



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**AISLAMIENTO MEDIANTE CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE LOS  
CONSTITUYENTES DE LA ESPECIE *HYPTIS PECTINATA***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGA**

PRESENTA

**DAMARIS LUCERO FLORES SUÁREZ**



MÉXICO. CDMX.

2016



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**

Presidente: María Isabel Aguilar Laurents  
Vocal: Rachel Mata Essayag  
Secretario: Rogelio Gregorio Pereda Miranda  
1° suplente: Mario Alberto Figueroa Saldívar  
2° suplente: Mabel Clara Fragoso Serrano

### **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Departamento de Farmacia, Laboratorio 123.

Facultad de Química.

Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor de tema:

\_\_\_\_\_  
Rogelio Gregorio Pereda Miranda

Supervisor técnico:

\_\_\_\_\_  
Mabel Clara Fragoso Serrano

Sustentante:

\_\_\_\_\_  
Damaris Lucero Flores Suárez

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES .....	5
2.1. Generalidades de la familia <i>Lamiaceae</i> .....	5
2.2. Características del genero <i>Hyptis</i> .....	7
2.3. Metabolitos del género <i>Hyptis</i> .....	9
2.3.1. Terpenoides.....	9
2.3.2. Flavonoides .....	10
2.3.3. Lignanós .....	11
2.3.4. 5,6-dihidro-alfa-pironas.....	12
2.4. Descripción de <i>Hyptis pectinata</i> .....	14
2.4.1. Usos tradicionales .....	16
2.5. Química de <i>Hyptis pectinata</i> .....	17
3. HIPÓTESIS.....	20
4. OBJETIVOS.....	21
4.1. Objetivo general.....	21
4.2. Objetivos específicos .....	21
5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL .....	22
5.1. Material vegetal.....	22
5.1.1. Extracción del material vegetal .....	22
5.1.2. Eliminación de triterpenos .....	22
5.2. Instrumental analítico .....	23
5.3. Técnicas cromatográficas .....	23
5.3.1. Cromatografía en columna abierta .....	23
5.3.2. Cromatografía en capa fina .....	23
5.3.3. Cromatografía de líquidos de alta resolución .....	23
5.4. Fraccionamiento primario del extracto clorofórmico C-1 .....	24
5.4.1. Fraccionamiento secundario de las fracciones 8 y 9. ....	25
5.5. Fraccionamiento primario del extracto clorofórmico C-2.....	26
5.6. Análisis y purificación por CLAR .....	27
5.7. Ensayo de citotoxicidad .....	27

5.7.1. Líneas celulares.....	27
5.7.2. Dilución de las muestras.....	28
5.7.3. Suspensión celular .....	28
5.2.3. Bioensayo .....	29
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN. ....	30
6.1. Estudio químico de <i>Hyptis pectinata</i> .....	30
6.2. Aislamiento y purificación de los compuestos A, B y C.....	30
6.3. Caracterización de 2(5H)-furanona.....	35
6.3.1. Resonancia magnética nuclear .....	35
6.4. Caracterización de la salvigenina. ....	39
6.4.1. Resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas. ....	39
6.5. Caracterización de 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona .....	41
6.5.1. Resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas .....	41
6.6. Ensayo de citotoxicidad. ....	44
7. CONCLUSIONES. ....	45
8. PERSPECTIVAS. ....	45
9. BIBLIOGRAFIA. ....	46

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> La ilustración del Códice Badiano de la planta "Xoxouhcapahltli" (Izquierda), "vernaculo de Huitsiqua"(Centro) y la "Hierba del burro" (Derecha).....	4
<b>Figura 2.</b> Distribución de la familia Lamiaceae en México. ....	5
<b>Figura 3.</b> Ejemplos de plantas pertenecientes a la familia <i>Lamiaceae</i> . ....	7
<b>Figura 4.</b> <i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit., "hierba del burro". ....	14
<b>Figura 5.</b> Estructura del timol y halos de inhibición desarrollados en <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> .....	17
<b>Figura 6.</b> Estructura de los compuestos aislados. ....	30
<b>Figura 7.</b> Cromatograma de líquidos a nivel analítico de la fracción F4. ....	31
<b>Figura 8.</b> Cromatograma de líquidos a nivel preparativo de la fracción F4.....	32

<b>Figura 9.</b> Cromatograma de la purificación del pico dos de la fracción F4 .	32
<b>Figura 10.</b> Cromatograma de líquidos a nivel preparativo del pico 4 de fracción E9 mediante la técnica de reciclaje..	33
<b>Figura 11.</b> Cromatograma a nivel preparativo del pico 6 de la fracción E9..	34
<b>Figura 12.</b> Purificación del pico 6 de la fracción E9 mediante la técnica de reciclaje ..	34
<b>Figura 13.</b> Estructuras de la pectinólida G y de la 2(5)-furanona ..	35
<b>Figura 14.</b> Espectro de IR de la 2(5)-Furanona.	36
<b>Figura 15.</b> Espectro de <sup>13</sup> C-RMN de la 2(5)-furanona.	37
<b>Figura 16.</b> Espectro de <sup>1</sup> H-RMN de la 2(5)-furanona en CDCl <sub>3</sub> a 300 MHz.	38
<b>Figura 17.</b> Asignaciones de las señales en <sup>1</sup> H-RMN para la estructura de salvigenina.	40
<b>Figura 18.</b> Espectro de <sup>1</sup> H-RMN de la salvigenina.	40
<b>Figura 19.</b> Asignaciones de las señales en <sup>1</sup> H-RMN para la 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona.	42
<b>Figura 20.</b> Espectro de <sup>1</sup> H-RMN de la 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona.	42
<b>Figura 21.</b> Espectro de masas por impacto electrónico (70 eV).	43
<b>Figura 22.</b> Fragmentación por impacto electrónico de la 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona.	43

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Usos de algunas de las plantas pertenecientes a la familia Lamiaceae.	6
<b>Cuadro 2.</b> Principales usos de diversas especies del genero Hyptis.....	8
<b>Cuadro 3.</b> Clasificación taxonómica de Hyptis pectinata.	15
<b>Cuadro 4.</b> Columnas usadas en la cromatografía de líquidos.	24
<b>Cuadro 5.</b> Fraccionamiento primario.	25
<b>Cuadro 6.</b> Fraccionamiento secundario.	26
<b>Cuadro 7.</b> Fraccionamiento primario del extracto C-2.	26
<b>Cuadro 8.</b> Condiciones de separación y análisis de fracciones mediante CLAR.....	27
<b>Cuadro 9.</b> Desplazamientos químicos ( $\delta$ ) y constantes de acoplamiento de los espectros de <sup>13</sup> C-RMN (100 MHz) y <sup>1</sup> H-RMN de la 2(5)-furanona (400 MHz).....	38
<b>Cuadro 10.</b> Valores de Cl <sub>50</sub> para los compuestos y los extractos completos.	44

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
CCF	Cromatografía en capa fina
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
cm	Centímetros
Hex	Hexano
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria media
MHz	MegaHertz
MeOH	Metanol
µg	Microgramos
µL	Microlitros
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
min	Minutos
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear de hidrogeno
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
ppm	Partes por millón
THF	Tetrahidrofurano
t <sub>R</sub>	Tiempo de retención
UV	Luz ultravioleta

## 1. INTRODUCCIÓN

En México, la medicina tradicional tiene un importante valor histórico, en el cual los mercados indígenas constituyen espacios multiculturales y de convergencia entre una gran diversidad de productos naturales, estudiados parcialmente en su mayoría, pero aprovechados por hombres y mujeres de manera considerable. La posición geográfica de México confiere una envidiable diversidad biológica y cultural en la mayoría de su territorio, asociada a una variedad de microambientes y microclimas.

Estudios antropológicos y arqueológicos demuestran el extendido uso medicinal que tenían las plantas dentro de las antiguas culturas alrededor del mundo. Unos cuantos ejemplos de los documentos que existen acerca del uso terapéutico de las plantas son los ideogramas sumerios que datan de hace 2,500 años A. C. haciendo referencia al uso medicinal de las plantas, el papiro egipcio de Ebers (1500 A.C.) y la obra de Dioscórides, un médico y botánico de la antigua Grecia, en su obra *De Materia Medica* (ca. 50-68 DC) que fue el principal manual de historia natural europea durante la Edad Media hasta el Renacimiento (Gunther, 1968). Este manuscrito que describe cerca de 600 hierbas medicinales y remedios naturales conocidos en la antigüedad es el predecesor de los libros sobre hierbas (libros florísticos) o “herbarios” de uso entre los siglos XVI y XIX y del Recetario Florentino (1498), considerado la primera farmacopea (Puerto Sarmiento, 1993). (Cortez-Gallardo *et al.*, 2004; Ríos *et al.*, 2012).

En nuestro país, el Códice de la Cruz- Badiano (*Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*, Opúsculo sobre las hierbas medicinales de los pueblos indígenas) fue obra del médico indígena Martín de la Cruz, originario de Santiago Tlatelolco y asociado al Colegio de la Santa Cruz de Tlatelolco, quien dictó en náhuatl varios remedios contra diversas enfermedades y que el xochimilca Juan Badiano, estudiante del colegio, traduciría al latín. Esta obra de poca extensión provee información sobre el uso de 227 plantas medicinales usadas por los aztecas antes del arribo de los españoles (Viesca y Ramos de Viesca, 2012). Es ilustrada rústicamente, a la manera de los libros florísticos medievales, contiene material gráfico valioso que

ha permitido la identificación de varias de las especies medicinales de la herbolaria prehispánica y se terminó el 22 de julio de 1552. A pesar de su importancia, la versión del latín al español la hizo Ángel María Garibay y sólo se publicó en la segunda mitad del siglo XX (Martín de la Cruz, 1964) después del descubrimiento en la Biblioteca Vaticana del manuscrito que se creía perdido y su divulgación en la versión inglesa hecha por Emily Emmart (1940).

Otra valiosa fuente para el conocimiento de la herbolaria mexicana es la *Historia general de las cosas de Nueva España*, la cual es una obra enciclopédica sobre la gente y la cultura del centro de México compilada por fray Bernardino de Sahagún (1499-1590), un misionero franciscano que llegó a México en 1529, ocho años después de que Hernán Cortés finalizara la conquista española (Cárdenas, 2003). El manuscrito, al que comúnmente se llama *Códice Florentino*, escrito entre los años de 1540 y 1585, ya que se encuentra resguardado en la Biblioteca Medicea Laurenciana de Florencia, Italia, consta de 12 libros dedicados a diferentes temas. El libro XI, el más largo del código, es un tratado de historia natural. Siguiendo la división tradicional de conocimiento común en muchas obras enciclopédicas europeas, el *Códice Florentino* trata sobre «todo lo divino (o más bien idólatra), humano y natural de la Nueva España». Por lo tanto, después de haber hablado de seres superiores y de seres humanos, Sahagún examina los animales, las plantas y todos los tipos de minerales. Para el análisis de las hierbas medicinales y los minerales, Sahagún se basó en el conocimiento de los médicos indígenas en las poblaciones de Tlatelolco, Texcoco y Tenochtitlán, además de informes de los estudiantes indígenas trilingües formados por el fraile en el Colegio de la Santa Cruz de Tlatelolco en la Ciudad de México, y creó lo que el erudito Miguel León-Portilla ha llamado una especie de farmacología prehispánica (León Portilla, 1974).

La tercera fuente indispensable del siglo XVI para el estudio de la herbolaria precortesiana es el manuscrito “*Historia Plantarum Novovae Hispaniae*”, redactado por el médico español Francisco Hernández, quién fue elegido por Felipe II para dirigir la primera expedición científica a América. Desde marzo de 1574 y hasta su vuelta a España en 1577, Hernández vivió en la Nueva España donde formó una

colección, estudió las prácticas medicinales locales y realizó estudios arqueológicos. Durante estos años formó una considerable colección de plantas secas, 38 volúmenes de dibujos y numerosas notas, tres de las cuales están escritas en Náhuatl. Hernández murió antes de ver su obra publicada. Dado su coste, Felipe II encargó al médico napolitano, Nardi Antonio Recchi, la publicación de una versión abreviada. Los originales se conservaron en la Biblioteca de El Escorial pero desaparecieron, seguramente destruidos durante el incendio de 1671. Por lo tanto, sólo se conocen fragmentos de su inmensa obra. Sucesivos retrasos (el editor murió prematuramente) llevaron a que la obra abreviada no se publicara hasta 1635 y 1651 con el título de *Rerum medicarum Novae Hispaniae Thesaurus, seu Plantarum, Animalium, Mineralium Mexicanorum Historia*.

En años recientes, el estudio de estas fuentes permitió a un grupo de investigación etnofarmacológica del Instituto Mexicano del Seguro Social, encontrar el principio activo del *cihuapahltli* o zoapatle (*Montanoa tomentosa*). De la Cruz cita que este vegetal se empleaba para facilitar el parto. Las investigaciones clínicas ratificaron que el zoapatle contiene un poderoso oxitócico que provoca la contracción del útero (Levine *et al.*, 1981). Toda la sabiduría contenida en estos libros y manuscritos coloniales ha sido utilizada por químicos orgánicos mexicanos de este siglo, que han sobresalido en el terreno internacional con sus investigaciones sobre productos naturales. Así, la evaluación de los extractos provenientes de plantas superiores continúa representando una alternativa para el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos de interés clínico en el tratamiento de enfermedades neoplásicas (Donaldson y Cates, 2004). Los agentes quimioterapéuticos de mayor uso comprenden a un grupo numeroso de compuestos de origen natural y semisintético de gran diversidad.

El género *Hyptis*, un miembro de la familia de las labiadas (Lamiaceae), el cual se encuentra conformado por un gran número de especies de gran importancia económica y medicinal en la vida diaria de nuestro país, constituye una fuente de principios citotóxicos novedosos que incluyen lignanos y C<sub>6</sub>-alquenil-5,6-dihidro-alfa-pirona (Pereda-Miranda, 1995). Una de las plantas medicinales utilizadas por los pueblos mesoamericanos y cuyos usos se registraron en el Códice Badiano y

en las obras de Hernández y Sahagún es la “huitsiqua” o “xoxouhcapahtli” para el tratamiento de la disentería y los tumores. Reumatismo, llagas e infecciones oculares también son aliviados por la decocción de esta planta (Figura 1).

Miranda y Valdés (1964) indican que indudablemente es una labiada, quizá una especie de *Hyptis*. El jugo de la planta y los extractos de las hojas y las semillas fueron utilizadas en una poción y un lavado para curar la gota, el reumatismo y los dolores musculares. Decocciones de *Hyptis pectinata* (L.) Poit., conocida como hierba del burro por la población rural de Veracruz, se utilizan en la medicina popular contemporánea como un remedio doméstico para las mismas enfermedades que se mencionaron en los manuscritos coloniales para el “xoxouhcapahtli”, así como un agente antiséptico para las infecciones de la piel y para el tratamiento de la rinofaringitis y de los pulmones congestionados.

La presente disertación describe el aislamiento, la purificación y la caracterización estructural de tres de los constituyentes mayoritarios presentes en la planta *Hyptis pectinata* que cuenta con importantes propiedades farmacológicas descritas en la literatura tales como la actividad relajante del músculo liso y efectos antiinflamatorios, antipiréticos, antifúngicos y antimicrobianos (Pereda-Miranda, 1995).



**Figura 1.** La ilustración del Códice Badiano de la planta "Xoxouhcapahtli" (Náhuatl, medicina azul; *Xoxouhca*, azul; *pahtli*, medicina), utilizada para tratar el dolor de las rodillas -como lo indica la anotación en latín *poplitis dolor*- fue identificada como una labiada, quizá del género *Hyptis* (Izquierda). En el manuscrito de Hernández también se ilustra esta planta y se menciona que en Michoacán se conoce con el nombre vernáculo de *huitsiqua* (Centro). Las propiedades terapéuticas de este remedio indígena coinciden con la descripciones contemporáneas para la hierba del burro, *Hyptis pectinata* (L.) Poit. (Derecha); Poiteau, *Annales du Muséum National d'Histoire Naturelle*, 1806, vol. 7: Lámina 30).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Generalidades de la familia *Lamiaceae*

Es una de las familias más diversas de la República Mexicana, solo después de las familias *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Poaceae*, *Orchidaceae*, *Cactaceae*, *Euphorbiaceae* y *Rubiaceae* (Martínez *et al.*, 2013), y está representada por 512 especies y 27 géneros que pertenecen a seis tribus, de las cuales la más diversa es *Menthae*. En México, como se presenta en la Figura 2 se encuentra distribuida particularmente a lo largo de las zonas montañosas y de manera primordial en el eje neovolcánico transversal (Martínez *et al.*, 2013). Una de las características anatómicas de la familia es la presencia de glándulas secretoras de aceites esenciales en los tejidos epidérmicos foliares, los aceites de estas glándulas proporcionan a estas especies su aroma.



**Figura 2.** Distribución de la familia *Lamiaceae* en México.

La particularidad de la familia *Lamiaceae*, también llamadas labiadas, es su corola de cinco pétalos soldados que usualmente es bilabiada con un característico labio inferior, el cual presenta tres lóbulos en los que aterrizan los insectos (los mayores polinizadores de esta familia). Para garantizar la polinización, las lamiaceas producen mucho néctar, a menudo en un disco nectarífero ubicado en la base del ovario, y para facilitar la polinización presentan sus estambres aplicados sobre el

labio superior de la corola, con sus antenas dirigidas hacia adelante, de tal forma que cuando los insectos se posan sobre el labio inferior (que actúa como plataforma) impregnan su dorso con el polen. Entonces cuando penetran en otra flor provocan la polinización que resulta favorecida en las flores receptoras por un estilo a menudo arqueado y sobresaliente (Izco *et al.*, 1998).

Las labiadas son de gran importancia económica debido a su utilidad en la gastronomía (*Origanum*), en la medicina tradicional (*Salvia*, *Thymus*), en la industria farmacéutica (*Mentha*, *Melissa*), de la cosmética (*Ocimum*) y de la perfumería (*Lavandula*), además de que se cultivan en jardines como plantas ornamentales (Perva *et al.*, 2001; Pereda-Miranda, 1995). Sus constituyentes medicinales incluyen aceites esenciales, taninos, saponinas y ácidos orgánicos que pueden tener propiedades sedativas, diuréticas, antiespasmódicas, antisépticas, antibacterianas, antivirales, antifúngicas, nematocidas y carminativas (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Usos de algunas de las plantas pertenecientes a la familia *Lamiaceae*.

Nombre científico	Parte de la planta	Constituyentes químicos	Usos
<i>Ocimum sanctum</i>	Hojas frescas	Cineol	Saborizante, expectorante.
<i>Mentha piperita</i>	Flores frescas	Mentol, limoneno	Saborizante, irritaciones de la piel, náusea, diarrea, flatulencias.
<i>Thymus vulgaris</i> <i>Thymus zygis</i>	Hojas secas y flores	Timol, carvacol, $\alpha$ y $\beta$ terpineno	Saborizante, laringitis, diarrea, antifúngico, antiparasitario.
<i>Mentha spicata</i> <i>Mentha cardiaca</i>	Hojas y flores frescas	45-60% carvona y cineol	Saborizante.
<i>Coleus forskohlii</i>	Raíz seca	Forskolin, coleonol-B, coleonol-C, deoxicoleonol	Vasodilatador y cardioestimulante, glaucoma.

Los miembros de esta familia son principalmente plantas herbáceas y arbustos, dentro de la familia no se conocen epifitas, saprofitas o parasitas. Sus tallos son tetraangulares, con hojas simples, opuestas y con decusadas sin estípulas. Con frecuencia están cubiertas de pelos y glándulas que emiten fragancia. El calis está

fusionado en forma de campana o de cono, algunas veces bilabiadas con pétalos fusionados en pentámeros; cuatro o dos epipétalos, sea iguales o de dos longitudes, ovario súpero de dos carpelos fusionados, los cuales forman cuatro lóculos distintos cada uno con un lóbulo basal. Usualmente el sitio es ginobásico. El fruto consiste de cuatro nueces parecidas a aquenio indehiscentes con una semilla. Existe una gran variedad de formas de corola y posición estaminal dentro de la familia, usualmente con una clara división entre el labio superior e inferior (Domínguez-Vázquez *et al.*, 2002) (Figura 3).



**Figura 3.** Ejemplos de plantas pertenecientes a la familia *Lamiaceae*.

## 2.2. Características del género *Hyptis*

El género *Hyptis* comprende varias especies de gran importancia en la medicina tradicional mexicana (e.j. *Hyptis suaveolens*, la chia; *Hyptis albida*, la salvia blanca). Este género, con más de 250 especies tiene su centro de origen y diversificación en las tierras altas brasileñas siendo el límite en su distribución boreal el sur de los Estados Unidos. El género se encuentra dividido en 27

secciones y en México se localizan 8 secciones que agrupan a 33 especies, siendo endémicas del país solo 22 especies. Estas especies se distribuyen principalmente en las partes tropicales del sur y a lo largo de ambas costas del territorio nacional. Las secciones *Rhytidea*, *Umbellatae* y *Laniflorae* son las más notables en México y se localizan en el oeste, el occidente y el centro del país. Las secciones *Minthidium*, *Mesosphaeria* (subsección *Pectinaria*), *Polydesmia* (subsección *Vulgaris*), *Cephalohyptis* (subsecciones *Marrubiastrae* y *Genui*) y *Pusillae* tiene una distribución tropical en el sur de la República Mexicana (Ramamoorthy *et al.*, 1998).

El género *Hyptis* cuenta con un gran número de especies utilizadas en la medicina tradicional mexicana como remedios caseros para el tratamiento de malestares gastrointestinales e infecciones de la piel, así como para tratar dolores reumáticos, musculares, calambres y también como condimento en la cocina por sus diversas propiedades; en el Cuadro 2 se indican algunos de sus usos para diversas especies. Todas las especies medicinales comparten su uso como agentes carminativos y antisépticos (Pereda-Miranda, 1995).

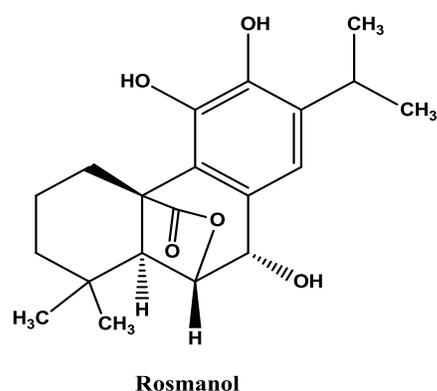
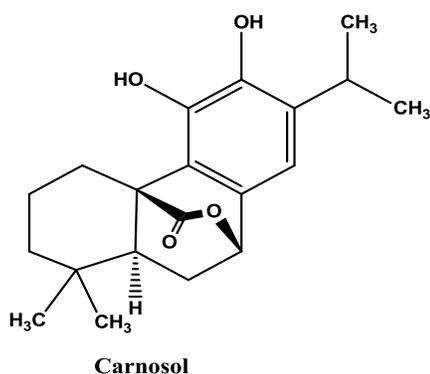
**Cuadro 2.** Principales usos de diversas especies del genero *Hyptis*.

<b>Especie</b>	<b>Uso</b>
<b><i>Hyptis albida</i></b>	Contra afecciones gastrointestinales, como repelente de insectos y antiséptico.
<b><i>Hyptis brevipes</i></b>	Como antifúngico, antibacteriano, agente intercalante del ADN y contra el asma.
<b><i>Hyptis capitata</i></b>	Contra el resfriado, fiebre y asma; como antifúngico y hemostático.
<b><i>Hyptis mutabilis</i></b>	En los trastornos gastrointestinales; contra infecciones de la piel, malaria, conjuntivitis, paludismo, flatulencias, menstruación excesiva y como antiparasitario.
<b><i>Hyptis pectinata</i></b>	Como antibacteriano y antifúngico; en la nasofaringitis, congestión pulmonar y trastornos gastrointestinales.
<b><i>Hyptis spicigera</i></b>	Como antiséptico, carminativo, insecticida, contra la úlcera gástrica e infecciones de la piel.
<b><i>Hyptis suaveolens</i></b>	Aperitivo, contra la bilis y el estreñimiento, estimulante, carminativo y antiespasmódico.
<b><i>Hyptis verticillata</i></b>	Contra el reumatismo, en infecciones gastrointestinales y de la piel, como expectorante y, contra el resfriado y la fiebre.

## 2.3. Metabolitos del género *Hyptis*

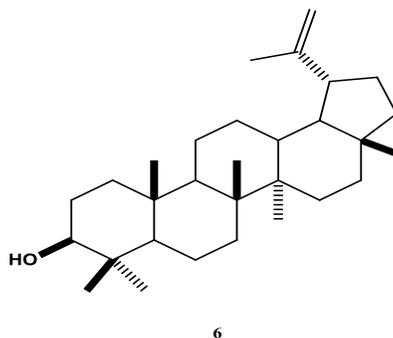
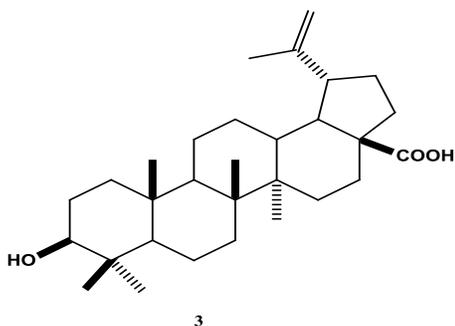
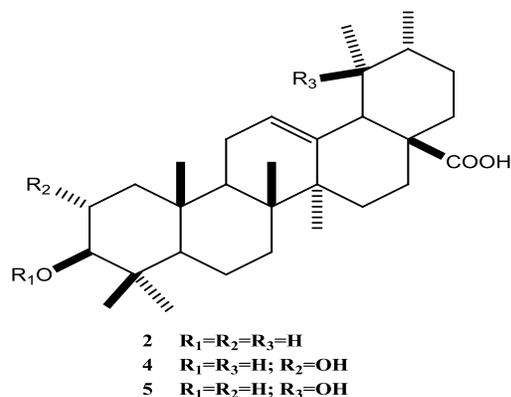
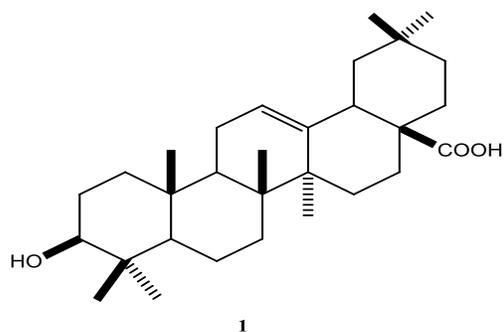
### 2.3.1. Terpenoides

En los aceites esenciales obtenidos del género *Hyptis* se han identificado monoterpenos como  $\alpha$ -pineno y sabieno; y también sesquiterpenos como  $\alpha$ -humuleno y  $\beta$ -cariofileno (Kini *et al.*, 1993). Otro tipo de terpenos que se han identificado son los diterpenos, estos metabolitos representan uno de los grupos más abundantes en el género, algunos de tipo abitano como carnosol, rosmanol y metilrosmanol (Mukherjee *et al.*, 1984).



Los triterpenos representan el grupo de metabolitos secundarios más abundantes y ampliamente distribuidos en las especies del género *Hyptis*. Se trata de derivados pentacíclicos con diferentes grados de oxidación que corresponden a las series lupano, oleanano y ursano (Pereda-Miranda y Gascon-Figueroa, 1988).

La actividad citotóxica observada en algunos estudios químicos de los extractos orgánicos de la familia de las labiadas se relaciona con la presencia de importantes cantidades de triterpenos moderadamente citotóxicos, entre los que destacan los ácidos oleanólico (1), ursólico (2), betulínico (3), 2 $\alpha$ -hidroxiursólico (4), pomólico y lupeol (6) (Pereda-Miranda, 1995).



### 2.3.2. Flavonoides

La palabra flavonoide tiene su raíz en la palabra latina que significa amarillo “flavus”. Los flavonoides forman un grupo muy grande de productos naturales que contienen característicamente una estructura de esqueleto C6-C3-C6. Diferentes familias de plantas tienen patrones característicos de flavonoides y sus conjugados que desempeñan importantes funciones bioquímicas y fisiológicas en diversos tipos de células u órganos de la planta donde se acumulan dentro de las células. Los flavonoides difieren en la saturación del anillo heteroatómico C, y en los patrones generales de hidroxilación. Pueden ser modificados por hidroxilación, metoxilación, O-glicosilación de grupos hidroxilo, así como C-glicosilación directamente al átomo de carbono del flavonoide.

Los flavonoides se conocen desde finales del siglo pasado, conociéndose hasta la fecha 6000 compuestos diferentes, número que sigue aumentando, gracias a las diversas modificaciones que sufren de acuerdo con lo mencionado en el párrafo anterior (Harborne y Williams, 2000).

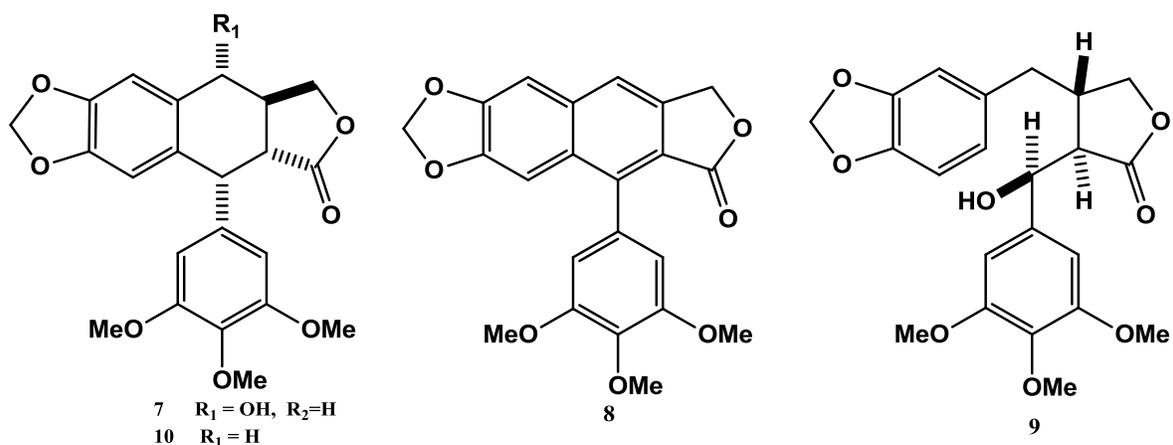
Se han podido identificar algunas flavonas en el género *Hyptis*. De *Hyptis verticillata* se aisló la sideroflavona con una  $CI_{50}$  de 1.6  $\mu\text{g/mL}$  contra el carcinoma epidermoide oral humano (KB) (Novelo *et al.*, 1993). Esta flavona inhibe la actividad de la prostaglandina sintetasa y presenta un efecto antiserotoninérgico (Kuhnt *et al.*, 1995). De *Hyptis fasciculata* se aislaron dos flavonas, cirsilineol y cirsimaritina con ligera actividad sobre *Helicobacter pylori* (Isobe *et al.*, 2006).

### 2.3.3. Lignanós

Se han aislado lignanos de algunas especies medicinales de *Hyptis* y posiblemente, este grupo de compuestos contribuye en gran medida al uso en la medicina tradicional de éstas, debido al gran espectro de actividades biológicas que poseen, entre las que desatacan las propiedades antimitóticas, antivirales, moduladores de diversas actividades enzimáticas y su toxicidad sobre hongos, insectos y vertebrados, entre otras (Charlton, 1998; MacRae y Towers, 1984).

A través del fraccionamiento biodirigido de los extractos citotóxicos de *H. verticillata*, se aislaron siete lignanos con esqueleto de ariltetralina, como la podofilotoxina (**7**) (Heinrich *et al.*, 1994); cuatro lignanos con núcleo arilnaftaleno, como el éter metílico de las deshidro- $\beta$ -peltatina (**8**) (Novelo *et al.*, 1993) y tres lignanos con esqueleto de dibencilbutirolactona, por ejemplo el podorrizol (**9**) (Kuhnt *et al.*, 1994). Esta especie se conoce en la medicina tradicional oaxaqueña como la hierba de San Martín, y representa una fuente alternativa a las especies de *Podophyllum* (Berberidaceae) como materia prima para la obtención de lignanos análogos a la podofilotoxina, compuesto que se emplea como un precursor de la semisíntesis del etopósido y tenipósido, agentes quimioterapéuticos de utilidad en el tratamiento de la leucemia y el cáncer testicular (Ruiz-Acevedo, 1996). En un estudio reciente (Orendaín, 2016) se caracterizaron seis lignanos mayoritarios responsables de la actividad tóxica de esta planta medicinal mexicana: la podofilotoxina, la deshidropodofilotoxina, la desoxipodofilotoxina, la yateína, la 5-metoxideshidropodofilotoxina y el glucósido de la  $\beta$ -peltantina. La podofilotoxina se describe por primera vez en una colecta

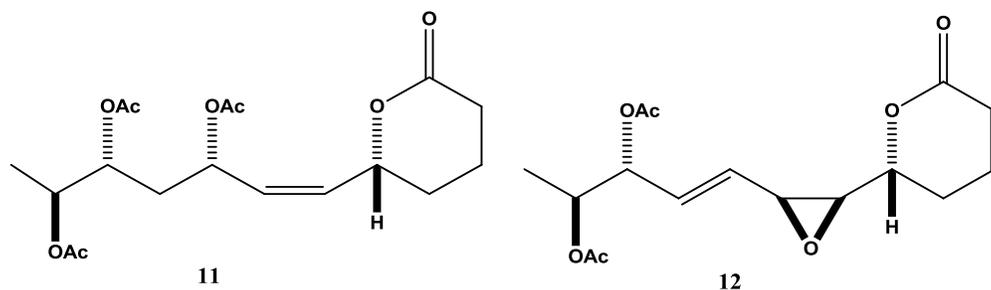
mexicana de *Hyptis verticillata* y el glucósido de la  $\beta$ -peltantina es reportado por primera vez en esta especie. De las partes aéreas de *Hyptis tormentosa* se aisló la desoxipodofilotoxina (**10**) (Kingston *et al.*, 1979).



#### 2.3.4. 5,6-dihidro-alfa-pironas

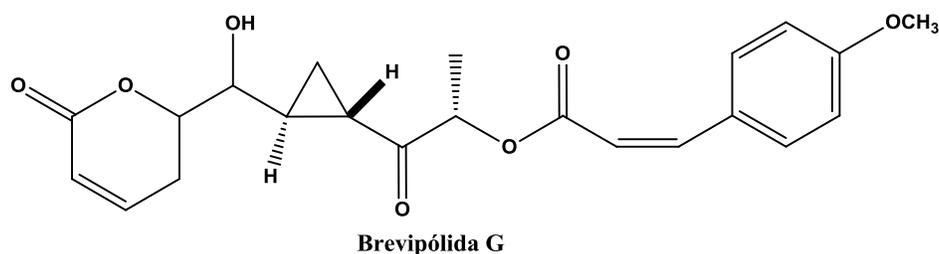
Las 5,6-dihidro-alfa-pironas se encuentran ampliamente distribuidas en las plantas y en los hongos. En las plantas, estos compuestos se asocian particularmente con las familias *Lamiaceae*, *Piperaceae*, *Lauraceae* y *Annonaceae*. Se han aislado a partir de todas las partes de la planta (Davies-Coleman y Rivet, 1989).

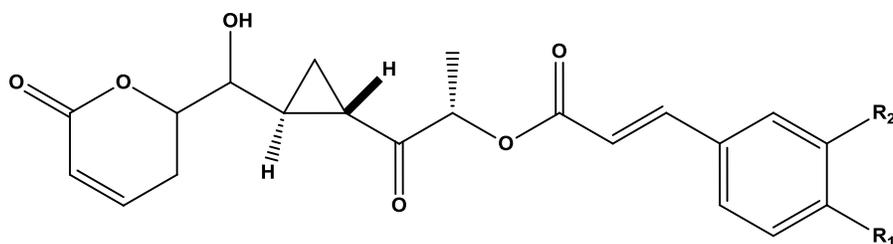
La primera  $C_6$ -alquenil-5,6-dihidro-alfa-pirona aislada en la familia de las labiadas fue la hiptólida (**11**) de *H. pectinata* (Achmad *et al.*, 1987). Del extracto acetónico de las partes aéreas de la especie mexicana *H. oblongifolia*, se aislaron cuatro 5,6-dihidro-alfa-pironas (Delgado *et al.*, 1985; Pereda-Miranda *et al.*, 1990), entre las cuales, la 5-desacetiloxi-5'-epi-olguina (**12**) demostró una actividad citotóxica significativa ( $CI_{50} < 4\mu g/mL$ ) contra líneas celulares de cáncer de pulmón, colon, carcinoma nasofaríngeo normal y resistente a la vinblastina, el carcinoma epidermoide humano y la leucemia linfocítica de múridos (Pereda-Miranda, 1995).



A partir de las partes aéreas de *H. spicigera* se logró el aislamiento de la spicigerólida, cuya estereoquímica se estableció a través de la aplicación de la mecánica molecular para el cálculo de las constantes de acoplamiento vecinales H1-H1 y se validó a través de la preparación del residuo acíclico a partir de L-ramnosa (Pereda-Miranda *et al.*, 2001).

En una investigación reciente sobre el extracto clorofórmico de las partes aéreas de *H. brevipes*, se encontraron nueve compuestos con un esqueleto de 6-heptil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas. Tres de ellos con una estructura conocida e identificada como las brevipólidas G-I, los cuales contienen un anillo de ciclopropano en su estructura; un compuesto nuevo con el mismo esqueleto pero mostrando un patrón de sustitución diferente. Todos los compuestos presentaron una citotoxicidad que va de moderada a buena, empleando seis líneas celulares derivadas de tumores humanos: HTC-15 (carcinoma de colon), MCF-7 (carcinoma de mama), KB (carcinoma nasofaríngeo), PC-3 (carcinoma de próstata), HeLa (carcinoma de Cervix) y Hep-2 (carcinoma de laringe), mostrando una pequeña selectividad hacia el carcinoma nasofaríngeo y carcinoma de cérvix con valores de IC<sub>50</sub> ( $\mu\text{g/mL}$ ) que van de 0.3 a 0.29 y 0.07 a 3.7, respectivamente (Suárez, 2013).





Brevipólida H	R <sub>1</sub> =OCH <sub>3</sub>	R <sub>2</sub> = H
Brevipólida I	R <sub>1</sub> =OH	R <sub>2</sub> = H
Brevipólida J	R <sub>1</sub> = OCH <sub>3</sub>	R <sub>2</sub> =OH

#### 2.4. Descripción de *Hyptis pectinata*

En México, *Hyptis pectinata* se conoce popularmente en los estados de Veracruz con el nombre de “hierba del burro” y con el nombre maya de “xoolté’xnuuk”, en Yucatán y en San Luis Potosí con el nombre huasteco (teenek) de “tsak maape” (Biblioteca Tradicional de la Medicina Mexicana, 2009). En Brasil, se conoce como “mercúrio do campo” o “canudinho” en los estados de Sergipe y Alagoas (Bispo *et al.*, 2001). En el resto de los países hispanoparlantes de América, se conoce como “poleo” (Renteria *et al.*, 2006).



**Figura 4.** *Hyptis pectinata* (L.) Poit., “hierba del burro”.

Es una planta originaria de América, pero se ha introducido en África y Asia. En México, se distribuye en el eje volcánico transversal, en el pacífico desde Nayarit hasta Chiapas, en los estados del golfo de México y de la península de Yucatán. Es abundante en América central y en las islas del caribe. En Sudamérica, se distribuye en los estados de la cuenca del mar caribe, en el litoral brasileño hasta el norte de Argentina y en la costa del pacifico hasta Perú y Bolivia. Es una planta de ruderal que aparece en hábitats alterados por la acción del ser humano, como bordes de caminos o zonas urbanas. Puede ser invasora de cultivos, jardines y huertos. La clasificación taxonómica de *H. pectinata* se presenta en la Cuadro 3.

**Cuadro 3.** Clasificación taxonómica de *Hyptis pectinata*.

<b>Reino</b>	Plantae
<b>División</b>	Magnoliophyta
<b>Clase</b>	Magnoliopsida
<b>Orden</b>	Lamiales
<b>Familia</b>	Lamiaceae
<b>Genero</b>	<i>Hyptis</i>
<b>Epítelo específico</b>	<i>Pectinata</i>
<b>Nombre científico</b>	<i>Hyptis pectinata</i>
<b>Especie</b>	<i>H. pectinata</i> (L.) Poit.

Son hierbas o arbustos pequeños, erectos hasta 2 m de alto (Figura 4), aromáticas con olor fétido; tallos jóvenes tomentosos. Hojas ovaladas o lanceoladas, 1.5-9 cm de largo y 1.3-6 cm de ancho, ápice agudo o acuminado (apiculado), base redondeada o truncada, margen serrado o biserrado (subentero), envés densamente tomentoso; pecíolo 0.4-6.5 cm de largo. Inflorescencia panícula de cimbras a veces amontadas y espiciformes, 0.3-0.6 cm de largo y 0.4-1 cm de ancho, (similar en fruto, pero más helicoidales), frecuentemente con 2-3 ramas helicoidales, 7-15 flores, pedúnculo 0.1-0.3 cm de largo, brácteas filiformes, 3-4 mm de largo, incóspicuas, hispadas o puberulentas; cáliz 2-2.5 mm de largo,

externamente en tubo veloso, internamente con tricomas exertos desde los senos, dientes espiniformes, erectos, 1.2-1.5 mm de largo, hispados; corola blanca, purpúreo pálida, anaranjado pálido, amarillo pálido o rojo-purpúrea, tubo 1.5-2 mm de largo, limbo 0.5-1.5 mm de largo. Cáliz fructífero 3.2-5 mm de largo y 1-1.2 mm de ancho, dientes 1.2-2 mm de largo; nuececillas 0.7-1 mm de largo, glabras y formando una espigas largas. En México, pueden crecer a la altitud del nivel del mar hasta 2,150 m (Missouri Botanical Garden, 2014).

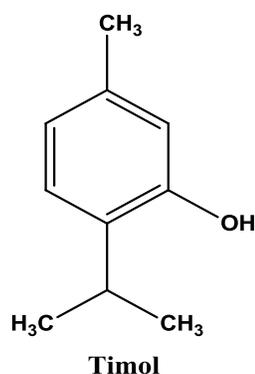
#### **2.4.1. Usos tradicionales**

*Hyptis pectinata* ha tenido diversos usos en la medicina tradicional de diversos países, en México ha sido usada para el tratamiento de fiebres, problemas cutáneos, gastrointestinales, rinofaringitis y congestión pulmonar (Pereda-Miranda y Hernandez, 1993). En el siglo XX, Maximino Martínez la señala como antirreumático. Se emplea en Yucatán contra la disentería, para lo cual se muelen las partes subterráneas en seco, se le agrega azúcar, se cuele, y lo comen. En Brasil, se utiliza en desordenes del hígado, asma, tos, bronquitis y dismenorrea (Agra *et al.*, 2007). Las inflorescencias secas se utilizan en forma de cigarrillo contra dolores de cabeza y dolores crónicos del diente. Las infusiones se utilizan contra amenorreas y dismenorreas. Las partes aéreas se indican contra hepatalgias bajo la forma de decocción. Es apreciada por sus características carminativas y antirreumáticas. Todavía en la medicina popular la utilizan para tratar rinofaringitis, la congestión nasal, enfermedades de la piel, problemas gástricos y fiebre, infecciones bacterianas y fúngicas. Se utiliza en la inflamación, en el dolor y el cicatrizado de heridas. Los efectos antidematogénico y antinociceptivos del extracto acuoso han sido comprobados. También, se describió su efecto hepatoprotector después de una hepatectomía parcial (Lemos *et al.*, 2002). En el oeste de África, se usa como antimicrobiano, antimicótico y contra la tos (Malan *et al.*, 1989).

Investigaciones contemporáneas han comprobado diversas actividades farmacológicas, los extractos acuosos de las hojas han presentado efectos en la estimulación de la regeneración del hígado (Melo *et al.*, 2006) y efectos antinociceptivos y antiedematogénicos (Bispo *et al.*, 2001) en modelos animales.

Los efectos antinociceptivos (Arrigoni-Blank *et al.*, 2008) mediados a través de los receptores opioides y colinérgicos se han presentado en el aceite esencial de *Hyptis pectinata*, junto con la actividad antiinflamatoria a través de la inhibición de la producción de ácido nítrico y prostaglandina E2 (Raymundo *et al.*, 2011) propiedades antioxidantes (Russo *et al.*, 2012), actividad contra bacterias Gram positivas como *Streptococcus mutans* (Nascimento *et al.*, 2008). Los extractos orgánicos presentaron actividad antileishmanicida contra el promastigote de *Leishmania braziliensis* (Falcão *et al.*, 2013).

El aceite esencial de esta especie es rico en timol y, por lo tanto, un gran número de las aplicaciones terapéuticas de esta planta en la medicina tradicional están asociadas con su contenido en aceites esenciales (Malan *et al.*, 1988). La figura 5 ilustra el ensayo de evaluación cualitativa de la actividad antimicrobiana para el aceite esencial de la hierba del burro que permitieron observar un efecto inhibitorio del crecimiento de bacterias Gram positivo (Pereda-Miranda *et al.*, 1993).

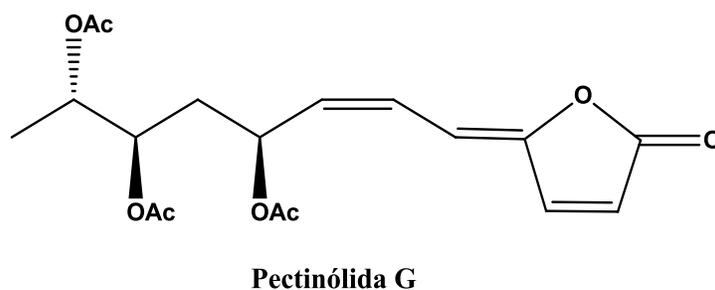
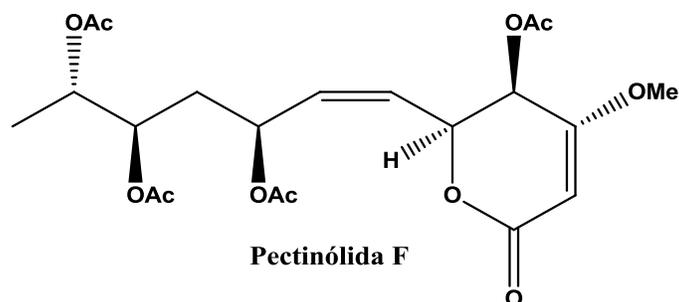
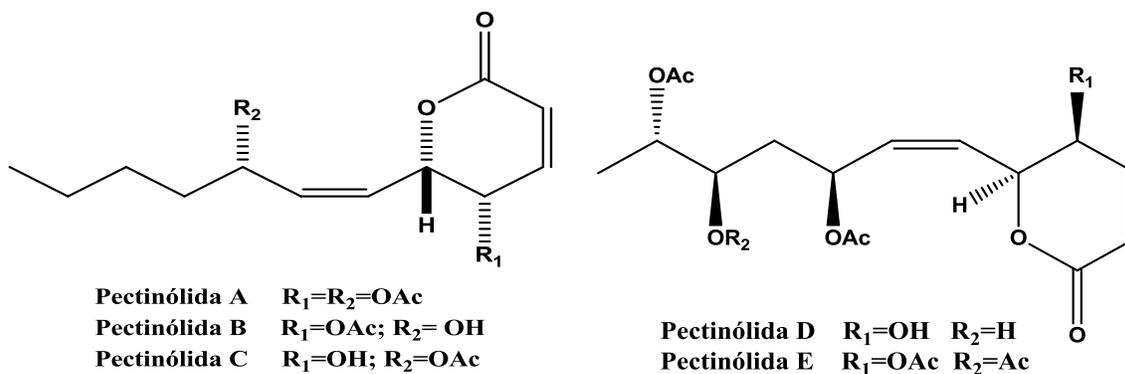


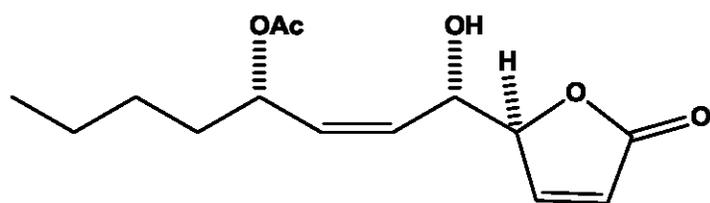
**Figura 5.** Estructura del timol, constituyente mayoritario del aceite esencial de la hierba del burro. Halos de inhibición desarrollados por el aceite esencial de *Hyptis pectinata* contra bacterias Gram positivo (*Bacillus subtilis* y *Staphylococcus aureus*). Control positivo: estreptomicina (Villavicencio González, 1993).

## 2.5. Química de *Hyptis pectinata*

El fraccionamiento biodirigido del extracto clorofórmico de las partes aéreas de *H. pectinata* permitió el aislamiento de las pectinólidas A-C, compuestos con actividad citotóxica y antimicrobiana. La estereoquímica absoluta se estableció con

base en evidencias espectroscópicas, quirópticas y químicas (Pereda-Miranda *et al.*, 1993). En otros estudios realizados con la misma especie, se aislaron 5,6-dihidro-alfa-pironas y una 2(5H)-furanona (pectinólidas D-G) (Boalino *et al.*, 2003). La pectinólida H corresponde al segundo compuesto de tipo 2(5H)-furanona aislado en el género *Hyptis* (Fragoso-Serrano *et al.*, 2005).





### **Pectinólida H**

Las hojas de *Hyptis pectinata* contienen un aceite esencial en el que se han identificado los monoterpenos camfeno, delta-car-3-eno, carvacrol, para-cimeno, limoneno, linalol, mirceno, beta-ocimeno, alfa y beta-pineno, sabineno, terpinen-4-ol, alfa y gama-terpineno, alfa-terpineol, terpinoleno, tujan-1-ol, alfa-tujan-2-ol, alfa-tujeno, isotuyona, timol y su éster metílico; y los sesquiterpenos alfa-bergamoteno, óxido de cariofileno, alfa-copaeno y alfa humuleno.

### 3. HIPÓTESIS

Con base en la información científica descrita en la literatura para la planta medicinal mexicana *Hyptis pectinata*, se pone en evidencia que la especie contiene una gran diversidad de constituyentes químicos con actividades biológicas de posible interés terapéutico. Considerando que el metabolismo secundario de la mayoría de las especies vegetales es de tipo rejilla, es altamente probable que la especie *H.pectinata* presente metabolitos adicionales no descritos del tipo aromático. En el presente estudio químico, se espera lograr la purificación mediante CLAR y la elucidación estructural de compuestos químicos inéditos para esta especie que puedan justificar alguna de las propiedades medicinales de la especie analizada.

## 4. OBJETIVOS.

### 4.1. Objetivo general

El objetivo principal del proyecto de investigación consistió en el aislamiento, la purificación y la caracterización estructural de los constituyentes mayoritarios presentes en el extracto clorofórmico de las partes aéreas de *Hyptis pectinata* (Lamiaceae).

### 4.2. Objetivos específicos

- 4.2.1. Realizar el fraccionamiento primario del extracto orgánico total de las partes aéreas de *Hyptis pectinata*.
- 4.2.2. Purificar las fracciones que contengan flavonoides mediante métodos cromatográficos convencionales y la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).
- 4.2.3. Caracterizar la estructura química de los compuestos obtenidos utilizando la técnica espectroscópica de la resonancia magnética nuclear (RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C) y espectrometría de masas.
- 4.2.4. Evaluar el potencial citotóxico del extracto, las fracciones y los compuestos puros utilizando líneas celulares provenientes de carcinomas humanos.

## 5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### 5.1. Material vegetal

Se investigaron las partes aéreas de dos colectas de *Hyptis pectinata* provenientes del Municipio de Dos Ríos, en el Estado de Veracruz. Un ejemplar de cada colecta se depositó en el herbario del Instituto de Ecología, Xalapa con los números de vaucher XAL0000286 (C-1) y XAL0001406 (C-2), colectadas el 19 de Noviembre del 2009 y 6 de diciembre del 2010, respectivamente.

#### 5.1.1. Extracción del material vegetal

El material vegetal se secó al aire libre a temperatura ambiente, se molió en un molino de cuchillas modelo Wiley 4. Se obtuvieron 2.77 kg de material seco y molido. La extracción se realizó a temperatura ambiente vía maceración con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , el proceso se repitió cuatro veces y cada periodo de extracción comprendió un periodo de 48 a 72 horas. Después de filtrar y concentrar el disolvente a presión reducida, se obtuvieron 125.8 g (C-1) y 169.3 g (C-2) de extracto de coloración verde.

#### 5.1.2. Eliminación de triterpenos

La eliminación de triterpenos del extracto C-1 se llevó a cabo a través de la precipitación de estos con metanol. El extracto (58.93 g) se disolvió en metanol, agregando 50 mL por cada gramo de extracto, y se dejó 12 horas a 0 °C, tiempo en el cual los triterpenos precipitaron; posteriormente se filtró y concentró hasta la mitad del volumen. Se repitió el proceso, esta vez concentrando el extracto a sequedad (45.52 g). En el caso de C-2 la eliminación de triterpenos se realizó mediante particiones sucesivas. El extracto (51.7 g) fue disuelto en hexano, 75 mL por cada 2.0 g de extracto y se agitó durante 30 min. Se realizó una primera extracción por triplicado con una mezcla metanol:agua (4:1), en una relación 1:1 con el hexano. Las fases metanólicas fueron reunidas y concentradas hasta retirar el metanol; posteriormente se restableció el volumen con agua destilada. Se realizó una segunda y tercera extracción con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y acetato de etilo, ambas por

triplicado. Cada una de las fases se concentró a presión reducida la fracción obtenida de la fase de diclorometano del extracto C-2 (18.79 g) fue seleccionada para su posterior fraccionamiento.

## **5.2. Instrumental analítico**

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no se encuentran corregidos. Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear Protónica ( $^1\text{H}$ -RMN) y de carbono 13 ( $^{13}\text{C}$ -RMN) fueron registrados a 400-MHz y 100MHz, en  $\text{CDCl}_3$ , los desplazamientos químicos se designan en partes por millón (ppm), con referencia al Tetrametilsilicio (TMS). El espectro de masas se realizó por impacto electrónico.

## **5.3. Técnicas cromatográficas**

### **5.3.1. Cromatografía en columna abierta**

La técnica se desarrolló utilizando columnas de vidrio empacadas con gel de sílice 60 (con tamaño de partícula de 0.063-0.200 mm). Los extractos fueron adsorbidos en una relación 1:1 con gel de sílice (punto de aplicación) y los disolventes utilizados fueron grado químicamente puro (Q. P).

### **5.3.2. Cromatografía en capa fina**

Se utilizaron placas de aluminio con gel de sílice 60  $F_{254}$  marca Merck. Las placas se observaron en una lámpara de UV a 254 nm y 320 nm. Una mezcla de ácido sulfúrico con sulfato cérico, se utilizó como agente cromógeno y se calentaron para su revelado.

### **5.3.3. Cromatografía de líquidos de alta resolución**

La purificación de los compuestos se realizó a través de cromatografía de líquidos de alta resolución con equipo de marca Waters (Millipore Corporation, Waters Chromatography Division Milford, MA, EEUU) que contaba con una bomba modelo 600E, un detector de UV de arreglo de diodos modelo 2487 y una válvula de recirculación de muestra.

El equipo estuvo adaptado a un equipo de cómputo marca Dell con sistema operativo Windows XP, el cual contaba con el programa Empower 2 (Waters) para el control del cromatógrafo y procesamiento de datos. Se utilizaron disolventes grado analítico (R. A) y en el Cuadro 4 se muestran las columnas utilizadas para el análisis, la separación y la purificación de las muestras.

**Cuadro 4.** Columnas usadas en la cromatografía de líquidos.

Tipo de columna	Tamaño de partícula	Dimensiones	Fase	Marca
Analítica	5 µm	4.6 x 250 mm	Reversa	Waters Symmetry® C18
Preparativa	7 µm	19 x 150 mm	Reversa	Waters SymmetryPrep™ C18
Preparativa	7 µm	19 x 300 mm	Reversa	Waters SymmetryPrep™ C18

El escalamiento del método analítico a nivel preparativo se llevó a cabo mediante la siguiente ecuación:

$$F_p = F_a \left( \frac{l_p}{l_a} \right) \left( \frac{d_p^2}{d_a^2} \right)$$

$F_p$  = Flujo de la columna preparativa

$F_a$  = Flujo columna analítica

$l_p$  = Longitud columna preparativa

$l_a$  = Longitud columna analítica

$d_p$  = Diámetro de la columna preparativa

$d_a$  = Diámetro de la columna analítica

#### 5.4. Fraccionamiento primario del extracto clorofórmico C-1

El extracto (45.52 g) se adsorbió en gel de sílice con una relación 1:1 y se aplicó a una columna abierta de sílice (910.4 g) en una proporción 1:20 con base en el peso del material vegetal. La elución comenzó con hexano y la polaridad se aumentó utilizando gradualmente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, acetona y metanol. Los eluatos colectados se analizaron mediante CCF para determinar su similitud cromatográfica y poder reunir las fracciones (Cuadro 5).

#### 5.4.1. Fraccionamiento secundario de las fracciones 8 y 9.

Del fraccionamiento primario se seleccionaron las fracciones 8 (7.817 g) y 9 (7.0086 g) para un segundo fraccionamiento, estas se mezclaron y adsorbieron en gel de sílice y se aplicaron a una columna abierta de sílice (296.512 g). La elución comenzó con Hexano y la polaridad se incrementó utilizando acetato de etilo y metanol. Los eluatos colectados se analizaron mediante CCF para determinar su similitud cromatográfica y proceder a la reunión de fracciones (Cuadro 6).

**Cuadro 5.** Fraccionamiento primario.

Fase	Proporción (%)	Número de fracción	Fracciones combinadas
Hexano	100	F1 – F2	F1 (F1)
Hexano- CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	80:20	F3 – F6	F2 – F4 (F2)
	70:30	F7 – F10	F5 – F7 (F3)
	60:40	F11 – F12	F8 – F14 (F4)
	30:70	F13 – F14	F15 (F5)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	F15 – F18	F 16 (F6)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - Acetona	90:10	F19 – F22	F17 – F19(F7)
	80:20	F23 – F26	F20 (F8)
	70:30	F27 – F29	F20 – F21(F9)
	60:40	F30 – F33	F22 (F10)
	50:50	F34 – F37	F23 – F25 (F11)
	40:60	F38 – F42	F26 – F29 (F12)
Acetona	100	F43 – F44	F30 – F35 (F13)
Acetona - MeOH	70:30	F45 – F48	F36 (F14)
	50:50	F49 – F51	F37 (F15)
	30:70	F52– F55	F39 – F39 (F16)
MeOH	100	F56 – F57	F40 – F42 (F17)
			F43 – F44 (F18)
			F45 (F19)
			F46 (F20)
			F47 – F49 (F21)
			F50 – F51 (F22)
			F52 – F53 (F23)
			F54 – F57 (F24)

**Cuadro 6.** Fraccionamiento secundario.

Fase	Proporción (%)	Número de fracción	Fracciones combinadas
Hexano	100		F1–F4 (F1)
Hexano: AcOEt	90:10	F1–F6	F5 (F2)
	80:20	F7 – F12	F6 – F11 (F3)
	70:30	F13 – F18	F12 – F14 (F4)
	65:35	F19–F24	F15–F19 (F5)
	60:40	F25 – F30	F20 – F24 (F6)
	55:45	F31–F36	F25–F35 (F7)
	50:50	F37–F42	F36–F38 (F8)
	45:55	F43–F48	F39–F45 (F9)
	40:60	F49–F54	F46–F57 (F10)
	30:70	F55 – F60	F58–F59 (F11)
AcOEt	100	F61 – F66	F60–F67 (F12)
MeOH	100	F67	

### 5.5. Fraccionamiento primario del extracto clorofórmico C-2.

El extracto (20.04 g) se adsorbió en gel de sílice con una relación 1:1 y se aplicó a una columna abierta de sílice (400.8 g). La elución comenzó con hexano y la polaridad se incrementó utilizando los siguientes disolventes: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, acetona y metanol. Los eluatos colectados se analizaron mediante CCF para determinar su similitud cromatográfica y poder reunir las fracciones (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Fraccionamiento primario del extracto C-2.

Fase	Proporción (%)	Número de fracción	Fracciones combinadas
Hexano	100	F1 – F12	F1 – F4 (E1)
Hexano- CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	70:30	F13 – F20	F5 – F10 (E2)
	50:50	F21 – F28	F11 – F14 (E3)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	F29 – F40	F15 – F17 (E4)
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - Acetona	90:10	F41 – F47	F18 – F22 (E5)
	70:30	F48 – F52	F23 – F28 (E6)
	50:50	F53 – F55	F29 – F30 (E7)
Acetona	100	F56 – F61	F31 – F32 (E8)
Acetona- MeOH	70:30	F61 – F64	F33 – F43 (E9)
MeOH	100	F65	F44 – F46 (E10)
			F47 – F48 (E11)
			F49 – F55 (E12)
			F56 – F59 (E13)
			F60 – F64 (E14)
			F65 (E15)

## 5.6. Análisis y purificación por CLAR

Las fracciones F4 y E9 se analizaron en fase reversa con una elución isocrática y volúmenes de inyección de 20  $\mu\text{L}$  a una concentración de 0.05 mg/ $\mu\text{L}$ ; la detección se efectuó a las longitudes de onda de 254 nm y 320 nm (Cuadro 8). Los diferentes picos fueron separados y purificados mediante las técnicas de corte de núcleo y reciclaje de muestra (Hernández-Carlos y Pereda-Miranda, 2002).

**Cuadro 8.** Condiciones de separación y análisis de fracciones mediante CLAR.

	<b>F4 (C-1)</b>	<b>E9 (C-2)</b>
Fase móvil	ACN:H <sub>2</sub> O (7:3)	ACN:H <sub>2</sub> O (7:3)
Flujo analítico (mL/min)	0.3	0.3
Flujo preparativo (mL/min)	3.07	6.14

A partir de la fracción F4 de C-1 se obtuvo el pico con el tiempo de retención  $t_R = 25.6$  min (compuesto A), el cual se recicló siete veces en una columna C-18 preparativa con flujo de 3.07 mL/min utilizando la misma fase móvil empleada para su separación.

De la fracción E9 de C-2 se obtuvieron dos flavonoides con los tiempos de retención  $t_R = 42.2$  min (compuesto B) y  $t_R = 67.4$  min (compuesto C). El compuesto obtenido en tiempo de retención  $t_R = 42.2$  min se recicló ocho veces con la fase que se usó para su separación de la fracción secundaria. El compuesto con el tiempo de retención  $t_R = 67.4$  min fue reciclado 4 veces con la fase usada para su separación de la fracción secundaria. Los dos picos se aislaron en una columna C-18 preparativa con flujo de 6.14 mL/min.

## 5.7. Ensayo de citotoxicidad

### 5.7.1. Líneas celulares

Se utilizaron tres líneas celulares derivadas de cáncer de humano: carcinoma de mama (MCF7), carcinoma de colon (HCT15) y carcinoma de cérvix (HeLa). Dichas líneas se conservaron en medio RMPI 1640 suplementado con 10 % de suero fetal

bovino. Todas las líneas se cultivaron a 37° C en una atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5 % en aire y 100 % de humedad relativa.

### **5.7.2. Dilución de las muestras**

Cada muestra es disuelta en DMSO a una concentración de 4 mg de extracto/1mL. A partir de esta solución se tomaron 25 µL y se depositaron en un primer pocillo con 175 µL de agua destilada, se mezcló y se tomó una alícuota de 40 µL de ese primer pocillo y se adicionaron en un segundo pocillo con 160 µL de DMSO al 10 %.

### **5.7.3. Suspensión celular**

El ensayo se llevó a cabo en microplacas de 96 pozos con una capacidad de 250 µL cada uno y se realizó utilizando células de la fase logarítmica. Las muestras se aplicaron por triplicado a cuatro concentraciones (25 a 0.2 µg/mL).

Una vez que se tuvieron las células en fase logarítmica de crecimiento 60-70% de confluencia, se realizó un cambio de medio 24 horas antes del ensayo, el día del ensayo se decantó el medio, se lavó dos veces con 5 mL de PBS (buffer salino de fosfatos) y se agregaron 0.3 mL de tripsina para despegar las células de la caja de crecimiento; se incubaron por 5 minutos y se monitorearon al microscopio hasta que se despegaron por completo, se adicionaron de 1 a 2 mL de medio y se homogenizo hasta que las células estuvieron dispersas. En seguida se realizó el conteo en cámara de Neubauer, se diluyeron para tener una suspensión de células de aproximadamente 10<sup>4</sup> células/mL. De esta suspensión se utilizaron 190 µL para adicionar en las 96 cavidades de 250 µL de las microplacas de plástico con 10 µL de las diferentes concentraciones de las muestras a analizar y los controles, cada uno por triplicado.

### 5.2.3. Bioensayo

Las cajas se incubaron durante 72 horas a 37 °C en atmosfera de 100 % humedad y 5 % de CO<sub>2</sub>, trascurrido el tiempo de incubación se hizo la fijación celular por medio de la adición de 100 µL de ácido tricloroacetico (TCA), incubando por 30 minutos en refrigeración, se decantó el TCA y se lavó por tres ocasiones con agua corriente, se dejó secar la microplaca en su totalidad; se hizo una tinción con 100 µL de sulforodamida B a temperatura ambiente por 30 minutos. Se decantó el colorante y se lavó con ácido acético al 1%, se dejó secar. Posteriormente para poder realizar la lectura se adicionan 200µL de TRIS solubiliza el color impregnado en las células que crecieron en la microplaca dando la oportunidad de realizar la lectura de absorbancia al espectrofotómetro a una longitud de onda de 564 nm. Los resultados obtenidos se expresan como la concentración que inhibe el 50% del control de crecimiento después del periodo de incubación (CI<sub>50</sub>). Los valores obtenidos en las diferentes concentraciones del control positivo y las muestras fueron promediados y se determinó el porcentaje de crecimiento con la siguiente fórmula:

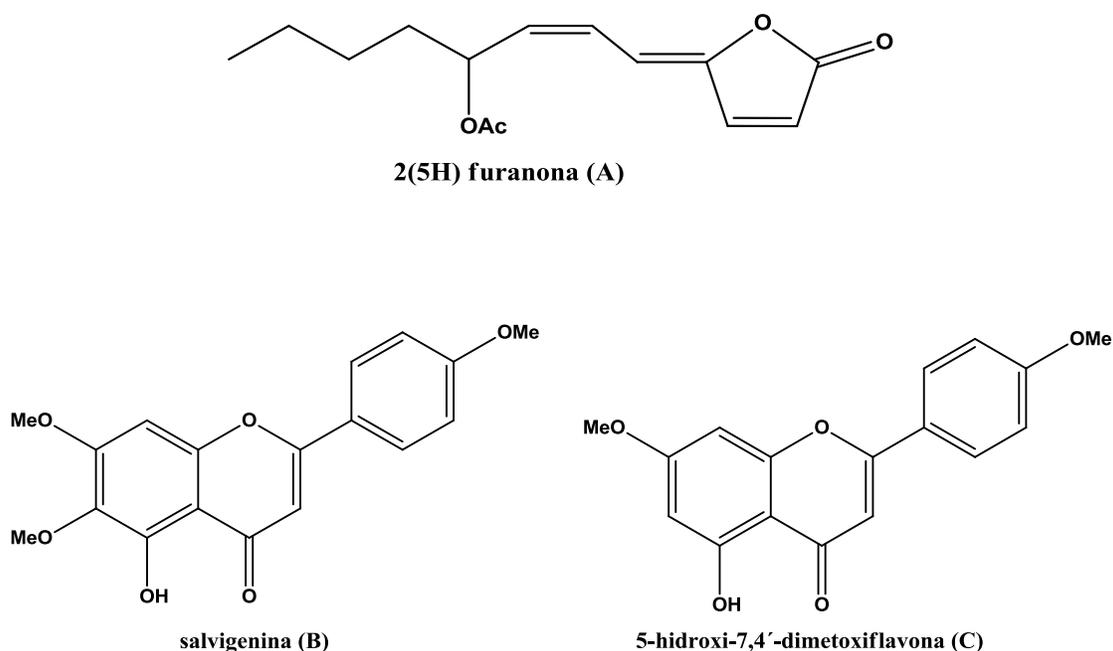
$$\% \text{ Crecimiento} = \frac{\text{Abs}_{\text{células+muestra}} - \text{Abs}_{\text{células tiempo inicial}}}{\text{Abs}_{\text{células+DMSO10\%}} - \text{Abs}_{\text{células tiempo inicial}}} * 100$$

El porcentaje de crecimiento fue graficado junto con sus respectivas concentraciones utilizando el programa Table Curve 2D v5.01. Se consideraron activas las fracciones con una CI<sub>50</sub> ≤ 25 µg/mL y los compuestos puros con una CI<sub>50</sub> ≤ 4 µg/mL.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 6.1. Estudio químico de *Hyptis pectinata*

A partir de los extractos de diclorometano de dos colectas de *Hyptis pectinata*, se aislaron tres compuestos: una 2(5H) furanona (**A**) de estructura inédita en la literatura fitoquímica y dos flavonoides conocidos que fueron identificados como la salvigenina (**B**) y la 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (un derivado de la apigenina) (**C**).



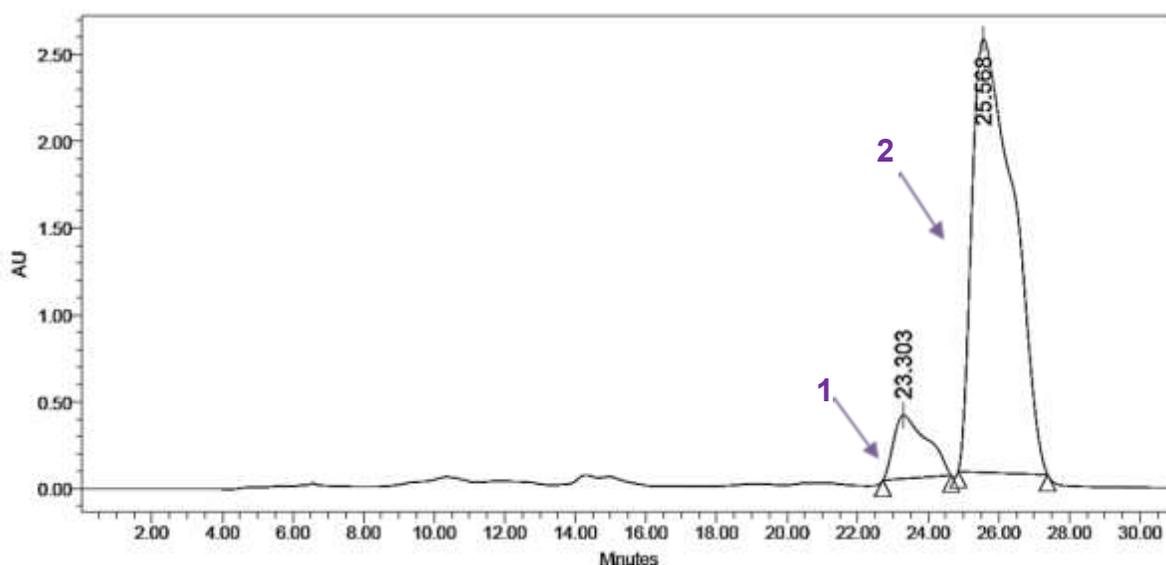
**Figura 6.** Estructura de los compuestos aislados.

### 6.2. Aislamiento y purificación de los compuestos A, B y C.

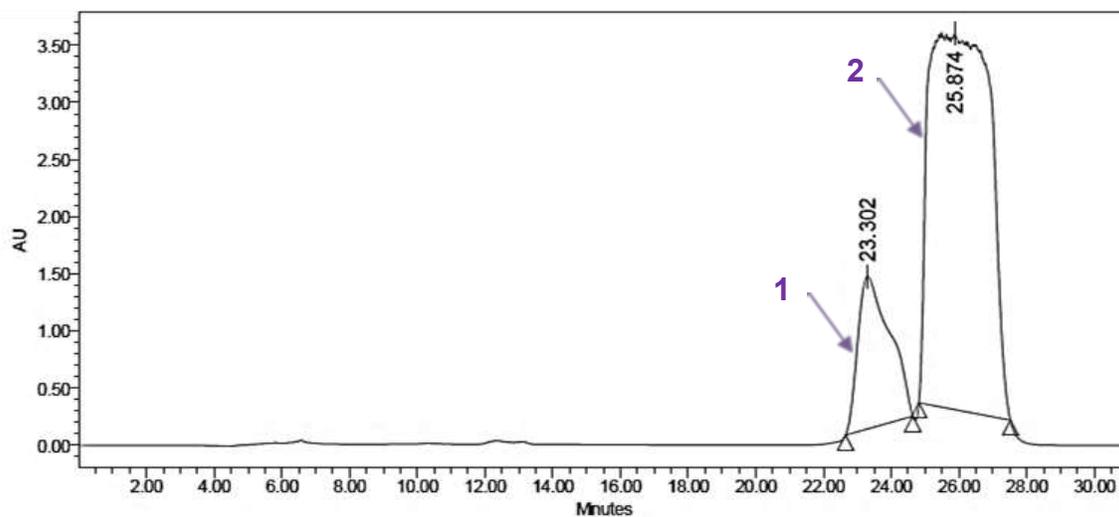
Para realizar la purificación del compuesto A, se sometió al extracto C-1 a la eliminación de triterpenos por el método de partición; posteriormente, fue necesario realizar el fraccionamiento primario por medio de una columna de gel de sílice para la obtención de 19 fracciones (Cuadro 5). De ellas fueron seleccionadas las fracciones 8 y 9 para realizar un fraccionamiento secundario, obteniendo de

este último 12 fracciones de las cuales fue seleccionada la fracción F4 para su purificación debido a que el monitoreo mediante CCF permitió la visualización de compuestos fluorescentes que indicaban la presencia de flavonoides mediante su absorción a 254 nm.

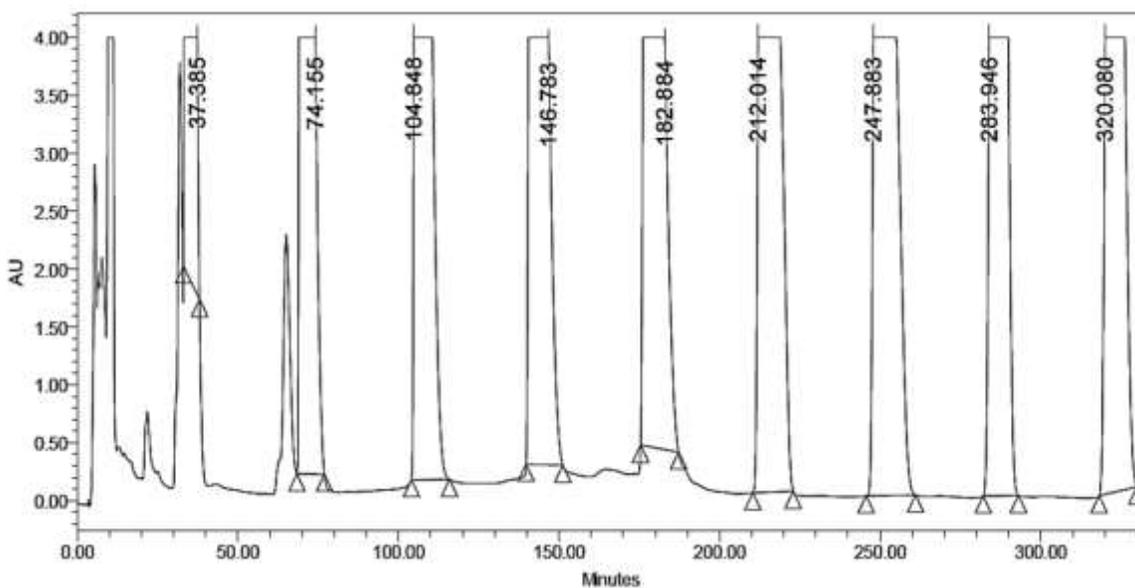
Para purificar la fracción F4 se usó la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), buscando las condiciones adecuadas de separación a nivel analítico utilizando una columna C<sub>18</sub> (Figura 7). Como sistema de elución se seleccionó una fase de ACN:H<sub>2</sub>O (7:3); posteriormente, las condiciones seleccionadas fueron escaladas a nivel preparativo, inyectando 25 mg de la muestra en 500 µL de vehículo (MeOH). Se obtuvieron dos picos principales (Figuras 7 y 8); el pico 2 (t<sub>R</sub> = 25.57 min) fue seleccionado para su purificación mediante la técnica de reciclaje durante nueve ciclos (Figura 9) ya que era el mayoritario.



**Figura 7.** Cromatograma de líquidos a nivel analítico de la fracción F4. Condiciones cromatográficas: columna Symmetry C-18 (5 µm, 4.6 × 250 mm); detector de arreglo de diodos (254 nm); fase móvil ACN:H<sub>2</sub>O (7:3); flujo de elución: 0.3 mL/min



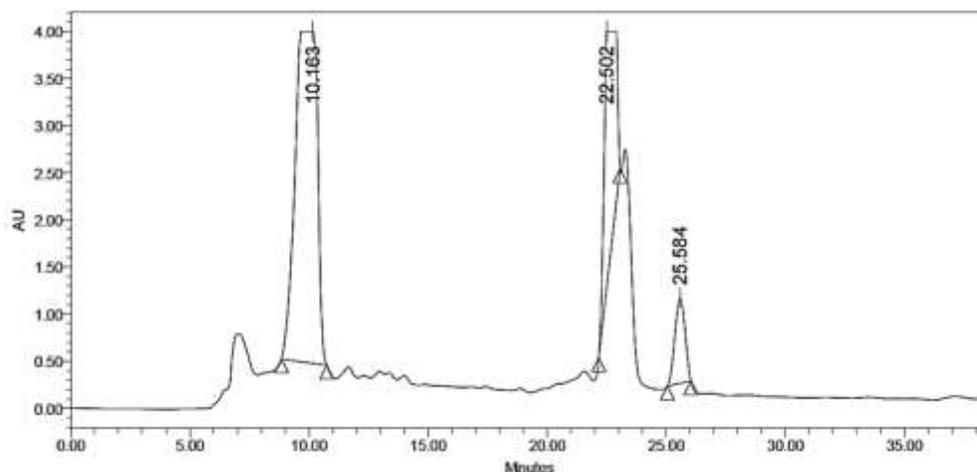
**Figura 8.** Cromatograma de líquidos a nivel preparativo de la fracción F4. Condiciones cromatográficas: columna Symmetry C-18 (7  $\mu$ m, 19  $\times$  150 mm); detector de arreglo de diodos (254 nm); fase móvil ACN:H<sub>2</sub>O (7:3); flujo de elución: 3.07 mL/min.



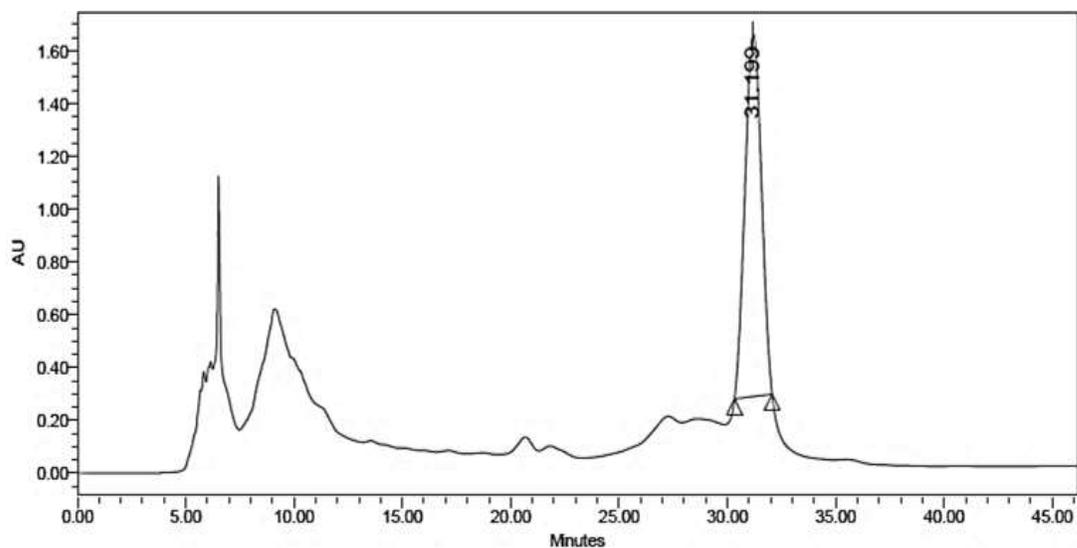
**Figura 9.** Cromatograma de la purificación del pico dos ( $t_R = 25.57$  min) de la fracción F4 mediante la técnica de reciclaje. Condiciones cromatográficas: columna Symmetry C-18 (7  $\mu$ m, 19  $\times$  150 mm); detector de arreglo de diodos (254 nm); fase móvil ACN:H<sub>2</sub>O (7:3); flujo de elución: 3.07 mL/min

En el caso de la obtención de los compuestos B y C, se sometió al extracto C-2 a un fraccionamiento primario por medio de una columna de gel de sílice, de la cual se obtuvieron 15 fracciones, de ellas fue seleccionada la fracción E9 para su purificación debido a que al visualizarse en CCF mediante exposición a UV se identificaron compuestos fluorescentes mediante su absorción a 254 nm.

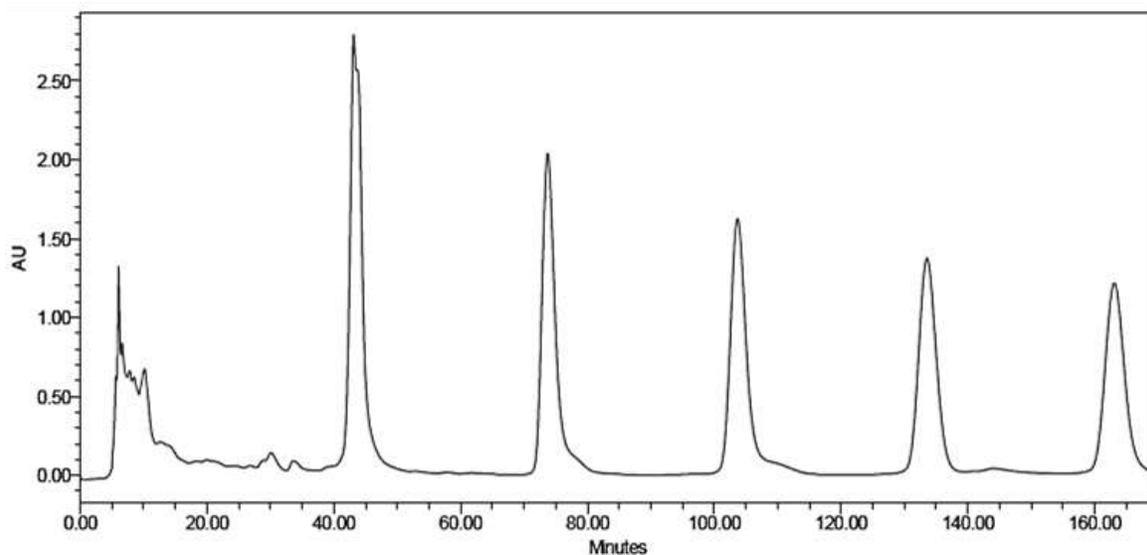
Se utilizó la CLAR para purificar los compuestos B y C, buscando las condiciones adecuadas de separación a nivel analítico utilizando una columna C<sub>18</sub>. Como sistema de elución se seleccionó una fase de ACN:H<sub>2</sub>O (7:3); posteriormente, las condiciones seleccionadas fueron escaladas a nivel preparativo, inyectando 25 mg de muestra en 500 µL de vehículo (MeOH). Se obtuvieron seis picos los cuales se cortaron y colectaron por separado. Se seleccionaron para su purificación los picos 4 ( $t_R = 42.2$  min, compuesto B) y 6 ( $t_R = 67.4$  min, compuesto C), los cuales se inyectaron a nivel analítico para poder determinar las condiciones para su posterior purificación. Las condiciones para la purificación de los picos en una columna C<sub>18</sub> preparativa fue una fase de ACN:H<sub>2</sub>O (7:3), inyectando 43.3 mg de muestra en 500 µL de vehículo (MeOH) para el pico 4 (Figura 10) y 26.5 mg de muestra en 500 µL de vehículo (MeOH) para el caso del pico 6 (Figura 11); ambos fueron purificados mediante la técnica de reciclaje, el pico 4 durante ocho ciclos y el 6 durante 4 ciclos (Figura 12).



**Figura 10.** Cromatograma de líquidos a nivel preparativo del pico 4 ( $t_R = 42.2$  min) de la fracción E9. Condiciones cromatográficas: columna Symmetry C-18 (7 µm, 19 × 150 mm); detector de arreglo de diodos (254 nm); fase móvil ACN:H<sub>2</sub>O (7:3); flujo de elución: 3.07 mL/min.



**Figura 11.** Cromatograma a nivel preparativo del pico 6 ( $t_R = 67.4$  min) de la fracción E9. Condiciones cromatográficas: columna Symmetry C-18 ( $7 \mu\text{m}$ ,  $19 \times 150$  mm); detector de arreglo de diodos (254 nm); fase móvil ACN:H<sub>2</sub>O (7:3); flujo de elución: 3.07 mL/min.



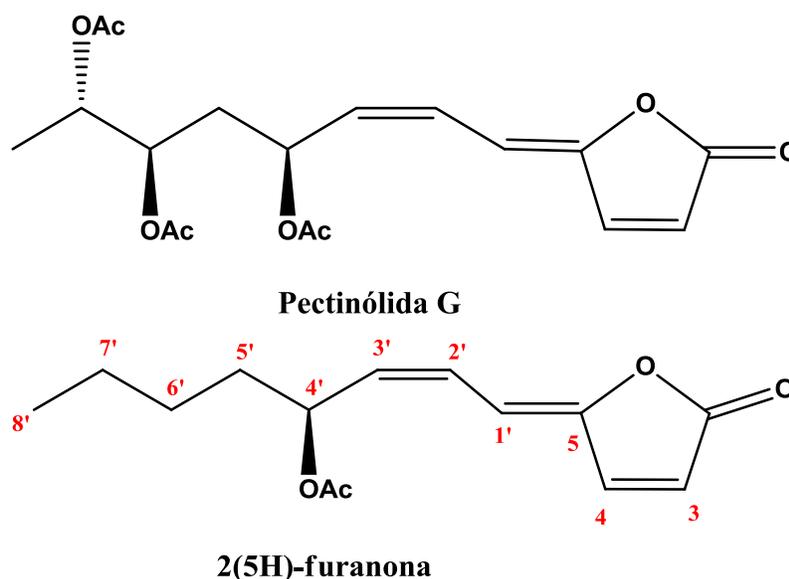
**Figura 12.** Cromatograma de la purificación del pico 6 ( $t_R = 67.4$  min) de la fracción E9 mediante la técnica de reciclaje de la muestra. Condiciones cromatográficas: columna Symmetry C-18 ( $7 \mu\text{m}$ ,  $19 \times 150$  mm); detector de arreglo de diodos (254 nm); fase móvil ACN:H<sub>2</sub>O (7:3); flujo de elución: 3.07 mL/min.

### 6.3. Caracterización de 2(5H)-furanona

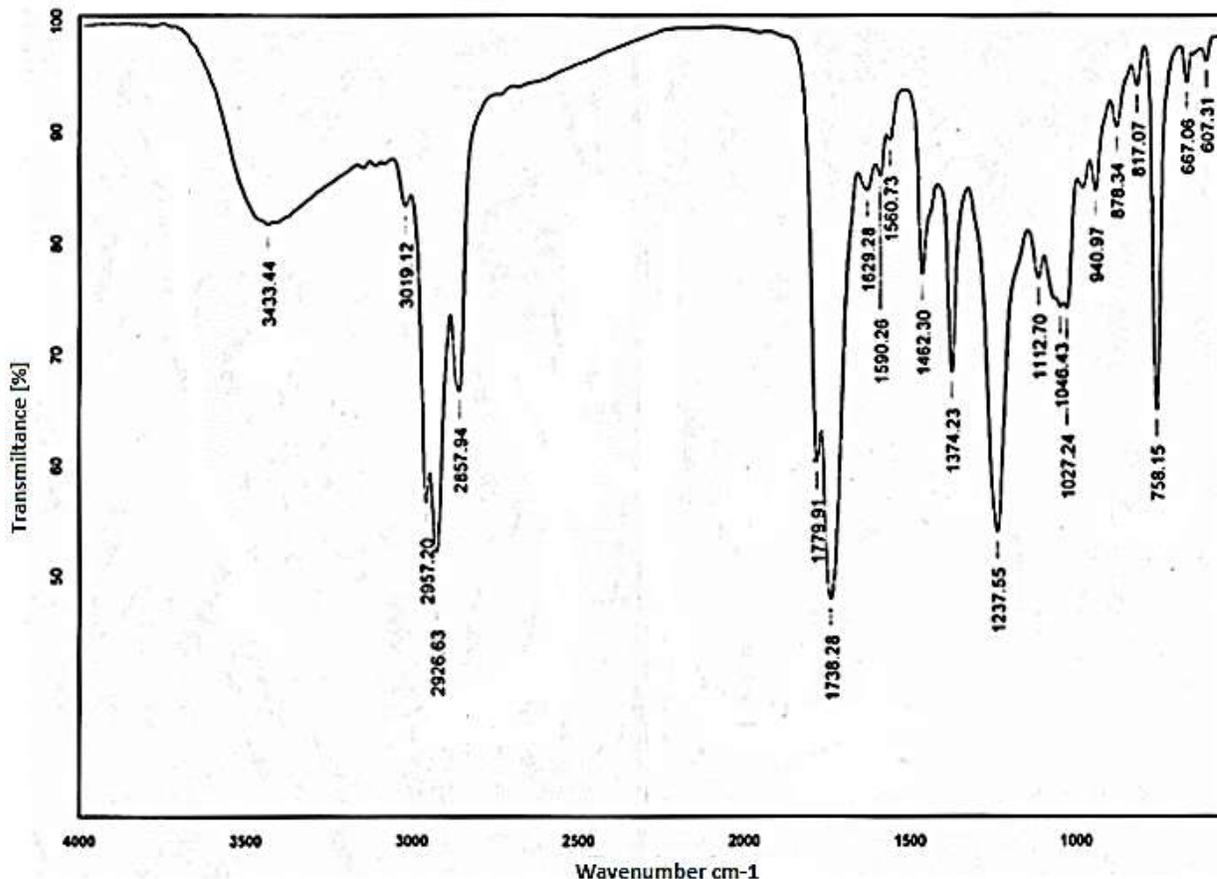
Del pico dos de la fracción F4 ( $t_R = 25.57$  min), se obtuvo un aceite color amarillo ámbar con la fórmula molecular  $C_{14}H_{18}O_4$  y su estructura correspondía a una 2(5H)-furanona con una cadena lateral en la posición C-5, su estructura se determinó a través del análisis de los espectros de  $^1H$ -RMN y  $^{13}C$ -RMN.

#### 6.3.1. Resonancia magnética nuclear

En el espectro de  $^{13}C$ -RMN (Figura 18) se observa dos señales de carbonilo, seis señales para protones vinílicos (110-150 ppm), una señal base de oxígeno (70 ppm) y cinco señales para protones alifáticos (14-35 ppm). Al comparar las señales de este espectro con las reportadas para la pectinólida G (Boalino *et al.*, 2003), se encontró que las señales correspondientes a las posiciones C-2 a C-5 eran similares e indicaban la presencia de una 2(5H)-furanona lo que llevó a proponer la estructura de este compuesto como un análogo con un menor grado de oxidación de la cadena lateral (Figura 13) en función de la presencia del mismo número de señales para la cadena lateral de las pectinólidas A-C.



**Figura 13.** Estructuras de la pectinólida G y de la 2(5)-furanona inédita.



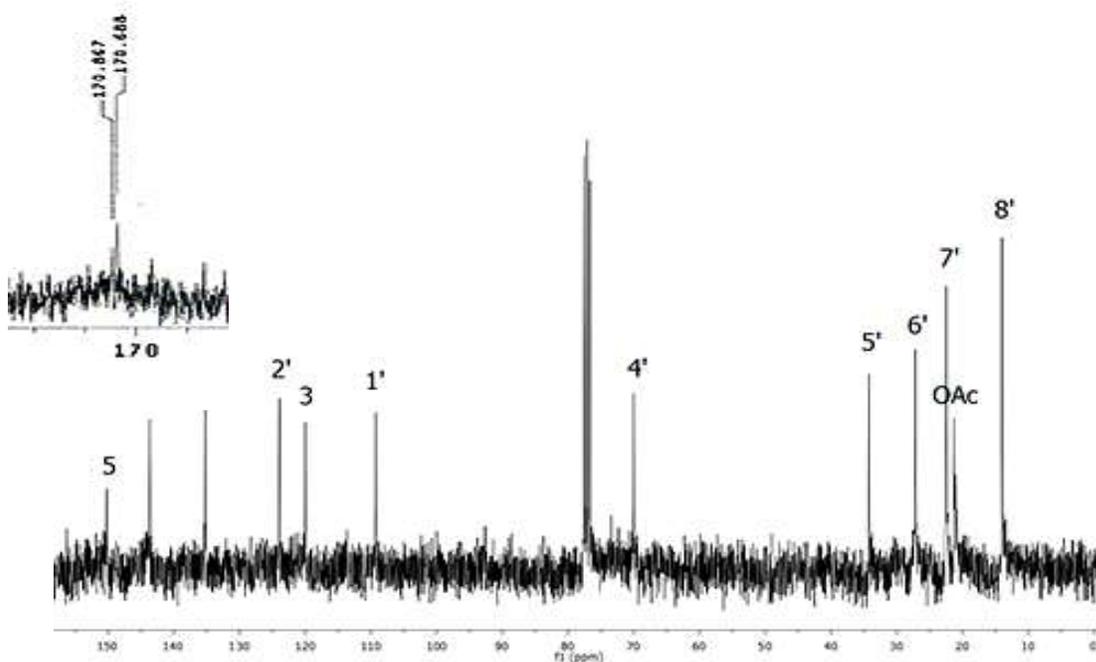
**Figura 14.** Espectro de IR de la 2(5)-Furanona.

En el espectro de IR (Figura 14) se observaron las señales de dos grupos carbonilo que permitieron la asignación tanto del anillo de 2(5H)-furanona mediante la absorción para una  $\delta$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada ( $1779\text{ cm}^{-1}$ ) y para un grupo acetato ( $1738\text{ cm}^{-1}$ ). En el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN (Figura 15), se observaron seis carbonos  $sp^2$ , además de las dos funcionalidades para los carbonilos (170.9 y 170.7).

Estas señales justificaban los seis grados de insaturación calculados a partir de la fórmula molecular calculada para este nuevo metabolito. En el espectro de  $^1\text{H}$ -RMN (Figura 16), se identificó la señal base del acetato (5.63 ppm) y que se asignó a la posición C-4' correspondiente al metino oxigenado observado en el espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN centrado en 69.9 ppm; además, se observan las señales correspondientes a la doble ligadura del anillo de  $\delta$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada (6.20

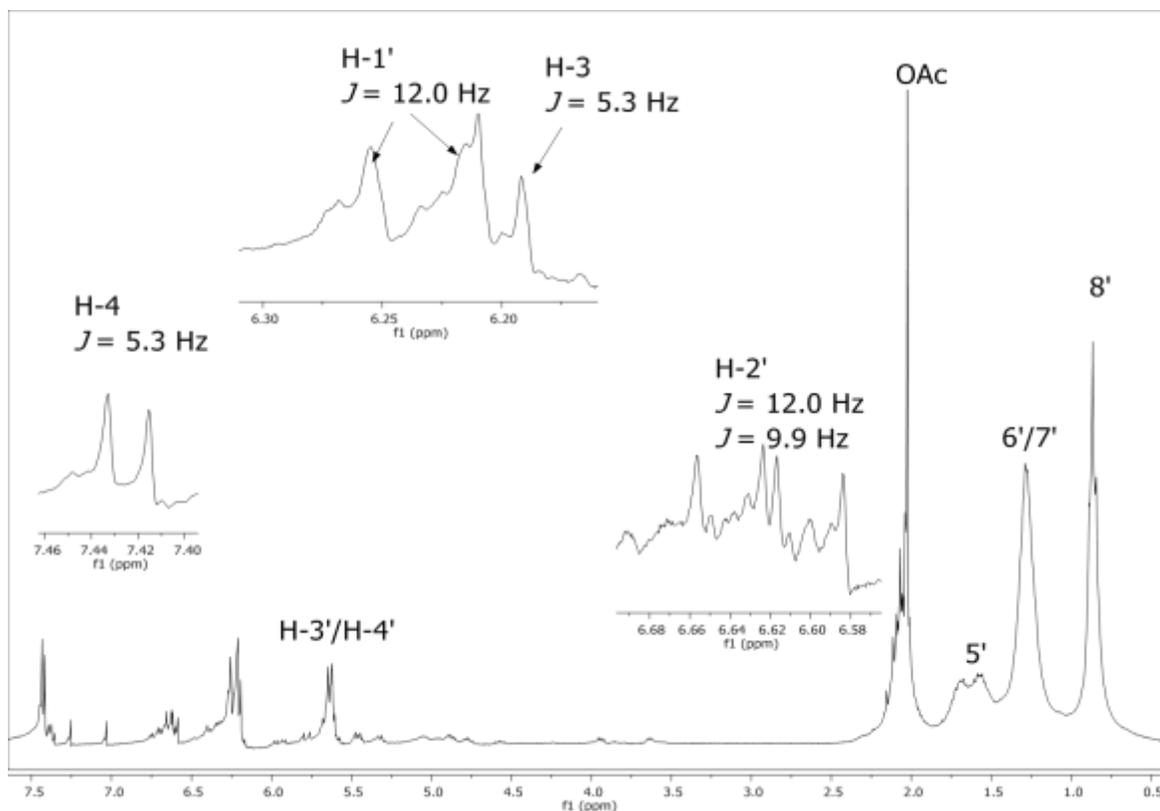
ppm y 7.42 ppm), los cuales se muestran como dobletes ya que se acoplan entre sí con un valor para la constante de acoplamiento de  $J = 5.3$  Hz (Figura 16).

Dos protones olefínicos se observaron en 6.62 y 5.63 ppm y el valor de su constante de acoplamiento de  $J = 9.9$  Hz establecieron la geometría para este doble enlace en C-2' como Z (Figura 16). El protón de la posición 2' se presenta como un doble de dobles, ya que se acopla adicionalmente con el protón en C-1' (6.23 ppm). Las señales correspondientes a los protones alifáticos de la cadena lateral (H-4' a H-8') muestran el mismo patrón de multiplicidades y desplazamientos químicos observado en RMN (Cuadro 10) para las señales de las pectinólida A-C.



**Figura 15.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN de la 2(5)-furanona.

Para la determinación de la configuración absoluta de la posición C-4', se consideró que debe ser la misma configuración *S* de la pectinólida A, compuesto que se encuentra en forma mayoritaria en *H. pectinata* y que puede considerarse como un precursor de esta furanona cuya estructura fue asignada como la [2'Z,5(1')Z] 5-(4'S-acetoxi-2-octeniliden)-2(5H)-furanona.



**Figura 16.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la 2(5)-furanona en  $\text{CDCl}_3$  a 400 MHz.

**Cuadro 9.** Desplazamientos químicos ( $\delta$ ) y constantes de acoplamiento de los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz) y  $^1\text{H}$ -RMN de la 2(5)-furanona (400 MHz).

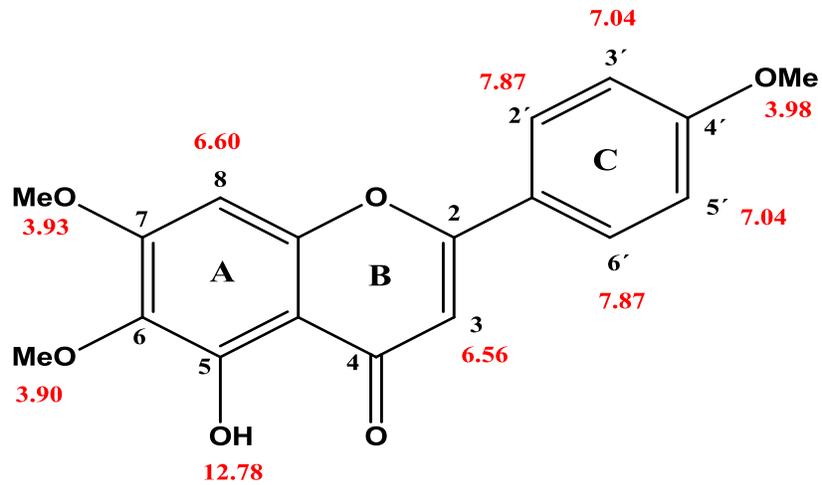
Posición	$\delta_c$	$\delta_H$ , J en Hz
<b>2</b>		-
<b>3</b>	119.98	6.20 d (5.3)
<b>4</b>	143.68	7.42 d (5.3)
<b>5</b>	150.18	-
<b>1'</b>	109.26	6.23 d (12.00)
<b>2'</b>	123.89	6.62 dd (12.00, 9.9)
<b>3'</b>	135.18	5.63 m
<b>4'</b>	70.05	5.63 m
<b>5'</b>	34.24	1.56 m
<b>6'</b>	27.21	1.28 m
<b>7'</b>	22.50	1.28 m
<b>8'</b>	14.00	0.87 t (6.7)
<b>MeCOO<sup>-</sup></b>	21.29	2.03

#### 6.4. Caracterización de la salvigenina.

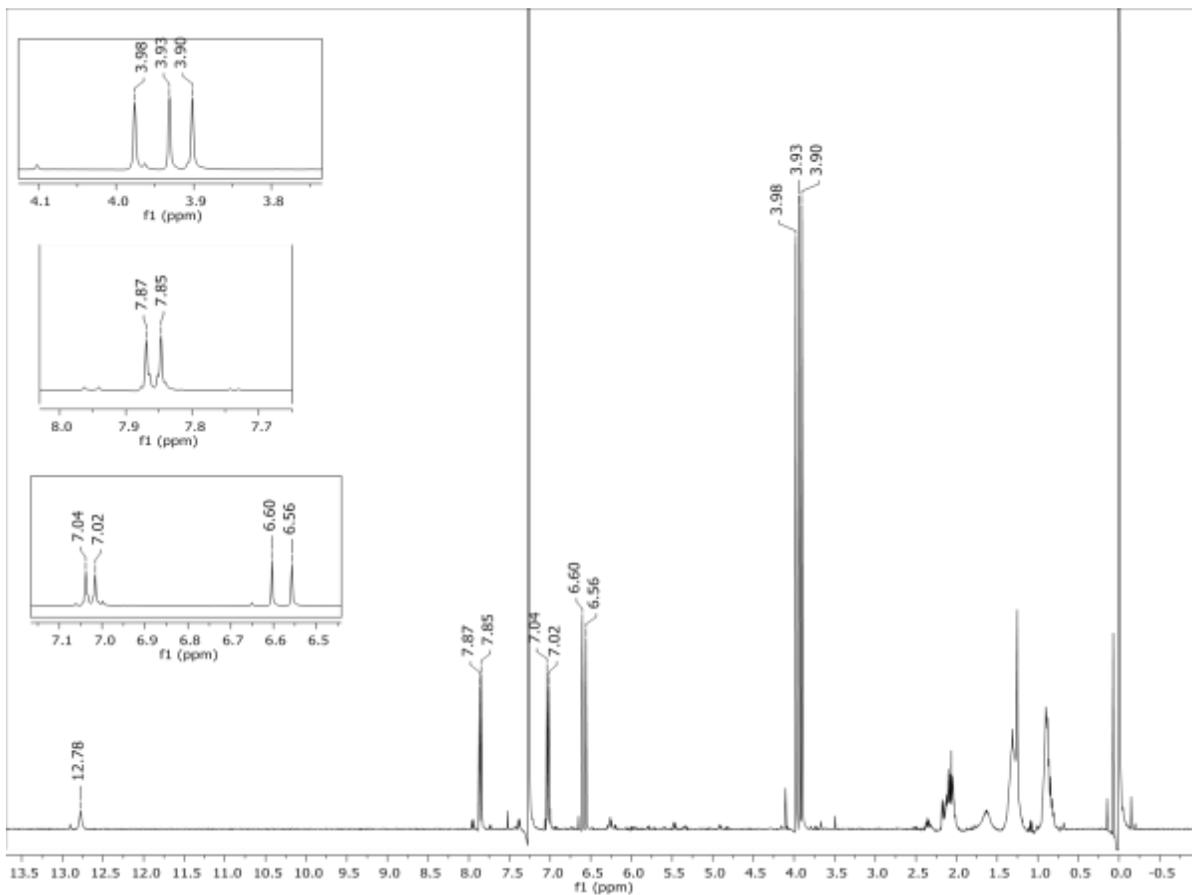
Del pico 4 de la fracción E9 se obtuvo un compuesto descrito en la literatura con el nombre de la salvigenina (5-hidroxi-4',6,7-trimetoxiflavona, Figura 17) en forma de cristales color amarillo con un punto de fusión entre 188-190°C. Se ha purificado a partir de numerosas especies de la familia *Lamiaceae*: *Orthosiphon stamineus* (Amzad y Mizanur, 2011), de los géneros *Salvia*, *Sideritis*, *Plectranthus*, *Coleus* y *Solenostemon*, entre otros (Grayer *et al.*, 2010) y en las familias *Phytholaccaceae* (*Microtea debilis*; Bai *et al.*, 2010) y *Asteraceae* (*Tanacetum canescens*; Noori *et al.*, 2013). Se le han atribuido beneficios como la disminución del crecimiento celular en tumores y efectos moduladores del sistema inmunológico en experimentos con ratones (Noori *et al.*, 2013) y propiedades antioxidantes (Amazad y Mizanur, 2011). Su fórmula molecular se determinó como C<sub>18</sub>H<sub>16</sub>O<sub>6</sub>.

##### 6.4.1. Resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas.

El espectro de <sup>1</sup>H-RMN (Figura 18) se registró a 400MHz con la muestra disuelta en CDCl<sub>3</sub>, se observaron las mismas señales reportadas en la literatura para la salvigenina (Rafatian *et al.*, 2012). Se estableció la trisustitución del anillo A por el singulete en δ12.78 correspondiente a un OH quelato en la posición C-5, un singulete en δ 6.60 que corresponde al protón en la posición C-8, un singulete en δ 3.93 que corresponde a los 3H de un -OCH<sub>3</sub> en la posición C-7 y un singulete en δ 3.90 que corresponde a los 3H de un -OCH<sub>3</sub> en la posición C-6; las sustituciones del anillo C aparecen como una señal en δ 6.56 correspondiente a un protón de la posición C-3; para el anillo B, se observa un sistema A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> para un sustitución en *para* formando un doblete en la posición δ 7.04 correspondiente a los hidrógenos de las posiciones C-3' y C-5' y un doblete en la posición δ 7.87 correspondiente a los hidrógenos en las sustituciones C-2' y C-6', además de un singulete en δ 3.98 correspondiente a tres hidrógenos del grupo -OCH<sub>3</sub> en la posición C-4'. Estas evidencias espectrales indicaron que la estructura corresponde a la 5-hidroxi-4',6,7-trimetoxiflavona, conocida como la salvigenina (Figura 17).



**Figura 17.** Asignaciones de las señales en  $^1\text{H}$ -RMN para la estructura de la salvigenina.



**Figura 18.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN de la salvigenina, en  $\text{CDCl}_3$  a 400MHz.

## 6.5. Caracterización de 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona

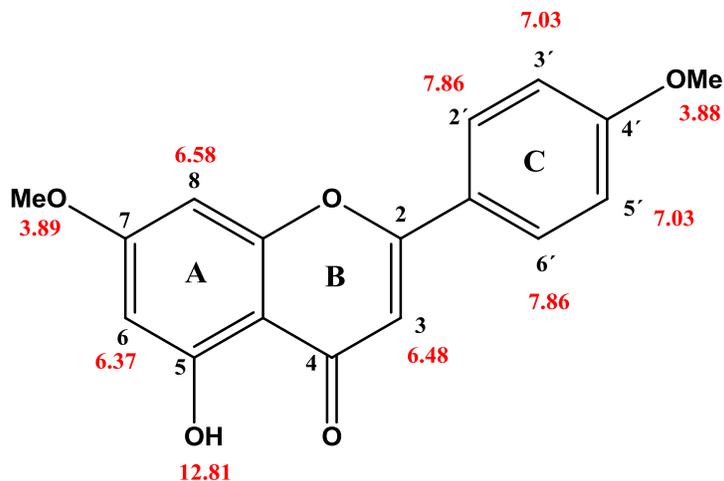
Del pico 4 se obtuvo un compuesto conocido en la literatura como la 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (Figura 19), un derivado de la apigenina, en forma de cristales color amarillo pálido con un punto de fusión en un rango de 166-168 °C. Este flavonide se ha encontrado en plantas de la familia Labiatae, por ejemplo, en las especies de los géneros *Leucas* (Miyachi *et al.*, 2006) y *Salvia* (Habibi *et al.*, 2011), Euphorbiaceae (*Croton betulaster*, Cerquera *et al.*, 2015) y Zingiberaceae (*Kaempferia parviflora*, Tewtrakul *et al.*, 2007), se ha visto que es el causante de los efectos antialérgicos de algunas plantas (Tewtrakul *et al.*, 2007), y se ha identificado su actividad antioxidante (Pérez, 2012). Su fórmula se determinó como C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub> mediante espectrometría de masas.

### 6.5.1. Resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas

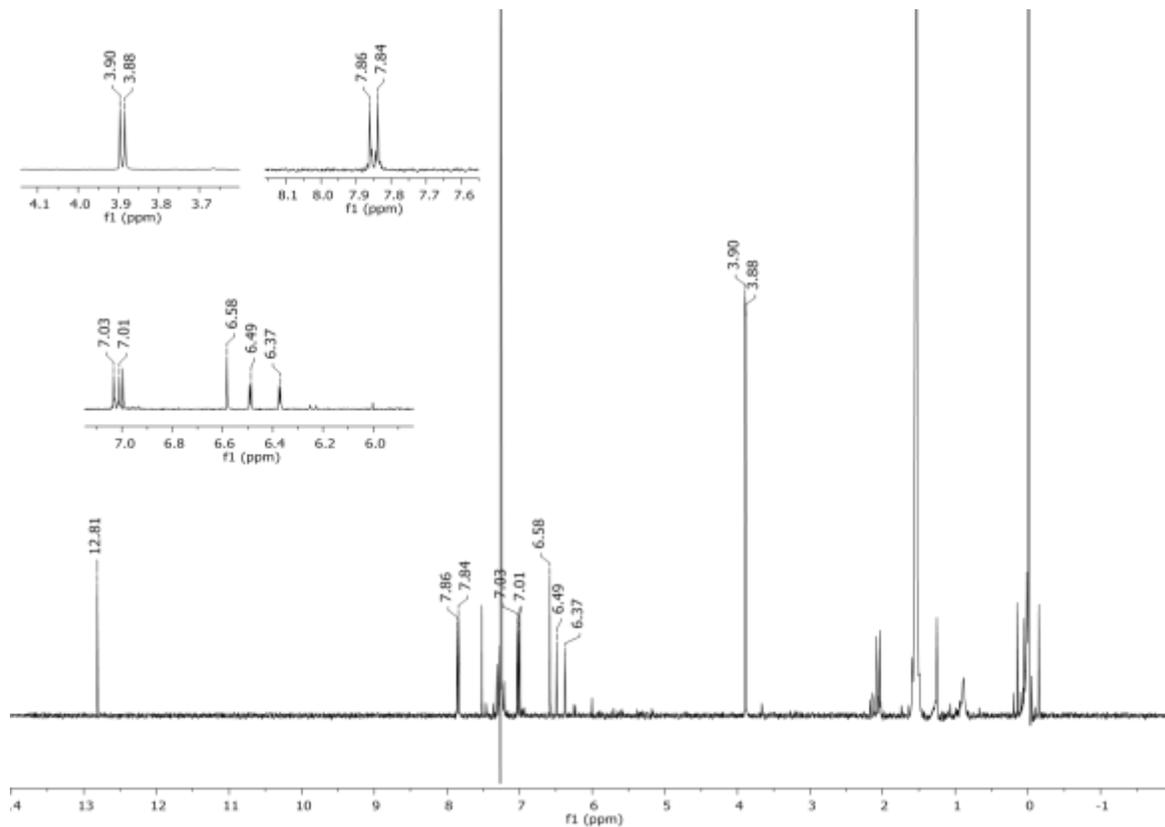
El espectro de <sup>1</sup>H-RMN (Figura 20) se registró a 400 MHz con la muestra disuelta en CDCl<sub>3</sub>. Se observaron las mismas señales reportadas en la literatura para la 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (Kolak *et al.*, 2009); Para el anillo A se observó un singulete en δ 12.8 correspondiente a un grupo OH quelatado en la posición C-5, éste protón del grupo C<sub>5</sub>-OH se encuentra desprotegido por la interacción con el C<sub>4</sub>=O y desaparecen cuando se equilibra con D<sub>2</sub>O; un sistema AB aromático con constante de acoplamiento *meta* (*J* = 2.5 Hz), un singulete en δ 6.58 que corresponde al protón en la posición C-8 y un singulete en δ 6.37 correspondiente al protón en la posición C-6. En el caso del anillo B, también se observó un sistema A<sub>2</sub>B<sub>2</sub> indicativo de una sustitución *para* del anillo aromático: encontrándose un doblete en δ 7.03 correspondiendo a los hidrógenos de las posiciones C-3' y C-5' y un doblete en δ 7.86 correspondiente a las protones en C-2' y C-6'. Para el anillo C, se observó una señal en δ 6.48 correspondiente al protón de la posición C-3. Por último, se identificaron los singuletes en δ 3.89 y 3.88 que corresponden a los metilos de los grupos OCH<sub>3</sub> en las posiciones C-7 y 4'.

El espectro de masas se realizó por introducción directa de la muestra mediante impacto electrónico (70 eV). En Figura 21, se presenta el espectro de masas

generado en donde el pico base corresponde al ion molecular de  $m/z$  298  $[M]^+$  y se ilustra el patrón de fragmentación de la molécula para la generación de los picos característicos para la 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (Figura 22).



**Figura 19.** Asignaciones de las señales en  $^1\text{H-RMN}$  para la 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona.



**Figura 20.** Espectro de  $^1\text{H-RMN}$  de la 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona.

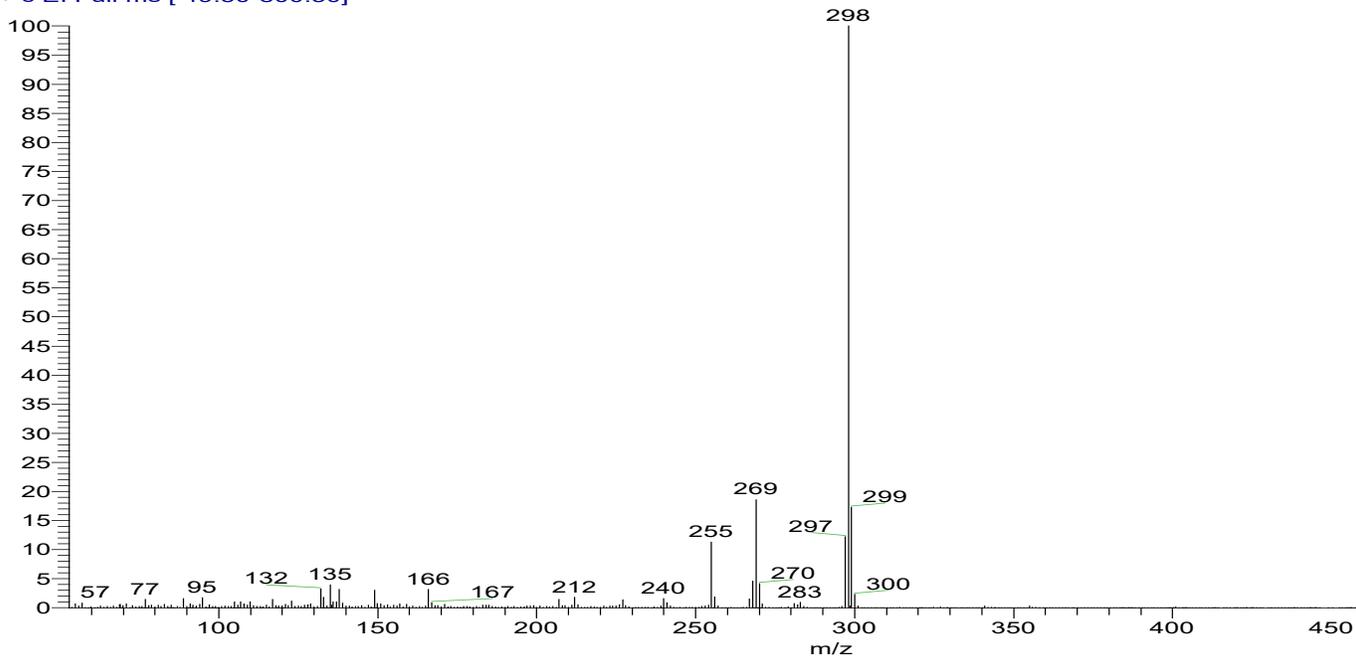


Figura 21. Espectro de masas por impacto electrónico (70 eV).

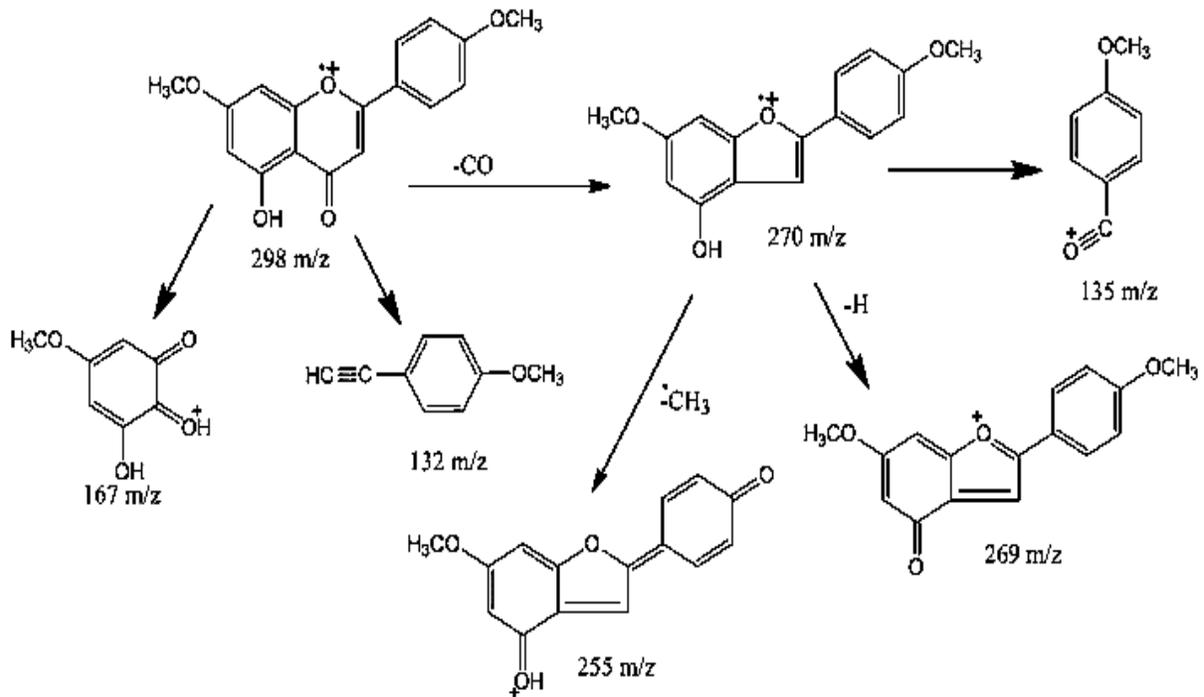


Figura 22. Fragmentación por impacto electrónico de la 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona.

## 6.6. Ensayo de citotoxicidad.

Los compuestos aislados, así como los extractos iniciales de los cuales se obtuvieron, se sometieron a la evaluación citotóxica para determinar su actividad biológica frente a tres líneas celulares, en el Cuadro 10 se muestran los valores de  $CI_{50}$  obtenido para cada compuesto. El criterio de actividad establecido por el Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos considera un valor significativo ( $CI_{50}$ ) concentraciones menores a 4  $\mu\text{g/mL}$  para los compuestos puros (Suffnes y Pezzuto, 1991) y 25  $\mu\text{g/mL}$  para extractos y fracciones

**Cuadro 10.** Valores de  $CI_{50}$  para los compuestos y los extractos completos.

Muestra	Línea celular ( $\mu\text{g/mL}$ )		
	HCT15	HeLa	MCF7
Colchicina	0.002	0.009	0.02
Extracto C-1	17.45	0.99	9.21
Extracto C-2	>25	22.59	24.50
Salvigenina	>25	>25	>25
5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona	>25	>25	>25
2(5)-furanona	1.87	21.25	24.90

Se puede observar que el Extracto C-2 tiene actividad alta con respecto a las tres líneas celulares. Otros compuestos con propiedades cancerígenas de este extracto ya han sido reportados en la literatura (Martínez Fructuoso, 2015).

## 7. CONCLUSIONES.

El presente trabajo pretendió ampliar el conocimiento de la composición química de la especie *Hyptis pectinata*, la cual es importante en la medicina tradicional mexicana por su empleo contra las fiebres, los problemas cutáneos y gastrointestinales, la rinoфаринgitis y la congestión pulmonar.

Haciendo uso de la técnica de corte de núcleo en la cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa fue posible la purificación de tres metabolitos secundarios. La elucidación estructural de estos principios se realizó mediante el análisis de los espectros de resonancia magnética nuclear ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) y espectrometría de masas (impacto electrónico); de esta forma, fue posible la caracterización de tres compuestos: una nueva 2(5H)-furanona cuya estructura corresponde a la [2'Z,5(1')Z] 5-(4'S-acetoxi-2-octeniliden)-2(5H)-furanona y dos flavonoides conocidos, la salvigenina y la 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona, provenientes de los extractos lipofílicos de *H. pectinata*.

De los compuestos obtenidos, sólo los flavonoides habían sido descritos en la literatura para especies de la misma familia pero no en la especie *H. pectinata*. La estructura de la 2(5H)-furanona es inédita.

## 8. PERSPECTIVAS.

Realizar la evaluación del potencial antimicrobiano de la nueva 2(5H)-furanona y compararlo con la actividad descrita para las pectinólidas caracterizadas de esta especie.

## 9. BIBLIOGRAFIA.

Abdulmajid Ayatollahi S., Shojaii A., Kobarfard F., Mohammadzadeh M. (2009) Two Flavones from *Salvia leriæefolia*. *Journal of Pharmaceutical Research* **8**, 179-184.

Acmad, S., Hoyer T., Kjaer S., Makmur L. Norrestam R. (1987) Molecular and crystal structure of Hyptolide, a natural occurring  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated  $\gamma$ -lactone. *Acta Chemica Scandinavica* **B41**, 599-609.

Agra, M. F.; França de Freitas, P.; Barbosa-Filho, J. M. (2007) Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **17** (1), 114-140.

Alonso-Castro A.J; Maldonado-Miranda J. J.; Zarate-Martinez A.; Jacobo-Salcedo M.; Fernandez-Galicia C.; Figueroa-Zuniga L. A; Rios-Reyes N. A.; De Leon-Rubio M.A.; Medellin-Castillo N. A.; Reyes-Munguia A. (2012) Medicinal plants used in the Huasteca Potosina, México. *Journal of Ethnopharmacology* **143**, 292-298.

Amzad Hossain M., Mizanur Rahman S. M. (2011) Isolation and characterization of flavonoids from the leaves of medicinal plant *Orthosiphon stamineus*. *Arabian Journal of Chemistry*. **8**, 218-221

Arrigoni-blank, M. F.; Antonioli, A. R.; Caetano, L. C.; Campos, D.A.; Blank, A. F.; Alves, P. B. (2008) Antinociceptive activity of the volatile oils of *Hyptis pectinata* L. Poit. (Lamiaceae) genotypes. *Phytomedicine*. **15**, 334-339.

Bai Naisheng, He Kan, Roller Marc, Lai Ching-Shu, Shao Xi, Pan Min-Hsiung, Bily Antoine, Ho Chi-Tang.(2010) Flavoniod glycosides from *Microtea debilis* and their cytotoxic and anti-inflammatory effects. *Fitoterapia*. **82**, 168-172.

Biblioteca digital de la medicina tradicional mexicana. UNAM. 2009. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7870> (Consultado el 13 de diciembre del 2015 a las 13:44pm).

Bispo, M. D.; Mourao, R. H. V.; Franzotti, E. M.; Bomfilm K. B. R.; Arrigoni-Blank, M de F.; Moreno, M. P. N; Marchioro, M.; Antoniollli, A.R. (2001) Anticonceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. *Journal Ethnopharmacology*. **76**, 80-86.

Boalino Dionne M., Connolly Joseph D., McLean Stewart., Reynolds William F., Tinto Winston F. (2003)  $\alpha$ -Pyrones and 2(5H)-furanone from *Hyptis pectinata*. *Phytochemistry*. **64** (7), 1303-1307.

Cadena Ríos M. (2008). Estudio químico de *Hyptis brevipes*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

Cárdenas PE. Medicina precortesiana en el mundo mexicana. An Med Asoc Med Hosp ABC 2003; **48** (2), 124-130.

Cerqueira Coelho Paulo Lucas., Villas-Boas Sandra Regina., Seara Pitanga Bruno Penas., Amaral Da Silva Victor Diogenes., Neves Olivera Mona., Grangeiro Maria Socorro., Dos Santos Souza Cleide. (2015) Flavonoids from the Brazilian plant *Croton betulaster* inhibit the growth of human glioblastoma cells and induce apoptosis. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. **26**, 34-43.

Charlton, L. J. (1998) Antiviral activity of lignans. *Journal of Natural Products*. **61**, 1447-1451.

Cortez-Gallardo, V.; Macedo-Ceja, J.P; Hernandez Arrollo, M.; Arteaga-Aureoles, G.; Espinosa-Galvan, D.; Rodriguez-Landa, J. F. (2004) Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas. *Revista Biomédica*. **15**, 126-136.

Davies Coleman T. M y Rivett D. E. A. (1989) Naturally occurring 6-substituted 5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrones. En: *Progress in Chemistry of Organic Natural Products. Fortschritte. Der Chemie Organischer Naturstoffe*. **55**, W. Herz, H. Grisebach, G. W. Kirby, Ch. Tamm (editores), Springer-Verlag, New York. 1-35.

De la Cruz, Martín (1964). *Libellus de medicinalibus indorum herbis. Manuscrito azteca de 1552. Según traducción latina de Juan Badiano*. México: Instituto Mexicano del Seguro Social.

Delgado G., Pereda-Miranda R., Romo de Vivar A. (1985) Structure and stereochemistry of 4-deacetoxy-10-epi-olguine, a new  $\gamma$ -lactone from *Hyptis oblongifolia* Betham (Labiatae). *Heterocycles*. **23**, 1869-1872.

Domínguez-Vázquez, G.; Berlín, B.; Castro, R. A. E.; Estrada-Lugo, I. K. E. (2002) Revisión de la diversidad y patrones de distribución de *Labiatae* en Chiapas. *Anales del Instituto de biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Serie botánica* **73** (1), 39-80.

Donaldson, J. R. y Cates, R. G. (2004) Screening for Anticancer agents from Sonoran Desert Plants: A chemical Ecology Approach. *Pharmaceutical Biology*. **42** (7), 478-487.

Emmart, E. W. (1940) *The Badianus Manuscript (Codex Barberini, Latin 241). An Aztec Herbal of 1552*; The Johns Hopkins Press: Baltimore.

Falcão, R. A.; do Nascimento, P. L. A.; de Souza, S. A.; da Silva, T. M. G.; de Queiroz, A. C; de Matta, C. B. B; Moreira, M. S. A.; Camara, C. A.; Silva, T. M. S. (2013) Antileishmanial phenylpropanoids from leaves of *Hyptis pectinata* (L.) Poit. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1-7.

Flora de Santa Catarina:  
<https://sites.google.com/site/biodiversidadecatarinense/plantae/magnoliophyta/lamiaceae/hyptis-pectinata-sambacaita>. Consultado el 13 de Enero del 2016 a las 19:38 pm.

Fragoso- Serrano, C., Gibbons, S., Pereda-Miranda, R. (2005) Anti-Staphylococcal and cytotoxic compounds from *Hyptis pectinata*. *Planta Medica*. 71 (3), 278-280.

Grayer Renée J., Eckert Maria R., Lever Andrew, Veitch Nigel C., Kite Geoffrey C., Paton Alan J. (2010) Distribution of exudate flavonoids in the genus *Plectranthus*. *Biochemical Systematics and Ecology*. 38, 335-341.

Gunther RT (1968) The Greek Herbal of Dioscorides. Hafner, London. 57.

Habibi Z., Cheraghi Z., Ghasemi S., Yousefi M. (2012) A new highly hydroxylated triterpene from *Salvia Atropatana* Bunge. *Natural Product Research*. 26:20, 1910-1913.

Heinric M., Kuhnth M., Rimpler H. (1994) Lignans and other compounds from the Mixe Indian medicinal plant *Hyptis verticillata*. *Phytochemistry*. 36 (2), 485-489.

Isobe, T.; Doe, M.; Morimoto, Y.; Nagata, K.; Ohsaki, A. (2006) The anti-*Helicobacter pylori* flavones in a Brazilian plant, *Hyptis fasciculata*, and the activity of methoxyflavones. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. 29 (5), 1039-1041.

Izco, J.; Barreno, E.; Brugués, M.; Costa, M.; Devesa, J. (1998) Botánica. Ed. McGraw-Hill Interamericana. España. 781.

Kingston, D.G.I., Rao, M. M; Zucker W. V. (1979) Plant anticancer agents. IX. Constituents of *Hyptis tormentosa*. *Journal of Natural Products* 42 (5), 496-499.

Kini, F; Kam, B.; Aycard, J.-P.; Gaydou, E.; Bombarda, I. (1993) Chemical Composition of the Essential Oil of *Hyptis spicigeria* Lam. from Burkina Faso. *Journal Essential Oil Research*. **5** (2), 219-221.

Kolak Ufuk., Işil Hacibekiroğlu., Öztürk Mehmet, Özgökçe Fevzi., Topçu Gülaçtu., Ulubelen Ayhan. (2009) Antioxydant and anticholinesterase constituents of *Salvia pocolata*. *Turk J Chem*. **33**, 8143-823.

Kuhnt, M.; Pröbstle, A. Rimpler, H., Bauer, R. y Heinrich, M. (1995) Biological and Pharmacological activities and further constituents of *Hyptis verticillata*. *Planta Médica*. **61** (3), 227-232.

Leal Luna J. (2014) Aislamiento de compuestos bioactivos a partir de *Hyptis spicigera*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

Lemos Silva, R. L.; Melo, G. B.; Antonioli, A. R.; Lima, S. O.; Melo, V. A.; Ramanho, F. S.; Ramalho, L. N. Z.; Zucoloto, S. & Silva Júnior, O. C. (2002) Efeito do Extrato Aquoso de *Hyptis pectinata* sobre a proliferação de Hepatócitos após Hepatectomia Parcial. *Acta Cirúrgica Brasileira*. **17** (3), 101-105.

León Portilla M. (1974) *La filosof.a náhuatl*. México: UNAM, Instituto de Investigaciones Históricas.

Levine SD; Hahn DW; Cotter ML; Greenslade FC; Kanojia RM; Pasquale SA; Wachter M; McGuire JL. (1981) The Mexican plant zoapatle (*Montanoa tomentosa*) in reproductive medicine: past, present and future. *Journal of Reproductive Medicine* **26** (10), 524-528.

MacRae, W. D. y Towers, G. H. N. (1984) Biological activities of lignans. *Phytochemistry*. **23**, 1207-1220.

Malan, K. A.; Pelissier, Y.; Bessiere, J. M.; Pellerin, F. (1989) Variation in the chemical composition of the essential oil of *Hyptis pectinata*, L. Poit. *Plant. Med. Phytother.* **23** (2), 86-89.

Martinez, M. (1993) Las plantas medicinales de México. Sexta edición. Editorial Botas. México. 216, 412, 488, 508.

Martínez-Fructuoso L. (2015) Aislamiento y caracterización estructural de 6-heptapintil-5,6-dihidro-alfa-pironas con actividad citotóxica de la especie *Hyptis pectinata*. Tesis de maestría. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

Martínez-Gordillo, M.; Fragoso-Martínez, I.; García-Peña, M. R; Montiel, O. (2013) Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo. *Revista Mexicana de Biodiversidad.* **84**, 30-36.

Melo, G.B.; Silva, R. L.; Melo, V. A.; Antonioli, Â. R.; Michellone, P.R.T.; Zucoloto, S.; Souza, M. E. J; Gomez, M. C. J.; Correia, R.B.; Castro-e-Silva, O. (2006) Proliferative effect of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* on liver regeneration after partial hepatectomy in rats. *Acta Cirurgica Brasileira.* **21** (Suppl. 1), 33-36.

Miranda, F.; Valdes, J. (1964) Comentarios Botánicos. En: *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*; Instituto Mexicano del Seguro Social: Mexico City. 243-282.

Missouri Botanical garden <http://www.tropicos.org>. Consultado el 17 de enero del 2016 a las 3:30 p.m.

Missouri Botanical Garden, St.Louise, U.S.A. *Hyptis pectinata*(L). Point. Consultado el 1 de mayo del 2016 a las 17:13 p.m

[http://www.plantillustrations.org/illustration.php?id\\_illustration=71492&mobile=0&code\\_category\\_taxon=1](http://www.plantillustrations.org/illustration.php?id_illustration=71492&mobile=0&code_category_taxon=1).

Miyaichi Yukinori., Segawa Akiko., Tomimori Tsuyoshi. (2006) Studies on Neoplase Crude Drugs. XXIX. Chemical Constituents of Dronapupsi, the Whole Herb of *Leucas cephalotes* Spreng. *Chemical Pharmacognosie Brasil*. **54** (10), 1370-1379.

Mukherjee, K. S.; Mukherjee, R. K.; Ghosh, P. K. (1984) Chemistry of *Hyptis suaveolens*: a pentacyclic triterpene. *Journal of Natural Products*. **47**, 377-378.

Nascimento, P. F. C.; Alviano, W. S.; Nascimento, A. L. C.; Santos, P. O.; Arrigoni-Blank, M. F.; de Jesus, R.A.; Azevedo, V. G.; Alviano, D. S.; Bolognese, A. M.; Trindale, R. C. (2008) *Hyptis pectinata* essential oil: chemical composition and anti-*Streptococcus mutans* activity *Oral Disease*. **14**, 485-489.

Noori Shokoofe, Hassan Zuhair M., Yaghmaei Bahram, Dolatkhah Milad. (2013) Antitumor and immunomodulatory effects of salvigenin on tumor bearing mice. *Cellular immunology*. **286**, 16-21.

Novelo, M.; Cruz, G. J.; Hernandez, L., Pereda-Miranda, R., Chai, H.; Mar, W. y Pezzuto, M. J. (1993) Cytotoxic constituents from *Hyptis verticillata*. *Journal of Natural Products*. **56**, 1728-1736.

Orendain Adalid, E.A. (2016). Monitoreo de la actividad citotóxica de los extractos obtenidos de las partes aéreas de la planta *Hyptis verticillata*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

Ortega-Soto A. (2014) Perfil cromatográfico y evaluación biológica de diferentes extractos de la planta *Hyptis brevipes*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

Pereda-Miranda, R. (1995) Bioactive Natural Products from traditionally used mexican plants. En: *Phytochemistry of Medicinal Plants* **29**. Editores J. T. Arnason, R. Mata, J. T. Romeo. Plenum Press. New York. 83-112.

Pereda-Miranda, R.; Gascon-Figueroa, M. (1988) Chemistry of *Hyptis mutabilis*: New pentacyclic triterpenoids. *Journal of Natural Products*. **51** (5), 996-998.

Pereda-Miranda, R., Hernández-Carlos, B. (2002). HPLC Isolation and structural elucidation of diastereomeric niloyl ester tetrasaccharides from Mexican scammony root. *Tetrahedron*. **58** (16), 3145-3154.

Pereda-Miranda, R.; Hernández, L.; Villavicencio, M.J.; Novelo, M.; Ibarra, P.; Chai, H.; Pezzuto, M. J. (1993) Structure and stereochemistry of pectinolides A-C, novel antimicrobial and cytotoxic 5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrones from *Hyptis pectinata*. *Journal of Natural Products*. **56**, 583-593.

Pereda-Miranda, R.; Fragoso-Serrano, M. y Cerda-García-Rojas, C. M. (2001) Application of molecular mechanics in the Total stereochemical elucidation of spicigerolide, a cytotoxic 6-tetraacetyl-oxyheptenyl-5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrone from *Hyptis spicigera*. *Tetrahedron* **57**, 47-53.

Pereda-Miranda R., Garcia M., Delgado G. (1990) Structure and Stereochemistry of four  $\alpha$ -pyrones from *Hyptis oblongiflora*. *Phytochemistry*. **29** (9), 2971-2974.

Pérez Gutierrez Rosa Martha. (2012) Antihepatotoxic, nephroprotective, and antioxidant activities of phenolic compounds from *Satureja macrostema* leaves against carbon tetrachloride-induced hepatic damage in mice. *Medicinal Chemistry Research*. **22**, 1846-1855.

Perva, A.; Stangler H. S.; Hadolin, M.; Knez, Z. (2001) Isolation of active components of Lamiaceae. Parte 2. Editores Glavic, Peter; Brodnjak-Voncina, Darinka. Zbornik Referatov Posvetovanja Slovenski Kemijski Dnevi, Maribor. Slovenia. Abstrac en inglés. Copyright © 2007 ACS on SciFindres ®.

Puerto Sarmiento FJ (1993). La Farmacia Renacenstista Española y la Botica de El Escorial. Universidad Complutense de Madrid. 97-108.

Rafatian Ghazaleh., Kjhodagholi Fariba., Farimani Mahdi Moridi., Abraki Shahnaz Babaei., Gardaneh Mossa. (2012) Increase of autophagy and attenuation of apoptosis by Salvigenina promote survival of SH-SY5Y cells following treatment with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Molecular Cell Biochemistry*. **371**, 9-22.

Ramamoorthy, T. P.; Bye, R.; Lot, A. y Fa, J. (1998) Lamiaceae de México: diversidad, distribución, endemismo y evolución. *Diversidad Biológica de México, orígenes y distribución*. Instituto de biología. UNAM: México. 501-526.

Raymundo. L. J. R. P.; Guilhon, C. C.; Alviano, D. S.; Matheus, M. E.; Antoniulli. A. R.; Cavalcanti, S. C. H.; Alves, P. B.; Alviano, C. S.; Fernandes, P. D. (2011) Characterisation of the anti-inflammatory and anticonceptive activities of the *Hyptis Pectinata* (L.) Poit essential oil. *Journal of Ethnopharmacology*. **134**, 725-732.

Renteria, J. L.; Atkinson R.; Guerrero, A. M.; Mader, J. (2006) Manual de identificación y manejo de malezas en las islas Galápagos, segunda edición. *Charles Darwin Foundation*. 33.

Ríos Castillo T., Quijano L., Reyes Chalpan R. (2012) Algunas reflexiones sobre la herbolaria prehispánica desde el punto de vista químico. *Revista Latinoamericana de Química*. **40** (2), 41-64.

Ruiz Acevedo, J. (1996) Determinación cuantitativa y aislamiento mediante cromatografía de líquidos de los constituyentes citotóxicos de *Hyptis verticillata* Jacq. (Lamiaceae). Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma "Benito Juárez". Oaxaca. México. 76.

Russo Serafini, M.; Campos Vergne, D. M.; Rabelo, T. K.; dos Passos Menezes, P.; Fagundes da Rocha, R; Fonseca Moreira, J. C.; Amaral da Silva, F.; Barreto Alves, P.; Ramos de Jesus, H. c.; Suoza Araújo, A. A.; Pens Gelain, D. (2012) Determination of chemical and physical properties of *Hyptis pectinata* essential oil and their redox active profile. *Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research*. **3** (1), 1-9.

Suárez Ortiz, G. A. (2003). Caracterización estructural y análisis conformacional de 6-heptenil-5,6-dihidro-2H-piran-2onas de origen vegetal. Tesis de Doctorado. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

Tewtrakul Supinya., Subhadhirasakul Sanan, Kummee Sopa. (2007). Anti-allergic activity of compounds from *Kaempferia parviflora*. *Journal of Ethnopharmacology*. **116**, 191-193.

UNIBIO: Colecciones Biológicas. Instituto de Biología. "*Hyptis pectinata*. UNAM. <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:OAX549394>. (Consultado el 13 de diciembre del 015 a las 13:51 pm)

University of florida. Algunas malesas de Costa Rica y Mesoamerica. Catálogo de terrestres, parasitas y acuáticas. *Hyptis pectinata*. Consultada el 1 de mayo del 2016 a las 17:16 p.m. [http://international\\_extension.ifas.ufl.edu/LaFlor/weeds-of-costa-rica/MALEZAS/Labiadas/hyptis-pectinatan.shtml](http://international_extension.ifas.ufl.edu/LaFlor/weeds-of-costa-rica/MALEZAS/Labiadas/hyptis-pectinatan.shtml).

Viesca TC.; Ramos de Viesca, M. (2012). Códice De la Cruz-Badiano. *Arqueología mexicana*. Edición especial (42): 74-77.

Villavicencio González, M.J. (1993). Purificación y caracterización de las pectinólidas A-C, principales constituyentes citotóxicos y antimicrobianos de *Hypstis pectinata* (L.) Poit. Tesis de Maestría. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.