración de los enlaces C-O de la molécula. En este momento se pudo inferir por las señales en el IR, y por sus características cromatográficas en capa fina que el compuesto se trataba de la verbenalina (**1**), aislada anteriormente por nuestro grupo de trabajo. Esta suposición se confirmó al observar el espectro de RMN- $^1\text{H}$  (**Espectro 2**) en donde se apreciaron 10 señales para grupos metino, de las cuales, las ubicadas en 2.2, 2.5, 3.5, 5.2 y 7.4 ppm correspondieron al esqueleto iridoide, mientras que las restantes en 3.2, 3.21, 3.27 y 4.6 (H-anomérico) ppm pertenecen al residuo de glucosa. Otras señales diagnósticas fueron el metilo en la posición 10 ubicado en 1.22 ppm como un doblete por su vecindad con el metino en la posición 8 y el metileno en la posición 6 de la glucosa en 3.88 ppm. Mediante la comparación de los datos anteriores con los descritos en la literatura se comprobó que el compuesto **1** corresponde a la verbenalina (**Figura 9**).

#### 5.4 Obtención del derivado peracetilado de la verbenalina (**1**)

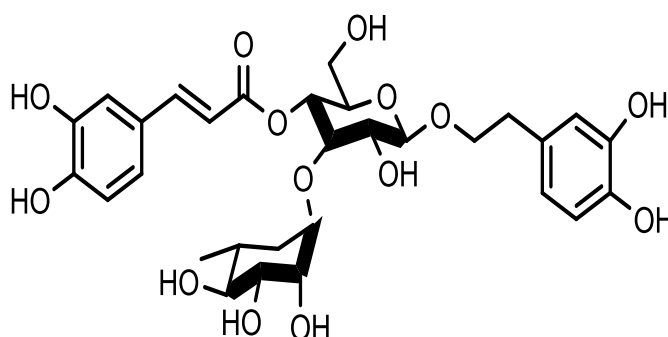
Una muestra del compuesto (**1**) se sometió a una reacción de acetilación y la estructura del producto acetilado se confirmó mediante sus características espectroscópicas. El espectro UV (**Espectro 3**) mostró una banda de absorción en 244 nm correspondiente al carbonilo  $\alpha,\beta$ -insaturado. El espectro IR (**Espectro 4**) mostró la ausencia de las señales de los hidrógenos de los hidroxilos de la porción del azúcar en la molécula en 1742 y 1716, en su lugar se observaron bandas intensas para los grupos carbonilo de los grupos acetato y carbonilo de la cetona y en 1212 y 1031  $\text{cm}^{-1}$  bandas muy intensas de los enlaces C-O de los ésteres. El espectro de RMN- $^1\text{H}$  (**Espectro 5**) mostró las señales correspondientes a los grupos metilo de los acetatos del azúcar; las señales de los hidrógenos en los



carbonos base de los grupos acetato en el azúcar se desplazaron a campo bajo entre 5.2 y 3.6 ppm.

### 5.5 Aislamiento e identificación del verbascósido (2)

El compuesto obtenido de la fracción primaria V\* mostró pureza cromatográfica (acetona/MeOH 80:20, Rf.0.5) y fue identificado como el verbascósido (**Figura 10**) de acuerdo a sus características espectroscópicas y por comparación con aquellas reportadas en la literatura.<sup>61</sup>



**FIGURA 10** Estructura del verbascósido (2)

El compuesto **2** presentó un p.f. de 60-63 °C. El espectro en el UV (**Espectro 6**) mostró dos máximos de absorción: en 290 y 330 nm indicando la presencia de grupos cromofóricos importantes en la molécula. El espectro en el IR (**Espectro 7**) mostró absorciones de gran intensidad para grupos hidroxilo en  $3347\text{ cm}^{-1}$  y para grupos C-H, en  $1013\text{ cm}^{-1}$ . En  $1693\text{ cm}^{-1}$  se observó una banda para carboxilo  $\alpha,\beta$ -insaturado y en  $1600\text{ cm}^{-1}$  una banda para la absorción de grupos C-H insaturados.

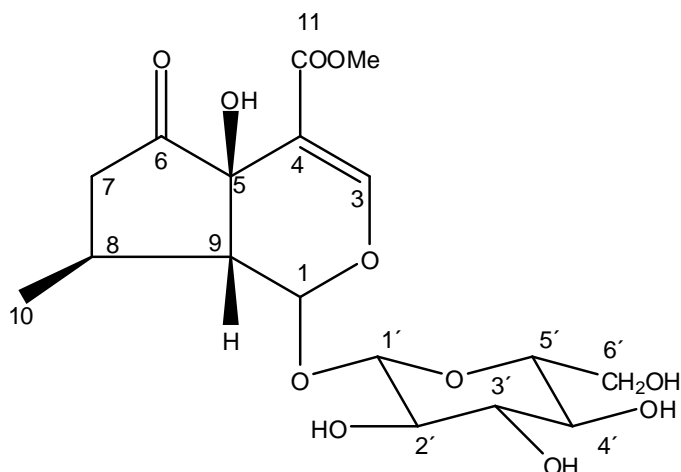
El espectro de RMN-<sup>1</sup>H (**Espectro 8**) muestra la presencia de un glicósido formado por dos unidades de azúcar por el conjunto de señales observadas entre 3.34 y 4.05 ppm, los hidrógenos anoméricos se observan en 5.18 y 4.39 ppm. La molécula también presenta un residuo de feniletilo, esta señal se observa como un



tripleto en 2.79 correspondiente a los hidrógenos del metileno bencílico y un multiplete en 3.92 ppm diagnóstico para un metileno base de oxígeno. La molécula presenta un grupo carboxilo  $\alpha,\beta$ -insaturado que se observa como dos dobletes en 6.27 y 7.59 ppm con constante de acoplamiento de 15.9 Hz. La última porción de la molécula corresponde a un par de anillos bencénicos trisustituidos por dos grupos hidroxilo en posición orto y un carbono, esta señal se aprecia se aprecia dos sistemas ABX entre 6.54 y 7.05 ppm. En 1.04 aparece un doblete que integra para tres hidrógenos correspondiente a H-6'. En conjunto estos resultados ponen de manifiesto la estructura del verbascósido (**2**) previamente aislado de esta planta de esta planta. La estructura propuesta se confirmó mediante la correlación química con el derivado peracetilado de (**2**) y por comparación de las características espectroscópicas con las reportadas en la literatura.<sup>60</sup>

### 5.6 Aislamiento e identificación del hastatósido (**3**)

El producto obtenido de la fracción secundaria F- III mostró pureza cromatográfica ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ , 70:30, Rf. 0.4) y fue identificado como hastatósido (**Figura 11**); su estructura es similar a la de la verbenalina (**1**) con excepción de la aparición de un grupo hidroxilo en la posición 5 del esqueleto iridoide, por lo cual, sus características espectroscópicas son similares ó las de **1**. La presencia del grupo hidroxilo en C-5, se confirmó mediante la ausencia en esa posición del hidrógeno observado en la verbenalina ( $\delta_{\text{H}}$  3.5) (**Espectro 9**) y por otra parte, la señal del hidrógeno acetálico en la posición 1' de la verbenalina (**1**) se encuentra desplazada a campo bajo en el hastatósido (de 5.2 a 5.9 ppm) por la influencia del hidroxilo en C-5.



**Figura 11.** Estructura del hastatósido (**3**)

Las características espectroscópicas de (**3**) se confirmaron por comparación con las reportadas en la literatura para este compuesto <sup>62</sup>

### 5.7 Aislamiento e identificación del 7-O- $\alpha$ -D-glucuronopiranosido de 5-hidroxi-6,4'-dimetoxiflavona (**4**)

Las fracciones primarias más polares obtenidas (FA-121-132), se agruparon en la fracción CVAP, a partir de las cuales, cristalizó un producto que mostró una pureza cromatográfica (100% MeOH, Rf. 0.75) y gran absorción en el espectro UV de onda larga (color azul), lo cual permitió suponer que se trataba de un compuesto de tipo flavonoide, el cual fue identificado como el 7-O- $\alpha$ -D-glucuronopiranosido de 5-hidroxi-6,4'-dimetoxiflavona (**4**) (**Figura 12**) el cual no había sido aislado en especies del genero *Verbena*. Este producto presentó un punto de fusión de 195-207 °C con absorción importante en el espectro UV (**Espectro 10**) en 271 y 330 nm. El espectro IR (**Espectro 11**) mostró absorciones para grupos hidroxilo en 3332  $\text{cm}^{-1}$ , C-H alifáticos en 2922 y 2839  $\text{cm}^{-1}$  con sus señales de corroboración en 1488 y 1351  $\text{cm}^{-1}$ , y un carbonilo de grupo lactona en 1656  $\text{cm}^{-1}$ . La presencia de carbonos-hidrógenos aromáticos se observaron en la banda de gran intensidad en 1602  $\text{cm}^{-1}$  y por otra parte, en 1251, 1182, 1066 y



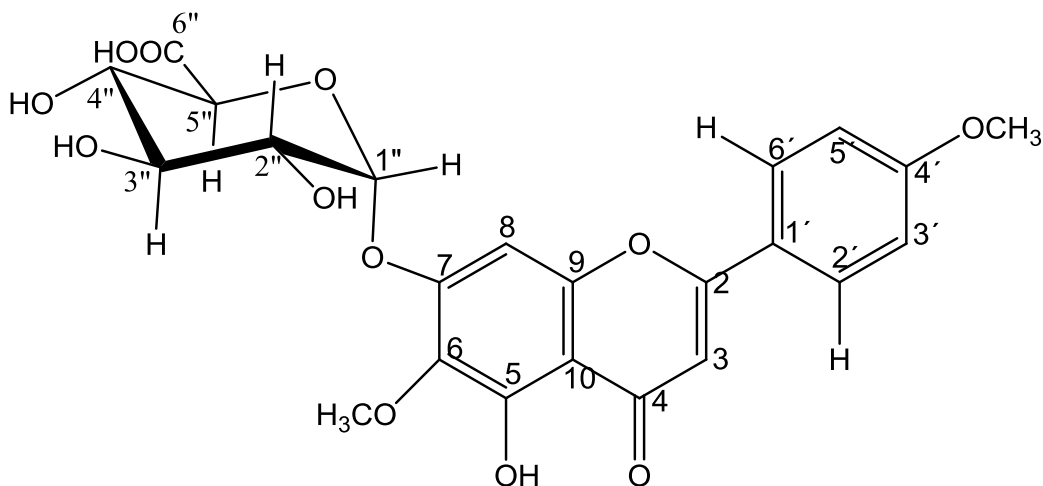
1021  $\text{cm}^{-1}$  se apreciaron las bandas para vibraciones C-O de la molécula. Las características espectroscópicas de RMN- $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  (**Espectros 12 y 13**) fueron muy similares a las de la hispidulina, compuesto aislado en previamente en la especie objeto de estudio<sup>63</sup>, conteniendo un grupo metoxilo adicional y un residuo de azúcar. Los espectros fueron realizados en DMSO- $\text{d}_6$  debido a que el compuesto **4** presentó características muy polares y fue insoluble en MeOH. El espectro de RMN- $^1\text{H}$  mostró el perfil de un flavonoide (**Tabla 7**) por las señales doblete ( $J=8$  Hz) de los hidrógenos pertenecientes al anillo "B" en un sistema bencénico  $A_2X_2$ , asignados a H-2', H-6' y H-3', H-5' en  $\delta_{\text{H}}$  8.05 y 7.13 respectivamente. El espectro también presentó dos grupos metoxilo (3.78 y 3.86 ppm) que se encuentran en las posiciones 6 del anillo "A" y 4' del anillo "B" respectivamente, con base en las correlaciones observadas en el espectro HMBC (**Espectro 14**). La presencia de un glucurónido en la molécula se demostró por la presencia de 4 metinos base de oxígeno en el espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  en 76.6, 73.8, 72.8 y 71.7 ppm y otro de tipo anomérico (99.7 ppm) y las correspondientes señales de hidrógeno en 3.22 a 3.65 ppm en el espectro de RMN- $^1\text{H}$ . El residuo de azúcar contiene un grupo carboxilo que se localizó en  $\delta_{\text{C}}$  171.87 y correlacionó en el espectro HMBC con la señal de los hidrógenos en 3.63 y 3.22 ppm los cuales se asignaron a las posiciones 5" y 4" del azúcar ya que H-5" correlaciona en el espectro COSY únicamente con H-4". Por otra parte, el hidrógeno anomérico se estableció en 5.13 ppm observándose una correlación en el espectro COSY (**Espectro 15**) con H-2", localizado en 3.23 ppm. Las señales de los hidrógenos 2" y 3" se encuentran sobrepuestas en 3.23 ppm. El enlace glicosídico se estableció en la posición 7 del anillo "A", mediante las correlaciones observadas en el espectro HMBC (a tres y dos enlaces) entre H-1"-C-7 y H-8-C-7, respectivamente. La estructura propuesta se presenta en la **Figura 12**. Sin embargo, otra disposición que cumpliera con las correlaciones entre un C-H y un carbono cuaternario aromático base del glucósido sería la representada en la **Figura 13**, y otra más en la **Figura 14**. La estructura de la **Figura 14** se descarta en virtud de que no se observó correlación en el espectro NOE-1D entre el hidrógeno del oxhidrilo en C-5 y un CH. La estructura de la **Figura 12** para el compuesto **4** se



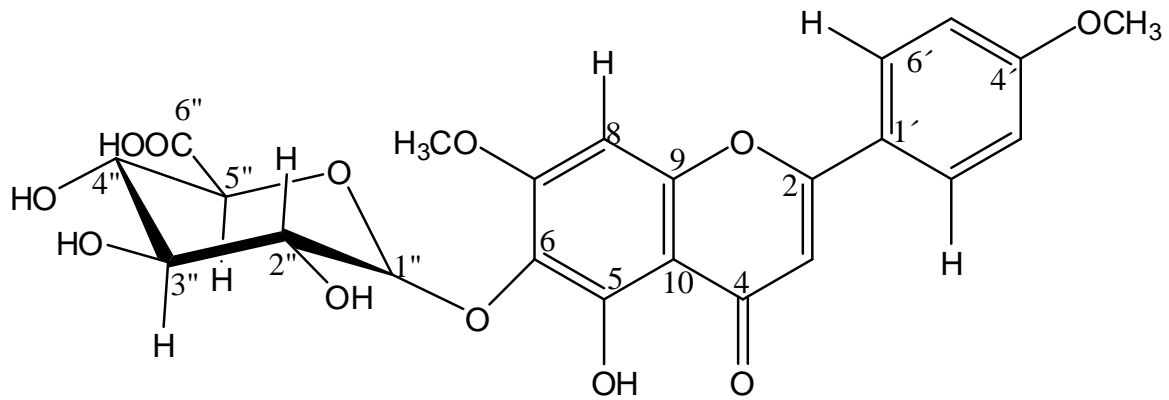


comprobó mediante la comparación y coincidencia de las constantes espectroscópicas del anillo "A" en RMN-<sup>13</sup>C con las del flavonoide hispidulina aislado de la misma planta (*V. carolina*) en un trabajo previo (Morales, 2009), descartándose la estructura de la **Figura 13**. Las tres señales remanentes en el espectro se asignaron al hidrógeno de la posición 3, en 6.94 ppm, al hidrógeno de la posición 8 en 7.0 (ambos con correlación en el espectro HMBC con C-10 en 105.5 ppm) y al hidrógeno quelatado del hidroxilo en la posición 5 en 12.91 ppm. En la literatura existen reportes de un compuesto muy similar, aislado de 1978 de la especie *Comanthosphace japonica* (Labiatae), el comantósido B del cual se describen sus características espectroscópicas (UV, IR y algunas constantes de RMN-<sup>1</sup>H), sin precisar las posiciones de los hidrógenos dentro de la molécula<sup>64, 65</sup>. Asimismo, los autores del trabajo (Arisawa, *et al*, 1979.) mencionan la determinación de la estructura por Rayos X y la fórmula molecular por análisis elemental. Sin embargo, los mismos autores describen la porción sacárida como β. En este trabajo, el cálculo de las constantes de acoplamiento entre los hidrógenos H-1"-H-2" y H-4"-H-5" del azúcar permitieron establecer al mismo como el α-D-glucuronopiranósido.

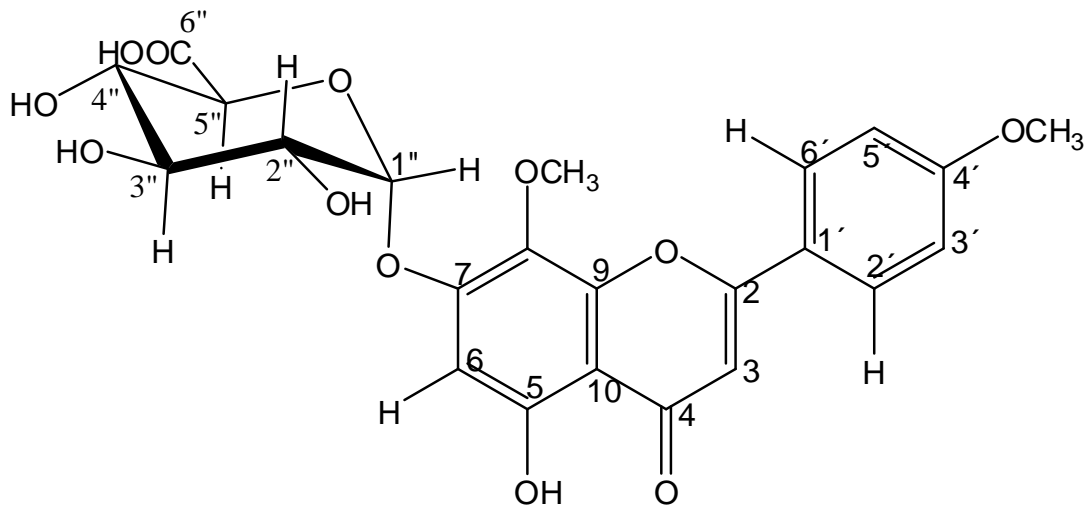
El espectro de masas (**Espectro 16**) confirmó el peso molecular del 7-O-α-D-glucuronopiranósido de 5-hidroxi-6,4'-dimetoxiflavona (**4**) (**Figura 12**).



**Figura. 12** 7-O-α-D-glucuronopiranósido de 5-hidroxi-6,4'-dimetoxiflavona (**4**)



**Figura. 13** 6-O- $\alpha$ -D-glucuronopiranosido de 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona



**Figura. 14** 7-O- $\alpha$ -D-glucuronopiranosido de 5-hidroxi-8,4'-dimetoxiflavona.



Tabla 07. Constantes espectroscópicas del compuesto (4)

p.f	195-207°C
F.M.	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub>
UV(espectro 10)	$\lambda_{\text{máx}}$ (MeOH), nm., 271 y 330
IR (espectro 11)	$V_{\text{máx}}$ (pastilla) cm <sup>-1</sup> : 3332, 2922, 2839, 1656, 1602, 1488, 1351, 1251, 1182, 1066, 1021.
RMN- <sup>1</sup> H (espectro 12)	400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> , $\delta$ : 12.91(1H, s, H-5), 8.055 (2H, d, $J=12$ Hz, H-2', H-6'), 7.13(2H, d, $J=8$ Hz, H-3', H-5'), 7.03(1H, s, H-8), 6.94(1H, s, H-3), 5.13 (1H, s, H-1''), 3.86 (3H, s, O-CH <sub>3</sub> ), 3.78 (3H, s, O-CH <sub>3</sub> ), 3.63 (1H, d, $J=10$ , H-5''). 3.23 (2H, m, H-2'', H-3''), 3.22(H-1, t, $J=9.6$ , H-4'')
RMN- <sup>13</sup> C	400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> , $\delta$ : 182.26(C-4), 171.87 (COOH), 163.6 (C-2), 162.3 (C-4'), 156.5 (C-7), 152.3 (C-9), 132.2 (C-6), 128.25 (C-2' y C-6'), 122.6 (C-1'), 114.51 (C3' y C5'), 105.57 (C-10), 103.2 (C-3), 99.75 (C-1''), 94.19 (C-8), 76.65 (C-2''), 73.84 (C-3''), 72.87 (C-4''), 71.79 (H-5''), 60.15 (O-Me), 55.47 (O-Me)

### 5.8 Obtención del aceite esencial.

El aceite esencial de una planta tiene cierto contenido volátil identificable que puede constituir una prueba de identidad química del vegetal por medio del perfil cromatográfico. Así, se determinaron los constituyentes volátiles de las partes aéreas de *V. carolina* aplicando la técnica de cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas del aceite esencial obtenido por hidrodestilación.



Cada uno de los componentes presentes en la muestra fue identificado mediante la comparación de los índices de retención calculados y con aquellos reportados en la literatura y en la biblioteca del equipo NIST. Se identificaron 42 compuestos correspondientes al 99.99% de los componentes totales, de los cuales solo 35 tienen un rango de similitud significativo con la biblioteca del equipo. Los productos mayoritarios en este ensayo para la planta medicinal fresca se enlistan en las Tablas 8 (planta fresca) y 9 (planta seca) Se observa que la composición principal del aceite esencial de *V. carolina*, contiene compuestos derivados de la ruta de los policétidos como 1- y 3- octanol, octadecanal y ácido *n*-hexadecanoico, con excepción del fitol, y además, no existen compuestos de tipo terpenoide.

**Tabla 08.** Composición química del aceite esencial de *V. carolina* (Fresca)

Nombre	Area %	R.T. (s)	IRexp	IRteo	Similitud	Método de identificación
<b>1-Octen-3-ol*</b>	26.76	295.397	1002	981	950	KI
(dl)-6-Metil-5-hepten-2-ol	0.62528	300.297	1011	985	949	KI
<b>3-Octanol</b>	2.1616	302.647	1015	995	969	KI
2-Etenil-1,1-dimetil-3-metilen-ciclohexano	0.42274	308.047	1025	-	787	IP
<b>Bencenacetaldehído*</b>	1.0979	330.697	1067	1053	901	KI
Pentil- ciclopropano	0.44479	347.097	1097	-	890	IP
5-Eteniltetrahidro- $\alpha$ , $\alpha$ ,5-trimetil-cis-2-furanometanol	0.6238	351.997	1106	1077	905	KI
<b>3,7-Dimetil-1,6-octadien-3-ol*</b>	16.321	362.947	1126	1113	920	KI
<b>Alcohol feniletílico*</b>	1.9058	370.547	1140	1120	957	KI
Trans-3-nonen-2-ona	0.40604	380.297	1158	1141	825	KI
1-Nonen-3-ol	0.29651	401.447	1197	1146	874	KI
Cimen-9-ol	0.0022506	405.797	1207	1205	798	KI
Salicilato de Metilo	0.2532	406.847	1209	1206	893	KI



<b>p-ment-1-en-8-ol*</b>	3.6985	408.197	1212	-	927	IP
<b>2,6-Dimetil-3,7-octadien-2,6-diol*</b>	1.0237	408.897	1214	1194	802	KI
5,5-Dimetil-ciclohex-3-en-1-ol	0.66748	421.947	1244	-	817	KI
2-metil-5-(1-metiletil)- (S)- 2-ciclohexen-1-ona *	0.59181	430.597	1264	1220	773	KI
3,4,4a,5,6,8a-hexahidro-2,5,5,8a-tetrametil-(2 $\alpha$ ,4 $\alpha$ ,8 $\alpha$ )- 2H-1-Benzopirano	0.2211	449.897	1309	1273	915	KI
Éter ciclohexil-vinílico	0.27125	462.497	1338	-	818	IP
1,2-Dimetil-1,5-ciclooctadieno*	0.38631	472.847	1362	-	765	IP
1-(2,6,6-Trimetil-1,3-ciclohexadien-1-il)-(E)-2-Buten-1-ona	0.55392	485.947	1392	1391	909	KI
2,6,10,14-Tetrametil- heptadecano	0.87546	515.597	1471	-	917	IP
4-(2,6,6-Trimetil-1-ciclohexen-1-il)-, (E)- 3-buten-2-ona*	0.16955	524.847	1495	1486	934	KI
4-(2,2,6-Trimetil-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-1-il)- 3-Buten-2-ona	0.13949	526.097	1499	1488	935	KI
3,7,11-Trimetil-1,6,10-dodecatrien-3-ol	0.56876	554.547	1575	1562	948	KI
3-Metil-3-(4,8-dimetilnona-3,7-dienyl)-4-metilen-1,3-dioxolan-2-ona	0.041299	557.897	1584	-	799	IP
5,5-dimetil-(Z)-2-hexeno	0.40575	561.547	1594	-	693	IP
Éster 2-metil-, 1-(1,1-dimetiletil)-2-metil-1,3-propandiil	0.40848	563.047	1598	-	897	IP



propanoico						
<b>Octadecanal</b>	2.8168	607.797	1738	2021	946	KI
<b>6,10,14-Trimetil-2-pentadecanona*</b>	2.711	647.747	1868	-	924	IP
<b>9,12,15-Octadecatrienal</b>	2.8066	664.397	1923	-	905	IP
<b>(Z)- 13-Octadecenal</b>	2.8066	664.647	1924	-	847	IP
14-Metil-(Z)-8-Hexadecenal	0.21617	670.947	1944	-	790	IP
Éster metílico del ácido tridecanoico	0.81937	672.997	1951	1625	936	KI
Dihexil ester del ácido 1,2-benzenedicarboxílico	0.029274	683.347	1985	-	914	IP
<b>Ácido n-hexadecanoico *</b>	4.9709	692.797	2018	2010	925	KI
<b>Éster 2,6-dimetil-, metílico del ácido nonanoico,</b>	4.8889	693.197	2020	-	647	IP
<b>3,7,11,15-tetrametil-, (E,E)- 1,6,10,14-hexadecatetraen-3-ol</b>	0.97703	702.397	2053	2008	868	KI
<b>Fitol</b>	13.206	728.947	2149	2128	906	KI
<b>3,7,11,15-Tetrametil-1-hexadecin-3-ol</b>	0.55554	735.147	2172	-	797	IP
Éster mono-(2-etil)-hexílico del ácido 1,2-benzenedicarboxílico	0.029939	833.747	2557	2555	913	KI

Los componentes mayoritarios se indican con números resaltados. **Ir**: Índice de retención de Kovats, en una columna DB-5, **IP**: Identificación presuntiva, **IR teo**: Índice de retención teórico, **Iexp**: Índice de retención experimental, **KI**: Índice de Kovats

**Tabla9.** Composición química del aceite esencial de *V. carolina* (seca)

Nombre	Area %	R.T. (s)	IRexpl	IR teo	Similitud	Método de identificación
1-Octen-3-ona	0.2615	286.882	991.47	983	917	KI
<b>Benceneacetaldehído*</b>	4.9794	329.682	1065	1053	903	KI
<b>3,7-Dimetil-1,6-octadien-3-ol*</b>	2.5241	360.132	1121.2	1107	893	KI
<b>Alcohol feniletílico*</b>	22.198	371.182	1141.6	1141	970	KI
<b>2-(1-Metiletiliden) ciclohexanona</b>	2.7712	391.132	1178.4	-	758	IP
<b>2,3-Dimetil-1,4-hexadieno</b>	1.7123	396.682	1188.6	-	847	IP
<b>Lactona del ácido cis-4-hidroxi-3-metilundecanoico</b>	1.7123	397.032	1189.3	-	684	IP
1-Octen-3-ol*	0.0167	401.432	1197.4	988	876	KI
<b>p-Ment-1-en-8-ol*</b>	6.623	408.182	1212.3	1195	921	KI
<b>2,6-Dimetil-3,7-Octadien-2,6-diol*</b>	1.6055	408.882	1214	1194	794	KI
<b>3,7-Dimetil-, (Z)-2,6-octadien-1-ol*</b>	1.2631	421.732	1243.7	1232	910	KI





<b>2-Metil-5-(1-metiletil)-(S)- 2-ciclohexen-1-ona *</b>	1.5122	430.732	1264.5	1246	760	KI
<b>3,7-Dimetil-(Z)- 2,6-octadien-1-ol*</b>	3.7505	433.682	1271.3	1251	906	KI
3-Metil-6-(1-metiletil)- 2-ciclohexen-1-ona	0.3943	434.932	1274.2	1252	858	KI
<b>2,6-Dimetil-1,7-octadieno-3,6-diol</b>	1.2917	446.682	1301.4	1277	891	KI
<b>Éster metílico del ácido 7-oxo-1-norbornanecarboxílico</b>	1.6788	467.632	1349.9	-	699	IP
Triacetina	0.51689	472.232	1360.5	1344	962	KI
<b>1,2-Dimetil-1,5-ciclooctadieno*</b>	2.2499	473.032	1362.4	-	722	IP
4'-metoxi acetofenona	0.46683	480.282	1379.1	1369	908	KI
<b>1-(2,6,6-Trimetil-1,3-ciclohexadien-1-il)-(E)-2-buten-1-ona*</b>	2.1559	486.182	1392.8	1391	916	KI
10-(Acetilmetil)-(+)-3-careno	0.92887	489.632	1400.9	-	761	IP
<b>2,6-Dimetil-6-(4-metil-3-pentenil)-biciclo[3.1.1]-hept-2-eno</b>	1.9592	496.432	1419.1	1436	743	KI
<b>8-(2-Acetiloxiran-2-il)-6,6-dimetilocta-3,4-dien-2-</b>	1.2975	512.582	1462.4	-	607	IP



## ona

<b>Acetato de 3-fenil-2-propen-1-ol</b>	6.0561	514.182	1466.7	1440	932	KI
4-(2,6,6-Trimethyl-1-ciclohexen-1-il)-(E)-3-buten-2-ona*				1493		
	0.61399	525.032	1495.7		939	KI
<b>4-(2,2,6-Trimetil-7-oxabicyclo[4.1.0]hept-1-il)- 3-Buten-2-ona</b>				1473		
	1.0172	526.432	1499.5		916	KI
<b>Tiglato de bencilo</b>	0.34912	533.382	1518.1	1498	827	KI
5,6,7,7a-Tetrahidro-4,4,7a-trimetil-2(4H)-benzofuranona				-		
	0.38611	546.682	1553.7		901	IP
<b>Ácido dodecanoico</b>	0.71766	560.682	1591.3	1562	711	KI
Óxido de Cariofileno	0.26282	563.182	1598	1583	812	KI
<b>Ácido tetradecanoico</b>	0.45259	626.482	1797.4	1770	869	KI
<b>Benzoato de bencilo</b>	13.396	628.332	1803.4	1775	952	KI
6,10,14-Trimetil-2-pentadecanona*	0.75852	647.432	1866.6	-	867	IP
Éster metílico del ácido tridecanoico	0.072787	672.932	1951	1625	942	IK



<b>Ácido n-hexadecanoico *</b>	2.32	689.032	2004.7	1972	919	IK
2,3,4,6-Tetra- <i>O</i> -acetil- $\alpha$ -D-glucopiranosido	0.76409	703.482	2057	-	912	IP
<b>Tetra-<i>O</i>-acetil-d-mannopiranososa</b>	1.8666	716.282	2103.3	-	888	IP
Dodecanamida	0.059542	800.982	2427.8	-	822	IP
<b>Éster mono(2-etilhexílico) del ácido 1,2-bencendicarboxílico</b>	4.673	834.532	2559.7	-	951	IP
<b>(Todos <i>E</i>)-2,6,10,15,19,23-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno</b>	1.3573	895.432	2799	-	898	IP

Los componentes mayoritarios se indican con números resaltados. **Ir**: Índice de retención de Kovats, en una columna DB-5, **IP**: Identificación presuntiva, **IR teo**: Índice de retención teórico, **I<sub>exp</sub>**: Índice de retención experimental, **KI**: Índice de Kovats



## 5.9 Evaluación de la actividad antimicrobiana de los compuestos obtenidos

### 5.9.1 Determinación de la actividad antimicrobiana por medio del cálculo de la concentración mínima inhibitoria (CMI, mg/mL).

Se determino la actividad antimicrobiana de los siguientes compuestos utilizando cepas de microorganismos Gram(+), Gram(-), así como en hongos levaduriformes y filamentosos representativos. Los resultados de la CMI obtenidos para cada uno de los compuestos se muestran en la **Tabla 10**.

**Tabla 10.** Evaluación antimicrobiana de los compuestos puros

Compuesto probado	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )					
	Sa	Sf	Ec	Ca	Tm	Tr
Verbenalina	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Compuesto (4)	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Verbascósido	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Verbenalina acetilada	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Verbascósido acetilado	>100	>100	>100	>100	>100	>100
Gentamicina	2.0	2.0	4.0	NP	NP	NP
Miconazol	NP	NP	NP	NP	4.0	4.0
Nistatina	NP	NP	NP	8.0	NP	NP

**NP.** No evaluado; **Sa:** *Staphylococcus aureus*; **Ef:** *Enterococcus faecalis*; **Ec:** *Escherichia coli*; **Ca:** *Candida albicans*; **Tm:** *Tricophyton mentagrophytes*; **Tr:** *Tricophyton rubrum*



Como se puede observar en la **Tabla 10** todos los compuestos puros muestran una CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )  $>100$  que fue la concentración máxima que se evaluó, indicando que ninguno de los productos evaluados fueron activos.



## 6. Conclusiones

Del extracto *n*-butanólico de la planta medicinal *Verbena carolina* se aislaron cuatro metabolitos secundarios cuyas estructuras fueron caracterizadas por métodos químicos, espectroscópicos, espectrométricos y por formación de derivados químicos. Los compuestos aislados fueron:

1. Verbenalina
2. Verbascósido
3. Hastatósido
4. 7-O- $\alpha$ -D-glucuronopiranosido de la 5-hidroxi-6,4'-dimetoxiflavona.

De la fracción V del fraccionamiento primario del extracto *n*-butanólico se identificó un compuesto de tipo flavonoide, el 7-O- $\alpha$ -D-glucuronopiranosido de la 5-hidroxi-6,4'-dimetoxiflavona (**4**) el cual no había sido aislado previamente a partir de las especies de *Verbena*.

Ninguno de los compuestos obtenidos resultó ser activo contra bacterias Gram (+) y Gram (-), así como hongos levaduriformes y filamentosos representativos en el bioensayo de actividad antimicrobiana.

Se comprobó la actividad antimicrobiana sobre *S. mutans* del verbascósido (**2**) lo cual validaría el uso tradicional de esta planta en patologías bucales.

El análisis de los compuestos volátiles presentes en el aceite esencial de muestras fresca y seca de *V. carolina* permitió la identificación de 43 y 42 compuestos volátiles respectivamente que corresponden al 99.99% de los componentes totales presentes en las muestras analizadas.

Ninguno de los metabolitos secundarios aislados en este trabajo se encuentra presente en el aceite esencial de la planta.



## 7. Bibliografía

1. Pérez-Tamayo, R. (1997). *“La medicina de los pueblos primitivos”*. La magia a la medicina moderna, Fondo de Cultura Económica, CONACYT; pp. 17-29.
2. Pavia-Ruiz, N., Ceballos-Quintal, JM., Medina-Escobedo, C., Ordóñez-Duran, A., Ríos-Rodríguez, H., (1998). *“Magia Religión y medicina”*, Rev. Biomed, 9:192-8.
3. Cortez-Gallardo, V., Macedo-Ceja, J. P., Hernández-Arroyo, M., Arteaga-Aureoles, G., Espinosa-Galván, D., Rodríguez-Landa J. F. (2004). *“Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas”*. Revista Biomedica 15 (2):123-134.
4. Brailowsky, S. (1995). *“Las sustancias de los sueños: neuropsicofarmacología”*. México: Fondo de Cultura Económica.
5. De Mora, J. M., Ludwika-Jarocka, M. (2002). *“Apuntes para una historia de la ciencia en la India antigua”*. Instituto de Investigaciones Filológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 244 pp.
6. De la Cruz M. *“Libellus de medicinalibus indorum herbis”*. Manuscrito azteca de 1552. Traducción latina de Juan Badiano. Versión española con estudios y comentarios por diversos autores. México: Editorial Fondo de Cultura Económica, Instituto Mexicano del Seguro Social; 1991.
7. World Health Organization. (2000). *“Situación Reglamentaria de los Medicamentos. Una Reseña Mundial ”*. World Health Organization. Geneva, Swiss.
8. Castillo, E. y Martínez, I. (2007). *“Manual de Fitoterapia”* Elsevier Masson. Barcelona, España. pp. 3-6.



9. Rzedowski, J., Rzedowski, G. C. (2002). "Verbena". *Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes*. Fasc. 100. Instituto de Ecología. Centro Regional del Bajío, México. pp. 118-139.
10. O'Leary, N., Múlgura M., Morrone O. (2007) "*Filogenia del género Verbena (Verbenaceae) basada en caracteres morfológicos*". Darwiniana. 45: 103-105.
11. O'Leary, N., Múlgura M., Morrone O. (2007). "*Revisión Taxonómica de las especies del género Verbena (Verbenaceae): Serie Pachystachyae*". Ann.Missouri Bot. Gard. 94: 571-62
12. Deepak, M. y Handa, S. (2000 a). "*Anti-inflammatory activity and chemical composition of extracts of Verbena officinalis*". Phytotherapy Research. 14:463–465.
13. Favari, P.L., Nava, A. R. y Meléndez, C.M. (2007). "*Posible efecto hepatoprotector de la Verbena en la hepatitis inducida por tetracloruro de carbono en la rata*". Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. Julio-Septiembre. 38 (3): 19-25.
14. Rehecho, S., Hidalgo, O., García-Iñiguez, M., Navarro, I., Astiasarán, I., Ansorena, D., Caverro, R.Y. y Calvo, M.I. (2011). "*Chemical composition, mineral content and antioxidant activity of Verbena officinalis L.*", Food Science and Technology. 44 (4): 875-882.
15. Casanova, E., García-Mina, J.M., Calvo, M.I. (2008). "*Antioxidant and Antifungal Activity of Verbena officinalis L. Leaves*". Plant Foods Hum Nutr. 63:93-97.





- 16 Makino, Y., Kondo, S., Nishimura, Y., Tsukamoto, Y., Huang, Z. y Urade, Y. (2009). "*Hastatoside and verbenalin are sleep-promoting components in Verbena officinalis*". *Sleep and Biological Rhythm*. 7:211–217
  
17. Ardakani, M., Mosaddegh, M., Shafaati, A. (2003). "*Volatile Constituents from the Aerial Parts of Verbena Officinalis L. (Vervain)*". *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. pp.39-42.
  
18. Gamboa, C., Castro, O. (2004). "*Iridoids from the aerial parts of Verbena littoralis (Verbenaceae)*". *Phytochemistry*. 65:2369-2372
  
19. Umaña, E., Castro, O. (1990). "Chemical Constituents of *Verbena littoralis*". *Int. J. Crude Drug Res*. 3:175-176.
  
20. Deepak, M. y Handa, S. (2000 a). "*Anti-inflammatory activity and chemical composition of extracts of Verbena officinalis*". *Phytotherapy Research*. 14, 463–465.
  
21. Franke, A. y Rimpler, H. (1987). "*Vebraside, an iridoid glucoside from Verbena brasiliensis*". *Phytochemistry*. 11: 3015-3020.
  
22. Müller, A., Ganzera, M., Stuppner, H. (2004). "*Analysis of the Aerial Parts of Verbena officinalis L. by Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography*". *Chromatographia*. 60: 193-197.
  
23. Ono, M., Oishi, K., Abe, H., Masuoka, C., Okawa, M., Ikeda, T., Nohara, T. (2006). "*New Iridoid Glucosides from the Aerial Parts of Verbena brasiliensis*". *Chem. Pharm. Bull*. 54(10):1421-1424.



24. Valento, P., Andrade, P., Areias, F., Ferreres, F., Seabra, R. (1999). "Análisis of Vervain Flavonoids by HPLC/Diode Array Detector Method. Its Application to Quality Control". J. Agric. Food Chem. 47: 4579-4582
25. Casanova, E., García-Mina, J. M., Calvo, M. I. (2008). "Antioxidant and Antifungal Activity of *Verbena officinalis* L. Leaves". Plant Foods Hum Nutr. 63: 93-97.
26. Calvo, M.I., San Julián, A., Fernández, M. (1997). "Identification of the Major Compounds in Extracts of *Verbena officinalis* L. (Verbenaceae) by HPLC with Post-Column Derivatization". Chromatographia. 46: 241-244.
27. Li, Y., Matsunaga, K., Kato, R., Ohizumi, Y. (2001). "Verbenachalcone, a Novel Dimeric Dihydrochalcone with Potentiating Activity on Nerve Growth Factor-Action from *Verbena littoralis*". J. Nat. Prod. 64(6): 806-808
28. Bilia, A.R., Giomi, M., Innocenti, M., Gallori, S., Vincieri, F.F. (2007). "HPLCDAD-ESI-MS analysis of the constituents of aqueous preparations of verbena and lemon verbena and evaluation of the antioxidant activity". Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 46: 463-470.
30. Márquez, A.C., F. Lara O., B. Esquivel R., R. Mata E. (1999). "Plantas medicinales de México II. Composición, usos y actividad biológica". Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
31. Argueta, V.A., Cano, A.M.C. y Rodarte, M.E. (1994). "Atlas de la Medicina Tradicional Mexicana" 1ª. edición., Instituto Nacional Indigenista, México, 3:1374-1380.
33. Rzedowski, J., Rzedowski, G. C. (2001). Flora fanerogámica del Valle de México. 2a. edición. Instituto de Ecología A.C., México, pp. 622-624.



35. El-Naggar, J., Beal, L. (1980). "*Iridoids. A review*". *Journal of Natural Products*. 43: 649-707
36. Villaseñor. M. (2007). "Bioactivities of Iridoids". *Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry*. 6: 307-314
37. Sampaio-Santos, M., Kaplan, C. (2001). "*Biosynthesis Significance of Iridoids in Chemosystematics*". *J. Braz. Chem. Soc.* 12( 2):144-153.
38. Dinda, B., Debnath, S., Harigaya, Y. (2007). "*Naturally Occurring Iridoids. A Review, Part 1*". *Chem. Pharm. Bull.* 55(2):159-222
39. Sanchez, F.E.(2006). "*Síntesis stereo selectivas de terpenoides bioactivos via procesos radicalarios*". Tesis Doctoral Facultad de Ciencias, Universidad de Granada.
40. Meinwald, J., Jones, T. H., Eisner, T., Hicks, K. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 74, 2189-2193
41. Pagnoni, U. M., Pinetti, A., Trave, R., Garanti, L. *Aust. (1976). J. Chem.*, 29, 1375-1381
42. Joshi, K. C., Singh, P.; Taneja, S., Cox, P. J., Howie, R. A., Thomson, R. H. (1982). *Tetrahedron*, 38, 2703-2708.
43. Abe, F., Okabe, H., Yamauchi, T. (1977). *Chem. Pharm. Bull.*, 25, 3422-3424
44. Bartholomaeus, A., Ahokas, J. (1995). *Toxicology Lett*, 80, 75-83.
45. Yamazaki, M., Chiba, K. (2005). *J. of Health Science*, 51, 687-692



46. Cavill, G. W. K., Ford, D. L., Locksley, H. D. (1956). *Aust. J. Chem*, 9, 288-293.
47. Morota, H., Nishimura, H., Sasaki, Chin, M., Sugama, K., Katsuhara, T. (1989) *Phytochemistry*, 28, 2385-2391.
48. Marini-Bettolo, G. B.; Nicoletti, M.; Messana, I.; Patamia, M.; Galeffi, C.; Oguakwa, G.; Vaciago, A. (1983). *Tetrahedron*, 39, 323-329
49. Sakan, T.; Murai, F.; Hayashi, Y.; Honda, Y.; Shono, T.; Nakajima, M.; Kato, M. (1967). *Tetrahedron*, 23, 4635-4652.
50. Fukuyama, Y., Minoshima, Y., Kishimoto, Y., Chen, I., Takahashi, H., Esumi, T. (2004). "Iridoid glucosides and *p*-coumaroyl iridoids from *Viburnum luzonicum* and their cytotoxicity". *J. Nat. Prod.* 67: 1833-1838.
51. Wang, Y., Wei, Q., Yang, Li., Liu, Z.L. (2003). "Iridoid glucosides from Chinese herb *Lonicera chrysatha* and their antitumor activity". *Journal of Chemical Research*. 10: 676-677
52. Küpeli, E., Harput, U.S., Varel, M., Yesilada, E., Saracoglu, I. (2005). "Bioassay-guided isolation of iridoid glucosides with antinociceptive and anti-inflammatory activities from *Veronica anagallis-aquatica* L." *Journal of Ethnopharmacology* 102: 170-176.
53. Cheng-Shan, Y., Qi, Z., Wei-Dong, X., Xiu-Ping, Y., Zhong-Jian, J. (2003). "Iridoids from *Pedicularis kansuensis* forma *albiflora*" *Pharmazie*. 58: 428- 430.
54. Gamboa, F., Herazo, B. y Martínez, MC. (2004). "Control microbiológico sobre *Streptococcus mutans* y su acción acidogénica", *Revista de la Facultad de Ciencias, Universidad Scientiaru*, 9, 45-55.



55. Singleton, V. L., Orthofer, R. y Lamuela-Raventós, R. M. (1999). “*Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent*”. *Methods in enzymology* 299, 152-178.
56. Pourmorad, F. Hosseinimehr, S. J., Shahabimajb, N. (2006). “*Antioxidant activity of some selected Iranian medicinal plants*”. *African Journal of biotechnology*, 5 , 1142-1145
57. Shriner, R., Fuson, R., Curtin, D. (1997). “*Identificación Sistemática de Compuestos Orgánicos*”. Edit. Limusa, México. p. 269.
58. Van Den Dool, H. y Krats Dec, P. (1963). “*A generalization of the retention index system including linear temperature programmed Gas-Liquid partition chromatography*”. *Journal of Chromatography*, 11, 463-471.
59. Rivero-Cruz, J. F., 2008 “*Antimicrobial compounds isolated from Haematoxylon brasiletto*”, *Journal of Ethnopharmacology*, 119, 99-103.
60. Rajnikant, M. L., Gupta, V.K., Singh, A., Suri, O.P. (1998). “*Crystal structure of 1 $\alpha$ -( $\beta$ -D-glucopyranosyloxy)-1,4 $\alpha\alpha$ ,5,6,7,7 $\alpha\alpha$ -hexahydro-7 $\alpha$ -methyl-5-oxocyclopenta[c]pyran-4-carboxylic acid methyl ester (Verbenalin)*”. *Crystallography Reports*. 43(3): 487-492
61. Andary, C., Wilde, R., Laffite, R., Privat, G. y Winternitz, F. (1982). “*Structures of verbascoside and orobanchoside, caffeic acid sugar esters from Orobanche rapum-genistae*”. *Phytochemistry*. 21(5):1123-1127.
62. Rimpler, H. Schäfer, B. (1973). “*Hastatosid, ein neues iridoid aus Verbena officinalis und Verbena hastata (Verbenaceae)*” *Tetrahedron letters*, 17:1463-1464.



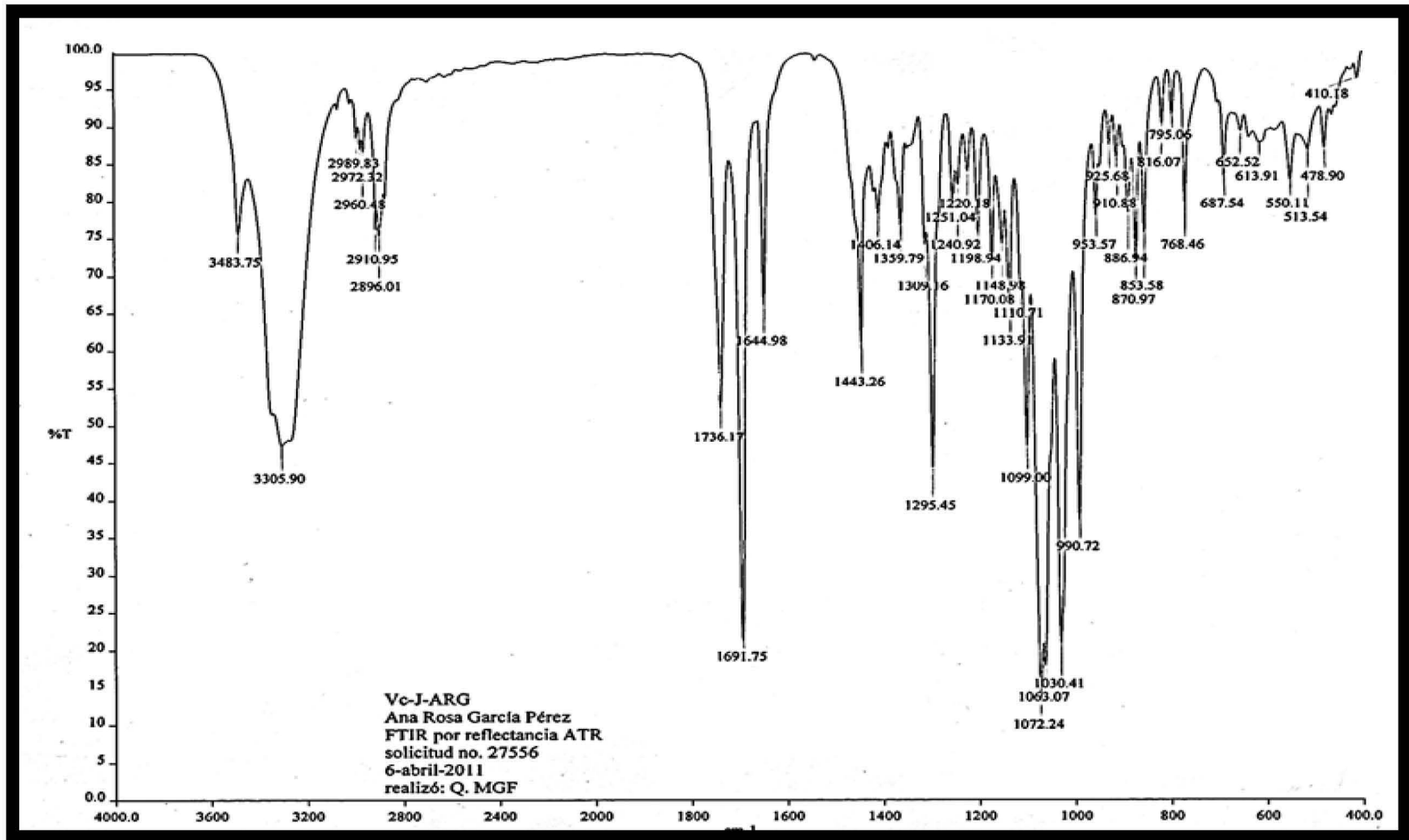
**63.** Morales, R.A. (2009). *“Aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana de la planta medicinal Verbena carolina L. (Verbenaceae)”*. Tesis de licenciatura (Químico Farmacéutico-Biólogo), Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México, DF

**64.** Arisawa, M, Fukuta, M; Shimizu, M. y Morita, N. (1979) *“The constituents of the leaves of Comanthosphace japonica S. Moore (Labiatae): Isolation of two new flavones glycosides, comanthosides A and B”* Chemical and Pharmaceutical Bulletin 27(5) 1252-1254.

**65.** Murata, T., Watahiki, M., Tanaka, Y. Miyase, T., Yoshizaki, F. (2010) *“Hyaluronidase inhibitors from Takuran, Lycopodium lucidus”* Chemical and Pharmaceutical Bulletin 58(3) 394-397.

Sitios de internet

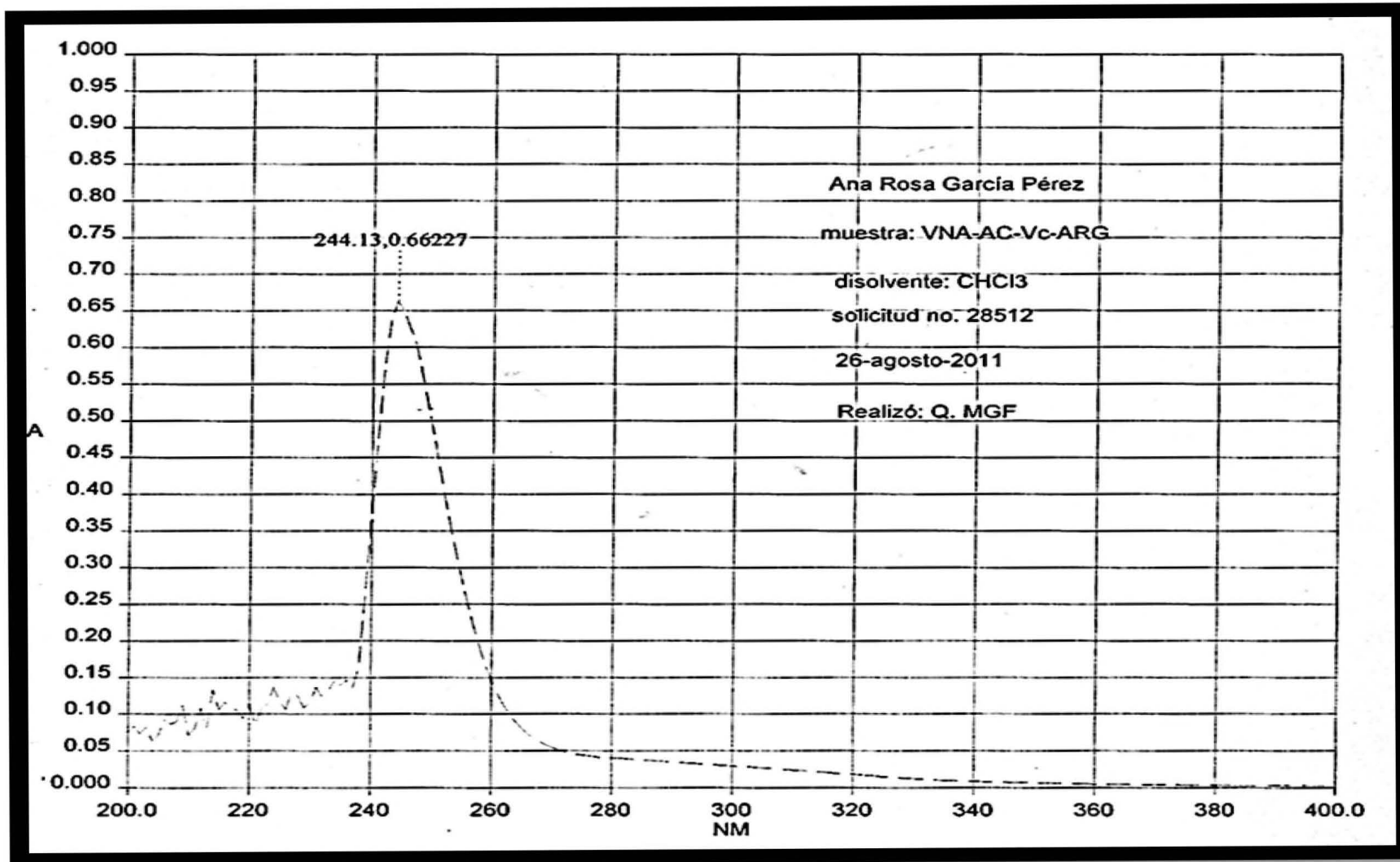
**29.** <http://www.itis.gov/>.



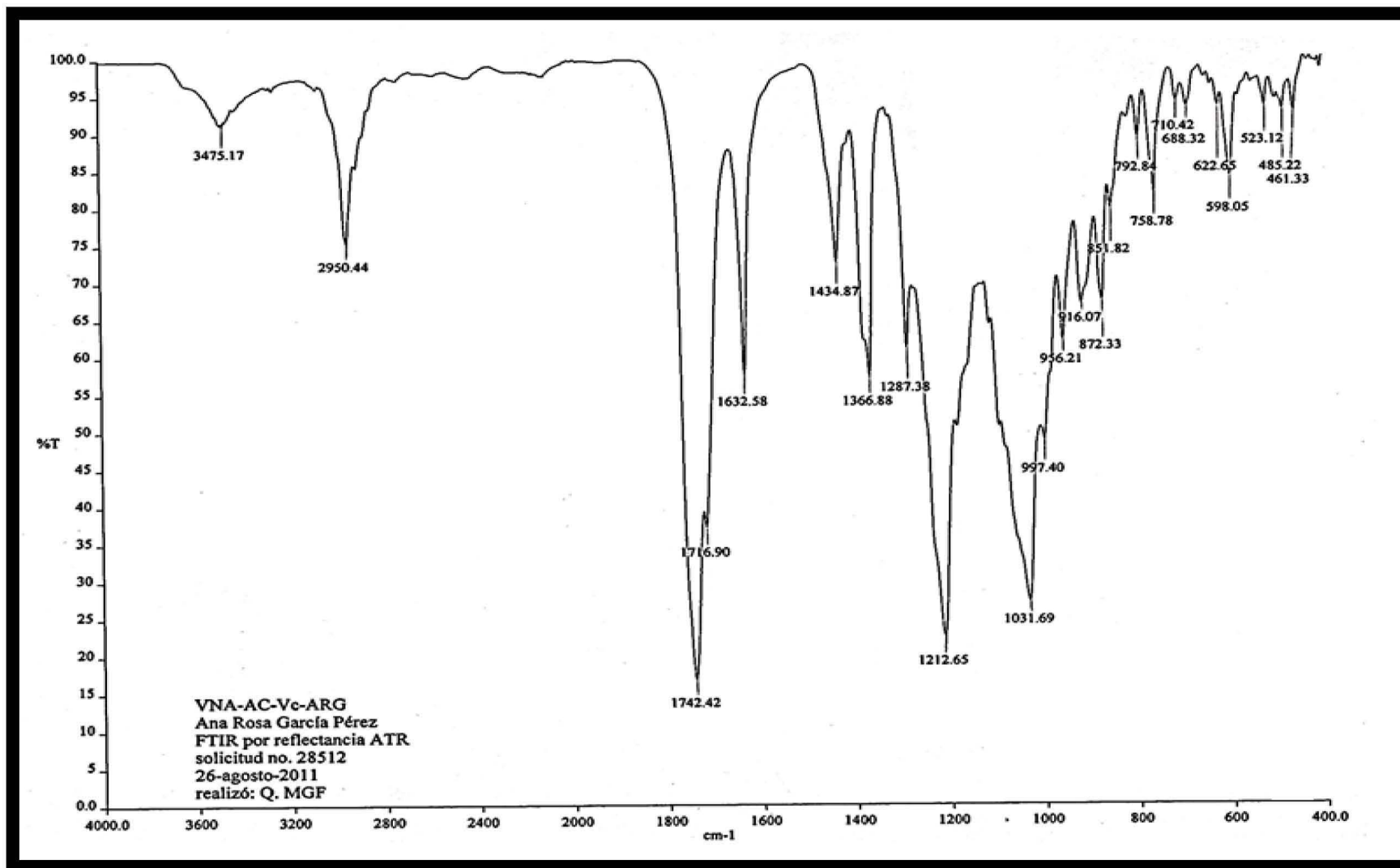
Espectro 01. Espectro en el IR de la Verbenalina (1)



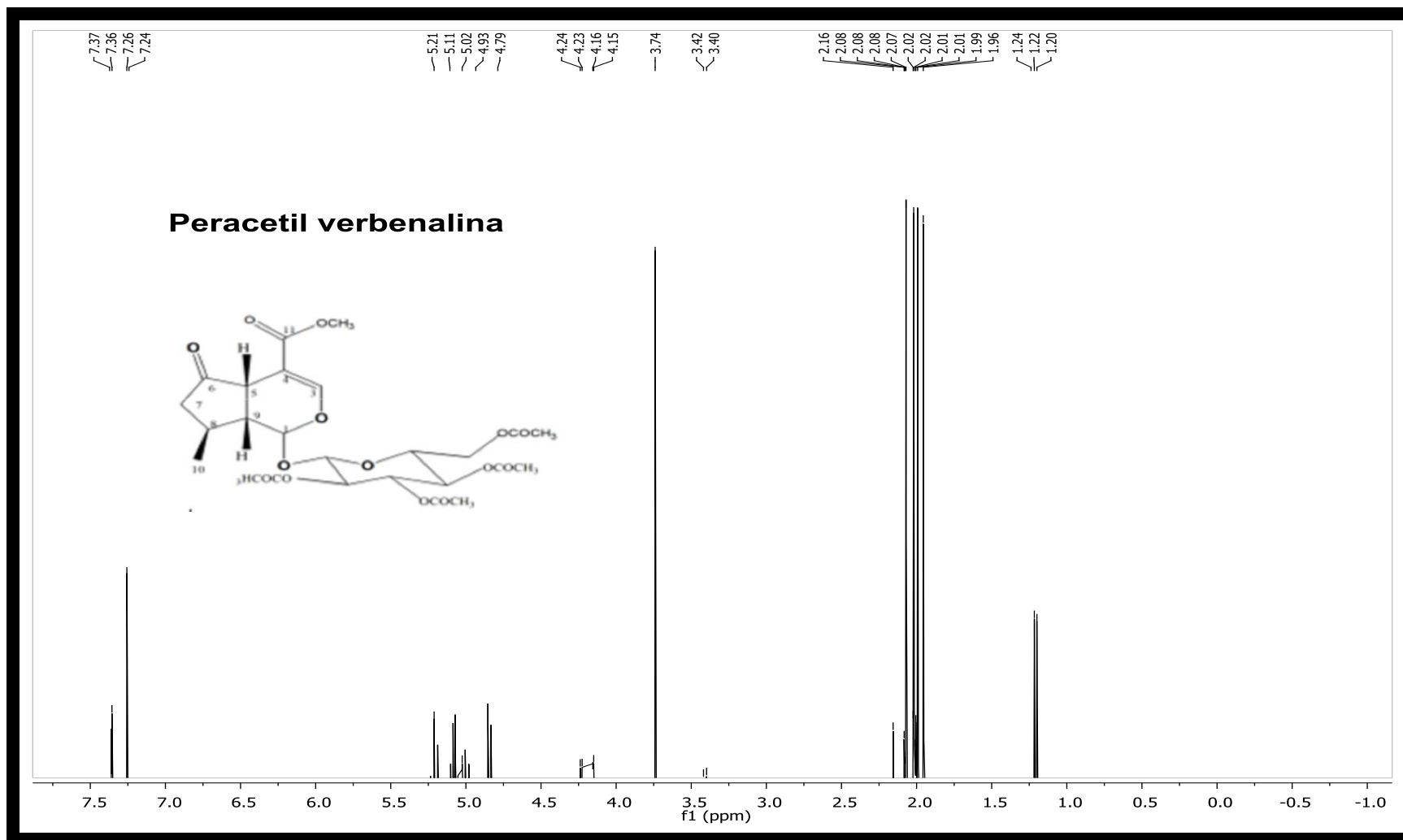




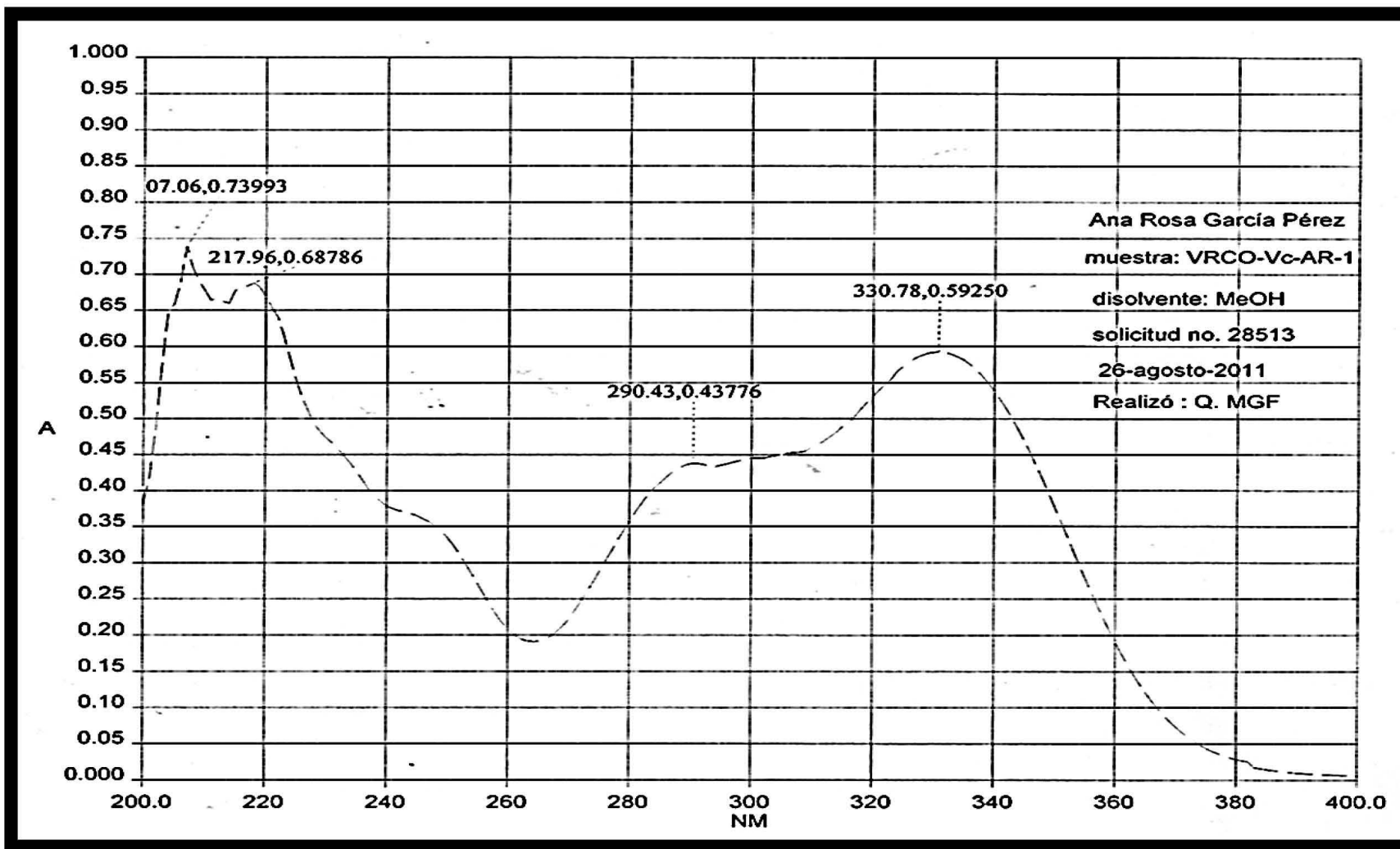
**Espectro 03.** Espectro en el UV del derivado peracetilado de la verbenalina



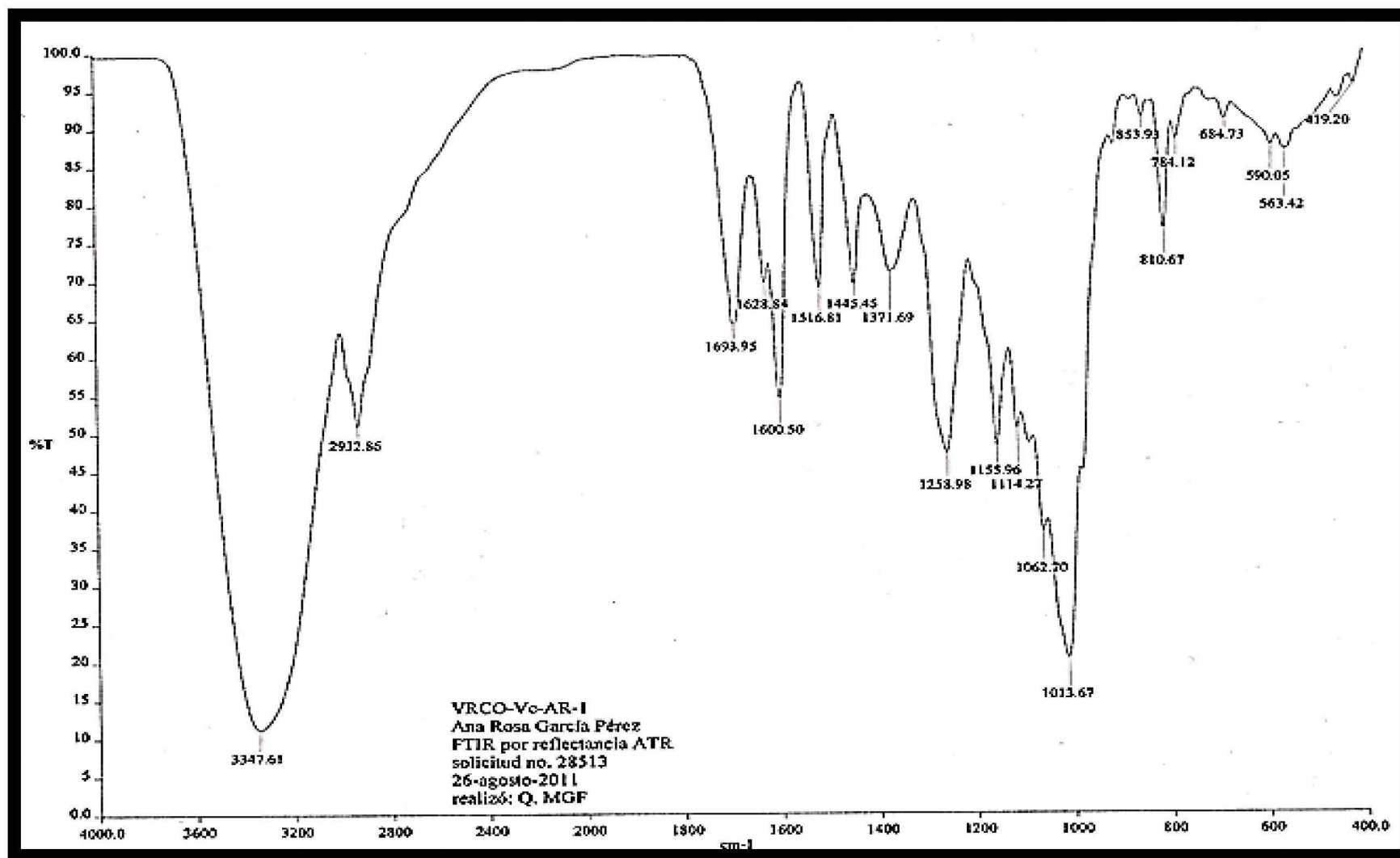
**Espectro 04.** Espectro IR del derivado peracetilado de la verbenalina



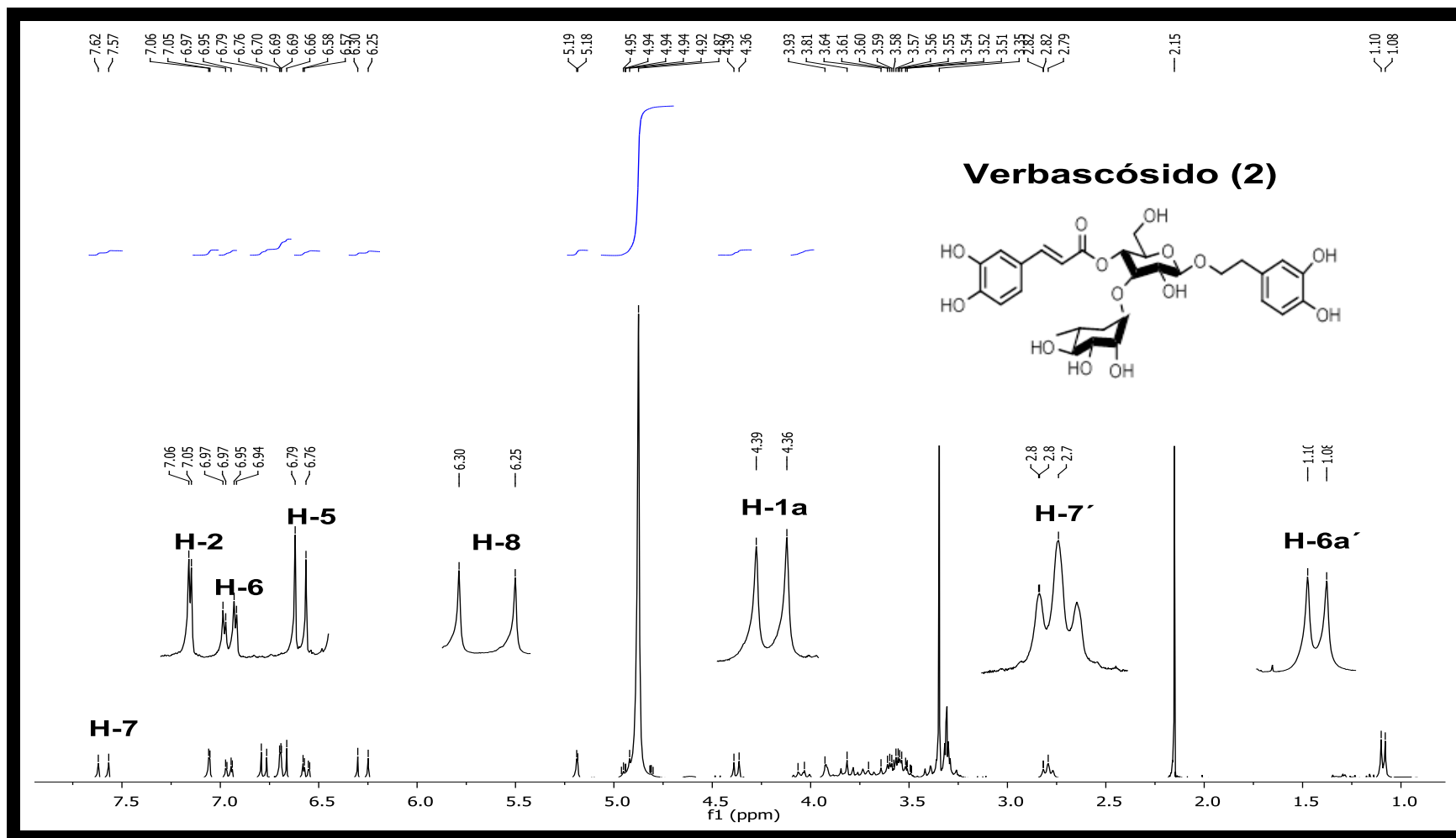
**Espectro 05.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>Cl) del derivado peracetilado de la verbenalina



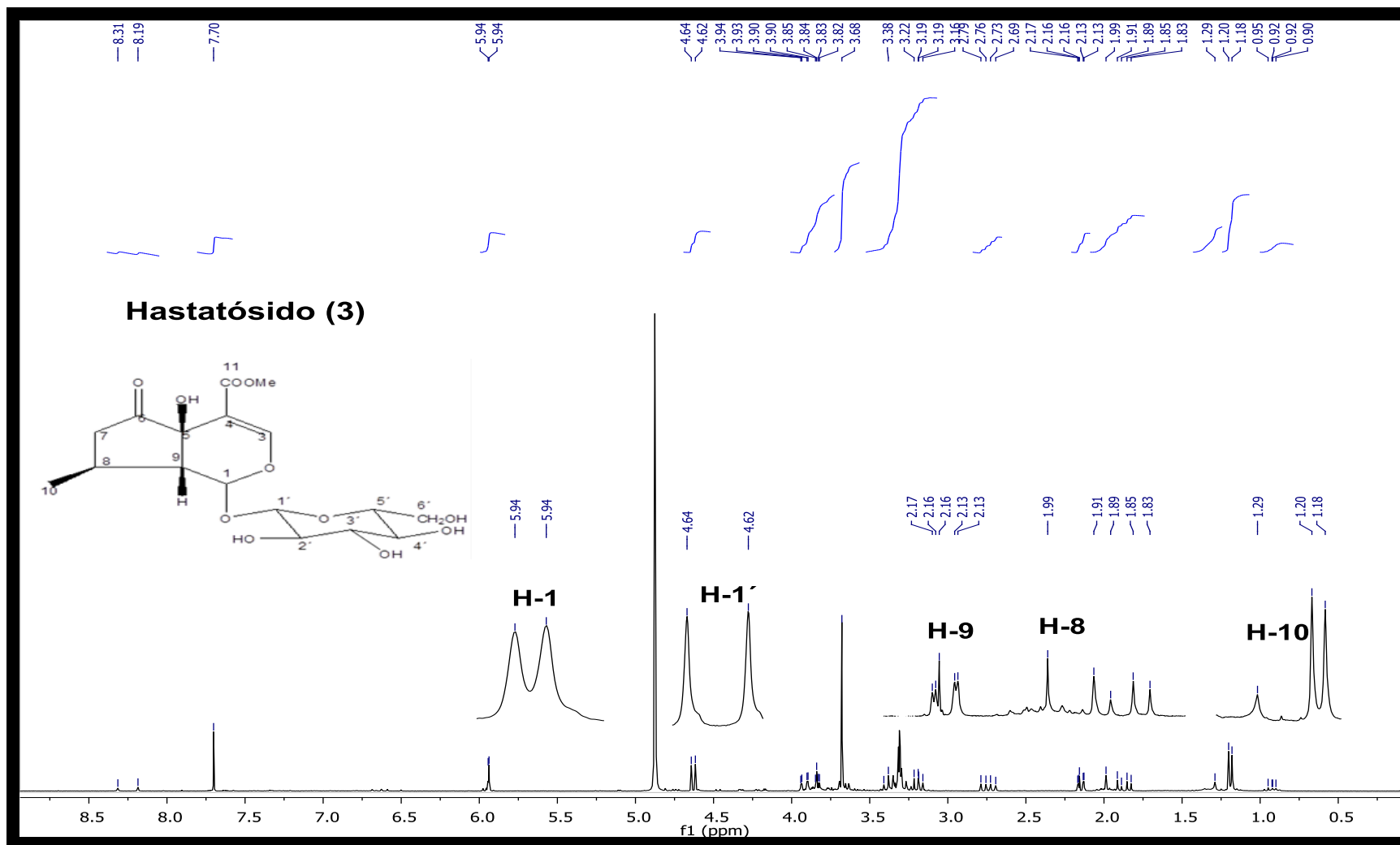
**Espectro 06.** Espectro en el UV del Verbascósido (2)



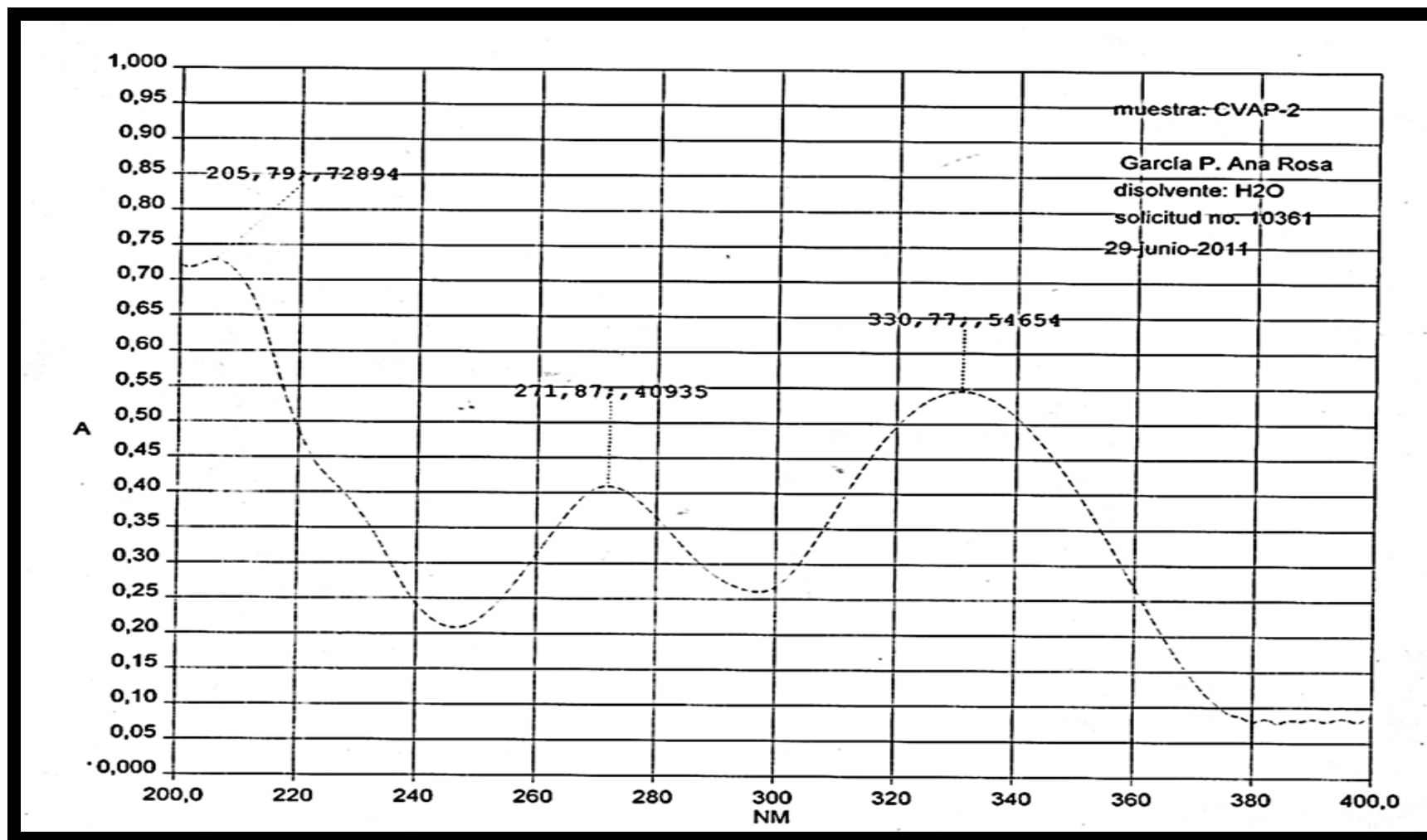
**Espectro 07.** Espectro en el IR del Verbascósido (2)



**Espectro 08.**Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, MeOD) del Verbascósido (2)

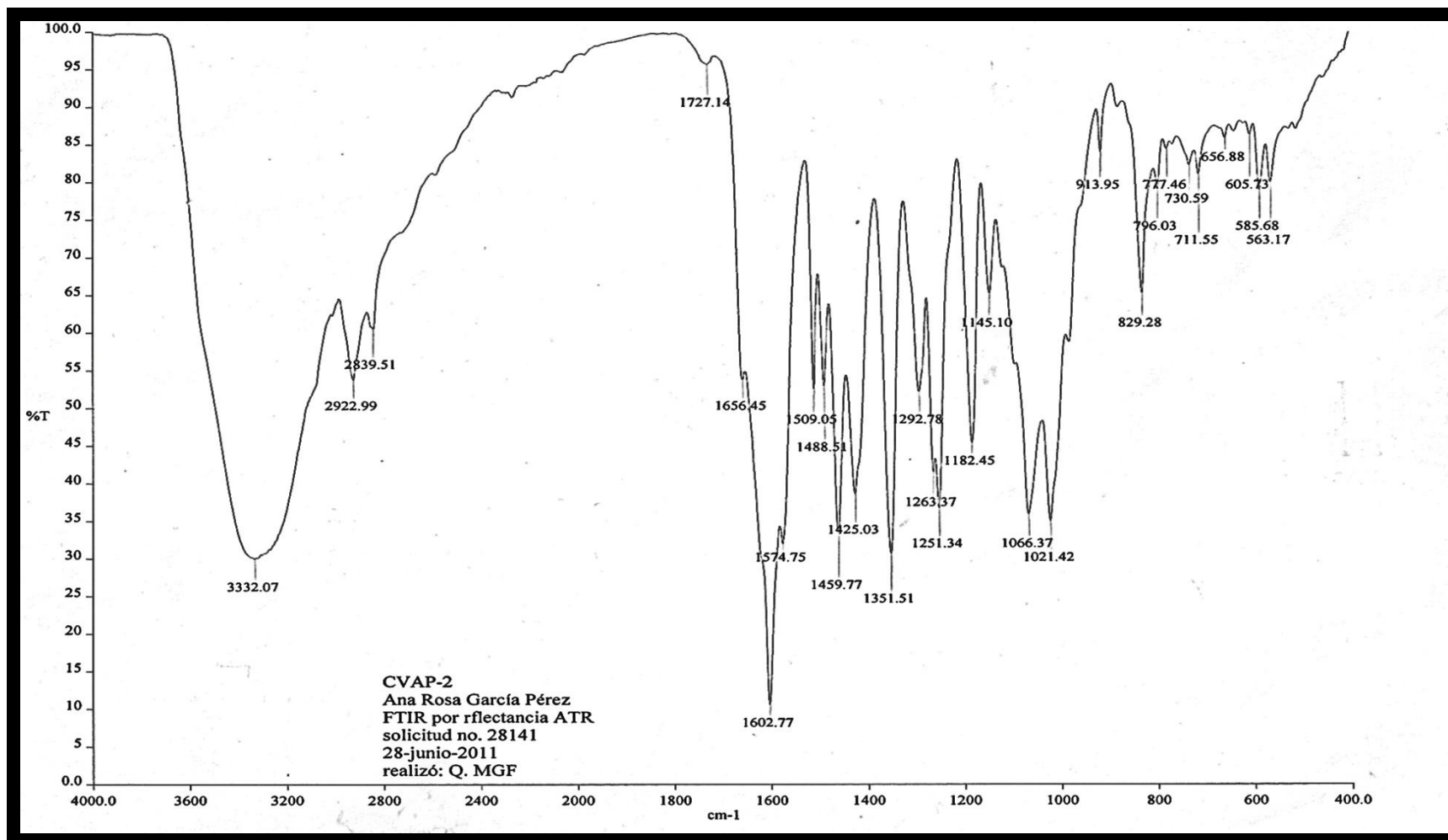


**Espectro 09.**Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (300 MHz, MeOD) del hastatósido (3)

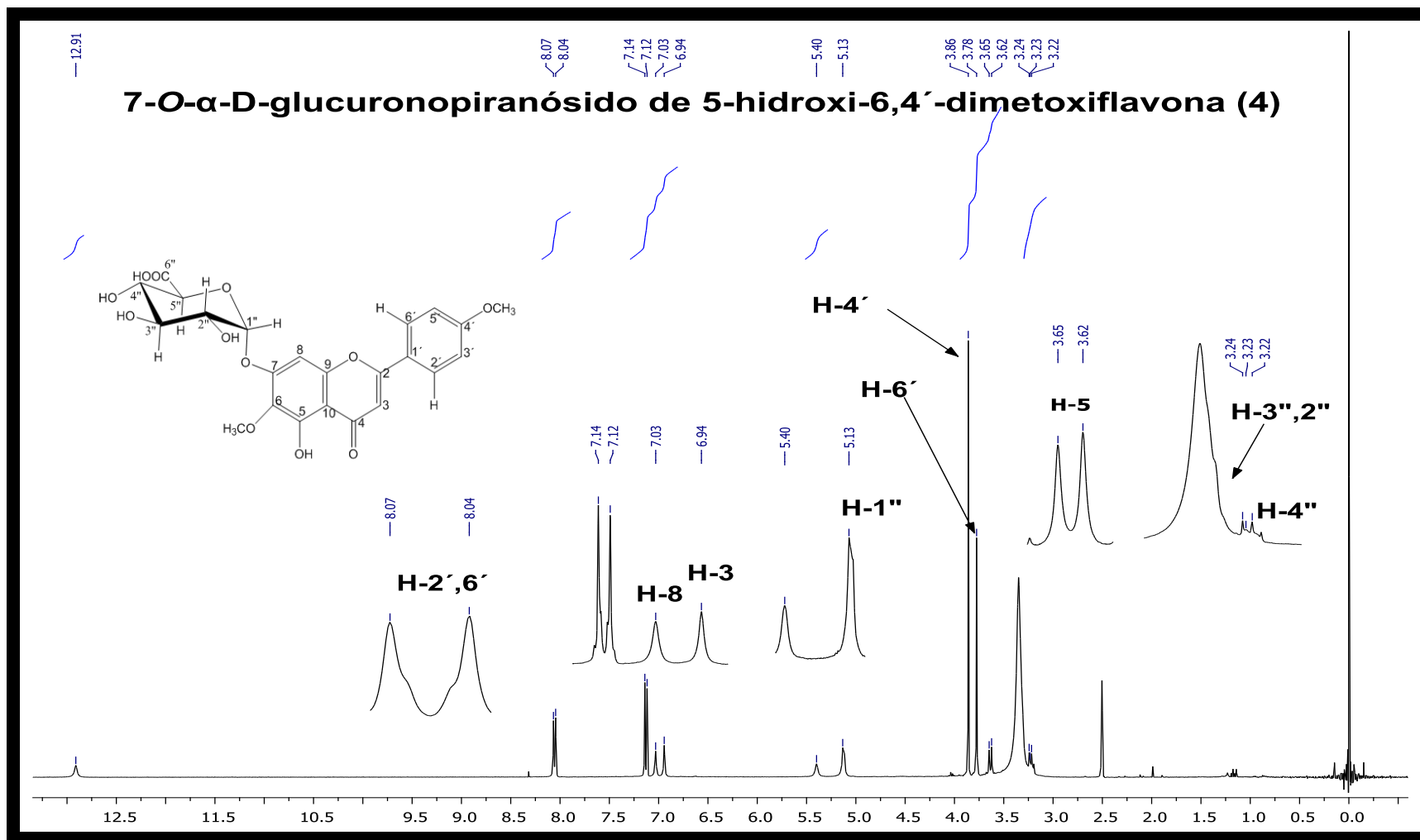


**Espectro 10.** Espectro en el UV del 7-O- $\alpha$ -D-glucuronopiranosido de 5-hidroxi-6,4'-dimetoxiflavona (4)

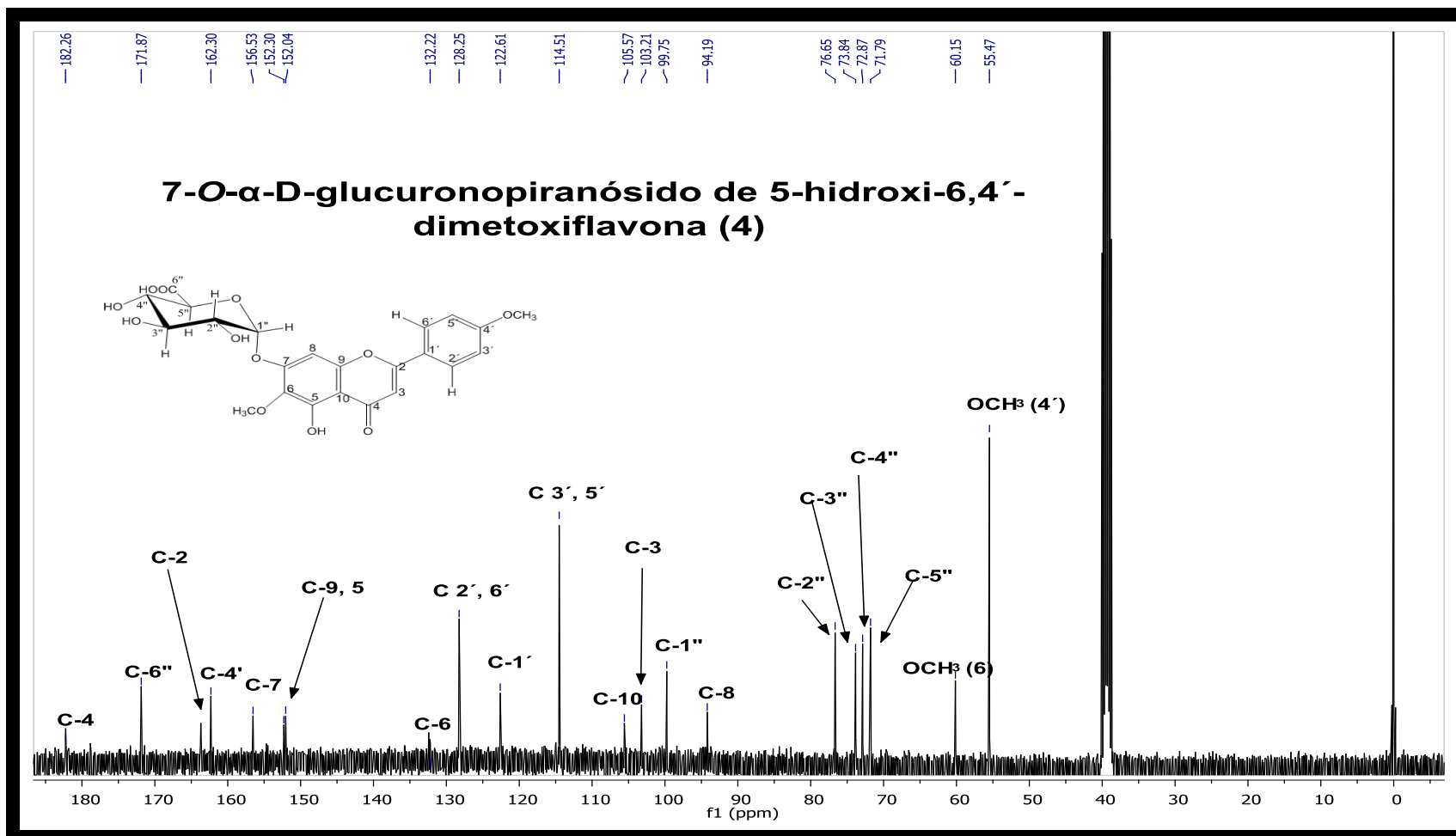




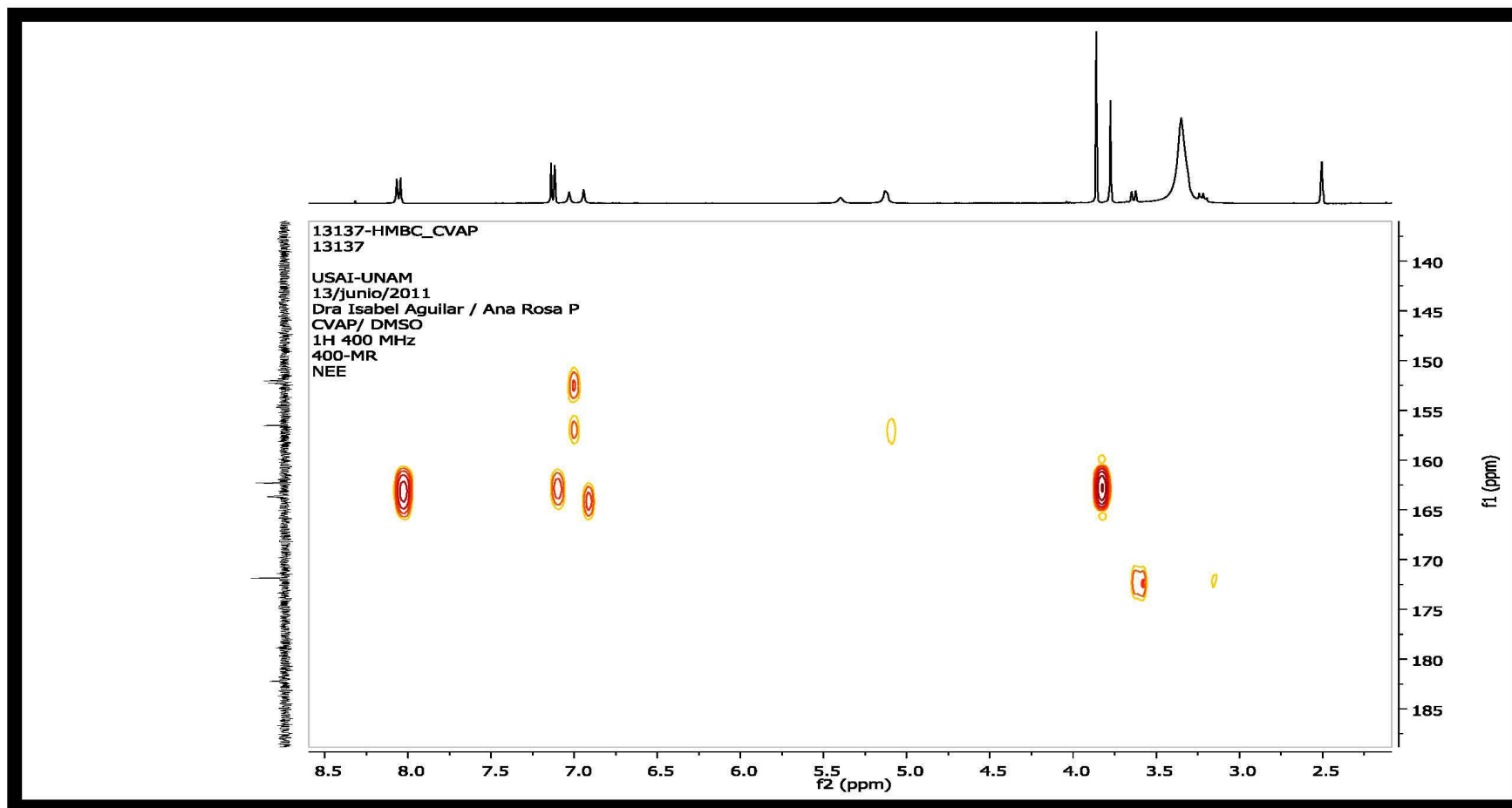
**Espectro 11.** Espectro en el IR del-7-O- $\alpha$ -D-glucuronopiranosido de 5-hidroxi-6,4'-dimetoxiflavona (4)



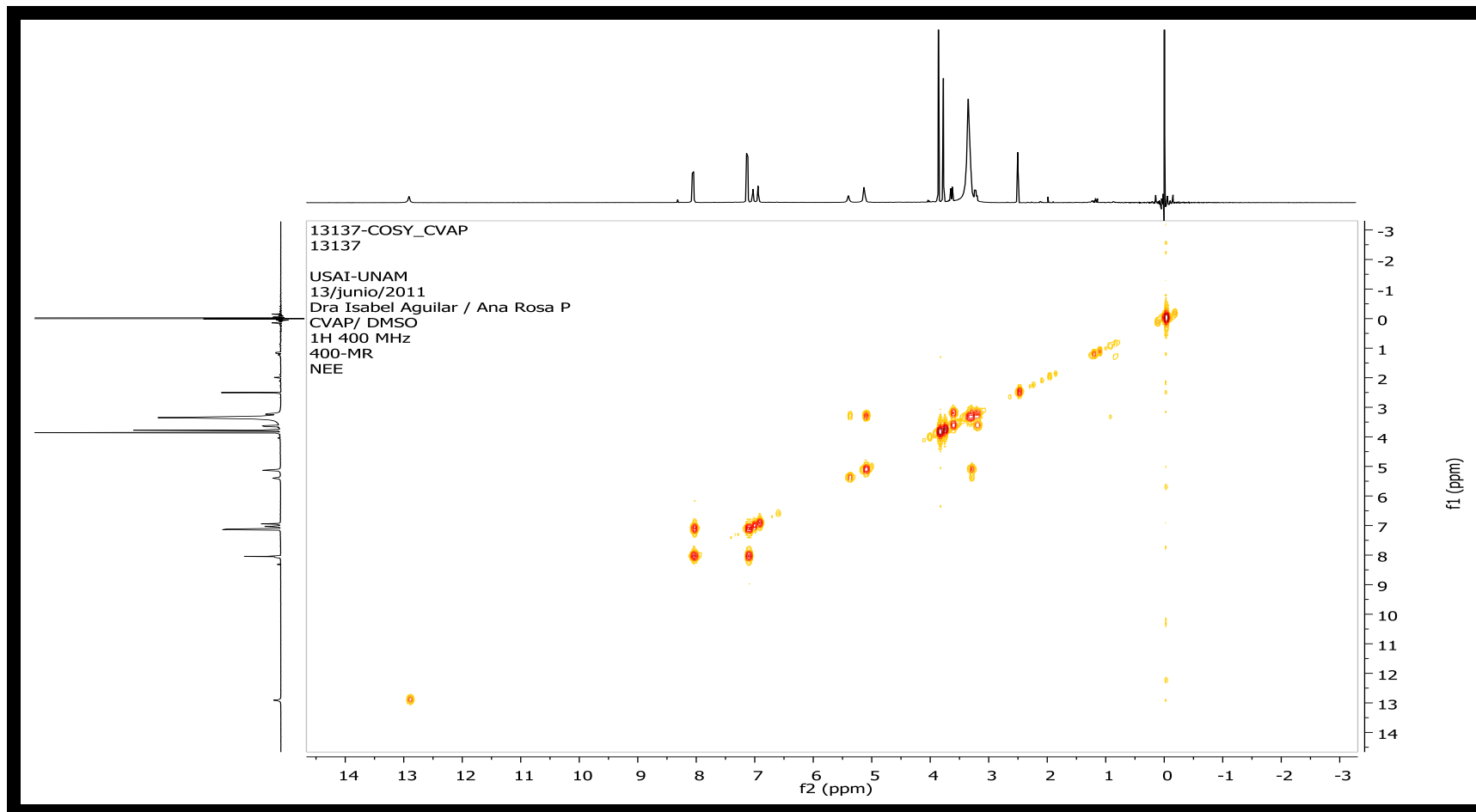
**Espectro 12.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $d_6$ ) 7-O- $\alpha$ -D-glucuronopiranósido de 5-hidroxi-6,4'-dimetoxiflavona (4)



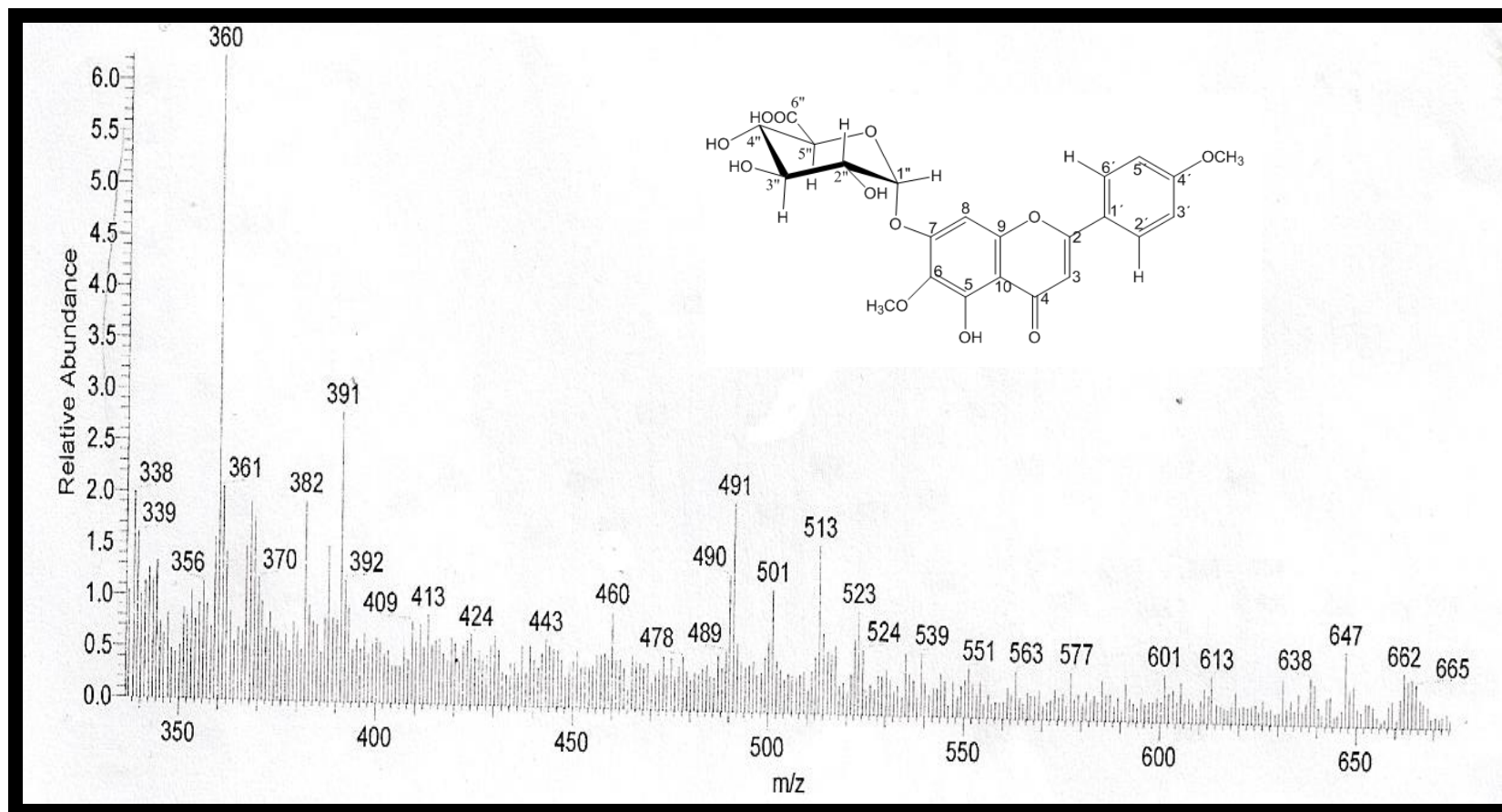
**Espectro 13.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) de 7-O- $\alpha$ -D-glucuronopiranosido de 5-hidroxi-6,4'-dimetoxiflavona (4)



**Espectro 14.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) modalidad HMBC de 7-O-α-D-glucuronopiranosido de 5-hidroxi-6,4'-dimetoxiflavona (**4**)



**Espectro 15.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ) modalidad COSY de 7-O- $\alpha$ -D-glucuronopiranosido de 5-hidroxi-6,4'-dimetoxiflavona (**4**)



**Espectro 16.** Espectro de masas modalidad FAB<sup>+</sup> de 7-O-α-D-glucuronopiranosido de 5-hidroxi-6,4'-dimetoxiflavona (4)