



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ESTUDIO QUÍMICO DE HYPTIS BREVIPES”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:

MARIBEL CADENA RIOS



MÉXICO, D.F.

2008.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

Todo el material contenido en esta tesis 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	Dra. Maria Isabel Aguilar Laurents
Vocal	Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda
Secretario	Dra. Mabel Fragoso Serrano
1er sup.	Dr. José Fausto Rivero Cruz
2do sup.	Dr. José Antonio Guerrero Analco

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Departamento de Farmacia, Laboratorio 123  
Facultad de Química  
Universidad Nacional Autónoma de México

Asesor del tema:

---

Mabel Clara Fragoso Serrano

Sustentante:

---

Maribel Cadena Ríos

## DEDICATORIAS

A mis hijos Isabel Aime y Emiliano, que son el principal motor para seguir adelante y en espera de ser un ejemplo para ellos.

A mi esposo Israel por todo su apoyo y comprensión a lo largo de este proceso.

A mis padres Laura y Félix por su ejemplo de vida, por su motivación y su gran apoyo para continuar con mis estudios.

A mis hermanos Angélica, Álvaro y Gerardo por su ejemplo de superación y lucha diaria.

A Flor mi amiga de toda la carrera que ha estado conmigo en buenos y malos momentos y en espera de que logre sus objetivos.

A Dios por darme la vida y la oportunidad de estar en este camino, por darme las fuerzas para poder levantarme cada día con el firme propósito de llegar al fin de mis metas y así descubrir lo importante que es superarse.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dirección General de Asuntos de Personal Académico (DGAPA: proyecto IN208307-3) y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT: proyecto 45861-Q ).

A la Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano por todos sus conocimientos, por su gran apoyo para el desarrollo de este trabajo y por su paciencia en todo lo que se presentó a lo largo del camino.

Al Dr. Rogelio Pereda Miranda por permitirme formar parte de su grupo de investigación.

A los miembros del jurado por sus acertadas observaciones que permitieron la corrección del presente manuscrito.

A todos mis profesores que a lo largo de la carrera me brindaron sus conocimientos y apoyo para cada día superarme y aprender de cada uno de ellos lo mejor.

## INDICE

LISTA DE FIGURAS .....	I
LISTA DE CUADROS .....	II
LISTA DE TABLAS .....	II
Introducción .....	1
Antecedentes .....	2
1. Generalidades de la familia .....	2
2. Etnobotánica del género <i>Hyptis</i> .....	3
3. Descripción de <i>Hyptis brevipes</i> .....	4
3.1. Características botánicas .....	4
3.2. Clasificación taxonómica .....	5
3.3. Distribución.....	6
3.4. Etnobotánica.....	6
4. Fitoquímica del género <i>Hyptis</i> .....	7
4.1. Terpenoides.....	7
4.2. Flavonoides .....	9
4.3. Lignanos .....	9
4.4. 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas .....	10
Hipótesis .....	13
Objetivo General .....	14
Parte experimental.....	15
1. Procedimientos generales .....	15
1.1. Instrumental analítico .....	15
1.2. Técnicas cromatográficas.....	15
1.2.1. Cromatografía en columna abierta .....	15
1.2.2. Cromatografía en capa fina .....	15

1.2.3. Cromatografía de líquidos de alta resolución .....	16
2. Material vegetal .....	16
3. Extracción del material vegetal.....	16
4. Fraccionamiento primario del extracto orgánico total .....	17
5. Fraccionamiento secundario de la fracción VI .....	18
6. Aislamiento y purificación del ácido oleanólico y ácido ursólico .....	19
7. Análisis por cromatografía de gases de las fracciones 3-5 y 7-9.....	19
8. Ensayo de citotoxicidad .....	19
9. Obtención de derivados.....	20
9.1. Síntesis del difenilditiocetal de la L-ramnosa .....	20
9.2. Acetilación total del difenilditiocetal de la L-ramnosa .....	21
9.3. Acetilación parcial del difenilditiocetal de la L-ramnosa .....	23
Resultados y discusión .....	24
Resumen y conclusiones .....	35
Bibliografía.....	36

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Hyptis brevipes</i> .....	5
Figura 2. Distribución de <i>Hyptis brevipes</i> en América .....	6
Figura 3. Metodología general para el aislamiento de los constituyentes principales del extracto diclorometano-metanol de <i>H. brevipes</i> .....	25
Figura 4. Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 300 MHz) de la mezcla de ácido ursólico y ácido oleanólico.....	27
Figura 5. Espectro de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 75 MHz) de la mezcla de ácido ursólico y ácido oleanólico.....	27
Figura 6. Espectro de RMN <sup>1</sup> H (C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N, 300 MHz) de la mezcla de ácido ursólico y ácido oleanólico.....	28
Figura 7. Espectro de RMN <sup>13</sup> C (C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N, 75 MHz) de la mezcla de ácido ursólico y ácido oleanólico.....	28
Figura 8. Secuencia retrosintética para la obtención de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas a partir de L-ramnosa. ....	29
Figura 9. Espectro de RMN <sup>1</sup> H del difenilditioacetal de la L-ramnosa ( <b>3</b> ) (300 MHz, C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N).....	31
Figura.10. Espectro de RMN <sup>13</sup> C del difenilditioacetal de la L-ramnosa ( <b>3</b> ) (300 MHz, C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N).....	31
Figura 11. Espectro de RMN <sup>1</sup> H del difenilditioacetal de la 2,3,4,5-tetra-O-acetil-L-ramnosa ( <b>4</b> ) (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	32
Figura 12. Espectro de RMN <sup>13</sup> C del difenilditioacetal de la 2,3,4,5-tetra-O-acetil-L-ramnosa( <b>4</b> ) (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	32
Figura 13. Espectro de RMN <sup>1</sup> H del fenil 3,4-di-O-acetil-2-S-fenil-1,2-ditio- $\beta$ -L-quinopiranosido ( <b>5</b> ) (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	33
Figura 14. Espectro de RMN <sup>13</sup> C del fenil 3,4-di-O-acetil-2-S-fenil-1,2-ditio- $\beta$ -L-quinopiranosido ( <b>5</b> ) (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) .....	33
Figura 15. Espectro de RMN <sup>1</sup> H del difenilditioacetal de la 3,4-di-O-acetil-2,5-anhidro-L-quinovosa difenilditioacetal ( <b>6</b> ) (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	34
Figura 16. Espectro de RMN <sup>13</sup> C del difenilditioacetal de la 3,4-di-O-acetil-2,5-anhidro-L-quinovosa difenilditioacetal ( <b>6</b> ) (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	34



## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Secciones del género <i>Hyptis</i> localizadas en México .....	3
Cuadro 2. Principales triterpenos citotóxicos aislados en el género <i>Hyptis</i> .....	9
Cuadro 3. Fraccionamiento primario del extracto total de <i>Hyptis brevipes</i> .....	17
Cuadro 4. Fraccionamiento secundario de la fracción VI de <i>Hyptis brevipes</i> .....	18

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Citotoxicidad de las fracciones primarias del extracto diclorometano- metanólico de <i>Hyptis brevipes</i> .....	24
Tabla 2. Desplazamientos químicos en la RMN <sup>1</sup> H del ácido ursólico (1) y ácido oleanólico (2) (300 MHz) .....	26
Tabla 3. Desplazamientos químicos en la RMN <sup>13</sup> C del ácido ursólico (1) y ácido oleanólico (2) (75 MHz) .....	26

---

## INTRODUCCIÓN

Dentro del marco de productos naturales, proliferan en nuestro país un gran número de extractos de plantas que se comercializan como “Medicamentos Naturales”. Las plantas superiores han constituido una fuente asequible de productos naturales bioactivos de utilidad en la medicina y la agricultura. El descubrimiento de compuestos biodinámicos y novedosos ha permitido la caracterización química y biológica de especies susceptibles de comercialización y adicionalmente, provee de estructuras que sirven de modelo para el desarrollo de derivados sintéticos con una actividad biológica selectiva y una reducida toxicidad (Heinrich 2003; Crag, 1994).

En especial, 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 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), se encuentra conformado por un gran número de especies de gran importancia económica y medicinal en la vida diaria de nuestro país. Un programa destinado a establecer el potencial citotóxico de algunas de estas especies útiles en la medicina tradicional mexicana, demostró la presencia de compuestos antineoplásicos potentes ( $CE_{50} < 1 \mu\text{g/mL}$ ) caracterizados como 6-poliaciloxialquenil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas (Pereda-Miranda, 1995). Estas investigaciones demostraron un efecto citotóxico específico de estos principios para los carcinomas de colon y ovario, *e.g.* las pectinólidas ( $CE_{50} < 0.01 \mu\text{g/mL}$ ) de *Hyptis pectinata* (Pereda-Miranda, 1993).

El presente trabajo surgió como parte de un programa de investigación titulado “Evaluación del potencial citotóxico de especies selectas del género *Hyptis* (Lamiaceae) como una fuente potencial de agentes terapéuticos”. La selección de cada una de las especies que han sido sometidas a investigación fitoquímica se realizó a través de una propuesta fundamentada en criterios quimiotaxonómicos en conjunto con los resultados de las evaluaciones preliminares de su potencial citotóxico (Hernández de Jesús, 1991; Villavicencio González, 1993; Novelo Torres, 1994).

---

---

## ANTECEDENTES

### 1. Generalidades de la familia.

La familia Labiatae se compone de aproximadamente 250 géneros y 6970 especies, distribuidas desde el sur de Estados Unidos hasta Argentina (Falcao y Menezes, 2003). 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.

En México, la familia está representada abundantemente por más de 512 especies y 27 géneros que pertenecen a seis tribus. La tribu más diversa es Mentheae con 11 géneros; sin embargo la tribu Salviae, representada por dos géneros (*Monarda* y *Salvia*), es la que presenta una mayor riqueza en número de especies, contribuyendo con el 64% del total de las labiadas de México. Se les encuentra predominante en las montañas, aunque son muy numerosas en casi todos los tipos de vegetación en condiciones tan variables como las tierras bajas tropicales, los desiertos y las áreas alpinas (Ramamoorthy *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 las industrias 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).

En la medicina tradicional se emplean los extractos y los aceites esenciales de las labiadas por sus actividades antibacterianas, antivirales, antifúngicas, nematocidas, carminativas y espasmolíticas (Facey *et al.*, 2005; Oliva *et al.*, 2007). Tal vez, las materias primas de mayor importancia económica obtenidas a partir de las labiadas son la hierbabuena (*Mentha spicata* L) y la menta (*Mentha piperita* L), ampliamente utilizadas como saborizantes, especialmente en goma de mascar y para la higiene dental.

En particular el género *Hyptis* comprende varias especies de gran importancia en la medicina tradicional mexicana (*e.g.* *Hyptis suaveolens*, la chia; *Hyptis albida*, la salvia blanca) (Pereda-Miranda, 1988). 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 (cuadro 1) que agrupan a 33 especies, siendo endémicas del país sólo 22 especies (Epling, 1949). 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* (subsecc. *Pectinaria*), *Polydesmia* (subsecc. *Vulgaris*), *Cephalohyptis* (subsecciones *Marrubiastrae* y *Genui*) y *Pusillae* tienen una distribución tropical en el sur de la República Mexicana (Ramamoorthy *et al.*, 1998).

**Cuadro 1.** Secciones del género *Hyptis* localizadas en México

Sección	Número total de especies de la sección	Número de especies de México	Número de especies endémicas de México
<i>Rhytidea</i>	2	2	2
<i>Umbellatae</i>	3	2	2
<i>Laniflorae</i>	6	6	5
<i>Minthidium</i>	11	3	2
<i>Mesosphaeria</i> Subsecc. <i>Pectinaria</i>	14	6	5
Subsecc. <i>Spicaria</i>	1	1	
<i>Polydesmia</i> Subsecc. <i>Vulgaris</i>	11	2	1
<i>Cephalohyptis</i> Subsecc. <i>Marrubiastrae</i>	25	4	1
Subsecc. <i>Genui</i>	20	6	4
<i>Pusillae</i>	4	1	
Total	97	33	22

## 2. Etnobotánica del género *Hyptis*.

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 y calambres. Sin embargo, todas las especies medicinales comparten su uso

---

como agentes carminativos y antisépticos (Pereda-Miranda, 1995). En México, las hojas de *H. albida* se utiliza para tratar infecciones del oído y para dolores reumáticos (Martínez, 1993). *H. pectinata* se utiliza ampliamente en América Central para el tratamiento del reumatismo y para el tratamiento de problemas estomacales. En México, se utilizan las hojas frescas en inhalaciones en caso de congestión pulmonar y rinofaringitis, usos que ponen en evidencia las propiedades antibacterianas y antimicóticas de los componentes bioactivos de la planta (Villavicencio-González, 1993; Fragoso-Serrano, *et al.*, 2005). *H. suaveolens* se utiliza en México, para curar algunas afecciones intestinales, contra el estreñimiento y contra la bilis (Martínez, 1993), además de tener actividad antiinflamatoria (Grassi *et al.*, 2006). *H. verticillata* se usa para tratar desórdenes gastrointestinales, tales como dolor de estómago, la indigestión, los cólicos y los parásitos gastrointestinales, también se utiliza contra infecciones de la piel y para eliminar verrugas (Heinrich, 2003; Facey *et al.*, 2005).

Otro uso tradicional de estas especies consiste en mezclar las plantas con los alimentos que almacenan los granjeros de diversas regiones del trópico de América y de África, para controlar la infestación por insectos de sus cosechas almacenadas. Se han realizado varias investigaciones enfocadas a la evaluación de extractos orgánicos y de compuestos puros de algunas de estas especies las cuales demostraron sus propiedades repelentes y antidegustativas (Araujo *et al.*, 2003; Krishnamurthy y Shashikala, 2006; Jaenson *et al.*, 2006). En México, las especies del género *Hyptis* utilizadas por sus propiedades insecticidas son: *H. capitata*, *H. emory*, *H. verticillata* e *H. albida*. (Altschul, 1973).

### **3. Descripción de *Hyptis brevipes*.**

#### **3.1. Características botánicas**

*Hyptis brevipes*, se conoce popularmente como hierba del burro, es una hierba erecta de 0.5-1.5 m de alto. Tallo hueco, cuadrangular, ramificado, con pelos antrorsos; hojas estrechas ovadolanceoladas de 15-80 x 5-22 mm, ápice agudo o acuminado, con pelos en ambos lados, pecíolos de 3-12 mm de largo, con pelos rígidos y largos. Las flores en forma de cabezas globosas verdes pálidas de 6-8 mm, con tallos axilares de 5-12 mm; El cáliz es una glándula en forma de punta, tubular, de 3-5 mm de largo. Da un fruto en forma de nuez pequeña arrugada de color café oscuro o negro pardusco, con 0.5-0.8 mm de largo (Figura 1)( Suddee, 2001; Waterhouse y Mitchell, 1998).



**Figura 1.** *Hyptis brevipes* (Tenorio, 2006)

### 3.2. Clasificación taxonómica

Reino	Plantae
Subreino	Traqueobionta
Superdivisión	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Labiales (Lamiales)
Familia	Lamiaceae
Subfamilia	Androceo
Género	<i>Hyptis</i>
Sección	<i>Cephalohyptis</i>
Subsección	<i>Marrubiastrae</i>
Especie	<i>brevipes</i>

(Vibrans, 2007)

### 3.3. Distribución.

*Hyptis brevipes* es nativa de América tropical, se le ha localizado en Costa Rica, El Salvador, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Panamá, Cuba, Venezuela, Brasil, Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú, Argentina, Paraguay y Uruguay (Figura 2) (USDA 2007), tiene una distribución secundaria en Burma, Tailandia, Vietnam y Oceanía (Suddee, 2001, Vibrans, 2007). En México, sólo se ha registrado en Chiapas, Tabasco y Veracruz (Villaseñor y Espinosa, 1998).

### 3.4. Etnobotánica

*Hyptis brevipes* Lam., al igual que otras especies de este género, se emplea en la medicina tradicional como un remedio para múltiples propósitos, para el dolor de cabeza, mordeduras, diarrea, gusanos y lombrices, durante y después del parto, principalmente por sus propiedades antisépticas y carminativas (Duke, 2007). En Indonesia se utiliza para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer (Goun *et al.*, 2003). En Panamá se emplea como protección después del parto (Gupta, 1996).



**Figura 2.** Distribución de *Hyptis brevipes* en América (Missouri Botanical Garden, 2007)

#### 4. Fitoquímica del género *Hyptis*.

Los constituyentes químicos aislados incluyen monoterpenos, diterpenos, triterpenos, sesquiterpenos, flavonoides, lactonas, lignanos y ácidos grasos (Falcao y Menezes, 2003)

##### 4.1 Terpenoides.

Estas especies se caracterizan por ser ricas en aceites esenciales, cuyos constituyentes de naturaleza terpenoide varían ampliamente no sólo entre las diferentes especies, también se observa una gran variabilidad intraespecífica, es decir, entre las mismas especies colectadas en zonas geográficas diferentes (Aguiar *et al.*, 2003, Eshilokun, 2005; Oliveira *et al.*, 2005).

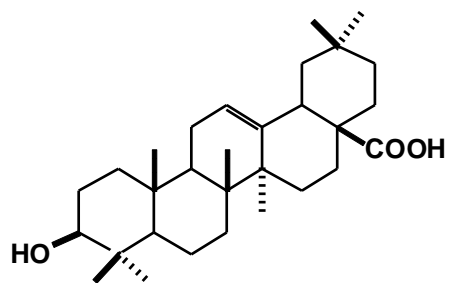
Se han aislado monoterpenos (*H. lanceolata* Poit., *H. pectinata* (L.) Poit., *H. spicigera* Lam. e *H. suaveolens* Poit.; Tchoumboungang *et al.*, 2005; Rana *et al.*, 2004), sesquiterpenos (*H. floribunda*, Micheli *et al.*, 2002), diterpenos tricíclicos con núcleos abietano (*H. martiusii*, Araujo *et al.*, 2004 y 2006; *H. suaveolens*, Chukwujekwu, 2005) pimarano (*H. dilatata*, Urones *et al.*, 1998) y labdano (*H. spicigera*, Fragosó-Serrano, 2000).

Los triterpenos constituyen los productos del metabolismo secundario más abundantes y ampliamente distribuidos entre las especies del género *Hyptis* (Cuadro 2) y representan derivados pentacíclicos con diferentes grados de oxidación de los esqueletos básicos de lupano, oleanano y ursano (Pereda-Miranda, 1988).

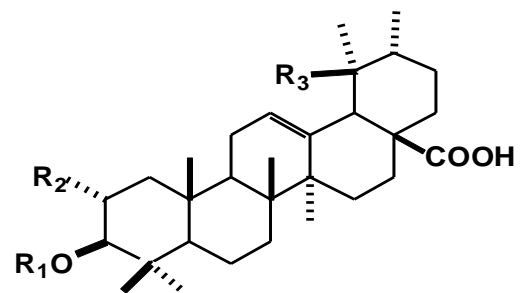
Se ha sugerido que la actividad citotóxica detectada durante el fraccionamiento biodirigido de los extractos orgánicos derivados de remedios tradicionales pertenecientes a la familia de las labiadas se asocia con la presencia de grandes cantidades de triterpenos moderadamente citotóxicos, entre los que se encuentran los ácidos oleanólico (1), ursólico (2), betulínico (3), 2 $\alpha$ -hidroxiursólico (4), pomólico (5) y el lupeol (6) (Pereda-Miranda, 1995).

Los compuestos 1 y 5 presentan actividad anti-HIV; CE<sub>50</sub>= 1.7  $\mu$ g/mL y 1.4 $\mu$ g/mL respectivamente (Kashiwada *et al.*, 1998; Palsson y Jaenson, 1999). Los compuestos 1, 2 y 3 inhiben totalmente la movilidad de epimastigotes cultivados del *Tripanosoma cruzi* en concentraciones de 2 mg/mL después de 2 h de incubación (Fumiko-Abe, 2002).





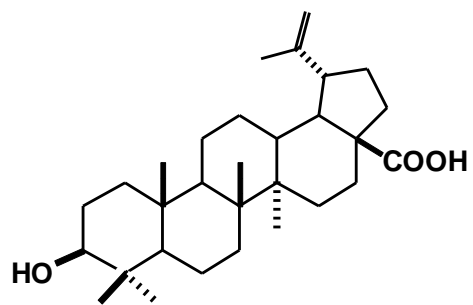
1



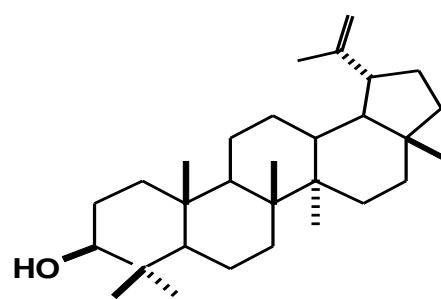
2  $R_1 = R_2 = R_3 = H$

4  $R_1 = R_3 = H; R_2 = OH$

5  $R_1 = R_2 = H; R_3 = OH$



3



6

**Cuadro 2.** Principales triterpenos citotóxicos aislados en el género *Hyptis*.

Compuesto	Fuente*	Referencia
1	HA, HE, HS, HT	Pereda-Miranda y Delgado, 1990; Shet <i>et al.</i> , 1972; Misra <i>et al.</i> , 1981; Kingston <i>et al.</i> , 1979.
2	HA, HC, HV	Pereda-Miranda y Delgado, 1990; Almtorp <i>et al.</i> , 1991; Novelo <i>et al.</i> , 1993.
4	HA, HC, HM, HV	Pereda-Miranda y Delgado, 1990; Almtorp <i>et al.</i> , 1991; Pereda-Miranda, 1988; Novelo <i>et al.</i> , 1993.
5	HM	Pereda-Miranda y Gascón-Figueroa, 1988.
6	HM	Pereda-Miranda y Gascón-Figueroa, 1988.

\*HA= *Hyptis albida*, HC= *Hyptis capitata*, HE= *Hyptis emoty*, HM= *Hyptis mutabilis*, HS= *Hyptis suaveolens*, HT= *Hyptis tomentosa*, HV= *Hyptis verticillata*.

#### 4.2. Flavonoides.

Varias flavonas se han aislado de especies del género *Hyptis*. De *H. verticillata* se aisló la sideritoflavona con una  $CE_{50}$  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 *H. fasciculata* se aislaron dos flavonas, cirsilineol y cirsimaritina con ligera actividad sobre *Helicobacter pylori* (Isobe *et al.*, 2006)

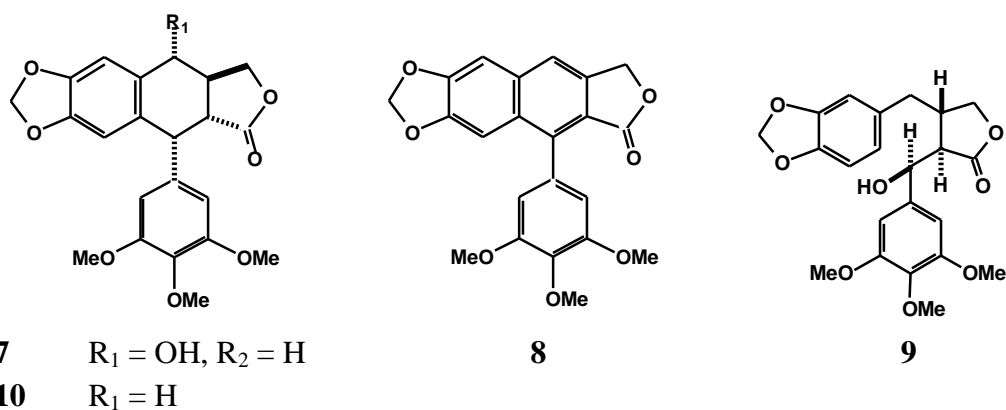
#### 4.3. Lignanos.

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 destacan

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 la deshidro- $\beta$ -peltatina (**8**) (Novelo *et al.*, 1993) y, tres lignanos con esqueleto de dibencilbutirolactona, p. ejemplo el podorrizol (**9**) (Kuhnt *et al.*, 1994). Esta especie, se conoce en la medicina tradicional oaxaqueña como la hierba San Martín, y representa una fuente alternativa a las especies de *Podophyllum* (Berberidaceae) como materia prima para la obtención de lignanos análogos de la podofilotoxina, compuesto que se emplea como un precursor para la semisíntesis del etopósido y tenipósido, agentes quimioterapéuticos de utilidad en el tratamiento de la leucemia y el cáncer testicular (Ruíz-Acevedo, 1996).

De las partes aéreas de *Hyptis tomentosa* se aisló la desoxipodofilotoxina (**10**) (Kingston *et al.*, 1979).

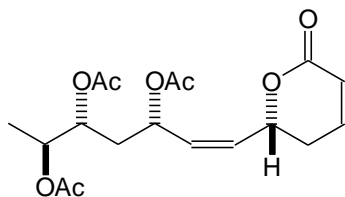


#### 4.4. 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas.

Las 5,6-dihidro- $\alpha$ -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).

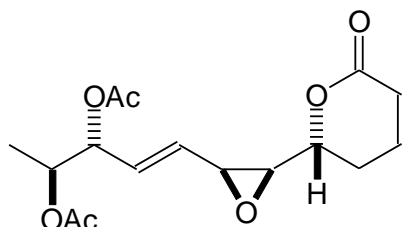
La primera  $C_6$ -alquenil-5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona aislada en la familia de las labiadas fue

la hiptólida (**11**) de *H. pectinata* (Achmad *et al.*, 1987).



**11**

Del extracto acetónico de las partes aéreas de la especie mexicana *H. oblongifolia*, se aislaron cuatro 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas (Delgado *et al.*, 1985, Pereda-Miranda *et al.*, 1990a), entre las cuales, la 5-desacetiloxi-5'-*epi*-olguina (**12**) demostró una actividad citotóxica significativa ( $CE_{50} < 4 \mu\text{g/mL}$ ) contra las líneas celulares de cáncer de pulmón, colon, carcinoma nasofaríngeo normal y resistente a la vinblastina, el carcinoma epidermoide de humanos y la leucemia linfocítica de múridos (Pereda-Miranda, 1995).

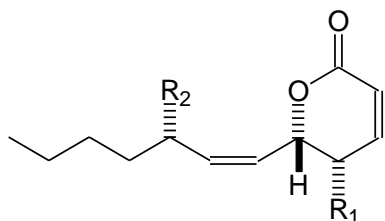


**12**

A partir de las partes aéreas de *H. spicigera* se logró el aislamiento de la espicigerólida (**13**) cuya estereoquímica se estableció a través de la aplicación de la mecánica molecular para el cálculo de las constantes de acoplamiento vecinales  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  y se validó a través de la preparación del residuo acíclico a partir de L-ramnosa (Fragoso-Serrano, 2000; Pereda-Miranda *et al.*, 2001).

El fraccionamiento biodirigido del extracto clorofórmico de las partes aéreas de *H. pectinata* permitió el aislamiento de las pectinólidas A-C (**14-16**), 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 tres 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas y una

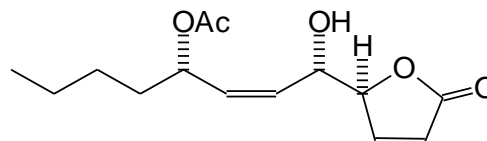
2(5H)-furanona (pectinólidas D-G) (Boalino *et al.*, 2003). La pectinólida H (**17**) corresponde al segundo compuesto de tipo 2(5H)-furanona aislado en el género *Hyptis* (Fragoso-Serrano *et al.*, 2005)



**14** R<sub>1</sub> = R<sub>2</sub> = OAc

**15** R<sub>1</sub> = OAc; R<sub>2</sub> = OH

**16** R<sub>1</sub> = OH; R<sub>2</sub> = OAc



**17**

## HIPÓTESIS.

Al considerar los criterios de tipo quimiotaxonómico y etnobotánico del género *Hyptis* existe la suposición de que estas especies poseen una gran variedad de constituyentes químicos con diversas propiedades biológicas. En el caso de *Hyptis brevipes*, una especie mexicana empleada para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales e infecciones de la piel, se espera encontrar la presencia de principios activos en el extracto orgánico que podrán monitorearse mediante el ensayo de citotoxicidad.

## OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del presente proyecto de investigación consistió en el aislamiento, la purificación y caracterización de los constituyentes mayoritarios del extracto diclorometano-metanólico obtenido de las partes aéreas de *Hyptis brevipes* (Lamiaceae). De forma alterna obtener derivados semisintéticos de la L-ramnosa protegida en el carbono anomérico y por acetilación selectiva de los hidroxilos presentes en la molécula para generar un sintón quiral de utilidad en la preparación de las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas citotóxicas características del género *Hyptis*.

### Objetivos específicos.

Para el cumplimiento del objetivo general se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- 1) Establecer el potencial citotóxico del extracto orgánico total de *Hyptis brevipes*.
- 2) Realizar el fraccionamiento primario del extracto orgánico total de las partes aéreas de *Hyptis brevipes* y monitorear las actividades citotóxicas de las fracciones colectadas.
- 3) Purificar los constituyentes mayoritarios mediante métodos cromatográficos convencionales y la cromatografía de líquidos de alta resolución.
- 4) Establecer la estructura molecular de los metabolitos secundarios bioactivos, mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas contemporáneas.
- 5) Sintetizar la ditiofenil-L-ramnosa y buscar las condiciones de acetilación selectiva empleando anhídrido acético-piridina.

---

---

## PARTE EXPERIMENTAL.

### 1. Procedimientos generales.

#### 1.1. Instrumental analítico.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no se encuentran corregidos. Los espectros de IR se obtuvieron en un espectrómetro FTIR de rejilla marca Perkin-Elmer, modelo 1605, a un rango de 4000-400  $\text{cm}^{-1}$  sobre una ventana de bromuro de potasio usando la técnica de película y pastilla. Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN- $^1\text{H}$ ) y de carbono 13 (RMN- $^{13}\text{C}$ ) fueron registrados en un equipo Varian Unity-Inova a 300 y 75 MHz, respectivamente, en  $\text{CDCl}_3$  y  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , los desplazamientos químicos se designaron en partes por millón (ppm), con referencia al tetrametilsilano (TMS). Los espectros de masas se obtuvieron en el equipo Jeol, modelo JMS-SX102A, tipo doble sector, geometría inversa. El análisis se realizó por impacto electrónico a 70 eV. Para el registro de los cromatogramas de gases se empleó un cromatógrafo de gases marca Hewlett-Packard, modelo 5890 serie II.

#### 1.2. Técnicas cromatográficas.

Se emplearon tres diferentes técnicas de cromatografía de adsorción:

- a) Cromatografía en columna abierta (CC).
- b) Cromatografía en capa fina (CCF).
- c) Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

##### 1.2.1. Cromatografía en columna abierta.

Esta técnica se desarrolló empacando una columna de vidrio con gel de sílice 60 de marca Merck, con tamaño de partícula 0.063-0.200 mm.

##### 1.2.2. Cromatografía en capa fina.

Para los análisis cromatográficos se utilizaron cromatoplacas de aluminio cubiertas con



gel de sílice 60-F<sub>254</sub> (Merck) y para detectar los constituyentes en la placa cromatográfica, se empleó luz UV de onda corta (254 nm) y de onda larga (365nm), además de sulfato cérico como agente cromógeno.

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

La instrumentación utilizada consistió en un cromatógrafo marca Waters (Millipore Corporation, Waters Chromatography Division Milford, MA, EEUU.) equipados con una bomba modelo 600E y un detector de arreglo de diodos (modelo 996), adaptados a una computadora (Optiplex, Dell). El control de los equipos, la adquisición de los datos, así como, el procesamiento y el manejo de la información cromatográfica se realizaron con el programa Empower 2 (Waters). La resolución de las fracciones cromatográficas y/o de los crudos de reacción, así como la purificación de los compuestos, se efectuaron empleando columnas de gel de sílice en las escalas analítica ( $\mu$ porasil Waters 3.9  $\times$  300 mm) y preparativa (Waters 19  $\times$  150mm).

## **2. Material vegetal.**

Para el desarrollo del presente trabajo de investigación se utilizaron las partes aéreas de una población de *Hyptis brevipes* Lam. (Lamiaceae) colectadas en Noviembre de 1989 en el Km. 16 de la carretera Jalapa-Veracruz, estado de Veracruz, México. Un ejemplar de esta especie se depositó en el Herbario Nacional (Voucher H-1), Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México.

## **3. Extracción del material vegetal.**

El material vegetal se dejó secar mediante exposición al aire libre a temperatura ambiente, se pulverizó en un molino de cuchillas modelo Wiley 4, obteniéndose 525 g de material vegetal seco y molido. Se procedió a la extracción a temperatura ambiente vía maceración con *n*-hexano (2 L), en tres ocasiones durante 5 días, filtrando el disolvente y concentrándolo después de cada operación. El material vegetal residual se extrajo con una

mezcla de diclorometano-metanol (1:1) siguiendo el mismo procedimiento, resultando 56.6 g de un extracto con una coloración verdusca.

#### 4. Fraccionamiento primario del extracto orgánico total.

El extracto diclorometano-metanólico se adsorbió en gel de sílice (51.3 g) y se depositó en una columna empacada con 450 g de la misma fase estacionaria para proceder a la resolución primaria del extracto. Se inició con *n*-hexano y posteriormente se utilizó un gradiente de *n*-hexano-diclorometano y diclorometano-metanol para finalizar con metanol, eluyendo un total de 66 fracciones de 200 mL cada una, las cuales se analizaron mediante CCF para reunir los eluatos tomando en cuenta la homogeneidad cromatográfica (*R<sub>f</sub>*) de sus constituyentes. De esta forma, se obtuvieron 9 subfracciones combinadas (I-IX). El siguiente cuadro resume el fraccionamiento primario del extracto diclorometano-metanólico, así como los sistemas de elución empleados para la obtención de las subfracciones combinadas. Estas fracciones se sometieron a evaluación de citotoxicidad sobre tres líneas celulares.

**Cuadro 3.** Fraccionamiento primario del extracto total de *Hyptis brevipes*.

Eluyente	Proporción %	Número de Fracción	Fracciones combinadas	Clave
<i>n</i> -Hexano	100	1-13	2-18	I
<i>n</i> -Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	90:10	14-21	19-25	II
	70:30	22-27		
<i>n</i> -Hex-CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	50:50	28-33	29-39	III
	30:70	34-39		
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	100	40-46	40-47	IV
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> -MeOH	70:30	47-51	48	V
	50:50	52-56	49-50	VI
	30:70	57-61	51-54	VII
MeOH	100	62-66	55-60	VIII
			60-66	IX

## 5. Fraccionamiento secundario de la fracción VI.

La fracción número VI (19.52 g) se adsorbió en gel de sílice (50g) y se depositó en una columna empacada con 500 g de la misma fase estacionaria para proceder a la resolución primaria del extracto. Se inició con *n*-hexano y posteriormente se utilizó un gradiente de *n*-hexano-acetato de etilo y acetato de etilo-metanol para finalizar con metanol, eluyendo un total de 283 fracciones de 200 mL cada una, las cuales se analizaron mediante CCF para reunir los eluatos tomando en cuenta la homogeneidad cromatográfica (*R<sub>f</sub>*) de sus constituyentes. De esta forma, se obtuvieron 11 subfracciones combinadas (I'-XI'). El siguiente cuadro resume el fraccionamiento secundario de la fracción VI, así como los sistemas de elución empleados para la obtención de las subfracciones combinadas.

**Cuadro 4.** Fraccionamiento secundario de la fracción VI de *Hyptis brevipes*.

Eluyente	Proporción %	Número de Fracción	Fracciones combinadas	Clave
<i>n</i> -Hexano	100	1-25		
<i>n</i> -Hex-AcOEt	99:1	26-35		
<i>n</i> -Hex-AcOEt	98:2	36-50		
<i>n</i> -Hex-AcOEt	97:3	51-62	1	I'
<i>n</i> -Hex-AcOEt	94:6	63-73	50-70	II'
<i>n</i> -Hex-AcOEt	92:8	74-98	71-100	III'
<i>n</i> -Hex-AcOEt	90:10	99-109	101-128	IV'
<i>n</i> -Hex-AcOEt	88:12	110-154	129-139	V'
<i>n</i> -Hex-AcOEt	86:14	155-229	140-159	VI'
<i>n</i> -Hex-AcOEt	85:15	230-239	160-180	VII'
<i>n</i> -Hex-AcOEt	70:30	240-245	191-207	VIII'
AcOEt	100	246-256	208-238	IX'
AcOEt-MeOH	70:30	257-268	239-253	X'
AcOEt-MeOH	50:50	269-274	254-283	XI'
MeOH	100	275-283		

## 6. Aislamiento y purificación de ácido oleanólico y ácido ursólico

La subfracción VII' (162 mg), eluida con *n*-hexano-acetato de etilo (85:15) a partir de la fracción primaria VI, presentó un precipitado blanco que al ser sometido a análisis cromatográfico y el registro de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C, permitió la identificación de dos triterpenos conocidos y ampliamente distribuidos en la familia Lamiaceae: el ácido oleanólico y el ácido ursólico (Pereda-Miranda, 1988).

## 7. Análisis por cromatografía de gases de las fracciones 3-5 y 7-9

Se realizó un análisis por cromatografía de gases y espectrometría de masas de las fracciones 3 a 5 y 7 a 9, realizando una comparación de los constituyentes principales con la biblioteca del equipo.

## 8. Ensayo de citotoxicidad

Los procedimientos para el establecimiento de los cultivos celulares de las líneas cancerosas se fundamentaron en los protocolos previamente descritos en la literatura (Likhitwitayawuid, 1993; Pezzuto, 1997). Se utilizaron tres líneas celulares cancerosas humanas: KB, carcinoma nasofaríngeo; Hep-2, carcinoma de laringe humano; HeLa: carcinoma de cérvix humano. Estas líneas se mantuvieron en medio RMPI 1640 (10X), suplementado con 10 % de suero bovino fetal. Todas las líneas se cultivaron a 37 °C bajo atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% en aire y 100 % de humedad relativa y se utilizaron para el ensayo cuando se encontraban en la fase logarítmica de crecimiento.

El bioensayo se realizó en microplacas de plástico con 96 cavidades (250 µL) de acuerdo con los procedimientos descritos por Skehan, *et al.* (1990) y Fragosó-Serrano (2000). Se depositaron en cada una de las cavidades de la placa 190 µL de las suspensiones celulares y se adicionaron 10 µL de la solución conteniendo la muestra de prueba, las cuales se evaluaron en las concentraciones de prueba correspondientes a 20.0, 4.0, 0.8, 0.16 y 0.032 µg/mL, por triplicado. Paralelamente, se prepararon ensayos de control, utilizando 190 µL

de la suspensión celular a evaluar y 10  $\mu\text{L}$  de DMSO al 10 %. Por otro lado, se depositaron 190  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular en una placa adicional y se determinó su densidad óptica inicial. Las placas que contenían las muestras de prueba y los controles se incubaron a 37 °C durante 72 horas, en tanto que las placas etiquetadas como iniciales se incubaron a 37 °C durante 30 min. Al concluir el periodo de incubación, las monocapas celulares se sometieron a un proceso de fijación adicionando 50  $\mu\text{L}$  de ácido tricloroacético al 50 % en cada una de las réplicas del bioensayo y se incubaron a 4 °C durante 30 min. Todas las placas se lavaron con agua de hielo por cuatro ocasiones, se tiñeron con 100  $\mu\text{L}$  de una solución de sulforodamida B (0.4 %) en ácido acético (1 %) durante 30 min. Se eliminó el exceso de tinción lavando con ácido acético al 1 % por cuatro ocasiones y se secaron con una corriente de aire. Posteriormente, el colorante unido a las proteínas se solubilizó agitando moderadamente con 200  $\mu\text{L}$  de Tris base 10 mM (tris-hidroximetil-aminometano) a un pH de 10 durante 5 min. Se registró la densidad óptica en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 564 nm. El porcentaje de sobrevivencia celular se determinó mediante la fórmula  $(T-Co/C-Co) \times 100$ , donde T representa el promedio de la densidad óptica de las concentraciones de prueba, C es el promedio de la densidad óptica en los ensayos control y Co es el promedio de la densidad óptica inicial. A través de un análisis de regresión lineal de los gráficos semilogarítmicos obtenidos entre la dosis y el porcentaje de crecimiento celular, se determinó la concentración efectiva del compuesto de prueba necesaria para inhibir el crecimiento celular en un 50 % ( $CE_{50}$   $\mu\text{g/mL}$ ). Se utilizaron como controles positivos vinblastina y colchicina.

## 9. Obtención de derivados

### 9.1. Síntesis de la difenilditiocetal de la L-ramnosa

Una mezcla de 500 mg de L-ramnosa, 1.5 mL de bencenotiol y 5 mL de ácido trifluoroacético al 90 % se sometió a reflujo en un baño de agua a 55 °C durante 1 h (Funabashi *et al.*, 1999). La mezcla de reacción se llevó a sequedad con corriente de nitrógeno y, se purificó mediante CC en gel de sílice (100 g). Se colectaron fracciones de 10

mL con un gradiente de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH, iniciando con una relación 98:2 para la mezcla de disolventes hasta alcanzar la polaridad proporcionada por la mezcla 90:10. Las fracciones 1-7 proporcionaron 719.8mg (71.5 %) del difenilditioacetal de la L-ramnosa (**3**).

**Compuesto 3.** Sólido blanco; **p.f.** 124-126 °C; **DOR** (c 2.9, MeOH)  $[\alpha]_{589} +49$ ,  $[\alpha]_{578} +52$ ,  $[\alpha]_{546} +60$ ,  $[\alpha]_{436} +119$ ,  $[\alpha]_{365} +229$ ; **RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, TMS):**  $\delta$  6.04 (sa, H-1), 5.07 (d,  $J = 9.3$  Hz, H-2), 5.27 (d,  $J = 9.3$  Hz, H-3), 4.55 (m, H-4 y H-5), 1.70 (d,  $J = 6.1$  Hz, H-6), 7.81-7.78, 7.56-5.54, 7.22-7.09 (m, C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>); **RMN <sup>13</sup>C (75.5 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N, TMS):**  $\delta$  61.5 (C-1), 72.3 (C-2), 69.4 (C-3), 73.3 (C-4), 66.4 (C-5), 21.0 (C-6), 136.1, 135.6 130.0, 130.0, 129.6, 129.6, 129.0, 129.0, 128.9, 128.9, 126.5, 126.4 (2 C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>); **EM-IE (20 eV) m/z** (% de int. rel.)  $[M]^+$  366 (0.7),  $[M - C_6H_5S]^+$  257 (44.6),  $[M - C_6H_6S]^+$  256 (60.4),  $[M - C_6H_5S - C_6H_6S]^+$  147 (100); **EM-IE alta resolución (70 eV) m/z**  $[M]^+$  366.0960 (calculado para C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>, 366.0960).

## 9.2. Acetilación total del difenilditioacetal de la L-ramnosa

Se adicionó 1 mL de AcCl a 200 mg del compuesto anterior y la mezcla de reacción se mantuvo con agitación continua durante 2 h a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo, la reacción se llevó a sequedad y se adicionó un exceso de CHCl<sub>3</sub> para evaporar mediante una corriente de nitrógeno y eliminar residuos de AcCl, repitiendo por dos ocasiones más. La mezcla de reacción se purificó por CC en gel de sílice (30 g), utilizando como fase móvil un gradiente de polaridad creciente de *n*-hexano-AcOEt. La elución se inició con una relación 9:1 para la mezcla de disolventes hasta alcanzar la polaridad de la mezcla correspondiente a una proporción 4:1. Se colectaron fracciones de 15 mL. Las fracciones 67-77 proporcionaron 100.4 mg (32.2 %,  $R_f = 0.46$ ) del derivado peracetilado (**4**), además de los subproductos de reacción fenil-3,4-di-*O*-acetil-2-*S*-fenil-1,2-ditio- $\beta$ -L-quinopiranosido (**5**) (fracciones 43-50, 33 mg, 12.9 %,  $R_f = 0.53$ ) y 3,4-di-*O*-acetil-2,5-anhidro-L-quinovosa difenilditioacetal (**6**) (fracciones 54-57, 12.5 mg, 4.6 %,  $R_f = 0.49$ , *n*-hexano-AcOEt 7:3).

**Compuesto 4.** Aceite, **DOR** (c 1.7, CHCl<sub>3</sub>)  $[\alpha]_{589} +20$ ,  $[\alpha]_{578} +21$ ,  $[\alpha]_{546} +26$ ,  $[\alpha]_{436} +54$ ,

$[\alpha]_{365} +104$ ; **RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)**:  $\delta$  4.38 (d,  $J = 3.0$  Hz, H-1), 5.34 (dd,  $J = 8.5, 3.0$  Hz, H-2), 5.88 (dd,  $J = 8.5, 2.0$  Hz, H-3), 5.21 (dd,  $J = 8.5, 2.0$  Hz, H-4), 4.85 (dc,  $J = 8.5, 6.5$  Hz, H-5), 1.17 (d,  $J = 6.5$  Hz, H-6), 7.58-7.56 y 7.35-7.26 (m, 2  $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 2.06 s, 2.01 s, 1.98 s (x2) (4 OAc); **RMN  $^{13}\text{C}$  (75.5 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , TMS)**:  $\delta$  61.4 (C-1), 71.3 (C-2), 68.8 (C-3), 71.2 (C-4), 67.2 (C-5), 16.4 (C-6), 134.0, 133.7, 133.2 (x4), 129.0 (x4), 128.2 (x2) (2  $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 21.1, 20.7, 20.6, 20.5, 170.2, 170.0, 169.6, 169.4; **EM-IE (20 eV)  $m/z$  (% de int. rel.)**  $[\text{M}]^+$  534 (0.9),  $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_5\text{S}]^+$  425 (77.3),  $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_5\text{S} - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$  365 (26.0),  $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_5\text{S} - \text{H}_2\text{O} - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}]^+$  85 (95.9),  $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_5\text{S} - \text{H}_2\text{O} - \text{C}_2\text{H}_4\text{O} - \text{CH}_2]^+$  71 (100).

**Compuesto 5.** Sólido blanco; **p.f.** 97-99 °C; **DOR** (c 3.8,  $\text{CHCl}_3$ )  $[\alpha]_{589} +6$ ,  $[\alpha]_{546} +6$ ,  $[\alpha]_{578} +8$ ,  $[\alpha]_{436} +17$ ,  $[\alpha]_{365} +36$ ; **RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)**:  $\delta$  4.45 (d,  $J = 11.0$  Hz, H-1), 3.05 (dd,  $J = 11.0, 11.0$  Hz, H-2), 5.16 (dd,  $J = 11.0, 9.5$  Hz, H-3), 4.70 (dd,  $J = 9.5, 9.5$  Hz, H-4), 3.43 (dc,  $J = 9.5, 6.0$  Hz, H-5), 1.19 (d,  $J = 6.0$  Hz, H-6), 7.53-7.51, 7.48-7.45 y 7.29-7.26 (m, 2  $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 2.01 s, 1.94 s; **RMN  $^{13}\text{C}$  (125.7 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)**:  $\delta$  86.3 (C-1), 52.3 (C-2), 74.2 (C-3), 74.5 (C-4), 73.8 (C-5), 17.5 (C-6), 134. (x2), 133.3 (x2), 131.7, 131.5, 129.0 (x2), 128.8 (x2), 128.3, 128.0 (2  $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 170.1, 169.9, 20.7, 20.6; **EM-IE (20 eV)  $m/z$  (% de int. rel.)**  $[\text{M}]^+$  432 (1.1),  $[\text{M} - \text{C}_6\text{H}_5\text{S}]^+$  323 (1),  $[323 - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$  263 (9),  $[263 - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$  203 (100),  $[\text{C}_2\text{H}_3\text{O}]^+$  43 (31); **EM-FAB $^+$   $m/z$  (rel inten.)**  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  455 (4),  $[\text{M} + \text{H}]^+$  433 (4),  $[\text{M}]^+$  432 (11),  $[\text{M} - \text{SC}_6\text{H}_5]^+$  323 (37),  $[323 - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$  263 (22),  $[263 - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$  203 (100); **Análisis elemental:** Calcd para  $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_5\text{S}_2$ : C, 61.09; H, 5.59; S, 14.82. Encontrado: C, 61.06; H, 5.47; S, 14.78.

**Compuesto 6.** Aceite; **DOR** (c 2.4,  $\text{CHCl}_3$ )  $[\alpha]_{589} +7$ ,  $[\alpha]_{578} +8$ ,  $[\alpha]_{546} +10$ ,  $[\alpha]_{436} +24$ ,  $[\alpha]_{365} +55$ ; **RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)**:  $\delta$  4.84 (d,  $J = 4.0$  Hz, H-1), 4.03 (dd,  $J = 4.5, 4.0$  Hz, H-2), 5.39 (dd,  $J = 4.5, 1.1$  Hz, H-3), 5.14 (dd,  $J = 4.0, 1.0$  Hz, H-4), 4.16 (dc,  $J = 6.0, 4.0$  Hz, H-5), 1.25 (d,  $J = 6.05$  Hz, H-6), 7.51-7.48, 7.38-7.35 y 7.31-7.22 (m, 2  $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 2.11 s, 2.05 s; **RMN  $^{13}\text{C}$  (125.7 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , TMS)**:  $\delta$  60.8 (C-1), 85.1 (C-2), 80.8 (C-3), 78.8 (C-4), 77.4 (C-5), 13.6 (C-6), 134.3, 134.2, 132.9 (x2), 132.7 (x2), 129.0 (x2), 128.9 (x2), 127.9, 127.8 (2  $\text{C}_6\text{H}_5$ ), 20.8 (x2), 170.2, 170.0; **EM-IE (20 eV)  $m/z$  (rel inten.)**  $[\text{M}]^+$  432 (5),  $[\text{M} - \text{SC}_6\text{H}_5]^+$  323 (10),  $[323 - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$  263 (100),  $[263 - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2]^+$  203 (14),  $[\text{C}_2\text{H}_3\text{O}]^+$  43 (55); **EM-FAB $^+$   $m/z$  (rel inten.)**  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  455 (1),  $[\text{M} + \text{H}]^+$  433 (11),  $[\text{M}]^+$  432 (14),  $[\text{M} -$

---

$SC_6H_5]^+$  323 (21),  $[323 - C_2H_4O_2]^+$  263 (100),  $[263 - C_2H_4O_2]^+$  203 (23); **EM-IE-AR** (70 eV)  $m/z$   $[M]^+$  432.1060 (calcd para  $C_{22}H_{24}O_5S_2$  432.1065).

### 9.3. Acetilación parcial del difenilditioacetal de la L-ramnosa

El compuesto **1** (49.4 mg) se disolvió en una mezcla de anhídrido acético (7.5  $\mu$ L) y piridina (250  $\mu$ L) y se mantuvo con agitación magnética a  $-10$  °C durante 1 h. Al cabo de este tiempo se adicionó una cantidad igual de la mezcla  $Ac_2O-C_6H_5N$ , dejando con agitación continua, a la misma temperatura, hasta completar 3 h. La mezcla de reacción se diluyó con agua y se extrajo con AcOEt, se lavó con una solución saturada de  $NaHCO_3$ , se secó con  $Na_2SO_4$  y se concentró a sequedad, procediendo a purificar por CC en gel de sílice (30 g), utilizando como fase móvil un gradiente de polaridad creciente de *n*-hexano-AcOEt. La elución se inició con una relación 9:1 para la mezcla de disolventes hasta alcanzar la polaridad de la mezcla correspondiente a una proporción 4:1. Se colectaron fracciones de 15 mL. Se realizó una comparación del perfil cromatográfico en capa fina con los compuestos purificados en la acetilación con AcCl y se encontraron los mismos constituyentes.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El fraccionamiento primario del extracto orgánico de *H. brevipes* permitió la obtención de nueve fracciones que se sometieron a evaluación de citotoxicidad para monitorear la presencia de constituyentes activos (tabla 1). Tanto el extracto orgánico como las fracciones no resultaron activas contra las líneas celulares evaluadas sin embargo, se continuó con el análisis cromatográfico de las fracciones 3 y 6, debido a que por cromatografía en capa fina se observaron en estas componentes en mayor concentración.

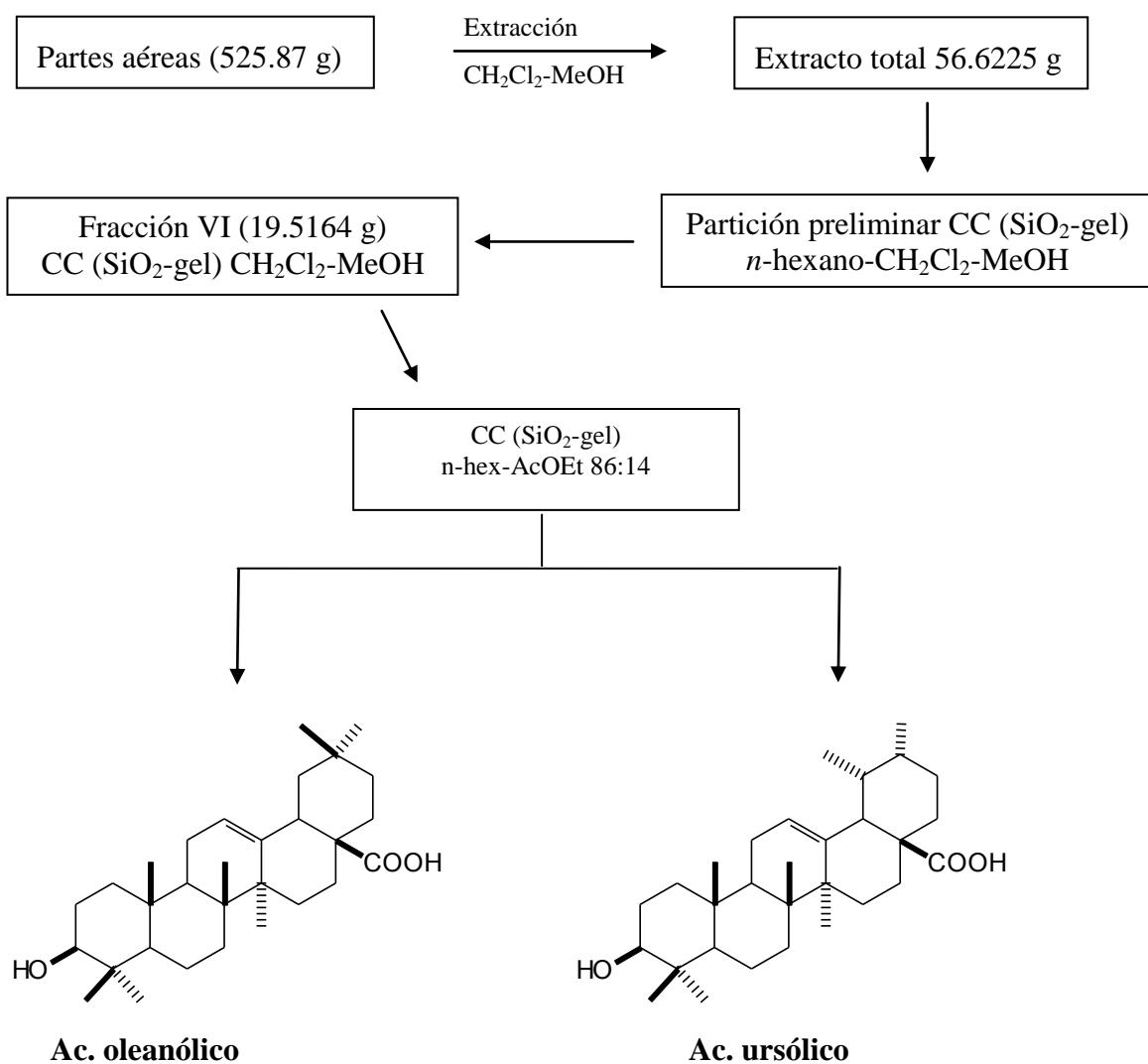
**Tabla 1.** Citotoxicidad de las fracciones primarias del extracto diclorometano-metanólico de *Hyptis brevipes*.<sup>a</sup>

Compuesto	Línea celular, CI <sub>50</sub> (µg/mL) <sup>a</sup>		
	KB	Hep-2	HeLa
Extracto	>20	>20	>20
F-II	>20	>20	>20
F-III	>20	>20	>20
F-IV	>20	>20	>20
F-V	>20	>20	>20
F-VI	>20	>20	>20
F-VII	>20	>20	>20
F-VII	>20	>20	>20
F-IX	>20	>20	>20
Mezcla triterpenos	15.7	17.7	13.6
Vinblastina	0.0047	0.0057	0.0066
Colchicina	0.0097	0.0014	0.0036

<sup>a</sup>Abreviaciones: KB, carcinoma nasofaríngeo; Hep-2, carcinoma de laringe humano; HeLa: carcinoma de cérvix humano.

La fracción 3 se volvió a fraccionar subsecuentemente por cromatografía en columna y los constituyentes principales se inyectaron por HPLC y se analizaron por cromatografía de gases-espectrometría de masas y RMN <sup>1</sup>H, encontrándose que únicamente se trataba de ácidos grasos de bajo peso molecular.

La fracción 6 se sometió a un segundo fraccionamiento por cromatografía en columna y se logró la identificación de los ácidos ursólico (**1**) y oleanólico (**2**), por comparación con los datos registrados en la literatura. En la figura 3 se ilustra el procedimiento general que permitió el aislamiento de estos triterpenos y en las tablas 2 y 3 se indican sus constantes de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . En las figuras 4 a 7 se presentan los espectros correspondientes.



**Figura 3.** Metodología general para el aislamiento de los constituyentes principales del extracto diclorometano-metanólico de *H. brevipes*.

**Tabla 2.** Desplazamientos químicos en la RMN  $^1\text{H}$  del ácido ursólico (**1**) y ácido oleanólico (**2**) (300 MHz)<sup>a</sup>

Posición	<b>1</b>		<b>2</b>	
	$\delta\text{H}^b$	$\delta\text{H}^c$	$\delta\text{H}^b$	$\delta\text{H}^c$
3	3.20 m	3.48 dd (4.2, 3.6)	3.20 m	3.48 dd (4.2, 3.6)
12	5.26 m	5.52 m	5.26 m	5.52 m
18	2.19 d (10.8, )	2.66 d (8.7)	2.82 d (13.5, 5.1)	3.34 dd (10.3, 3.1)
23	1.14 s	1.27 s	1.09 s	1.25 s
24	0.93 s	1.05 s	0.92 s	1.03 s
25	0.78 s	0.91 s	0.77 s	0.97 s
26	0.95 s	1.08 s	0.91 s	1.05 s
27	0.98 s	1.27 s	0.98 s	1.31 s
28	---	---	---	---
29	0.87 s	1.05 s	0.91 s	0.98 s
30	0.85 s	0.97 s	0.81 s	1.03 s

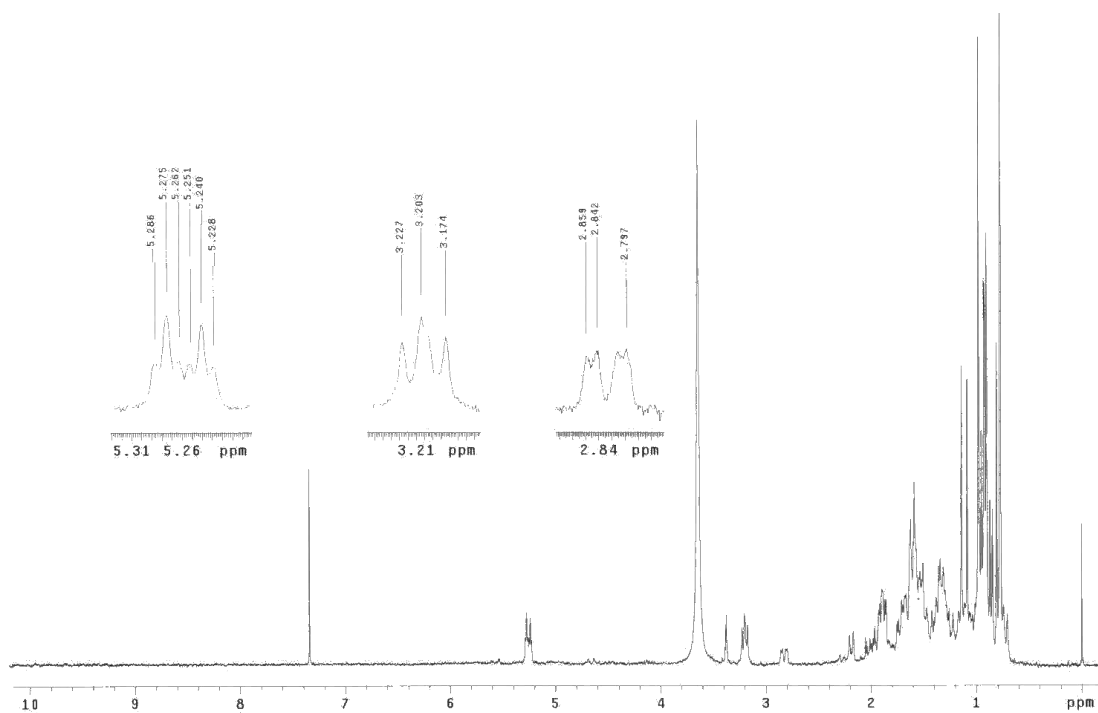
<sup>a</sup>Desplazamientos químicos ( $\delta$ ) en ppm en relación a TMS. Las constantes de acoplamiento ( $J$ ) entre paréntesis en Hz. <sup>b</sup>Datos registrados en  $\text{CDCl}_3$ .

<sup>c</sup>Datos registrados en  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ .

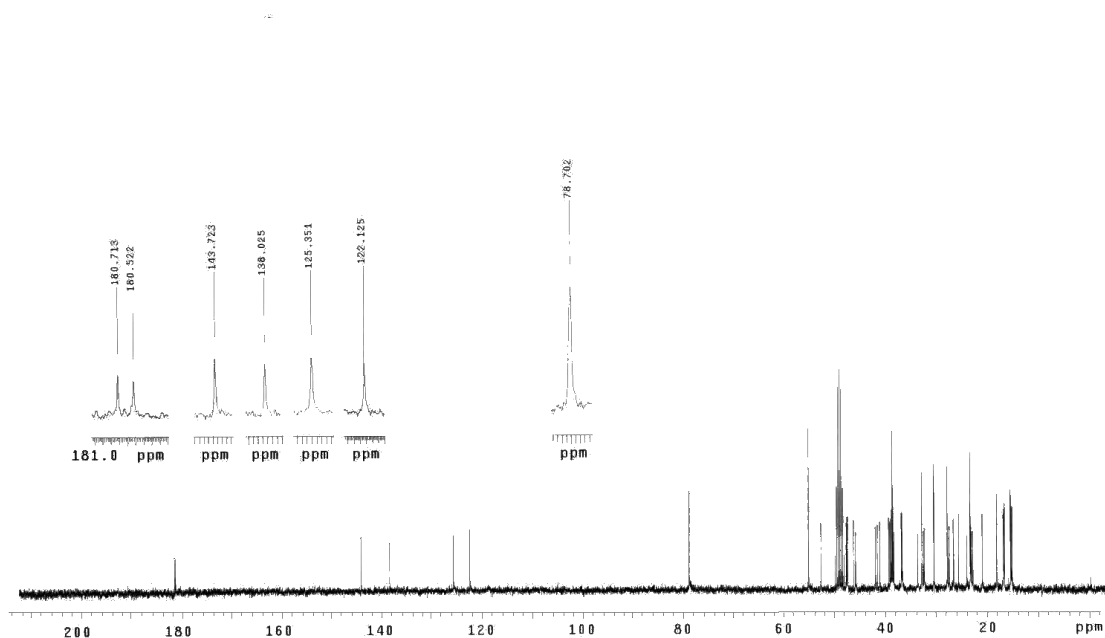
**Tabla 3.** Desplazamientos químicos en la RMN  $^{13}\text{C}$  del ácido ursólico (**1**) y ácido oleanólico (**2**) (75 MHz).

Posición	<b>1</b>		<b>2</b>	
	$\delta\text{C}^a$	$\delta\text{C}^b$	$\delta\text{C}^a$	$\delta\text{C}^b$
3	78.7	78.5	78.7	78.5
12	125.4	126.0	122.1	122.9
13	138.0	139.7	143.7	145.2
18	52.7	53.9	41.1	42.4
23	23.3	28.5	23.2	29.2
24	23.3	16.9	23.1	16.9
25	15.2	16.1	15.4	15.9
26	24.9	17.8	25.7	17.9
27	21.0	24.1	22.9	26.5
28	180.5	180.3	180.7	180.5
29	16.6	17.8	30.5	33.6
30	15.1	21.8	22.9	24.1

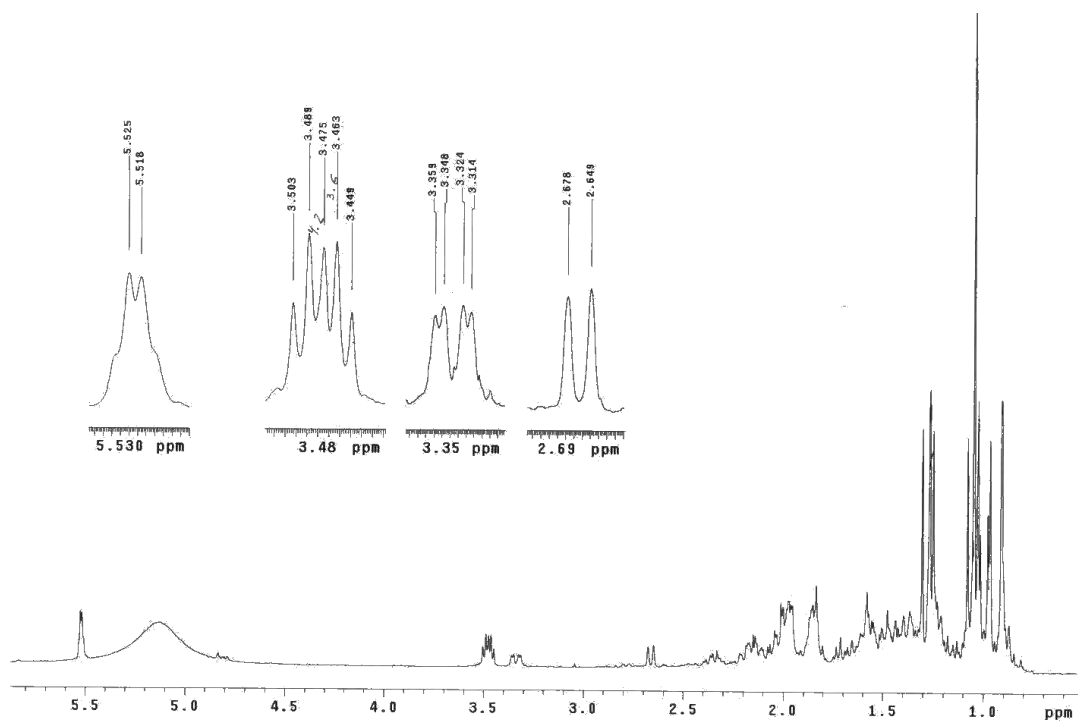
<sup>a</sup>Datos registrados en  $\text{CDCl}_3$ . <sup>b</sup>Datos registrados en  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ .



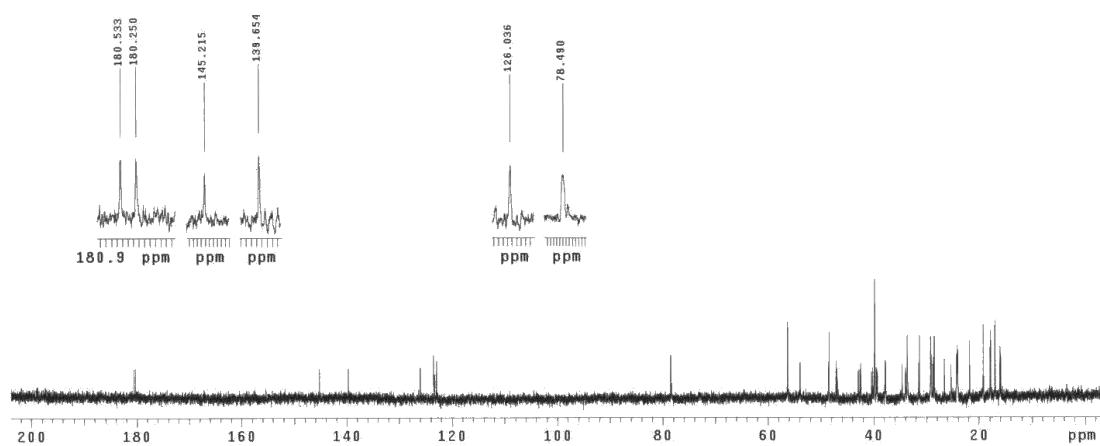
**Figura 4.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) de la mezcla de ácido ursólico y ácido oleanólico.



**Figura 5.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz) de la mezcla de ácido ursólico y ácido oleanólico.



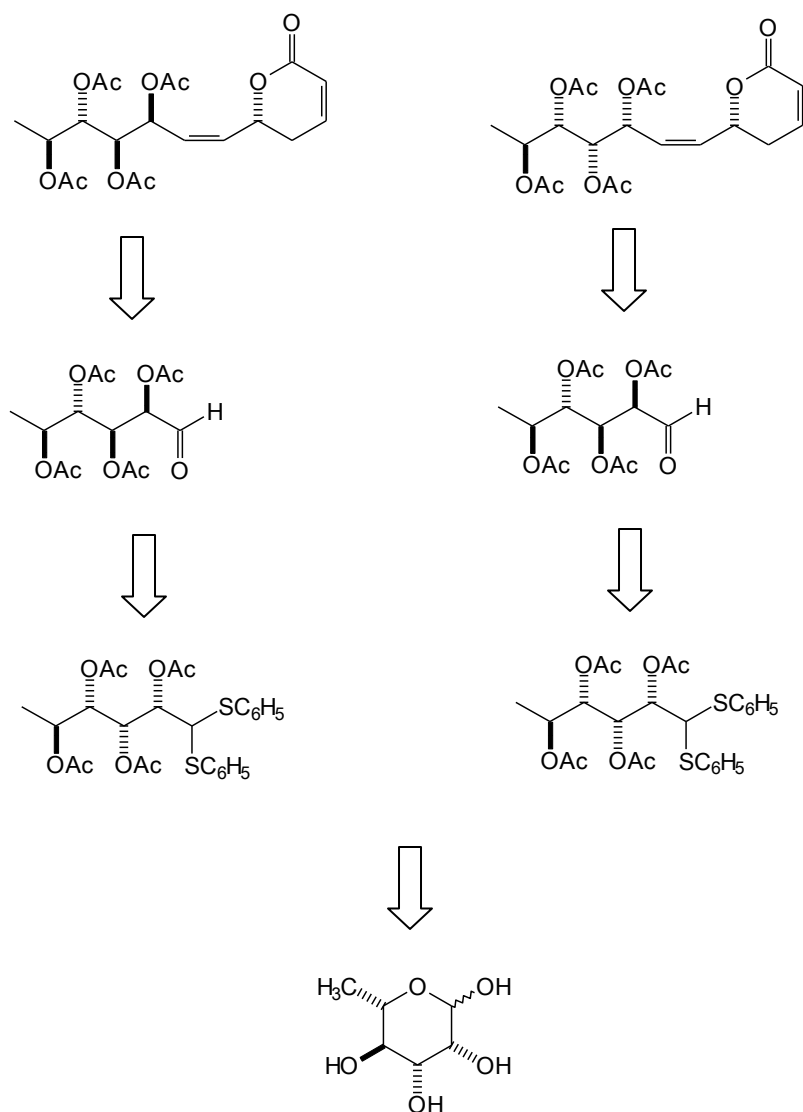
**Figura 6.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 300 MHz) de la mezcla de ácido ursólico y ácido oleanólico.



**Figura 7.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ , 75 MHz) de la mezcla de ácido ursólico y ácido oleanólico.

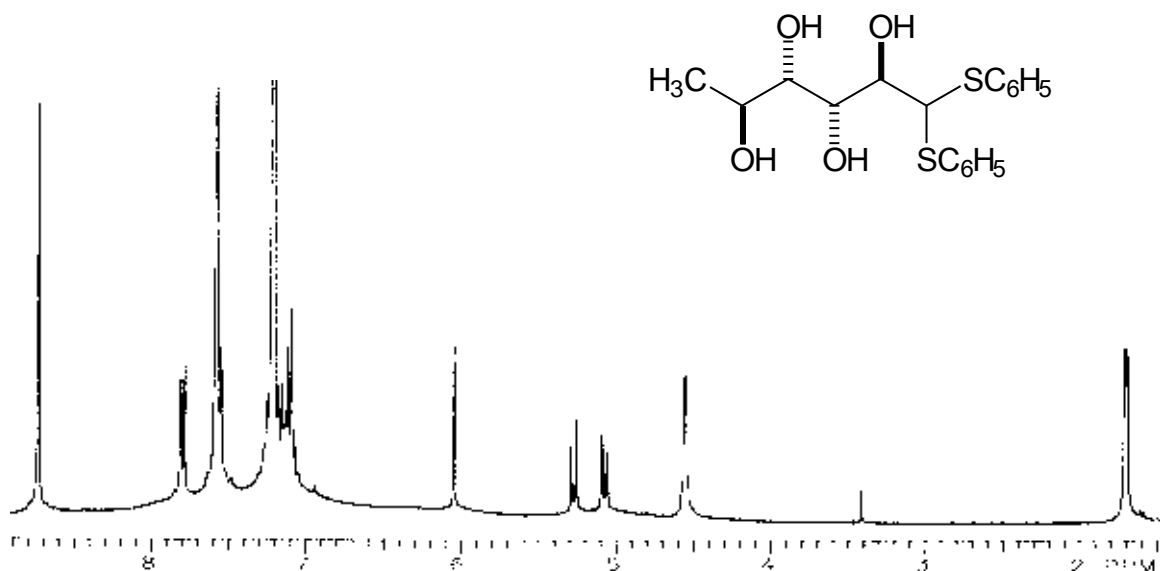
El análisis por IR y EM-CG del resto de las fracciones no indicó la presencia de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas como se esperaba encontrar. Únicamente se logró la identificación de constituyentes de bajo peso molecular (hasta 300) que correspondían a ácidos hexanoico y dodecanoico, tanto en su forma libre como esterificada.

Debido a que no se logró la obtención de más constituyentes con posible actividad citotóxica, se decidió buscar las condiciones de acetilación parcial del difenilditioacetal de la L-ramnosa para contar con un sinton quiral de utilidad para la síntesis total de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas citotóxicas, como las que se ilustran en la figura 8.

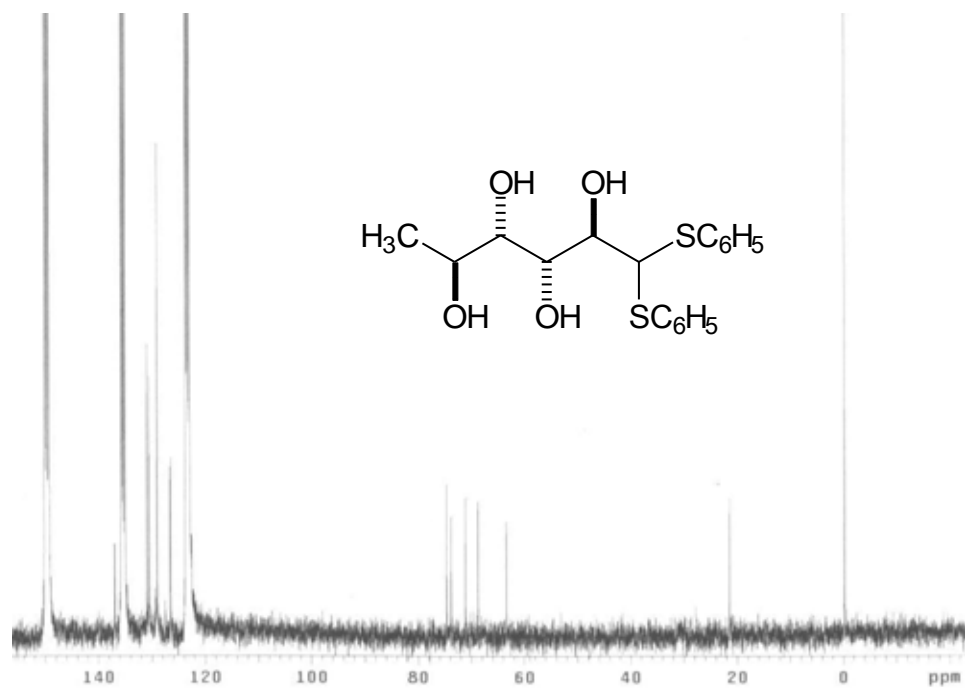


**Figura 8.** Secuencia retrosintética para la obtención de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas a partir de L-ramnosa.

El compuesto **3** se preparó usando la metodología de Funabashi y colaboradores (1999), usando ácido trifluoroacético al 90% para condensar azúcares libres con tioles. Con este método se obtuvo como principal producto el difenilditioacetal de la L-ramnosa (**3**, Figuras. 9 y 10), posteriormente se purificó por cromatografía en columna y fue caracterizada por sus constantes espectroscópicas. El compuesto **3** se acetiló bajo condiciones ácidas y básicas, obteniendo como producto mayoritario el derivado peracetilado, difenilditioacetal de la 2,3,4,5-tetra-*O*-acetil-L-ramnosa (**4**, Figura. 11 y 12), y dos constituyentes minoritarios acetilados parcialmente. Al analizar los espectros de RMN  $^1\text{H}$  de estos compuestos (figura 13 y 15) se pudo determinar que correspondieron al 3,4-di-*O*-acetil-2-*S*-fenil-1,2-ditio- $\beta$ -L-quinopiranosido (**5**, Figura. 13 y 14) y la 3,4-di-*O*-acetil-2,5-anhidro-L-quinovosa difenilditioacetal (**6**, Figura 15 y 16), compuestos identificados previamente (Fragoso-Serrano *et al.*, 2003). Se probaron diferentes condiciones de acetilación pero no se logró la obtención de los sintones quirales en forma abierta, que permitieran la obtención de los aldehídos correspondientes para la síntesis de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas.

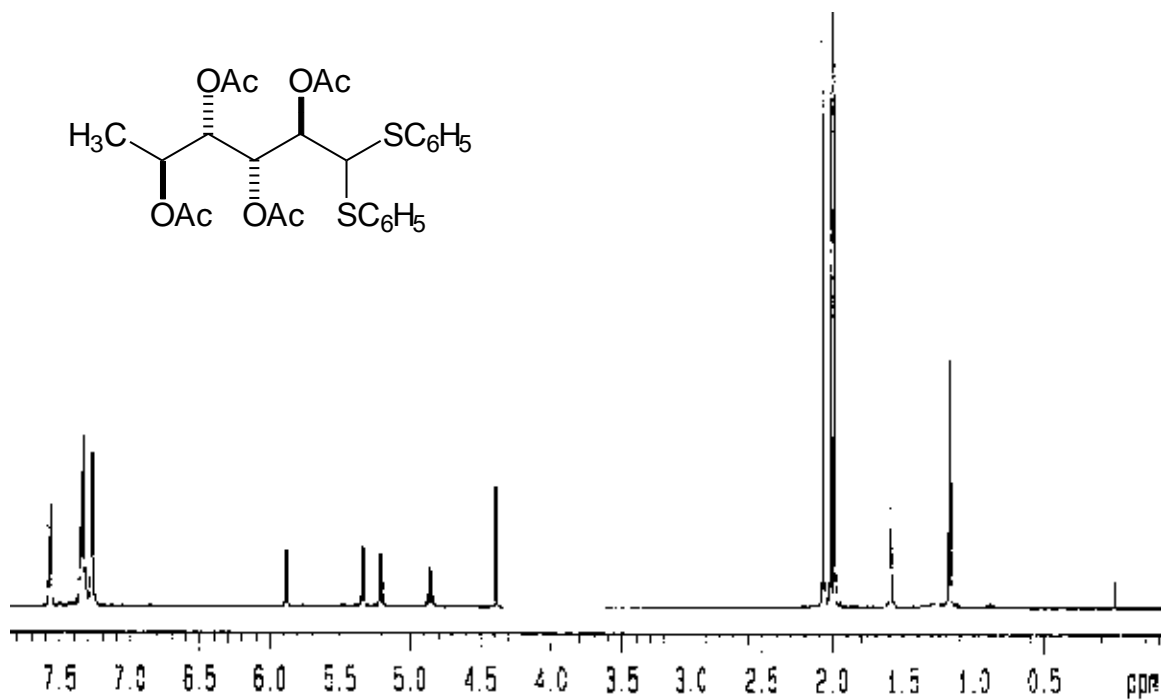


**Figura 9.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del difenilditioacetal de la L-ramnosa (**3**) (300 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ).

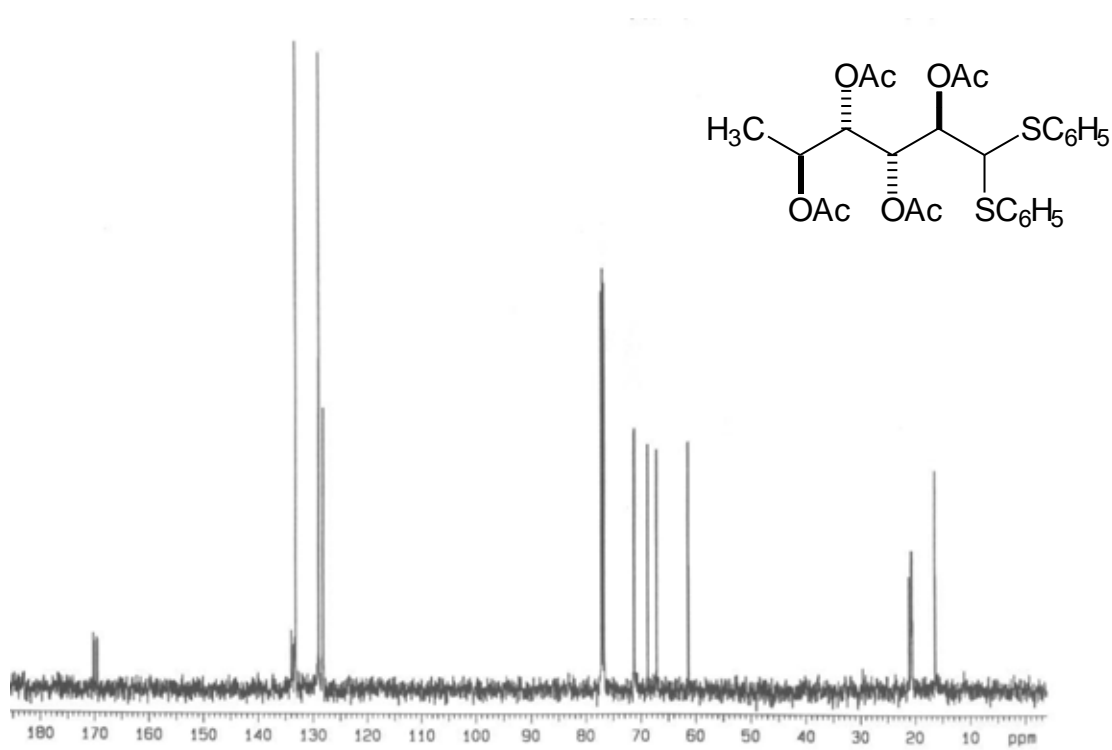


**Figura 10.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del difenilditioacetal de la L-ramnosa (**3**) (300 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ).

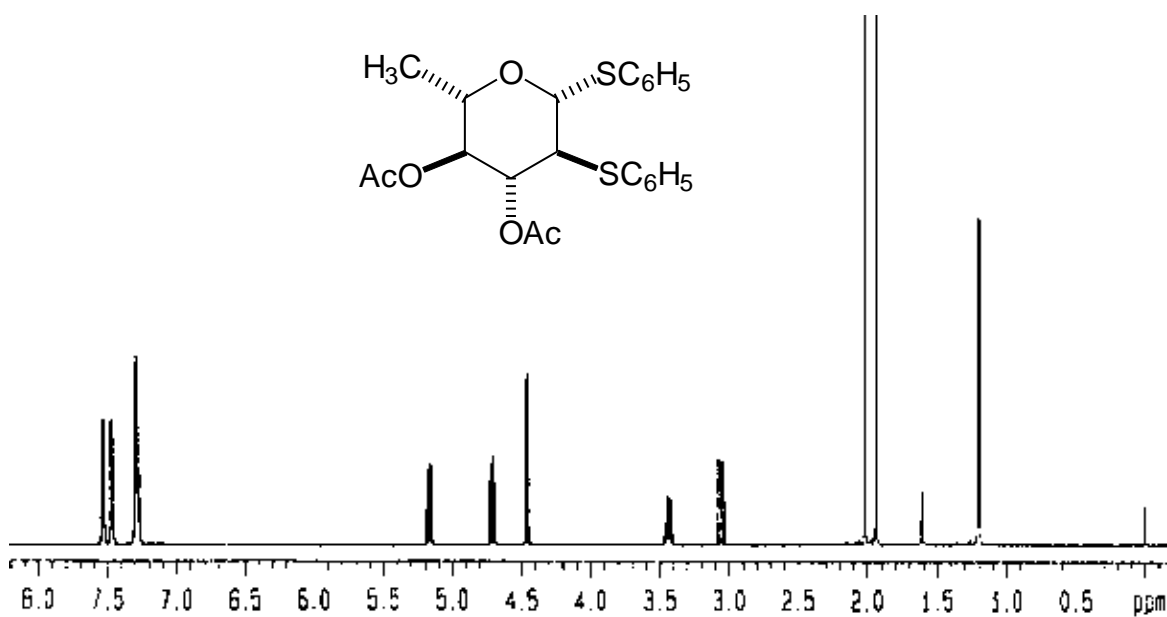




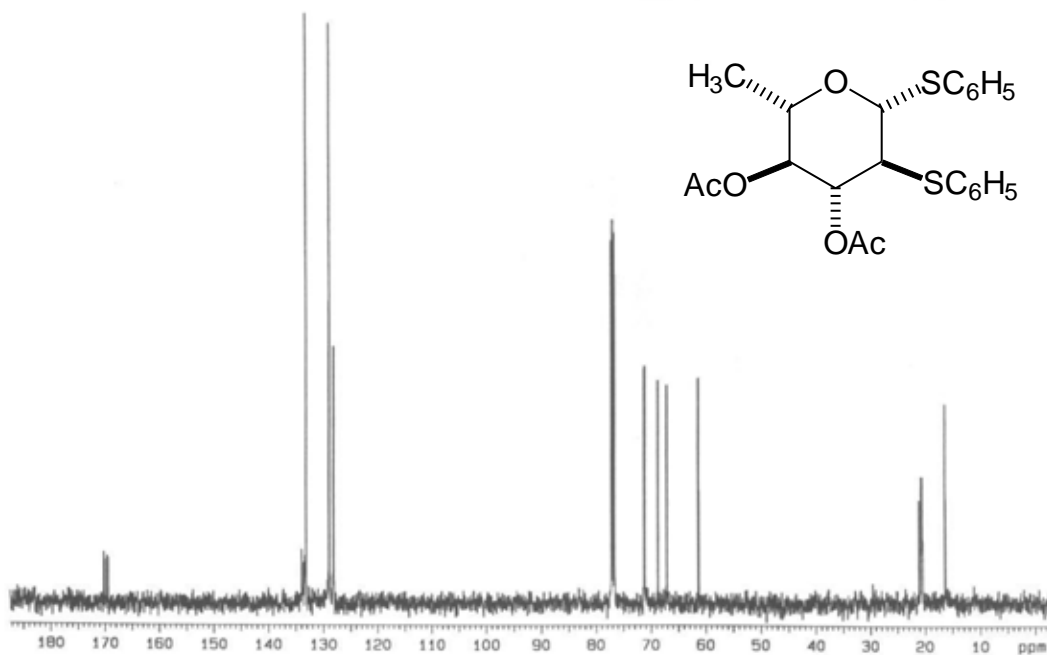
**Figura 11.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del difenilditioacetal de la 2,3,4,5-tetra-*O*-acetil-L-ramnosa (**4**) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



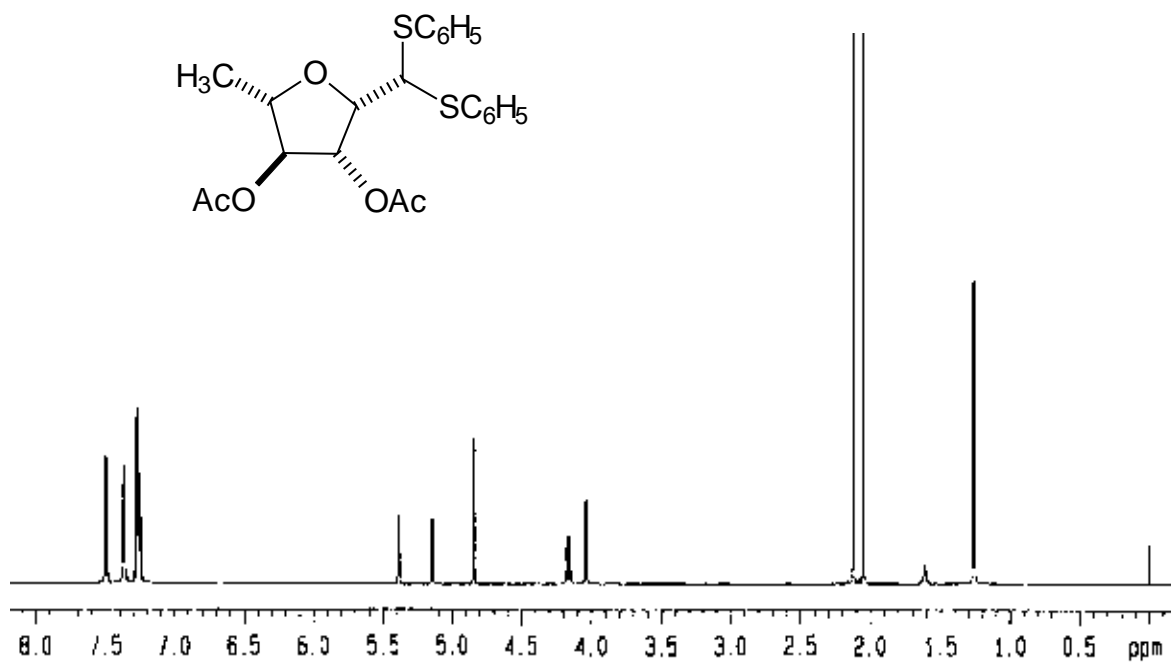
**Figura 12.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del difenilditioacetal de la 2,3,4,5-tetra-*O*-acetil-L-ramnosa(**4**) (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



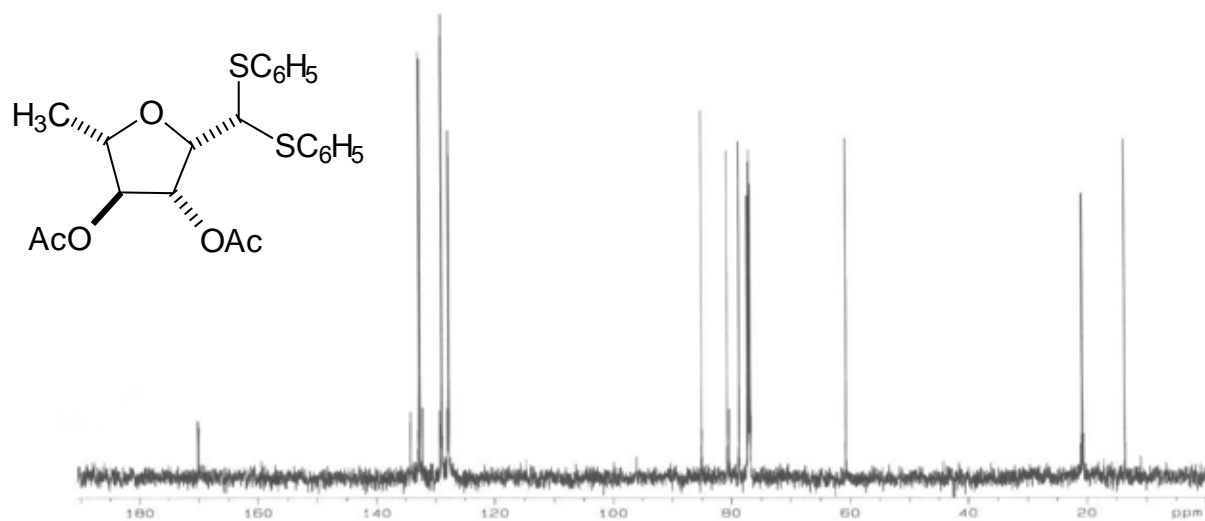
**Figura 13.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H del fenil 3,4-di-*O*-acetil-2-*S*-fenil-1,2-ditio-β-*L*-quinopiranosido (**5**) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



**Figura 14.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C del fenil 3,4-di-*O*-acetil-2-*S*-fenil-1,2-ditio-β-*L*-quinopiranosido (**5**) (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



**Figura 15.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H del difenilditioacetal de la 3,4-di-*O*-acetil-2,5-anhidro-L-quinovosa difenilditioacetal (**6**) (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



**Figura 16.** Espectro de RMN <sup>13</sup>C del difenilditioacetal de la 3,4-di-*O*-acetil-2,5-anhidro-L-quinovosa difenilditioacetal (**6**) (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

## RESUMEN Y CONCLUSIONES.

El presente trabajo pretendió ampliar el estudio sobre el género *Hyptis*, cuyas especies son importantes para la medicina tradicional mexicana por sus propiedades para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales y contra infecciones de la piel. De esta forma, el estudio fitoquímico biodirigido de *H. brevipes*, permitiría el aislamiento de principios citotóxicos. Sin embargo, no se detectó actividad citotóxica en el extracto total y en las fracciones primarias, por lo cual, únicamente se identificaron los triterpenos mayoritarios, el ácido ursólico (**1**) y ácido oleanólico (**2**), que al ser sometidos a ensayos de citotoxicidad, se observó una ligera actividad contra las líneas celulares cancerosas evaluadas. Es importante señalar que estos compuestos tienen actividad anti-HIV, acción antiinflamatoria, hipolipemiente (reduce niveles de colesterol y triglicéridos), antihipertensivo, entre otras (Kashiwada *et al.*, 1998; Palsson y Jaenson, 1999; Fumiko-Abe, 2002).

Se corrobora que la especie *Hyptis brevipes* no contiene 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas como parte de su metabolismo secundario, al no pertenecer a la sección *Mesosphaeria*.

De forma complementaria, se trabajó con la obtención de derivados de la L-ramnosa, con el fin de encontrar las condiciones adecuadas de acetilación parcial para sintetizar sintones quirales que permitieran la preparación de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas, compuestos de suma importancia por su actividad biológica. Sin embargo, después de varios intentos en diferentes condiciones de acetilación del difenilditioacetal de la L-ramnosa, se identificaron dos compuestos cíclicos, 3,4-di-*O*-acetil-2-*S*-fenil-1,2-ditio- $\beta$ -L-quinopiranosido (**5**) y 3,4-di-*O*-acetil-2,5-anhidro-L-quinovosa difenilditioacetal (**6**), además del derivado peracetilado, 2,3,4,5-tetra-*O*-acetil-L-ramnosa (**4**).

---

**BIBLIOGRAFÍA**

- ◆ Achmad, S.; Hoyer, T.; Kjaer, S.; Makmur, L. y Norrestam, R. (1987) Molecular and crystal structure of Hyptolide, a naturally occurring  $\alpha,\beta$ -unsaturated  $\gamma$ -lactone. *Acta Chemica Scandinavica* **B41**, 599-609
- ◆ Aguiar, E. H. A.; Zoghbi, M. G. B.; Silva, M. H. L.; Maia, J. G. S.; Rojas A. J. M.; Rojas, U. M. (2003) Chemical variation in the essential oils of *Hyptis mutabilis* (Rich.) Briq. *Journal of Essential Oil Research* **15** (2): 130-132.
- ◆ Almtorp, T. G.; Hazell, C. A. y Torrsell, B. G. K. (1991). A lignan and pyrone and other constituents from *Hyptis capitata*. *Phytochemistry* **30**, 2753-2756.
- ◆ Altschul, S. V. R. (1973) *Drugs and food from little-know plants*. Ed. Harvard University Press, U.S.A., p. 263.
- ◆ Araujo, E. C. C.; Silveira, E. R.; Lima, M. A. S.; Andrade N. M.; De Andrade, I. L.; Lima, M. A. A.; Santiago, G. M. P.; Mesquita, A. L. M. (2003) Insecticidal Activity and Chemical Composition of Volatile Oils from *Hyptis martiusii* Benth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51** (13): 3760-3762.
- ◆ Araujo, E. C. C.; Cavalcante C.; Lima, M. A. S.; Silveira, E. R. (2004) Spectral assignments of new diterpenes from *Hyptis martiusii* benth. *Magnetic Resonance in Chemistry* **42** (12): 1049-1052.
- ◆ Araujo E. C. C.; Lima M. A. S; Montenegro R. C; Nogueira M.; Costa-Lotufo L. V; Pessoa C.; De Moraes M. O.; Silveira E. R. (2006) Cytotoxic abietane diterpenes from *Hyptis martiusii* Benth. *Journal of Biosciences* **61** (3-4): 177-183.
- ◆ Boalino D. M.; Connolly J. D.; McLean S.; Reynolds W. F. y Tinto, W. F. (2003) Alpha-pyrone and a 2(5H)-furanone from *Hyptis pectinata*. *Phytochemistry* **64** (7): 1303-1307.
- ◆ Cragg, M. G.; Boyd, M. R.; Cardellina, J. H.; Newman, D. J.; Snader, K. M. y McCloud, T. G. (1994) Ethnobotany and drug discovery: the experience of the US National Cancer Institute. En: *Ethnobotany and the Search for New Drugs*, Ciba Foundation Symposium 185, John Wiley & Sons, Chichester, England, pp. 178-190.
- ◆ Charlton, L. J. (1998) Antiviral activity of lignans. *Journal of Natural Products* **61**, 1447-1451.
- ◆ Chukwujekwu J.C.; Smith P.; Coombes P.H.; Mulholland D.A.; van Staden J. (2005) Antiplasmodial diterpenoid from the leaves of *Hyptis suaveolens*. *Journal of ethnopharmacology* **102**(2), 295-297.

- 
- ◆ Davies-Coleman, T. M. y Rivett, D. E. A. (1989) Naturally occurring 6-substituted 5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrones. En: *Progress in the 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, pp. 1-35.
  - ◆ Delgado, G.; Pereda-Miranda, R. y 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
  - ◆ 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.
  - ◆ Duke A. J. (2007) Ethnobotanical uses of *Hyptis brevipes*. Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases. Green Pharmacy Garden.
  - ◆ Eshilokun, A. O.; Kasali, A. A.; Giwa-Ajeniya, A. O. (2005) Chemical composition of essential oils of two *Hyptis suaveolens* (L.) Poit leaves from Nigeria. *Flavour and Fragrance Journal* **20** (5): 528-530.
  - ◆ Epling, C. (1949) Revisión del Género *Hyptis* (Labiatae). *Revista del Museo de la Plata*. Tomo VII, sec. Botánica, Argentina, pp. 153-497.
  - ◆ Facey P. C.; Porter, R. B. R.; Reese, P. B.; Williams, L. A. D. (2005) Biological Activity and Chemical Composition of the Essential Oil from Jamaican *Hyptis verticillata* Jacq. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53** (12): 4774-4777.
  - ◆ Falcao, D. Q. y Menezes, F. S. (2003) The *Hyptis* genus: An ethnopharmacological and chemical review. *Revista Brasileira de Farmacia* **84** (3): 69-74.
  - ◆ Fragoso-Serrano, M.; Chimeo-González, E. y Pereda-Miranda, R. (1999) Novel Labdane Diterpens from the Insecticidal Plant *Hyptis spicigera*. *Journal of Natural Products* **62**, 45-50.
  - ◆ Fragoso-Serrano, M. (2000) Elucidación estructural y establecimiento de la configuración absoluta de metabolitos secundarios biodinámicos aislados de la planta medicinal *Hyptis spicigera*. Aplicación de la mecánica molecular en la elucidación estereoquímica de la espicigerólida, una 5,6-dihidro-alfa-pirona citotóxica. Tesis de Doctorado. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 271 p.
  - ◆ Fragoso-Serrano, M.; Gibbons, S.; Pereda-Miranda, R. (2005) Anti-Staphylococcal and cytotoxic compounds from *Hyptis pectinata*. *Planta Medica* **71** (3): 278-280.
  - ◆ Fumiko-Abe, A.; Nagafuji, S.; Yamauchi, T.; Maki, J., Higo, K.; Akahane, H.,

- 
- Aguilar, A.; Jiménez-Estrada, M. y Reyes-Chilpa, R. (2002) Trypanocidal constituents in plants 1. Evaluation of some Mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in Guaco, roots of *Aristolochia taliscana*. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **25** (9): 1188-1191.
- ◆ Funabashi, M.; Arai, S. y Shinohara, M. (1999) Novel synthesis of diphenyl and/or trimethylene dithioacetals of mono- and oligosaccharides in 90% trifluoroacetic acid. *Journal of Carbohydrate Chemistry* **18**, 333-341.
  - ◆ Goun E.; Cunningham G.; Chu, D.; Nguyen, C. y Miles D. (2003) Antibacterial and antifungal activity of Indonesian ethnomedical plants. *Fitoterapia* **74** (6):592-596.
  - ◆ Grasi, P.; Reyes P.; Urias, S.T.; Sosa, S.; Tubaro, A.; Hofer, O.; Zitterl-Eglseer, K. (2006) Anti-inflammatory activity of two diterpenes of *Hyptis suaveolens* from El Salvador. *Journal of Biosciences* **61**(3/4): 165-170.
  - ◆ Gupta, M. P.; Monge, A., Karikas, G. A.; Lopez, C. A.; Solis, P. N.; Leon, E.; Trujillo, M.; Suarez, O.; Wilson, F.; Montenegro, G.; Noriega, Y.; Santana, A. I.; Correa, M. y Sanchez C. (2006) Screening of Panamanian medicinal plants for brine shrimp toxicity, crown gall tumor inhibition, cytotoxicity and DNA intercalation. *International Journal of Pharmacognosy* **34** (1): 19-27.
  - ◆ Heinrich M., Kuhnt, M. y Rimpler H. (1994) Lignans and other compounds from the Mixe Indian medicinal plant *Hyptis verticillata*. *Phytochemistry* **36**(2): 485-489.
  - ◆ Heinrich, M. (2003) Ethnobotany and natural products: the search for new molecules, new treatments of old diseases or a better understanding of indigenous cultures?. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **3** (2), 141-154.
  - ◆ Hernández de Jesús, M. L. (1991) Estructura y estereoquímica de la pectinólida, una nueva 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona con propiedades antimicrobianas de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. Tesis de maestría, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, 146 p.
  - ◆ 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.
  - ◆ Jaenson T. G. T.; Palsson K.; Borg-Karlson A. K. (2006) Evaluation of extracts and oils of mosquito (Diptera: Culicidae) repellent plants from Sweden and Guinea-Bissau. *Journal of Medical Entomology* **43** (1): 113-119.
  - ◆ Kashiwada Y; Wang H K; Nagao T; Kitanaka S; Yasuda I; Fujioka T; Yamagishi T; Cosentino L M; Kozuka M; Okabe H; Ikeshiro Y; Hu C Q; Yeh E; Lee K H (1998) Anti-AIDS agents. 30. Anti-HIV activity of oleanolic acid, pomolic acid, and structurally related triterpenoids. *Journal of Natural Products*

---

61 (9): 1090-1095.

- ◆ Kingston, D. G. I.; Rao, M. M. y Zucker, W. V. (1979) Plant Anticancer Agents. IX. Constituents of *Hyptis tomentosa*. *Journal of Natural Products* **42**, 496-499.
- ◆ Krishnamurthy, Y. L. y Shashikala, J. (2006) Inhibition of aflatoxin B1 production of *Aspergillus flavus*, isolated from soybean seeds by certain natural plant products. *Letters in Applied Microbiology* **43** (5): 469-474.
- ◆ Kuhnt, M.; Rimpler, H. y Heinrich, M. (1994) Lignans and other compounds from the Mixe indian medicinal plant *Hyptis verticillata*. *Phytochemistry* **36**, 485-489.
- ◆ Kuhnt, M.; Pröbstle, A.; Rimpler, H., Bauer, R. y Heinrich, M. (1995) Biological and pharmacological activities and further constituents of *Hyptis verticillata*. *Planta Medica* **61**, 227-232.
- ◆ Likhitwitayawuid, K.; Angerhofer, C. K.; Cordell, G. A.; Pezzuto, J. M. y Ruangrunsi, N. (1993) Cytotoxic and antimalarial bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Stephania erecta*. *Journal of Natural Products* **56**, 30-38.
- ◆ MacRae, W. D. y Towers, G. H. N. (1984) Biological activities of lignans. *Phytochemistry* **23**, 1207-1220
- ◆ Martínez, M. (1993) *Las Plantas Medicinales de México*, 6ª ed., Ed. Botas, México, pp. 216, 412, 488, 508.
- ◆ Micheli, L. M. G.; Banchio, E.; Zygadlo, J. A. (2002) Aromatic plants of Yungas Part I: Chemical composition of the essential oil of *Hyptis floribunda* Briq. ex. *Journal of Essential Oil Research* **14** (3): 179-180.
- ◆ Misra, T. N.; Singh, R. S.; Ojha, T. N. y Opadhayay, J. (1981) Chemical constituents of *Hyptis suaveolens*, part I. Spectral and biological studies on a triterpene acids. *Journal of Natural Products* **44**, 735-738.
- ◆ Missouri Botanical Garden (2007) Smithsonian Tropical Research Institute Herbarium, SCZ, Discover Life map of *Hyptis brevipes*.htm. 29 de diciembre de 2007.
- ◆ Novelo, M.; Cruz, G. J.; Hernández, 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.
- ◆ Novelo Torres, A. M. (1994) Aislamiento y caracterización estructural de los principios activos con potencial antineoplásico de *Hyptis verticillata* Jacq. (Lamiaceae). Tesis de Maestría, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, 131 p.



- 
- ◆ Oliva, M. de las M.; Gallucci, N.; Zygadlo, J. A.; Demo, M. S. (2007) Cytotoxic Activity of Argentinean Essential Oils on *Artemia salina*. *Pharmaceutical Biology* **45** (4): 259-262.
  - ◆ Oliveira, M. J.; Campos, I. F. P.; Oliveira, C. B. A.; Santos, M. R.; Souza, P. S.; Santos, S. C.; Seraphin, J. C.; Ferri, P. H. (2005) Influence of growth phase on the essential oil composition of *Hyptis suaveolens*. *Biochemical Systematics and Ecology* **33** (3): 275-285.
  - ◆ Palsson K. y Jaenson. T. G. (1999) Comparison of plant products and pyrethroid-treated bed nets for protection against mosquitoes (Diptera: Culicidae) in Guinea Bissau, West Africa. *Journal of Medical Entomology* **36** (2): 144-148.
  - ◆ Pereda-Miranda, R. (1988) Elucidación estructural y estereoquímica de nuevos metabolitos secundarios aislados de Labiatae (*Salvia* e *Hyptis*). Tesis de Maestría, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México, pp. 17-59.
  - ◆ Pereda-Miranda, R. y Gascón-Figueroa, M. (1988) Chemistry of *Hyptis mutabilis*: New pentacyclic triterpenoids. *Journal of Natural Products* **51**, 996-998.
  - ◆ Pereda-Miranda, R. y Delgado, G. (1990) Triterpenoids and Flavonoids from *Hyptis albida*. *Journal of Natural Products* **53**, 182-185.
  - ◆ Pereda-Miranda, R.; García, M. y Delgado, G. (1990a) Structure and stereochemistry of four  $\alpha$ -pirones from *Hyptis oblongifolia*. *Phytochemistry* **29**, 2971-2974
  - ◆ Pereda-Miranda, R.; Hernández, L.; Villavicencio, M. J.; Novelo, M., Ibarra, P., Chai, H. y Pezzuto, M. J. (1993) Structure and stereochemistry of pectinolides A-C, novel antimicrobial and cytotoxic 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirones from *Hyptis pectinata*. *Journal of Natural Products* **56**, 583-593.
  - ◆ Pereda-Miranda, R. (1995) Bioactive natural products from traditionally used mexican plants. En: *Phytochemistry of Medicinal Plants* **29**, J. T. Arnason, R. Mata, J. T. Romeo (editores), Plenum Press, New York, pp. 83-112.
  - ◆ Pereda-Miranda, R.; Fragosó-Serrano, M. y Cerda-García-Rojas, C. M. (2001) Application of Molecular Mechanics in the Total Stereochemical Elucidation of Spicigerolide, a Cytotoxic 6-Tetraacetyloxyheptenyl-5,6-dihidro- $\alpha$ -Pyrone from *Hyptis spicigera*. *Tetrahedron* **57**: 47-53.
  - ◆ Perva, A.; Stangler H. S.; Hadolin, M.; Knez, Z. (2001) Isolation of active components of Lamiaceae. (Part 2). Editores: Glavic, Peter; Brodnjak-Voncina, Darinka. Zbornik Referatov s Posvetovanja Slovenski Kemijski Dnevi, Maribor, Slovenia. Abstract en Inglés. (Copyright (C) 2007 ACS on SciFinder (R))

- 
- ◆ Pezzuto, M. J. y Chai, H. B. (1997) *In vitro* anticancer drug screening: human cancer cell line. *Program for Collaborative Research in the Pharmaceutical Sciences*, Department of Medicinal Chemistry and Pharmacology, College of Pharmacy, University of Illinois at Chicago.
  - ◆ Ramamoorthy, T.P.; Bye, R.; Lot, A. y Fa, J. (1998) Lamiaceae de México: diversidad, distribución, endemismo y evolución. En: *Diversidad Biológica de México, Orígenes y distribución*. Instituto de Biología, UNAM, México, pp. 501-526.
  - ◆ Rana, V. S.; Juyal, J. P.; Rashmi; Blazquez, M. A. (2004) Volatile constituents of *Hyptis suaveolens* flowering twig oil. *International Journal of Aromatherapy* **14** (4): 198-201.
  - ◆ Ruíz 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" de Oaxaca. México, p. 76.
  - ◆ Sheth, K.; Jolad, S.; Wiedhopf, R. y Cole, J. R. (1972) Tumor-inhibitory agent from *Hyptis emoryi* (Labiatae). *Journal of Pharmaceutical Science* **61**, 1819-1821
  - ◆ Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, T. J., Bokesch, J.; Kenney, S. y Boyd, R. M. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of Natural Cancer Institute* **82**, 1107-1112.
  - ◆ Suddee (2001) A taxonomy revision of tribe Ocimeae Dumort. (Labiatae) in continental South East Asia. PhD thesis. Dublin Trinity College. Dublin. En URL, Heike Vibrans (ed.), 29 de mayo de 2007 (última modificación de la ficha), Malezas de México, (29 de diciembre de 2007).
  - ◆ Tchoumboungang, F.; Zollo, P. H. A.; Boyom, F. F.; Nyegue, M. A.; Bessiere, J. M.; Menut, C. (2005) Aromatic plants of tropical Central Africa. XLVIII. Comparative study of the essential oils of four *Hyptis* species from Cameroon: *H. lanceolata* Poit., *H. pectinata* (L.) Poit., *H. spicigera* Lam. and *H. suaveolens* Poit. *Flavour and Fragrance Journal* **20** (3): 340-343.
  - ◆ Tenorio (2006) URL, Malezas de México, (29 December 2007).
  - ◆ Urones, G. J.; Marcos, S. I.; Diez, D. y Cubilla, R. L. (1998) Tricyclic diterpenes from *Hyptis dilatata*. *Phytochemistry* **48**, 1035-1038.
  - ◆ USDA, ARS, National Genetic Resources Program. *Germplasm Resources Information Network - (GRIN)* [Base de Datos en Línea]. National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. URL: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?448591> (29 December 2007).

- ◆ Vibrans, H. (2007) URL, Malezas de México, (29 December 2007).
- ◆ Villavicencio González, J. M. (1993) Purificación y caracterización de las Pectinólidas A-C, principales constituyentes citotóxicos y antimicrobianos de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. Tesis de maestría, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, 65 p.
- ◆ Villaseñor R. J. L. y Espinosa G. F. J. (1998) Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México, Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario y Fondo de Cultura Económica, México.
- ◆ Waterhouse, B. M. y Mitchell, A. A. (1998) Northern Australia Quarantine Strategy: weeds target list. Second edition. Australian Quarantine & Inspection Service, Miscellaneous Publication No. 6/98. 110 pp.