



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EVALUACIÓN CITOTÓXICA DEL EXTRACTO  
CLOROFÓRMICO DE *HYPTIS PECTINATA*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA:

LUCERO MARICELA MARTÍNEZ FRUCTUOSO



MÉXICO, D.F.

2012



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. María Isabel Aguilar Laurents
Vocal	Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda
Secretario	Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano
1er sup.	Dr. Jose Fausto Rivero Cruz
2do sup.	Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz

Sitio en donde se desarrolló el tema:

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

Asesor del tema:

---

Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano

Supervisor técnico:

---

Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda

Sustentante:

---

Lucero Maricela Martínez Fructuoso

*“No existe una combinación de sucesos que la inteligencia de un hombre no sea capaz de explicar”*

Sherlock Holmes,

Personaje ficticio creado por Sir Arthur Conan Doyle.

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo brindado a las siguientes personas e instituciones:

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (proyecto 101380) por la beca otorgada durante el periodo de enero a diciembre de 2012.

*Dirección General de Asuntos de Personal Académico (IN 217310) y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (proyecto 101380) por el financiamiento parcial de esta investigación.*

M. en C. Rosa Isela Del Villar Morales por el registro de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear en *la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación*, Facultad de Química, UNAM.

Miembros del jurado por sus observaciones, mismas que me permitieron la corrección del presente escrito.

Dr. Rogelio Pereda Miranda por haberme otorgado sin pedirlo la beca que tanto aproveché.

Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano por su tiempo y apoyo en la presente investigación.

# ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS .....	III
LISTA DE CUADROS .....	IV
Introducción.....	1
Marco teórico.....	3
1. La familia Labiatae .....	3
2. Características del género <i>Hyptis</i> .....	4
3. Descripción de <i>Hyptis pectinata</i> .....	6
3.1. Características botánicas .....	6
3.2. Clasificación taxonómica .....	7
3.3. Distribución.....	7
3.4. Usos tradicionales .....	8
4. Fitoquímica del género <i>Hyptis</i> .....	9
4.1. Terpenoides .....	9
4.2. Flavonoides .....	11
4.3. Lignanos.....	12
4.4. 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas .....	13
Hipótesis.....	16
Objetivos .....	17
Metodología.....	18
1. Determinación de espectros de RMN .....	18
2. Técnicas cromatográficas .....	18
2.1. Cromatografía en columna abierta .....	18
2.2. Cromatografía en capa fina.....	19
2.3. Cromatografía de alta eficiencia.....	19
3. Material vegetal.....	20

4. Extracción de material vegetal .....	20
5. Fraccionamiento primario del extracto clorofórmico.....	20
6. Fraccionamiento secundario de las fracciones: VIII y X.....	21
6.1. Decoloración de la fracción VIII.....	22
7. Análisis y separación por CLAR de la fracción HP2-2 a HP2-5, IX y la subfracciónHP36.....	23
8. Ensayo de citotoxicidad.....	24
8.1. Preparación de los controles .....	25
8.2. Preparación de las muestras .....	26
8.3. Determinación de CL <sub>50</sub> .....	26
Resultados y discusión.....	28
Conclusiones.....	44
Bibliografía .....	45

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Diversas especies del género <i>Hyptis</i> .....	5
<b>Figura 2.</b> <i>Hyptis pectinata</i> .....	6
<b>Figura 3.</b> Distribución de <i>Hyptis pectinata</i> .....	8
<b>Figura 4.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400MHz) de la muestra HP2-2.....	34
<b>Figura 5.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400MHz) de la muestra HP2-5.....	34
<b>Figura 6.</b> Cromatograma a nivel analítico de la fracción IX.....	35
<b>Figura 7.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400MHz) de la muestra P1.....	36
<b>Figura 8.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400MHz) de la muestra P2.....	36
<b>Figura 9.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400MHz) de la muestra P3.....	37
<b>Figura 10.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400MHz) de la muestra P4.....	37
<b>Figura 11.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400MHz) de la muestra P5.....	38
<b>Figura 12.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400MHz) de la muestra P6.....	38
<b>Figura 13.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400MHz) de la muestra P7.....	39
<b>Figura 14.</b> Cromatogramas a nivel analítico, observados a 254 nm, de la fracción X en fase reversa. A) metanol/agua 6:4 y B) acetonitrilo/agua 6:4.....	40
<b>Figura 15.</b> Cromatograma a nivel analítico, observado a 254 nm, de la fracción X en fase normal ( <i>n</i> -hexano/acetato de etilo 35:65).....	41
<b>Figura 16.</b> Purificación del Pico 2 mediante la técnica de reciclaje realizada a 322.7nm.....	41
<b>Figura 17.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (CDCl <sub>3</sub> , 400MHz) de la muestra Pico 2.....	42
<b>Figura 18.</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C (CDCl <sub>3</sub> , 400MHz) de la muestra Pico 2.....	43



## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Tribus y géneros de la familia Labiatae presentes en México.....	3
<b>Cuadro 2.</b> Taxonomía de <i>Hyptis pectinata</i> .....	7
<b>Cuadro 3.</b> Terpenoides obtenidos del aceite esencial de algunas especies del género <i>Hyptis</i> .....	11
<b>Cuadro 4.</b> Columnas de vidrio utilizadas en los fraccionamientos primarios y secundarios del extracto clorofórmico.....	18
<b>Cuadro 5.</b> Columnas utilizadas en el equipo de CLAR.....	20
<b>Cuadro 6.</b> Fracciones reunidas del primer fraccionamiento del extracto clorofórmico.....	21
<b>Cuadro 7.</b> Fracciones reunidas para el segundo fraccionamiento.....	23
<b>Cuadro 8.</b> Diluciones para los controles positivo.....	26
<b>Cuadro 9.</b> Diluciones para las muestras.....	26
<b>Cuadro 10.</b> Rendimiento y citotoxicidad de los extractos totales de <i>Hyptis pectinata</i> .....	29
<b>Cuadro 11.</b> Citotoxicidad de las fracciones primarias del extracto clorofórmico de <i>H. pectinata</i> .....	29
<b>Cuadro 12.</b> Citotoxicidad de las subfracciones HP2.....	30
<b>Cuadro 13.</b> Desplazamientos químicos ( $\delta$ ) y constantes de acoplamiento ( $J$ ) en la RMN $^1\text{H}$ para las pectinólidas A-H y la hiptólida (300, 500 MHz).....	31
<b>Cuadro 14.</b> Citotoxicidad de las subfracciones P1-P7.....	35

---

---

## INTRODUCCIÓN

México, como muchos otros países, cuenta con una gran y antigua cultura dentro de la medicina tradicional, dentro de los archivos históricos que contienen esta información se cuenta por ejemplo con el *Códice Badiano*, el cual alberga un compilado de la herbolaria utilizada por las culturas prehispánicas.

El uso de plantas superiores es común para la elaboración de los remedios caseros para el tratamiento de diversas enfermedades y, a partir de este conocimiento empírico, transmitido oralmente de generación en generación o documentado por escritos como el anteriormente mencionado, ciencias como la etnofarmacología tienen como objetivo la investigación experimental y validación biológica de las plantas medicinales y medicamentos de origen natural. La amplia perspectiva de la etnofarmacología contextualiza la ecología y aborda la percepción de las plantas, su uso, farmacología y toxicología en comunidades humanas (Leonti, 2011).

El estudio de las plantas superiores involucradas en la medicina tradicional ha llevado al aislamiento de compuestos activos, comenzando con el aislamiento de la morfina desde el siglo XIX. El aislamiento y caracterización de los compuestos farmacológicamente activos continúa hasta nuestros días.

El descubrimiento de fármacos a partir de plantas medicinales ha involucrado numerosos campos de investigación y varios métodos de análisis. El proceso típico comienza con un botánico, etnobotánico, o ecólogo quien colecta e identifica la planta de interés. La colecta puede involucrar especies con una conocida actividad biológica pero cuyos compuestos activos no han sido aislados o puede involucrar una colecta taxonómica al azar para un programa de "screening". Los químicos preparan extractos del material vegetal, éstos son sometidos a análisis biológicos en ensayos farmacológicamente relevantes y, de esta forma, se da inicio al proceso de aislamiento y caracterización de los compuestos activos a través de un fraccionamiento biodirigido. La farmacognosia encapsula todos estos campos en una distinta ciencia interdisciplinaria (Balunas y Kinghorn, 2005).

El género *Hyptis*, un miembro de la familia de las labiadas (Lamiaceae), presenta un gran número de especies de gran importancia en la medicina tradicional mexicana con una considerable variedad de usos tradicionales, por ejemplo, para el tratamiento de malestares gastrointestinales e infecciones de la piel, así como, para tratar dolores reumáticos, musculares y calambres. En estudios citotóxicos de plantas pertenecientes a este género se han encontrados compuestos con una actividad citotóxica importante, dicha actividad se ha atribuido principalmente a compuestos como las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas (López-Vallejo *et al.* 2011) y derivados de la podofilotoxina (Novelo *et al.*, 1993).

*Hyptis pectinata* ha mostrado interesantes propiedades fisiológicas como relajante de músculo liso, anti-inflamatorio, antipirético, antifúngico y antimicrobiano (Pereda-Miranda, 1995). Con base en los compuestos ya reportados tanto para el género como para esta planta, el presente trabajo tiene como interés el estudio de una nueva colecta para la identificación de las fracciones y compuestos activos presentes a través de pruebas de citotoxicidad.

## MARCO TEÓRICO

### 1. La familia Lamiaceae.

La familia Lamiaceae está constituida por aproximadamente 224 géneros y 5600 especies en todo el mundo. En México, la familia está formada por 26 géneros que pertenecen a seis tribus y aproximadamente 512 especies. Las tribus más diversas son Menthae con 11 géneros y Salviae con 2 géneros (Ramamoorthy *et al.*, 1998).

**Cuadro 1. Tribus y géneros de la familia Lamiaceae presentes en México.**

Ajugeae	Lamieae	Menthae	Salviae	Nepeteae	Ocimieae
<i>Tetraclea</i>	<i>Physostegia</i>	<i>Acanthomintha</i>	<i>Monarda</i>	<i>Agastache</i>	<i>Asterohyptis</i>
<i>Teucrium</i>	<i>Prunella</i>	<i>Chaenostoma</i>	<i>Salvia</i>		<i>Catoferia</i>
<i>Trichostema</i>	<i>Scutellaria</i>	<i>Cunila</i>			<i>Hyptis</i>
	<i>Stachys</i>	<i>Hedeoma</i>			<i>Marsypianthes</i>
		<i>Hesperozygis</i>			<i>Ocimum</i>
		<i>Lepechinia</i>			
		<i>Monardella</i>			
		<i>Neoeplingia</i>			
		<i>Pogogyne</i>			
		<i>Poliomintha</i>			
		<i>Clinopodium</i>			

Un gran número de labiadas introducidas se cultivan, ya sea como plantas ornamentales o como hierbas de uso culinario. Las más conocidas pertenecen a los géneros *Lavandula*, *Mentha*, *Origanum*, *Rosmarinus* y *Thymus*.

Sus miembros son principalmente plantas herbáceas y arbustos, en la familia no se conocen epífitas, saprófitas o parásitas. Los tallos son tetraangulares, hojas simples, opuestas y decusadas sin estípulas. Con frecuencia las plantas están cubiertas de pelos y de glándulas que emiten fragancia. El cáliz está fusionado en

---

forma de campana o cono, algunas veces bilabiadas; pétalos fusionados pentámeros; 4 ó 2 estambres epipétalos, ya sea iguales o de dos longitudes, ovario súpero de dos carpelos fusionados, los cuales forman cuatro lóculos distintos cada uno con un óvulo basal. Usualmente el estilo es ginobásico. El fruto consiste de cuatro nueces parecidas a aquenios indehiscentes con una semilla. Existe una amplia 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).

## **2. Características del género *Hyptis*.**

*Hyptis* cuenta con más de 300 especies, las cuales son bastante aromáticas y se utilizan con frecuencia para el tratamiento de trastornos gastrointestinales como infecciones, calambres y dolor, así como en el tratamiento de infecciones de la piel (Azevedo, *et al*, 2001) e insecticida (Araújo, *et al*, 2003). Las plantas de este género son herbáceas con hojas opuestas cruzadas y hojas enteras, las flores son pequeñas, agrupadas en inflorecencias axilares, hermafroditas, pentámeros, fuertemente zigomorfas y bilabiadas (Figura 1) (Arrigoni-Blank, *et al*, 2005).

El empleo de algunos miembros de *Hyptis* se remonta a las antiguas civilizaciones mesoamericanas. En el siglo XVI, el manuscrito “*Historia Plantarum Novae Hispanae*”, escrito post-conquista de la herbolaria prehispánica redactado por el médico español Francisco Hernández, menciona “huitsiquia” o “xoxouhcapatlí” para un tratamiento medicinal efectivo para el tratamiento de disentería y tumores. Reumatismo, llagas e infecciones oculares también son aliviados con la decocción de esta planta (Pereda-Miranda, 1995). Esfuerzo contemporáneos de grupos multidisciplinarios que incluyen taxónomos y etnobotánicos han permitido identificar a esta planta medicinal como miembros del género *Hyptis*.



Figura 1. Diversas especies del género *Hyptis*. (<http://www.kew.org>)

### 3. Descripción de *Hyptis pectinata*.

#### 3.1. Características botánicas.

Hierbas o arbustos pequeños, erectos, hasta 2 m de alto, aromáticas o con olor fétido; tallos jóvenes tomentosos. Hojas ovadas 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 cimas a veces amontonadas 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, inconspicuas, hispidas o puberulentas; cáliz 2–2.5 mm de largo, externamente el tubo veloso, internamente con tricomas largos en el ápice del tubo y en fruto como fascículos conspicuos de tricomas exertos desde los senos, dientes espiniformes, erectos, 1.2–1.5 mm de largo, hispídos; 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 (Figura 2) (Tropicos, 2009).

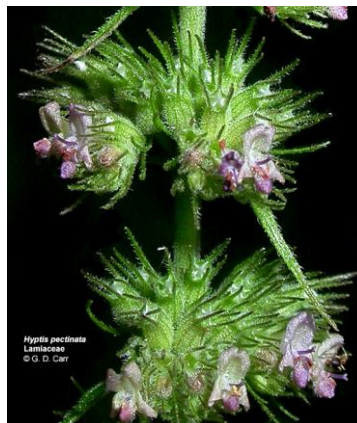


Figura 2. *Hyptis pectinata*. ([www.botany.hawaii.edu](http://www.botany.hawaii.edu))

### 3.2. Clasificación taxonómica.

Cuadro 2. Taxonomía de <i>Hyptis pectinata</i> .	
Reino	Plantae
Subreino	Viridaeplantae
Infrareino	Streptophyta
División	Tracheophyta
Subdivisión	Spermatophytina
Infradivisión	Angiospermae
Clase	Magnoliopsida
Superorden	Asteranae
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Género	Hyptis
Especie	H. pectinata

### 3.3. Distribución.

La especie se distribuye en las zonas tropicales e intertropicales de América, en países como: Bahamas, Belice, Brasil, Colombia, Costa Rica, Cuba, Ecuador, El Salvador, Estados Unidos, Guadalupe, Guatemala, Guyana, Haití, Honduras, Islas Vírgenes, Jamaica, México, Nicaragua, Panamá, Puerto Rico, Rep. Dominicana, Trinidad y Tobago, Venezuela (Figura 3) (Smithsonian Tropical Research Institute). Dentro de México, *Hyptis pectinata* se encuentra distribuida en las regiones intertropicales y tropicales de la cuenca del Golfo de México (Pereda-Miranda, 1995).



### 3.4. Usos tradicionales

Comúnmente conocida como “hierba del burro” y con el nombre maya de xoolte’xnuuk en Yucatán y en San Luis Potosí con el nombre terek de tsak maape’ (Biblioteca tradicional mexicana, 2009) ha sido usada por sus cualidades medicinales y por su aroma y sabor en la cocina regional del sureste mexicano. Formulaciones de la planta son usadas en la medicina popular como remedio en el tratamiento de fiebres, ciertas enfermedades de la piel, problemas gástricos, rinofaringitis y congestiones de pulmón (Pereda-Miranda, 1993).



**Figura 3.** Distribución de *Hyptis pectinata*. (<http://biogeodb.stri.si.edu/>)

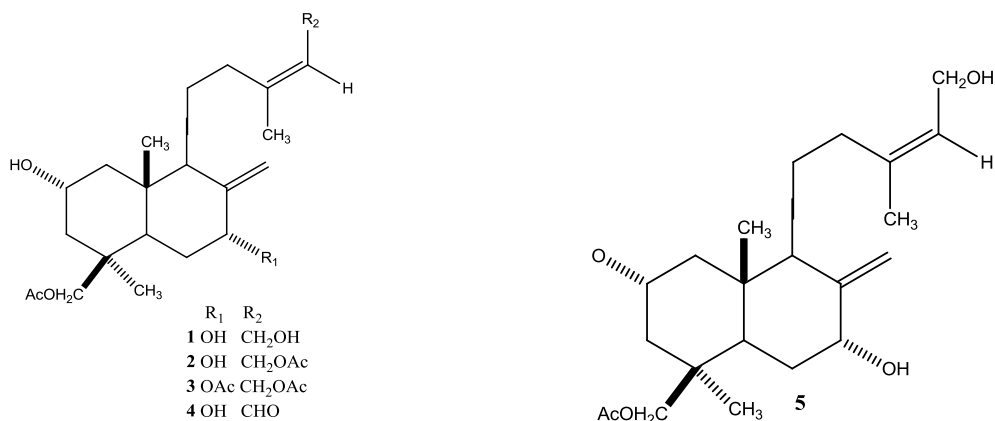
En Brasil, se conoce popularmente como “sambacaita” o “canudinho” en los estados de Sergipe y Alagoa, en donde se usa como un té medicinal (infusión o decocción) para el tratamiento de problemas de la piel, desórdenes gástricos, nasofaringitis, congestión nasal, fiebre y otras infecciones causadas por bacterias u hongos, como antiinflamatorio, para aliviar el dolor y cáncer (Arrigoni-Blank, 2005). También se han descrito propiedades antinociceptivas, antiinflamatorias, antimicrobianas, antivirales, antitumorales y actividades antioxidantes (Russo-Serafini, *et al*, 2012).

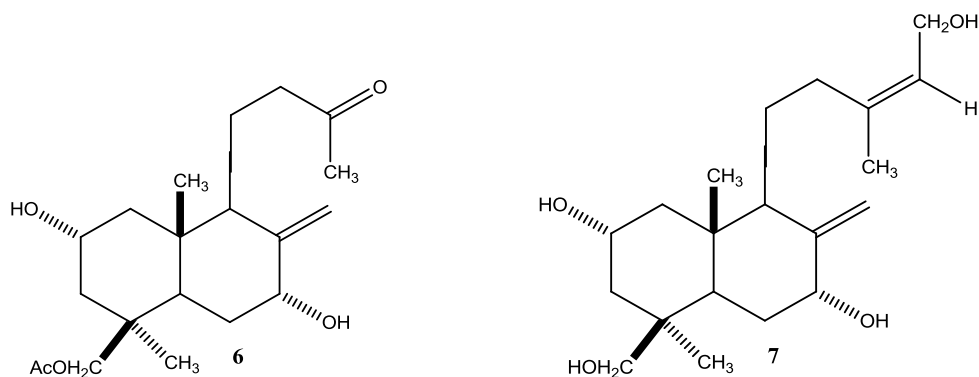
## 4. Fitoquímica del género *Hyptis*.

### 4.1. Terpenoides.

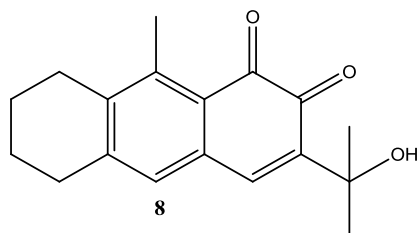
Todos los terpenos o terpenoides presentan la característica común de ser moléculas que se forman mediante la condensación de dos o varias moléculas de isopreno (2-metil-1,3-butadieno). El isopreno tiene cinco átomos de carbono, por lo cual, todos los terpenoides presentan en su molécula un número de carbonos múltiplo de cinco (a excepción de aquellos que pueden perder algún átomo de carbono por distintos procesos) (Ortuño, 2006).

Se ha aislado una gran diversidad de terpenoides en esta especie, por ejemplo, para *Hyptis spicigera* se reportó la presencia de siete diterpenos: 19-2 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -15-trihidroxilabda-8(17),13Z-dieno (**1**), 15,19-diacetoxi-2 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroxilabda-8(17),13Z-dieno (**2**), 7 $\alpha$ ,15,19-triacetoxi-2 $\alpha$ -hidroxilabda-8(17),13Z-dieno (**3**), 19-acetoxi-2 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroxilabda-8(17),13Z-dien-15-al (**4**), 19-acetoxi-2 $\alpha$ ,7 $\alpha$ -dihidroxi-14,15-dinorlabda-8(17)-en-13-ona (**5**), 19-acetoxi-7 $\alpha$ ,15-dihidroxilabda-8(17),13Z-dien-2-ona (**6**), 2 $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,15,19-tetrahidroxi-*ent*-labda-8(17),13Z-dieno (**7**) (Fragoso-Serrano, 2000).

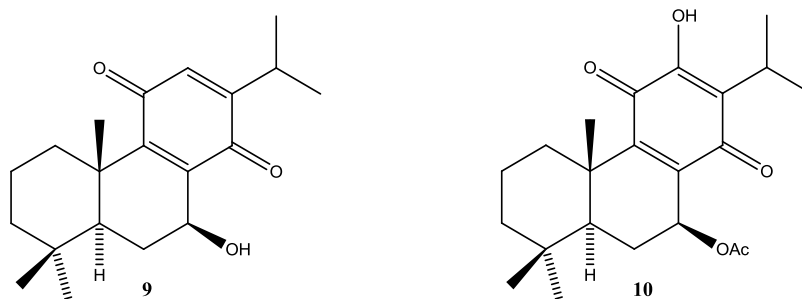




Del extracto etanólico de *Hyptis umbrosa* se obtuvo una diterpeno quinona denominada umbrosona (**8**) (Delle Monache, *et al.*, 1990).



De *Hyptis martiussi* se ha aislado el 7 $\beta$ -hidroxi-11,14-dioxoabieta-8,13-dieno (**9**) y el 7 $\alpha$ -acetoxi-12-hidroxi-11,14-dioxoabieta-8,12-dieno (**10**) (Cavalcanti, *et al.*, 2008).



De investigaciones en extractos de *Hyptis albida* se han obtenido triterpenos tipo lactonas como 3 $\beta$ -hidroxiolean-28,13 $\beta$ -olido (Pereda-Miranda y

Delgado, 1990). En la tabla 3 se presentan los diferentes terpenoides aislados a partir del aceite esencial de diferentes especies del género *Hyptis*.

#### 4.2. Flavonoides.

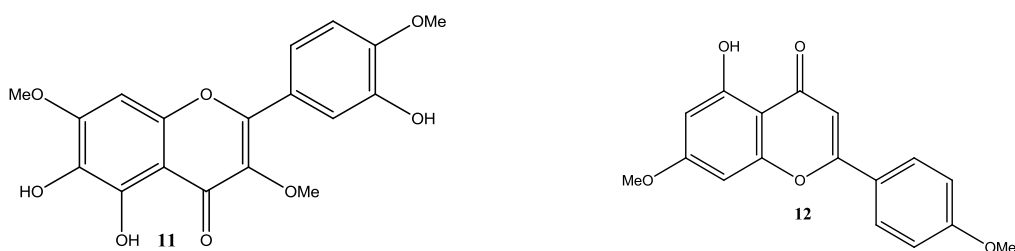
Los flavonoides tienen un núcleo fenilpropanoide de 15 átomos de carbono el cual consiste en dos anillos de benceno que unidos a través del heterociclo pirano forman el fenilbenzopirano (Drago Serrano, 2007). Representan una clase muy diversa de metabolitos secundarios en las plantas con cerca de 9000 estructuras las cuales han sido identificadas hasta ahora. Estos compuestos son encontrados en todas las plantas vasculares, así como en algunos musgos. Tienen un amplio rango de funciones en fisiología, bioquímica y ecología, por ejemplo, protección contra los rayos UV, color de las flores, interacción interespecie y defensa en plantas (Martens y Mithöfer, 2005).

**Cuadro 3. Terpenoides obtenidos del aceite esencial de algunas especies del género *Hyptis*.**

Compuesto	Fuente de donde fueron aislados
$\alpha$ -Tujeno	HS, HSP, HL, HM
$\alpha$ -pineno	HS, HSP, HL, HM
Camfeno	HSP, HM
Sabineno	HS, HSP, HL, HM
$\beta$ -pineno	HS, HSP, HL, HM
Limoneno	HS, HSP, HL, HP, HM
$\gamma$ -terpineno	HS, HSP, HM
Linalol	HS, HL
Camfor	HS
Terpinoleno	HS, HSP
$\delta$ -elemeno	HP
$\alpha$ -cubebeno	HP
Germacreno D	HP, HSP, HL
$\delta$ -amorfenol	HP
$\gamma$ -cadineno	HP, HSP, HL
globulol	HS, HSP

HS= *Hyptis suaveolens*, HP= *Hyptis pectinata*, HSP= *Hyptis spicigera*, HL= *Hyptis lanceolata*, HM= *Hyptis mutabilis* (Tchoumboungang, 2005, Aguilar, et al, 2003).

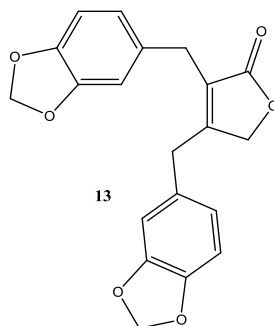
De *Hyptis brevipes* se han aislado 5,3'-dihidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona (ayanina), 3,5,3'-trihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (ombuina) y 5,6,3'-trihidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona (**11**) (Deng, *et al*, 2009). De *Hyptis capitata* se ha aislado la apigenin-4',7-dimetil éter (**12**) (Almtorp, 1991). Los flavonoides como cirsilineol, cirsimaritina, benzoato de aurantiamida y isoquercetrina se han reportado en *Hyptis fasciculata* (Silva, *et al*, 2009).



### 4.3 Lignanos.

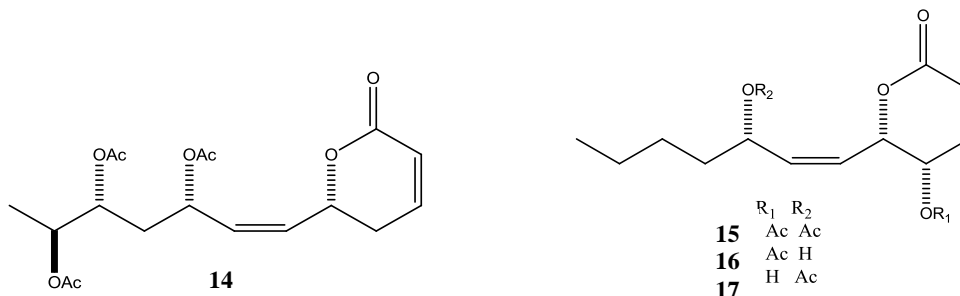
Los lignanos incluyen compuestos difenólicos y se presentan en altas concentraciones en la linaza y otras semillas, así como frutas y vegetales. Además en bebidas como café, té y vino (Landete, 2012).

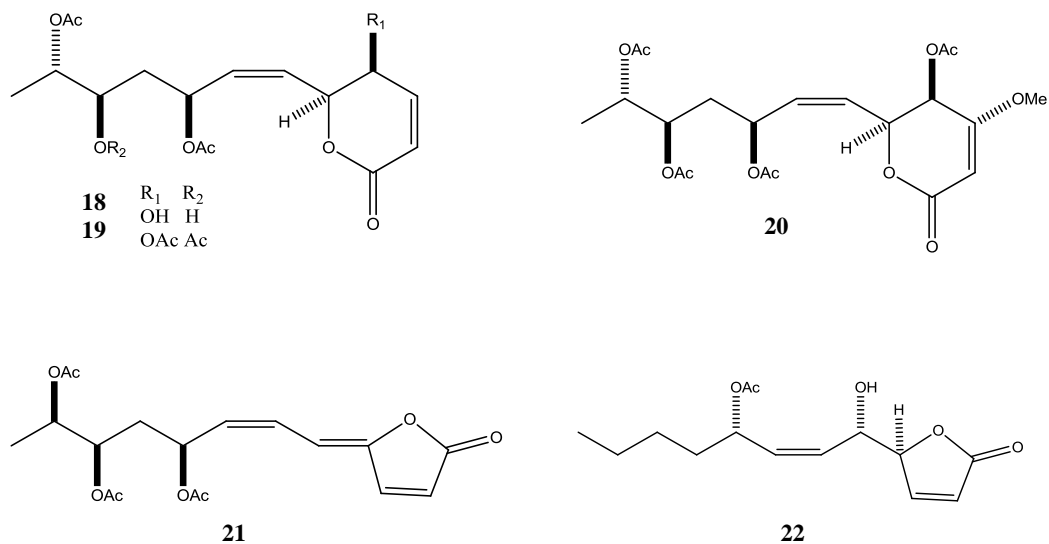
De *Hyptis capitata* se aisló la 2,3 di-(3',4'-metilenedioxibenzil)-2-buten-4-ólida (**13**), un lignano con una estructura  $\gamma$ -butenólida (Almtorp, 1991). Los lignanos conocidos como deshidropodofilotoxina, deshidrodesoxipodofilotoxina, 4'-desmetildesoxipodofilotoxina, podofilotoxina (Novelo *et al.*, 1993), podorhizol, epipodorhizol e hipitinina se obtuvieron de *Hytis verticillata* (Kuhnt, 1994).



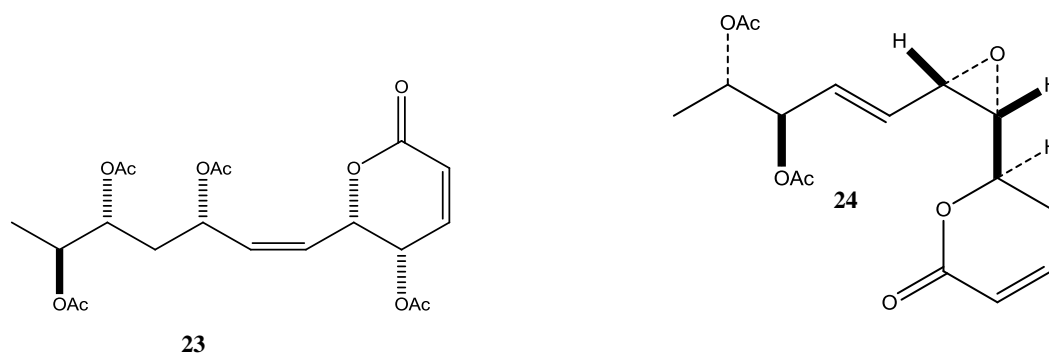
#### 4.4 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas.

Muchos de estos compuestos poseen actividad biológica como fitotoxicidad, citotoxicidad, además de actividad antimicrobiana y fúngica (Collet *et al.*, 1998). De *Hyptis pectinata* se aisló el primer compuesto de esta especie conocido como hiptólida (**14**) (Achmad *et al.*, 1987). De esta especie, también han aislado las pectinólidas A-C (**15-17**), las cuales poseen actividad citotóxica ( $CL_{50} \leq 4\mu\text{g/mL}$ ) contra una variedad de líneas celulares tumorales (Pereda-Miranda *et al.*, 1993). *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* son sensibles a la pectinólida A (Yadav y Mandal, 2011). Se han aislado otros compuestos denominados pectinólidas de la D a la G (**18-21**) (Boalino *et al.*, 2003). La pectinólida H (**22**) presenta una actividad significativa contra 4 cepas de *Staphylococcus aureus* multiresistentes a fármacos en un rango de concentración de 32 a 64  $\mu\text{g/mL}$  y no presentó actividad citotóxica, lo cual sugiere que puede servir como modelo para el diseño de nuevos antibióticos con un grupo farmacóforo de  $\gamma$ -lactona (Fragoso-Serrano, 2005).

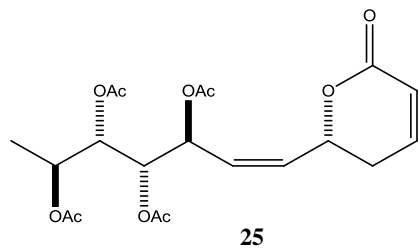




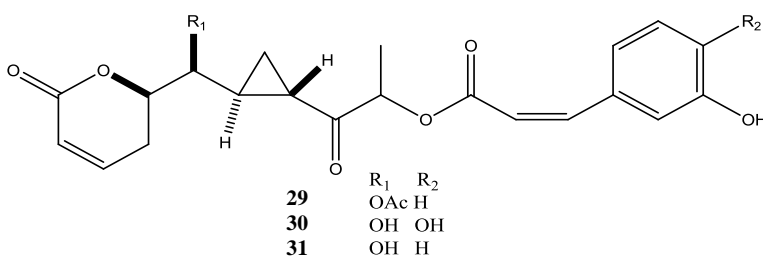
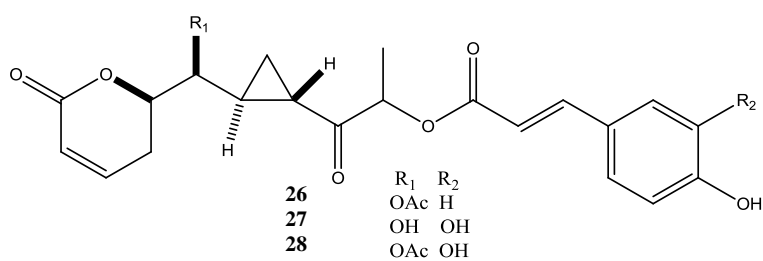
De *Hyptis urticoides* se aisló la hipurticina (**23**) (Romo de Vivar *et al.*, 1991), cuya elucidación correcta y estereoquímica se estableció recientemente (Mendoza-Espinosa *et al.*, 2009). Para *Hyptis oblongifolia* se han reportado la 4-deacetoxi-10-*epi*-olguina (**24**) (Pereda-Miranda, 1990) y la 10-*epi*-olguina la cual también ha sido reportada para *Hyptis capitata* (Almtorp, 1991).



De *Hyptis spicigera* se aisló la denominada con el nombre trivial de espicigérolida, 6R-[3'S, 4'S,5'S,6'S-tetraacetiloxi-1Z-heptenil]-5,6-dihidro-2H-piran-2-ona (**25**) (Fragoso-Serrano, 2000).



De *Hyptis brevipes* se obtuvieron seis compuesto llamados brevipólidas (**26-31**) (Deng, *et al*, 2009).





## HIPÓTESIS

La información documentada que existe sobre el uso medicinal de las plantas pertenecientes al género *Hyptis* y, particularmente, sobre *Hyptis pectinata*, permite sustentar su estudio químico y se espera llegar a la obtención de los compuestos responsables de la actividad biológica.

---

---

## OBJETIVOS

### Objetivo general

El objetivo general del presente proyecto de investigación consistió en establecer la presencia de constituyentes citotóxicos diferentes a las pectinólidas de la especie *Hyptis pectinata*, una especie de amplio uso en la medicina tradicional de nuestro país.

### Objetivos específicos

- a) Obtención del extracto clorofórmico preparado a partir de las partes aéreas de *Hyptis pectinata*.
- b) Fraccionamiento de extracto clorofórmico a través de la técnica de cromatografía en columna abierta.
- c) Determinación de la  $CL_{50}$  de las fracciones obtenidas por medio de ensayos de citotoxicidad utilizando líneas celulares provenientes de carcinomas humanos.
- d) Perfil cromatográfico de los componentes presentes en las fracciones citotóxicas utilizando cromatografía de alta resolución (CLAR).
- e) Caracterización de los constituyentes citotóxicos empleando la técnica de Resonancia Magnética Nuclear.

## METODOLOGÍA

### 1. Determinación de los espectros de RMN.

Los espectros de resonancia magnética nuclear, fueron registrados en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química; los espectros de RMN protónica ( $^1\text{H}$ ) y de carbono-13 ( $^{13}\text{C}$ ) se generaron en los equipos Varian, modelos VNMRS y MR, operando a una frecuencia de 400 MHz en  $^1\text{H}$  y 100 MHz en  $^{13}\text{C}$ , utilizando  $\text{CDCl}_3$  en ambos casos como disolvente. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresaron en partes por millón (ppm), utilizando como referencia interna la señal del tetrametilsilano (TMS).

### 2. Técnicas cromatográficas.

Se utilizaron tres técnicas distintas para el aislamiento de los compuestos de interés:

#### 2.1. Cromatografía en columna abierta.

Para cada fraccionamiento se llevó a cabo el uso de diversas columnas de vidrio empacadas con gel de sílice 60 (con tamaño de partícula de 0.063-0.200mm), empleando las condiciones indicadas en el cuadro 4.

<b>Cuadro 4. Columnas de vidrio utilizadas en los fraccionamientos primarios y secundarios del extracto clorofórmico.</b>		
	Diámetro y altura (cm)	Cantidad de sílica (g)
Fraccionamiento primario	77 x 9	1000
Fraccionamiento secundario (Fracción VIII)	38 x 5	370
Fraccionamiento secundario (Fracción X)	37 x 3	80

Las muestras fueron adsorbidas en una relación 1:1 con gel de sílice y los disolventes utilizados fueron de grado químicamente puro (QP).

## **2.2. Cromatografía en capa fina (CCF).**

Esta técnica se llevó a cabo en placas de aluminio con gel de sílice 60 F<sub>254</sub> marca Merck, la detección de los compuestos analizados con esta técnica se llevó a cabo con una lámpara de luz UV a 254 nm y 265 nm. Además, como agente cromógeno se usó una mezcla de ácido sulfúrico con sulfato cérico y calentamiento para su revelado.

## **2.3. Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).**

Se realizó en un equipo cromatográfico marca Waters (Millipore Corporation, Waters Chromatography Division milford, MA, EEUU) que contaba con una bomba modelo 600E y un detector UV de arreglo de diodos modelo 2996; adaptado a un computador marca Dell con un sistema operativo Windows XP, el cual contaba con el programa Empower 2 (Waters) para el control del equipo y procesamiento de los datos.

Para el análisis y separación de las muestras tanto en fase reversa como en fase normal se utilizaron disolventes grado analítico (RA) y las columnas enumeradas en el cuadro 5.

**Cuadro 5. Columnas utilizadas en el equipo de CLAR.**

Tipo de columna	Tamaño de partícula / Dimensiones
Waters Symmetry C18 analítica	5 µm 4.6 x 250 mm
Waters Symmetry C18 preparativa	7 µm 19 x 300 mm
µPorasil silica analítica	10 µm 3.9 x 300 mm
ISCO silica preparativa	21.2 x 250 mm

### 3. Material vegetal.

Para el desarrollo del presente estudio fitoquímico, se utilizaron las partes aéreas (tallos, hojas y flores) de una población de *Hyptis pectinata* colectadas en Veracruz en agosto de 2010.

### 4. Extracción del material vegetal.

El material vegetal se dejó secar mediante exposición al aire a temperatura ambiente, se pulverizó en un molino de cuchillas modelo Wiley 4, obteniéndose 3,682.45g de material seco y molido. Se procedió a la extracción a temperatura ambiente vía maceración con *n*-hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y metanol por 4 ocasiones con cada disolvente; cada periodo comprendía de 48-72 h. En esta investigación se trabajó con el extracto obtenido de la maceración con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, que después de filtrar y concentrar el disolvente se extrajeron 53.1 g de extracto con coloración verdusca.

### 5. Fraccionamiento primario del extracto clorofórmico.

El fraccionamiento primario del extracto clorofórmico se llevó por cromatografía

en una columna de abierta empacada con sílica gel. La elución se inició con *n*-hexano y se incrementó la polaridad utilizando en el siguiente orden los disolventes: diclorometano, acetona y metanol (cuadro 6). Se tomaron eluatos de 1 L y se analizaron con CCF para determinar cuáles deberían ser reunidos. En total, se obtuvieron 68 fracciones, las cuales fueron reunidas como se presenta en el mismo cuadro.

### 6. Fraccionamiento secundario de las fracciones VIII y X.

Posterior al ensayo de citotoxicidad y análisis de los espectros de RMN de las muestras obtenidas en el fraccionamiento primario, se seleccionaron las fracciones VIII y X para un segundo fraccionamiento por columna abierta. Una muestra de la fracción VIII se decoloró como se indica en el punto 3.3.1.

La elución se realizó aumentando la polaridad de la misma manera que para el primer fraccionamiento (cuadro 7), se recolectaron eluatos de 20 mL y 50 mL, respectivamente.

<b>Cuadro 6. Fracciones reunidas del primer fraccionamiento del extracto clorofórmico.</b>			
Sistema de elución	Fracciones colectadas	Fracciones reunidas	Cantidad (g)
Hexano	1-5	I (1)*	0.4710
		II (2-6)*	0.1165
Hexano/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (7:3)	6-10	III (7-9)*	0.4350
Hexano/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (1:1)	11-15	IV (10-14)*	1.2577
Hexano/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (3:7)	16-20	V (15-17)*	0.2069
		VI (18-23)	1.0080
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	21-25	VII (24-26)	0.5346
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /Acetona (7:3)	26-30	VIII (27-28)*	23.9871

		IX (29-30)*	6.2490
		X (31-34)*	4.3920
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /Acetona (1:1)	31-35	XI (35-39)	2.6522
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /Acetona (3:7)	36-40	XII (40-44)	1.358
Acetona	41-45	XIII (45-47)	1.4292
Acetona/Metanol (7:3)	46-50	XIV (48)	1.1287
		XV (49-51)	0.8918
		XVI (52-63)	1.2538
Acetona/Metanol (1:1)	51-55	XVII (64-68)	0.4036
Acetona/Metanol (3:7)	56-60		
Metanol	60-68		

\*Fracciones seleccionadas para su análisis en RMN <sup>1</sup>H.

### 6.1. Decoloración de la fracción VIII.

Se tomaron 4.82 g de la fracción VIII y se disolvieron en la mínima cantidad de cloroformo; a continuación, se agregó carbón vegetal y se agitó por 15 minutos. La solución se filtró con un embudo Büchner con una cama de celita; el filtrado pasó nuevamente por el mismo proceso cuatro veces más. Por último, se dejó en reposo por 24 horas junto con el carbón activado para filtrar después. Se comparó la fracción decolorada con la inicial por CCF.

**Cuadro 7. Fracciones reunidas para el segundo fraccionamiento.**

Fracción VIII		Fracción X*	
Sistema de elución	Fracciones reunidas /rendimiento	Sistema de elución	Fracciones reunidas
Hexano/acetato de etilo (6:4)	HP2-1(1-50) 12.52 g	Hexano a Hexano/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (90:10)	HP3-1 (1-7)
Hexano/acetato de etilo (1:1)	HP- 2 (51-60) 0.9860 g	Hexano/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (65:35)	HP3-2 (8-22)
Hexano/acetato de etilo (4:6)	HP2-3 (61-70) 1.1450 g	Hexano/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (55:45)	HP3-3 (23-26)
Hexano/acetato de etilo (3:7)	HP2-4 (71-80) 0.2991 g	Hexano/CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (10:90)	HP3-4 (27-45)
Hexano/acetato de etilo (2:8)	HP2-5 (81-90) 1.2137 g	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> a CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /acetona (85:15)	HP3-5 (46-53)
Hexano/acetato de etilo (1:9)	HP2-6 (91-100) 0.2944 g	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /acetona (40:60)	HP3-6 (54-75)
Acetato de etilo	HP2-7 (100-111) 0.0580 g	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /acetona (35:65)	HP3-7 (76-90)
		Acetona/Metanol (60:40) a Metanol	HP3-8 (91-96)

\* Los cambios de polaridad se aumentaron paulatinamente en un 5%

## 7. Análisis y separación por CLAR de las fracciones HP2-2 a HP2-5, IX y la subfracción HP3-6.

Para el escalamiento de columna analítica a preparativa se usó la fórmula:

$$F_p = F_a \times \frac{l_p}{l_a} \times \frac{d_p^2}{d_a^2}$$



Donde:

$F_p$ = flujo columna preparativa

$F_a$ =Flujo columna analítica

$l_p$ =longitud columna preparativa

$l_a$ =longitud columna analítica

$d_p$ =diámetro columna preparativa

$d_a$ = diámetro columna analítica

Para todas las fracciones, en el análisis cromatográfico se inyectó un volumen de 10  $\mu$ L a una concentración de 0.02 mg/ $\mu$ L de muestra y en la separación se inyectaron 30 mg en 500  $\mu$ L. Los disolventes usados para disolver las muestras, fueron metanol y acetato de etilo.

Se realizaron los perfiles cromatográficos de las fracciones HP2-3 y HP2-4, detectando la presencia de la pectinólida A, como compuesto mayoritario, empleando una columna Symmetry C<sub>18</sub> con una elución isocrática de metanol-agua (9:1) a una velocidad de flujo de 3 mL/min.

El análisis de la fracción IX se llevó a cabo en fase normal (*n*-hexano/acetato de etilo, 3:2) con un flujo de 0.4 mL/min.

La subfracción HP3-6 proveniente de la fracción X fue estudiada empleando dos diferentes fases móviles (acetonitrilo/agua, 3:2 y metanol/agua, 3:2) en una columna de fase reversa y, posteriormente en fase normal (*n*-hexano/acetato de etilo 7:13), utilizando un flujo de 0.3 mL/min en las columnas analíticas correspondientes. De las muestras obtenidas en la fase normal, se seleccionó la denominada Pico 2 para la purificación a través del método de reciclaje.

## 8. Ensayo de citotoxicidad.

Se utilizaron tres líneas celulares cancerosas humana: KB (carcinoma nasofaríngeo), MCF<sub>7</sub> (carcinoma de mama) y HeLa (carcinoma de cérvix). Las líneas se cultivaron en medio de suero bovino fetal y su preparación para el ensayo consistió en permitir su crecimiento hasta el 60-70 % de confluencia.

---

Posteriormente, se cambió el medio y se dejó en incubación durante 24 horas adicionales.

Pasado este tiempo, se lavó dos veces con 5 mL de PBS y se agregó 0.3 mL de tripsina para separar las células de la caja de crecimiento; se incubó por 5 minutos y se observó al microscopio para comprobar que la separación se hubiera logrado. Se agregaron 5 mL de medio fresco y se procedió al conteo a través de una cámara de Neubauer, a partir del resultado se calculó el volumen requerido para tener una suspensión de alrededor de  $10^4$  células; de esta solución fueron tomados 190  $\mu$ L y fueron agregados en las microplacas de plástico (cada una con 96 cavidades de 250  $\mu$ L) con 10  $\mu$ L de las diferentes concentraciones de las muestras a analizar y los controles, esto se realizó por triplicado. Al mismo tiempo, se prepararon muestras blanco (células de tiempo inicial) con 190  $\mu$ L de la solución celular, éstas se incubaron por 30 minutos. Se incubó a 37 °C en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad por 72 horas. Al concluir la incubación, las células se fijaron agregando 100  $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA) e incubadas a 4 °C por 30 minutos. Pasado este tiempo, se decantó el TCA y las placas se lavaron con agua fría cuatro veces y expuestas al aire para su secado para después teñir cada cavidad con 100  $\mu$ L de sulforodamida B (SRB) al 0.4% en ácido acético al 1% por 30 minutos. Se eliminó el exceso de colorante con ácido acético al 1% y se procedió a un segundo secado. La SRB se solubilizó con 200  $\mu$ L de Tris base 10mM (pH 10) con agitación por 5 minutos. Se registró la densidad en un lector para ELISA a 564 nm.

### **8.1 Preparación de los controles.**

A partir de una disolución de 4 mg/mL de las muestras indicadas en el cuadro 8 para el control positivo (vinblastina, colchicina y elipticina), se realizaron las diluciones.

## 8.2 Preparación de las muestras.

De cada muestra utilizada en el ensayo, se pesó 1 mg y se disolvió en 250  $\mu\text{L}$  de DMSO para obtener una concentración de 4 mg/mL. Posteriormente, se realizaron las diluciones indicadas en el cuadro 9.

<b>Cuadro Tabla 8. Diluciones para los controles positivos.</b>	
10 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{L}$ de 4 mg/mL + 190 $\mu\text{L}$ agua estéril
2 $\mu\text{g/mL}$	40 $\mu\text{L}$ de 10 $\mu\text{g/mL}$ + 160 $\mu\text{L}$ DMSO 10%
0.4 $\mu\text{g/mL}$	40 $\mu\text{L}$ de 2 $\mu\text{g/mL}$ + 160 $\mu\text{L}$ DMSO 10%
0.08 $\mu\text{g/mL}$	40 $\mu\text{L}$ de 0.4 $\mu\text{g/mL}$ + 160 $\mu\text{L}$ DMSO 10%
0.016 $\mu\text{g/mL}$	40 $\mu\text{L}$ de 0.08 $\mu\text{g/mL}$ + 160 $\mu\text{L}$ DMSO 10%
0.32 $\mu\text{g/mL}$	40 $\mu\text{L}$ de 0.016 $\mu\text{g/mL}$ + 160 $\mu\text{L}$ DMSO 10%

<b>Cuadro 9. Diluciones para las muestras.</b>	
20 $\mu\text{g/mL}$	20 $\mu\text{L}$ de 4 mg/mL+180 $\mu\text{L}$ agua estéril
4 $\mu\text{g/mL}$	40 $\mu\text{L}$ de 20 $\mu\text{g/mL}$ +160 $\mu\text{L}$ DMSO 10%
0.8 $\mu\text{g/mL}$	40 $\mu\text{L}$ de 4 $\mu\text{g/mL}$ +160 $\mu\text{L}$ DMSO 10%
0.16 $\mu\text{g/mL}$	40 $\mu\text{L}$ de 0.8 $\mu\text{g/mL}$ +160 $\mu\text{L}$ DMSO 10%

## 8.3. Determinación de $\text{CL}_{50}$ .

Los valores obtenidos en las diferentes concentraciones tanto de los controles como las muestras a estudiar fueron promediados y para cada uno de ellos se determinó el porcentaje de crecimiento:

$$\% \text{ Crecimiento} = \frac{\text{D.O. células + muestra} - \text{D.O. células tiempo inicial}}{\text{D.O. células + DMSO 10\%} - \text{D.O. células tiempo inicial}} \times 100$$

El porcentaje de crecimiento fue graficado junto con sus respectivas concentraciones en el programa TableCurve v1.0 de Jandel Scientific.

Se consideran activos las fracciones con una  $CL_{50} \leq 20 \mu\text{g/mL}$ .

---

---

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El aislamiento de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas a partir del género *Hyptis* ha despertado especial interés por sus propiedades farmacológicas como antimicrobianos, citotóxicos y antitumorales, asociado a la  $\delta$ -lactona- $\alpha,\beta$ -insaturada, que constituye el grupo farmacofórico responsable de la actividad biológica (Pereda-Miranda, 1995; Yoshida *et al.*, 2007).

Estudios químicos previos de la hierba del burro, *Hyptis pectinata* describen el aislamiento de cuatro 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas, hiptólida y pectinólidas A-C y una furanona, pectinólida H (Pereda-Miranda, 1993, Fragoso-Serrano, 2004) y de una colecta de la Isla de Barbados, se reportó el aislamiento de las pectinólidas D-G (Boalino, 2003).

En la presente investigación se realizó el estudio químico de una colecta del Estado de Veracruz con el objetivo de establecer la presencia de metabolitos novedosos responsables de la actividad citotóxica de esta especie medicinal.

En primer lugar, se procedió a la obtención de los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico a partir de las partes aéreas de *Hyptis pectinata*. Para la obtención de los principios activos se realizó la evaluación biológica de los extractos orgánicos. Los protocolos para la evaluación del potencial citotóxico de extractos vegetales y fracciones, consideran como una actividad significativa aquellos valores con una concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) menores a 20  $\mu\text{g/mL}$  (Cordell *et al.*, 1991).

Se detectó actividad biológica en el extracto hexánico y clorofórmico (cuadro 10) y, de esta forma, se puede suponer la presencia de compuestos biológicamente activos en estos extractos.

**Cuadro 10. Rendimiento y citotoxicidad de los extractos totales de *H. pectinata*.**

Extracto	Rendimiento (g)	HeLa <sup>a</sup> (µg/mL)	Cl <sub>50</sub>
Hexánico	27.2	4.11	
Clorofórmico	53.1	2.34	
Metanólico	36.4	>20	

<sup>a</sup> HeLa: Carcinoma de cérvix.

El extracto clorofórmico se sometió a un fraccionamiento primario mediante cromatografía en columna abierta utilizando gel de sílica para generar un total de 17 fracciones primarias. Cada una de éstas se sometió a la determinación de su potencial citotóxico para establecer que la actividad se concentraba en las fracciones VIII y IX (tabla 11, Cl<sub>50</sub> = 3.85 y 15.19 µg/mL, respectivamente).

**Cuadro 11. Citotóxicidad de las fracciones primarias del extracto clorofórmico de *H. pectinata*.**

Fracción	HeLa <sup>a</sup> Cl <sub>50</sub> (µg/mL)
I a VII	>20
VIII	3.85
IX	15.19
X a XVII	>20

En el cuadro 11 se observa que sólo dos muestras resultaron tener actividad en el primer fraccionamiento, sin embargo se decidió analizar éstas y algunas fracciones listadas en la cuadro 6 (sección 6, metodología). En la cuadro 13 se presentan los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) y las constantes de acoplamiento ( $J$ ) para RMN <sup>1</sup>H de las pectinólidas A-H e hiptólida aisladas de

*Hyptis pectinata*, con el fin de poder establecer si se detectaban señales que indicaran la presencia de componentes similares. Al buscar estas señales en las fracciones de la I a la V, se logró establecer que no se detectaban las señales características de estos compuestos.

La fracción VIII se sometió a un segundo fraccionamiento al ser la fracción con mayor actividad citotóxica ( $CI_{50} = 3.8 \mu\text{g/mL}$ ). De la segunda columna se obtuvieron un total de siete fracciones. De estas subfracciones se volvió a evaluar la actividad citotóxica (cuadro 12), Se observó que en las fracciones HP2-3 y HP2-4 se concentra la actividad biológica, por lo cual se procedió a establecer su perfil cromatográfico por CLAR, comparando con muestras auténticas de pectinólidas A-C. Se logró detectar como compuesto mayoritario a la pectinólida A. En el caso de la fracción HP2-5 se observa una  $CI_{50}$  cercana al límite del criterio de citotoxicidad para la línea celular KB.

<b>Cuadro 12. Citotoxicidad de las subfracciones HP2.</b>		
Subfracción	Línea celular ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>a</sup>	
	KB	MCF <sub>7</sub>
HP2-2	8.07	4.96
HP2-3	1.55	1.74
HP2-4	1.33	1.08
HP2-5	19.02	>20
HP2-6	>20	>20

<sup>a</sup> KB: Carcinoma nasofaríngeo, MCF<sub>7</sub>: Carcinoma de ovario

Cuadro 13. Desplazamientos químicos ( $\delta$ ) <sup>a</sup> y las constantes de acoplamiento ( $J$ ) <sup>b</sup> en la RMN <sup>1</sup> H para las pectinólidas A-H y la hiptólida (300, 500MHz) <sup>c</sup>										
Protón	A <sup>d</sup>	B <sup>d</sup>	C <sup>d</sup>	D <sup>e</sup>	E <sup>e</sup>	F <sup>e</sup>	G <sup>e</sup>	H <sup>f</sup>	Hiptólida <sup>h</sup>	
3	6.24d (9.7)	6.22d (9.8)	6.08d (9.8)	6.09dd (9.8, 0.7)	6.17d (10.2)	2.81dd (17.5,5.0) 2.72dd (17.5,4.2)	6.23d (5.4)	6.22dd (6.0,2.0)	6.03ddd (10.0,1.0,2.80)	
4	6.96dd (9.7,5.7)	6.98dd (9.8,5.6)	7.01dd (9.8,5.4)	6.98dd (9.8, 5.0)	6.93dd (10.2, 5.1)	3.71m	7.43d (5.4)	7.55dd (6.0,2.0)	6.86ddd (10.0, 6.6,2.4,-0.25)	
5	5.19dd (5.7,2.9)	5.26dd (5.6,3.0)	4.12dd (5.4,3.0)	4.47dd (5.0,3.7)	5.26m	5.13dd (3.4, 2.0)	-	5.16ddd (5.0,2.0,2.0)	2.38dddd (1.0,6.6, -17.9, 3.9, -0.5)	
6	5.60dd (8.1,2.9)	5.54dd (8.1,3.0)	5.35dd (8.0,3.0)	5.44dd (7.0,3.7)	5.45m	5.68dd (7.4,2.0)	-	4.96ddd (8.5,5.0,3.5,2.0)	5.20ddd (3.9, 10.5,7.7)	
1'	5.73dd (10.5,8.1)	5.64ddd (11.1,8.1,0.9)	5.82dd (11.2,8.0)	5.87dd (11.6,7.0)	5.71dd (10.1,8.0)	5.60d (10.2)	6.20d (12.0)	5.53dd (11.0,8.5)	5.76dddd (-0.25,-0.5,7.7,10.32,-0.4)	
2'	5.62dd (10.5,10.1)	5.76dd (11.1,7.3)	5.66dd (11.2,9.2)	5.62ddd (11.6,10.0,1.3)	5.55dd (10.1, 9.2)	5.58m	6.17ddd (12.0,10.9,0.8)	5.46dd (11.0,6.0)	5.51dd (10.32,95)	
3'	5.35ddd (10.1,7.3,6.6)	4.39qd (7.3,0.9)	5.44ddd (9.2,6.8,5.8)	5.72dd (10.0,4.0)	5.43m	5.58m	5.60ddd (10.9,9.8,1.0)	5.39ddd (10.0,7.5,6.5)	5.52ddd (-0.4, 9.5, 8.5,4.6)	
4'	1.70m 2H	1.60m 2H	1.68m 2H	1.91m 1.74m	1.93dd (9.6,4.8) 1.81dd (9.6, 4.8)	1.92m 1.88m	5.73m	1.70m 1.55m	1.83ddd (8.5,-14.3,2.9)	
5'	1.54m 2H	1.55m 2H	1.55m 2H	3.69dt (6.5, 3.5)	4.91m	5.03m	2.09m 1.88ddd (12.8,6.4,3.2)	1.35m 2H	4.9ddd (2.9,9.6,3.2)	
6'	1.29m 2H	1.29m 2H	1.29m 2H	4.88dq (6.5,3.5)	4.89m	5.04m	4.97dt (9.3, 3.4)	1.30m	4.97dq (3.2,6.37)	
7'	0.90t (6.9)	0.90t (7)	0.90t (6.9)	-	1.13d (6.8)	1.23d (6.5)	5.03dq (6.6, 3.5)	0.92t 3H (7.0)	1.20d 3H (6.37)	
8'	-	-	-	-	-	-	1.20d (6.6)	-	-	
5-OAc	-	-	-	-	2.08s	2.12s	-	-	-	
4-OMe	-	-	-	-	-	3.47s	-	-	-	

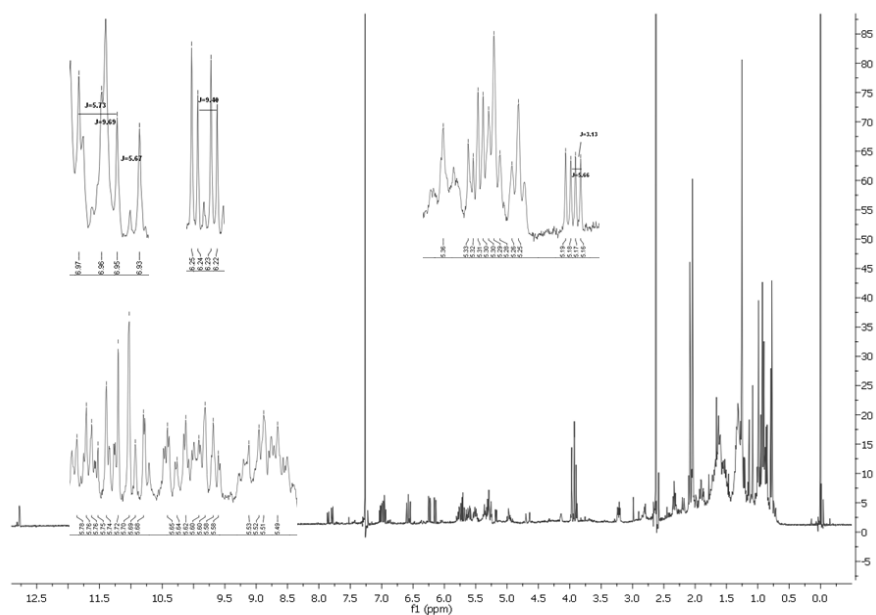


6'-OAc	-	-	-	2.08s	2.04s	2.09s	-	-	-
5'-OAc	2.09s	2.10s	-	-	2.10s	2.04s	-	-	-
4'-OAc	-	-	-	-	-	-	-	2.06s	-
3'-OAc	2.05s	-	2.04s	2.04s	2.04s	2.05s	-	-	-
1'-OH	-	-	-	-	-	.	-	3.60d (3.5)	-

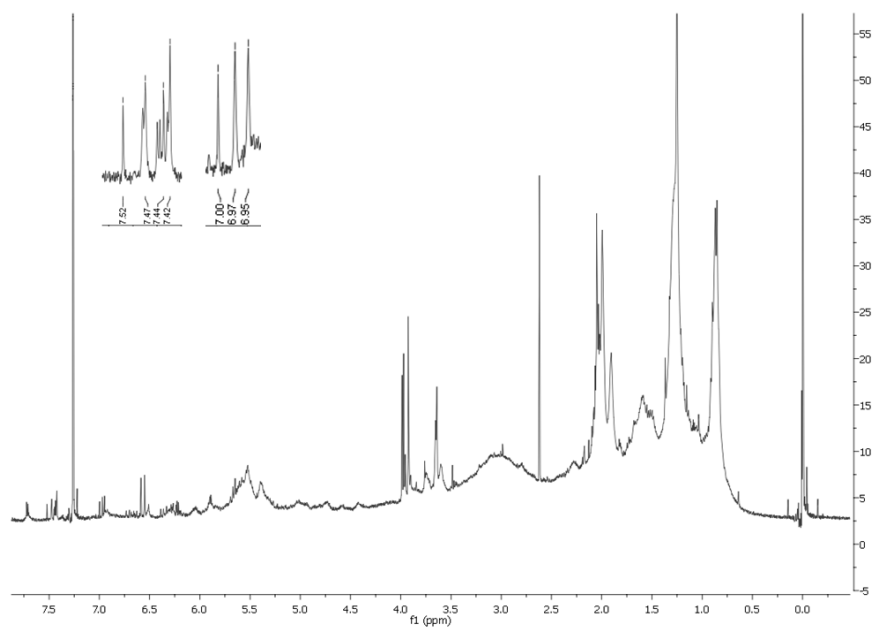
<sup>a</sup>Expresados en ppm en relación a TMS. <sup>b</sup>Entre paréntesis expresados en Hz. <sup>c</sup>Las pectinólidas A-C y H fueron registradas a 300 MHz y D-G a 500 MHz, los valores para la hiptólida fueron obtenidos a través de un programa computacional. <sup>d</sup>Pereda-Miranda, *et al*, 1993. <sup>e</sup>Boalino, *et al*, 2003. <sup>f</sup>Fragoso-Serrano, *et al.*, 2005. <sup>h</sup>Mendoza-Espinoza, *et al.*, 2009.

Se realizaron los registros de RMN  $^1\text{H}$  de las subfracciones HP2-2 y HP2-5 (figuras 4 y 5). El espectro correspondiente a la HP2-2 (figura 4) presenta señales alrededor de 6.9 ppm con constantes de acoplamiento de 9.6 y 5.7 Hz, las cuales según lo reportado corresponden al protón en posición 4 de las pectinólidas A y B. El valor correspondiente al protón en posición 3 se encuentra en 6.2 con una  $J$  de 9.40 Hz, estos valores también pertenecen a estos compuestos, así como la serie de multipletes para los protones en posición 6, 1', 2' y 3' que aparecen en el espectro, sin embargo no se puede calcular su  $J$  debido a que la muestra no se encontraba en estado puro y por lo tanto el número de señales es mayor al reportado. La señal para el protón en posición 5 de la pectinólida A aparece como un doble de dobles en 5.18 ppm con  $J$  de 3.13 y 5.66 Hz. Además, se observan señales correspondientes a compuestos diferentes a los reportados en la literatura, por lo cual, deberá realizarse su purificación posterior para lograr la elucidación de un posible compuestos novedoso.

En el caso del espectro de RMN  $^1\text{H}$  de la subfracción HP2-5, se observan señales entre 7.5 y 7.4 ppm (figura 5) que podrían ser pertenecientes a las pectinólidas G y H, sin embargo no hay otras señales para estos compuestos. Se presenta un triplete en 6.9 ppm a diferencia de lo reportado para otras pectinólidas donde se observa un doble de dobles.

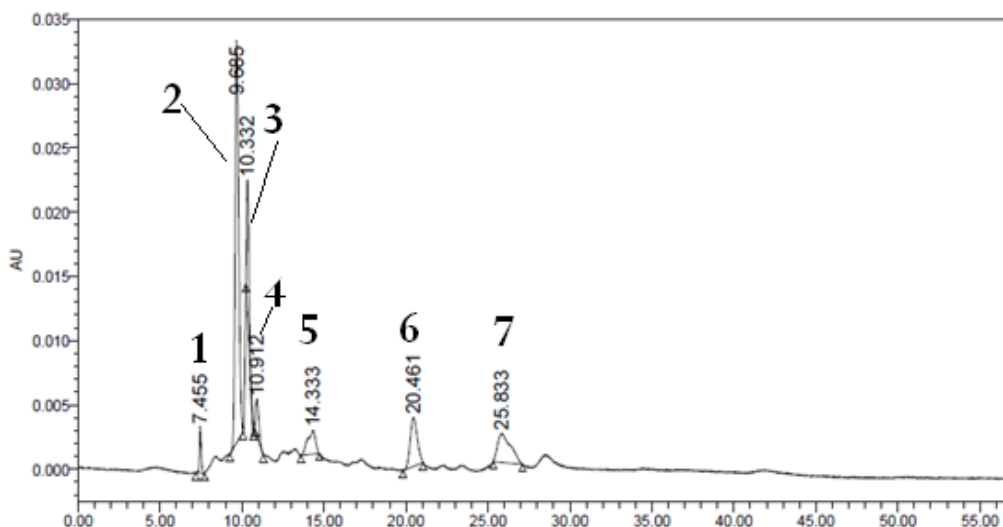


**Figura 4.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) de la subfracción HP2-2.



**Figura 5.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) de la subfracción HP2-5.

La fracción IX fue fraccionada por CLAR a través de un sistema de fase normal (figura 6), se obtuvo en rendimiento 79.73%.



**Figura 6.** Cromatograma a nivel analítico de la fracción IX.

En el cuadro 14, se presentan los resultados de  $CI_{50}$  registrados para estas subfracciones, P1 a P7, se observan valores cercanos al límite para considerarlas activas, registrando la mayor actividad en P3 en la línea KB y en P1 para HeLa.

<b>Cuadro 14. Citotoxicidad de las subfracciones P1-P7.</b>		
Sufracción	Línea celular ( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>a</sup>	
	KB	MCF <sub>7</sub>
P1	>20	11.540
P2	>20	>20
P3	13.272	19.726
P4	17.745	>20
P5	17.300	19.718
P6	>20	>20
P7	>20	19.382

Se realizó el registro de RMN <sup>1</sup>H de estas fracciones (figuras 7 a 13).

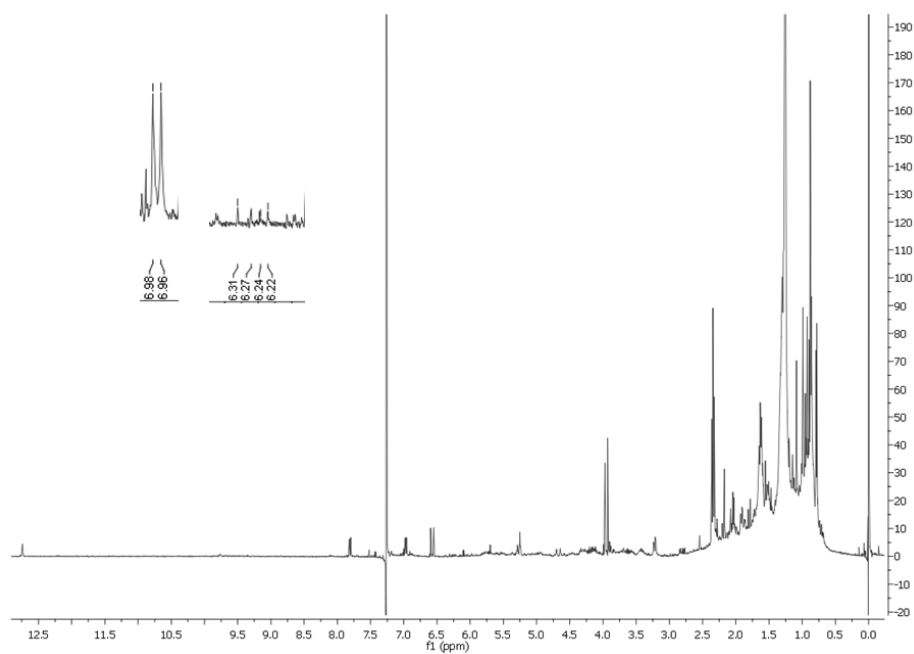


Figura 7. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) de la muestra P1.

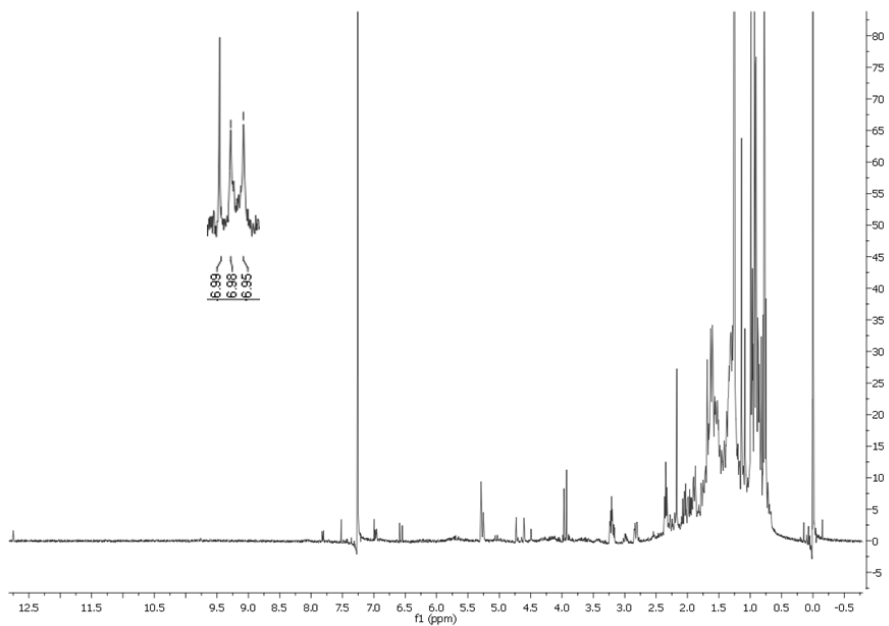
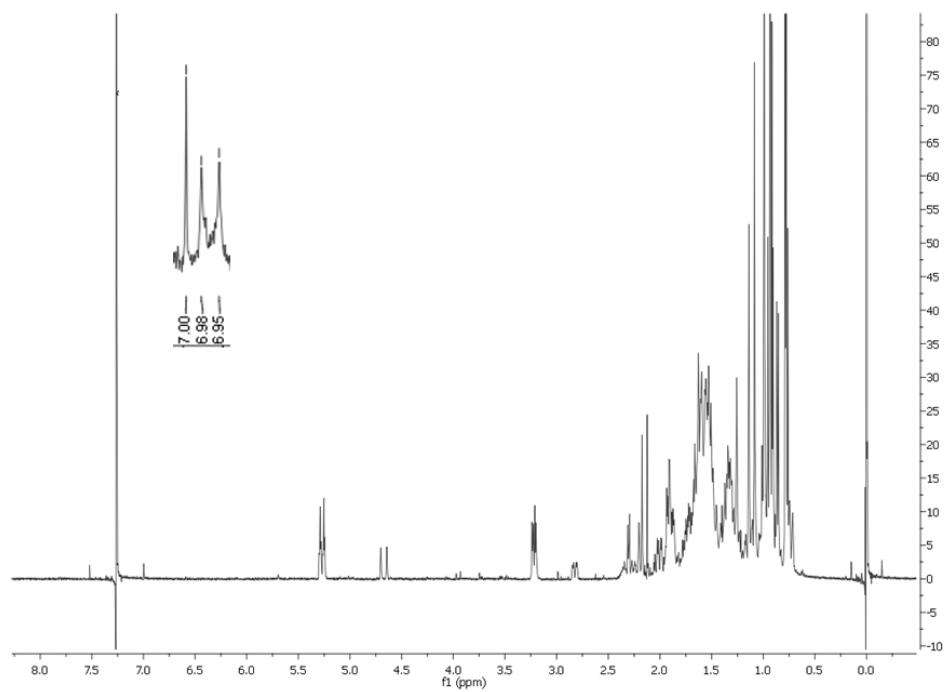
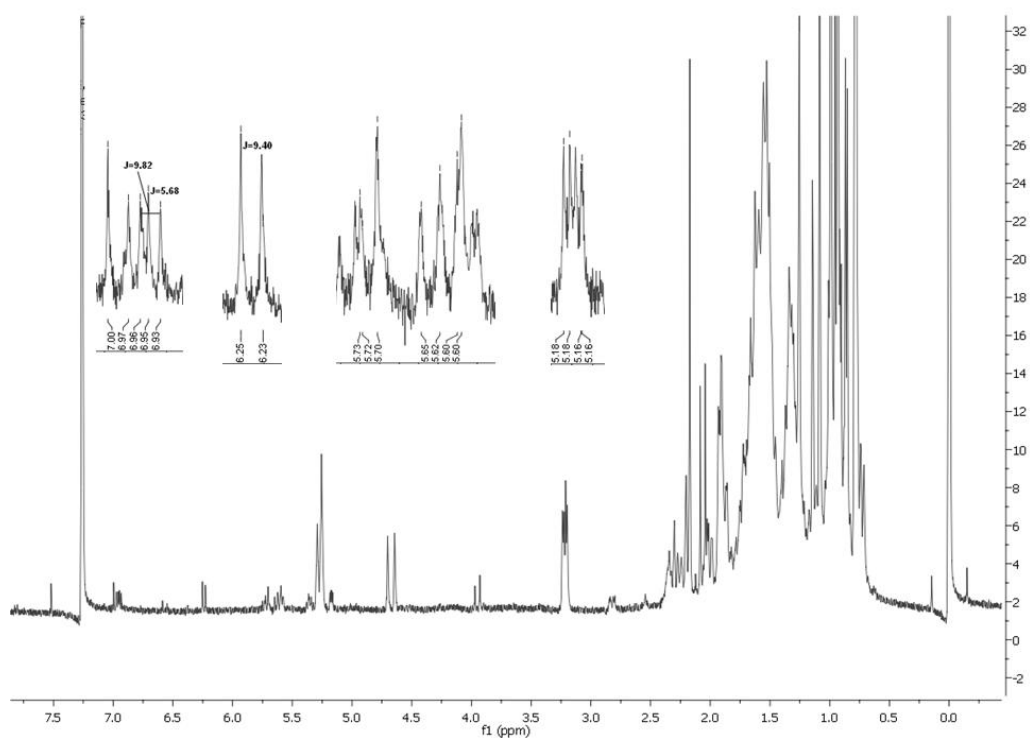


Figura 8. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) de la muestra P2.



**Figura 9.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz) de la muestra P3.



**Figura 10.** Espectro de RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400MHz) de la muestra P4.

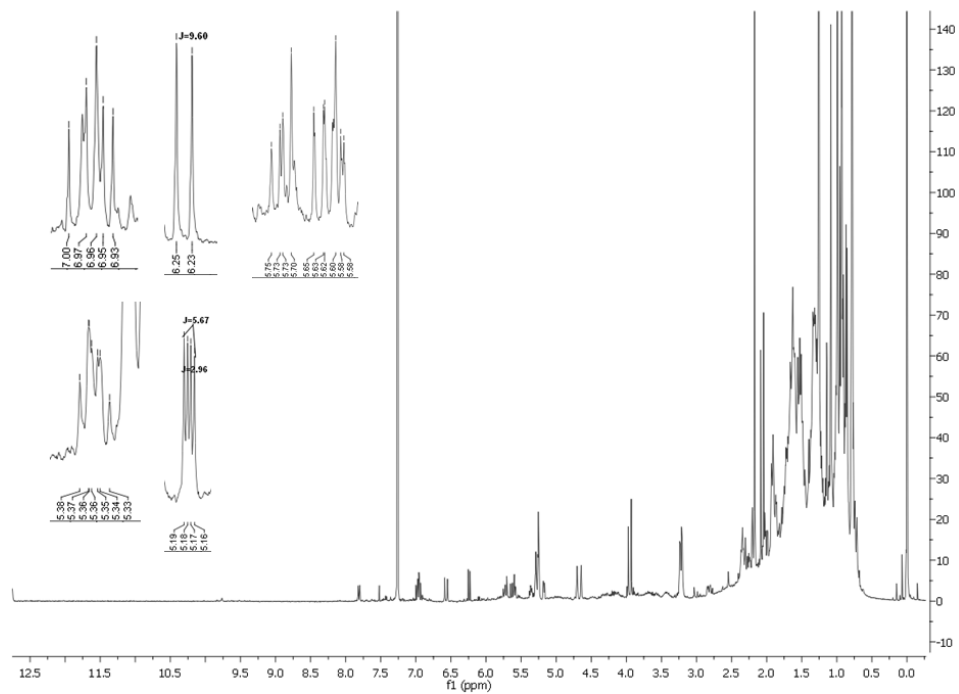


Figura 11. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) de la muestra P5.

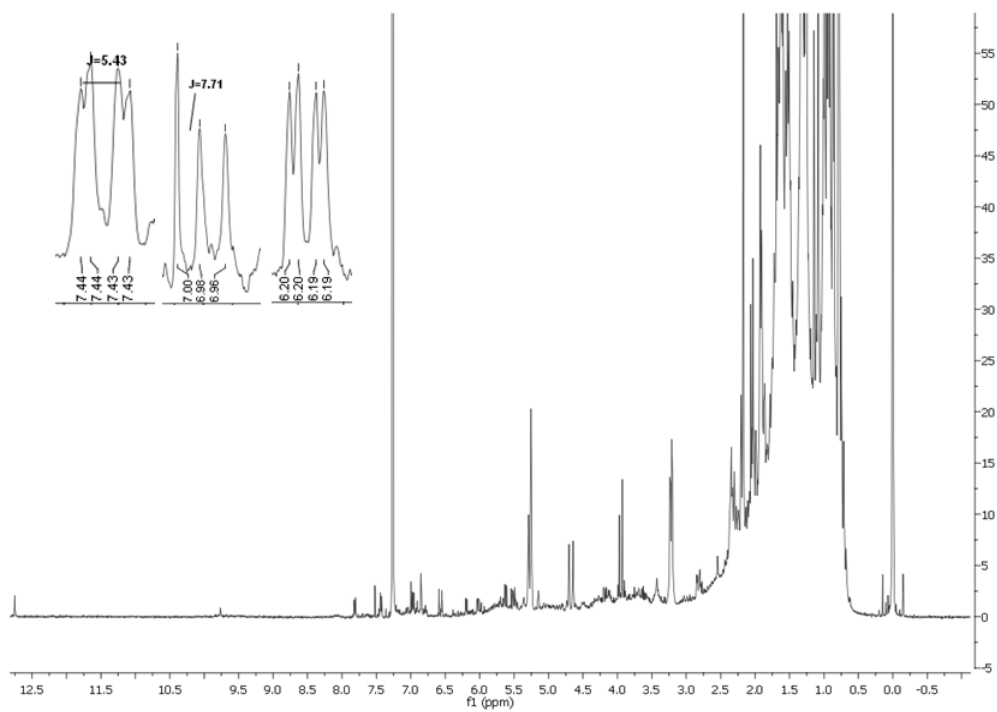
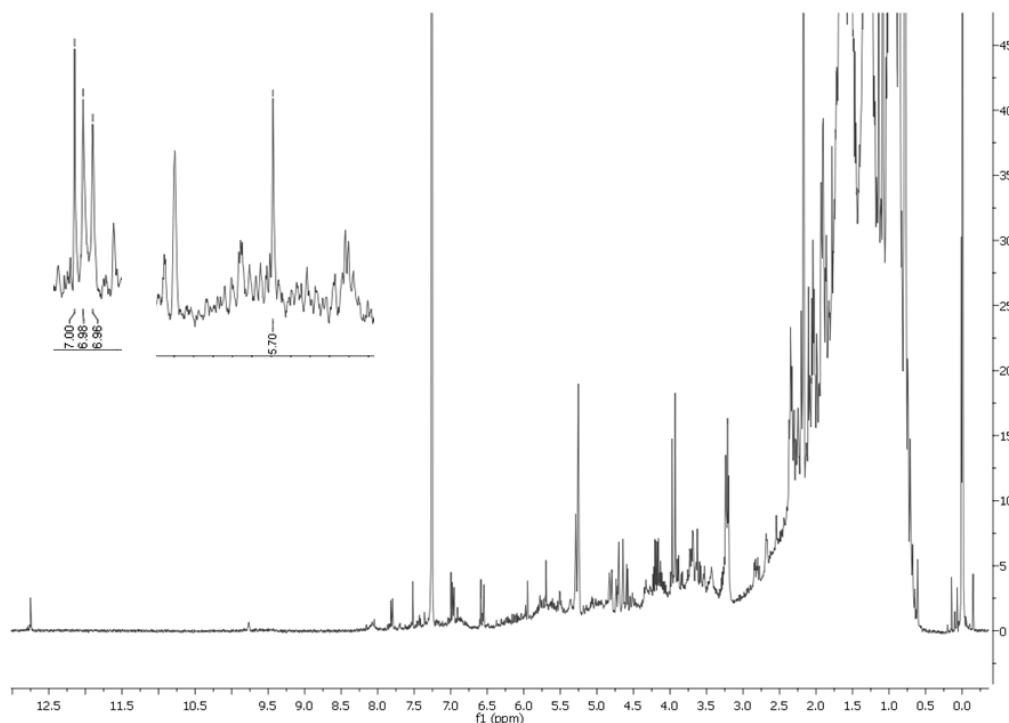


Figura 12. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) de la muestra P6.



**Figura 13.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) de la muestra P7.

De las subfracciones analizadas por RMN  $^1\text{H}$  se encontró que para P1 (figura 7) hay un doblete aproximadamente en 6.97 ppm y pequeñas señales en 6.2 ppm, la presencia del doblete descarta la presencia de pectinólidas. En P2 y P3 (figura 8 y 9) tampoco se presentan señales para estos, sin embargo P3 presenta  $\text{CL}_{50}$  lo cual podría indicar la presencia de otro tipo de compuestos citotóxicos.

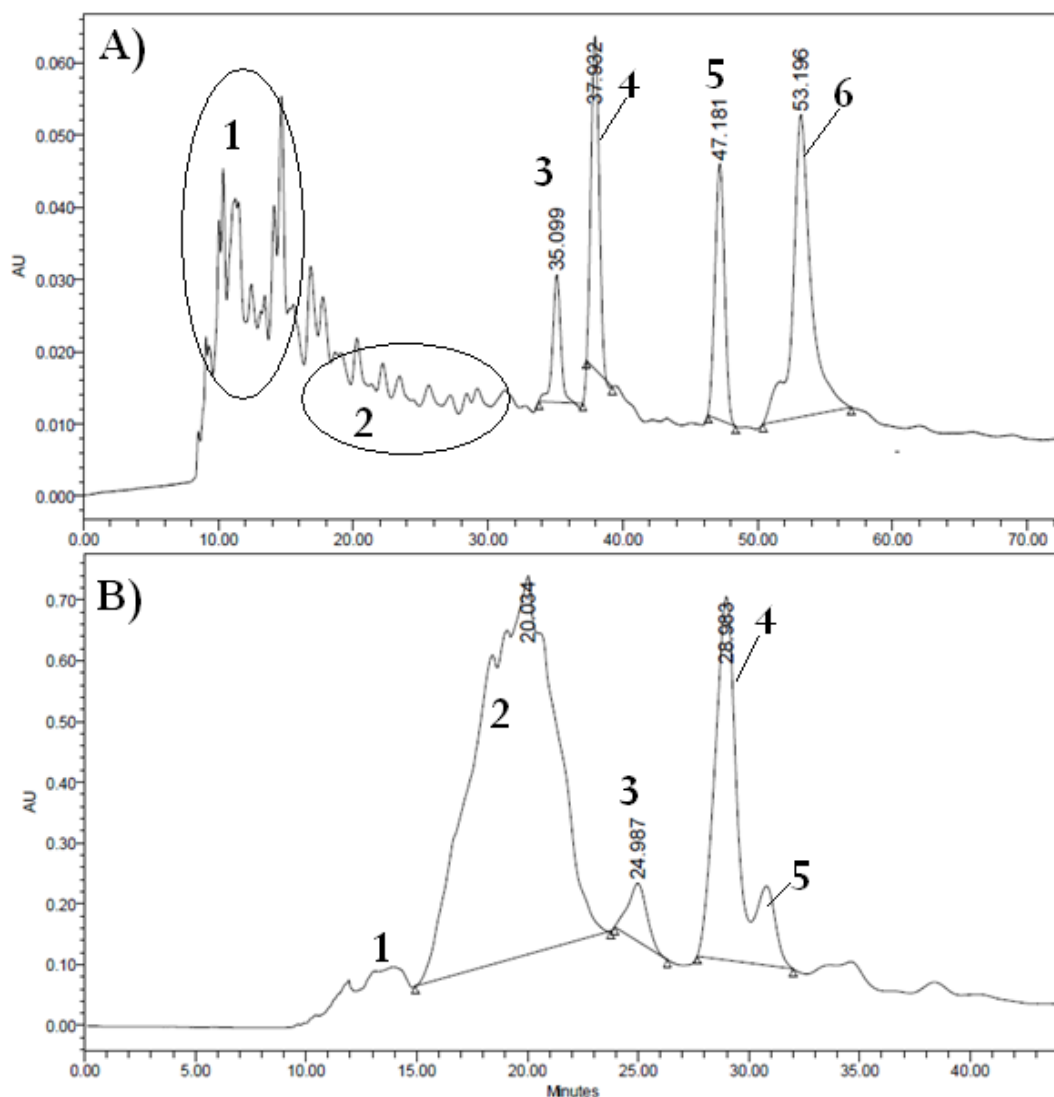
En P4 (figura 10) se encuentran señales para los protones en las posiciones 3-6, 1',2' similares a los reportados para la pectinólida A, debido a que tampoco es un compuesto puro la constante de acoplamiento no puede medirse adecuadamente; P5 (figura 11) cuenta también con estas señales además de las del protón en posición 3'. Ambas subfracciones resultaron citotóxicas.

Las señales presentes en P6 (figura 12) muestran en 7.44 ppm señales con  $J$  de 5.43 Hz similar a los valores del protón en posición 4 para la pectinólida G, en 6.2 ppm hay señales que podrían corresponder al protón en la posición 3 o 1', pero no se observan otras señales para este compuesto. En el caso de P7 (figura 13) no presenta la multiplicidad para el protón en la posición 4 (doble de dobles)



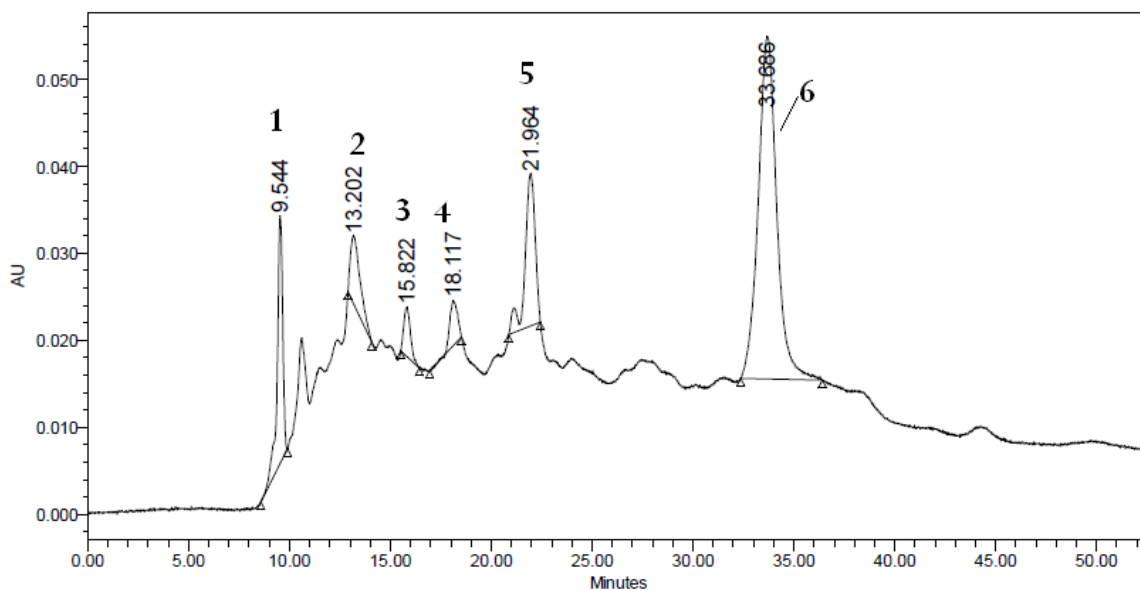
que se presenta en las pectinólidas de la A-E y H; no se muestran otras señales significativas para estos compuestos.

La fracción X se trabajó por cromatografía en columna abierta, la subfracción HP3-6 se escogió para su estudio por CLAR debido a que era la mayoritaria. Se inició con la búsqueda de condiciones cromatográficas en fase reversa, empleando dos diferentes fases (figura 14), obteniendo una recuperación de los compuestos de 44.7% y 52.8% respectivamente.

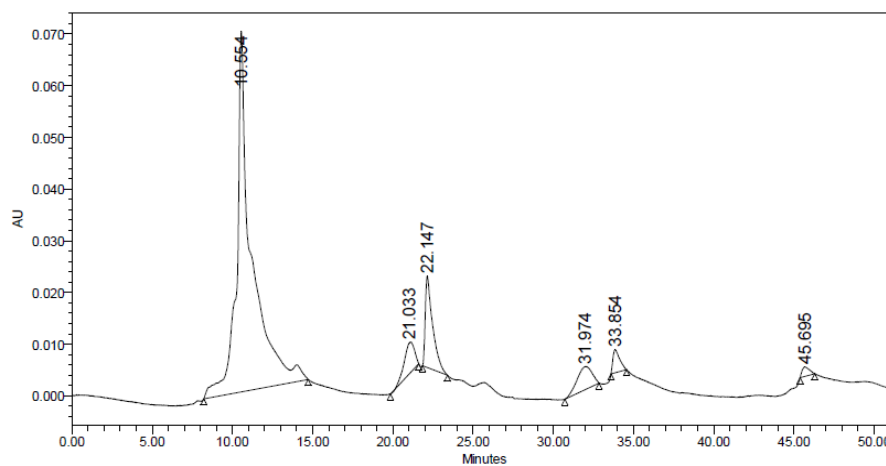


**Figura 14.** Cromatogramas a nivel analítico, observados a 254 nm, de la fracción X en fase reversa. A) metanol/agua 3:2 y B) acetonitrilo/agua 3:2.

El análisis en fase normal permitió un mayor rendimiento, siendo éste de 82.73% (figura 15). Se obtuvieron seis muestras a partir de la fase normal y se seleccionó el Pico 2 para ser purificado por el método de reciclaje (figura 16).



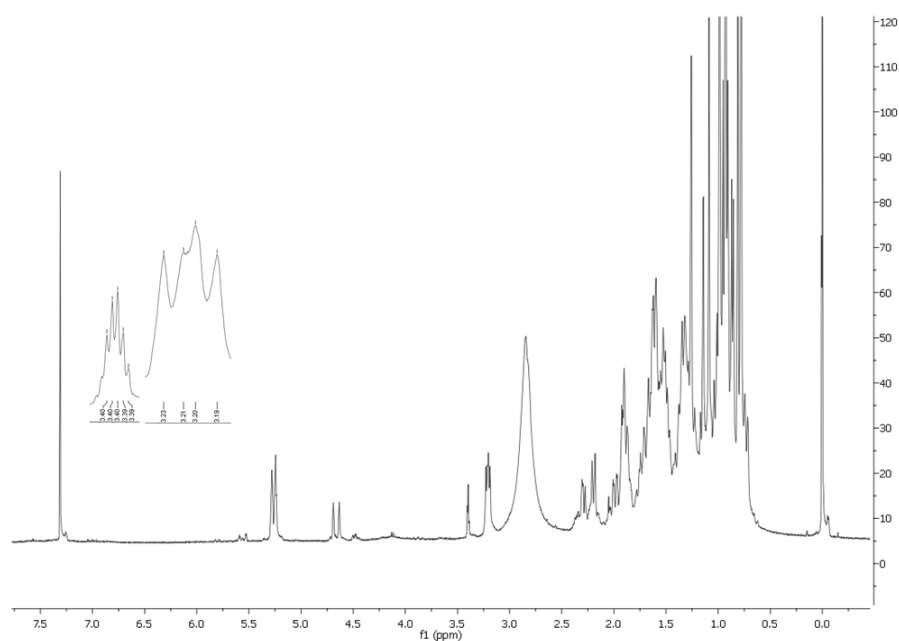
**Figura 15.** Cromatograma a nivel analítico, observado a 254 nm, de la fracción X en fase normal (*n*-hexano/acetato de etilo 7:13).



**Figura 16.** Purificación del Pico 2 mediante la técnica de reciclaje realizada a 322.7 nm.

De la muestra purificada se obtuvieron finalmente 4.7 mg, los cuales a

través de CCF fueron comparados con seis diferentes triterpenos y a partir de esto se observó una elución similar a la del ácido ursólico. La coelución mostró solamente una marca. Sin embargo, al tomar el punto de fusión resultó menor que el del ácido ursólico (221-226°C) que es de 280-286°C (Pereda-Miranda, 1988), el análisis de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  ponen en manifiesto que el Pico 2 purificado correspondía a la mezcla de ácido ursólico (**32**) y ácido oleanólico (**33**). En las figuras 23 y 24 se resaltan las señales reportadas para la mezcla de ácido ursólico y oleanólico.



**Figura 17.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400MHz) de la muestra Pico 2.

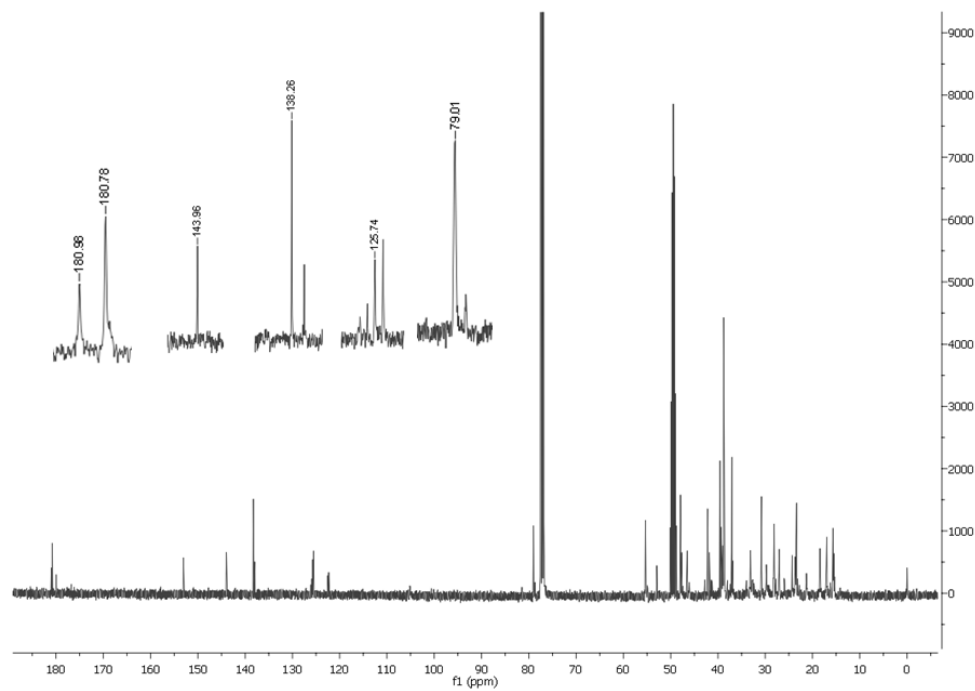
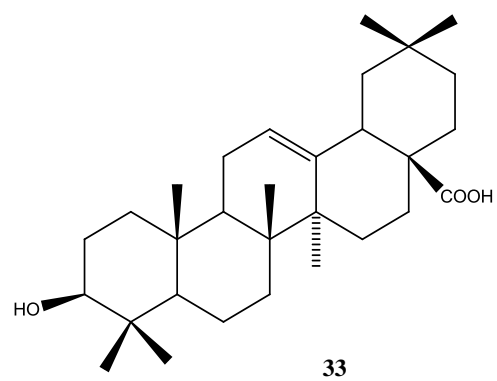
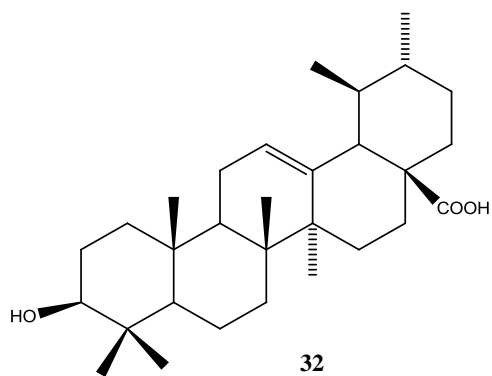


Figura 18. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$  400MHz) de la muestra Pico 2.



---

---

## CONCLUSIONES

El presente trabajo tuvo como interés la búsqueda de compuestos con potencial citotóxico dentro de la planta *Hyptis pectinata*, tras los ensayos biológicos y estudios de Resonancia Magnética Nuclear se observó la presencia de la pectinólida A(16) dentro de la subfracción F2-2, F2-3 y F2-4, así como la presencia de otros compuestos de la misma especie en diversas fracciones aún sin purificar. Se aisló la mezcla de ácido ursólico (**33**) y ácido oleanólico (**34**), triterpenos ya reportados para las especies del género *Hyptis*, los cuales a pesar de no presentar un potencial citotóxico en el estudio realizado, se les ha reportado con propiedades hepatoprotectoras y antiinflamatorias (Liu, 1995).

Con el trabajo realizado se puso de manifiesto la utilidad de los ensayos citotóxicos y las técnicas analíticas como la cromatografía de alta eficiencia y en conjunto con la resonancia magnética nuclear para la identificación de extractos y fracciones activas que conduzcan a la purificación de los principios biodinámicas.

---

---

**BIBLIOGRAFÍA**

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

Aguiar, E. H.; Zoghbi, M.; Silva, M. H. L.; Maia, J. G.; Rojas Amasifén, 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 Torssell, B. G. K. (1991) A lignan and pyrone and other constituents from *Hyptis capitata*. *Phytochemistry* **30**, 2753-2756.

Araújo, E. C. C.; Silveira, E. R.; Lima, M. A. S.; Neto, M. A.; De Andrade, I. L.; Lima, M. A. A. (2003) Insecticidal activity and chemical composition of volatile oils from *Hyptis maritimusii* Benth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**, 3760-3762.

Azevedo, N.; Campos, I.; Ferreira, H.; Portes, T.; Santos, S.; Seraphin, J.; Paula, J.; Ferri, P. (2001) Chemical variability in the essential oil of *Hyptis suaveolens*. *Phytochemistry* **57**, 733-736.

Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, Universidad Nacional Autónoma de México.  
[http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Kabal\\_x\\_nuuk&id=7870](http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Kabal_x_nuuk&id=7870) (Consultada el 7 de Noviembre del 2012).

Bispo, M. D.; Mourão, R. H. V.; Franzotti, E. M.; Bomfim, K. B. R.; Arrigoni-Blank, M. de F.; Moreno, M. P. N.; Marchioro, M.; Antonioli, A. R. (2001) Antinociceptive and antiedematogenic effects of the aqueous extract of *Hyptis pectinata* leaves in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology* **76**, 81-86.

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.

Cadena-Ríos, M. (2008) Estudio químico de *Hyptis brevipes*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 42 p.

Conti, B.; Benelli, G.; Flamini, G.; Cioni, P.L.; Profeti, R.; Ceccarini, L.; Macchia, M.; Canele, A. (2012) Larvicidal and repellent activity of *Hyptis suaveolens* (Lamiaceae) essential oil against the mosquito *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). *Parasitol Research* **110**, 2013-2021.

Cordell, G. A.; Beecher, C. W. W.; Pezzuto, J. M. (1991) Can ethnopharmacology contribute to the development of new anticancer drugs?. *Journal of Ethnopharmacology*, **32**, 117-133.

Delle-Monache, F.; Delle-Monache G.; Gacs-Bait, E.; De Barros, Coelho J. S.; De Albuquerque, Ivan L.; De Andrade Chiappeta, A.; De Mello, J. F. (1990) Umbrosone, an *ortho*-quinone from *Hyptis umbrosa*. *Phytochemistry* (29) 12: 3971-3972.

Deng, Y.; Balunas, M. J.; Kim, J.-A.; Lantvit, D. D.; Chin, Y.-W.; Chai, H.; Sugiarto, S.; Kardono, L.; Fong, H.; Pezzuto, J. M.; Swanson, S. M.; Carcache de Blanco, E. J.; Kinghorn, A. D. (2009) Bioactive 5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrone derivatives from *Hyptis brevipes*. *Journal of Natural products* **72**, 1165-1169.

Domínguez-Vázquez, G.; Berlin, B.; Castro Ramírez, A.E.; Estrada-Lugo, E.J.I. (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.

Drago Serrano, M. E. (2007) Flavonoides recombinantes de relevancia farmacéutica. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* **38** (4): 42-47.

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 spicigerólida, 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.

ITIS report, Integrated Taxonomic Information System.  
[http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=32526](http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=32526) (Consultada 6 de Noviembre 2012).

Kuhnt, M.; Rimpler, H. y Heinrich, M. (1994) Lignans and other compounds from the Mixe indian medicinal plant *Hyptis verticillata*. *Phytochemistry* **36**, 485-489.

Landete, J.M. (2012) Plant and mammalian lignans: A review of source, intaken, metabolism, intestinal bacteria and health. *Food Research International* **46**, 410-424.

Leonti, M. (2011) The future is written: impact of scripts on the cognition, selection, knowledge and trasmission of medicinal plant use and its implications for ethnobotany and ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* **134**, 542-555.



Lisboa, A.; Mello, I.; Nunes, R.; dos Santos, M.; Antonioli, A.; Marçal, R.; Calvacanti, S. (2006) Antinociceptive effect of *Hyptis pectinata* leaves extracts. *Fitoterapia* **77**, 439-442.

Liu, J (1995) Pharmacology of oleanic acid and ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology* **49**, 57-68.

López-Vallejo, F.; Fragoso-Serrano, M.; Suárez-Ortiz, G. A.; Hernández-Rojas, A.; Cerda-García-Rojas, C. M.; Pereda-Miranda, R. (2011) Vicinal  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NMR Coupling constants from density functional theory as reliable tools for stereochemical analysis of highly flexible multichiral center molecules. *The Journal of Organic Chemistry* **76**, 6057-6066.

Martens, S.; Mithöfer, A. (2005) Flavones and flavone synthases. *Phytochemistry* **66**, 2399-2407.

Misra T. N.; Singh R. S.; Upadhyay, J (1983) Triterpenoids from *Hyptis suaveolens* roots. *Phytochemistry* **22** (2), 603-605.

Missouri Botanical Garden. URL:  
<http://www.tropicos.org/Name/17601470?projectid=7> (Consultada el 7 Noviembre 2012).

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.

Ortuño Sánchez, M. F. (2006) Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. *Aiyana Ediciones*, p. 276.

---

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.

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. (1990) 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.

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.

Romo de Vivar, A.; Vidales, P.; Pérez, A. (1991) An aliphatic  $\delta$ -lactone from *Hyptis urticoides*. *Phytochemistry* **30** (7), 2417-2418.

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.; Souza Araújo, A.A.; PensGelain, 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.

Royal Botanic Gardens. URL: [http://www.kew.org/herbarium/keys/lamiales/key/Interactive%20key%20to%20the%20genera%20of%20Lamiaceae/Media/Html/Hyptis\\_Jacq.htm](http://www.kew.org/herbarium/keys/lamiales/key/Interactive%20key%20to%20the%20genera%20of%20Lamiaceae/Media/Html/Hyptis_Jacq.htm) (Consultada el 6 de Noviembre 2012).

STRI Herbarium, Smithsonian Tropical Research Institute. URL: <http://biogeodb.stri.si.edu/herbarium/species/19148/?fam=Lamiaceae> (Consultada el 6 de Noviembre 2012).

Tchoumboungang, F.; Amvam Zollo, P. H.; Fekam Boyom, F.; Nyegue, M. A.; Bessièrè, 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. *Flavor and Fragrance Journal* **20**, 340-343.

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.

Yadav, J. S.; Mandal S. S. (2011) First stereoselective total synthesis of pectinolide A. *Tetrahedron Letters* **52**, 5747-5749.

Yoshida, M.; Matsui, Y.; Ikarashi, Y.; Usui, T.; Osada, H.; Wakasugi, H. **(2007)** Antiproliferating activity of the mitotic inhibitor pironetin against vindesine- and paclitaxel-resistant human small cell lung cancer H69 cells. *Anticancer Research* **27**, 729–736.