UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“AISLAMIENTO DE COMPUESTOS BIOACTIVOS A PARTIR DE *HYPTIS SPICIGERA*”

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

JOSÉ LUIS LEAL LUNA

MEXICO, D.F. 2014.

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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	Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz
Secretario	Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano
1er sup.	Dr. Mario Alberto Figueroa Saldivar
2do sup.	Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda

Sitio donde se desarrollo el tema:

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

Asesor del tema:

_____
Mabel C. Fragoso Serrano

Supervisor técnico:

_____
Rogelio G. Pereda Miranda

Sustentante:

_____
José Luis Leal Luna

“La conquista propia es la más grande de las victorias”

-Platón-

“Hay algo oculto en cada sensación”

-Gustavo Cerati-

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante el periodo de Marzo de 2013 a Febrero de 2014.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (IN212813) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (proyecto 220535) por el financiamiento parcial de esta investigación.

Al Dr. Rogelio Pereda Miranda por haberme aceptado en su equipo de investigación y concederme una beca que no solicité; la cual fue de gran ayuda a lo largo de este proyecto.

A la Dra. Mabel C. Fragoso Serrano por haberme dado la oportunidad de trabajar en el equipo de investigación, por su apoyo, tiempo y dedicación al proyecto.

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

A los miembros del jurado por sus observaciones y aportaciones que contribuyeron a mejorar este escrito.

A mi madre Maricela Luna Prado por todo el apoyo incondicional, gracias por todo.

A mi hermano Héctor Leal Luna por su apoyo y comprensión.

A mi padre Héctor Alejandro Leal Muciño por todo su apoyo.

A todos y cada uno de mis amigos por todas las experiencias, su apoyo y amistad.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN 1
2. ANTECEDENTES 2
2.1. La familia Lamiaceae 3
2.2 Género *Hyptis* 5
2.3 Descripción botánica de la especie *Asterohyptis mociniana* 6
2.4 Descripción botánica de la especie *Hyptis spicigera* 8
3. HIPÓTESIS 10
4. OBJETIVOS 11
5. PARTE EXPERIMENTAL 12
5.1 Instrumental analítico 12
5.2 Técnicas cromatográficas 12
5.2.1 Cromatografía en capa fina (CCF) 12
5.2.2 Cromatografía en columna abierta (CCA) 12
5.2.3 Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) 13
5.3 Material vegetal 13
5.4 Extracción del material vegetal 14
5.5 Fraccionamiento primario de los extractos orgánicos 14
5.6 Fraccionamiento secundario de la fracción de AcOEt de *Asterohyptis mociniana* 16
5.7 Purificación de las fracciones de *A. mociniana* 16
5.7.1 Condiciones utilizadas en CLAE a nivel analítico 17
5.7.2 Condiciones utilizadas en CLAE a nivel preparativo 18
5.8 Fraccionamiento secundario de la fracción de MeOH de *H. spicigera* 18
5.8.1 Purificación de la fracción Hs-VI_{VIII} 19
5.8.1.1 Condiciones utilizadas en CLAE a nivel analítico 19
5.8.1.2 Condiciones utilizadas en CLAE a nivel preparativo 20
5.9 Ensayo de citotoxicidad 21
5.9.1 Líneas celulares 21
5.9.2 Dilución de las muestras 21

5.9.3 Suspensión celular ____ 22
5.9.4 Bioensayo ____ 22
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN ____ 23
6.1 Estudio químico de *Asterohyptis mociniana* ____ 25
6.2 Estudio químico de *Hyptis spicigera* ____ 28
7. CONCLUSIONES ____ 46
8. PERSPECTIVAS ____ 47
9. BIBLIOGRAFÍA ____ 48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de la familia Lamiaceae en México 4

Figura 2. Morfología de la especie *Asterohyptis mociniana* 8

Figura 3. Morfología de la especie *Hyptis spicigera* 9

Figura 4. Cromatograma de la fracción Am-V de *Asterohyptis mociniana* 27

Figura 5. Espectros de RMN ^{1}H obtenidos de las muestras. a) pico A y b) pico B28

Figura 6. Cromatograma de la fracción Hs-VI_{VIII} de *Hyptis spicigera* 33

Figura 7. Cromatograma del reciclaje del pico I de la fracción Hs-VI_{VIII} de *Hyptis spicigera* 33

Figura 8. Espectro de RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) del pico I obtenido por CLAE de la fracción Hs-VI_{VIII} 34

Figura 9. Reciclaje del pico II proveniente de la fracción Hs-VI_{VIII} de *Hyptis spicigera* 35

Figura 10. Espectro de RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) pico I-a obtenido del reciclaje por CLAE del pico II 36

Figura 11. Espectro de RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) del pico I-b obtenido por reciclaje por CLAE del pico II 36

Figura 12. Perfil cromatográfico de la fracción Hs-VI_{VIII} de *Hyptis spicigera* 37

Figura 13. Técnica de reciclaje de 11 ciclos de la fracción Hs-VI_{VIII} 37

Figura 14. a) Espectros de RMN ^{1}H del “pico I-a”, y b) del “pico I-b” 39

Figura 15. Perfiles cromatográficos obtenidos para la fracción Hs-VI_{VIII} (a), fracción Hs-IV (b) y fracción Hs-V (c) 40

Figura 16. Espectros de RMN ^{1}H de los picos (a) I, (b) II, (c) III, (d) IV recolectados por CLAE de la fracción IV, espectros de RMN ^{1}H de los picos (e) I, (f) II, (g) III (h) IV recolectados por CLAE de la fracción V 41

Figura 17. Espectros de RMN ^{1}H del extracto orgánico disuelto en THF (a); en ACN:THF (b); en ACN (c) 42

Figura 18. Perfil cromatográfico de la fracción Hs-VI_{VIII} en fase normal 43

Figura 19. Espectro de RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) obtenido del reciclaje del pico Hs-VI_{VIII} en condiciones analíticas 44

Figura 20. Espectro del RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) obtenido del reciclaje del pico Hs-VI_{VIII} en condiciones analíticas 45

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Usos tradicionales de algunas especies del género *Hyptis* _____ 7

Cuadro 2. Columnas empleadas en el cromatógrafo de líquidos _____ 13

Cuadro 3. Identificación de las especies colectadas _____ 14

Cuadro 4. Material vegetal y disolvente de extracción _____ 14

Cuadro 5. Resultados a partir del fraccionamiento primario de *A. mociniana* e *H. spicigera* _____ 15

Cuadro 6. Fraccionamiento secundario de la fracción de AcOEt de *A. mociniana* _____ 17

Cuadro 7. Fraccionamiento secundario del extracto de *H. spicigera* _____ 20

Cuadro 8. Fraccionamiento terciario de la fracción Hs-VI _____ 21

Cuadro 9. Ensayo de citotoxicidad de los extractos y fracciones de *A. mociniana* e *H. spicigera* empleando HCT15 y MCF7 _____ 25

Cuadro 10. Ensayo de citotoxicidad de las 13 fracciones de *A. mociniana* empleando MCF7 _____ 26

Cuadro 11. Desplazamientos químicos en RMN ^{1}H de las 5,6-dihidro-alfa pironas (1-6) aisladas de *Hyptis spicigera* (400 MHz, $CDCl_3$) _____ 30

Cuadro 12. Desplazamientos químicos δC (ppm) en RMN ^{13}C de las 5,6-dihidro-α-pironas (1-6) aisladas de *Hyptis spicigera* (100 MHz, $CDCl_3$) _____ 31

Cuadro 13. Evaluación de la citotoxicidad del fraccionamiento de la fracción de MeOH de *H. spicigera* _____ 32

Cuadro 14. Actividad citotóxica de las fracciones terciarias de Hs-VI sobre la línea celular HeLa _____ 32

LISTA DE DIAGRAMAS

Diagrama 1. Fraccionamiento primario de *Asterohyptis mociniana* _____ 15

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
CH_2Cl_2	Diclorometano
C-6	Sustitución en el carbón número 6
$CDCl_3$	Cloroformo deuterado
CH_3CO-	Grupo acetato
Cl_{50}	Concentración inhibitoria media
CLAE	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia
CO_2	Dióxido de carbono
δ	Desplazamiento químico
d	Doblete
dd	Doble de doble
ddd	Doble de doble de doble
dddd	Doble de doble de doble de doble
dt	Doblete tripleteado
dc	Doblete cuarteteado
g	Gramos
Hex	Hexano
MHz	Megahertz
MeOH	Metanol
µm	Micrómetros
µg	Microgramos
µL	Microlitros
mg	miligramos
mL	mililitros
mm	milímetros
min	Minutos

nm	nanómetros
-OCH_3	Grupo metoxilo
R*f*	Factor de retención
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN ^{1}H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
RMN ^{13}C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
s	Singulete
THF	Tetrahidrofurano
t_R	Tiempo de retención
UV	Luz ultravioleta

1. INTRODUCCIÓN

México como muchos otros países, cuenta con una amplia y antigua cultura dentro de la medicina tradicional. Por ello, las plantas son un recurso terapéutico por excelencia, su uso en regiones alejadas del país es amplio y a veces la única fuente accesible para tratar diversos problemas de salud; ya que en la mayoría de los casos la medicina alopática es nula o inaccesible. El uso de plantas superiores es común para la elaboración de remedios caseros útiles en el tratamiento de diversas enfermedades tales como cáncer de pulmón, mama, colon y próstata. El descubrimiento de compuestos novedosos a partir de estas fuentes naturales permite la caracterización química de principios biodinámicos con actividad biológica, especificidad en su mecanismo de reacción y por ende de baja o nula toxicidad (Suárez-Ortíz, 2013).

En este contexto, ciencias como la etnofarmacología tienen como objetivo la investigación experimental y la 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). En particular, la evaluación de los extractos provenientes de plantas superiores y microorganismos continúa representando una alternativa para el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos de interés clínico en el tratamiento de enfermedades neoplásicas (Cates, 2004).

Así, las plantas de la familia Lamiaceae se han utilizado en distintas áreas, como la agricultura, la alimenticia (condimentos), cosmética, medicina, entre otras. Las plantas del género *Hyptis* perteneciente a la familia de las labiadas (Lamiaceae), poseen una gran variedad de constituyentes químicos y los usos populares de estas especies son un reflejo de la amplia diversidad en su metabolismo secundario. En particular, *Hyptis spicigera* se conoce con el nombre de la “hierba del burro” en la medicina tradicional mexicana y se utiliza ampliamente en las poblaciones rurales de la costa del Golfo debido a sus

bondades como agente antiséptico para el tratamiento de diversas infecciones cutáneas, como cicatrizante, antiviral y carminativo (Martínez, 1993).

Dentro de los metabolitos secundarios aislados están las 5,6-dihidro-α-pironas que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, particularmente en plantas, hongos y bacterias. Estos compuestos poseen un anillo de δ-lactona-α, β-insaturado sustituido en la posición C-6 con grupos alquilo, alquenilo o arilo y ocasionalmente presenta sustituciones en el núcleo base. Muchos de estos compuestos son biológicamente activos y presentan propiedades fitotóxicas, citotóxicas contra diferentes líneas de células tumorales o antimicrobianas (Collet *et al*., 1998). La actividad biológica de estos compuestos se encuentra asociada al poder alquilante del núcleo δ-lactona-α-β-insaturada (Pereda-Miranda, 1995), siendo esta la unidad estructural análoga al grupo farmacofórico de la pironetina. De igual forma se encuentran los lignanos que incluyen a la podofilotoxina, sustancia conocida como precursor para la semisíntesis de compuestos utilizados como agentes quimioterapéuticos en el tratamiento de la leucemia y cáncer testicular.

En este marco de referencia, el presente proyecto, plantea el estudio químico y biológico de dos géneros de la familia Lamiaceae, *Hyptis* (*Hyptis spicigera y Asterohyptis mociniana*); esperando obtener a los compuestos con actividad citotóxica. La estrategia diseñada incluye el aislamiento, la purificación, la evaluación citotóxica, la identificación y caracterización de las 5,6-dihidro-α-pironas involucradas en las actividades descritas en la literatura.

2. ANTECEDENTES

2.1. La familia Lamiaceae

La familia Lamiaceae se constituye por aproximadamente 224 géneros y 5600 especies. Los integrantes de esta familia se distribuyen en los trópicos, subtrópicos y en las zonas templadas del mundo, abarcando desde el centro de Asia central, China, las islas del Pacífico, África en la zona tropical y América.

En México, esta familia cuenta con más de 512 especies nativas o naturalizadas que representan el 8.11% de la familia, con un endemismo de 65.82% (Martínez-Gordillo et al., 2013), distribuidas en 26 géneros que pertenecen a seis tribus. Hay dos tribus que son las más vastas y diversas, la Menthae con 11 géneros y la Salvieae con 2 géneros; encontrándose la mayoría de ellas en zonas montañosas, tierras bajas tropicales, desiertos y áreas alpinas (Ramamoorthy *et al.*, 1998).

La familia se conoce, desde el punto de vista botánico, con los nombres latinos de Labiatae (por la presencia de labios en sus flores) o Lamiaceae (por el nombre del género tipo de esta familia, *Lamium*). 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 característico. En la industria farmacéutica, los aceites de las labiadas se utilizan principalmente para preparar formulaciones orales y también se emplean como principios activos en formulaciones antisépticas tópicas, antibacteriana, antivirales, antifúngica, nematicidas, carminativa y espasmolítica (Facey *et al.*, 2005; Oliva *et al.*, 2007).

Dos materias primas con gran auge económico obtenidas a partir de las labiadas son la hierbabuena (*Mentha spigata* L) y la menta (*Mentha piperitha* L), usadas como agentes de sabor en goma de mascar e higiene dental. Otros usos que se les ha dado es el cultivo como plantas ornamentales o como hierbas de uso culinario, entre las más conocidas están las que pertenecen a los géneros *Lavandula, Mentha, Origanum, Rosmarinum y Thymus*.

Los miembros de esta familia son principalmente plantas herbáceas y arbustos, dentro de la familia no se conocen epifitas, saprofitas o parasitas. Sus tallos son tetrangulares, con hojas simples, opuestas y con decusadas sin estípulas. Con frecuencia están cubiertas de pelos y glándulas que emiten fragancia. El cáliz esta fusionado en forma de campana o de cono, algunas veces bilabiadas; con pétalos fusionados en pentámeros; 4 ó 2 epipétalos, ya sea iguales o de dos longitudes, ovario súpero de dos carpelos fusionados, los cuales forman cuatro lóculos distintos cada uno con un lóbulo basal. Usualmente el 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, 2002).

La familia Lamiaceae tiene una gran diversidad en México (Figura 1), se distribuye en zonas templadas, aunque hay géneros como el *Hyptis* y el *Asterohyptis* que se encuentran localizados en zonas secas y calientes.

Figura 1. Distribución de la familia Lamiaceae en México

2.2 Género *Hyptis*

Este género tiene un gran número de especies usadas dentro de la medicina tradicional mexicana, como remedios caseros, para tratar afecciones 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). Algunos usos etnofarmacológicos se encuentran enlistados en el Cuadro 1. Las plantas de este género son herbáceas con hojas opuestas cruzadas y hojas enteras, las flores son pequeñas, agrupadas en inflorescencias axilares, hermafroditas, pentámeros, fuertemente zygomorfas y bilabiadas (Bispo *et al*., 2001).

En el siglo XVI, el médico Francisco Hernández (1514-1587) durante su estadía en México redacto el manuscrito "*Historia Plantarum Novoae Hispanae*", el cual contiene la historia natural, costumbres y medicinas nativas de aquella época. En dicho manuscrito se menciona a la especie "huitsiquia" o "xoxouhcapatli" para un tratamiento medicinal efectivo contra la disentería y tumores. Esto demuestra que el aprendizaje viene desde antiguas civilizaciones y gracias al trabajo de grupos multidisciplinarios que incluyen taxónomos y etnobotánicos han permitido identificar y clasificar a esta planta medicinal como miembro del género *Hyptis* (Aladrén, 1993).

Las especies representativas del género son arbustos o sufrútices por lo general ginodioicos, débilmente aromáticos; tiene tallos muy ramosos, las ramillas son delgadas, divaricado ascendente. Hojas simples, lanceoladas a ovadas, membranáceas; con peciolos cortos. Inflorescencias tirsoides, generalmente axilares, cimas densas en panículas ramificadas, con glomérulos moniliformes o en espigas cilíndricas; brácteas persistentes, inconspicuas, setaceas lineales; bractéolas similares a las brácteas. Flores con pedicelos cortos; cáliz actinomorfo, 5-lobado, lóbulos más o menos iguales, subulados, rígidos, erectos, o levemente recurvados; tubo campanulado, cilíndrico en la madurez, 10-nervado, glabro o hirsuto; corola zigomorfa, ligeramente bilabiada, blanca, 5-lobada, lóbulos subredondos, subiguales, tubo cilíndrico en la parte superior amplia, interior

hirtelo, labio inferior con el lóbulo medio levemente cóncavo, entero; estambres 4, didínamos, ligeramente exertos, filamentos cortos; estilo ligeramente exerto; estigma bífido, lóbulos estigmáticos cortos, levemente planos. Núculas ovoides, ligeramente comprimidas, rugulosas.

2.3 Descripción botánica de la especie *Asterohyptis mociniana*

Del latín *aster,* estrella e *Hyptis,* por el cáliz, con los lóbulos con forma de una estrella, lo cual es un carácter usado para distinguir al género, además de la corola bilabiada con lóbulo medio del labio inferior cóncavo (Figura 2). Se considera de origen tropical y está constituido por 4 especies distribuidas de México a Costa Rica. En México se encuentran las 4 especies, 2 de las cuales son endémicas.

Arbusto delgado de hasta 3 metros de alto, su tallo es erecto o con frecuencia las ramas son recurvadas cubiertas de pelillos; las hojas son opuestas, pecioladas, ovadas a angostamente ovadas, de 2 a 8 cm de largo y de 1 a 4 cm de ancho, con forma puntiaguda, de base redondeada a más o menos truncada, el margen con dientes irregulares, cubierta abundantemente de pelillos. Inflorescencias compuestas de pequeñas flores formando espigas discontinuas a casi continuas; cáliz actinoformo de 2 a 4.5 mm de largo, se divide en 5 dientes en forma de espinas próximo al ápice, la corola insconspicuamente bilabiada es de color blanco. Los frutos son pequeñas nuecesillas ovoides y sin pelos de 1 mm de largo, su superficie es rugosa y están cubiertas por el cáliz persistente.

Cuadro 1. Usos tradicionales de algunas especies del género Hyptis

País	Subespecie	Uso
África	*H. pectinata*	Agente antibacteriano y antifúngico (Malan *et. al*., 1989).
	H. verticillata	Control de fiebre y resfriados (Almtorp *et. al*., 1991).
	H. spicigera	Condimento de alimentos. Repelente de mosquitos al quemar la planta completa (Kini *et. al*., 1993).
Argentina	*H. mutabilis*	Las hojas son usadas contra parásitos intestinales. La raíz se emplea para detener la menstruación excesiva. Estimulación del apetito en combinación con otras plantas (Villavicencio-González, 1993).
Brasil	*H. mutabilis*	Las hojas frescas son usadas como té en la reparación de las mucosas del útero, gastritis, úlceras gástricas, infecciones de la piel y conjuntivitis (Barbosa y Barbosa, 1992).
China	*H. capitata*	Se usa para tratar resfriados y la fiebre (Lee *et. al*., 1988; Almtorp *et. al*., 1991).
Colombia	*H. capitata*	Se utiliza como hemostático y en la curación de heridas (Villavicencio-González, 1991).
	H. mutabilis	La infusión de las hojas y flores se usa contra dolores estomacales y flatulencias. Paludismo (Villavicencio-González, 1991).
Costa Rica	*H. capitata*	Infusión de las hojas se usa como carminativo. Tópicamente en el dolor de muelas (Almtorp *et. al*., 1991).
Cuba	*H. suaveolens*	Estimulante y carminativo (Palsson, 1999).
Ecuador	*H. capitata*	Enfermedades fúngicas (Almtorp et. al., 1991).
El Salvador	*H. capitata*	Enfermedades gastrointestinales, infecciones de la piel, fiebre intermitente e hinchazón de piernas (Lee et. al., 1988).
India	*H. suaveolens*	Té hecho de raíces se usa como aperitivo por sus propiedades estomacales (Misra *et. al*., 1981; Mukherjee *et. al*., 1984).
México	*H. albida*	Problemas gastrointestinales, repelente de insectos; por sus propiedades antisépticas, infecciones del oído y dolores reumáticos (Rojas & Pereda, 1992; Novelo& Pereda, 1993; Pereda-Miranda, 1990).
	H. mutabilis	Trastornos gastrointestinales y malaria (Pereda-Miranda, 1988).
	H. pectinata	Infecciones de la piel, nasofaringitis, congestión

		pulmonar y trastornos gastrointestinales (Rojas *et al.*, 1992; Novelo *et al.*, 1993; Pereda-Miranda, 1993).
	H. suaveolens	Curar afecciones intestinales, estreñimiento y bilis (Martínez, 1993).
	H. spicigera	La planta completa sirve como insecticida en cosechas. Las infusiones se usan en infecciones de la piel y como cicatrizante.
	H. verticillata	Reumatismo e infecciones de la piel; hirviendo toda la planta y frotando sobre ella. Expectorante e infecciones gastrointestinales (Rojas *et al.*, 1992; Novelo *et al.*, 1993).
Venezuela	*H. capitata*	Remedio contra la insolación (Lee *et. al*., 1988).
Tailandia	*H. capitata*	Resfriados, fiebre y asma (Lee *et al*., 1988; Almtorp *et. al*., 1991).

Figura 2. Morfología de la especie *Asterohyptis mociniana*

2.4 Descripción botánica de la especie *Hyptis spicigera*

Del griego *Hypo*, abajo, con relación a la posición del labio inferior de la corola. En México se distribuye principalmente en las partes tropicales del sur y a lo largo de ambas costas. Es un género con 280 especies americanas con mayor diversidad en Brasil (Harley *et al.*, 2004).

La especie *H. spicigera* es una hierba anual o perenne, arbusto o pequeño árbol; globros o con tricomas simples o estrellados; tallos erectos o postrados, ramificados. Hojas simples, ovadas a lanceoladas, rombi-lanceoladas o lanceoladas lineares, tiene margen generalmente dentado; con peciolo presente en general. Inflorescencias torsoides, axilares, en cimas laxas o congestionadas, pedunculadas o sésiles; brácteas conspicuas o insconpicuas, en el primer caso, ovadas o lanceoladas, a veces formando un involucro. Flores pediceladas o sésiles; cáliz actinomorfo, campanulado, infundibuliforme o tubular, 5-dentado, acrescente en el fruto; corola zigomorfa, bilabiada, tubular, con labio superior erguido, emarginado o bilobado, el inferior es deflexo, trilobado, el lóbulo central es reflexo, generalmente cuculiforme; con 4 estambres didínamos, unidos en el tubo de la corola a diferentes alturas, exertos, declinados con filamentos libres; estilo ginobásico, estilopodio presente o ausente, estigma bífido con lóbulos estigmáticos glabros. Núculas ovoides a oblongas lisas o rugosas (Figura 3).

Se utiliza principalmente en la agricultura para evitar la infestación por insectos de los granos almacenados. Un estudio de una variedad mexicana de la especie *Hyptis spicigera* demostró propiedades insecticidas las cuales fueron atribuidas a la presencia de diterpenos de tipo labdano. Adicionalmente, estudios recientes del aceite esencial de esta especie demostraron su eficacia en el tratamiento de la úlcera gástrica.

Figura 3. Morfología de la especie *Hyptis spicigera*

3. HIPÓTESIS

Considerando 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, por lo cual, el estudio químico biodirigido, empleando el bioensayo de citotoxicidad sobre líneas celulares derivadas de carcinomas humanos, de las especies *Hyptis spicigera* y *Asterohyptis mociniana*; permitirá realizar la detección y el aislamiento de los compuestos responsables de la actividad biológica.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo general del proyecto en cuestión; fue llevar a cabo el aislamiento, la purificación y la elucidación estructural de las moléculas responsables de la actividad citotóxica de las especies *Hyptis spicigera* y *Asterohyptis mociniana*; con la finalidad de contribuir al descubrimiento de nuevas moléculas citotóxicas.

Objetivos específicos

- Preparar el extracto de cloroformo y de acetona de *Hyptis spicigera* y *Asterohyptis mociniana* respectivamente.

- Fraccionar los extractos orgánicos por cromatografía en columna abierta.

- Determinar la citotoxicidad, a partir de ensayos con líneas celulares derivadas de carcinomas humanos.

- Obtener los perfiles cromatográficos de las fracciones activas empleando a la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE).

- Realizar la purificación en compuestos individuales presentes en las fracciones activas por medio de la técnica de corte de núcleo y reciclaje a nivel preparativo.

- Establecer la estructura molecular de los compuestos aislados y purificados por medio de la técnica de resonancia magnética nuclear.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Instrumental analítico

Los espectros de resonancia magnética nuclear fueron adquiridos en la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química. Los espectros de RMN protónica (^{1}H, 400 MHz) y carbono 13 (^{13}C, 100 MHz) se generaron en los equipos Varian, modelos VNMRS y MR. Se utilizó $CDCl_3$ como disolvente. Los desplazamientos químicos (δ) se expresaron en partes por millón (ppm), usando como referencia la señal del tetrametilsilano (TMS).

5.2 Técnicas cromatográficas

Se emplearon tres diferentes técnicas para la separación y el aislamiento de los compuestos de interés:

5.2.1 Cromatografía en capa fina (CCF)

Esta técnica se realizó en placas de aluminio recubiertas con gel sílice 60 F_{254} de marca Merck; para la detección de los compuestos se utilizó una lámpara de luz UV a las longitudes de onda (254 y 365 nm) respectivamente. Como agente cromógeno se empleó sulfato cérico y calentamiento para su revelado.

5.2.2 Cromatografía en columna abierta (CCA)

Esta técnica se empleó para llevar a cabo el fraccionamiento de los extractos, empleando gel de sílice 60 Merck (con un tamaño de partícula de 0.063-0.200 mm) como fase estacionaria y como fase móvil utilizaron mezclas de Hexano-CH_2Cl_2-Acetona-MeOH en orden creciente de polaridad.

5.2.3 Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE)

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia se usó para realizar la separación de los constituyentes activos presentes en los extractos analizados. Para poder llevar a cabo dicha separación, se encontraron las condiciones analíticas óptimas para obtener una buena resolución y una mayor definición de los picos; empleando fase reversa y normal. Las columnas empleadas se enlistan en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Columnas empleadas en el cromatógrafo de líquidos

Reversa	*Waters Symmetry C18 analítica*	Tamaño de partícula 5 µm Dimensiones 4.6 x 250 mm
	Waters Symmetry C18 preparativa	Tamaño de partícula 7 µm Dimensiones 19 x 300 mm
Normal	Waters µPorasil Sílica analítica	Tamaño de partícula 10 µm Dimensiones 3.9 x 300 mm
	ISCO Sílica preparativa	Tamaño de partícula 10 µm Dimensiones 21.2 x 250 mm

Se utilizó un equipo cromatográfico marca Waters (Millipore Corporation, Waters Chromatography Division Milford, MA, EE.UU.) equipado con una bomba (modelo 600E) y un detector UV de arreglo de diodos Waters 2996 integrados a un equipo de cómputo de marca Dell, con el sistema operativo del programa de ejecución y análisis de muestras Empower v.2.

5.3 Material vegetal

Para el desarrollo de esta investigación se utilizaron hojas, tallos y flores de dos diferentes géneros (*A. mociniana.* e *H. spicigera*). La identificación y recolección del material vegetal se realizó por la bióloga Adriana Hernández Rojas y un ejemplar fue depositado en el herbario del instituto de Ecología, Xalapa, Veracruz-México. En el caso de *A. mociniana* las colectas se realizaron en distintos sitios (Cuadro 3).

Cuadro 3. Identificación de las especies colectadas

# voucher	Especie	Fecha	Lugar de colecta
XAL000**1393**	*Asterohyptis mociniana*	20/01/2013	Carretera Federal Xalapa-Veracruz No 140
XAL000**1396**	*Asterohyptis mociniana*	05/01/2013	Otates, Actopan
XAL000**1398**	*Asterohyptis mociniana*	20/12/2012	Camino a Xoltepec
XAL000**1402**	*Hyptis spicigera*	13/11/2011	Dos ríos, Emiliano Zapata

5.4 Extracción del material vegetal

El material vegetal se dejó secar mediante exposición al aire libre a temperatura ambiente; una vez seco se pulverizó en un molino de cuchillas modelo Wiley 4, se obtuvo el material vegetal seco y molido de las cuatro colectas; se sometió a una maceración exhaustiva con diclorometano o acetona (cinco extracciones cada tres o cinco días entre cada extracción). Después de cada extracción, los macerados se filtraron y concentraron a sequedad a presión reducida. De esta manera, se obtuvieron los extractos correspondientes con el peso indicado en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Material vegetal y disolvente de extracción

# Voucher	Material vegetal	Disolvente	Extracto
XAL0001393	1063 g	Acetona	20.7 g
XAL0001396	1175 g	Acetona	19.0 g
XAL0001398	1757 g	Diclorometano	33.8 g
XAL0001402	4518 g	Diclorometano	276.0 g

5.5 Fraccionamiento primario de los extractos orgánicos

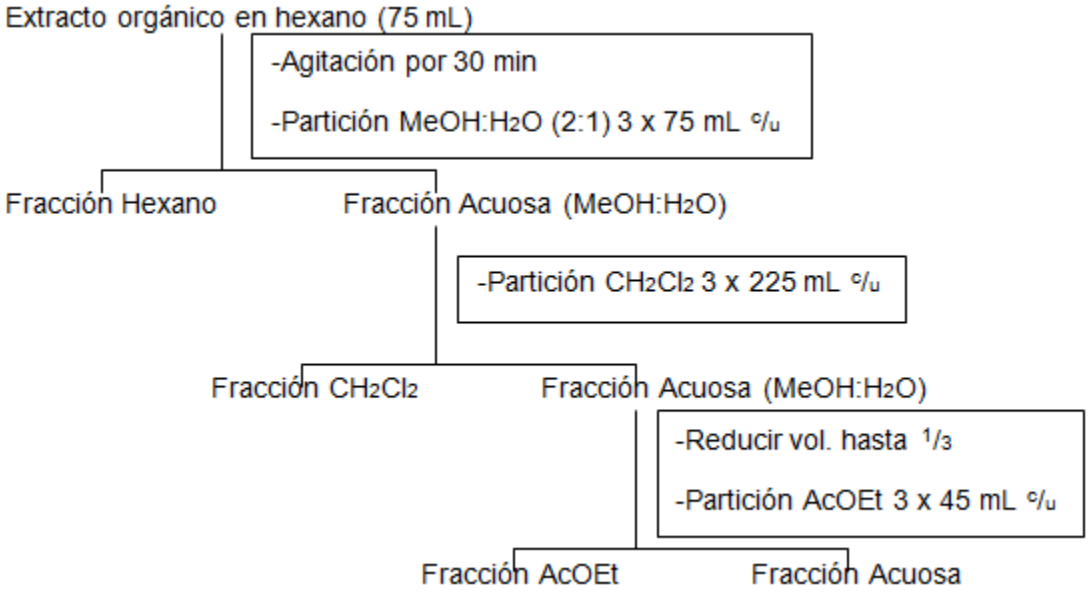
Los extractos obtenidos a partir de *Asterohyptis mociniana,* se fraccionaron mediante particiones orgánicas sucesivas (Diagrama 1), obteniéndose 4 fracciones primarias (Cuadro 5), cuyo análisis mediante CCF, RMN ^{1}H y

evaluación de citotoxicidad, permitió seleccionar la fracción de AcOEt para continuar con su estudio químico.

Cuadro 5. Resultados a partir del fraccionamiento primario de *A. mociniana* e *H. spicigera*

# Voucher	Hexano	Cloruro de metileno	Acetato de etilo	Metanol
XAL0001393	0.92 g	1.51 g	0.03 g	0.18 g
XAL0001396	3.4 g	0.82 g	0.51 g	0.19 g
XAL0001398	4. 4 g	1.24 g	0.08 g	0.09 g
XAL0001402	-	117.13 g	-	-

Diagrama 1. Fraccionamiento primario de *Asterohyptis mociniana*



La mitad del extracto obtenido a partir de *Hyptis spicigera* (138 g) se sometió a un tratamiento preliminar que permitiera la eliminación de triterpenos y ácidos grasos, el cual consistió en adicionar 50 mL de MeOH por cada gramo de extracto, dejando reposar una noche a 0°C, en seguida se filtró y se concentró la muestra a la mitad de su volumen original, y el proceso se repitió una vez más

para asegurar la precipitación total de los compuestos insolubles, de esta forma, se obtuvieron 117.13 g de extracto.

5.6 Fraccionamiento secundario de la fracción de AcOEt de *Asterohyptis mociniana*

La fracción de acetato de etilo del lote XAL0001396 (0.51 g) se sometió a un segundo fraccionamiento en columna abierta de gel de sílice (15 g). El proceso de elución se inició con hexano y posteriormente se utilizó un gradiente entre hexano-CH_2Cl_2, CH_2Cl_2-Acetona, CH_2Cl_2-MeOH para finalizar con MeOH, eluyendo un total de 152 eluatos de 20 mL cada uno, los cuales se analizaron mediante CCF para reunir a los eluatos tomando en cuenta la homogeneidad cromatográfica (R*f*) de sus constituyentes. De esta forma, se obtuvieron 13 conjuntos de fracciones combinadas (**Am-I** – **Am-XIII**). El Cuadro 6 resume este fraccionamiento secundario.

5.7 Purificación de las fracciones de *A. mociniana*

Para llevar a cabo la purificación de las fracciones secundarias Am-IV y Am-V (Cuadro 6) se encontraron las condiciones óptimas a nivel analítico utilizando a la cromatografía de líquidos de alta eficiencia en fase reversa.

Cuadro 6. Fraccionamiento secundario de la fracción de AcOEt de *A. mociniana*

Fase móvil	Proporción (%)	Número de fracción	Fracciones combinadas	Clave
Hexano	100	F1	-	-
Hexano : CH_2Cl_2	70 : 30	F2 – F11	F1 – F13	Am-I
	50 : 50	F12 – F21	F14 – F21	Am-II
	30 : 70	F22 – F31	F22 – F33	Am-III
CH_2Cl_2	100	F32 – F41	F34 – F41	Am-IV
CH_2Cl_2 : Acetona	95 : 5	F42 – F51	F42 – F51	Am-V
	90 : 10	F52 – F61	F52 – F63	Am-VI
	85 : 15	F62 – F71	F64 – F82	Am-VII
	80 : 20	F72 – F81	F83 – F92	Am-VIII
	70 : 30	F82 – F91	F93	Am-IX
	50 : 50	F92 – F101	F94 – F102	Am-X
	30 : 70	F102 – F111	F103 – F119	Am-XI
Acetona	100	F112 – F121	F120	Am-XII
Acetona : MeOH	70 : 30	F122 – 131	-	-
	50 : 50	F132 – F141	-	-
	30 : 70	F142 – 151	-	-
MeOH	100	F152	F121 – F152	Am-XIII

5.7.1 Condiciones utilizadas en CLAE a nivel analítico

Fase estacionaria: Symmetry C_{18} Waters (4.6 x 250 mm, 5 µm)

Fase móvil: Acetonitrilo : H_2O (1 : 1)

Flujo: 0.2 mL/min

Detector: Arreglo de diodos 254 nm

Volumen de inyección: 20 µL

Modo de elución: Isocrático

Para realizar el escalamiento de flujo a nivel preparativo se utilizó la siguiente fórmula:

$$Fp = Fa\left(\frac{Lp}{La}\right)\left(\frac{dp^2}{da^2}\right)$$

***Fp**: Flujo a nivel preparativo*

***Fa**: Flujo a nivel analítico*

***Lp**: Longitud columna preparativa*

***La**: Longitud columna analítica*

***dp**: Diámetro interno de la columna preparativa*

***da**: Diámetro interno de la columna analítica*

5.7.2 Condiciones utilizadas en CLAE a nivel preparativo

Fase estacionaria: Symmetry C_{18} Waters (19 x 300 mm, 7 µm)

Fase móvil: Acetonitrilo : H_2O (1 : 1)

Flujo: 4.2 mL/min

Detector: Arreglo de diodos 254 nm

Volumen de inyección: 500 µL

Modo de elución: Isocrático

5.8 Fraccionamiento secundario de la fracción de MeOH de *H. spicigera*

Se realizó un fraccionamiento de la fracción de MeOH (117.13 g) proveniente del extracto orgánico total de *Hyptis spicigera*, mediante una columna abierta (150 g de gel de sílice); generándose 75 eluatos de 500 mL, estos se combinaron por medio del análisis en CCF (R*f*) obteniéndose 12 fracciones (**Hs–I** a **Hs–XII**) (Cuadro 7). De este procedimiento, se seleccionaron las fracciones **Hs–IV** (5.26 g), **Hs–V** (5.23 g), **Hs–VI** (5.23 g) y **Hs–VIII** (5.15 g) por presentar la mejor actividad citotóxica y se analizaron en RMN ^{1}H para detectar las señales características de las 5,6-dihidro-alfa-pironas.

La fracción secundaria **Hs-VI** (5.2 g) se sometió a un tercer fraccionamiento en columna abierta de gel de sílice (200 g). Este procedimiento permitió colectar

un total de 319 eluatos de 20 mL. El análisis mediante CCF permitió obtener 10 fracciones (**Hs – VI_I** a **Hs – VI_X**) (Cuadro 8).

De acuerdo con los resultados obtenidos a partir de los análisis por CCF, pruebas de citotoxicidad y análisis de RMN (^1H) se decidió trabajar con la fracción **Hs-VI_{VIII}** (1.10 g, Cuadro 8).

5.8.1 Purificación de la fracción Hs-VI_{VIII}

5.8.1.1 Condiciones utilizadas en CLAE a nivel analítico

Fase estacionaria: µPorasil sílica Waters (3.9 x 300 mm, 10 µm)
Fase móvil: Hexano : Acetato de etilo (3 : 2)
Flujo: 0.49 mL/min
Detector: Arreglo de diodos 254 nm
Volumen de inyección: 20 µL
Modo de elución: Isocrático

Cuadro 7. Fraccionamiento secundario del extracto de *H. spicigera*

Fase	Proporción (%)	Número de fracción	Fracciones combinadas	Clave
Hexano	100	F1	F1 – F3	Hs-I
Hexano : CH_2Cl_2	70 : 30	F2 – F4	F4 – F9	Hs-II
	50 : 50	F5 – F10	-	-
	30 : 70	F11 – F12	F4 – F19	Hs-III
CH_2Cl_2	100	F13 – F20	F20 – F21	Hs-IV
CH_2Cl_2 : Acetona	95 : 5	F21 – F23	F22 – F25	Hs-V
	90 : 10	F24 – F26	-	-
	85: 5	F27 – F29	F26 – F31	Hs-VI
	80 : 20	F30 – F32	F32 – F34	Hs-VII
	75 : 25	F33 – F35	-	-
	70 : 30	F36 – F40	F35 – F42	Hs-VIII
	65 : 35	F41 – F43	-	-
	60 : 40	F44 – F46	-	-
	55 : 45	F47 – F50	F43 – F54	Hs-IX
	50 : 50	F51 – F53	-	-
	45 : 55	F54 – F57	-	-
	40 : 60	F58 – F61	F55 – F62	Hs-X
	30 : 70	F62 – F65	-	-
	20 : 80	F66 – F68	F63 – F69	Hs-XI
	10 : 90	F69 – F73	-	-
Acetona	100	F74	-	-
MeOH	100	F75	F70 – F75	Hs-XII

Para realizar el escalamiento a nivel preparativo se utilizó la fórmula indicada en la sección 5.7.1

5.8.1.2 Condiciones utilizadas en CLAE a nivel preparativo.

Fase estacionaria: Sílica ISCO (21.2 x 250 mm, 10 µm)

Fase móvil: Hexano : Acetato de etilo (3 : 2)

Flujo: 9.0 mL/min

Detector: Arreglo de diodos 254 nm

Volumen de inyección: 500 µL

Modo de elución: Isocrático

Cuadro 8. Fraccionamiento terciario de la fracción Hs-VI

Fase	Proporción (%)	Número de fracciones	Fracciones combinadas	Clave
Hexano	100	F1	-	-
Hexano : AcOEt	90 : 10	F2 – F19	F1 – F13	Hs-VI_{I}
	80 : 20	F20 – F39	F14 – F37	Hs-VI_{II}
	70 : 30	F40 – F59	F38 – F60	Hs-VI_{III}
	60 : 40	F60 – F79	-	-
	50: 50	F80 – F99	-	-
	40 : 60	F100 – F119	F61 – F105	Hs-VI_{IV}
	30 : 70	F120 – F139	-	-
	25 : 75	F140 – F159	-	-
	20 : 80	F160 – F179	-	-
	15 : 85	F180 – F199	F106 – F214	Hs-VI_{V}
	10 : 90	F200 – F219	F215 – F229	Hs-VI_{VI}
	5 : 95	F220 – F239	F230 – F236	Hs-VI_{VII}
AcOEt	100	F240 – F259	F237 – F254	Hs-VI_{VIII}
AcOEt : MeOH	75 : 25	F260 – F279	-	-
	50 :50	F280 – F299	-	-
	25 : 75	F300 – F318	F255 – F317	Hs-VI_{IX}
MeOH	100	F319	F318 – F319	Hs-VI_{X}

5.9 Ensayo de citotoxicidad

5.9.1 Líneas celulares

Se utilizaron cuatro líneas celulares derivadas de cáncer humano: Carcinoma de mama (**MCF7**), carcinoma de colon (**HCT15**), carcinoma de próstata (**PC3**) y carcinoma de cérvix (**HeLa**). Dichas líneas se conservaron en medio RMPI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino. Todas las líneas se cultivaron a 37°C en una atmósfera de CO_2 al 5% en aire y 100% de humedad relativa.

5.9.2 Dilución de las muestras

El ensayo se llevó a cabo en microplacas de 96 pozos con una capacidad de 250 µL cada uno y se realizó utilizando células en fase logarítmica. Las muestras se aplicaron por triplicado en distintas concentraciones (20 y 2 µg/mL), que se prepararon a partir de la dilución del extracto en DMSO (4 mg de extracto/1 mL de dimetilsulfóxido); para ello 25 µL de la dilución del extracto en DMSO se

depositaron en un primer pocillo con 175 µL de agua destilada, se mezcló y se tomó una alícuota de 40 µL de ese primer pocillo y se adicionaron en un segundo pocillo con 160 µL de DMSO al 10%.

5.9.3 Suspensión celular

Una vez que se tienen las células en fase logarítmica de crecimiento, se realizó un cambio de medio 24 hrs antes del ensayo, el día del ensayo se decantó el medio, se lavó dos veces con 5 mL de PBS (Buffer salino de fosfatos) y se agregaron 0.3 mL de tripsina para despegar las células de la caja de crecimiento; se incubaron por 5 minutos y se monitorearon al microscopio hasta que se despegaron por completo, se adicionó 1 a 2 mL de medio y se homogenizó hasta que las células estuvieron dispersas. En seguida, se realizó el conteo en cámara de Neubauer, se diluyeron para tener una suspensión de células de aproximadamente 10^4 células. De esta suspensión se utilizaron 190 µL para adicionar a cada pozo de la caja con diluciones de las muestras a evaluar, el control positivo y el control negativo.

5.9.4 Bioensayo

Las cajas se incubaron durante 72 h a 37°C en atmósfera de 100% humedad y 5% de CO_2, transcurrido el tiempo de incubación se hizo la fijación celular por medio de la adición de 100 µL de ácido tricloroacético (TCA), incubando por 30 minutos en refrigeración, se decanto el TCA y se lavó por tres ocasiones con agua corriente, se dejó secar la microplaca en su totalidad; se hizo una tinción con 100 µL de sulforodamida B a temperatura ambiente por 30 minutos. Se elimina el exceso de colorante lavando con ácido acético al 1%, se dejó secar. Posteriormente, para poder realizar la lectura, se adicionaron 200 µL de TRIS (tris-hidrometil-aminometano) y se agitaron por 5 minutos; el TRIS solubiliza el color impregnado en las células que crecieron en la microplaca dando la oportunidad de realizar la lectura de densidad óptica al espectrofotómetro a una longitud de onda de 564 nm. Los resultados obtenidos se expresan como la concentración que inhibe el 50% del control de crecimiento después del periodo de

incubación (CI_{50}). Los valores fueron estimados a partir de una curva semilogarítmica de la concentración del fármaco (µg/mL) contra el porcentaje de inhibición de crecimiento. La vinblastina se utilizó como un control positivo (Skehan *et al*., 1999).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inicialmente, se obtuvieron los extractos orgánicos totales de las especies *A. mociniana* e *H. spicigera* con acetona y diclorometano, respectivamente. Se procedió a realizar un fraccionamiento primario del extracto proveniente de *A. mociniana*, siguiendo la metodología indicada en el Diagrama 1 (ver sección experimental, apartado 5.5) para generar fracciones de hexano, CH_2Cl_2, acetona y AcOEt. El extracto orgánico total de *H. spicigera* (Cuadro 4) se dividió en dos porciones iguales y una de ellas se sometió al procedimiento de la eliminación de triterpenos con metanol en frío (ver sección experimental, apartado 5.5). Para evaluar el potencial citotóxico de los extractos y fracciones, se realizaron ensayos de evaluación biológica. Los protocolos para la evaluación del potencial citotóxico de extractos vegetales y fracciones, consideran como una actividad significativa aquellos valores de concentración inhibitoria media (CI_{50}) menores a 20 µg/mL (Cordell *et al*., 1991). En el Cuadro 9 se presentan los porcentajes de inhibición de los diferentes extractos a 20 y 2 µg/mL, remarcando los que demostraron un porcentaje de crecimiento menor al 60 %, es decir, deben tener valores de CI_{50} alrededor de 20 µg/mL.

Cuadro 9. Ensayo de citotoxicidad de los extractos y fracciones de *A. mociniana* e *H. spicigera* empleando HCT15[1] y MCF7[1]

Muestra[2]	Concentración (µg/mL)	% inhibición HCT15[1]	Muestra[2]	Concentración (µg/mL)	% inhibición MCF7[1]
OH	20	68.59	**OH**	20	100.0
	2	100.0		2	100.0
OC	20	57.16	**OC**	20	57.01
	2	100.0		2	100.0
OA	20	100.0	**OA**	20	100.0
	2	100.0		2	100.0
CH	20	100.0	**CH**	20	100.0
	2	100.0		2	100.0
CC	20	32.89	**CC**	20	55.86
	2	100.0		2	100.0
CA	20	100.0	**CA**	20	100.0
	2	100.0		2	100.0
XH	20	100.0	**XH**	20	100.0
	2	100.0		2	100.0
XC	20	24.47	**XC**	20	55.03
	2	100.0		2	100.0
XA	20	100.0	**XA**	20	100.0
	2	100.0		2	100.0
HM	20	100.0	**HM**	20	100.0
	2	100.0		2	100.0

[1]HCT15, carcinoma de colon; MCF7, carcinoma de mama. [2]Claves: ***Asterohyptis mociniana***: **OH**: colecta Otates fracción de hexano, **OC**: colecta Otates fracción de diclorometano, **OA**: colecta Otates fracción de acetato de etilo, **CH**: colecta Cerro gordo fracción de hexano, **CC**: colecta Cerro gordo fracción de diclorometano, **CA**: colecta Cerro gordo fracción de acetato de etilo, **XH**: colecta Xoltepec fracción de hexano, **XC**: colecta Xoltepec fracción de diclorometano, **XA**: colecta Xoltepec fracción de acetato de etilo, ***Hyptis spicigera:*** **HM:** fracción de metanol.

6.1 Estudio químico de *Asterohyptis mociniana*

El fraccionamiento del extracto de acetona de *Asterohyptis mociniana* permitió obtener 13 fracciones (Cuadro 6, sección experimental). Estas fracciones se evaluaron sobre la línea celular de carcinoma de mama (MCF-7). Los resultados se enlistan en el Cuadro 10, evidenciando que la fracción Am-V tiene el mayor porcentaje de inhibición, además de presentar una absorción característica al ser revelada con luz UV y sulfato cérico en cromatografía en capa fina.

Cuadro 10. Ensayo de citotoxicidad de las 13 fracciones de *A. mociniana* empleando MCF7

Fracción	Concentración (µg/mL)	% inhibición	Fracción	Concentración (µg/mL)	% inhibición
Am-I	20	63.33	**Am-VIII**	20	181.53
	2	98.87		2	256.35
Am-II	20	89.04	**Am-IX**	20	60.67
	2	110.21		2	100.00
Am-III	20	66.73	**Am-X**	20	116.31
	2	103.40		2	160.43
Am-IV	20	125.90	**Am-XI**	20	146.04
	2	166.19		2	150.84
Am-V	20	-88.97	**Am-XII**	20	147.96
	2	103.84		2	209.35
Am-VI	20	29.98	**Am-XIII**	20	140.29
	2	113.43		2	273.62
Am-VII	20	71.22			
	2	131.65			

La purificación de la fracción Am-V se hizo por medio de la técnica de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE). El primer paso fue encontrar las condiciones óptimas para la obtención de los perfiles cromatográficos de las muestras. Se trabajó en fase normal. Una vez encontradas las mejores condiciones de separación, se realizó el escalamiento a nivel preparativo, lo que permitió la obtención de dos picos principales A (t_R= 21.2 min, 5.7 mg) y B (t_R= 36.3 min, 7.6 mg) (Figura 4).

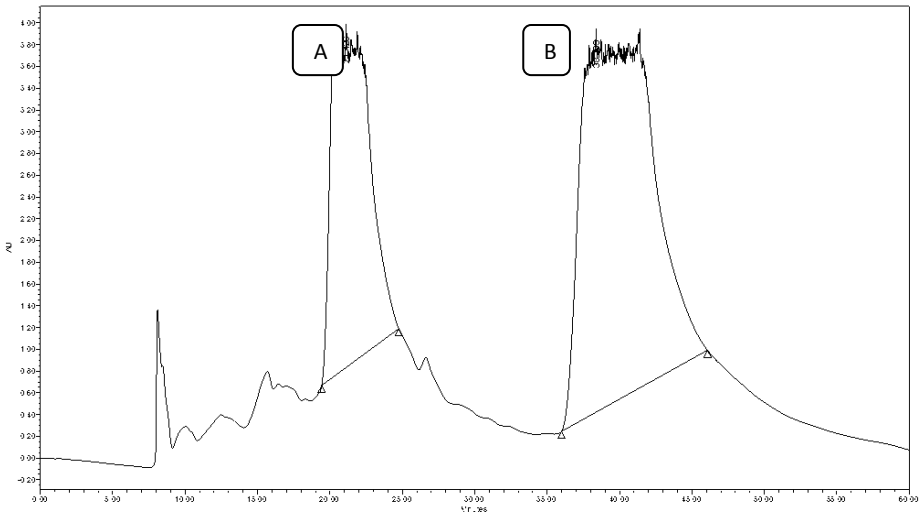
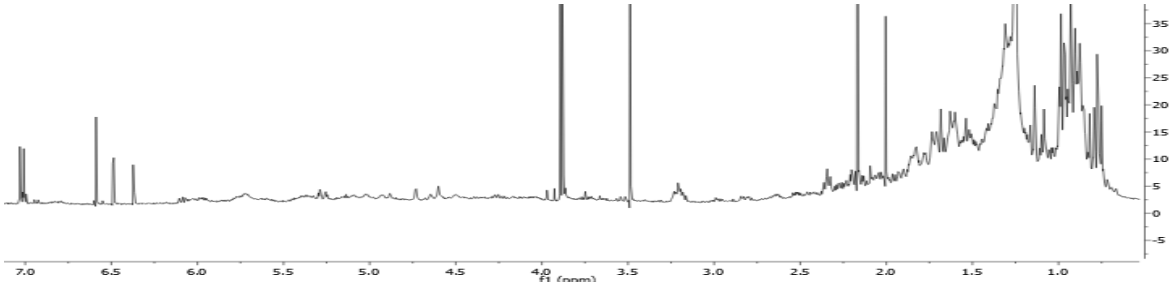


Figura 4. Cromatograma de la fracción Am-V de *Asterohyptis mociniana*
Condiciones cromatográficas: columna de fase normal Sílica (21.2 x 250 mm, 10µm); detector: arreglo de diodos (254 nm); fase móvil: Hex:AcOEt 3:2; flujo de elución: 3.2 mL/min; volumen de inyección: 500 µL; cantidad inyectada: 30 mg.

Los picos A y B colectados de la fracción Am-V fueron analizados por RMN ^{1}H y los resultados obtenidos permitieron establecer que estos compuestos no pertenecen al grupo de las 5,6,-dihidro-α-pironas (Figura 5).

Del extracto de acetona no se logró aislar e identificar ningún compuesto de interés debido a que los rendimientos obtenidos durante las etapas de aislamiento y purificación fueron pequeños.

a) Pico A



b) Pico B

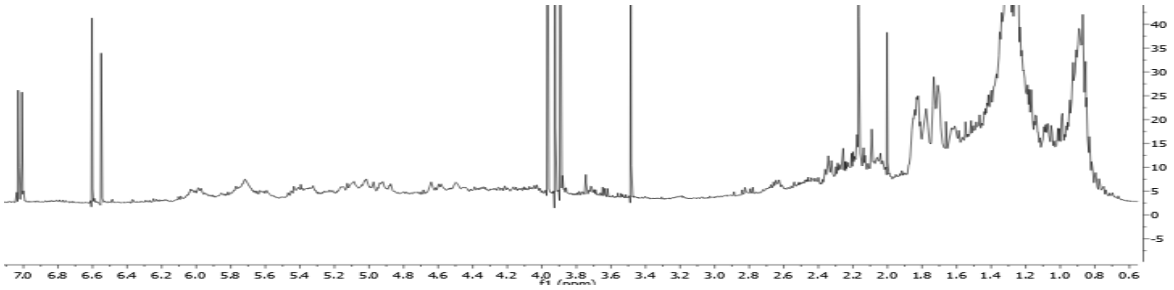
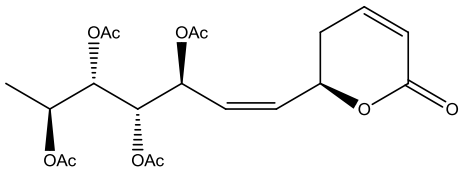


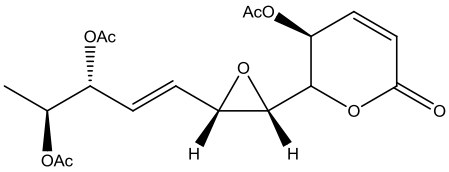
Figura 5. Espectros de RMN ^{1}H obtenidos de las muestras. a) pico A y b) pico B

6.2 Estudio químico de *Hyptis spicigera*

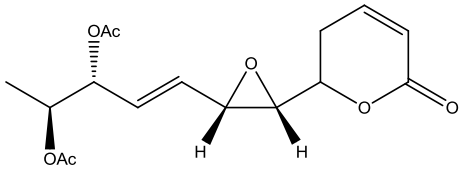
La evaluación de la fracción de MeOH obtenida a partir del extracto orgánico que se obtuvo de la eliminación de triterpenos no presentó una actividad citotóxica; sin embargo, se decidió realizar el fraccionamiento secundario para realizar la búsqueda de compuestos novedosos, además, esta especie ha sido estudiada previamente por nuestro grupo de investigación, obteniéndose hasta el momento los compuestos **1** (Fragoso-Serrano, 2000), **2**, **3**, **4** (Suárez-Ortíz, 2013), **5** y **6** (Juárez González, 2014). En los Cuadros 11 y 12 se presentan los valores de ^{1}H y ^{13}C que confirmaron su identificación.



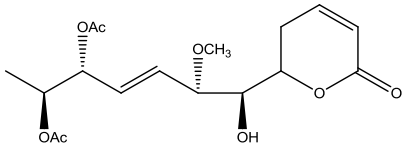
espicigerólida (**1**)



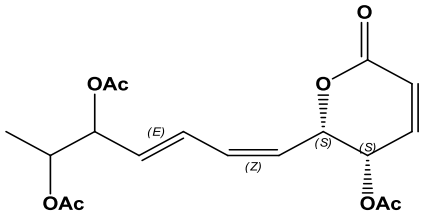
5’-epiolguina (**2**)



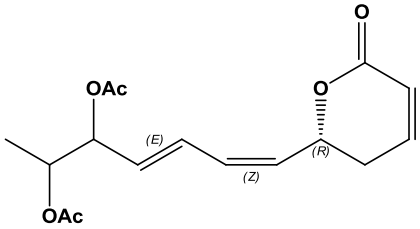
5-desacetoxi-5’-epiolguina (**3**)



R-[5*R*,6*S*-(diacetiloxi)-l*R*-(hidroxi)-2*R*-(metoxi)-3*E*-heptenil]-5,6-dihidro-2*H*-piran-2-ona (**4**)



dieno I (**5**)



dieno II (**6**)

Cuadro 11. Desplazamientos químicos en RMN ^{1}H de las 5,6-dihidro-alfa pironas (1-6) aisladas de *Hyptis spicigera* (400 MHz, $CDCl_3$)[a]

Posición	1	2	3	4	5	6
3	6.06 ddd (9.7, 2.5, 1.3)	5.22 d (9.7)	6.07 dd (9.7, 1.4)	6.04 dt (9.7, 2.5)	6.24 d (9.81)	6.08 dc (9.82, 1.46)
4	6.90 ddd (9.7, 5.2, 2.5)	7.08 dd (9.7, 5.7)	6.94 ddd (10.5, 5.3, 3.5)	6.95 ddd (9.8, 5.6)	6.98 dd (9.80, 5.42)	6.91 ddd (9.82, 5.42, 3.22)
5	2.35 dddd (18.5, 11, 2.5, 2.5) 2.52 dddd (18.5, 5.2, 4.5,1.3)	5.27 dd (5.7, 2.9)	2.6 m		5.26 dd (5.42, 3.22)	2.43 m
6	5.35 dddd (11, 9.5, 4.5, 1)	4.18 dd (8.3, 2.9)	4.18 ddd (8.2, 7.8, 6.0)	4.49 ddd (10.7, 7.8, 5.1)	5.45 dd (3.23, 8.65,)	5.35 ddd (9.81, 6.59, 1.31)
1'	5.79 ddd (10.5, 9.5, 1)	3.49 dd (8.4,4.0)	3.32 dd (8.2, 4.1)	3.65 dt (7.8, 2.7)	5.64 dd (8.79, 10.84)	5.64 dd (9.64, 10.98)
2'	5.49 dddd (10.5, 9, 1, 1)	3.68 dd (4.3, 4.0)	3.60 dd (5.2, 4.2)	4.01 dd (4.3, 2.6)	6.27 dd (10.84, 11.14)	6.18 dd (10.84, 11.43)
3'	5.41 dd (9, 9)	5.78 dd (15.6, 4.3)	5.78 dd (15.8, 5.2)	5.79 dd (16, 4)	6.51 dd (11.28, 15.09)	6.51 dd (11.28, 15.23)
4'	5.37 ddd (9, 2, 1)	5.86 dd (15.6, 5.7)	5.87 dd (15.8, 6.3)	5.79 (16,4)	5.79 dd (15.09, 7.18)	5.76 dd (15.09, 7.18)
5'	5.30 dd (8.5, 2)	5.33 dd (5.7, 3.6)	5.35 dd (6.3, 4.1)	5.34 dt (3.7, 1.8)	5.43 dd (7.18, 3.81)	5.45 ddd (7.18, 3.37, 1.2)
6'	4.96 dc (8.5, 6.2)	5.06 dc (6.3, 3.6)	5.07 dc (6.4, 4.1)	5.10 dc (6.6, 3.7)	5.08 dd (3.52, 6.60)	5.07 dc (6.59, 3.37)
7'	1.19 d (6.2)	1.16 d (6.3)	1.19 d (6.4)	1.20 d (6.6)	1.21 d (6.59)	1.20 d (6.59)
CH_3CO-	2.12 s 2.12 s 2.04 s 2.03 s	2.02 s 2.07 s 2.13 s	2.04 s 2.08 s	2.04 s 2.08 s	2.08 s 2.10 s 2.05 s	2.10 s 2.05 s
OCH_3				3.32 s		

[a]δ_H en ppm (*J* en Hz), s = singulete, d = doblete, t = triplete, c = cuarteto, q = quintuplete, m = multiplete

Cuadro 12. Desplazamientos químicos δC (ppm) en RMN ^{13}C de las 5,6-dihidro-α-pironas (1-6) aisladas de *Hyptis spicigera* (100 MHz, $CDCl_3$)

Posición	1	2	3	4	5	6
2	163.7	161.3	162.5	163.5	162.2	164.0
3	121.5	125	121.6	121.1	124.7	121.9
4	144.8	140.5	144.3	145.4	140.7	144.8
5	29.2	62.7	27.2	25.8	63.8	29.9
6	73.7	74.8	73.7	76.4	74.5	74.0
1'	132.8	54.5	57.9	74.6	123.6	128.8
2'	128.6	55.6	56.0	78.6	132.9	131.4
3'	66.3	126.9	127.3	128.9	128.0	128.4
4'	69.2	130.7	130.4	131.3	131.3	130.6
5'	71.0	74.3	74.1	74.7	74.6	74.8
6'	66.9	70.3	70.2	70.3	70.4	70.7
7'	16.6	15.4	15.2	15.3	15.1	15.2
$\underline{CH_3}CO$-	21.0	21.2	21.1	21.3	20.5	21.3
	21.0	21.1	20.9	20.8	21.1	21.4
	20.9	20.6	21.1		21.0	
	20.7		20.9			
$CH_3\underline{CO}$-	170	170.4	170.3		170.0	170.6
	169.9	170.0	169.9		170.4	170.3
	169.9	169.8			169.9	
	169.8					
$\underline{C}H_3O$-				55.4		

El estudio químico por CCA de *Hypis spicigera* permitió obtener 12 fracciones primarias; las cuales se evaluaron empleando dos líneas celulares derivadas de carcinomas humanos. Enseguida, las fracciones más activas (Cuadro 13) fueron analizadas por RMN ^1H y estos análisis en conjunto permitieron seleccionar a la fracción Hs-VI (5.23 g).

La fracción Hs-VI fue recromatografíada por CCA obteniéndose 10 fracciones (Cuadro 8, sección experimental 5.8.1.2) de las cuales se decidió trabajar con la fracción Hs-VI_{VIII} (1.10 g), basándose en los resultados obtenidos en la CCF, los ensayos de citotoxicidad (Cuadro 14) y los estudios de RMN ^1H, cabe destacar que los análisis por CCF y RMN permitieron establecer además de algunas señales características del núcleo de 5,6-dihidro-α-pirona, la presencia de metabolitos relacionados mas polares e inicialmente se procedió a la obtención de los perfiles cromatográficos en condiciones analíticas. Las primeras condiciones

empleadas fueron en fase reversa utilizando acetonitrilo:agua como fase móvil en una proporción 8:2. En la Figura 6 se observa el cromatograma correspondiente.

Cuadro 13. Evaluación de la citotoxicidad del fraccionamiento de la fracción de MeOH de *H. spicigera*

Fracción	CI_{50} (µg/mL) HeLa	[1]MCF_7
Hs-I	9.9	> 20
Hs-II	12.23	> 20
Hs-III	9.42	11.2
Hs-IV	10.74	11.35
Hs-V	8.79	7.95
Hs-VI	8.16	5.77
Hs-VII	15.43	14.07
Hs-VIII	14.14	16.25
Hs-IX	19.68	> 20
Hs-X	> 20	> 20
Hs-XI	> 20	> 20
Hs-XII	> 20	> 20

Cuadro 14. Actividad citotóxica de las fracciones terciarias de Hs-VI sobre la línea celular HeLa

Fracción	Concentración (µg/mL)	% inhibición [2]HeLa
$Hs\text{-}VI_{I}$	2	67.39
	20	100.0
$Hs\text{-}VI_{II}$	2	87.2
	20	100.0
$Hs\text{-}VI_{III}$	2	83.14
	20	100.0
$Hs\text{-}VI_{IV}$	2	0.40
	20	94.60
$Hs\text{-}VI_{V}$	2	-19.17
	20	77.27
$Hs\text{-}VI_{VI}$	2	-21.22
	20	53.97
$Hs\text{-}VI_{VII}$	2	-20.48
	20	47.26
$Hs\text{-}VI_{VIII}$	2	-20.48
	20	37.11
$Hs\text{-}VI_{IX}$	2	88.82
	20	100.0
$Hs\text{-}VI_{X}$	2	-
	20	-

[1]MCF-7, carcinoma de mama, [2]HeLa, carcinoma de cérvix

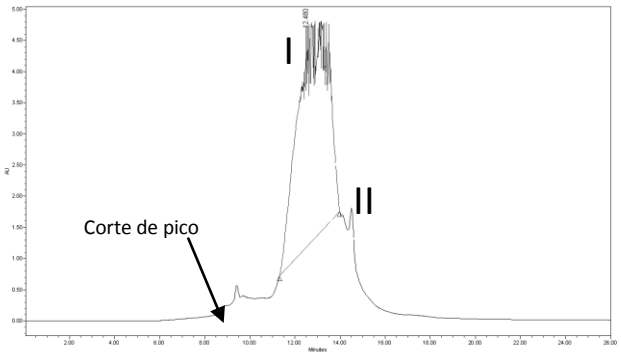


Figura 6. Cromatograma de la fracción Hs-VI_{VIII} de *Hyptis spicigera*
Condiciones cromatográficas: columna de fase reversa Symmetry C_{18} (4.6 x 250 mm, 5 µm); detector: arreglo de diodos (254 nm); fase móvil: ACN:H_2O 8:2; flujo de elución: 0.2 mL/min; volumen de inyección: 20 µL; cantidad inyectada: 1 mg.

Enseguida se realizó un escalamiento a nivel preparativo de la fracción Hs-VI_{VIII}, mediante la técnica de "rasurado y reciclaje", inyectando de manera sucesiva el pico I (Figura 7) (Pereda-Miranda y Hernández-Carlos, 2002).

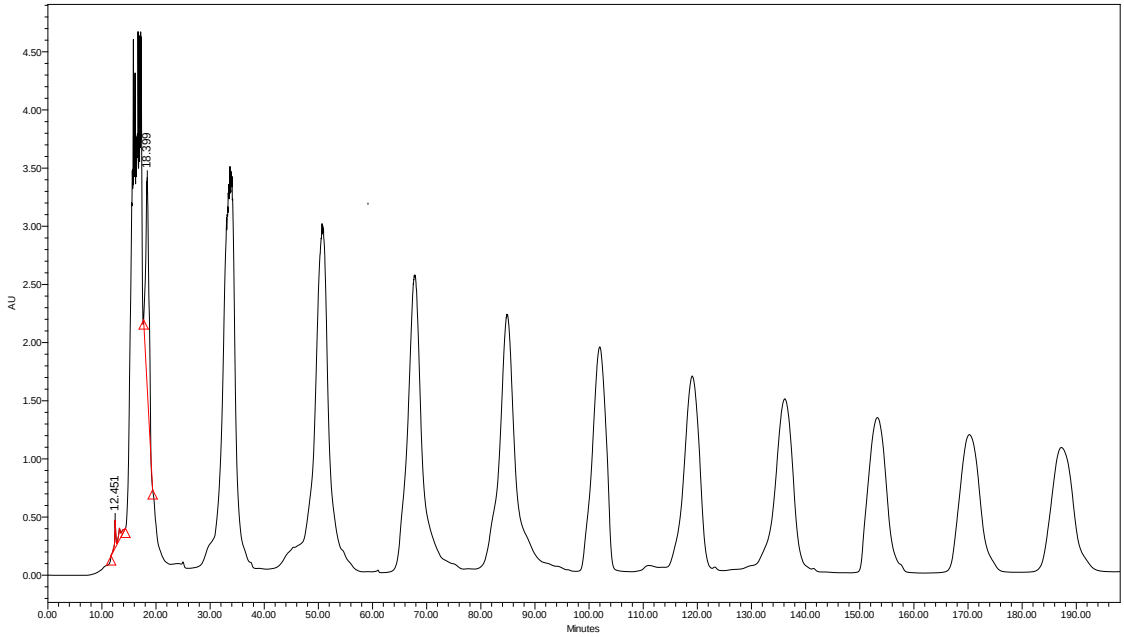


Figura 7. Cromatograma del reciclaje del pico I de la fracción Hs-VI_{VIII} de *Hyptis spicigera*
Condiciones cromatográficas: columna de fase reversa Symmetry C_{18} (19 x 300 mm, 7 µm); detector: arreglo de diodos (254 nm); fase móvil: ACN : H_2O 8:2; flujo de elución: 4.2 mL/min; volumen de inyección: 500 µL; cantidad inyectada: 30 mg.

El análisis por RMN ^{1}H (Figura 8) del pico I (16.9 mg), permitió establecer que en la muestra estudiada se encontraba más de una 5,6-dihidro-α-pirona.

El pico II fue reinyectado utilizando las mismas condiciones indicadas en la Figura 7, esto con el propósito de saber si dicho pico se desdoblaba esperando obtener algún compuesto puro de interés. En el cromatograma de la Figura 9 se observa que después del reciclado se obtienen dos productos; pico I-a y pico I-b, los cuales son residuos del pico I. Se observa que en el primer ciclo hay residuos del pico I, conforme pasa el reciclaje en el quinto ciclo se observa una pronunciación en la parte posterior del pico; mientras que en el ciclo seis se ve claramente el desdoble de dicho pico. Para el pico II se decidió colectar el desdoblamiento en una sola fracción; ya que al variar el valor de longitud de onda en el detector de arreglo de diodos, se observó que se encontraba en baja proporción, y los desdoblamientos del pico I se colectaron de manera individual. Los picos I-a (2.2 mg) y I-b (4.4 mg) se analizaron mediante RMN ^{1}H.

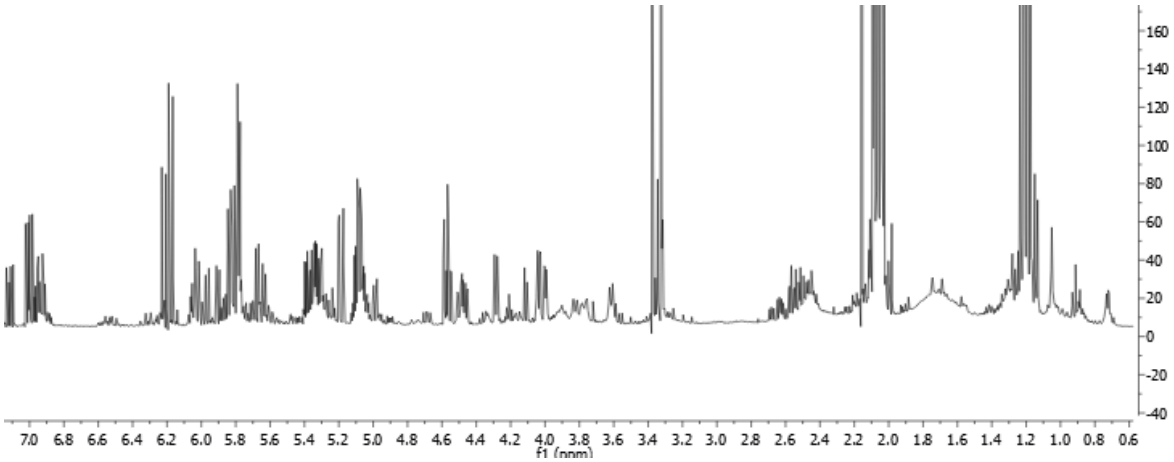


Figura 8. Espectro de RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) del pico I obtenido por CLAE de la fracción Hs-VI_{VIII}

El pico I-a muestra la presencia de 5,6-dihidro-α-pironas (Figura 10); sin embargo, una de ellas está en mayor proporción; esto demuestra que no se logró su purificación.

El pico I-b al igual que el pico I-a muestra la presencia de 5,6-dihidro-α-pironas; solamente que en esta fracción la proporción de las pironas es minoritaria a pesar de que la cantidad es mayor (Figura 11), por lo tanto la baja cantidad obtenida no permitió seguir adelante con el aislamiento a partir de esta fracción.

Los espectros obtenidos de los análisis de RMN ^{1}H y el bajo rendimiento en estas condiciones impidieron llevar a cabo una purificación en cantidades suficientes por ello se decidió variar la proporción en la fase móvil para obtener las condiciones óptimas para el aislamiento y la purificación de los compuestos de interés. En la Figura 12 se encuentra el cromatograma obtenido a partir del cambio en las condiciones cromatográficas de análisis en la fase móvil.

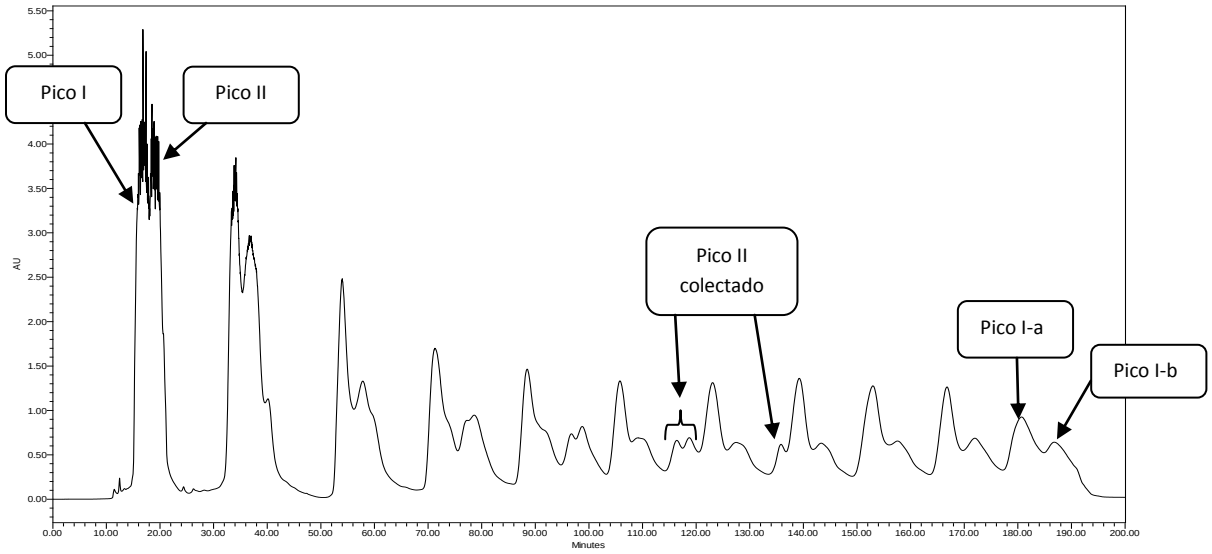


Figura 9. Reciclaje del pico II proveniente de la fracción Hs-VI_{VIII} de *Hyptis spicigera*

Las condiciones empleadas se indican en la Figura 7.

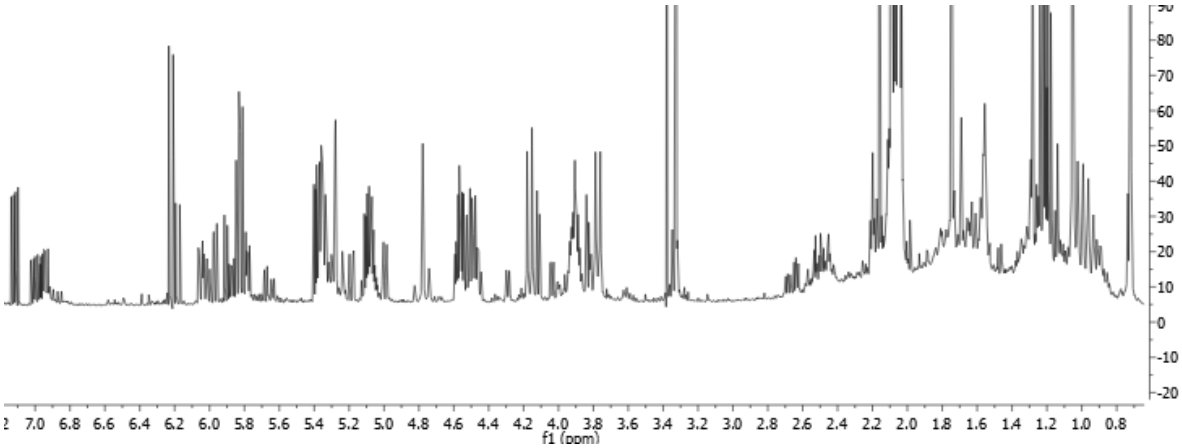


Figura 10. Espectro de RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) pico I-a obtenido del reciclaje por CLAE del pico II

Al comparar el cromatograma de la Figura 12 y la Figura 6 se puede observar que son prácticamente iguales, la variación que hay entre ambos cromatogramas son los tiempos de retención y la separación de los picos I y II se encuentra mejor definida. El pico I de la Figura 6 tiene un tiempo de retención de 12.4 min y en la Figura 12 de 18.3 min, aunque hay una variación de 6 minutos en los tiempos de retención al comparar los cromatogramas no hay presencia de algún pico nuevo que nos diera la pauta de pensar en una disociación de los compuestos; de esta forma, se ajustó la fase móvil una vez más hasta una proporción de ACN : H_2O 1:1 (Figura 13).

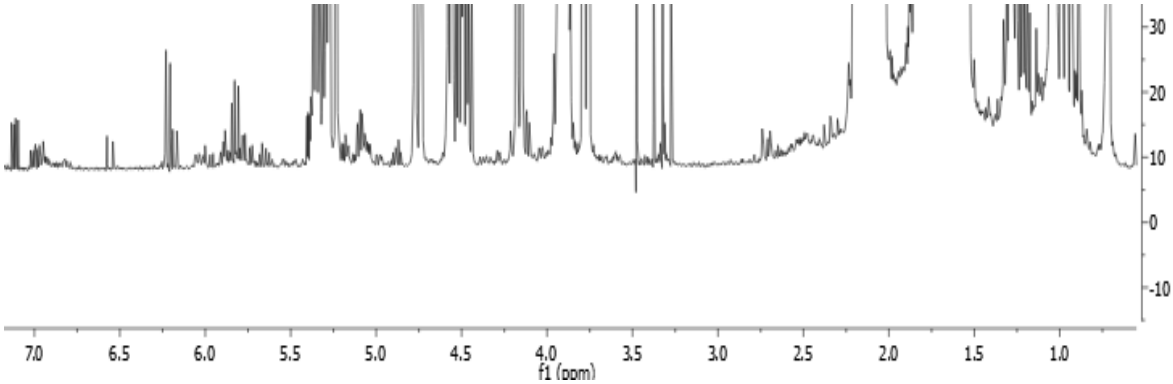


Figura 11. Espectro de RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) del pico I-b obtenido por reciclaje por CLAE del pico II

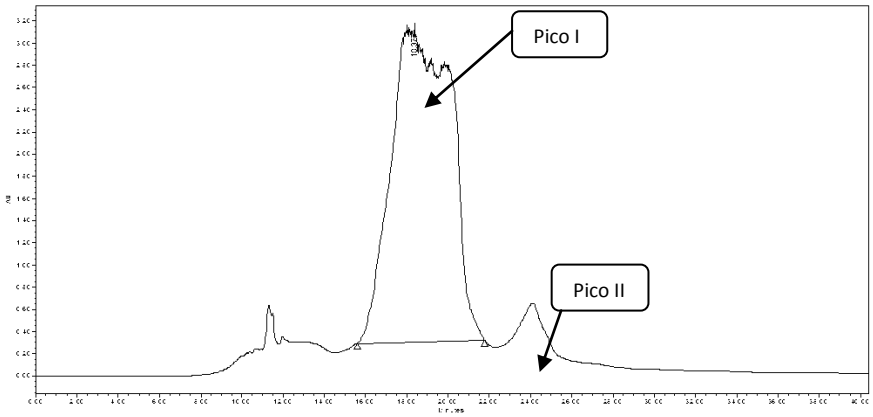


Figura 12. Perfil cromatográfico de la fracción Hs-VI_{VIII} de *Hyptis spicigera*
Condiciones cromatográficas: Columna Symmetry C_{18} (4.6 x 250 mm, 5µm); detector: arreglo de diodos (254 nm); fase móvil: ACN : H_2O 6:4; flujo de elución: 0.2 mL/min; volumen de inyección: 20 µL; cantidad inyectada: 1 mg.

Enseguida se realizó la purificación de los compuestos presentes utilizando estas condiciones analíticas mediante la técnica del reciclaje; en el primer ciclo se logran ver los picos I y II, se procedió a colectar el pico II dentro de los primeros ciclos, ya que se sabía que los compuestos en dicha parte se encuentran en muy baja cantidad, dentro del segundo ciclo el pico I comenzó a desdoblarse. Este proceso cromatográfico permitió la obtención de 10.9 mg del pico I-a y 11.4 mg del pico I-b, los cuales fueron analizados por RMN (Figura 14).

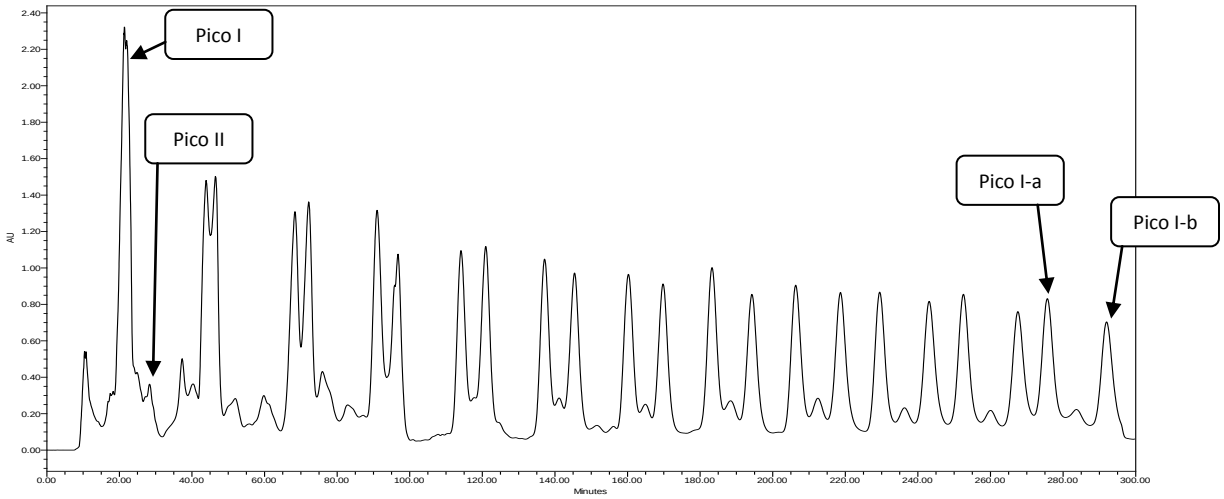


Figura 13. Técnica de reciclaje de 11 ciclos de la fracción Hs-VI_{VIII}

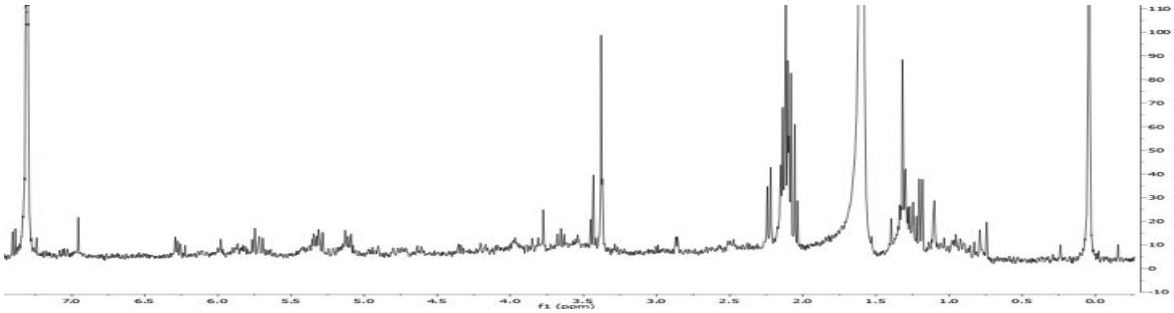
Condiciones cromatográficas: columna fase reversa Symmetry C_{18} (19 x 300 mm, 7µm); detector de diodos (254 nm); fase móvil ACN : H_2O 1:1; flujo de elución: 4.2 mL/min; volumen de inyección: 500 µL; cantidad inyectada: 30 mg.

En ambas muestras se observan señales diagnosticas para compuestos de tipo (δ_H 4.5-6.5 ppm) (Figura 14) 5,6-dihidro-α-pironas; sin embargo, en el espectro del pico I-a la intensidad de las señales es muy baja, esto demuestra que la cantidad de 5,6-dihidro-α-pironas es muy baja. El espectro del pico I-b demuestra que no se logró aislar un compuesto puro; ya que se aprecia un espectro complejo. Debido a que no se podía aislar un solo compuesto puro y por los bajos rendimientos se decidió obtener los perfiles cromatográficos de las fracciones Hs-IV y Hs-V en las mismas condiciones (ACN : H_2O 1:1); esto con el fin de poder comparar con la fracción Hs-VI_{VIII} y saber si era posible obtener más muestra, mejorando el rendimiento. Los perfiles cromatográficos obtenidos se muestra en la Figura 15.

Al observar los perfiles cromatográficos y compararlos entre sí, todos los cromatogramas presentan 4 picos principales con tiempos de retención muy similares. Los picos fueron colectados individualmente y se registraron sus espectros de RMN ^{1}H. Los picos I y II de la fracción HS-VI_{VIII} son ligeramente mayoritarios con respecto a las fracciones Hs-IV y Hs-V; aún con esto los 4 picos son los mayoritarios en las tres fracciones analizadas.

Estos picos colectados fueron analizados por RMN ^{1}H (Figura 16); no se encontraron 5,6-dihidro-α-pironas y en los que si se detectaron estaban en muy bajas cantidades; por ello se descartó el seguir adelante con la obtención de nueva muestra a partir de las fracciones Hs-IV y Hs-V.

a)



b)

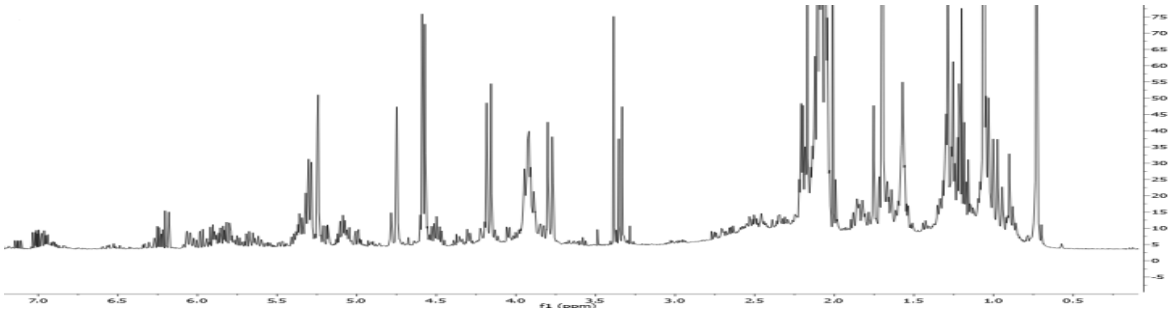
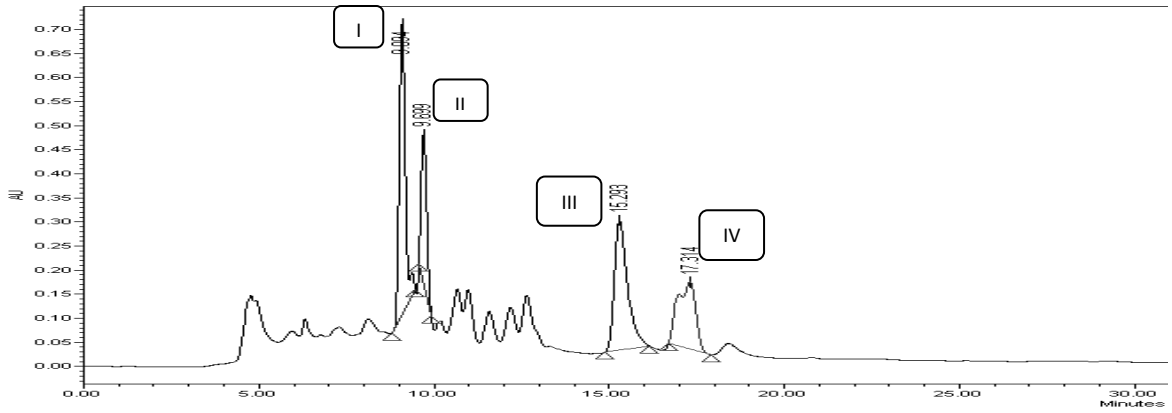
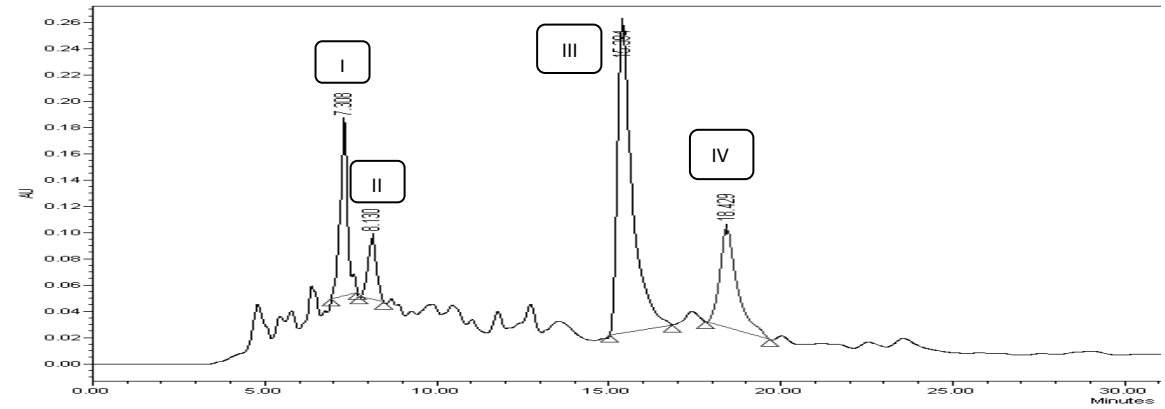


Figura 14. a) Espectros de RMN ^{1}H del “pico I-a”, y b) del “pico I-b”

a)



b)



c)

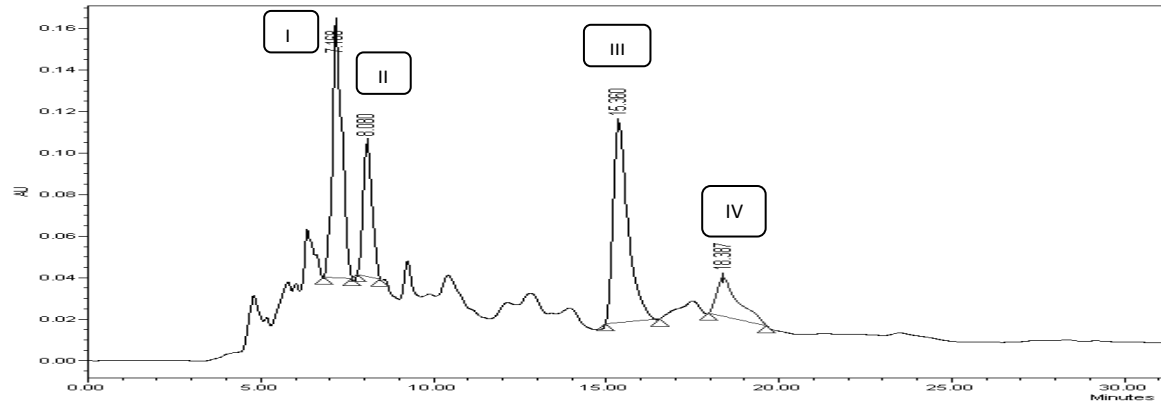


Figura 15. Perfiles cromatográficos obtenidos para la fracción Hs-VI_{VIII} (a), fracción Hs-IV (b) y fracción Hs-V (c)

Es importante resaltar que en los espectros de RMN ^{1}H se observa la presencia de 5,6-dihidro-α-pironas con grupos metoxilo. Esto puede ser debido a la apertura de un epóxido en presencia de metanol; lo que conlleva a que la

cadena de alguna de las 5,6-dihidro-α-pironas este sustituida por un grupo metoxilo, que pudo haber ocurrido durante el tratamiento de precipitación de triterpenos y grasas (Sección 5.5, fraccionamiento primario de los extractos orgánicos) realizado con MeOH.

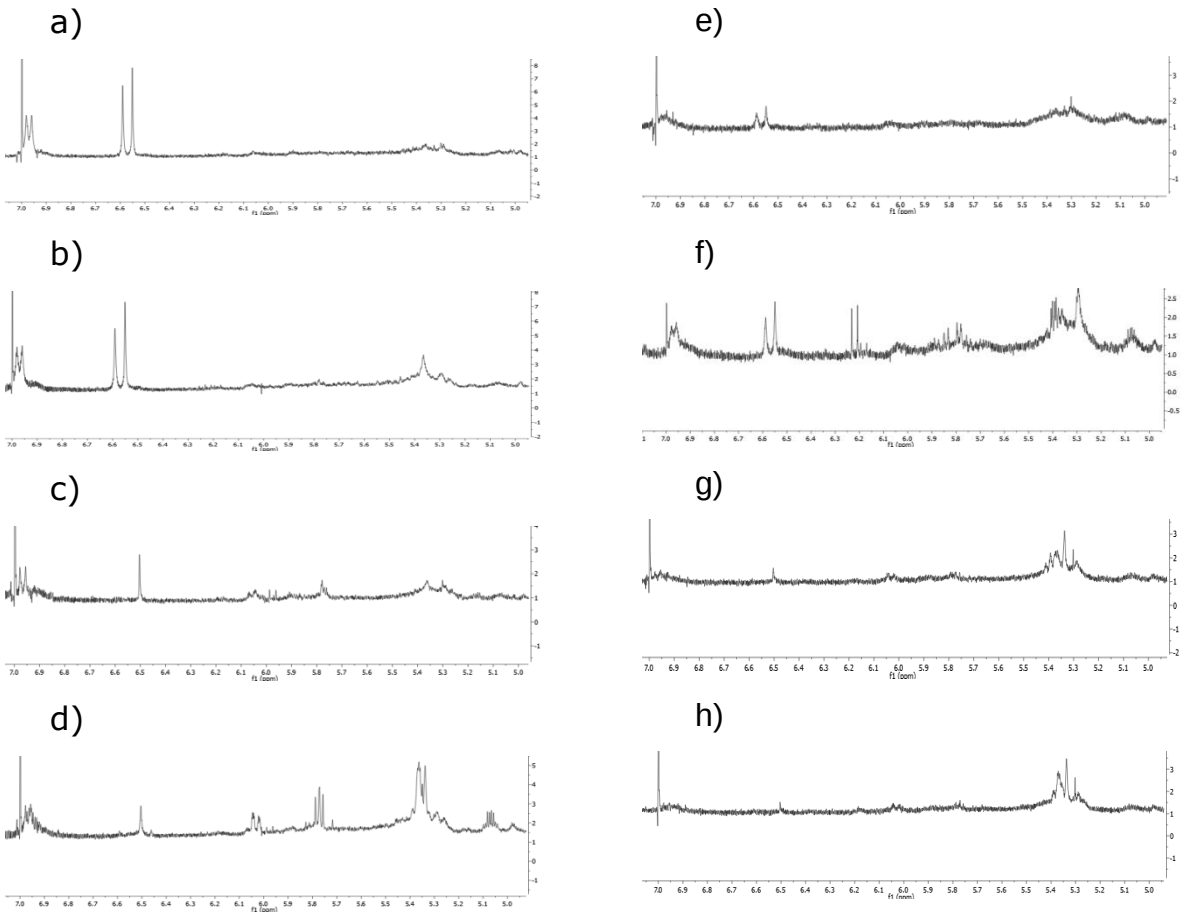


Figura 16. Espectros de RMN ^{1}H de los picos (a) I, (b) II, (c) III, (d) IV recolectados por CLAE de la fracción IV, espectros de RMN ^{1}H de los picos (e) I, (f) II, (g) III (h) IV recolectados por CLAE de la fracción V

En consecuencia se decidió hacer una CCF para saber si el grupo metoxilo provenía de este tratamiento con MeOH o solamente fue un artefacto formado en el proceso de dilución para realizar las inyecciones; una vez obtenido la cromatoplaca correspondiente y observar que no había una diferencia notable entre los R*f* de la fracción y el extracto crudo se llevaron a cabo la obtención de los

perfiles cromatográficos de la fracción Hs-V utilizando como disolvente CH_2Cl_2. Esto con el propósito de obtener una mejor solubilidad y por ende, mayor resolución entre los componentes de la fracción. Los perfiles cromatográficos obtenidos se muestran en la Figura 17.

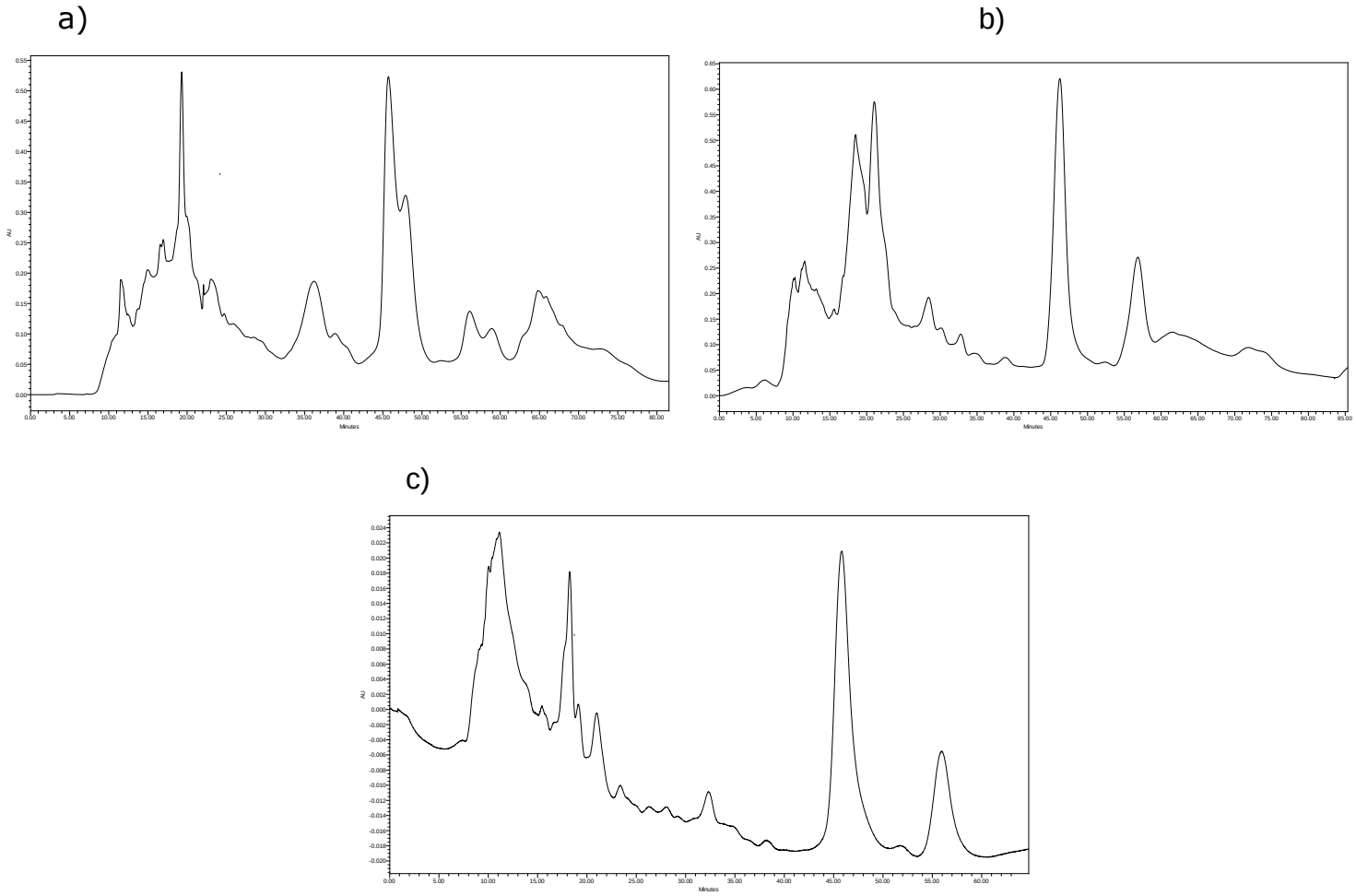


Figura 17. Espectros de RMN ^1H del extracto orgánico disuelto en THF (a); en ACN:THF (b); en ACN (c)

El cambio de disolvente para disolver el extracto no ayudo a mejorar la resolución en los perfiles; por lo que se decidió seguir trabajando con la fracción $HS\text{-}VI_{VIII}$.

Para esta parte de la purificación se cambiaron las condiciones cromatográficas a fase normal, similares a las empleadas con la muestra de *Asterohyptis mociniana*. El primer paso fue obtener el perfil cromatográfico de las

muestras en condiciones analíticas; esto se realizó utilizando una columna de sílica Waters (3.9 x 300 mm, 10µm). De esta manera se encontró que el sistema de elución Hex : AcOEt en proporción 3:2 y un flujo de 0.3 mL/min, permitió ver una mejor separación entre los componentes de la fracción HS-VI_{VIII}; sin embargo, en la parte final del perfil cromatográfico se observaron dos picos en buena proporción y con gran potencial a desdoblarse; esto debido a que son muy anchos y en el valle formado cuando cambia de dirección no llegan hasta la línea base, por lo tanto se decidió aumentar el flujo a 0.49 mL/min y de esta forma cambiar los tiempos de retención, una vez adquirido el perfil correspondiente y saber que efectivamente se tenía una mejor resolución las condiciones fueron escaladas a nivel preparativo donde se llevaron a cabo inyecciones de 30 mg, empleando la técnica de sobrecarga y corte de núcleo. Se obtuvieron 13 picos, de los cuales los picos I (2.3 mg), II (1.6 mg), VIII (8.3 mg) y X (3.6 mg) fueron los que se colectaron de manera individual; el perfil cromatográfico se muestra en la Figura 18.

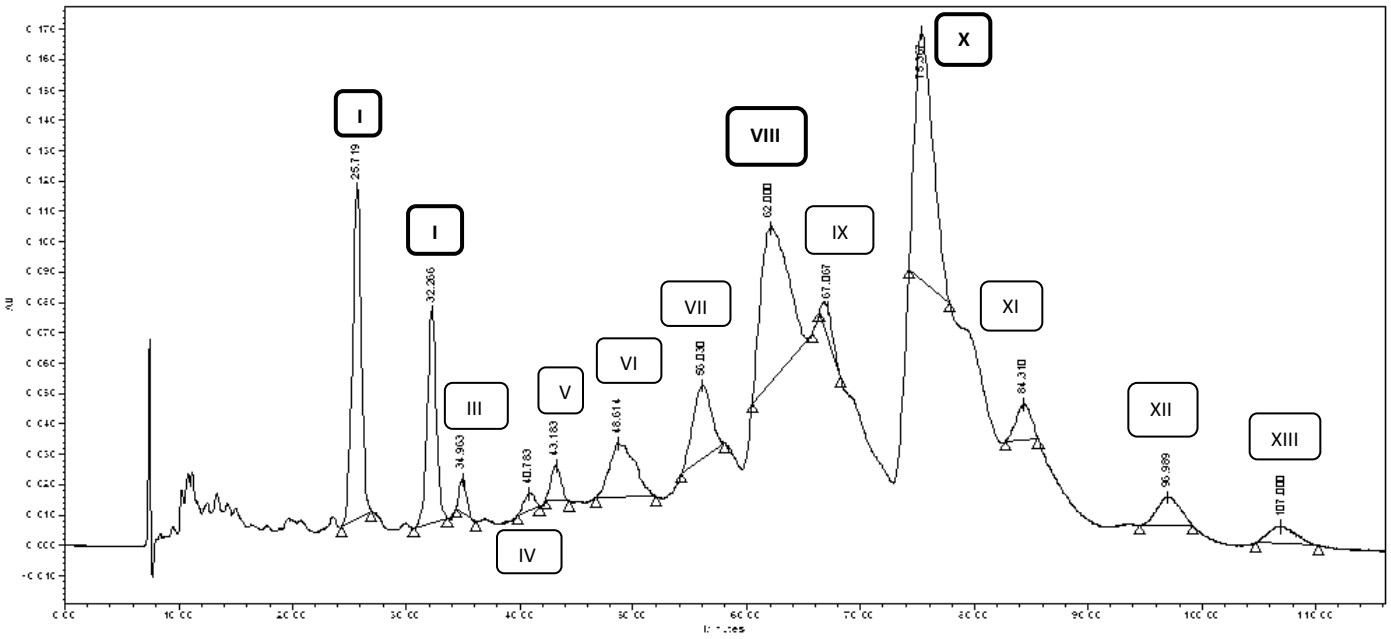


Figura 18. Perfil cromatográfico de la fracción Hs-VI_{VIII} en fase normal

Condiciones cromatográficas: columna fase normal sílica (21.2 x 250 mm, 10µm); detector de diodos (254 nm); fase móvil Hex : AcOEt 3:2; flujo de elución: 9.0 mL/min; volumen de inyección: 500 µL; cantidad inyectada: 30 mg.

Los 4 picos colectados se analizaron por RMN ^{1}H, detectando 5,6-dihidro-α-pironas en las muestras de los picos VIII y X, los cuales eran los de mayor cantidad; sin embargo, nuevamente no se logró una buena purificación, y al ya no haber muestra de donde obtener más cantidad se optó por reinyectar los picos VIII y X purificando mediante la técnica de rasurado de pico y posteriormente reciclaje del mismo se obtuvo uniformidad cromatográfica; el procedimiento fue llevado a cabo en condiciones analíticas con el fin de evitar que el bajo rendimiento obtenido a lo largo del proyecto afectara en un gran porcentaje y así poder colectar suficiente cantidad para ser analizada mediante RMN. De la muestra reciclada del pico Hs-VI_{VIII} no fue posible obtener un espectro adecuado; mientras que el rendimiento correspondiente al reciclaje del pico X fue mejor y se pudo hacer el análisis de los espectros de RMN ^{1}H y ^{13}C; los resultados observados en el ^{1}H (Figura 19) y en el ^{13}C (Figura 20) corrobora la presencia de dihidro-α-pironas.

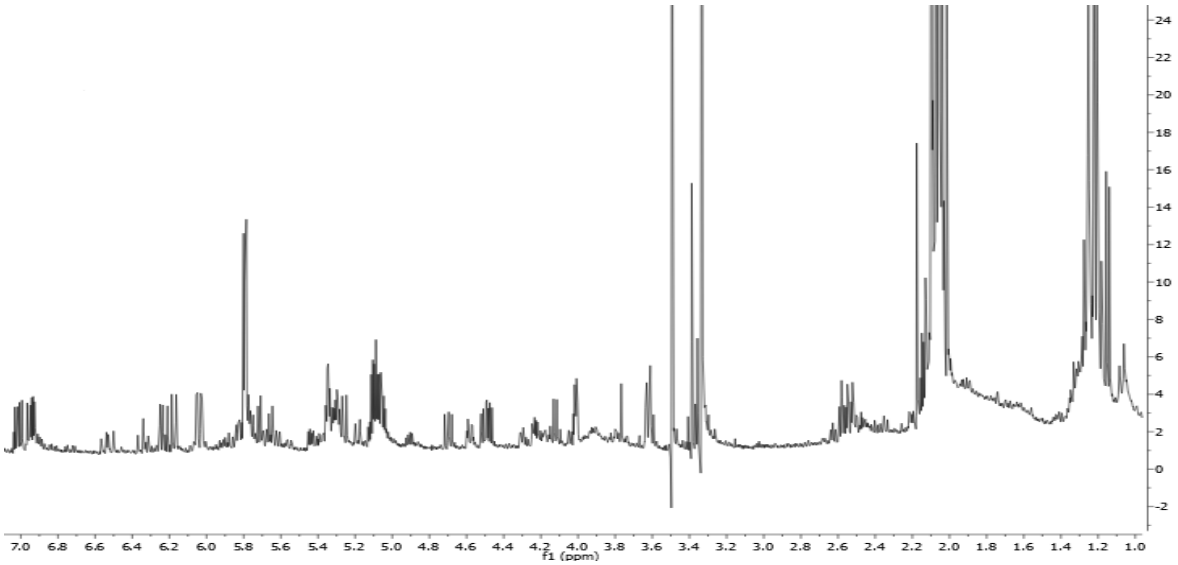


Figura 19. Espectro de RMN ^{1}H (400 MHz, $CDCl_3$) obtenido del reciclaje del pico Hs-VI_{VIII} en condiciones analíticas

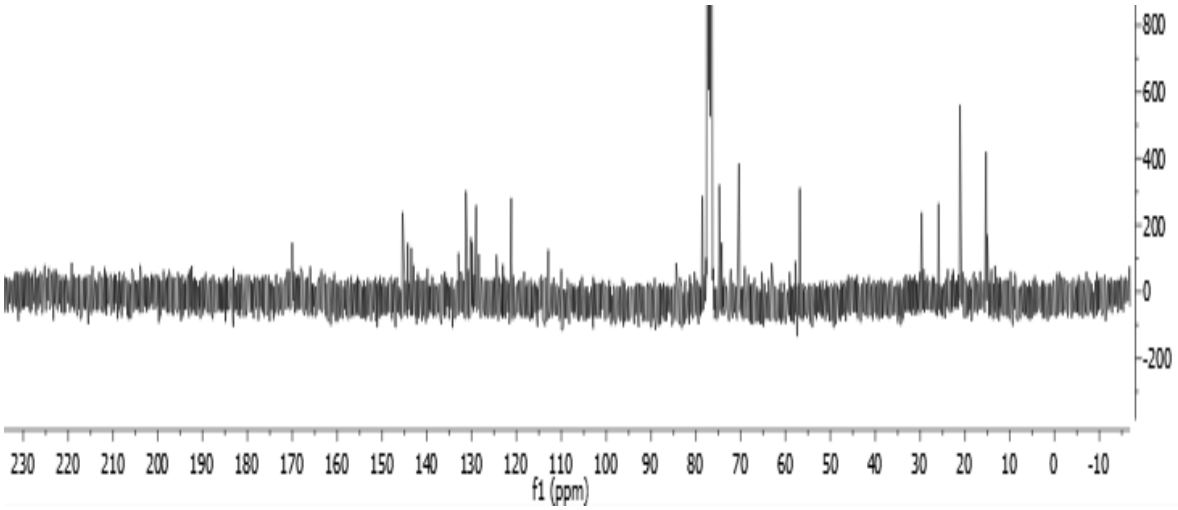


Figura 20. Espectro del RMN ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) obtenido del reciclaje del pico Hs-VI_{VIII} en condiciones analíticas

Los análisis de los espectros de las Figuras 19 y 20 permitieron obtener los desplazamientos químicos y las constantes espectroscópicas y al ser comparados con los reportados previamente, se identificó al compuesto **4** como la: *R*-[5*R*, 6*S*-(diacetiloxi)-1*R*-(hidroxi)-2*R*-(metoxi)-3*E*-heptenil]-5,6-dihidro-2H-piran-2-ona (Suárez, A. 2013).

En el resto de las fracciones contiene otro tipo de derivados de 5,6-dihidro-α-pironas pero el rendimiento y la presencia de mezclas, no permitieron su purificación para realizar la elucidación estructural.

7. CONCLUSIONES

- Se realizó el monitoreo de la actividad biológica mediante el empleo del ensayo de citotoxicidad para la búsqueda de compuestos a partir de dos especies medicinales de la familia lamiaceae.

- En la especie medicinal *A. mociniana* no contiene derivados de 5,6-dihidro-α-pironas.

- Se optimizaron las condiciones las condiciones cromatograficas analíticas y preparativas para la identificación, separación y purificación de un compuesto de tipo 5,6-dihidro-α-pirona.

- El estudio químico de las especies *A. mociniana* e *H. spicigera* por CLAE mediante la técnica de reciclado, permitieron el aislamiento de un compuesto derivado de α-pirona.

8. PERSPECTIVAS

- Realizar el estudio químico de la especie *Asterohyptis mocicinana* con la finalidad de identificar a los constituyentes presentes en las fracciones activas.

- Realizar la reinvestigación química para la elucidación estructural de las 5,6-dihidro-α-pironas minoritarias detectadas en este estudio en la especie *Hyptis spicigera* empleando una mayor cantidad de material vegetal.

- Comparar diferentes colectas de *Hyptis spicigera* con el fin de monitorear la variabilidad química con respecto a la época de recolecta para establecer la mayor concentración de las 5,6-dihidro-α-pironas presentes.

9. BIBLIOGRAFÍA

Aladrén, M. (1993). Fondos documentales manuscritos e iconograficos de la real expedicion botánica a nueva España en el archivo del real jardín botánico. *Archivo del Real Jardín Bótanico* .

Almtorp, T. G.; Hazell, C. A.;Torsell, B. G. K. (1991). A lignan and pyrone and other constituents from *Hyptis capitata*. *Phytochemistry, 30.* , 2753 – 2756.

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

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

Barbosa P.P.P.; Barbosa, C.P. (1992) Studies on the antiulcerogenic activity of the essencial oil of *Hyptis mutabilis* Briq. in rats. *Phytotherapy Research*, *6*, 114-115.

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

Cates, J. R. (2004). Screening for Anticancer Agents from Sonoran Desert Plants: A Chemical Ecology Approach. *Pharmaceutical Biology 42* , 478 - 487.

Collett, L. A.; Davies-Coleman, M. T.; Rivett, D. E. A. (1998) Naturally occurring 6-substituted 5,6-dihydro-α-pyrones*;* En: *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Herz, W.; Falk, H.; Kirby, G. W.; Moore, R. E.; Tamm, C., Eds. Springer Verlag: New York, **1998**, *75*, 182-209.

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

Domínguez-Vázquez, G.; Berlin, B.; Castro,R. A. E.; Estrada-Lugo, I. K. E. (2002). Revisión de la diversidad y patrones de distribución de Labiatae en Chiapas.

Anales del Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, Serie Botánica 73 (1) , 39 - 80.

Facey, C. P.; Porter B. R. R.; Reese, B. P.; Williams, A. D. L. (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.

Fragoso-Serrano, M. (2000) Elucidación estructural y establecimiento de la configuraciónabsoluta 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, México.

Harley, R. M.; Atkins, S.; Budantsev, A. L.; Cantino, P. D.; Conn, B. J.; Grayer, R.; Harley, M. M.; De Kok, R.; Krestovskaja, T.; Morales, R.; Paton, A. J., Ryding O.; Upson, T. (2004) Labiatae. E*n* Labiatae. The families and genera of vascular plants VII. Flowering plants dicotyledons: lamiales (except Acanthaceae including Avicenniaceae), K. Kubitzki y J. W. Kadereit (eds.). Spring, Berlin 167-275.

Juárez González, F. J. (2014). *Análisis conformacional de 6-alquenil-5,6-dihidro-α-pironas de origen vegetal utilizando acoplamientos dipolares residuales y constantes de acoplamiento vecinales en la resonancia magnética nuclear.*Tesis doctoradai, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, en escritura.

Kini, F.;Kam, B.; Aycard, J. P.; Gaydou, M. E.; Bombarda, I. (1993). Chemical composition of the essential oil of *Hyptis spicigera* Lam. from Burkina Faso. *Journal of EssentialOil Research*, 5 (2) 219 - 221.

Lee, K.; Lin, Y.; Wu, T.; Zhang, D. C.; Yamagishi, T.; Hayashi, T. (1988). Antitumor agents. LXXXVIII. The cytotoxic principles of *Prunella vulgaris*, *Psychotria serpens*, and *Hyptis capitata*: ursolic acid and related derivatives. *Planta Medica, 54* , 308 - 311.

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

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

Martínez, M. (1993). *Las plantas medicinales de México.* México: Ed. Botas, Sexta ed. pp 216, 412, 488, 508.

Martínez-Gordillo, M.; Fragoso-Martínez, I.; García-Peña, M. R.; Montiel, O. (2013) Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo, *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84, 30-86.

Misra, T.N.; Singh, R.S.; Ojha, T.N.; Upadhyay, J. (1981) Chemical constituents of *Hyptis suaveolens*. Part I. Spectral and biological studies on a triterpene acid. *Journal of Natural Products,44*, 735-738.

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

Novelo, M.; Cruz, J. G.; Hernandez, L.; Pereda-Miranda, R.; Chai, H.; Mar,W.; Pezzuto, J.M.(1993). Chemical studies on Mexican *Hyptis* species. VI. Biologically active natural products from Mexican medicinal plants. II. Cytotoxic constituents from *Hyptis verticillata*. *Journal of Natural Products* , 56, 1728 - 1736.

Oliva, M. M.; Gallucci, N.; Zygadio, J. A.; Demo, M. S. (2007) Cytotoxic activity of Argentinean essential oils on Artemia salina*Pharmaceutical Biology 45*259 - 262.

Palsson, K. ;Jaenson, T.G.T. (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*, 144-148.

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

Pereda-Miranda, R.; Delgado, G. (1990). Chemical studies on Mexican *Hyptis* species. Part 2. Triterpenoids and flavonoids from *Hyptis albida*. *Journal of Natural Products, 53*, 182-185.

Pereda-Miranda, R.; Hernández, L.; Villavicencio, M. J.; Novelo, M.; Ibarra, P.; Chai, H.; Pezzuto, J. (1993). Structure and stereochemistry of pectinolides A-C, novel antimicrobial and cytotoxic 5,6-dihydro-α-pyrones 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, Arnason J. T.; Mata, R.; Romeo, J. T. (editores), Plenum Press, New Press, New York, 83-112.

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

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

Rojas, A.; Hernandez, L.; Pereda-Miranda, R.; Mata, R.(1992). Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *Journal of ethnopharmacology, 35*, 275-283.

Suárez-Ortiz, G. A. (2013)Caracterización estructural y análisis conformacional de 6-heptenil-5,6-dihidro-2H-piran-2-onas de origen vegetal.Tesis de Doctorado, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México.

Villavicencio González, J. M. (1993). *Purificacion y caracterizacion de las pectinolidas A-C, principales constituyentes citotoxicos y antimicrobianos de Hyptis pectinata (L.).*Tesis de Maestría, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México.