



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PERFIL CROMATOGRÁFICO Y EVALUACIÓN
BIOLÓGICA DE DIFERENTES EXTRACTOS DE LA
PLANTA *Hyptis brevipes*.**

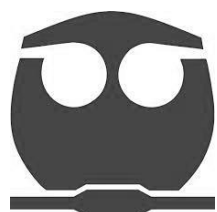
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

ANA KAREN ORTEGA SOTO



MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dra. María Isabel Aguilar Laurents.
Vocal: Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz.
Secretario: Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano.
1er. Suplente: Dr. Mario Alberto Figueroa Saldivar.
2do. Suplente: Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda.

SITIO 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: _____
Ana Karen Ortega Soto.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
2	ANTECEDENTES	3
2.1	Generalidades de la familia Lamiaceae.	3
2.2	Características botánicas del género <i>Hyptis</i> .	4
2.3	Metabolitos del género <i>Hyptis</i> .	7
2.3.1	Terpenoides.	8
2.3.2	Flavonoides.	8
2.3.3	Lignanós.	9
2.3.4	5,6-dihidro-alfa-pironas.	9
2.4	Biosíntesis de las 5,6-dihidro-alfa-pironas.	11
2.5	<i>Hyptis brevipes</i> .	12
2.5.1	Descripción y características botánicas.	12
2.5.2	Biología y Ecología.	13
2.5.3	Clasificación Taxonómica.	14
2.5.4	Distribución.	14
2.5.5	Usos Tradicionales.	15
2.6	Métodos de análisis.	16
2.6.1	Cromatografía de Líquidos.	16
2.6.1.1	Técnicas de Cromatografía de Líquidos (CL).	17
2.6.1.1.1	Cromatografía en Capa Fina (CCF).	17
2.6.1.1.2	Cromatografía en Columna.	17
2.6.1.1.3	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC).	18
2.6.2	Resonancia magnética nuclear (RMN).	20
2.7	Ensayo de Citotoxicidad.	21
2.7.1	Fundamento del ensayo de sulforodamina B.	21
3	HIPÓTESIS	23
4	OBJETIVOS	24
4.1	Objetivo general.	24
4.2	Objetivos específicos.	24
5	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	25
5.1	Material vegetal.	25

5.2	Extracción del material vegetal.	25
5.2.1	Fraccionamiento primario del extracto orgánico A.	26
5.2.2	Fraccionamiento por partición de los extractos orgánicos B-G.	26
5.3	Técnicas Cromatográficas.	28
5.3.1	Fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta del extracto orgánico A.	28
5.3.2	Cromatografía en Capa Fina (CCF).	29
5.3.3	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC) a nivel analítico.	31
5.3.4	Preparación de referencias y muestras de análisis.	31
5.3.5	Identificación de 5,6-dihidro-alfa-pironas en las fracciones obtenidas.	32
5.3.6	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC) a nivel preparativo.	32
5.4	Resonancia Magnética Nuclear (RMN).	32
5.5	Ensayo de Citotoxicidad.	33
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
6.1	Fraccionamiento de las muestras.	35
6.1.1	Fraccionamiento primario.	35
6.1.2	Fraccionamiento secundario.	36
6.2	Aplicación de Perfiles Cromatográficos y Espectros de RMN.	36
6.2.1	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia.	36
6.2.2	Resonancia magnética nuclear.	39
6.3	Identificación de 5,6-dihidro-alfa-pironas en las fracciones de <i>Hyptis brevipes</i> .	42
6.3.1	Fracción secundaria AE.	42
6.3.2	Fracción secundaria AF.	43
6.3.3	Fracción B-AcOEt.	46
6.3.4	Fracción C-AcOEt.	49
6.3.5	Fracciones D-AcOEt y E-AcOEt.	50
6.3.6	Fracción F-AcOEt.	54
6.3.7	Fracción G-AcOEt.	56
6.3.7.1	Fraccionamiento a nivel preparativo.	58
6.4	Ensayo de Citotoxicidad.	62
7	CONCLUSIONES	66
8	BIBLIOGRAFÍA	67
9	APÉNDICE	73

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
AcOEt	Acetato de Etilo
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
c	Cuadruplete
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CDCl ₃	Cloroformo Deuterado
CG-EM	Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CH ₃ CN	Acetonitrilo
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria 50
CL	Cromatografía de Líquidos
d	Doblete
dd	Doble de dobles
ddd	Doble de doble de dobles
DE ₅₀	Dosis Efectiva 50
H ₂ O	Agua
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hz	Hertz
INC	Instituto Nacional de Cancerología
KB	Línea Celular de Carcinoma Nasofaríngeo
MCF-7	Línea Celular de Carcinoma de Mama
MeOH	Metanol
nm	Nanómetros
pH	Potencial de Hidrógeno
ppb	Partes por billón
Q	Quintuplete
RF	Radiofrecuencia
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
SRB	Sulforodamina B
t	Triplete
TCA	Ácido Tricloroacético
t _R	Tiempo de Retención
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
UV	Ultravioleta

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de la familia Lamiaceae en México.	3
Figura 2. (A) Flor, (B) Corte longitudinal de la corola.	4
Figura 3. Diferentes especies del género <i>Hyptis</i> .	6
Figura 4. Estructura del anillo de la δ -lactona- α,β -insaturada.	10
Figura 5. Estructura de la pironetina.	10
Figura 6. Biosíntesis propuesta de la pironetina.	12
Figura 7. <i>Hyptis brevipes</i> .	13
Figura 8. Crecimiento de <i>Hyptis brevipes</i> .	13
Figura 9. Distribución mundial de <i>Hyptis brevipes</i> .	15
Figura 10. Experimento de Tswett's.	16
Figura 11. Cromatografía en capa fina (CCF).	17
Figura 12. Cromatografía en columna.	18
Figura 13. Sistema HPLC.	19
Figura 14. Estructura de la sulforodamina B.	22
Figura 15. Proceso de partición de las colectas con las claves B-G.	27
Figura 16. Proceso de obtención de las fracciones finales del extracto orgánico A.	30
Figura 17. Cromatoplaqa de la comparación entre el proceso metanólico y el proceso de partición.	36
Figura 18. Cromatoplaqa de las fracciones finales de la colecta A.	37
Figura 19. Compuestos aislados de <i>Hyptis brevipes</i> en estudios previos.	38
Figura 20. Cromatograma de líquidos a nivel analítico de la fracción secundaria AE.	42
Figura 21. Espectro de RMN- ¹ H de la fracción secundaria AE en CDCl ₃ (400 MHz).	43
Figura 22. Cromatograma de líquidos a nivel analítico de la fracción secundaria AF.	43
Figura 23. Cromatograma de líquidos a nivel analítico de la coelución entre la referencia 8 y la fracción secundaria AF.	44
Figura 24. Espectro de RMN- ¹ H de la referencia 8 en CDCl ₃ (400 MHz).	45

Figura 25. Cromatograma de líquidos a nivel analítico de la coelución entre la referencia 1 y la fracción secundaria AF. _____	45
Figura 26. Espectro de RMN- ¹ H de la fracción secundaria AF en CDCl ₃ (400 MHz). _____	46
Figura 27. Cromatograma de líquidos a nivel analítico de la fracción B-AcOEt. _	47
Figura 28. Espectro de RMN- ¹ H de la fracción B-AcOEt en CDCl ₃ (400 MHz). ___	48
Figura 29. Cromatograma de líquidos a nivel analítico de la coelución entre la referencia 5 y la fracción B-AcOEt. _____	48
Figura 30. Cromatograma de líquidos a nivel analítico de la fracción C-AcOEt. _	49
Figura 31. Cromatograma de líquidos a nivel analítico de la coelución entre la referencia 2 y la fracción C-AcOEt. _____	49
Figura 32. Espectro de RMN- ¹ H de la fracción C-AcOEt en CDCl ₃ (400 MHz). ___	50
Figura 33. Cromatograma de líquidos a nivel analítico de la fracción D-AcOEt. _	51
Figura 34. Cromatograma de líquidos a nivel analítico de la fracción E-AcOEt. _	51
Figura 35. Espectro de RMN- ¹ H de la fracción D-AcOEt en CDCl ₃ (400 MHz). ___	52
Figura 36. Espectro de RMN- ¹ H de la fracción E-AcOEt en CDCl ₃ (400 MHz). ___	53
Figura 37. Cromatograma de líquidos a nivel analítico de la coelución entre la referencia 1 y la fracción D-AcOEt. _____	53
Figura 38. Cromatograma de líquidos a nivel analítico de la coelución entre la referencia 4 y la fracción D-AcOEt. _____	54
Figura 39. Cromatograma de líquidos a nivel analítico de la fracción F-AcOEt. ___	55
Figura 40. Espectro de RMN- ¹ H de la fracción F-AcOEt en CDCl ₃ (400 MHz). ___	55
Figura 41. Cromatograma de líquidos a nivel analítico de la coelución entre la referencia 1 y 3 con la fracción F-AcOEt. _____	56
Figura 42. Cromatograma de líquidos a nivel analítico de la fracción G-AcOEt. _	57
Figura 43. Cromatograma de líquidos a nivel analítico de la coelución entre las referencias 1 y 2 con la fracción G-AcOEt. _____	57
Figura 44. Espectro de RMN- ¹ H de la fracción G-AcOEt en CDCl ₃ (400 MHz). ___	58
Figura 45. Espectro de RMN- ¹ H del compuesto 9 aislado de la fracción G-AcOEt en CDCl ₃ (400 MHz). _____	59
Figura 46. Estructura propuesta para la Brevipólida P (9). _____	59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales usos de diversas especies del género <i>Hyptis</i> . _____	7
Tabla 2. Taxonomía de <i>Hyptis brevipes</i> . _____	14
Tabla 3. Datos de las colectas de <i>Hyptis brevipes</i> . _____	25
Tabla 4. Peso de extractos obtenidos del proceso de partición de <i>Hyptis brevipes</i> . _____	27
Tabla 5. Fraccionamiento secundario del extracto orgánico A de <i>Hyptis brevipes</i> . _____	29
Tabla 6. Reuniones del fraccionamiento secundario del extracto orgánico A de <i>Hyptis brevipes</i> . _____	30
Tabla 7. Condiciones utilizadas en HPLC a nivel analítico. _____	31
Tabla 8. Condiciones utilizadas en HPLC a nivel preparativo. _____	32
Tabla 9. Tiempos de retención de las referencias de <i>Hyptis brevipes</i> . _____	39
Tabla 10. Desplazamientos químicos de las referencias de 5,6-dihidro-alfa pironas (1-6) aisladas de <i>Hyptis brevipes</i> . _____	41
Tabla 11. Desplazamientos químicos de la referencia 7 y el compuesto 9. _____	60
Tabla 12. Referencias identificadas en las diferentes fracciones de <i>Hyptis brevipes</i> . _____	61
Tabla 13. Citotoxicidad de fracciones obtenidas de la columna abierta. _____	63
Tabla 14. Citotoxicidad de las fracciones evaluadas de las colectas B-G. _____	65

1 INTRODUCCIÓN

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

Las plantas medicinales se encuentran valoradas como un recurso valioso, pues se estima que una importante parte de la población a nivel mundial las utiliza de forma significativa como opción a la medicina convencional. Además, aproximadamente el 60% de los medicamentos usados actualmente para el tratamiento del cáncer han sido aislados de productos naturales y las plantas han sido la fuente más significativa (Gordaliza, 2007). Estos incluyen a los alcaloides de la *Vinca*, diterpenos de *Taxus*, alcaloides de *Camptotheca* y lignanos de *Podophyllum*. En la actualidad, existen compuestos derivados de plantas que se están probando en estudios clínicos en fases I, II y III (Alonso-Castro, 2011).

En la búsqueda de nuevos fármacos contra el cáncer, las principales estrategias para la selección de especies de plantas, incluyen: la selección aleatoria, información quimiotaxonómica y el conocimiento etnobotánico. La selección aleatoria es empleada cuando el número de candidatos es bajo y/o los medios de investigación son amplios. La quimiotaxonomía distingue a las especies relacionadas con la producción de diferentes metabolitos secundarios, diferentes características ecológicas y diferentes características fisiológicas. El conocimiento etnobotánico incluye a las plantas utilizadas en la medicina tradicional como la herbolaria, folklore y el chamanismo (Alonso-Castro, 2011).

Este conocimiento etnobotánico ha permitido identificar a miembros de la familia Lamiaceae (Labiatae) que han aportado recursos importantes desde tiempo atrás,

destacando el uso de muchas especies utilizadas en la medicina, también como condimento en la cocina regional y como agentes de control de plagas. Esta familia tiene gran importancia económica en varias partes del mundo, ya que muchas de sus especies se usan en la culinaria como condimentos (*Origanum*, *Thymus*, *Mentha*), para la obtención de aceites esenciales (*Lavandula*, *Pogostemon*, *Salvia*) y/o como ornamentales (*Coleus*, *Salvia*, *Scutellaria*) (Martínez, 2013).

Algunos miembros de la familia Lamiaceae han sido fuente de numerosos estudios, particularmente en este trabajo el género *Hyptis* es el que figura con la especie *Hyptis brevipes*, de la cual se ha reportado la presencia de 5,6-dihidro- α -pironas con un anillo de ciclopropano y con un anillo de tetrahidrofurano presentando algunos de estos compuestos actividad citotóxica selectiva contra la línea celular de carcinoma nasofaríngeo KB (Suárez-Ortíz, 2013).

Basados en la información obtenida en los estudios previos mencionados, en este trabajo se buscó identificar 5,6-dihidro-alfa-pironas en las diferentes colectas de la especie *Hyptis brevipes*, bien sea, ya reportadas en la literatura o estructuras novedosas, también se evaluó su actividad biológica mediante la inhibición del crecimiento de células derivadas de carcinomas humanos.

2 ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de la familia Lamiaceae.

La familia Lamiaceae es muy diversa, ya que en ella se incluyen 236 géneros y 7173 especies. Su distribución es cosmopolita a excepción de regiones más frías, se localiza en zonas templadas, particularmente en el Mediterráneo, en Asia central y China, además de Sudamérica y África tropical (Suárez-Ortíz, 2013). En México, como se presenta en la Figura 1, se encuentra distribuida particularmente a lo largo de las zonas montañosas y de manera primordial en el eje neovolcánico transversal (Martínez, 2013).



Figura 1. Distribución de la familia Lamiaceae en México (Martínez, 2013).

La familia es una de las más diversas de la República Mexicana, sólo después de las familias Asteraceae, Fabaceae, Poaceae, Orchidaceae, Cactaceae, Euphorbiaceae y Rubiaceae (Martínez, 2013), y está representada por 512 especies y 27 géneros que pertenecen a seis tribus, de las cuales, la más diversa es Menthae. En cuanto a su riqueza, la más distintiva es Alviae aunque sólo

cuenta con dos géneros, pero que constituyen el 64% del total de las lamiáceas en México (Ramamoorthy, 1998).

La particularidad de la familia Lamiaceae, también llamadas labiadas (que le otorga su amplia distribución), es su característico labio inferior, el cual presenta tres lóbulos en los que aterrizan los insectos (los mayores polinizadores de esta familia). Para garantizar la polinización, las lamiáceas producen mucho néctar, a menudo en un disco nectarífero ubicado en la base del ovario, y para facilitar la polinización presentan sus estambres aplicados sobre el labio superior de la corola (Figura 2), con sus anteras dirigidas hacia adelante, de tal forma que cuando los insectos se posan sobre el labio inferior (que actúa como plataforma) impregnan su dorso con el polen. Entonces, cuando penetran en otra flor provocan la polinización que resulta favorecida en las flores receptoras por un estilo a menudo arqueado y sobresaliente (Izco, 1998).

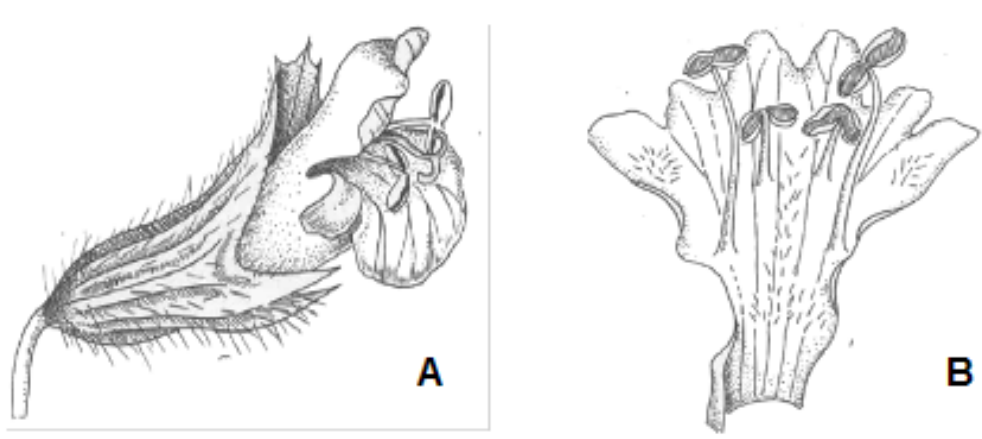


Figura 2. (A) Flor, (B) Corte longitudinal de la corola.

2.2 Características botánicas del género *Hyptis*.

En México se encuentran 8 de los 27 géneros en los que se agrupan 33 especies, siendo 22 de ellas endémicas de México (Ramamoorthy, 1998).

Principalmente prosperan en matorrales (42.85%) y bosques tropicales caducifolios (34.28%), pero se localizan en la mayoría de los tipos de vegetación

de México, incluyendo dunas y desiertos, 60% de las especies son hierbas, 37.14% son arbustos y 2.85% son definidos como sufrútices. Los estados con mayor diversidad son Chiapas (18 especies), Veracruz (16 especies), Guerrero (15 especies), Oaxaca (14 especies), Jalisco y Nayarit (12 especies). En la República Mexicana, el género *Hyptis* ocupa el cuarto lugar, después de *Salvia*, *Scutellaria* y *Stachys*, con un endemismo importante del 40%, donde sobresalen siete especies pertenecientes a la sección *Laniflorae*, con distribución destacada en la península de Baja California, de las cuales seis son endémicas (Martínez, 2010).

Las especies del género *Hyptis* son hierbas anuales o perennes, arbustos o pequeños árboles; glabros o con tricomas simples o estrellados; tallos erectos o prostrados, ramificados. Sus hojas son simples, ovadas a lanceoladas, rómbico-lanceoladas o lineal-lanceoladas, margen generalmente dentado. Inflorescencias tirsoideas, axilares, en cimas laxas o congestionadas, pedunculadas o sésiles; brácteas conspicuas o inconspicuas, en el primer caso, ovadas o lanceoladas, a veces formando un involucre. Flores pediceladas o sésiles; cáliz actinomorfo, campanulado, infundibuliforme o tubular, 5-dentado, acrescente en el fruto; corola zigomorfa, bilabiada, tubular, labio superior erguido, emarginado o bilobado, el inferior deflexo, trilobado, el lóbulo central reflexo, generalmente cuculiforme; estambres, didínamos, unidos en el tubo de la corola a diferentes alturas, exertos, declinados, filamentos libres; estilo ginobásico, estilopodio presente o ausente; estigma bifido, lóbulos estigmáticos glabros. Núculas ovoides a oblongas, lisas o rugosas (Martínez, 2013).

En la Figura 3 se muestran imágenes de diferentes plantas pertenecientes al género *Hyptis*, en ellas se pueden observar algunas de las características antes descritas para este género. Muchas especies del género *Hyptis* son utilizadas ampliamente como plantas medicinales, pero también como condimento en la cocina por sus diversas propiedades, en la Tabla 1 se indican algunos de los usos para diversas especies.



Figura 3. Diferentes especies del género *Hyptis*.

Tabla 1. Principales usos de diversas especies del género <i>Hyptis</i>.	
Especie	Uso
<i>Hyptis albida</i>	Contra afecciones gastrointestinales, como repelente de insectos y antiséptico.
<i>Hyptis brevipes</i>	Como antifúngico, antibacteriano, agente intercalante del ADN y contra el asma.
<i>Hyptis capitata</i>	Contra el resfriado, fiebre y asma; como antifúngico y hemostático.
<i>Hyptis mutabilis</i>	En trastornos gastrointestinales; contra infecciones de la piel, malaria, conjuntivitis, paludismo, flatulencias, menstruación excesiva; y como antiparasitario.
<i>Hyptis pectinata</i>	Como antibacteriano y antifúngico; en la nasofaringitis, congestión pulmonar y trastornos gastrointestinales.
<i>Hyptis spicigera</i>	Como antiséptico, carminativo, insecticida, contra la úlcera gástrica e infecciones de la piel.
<i>Hyptis suaveolens</i>	Aperitivo, contra la bilis y el estreñimiento; y como estimulante, carminativo y antiespasmódico.
<i>Hyptis verticillata</i>	Contra el reumatismo; en infecciones gastrointestinales y de la piel; como expectorante; y contra el resfriado y la fiebre.

2.3 Metabolitos del género *Hyptis*.

Estudios previos sobre la química de las especies del género *Hyptis* han permitido aislar metabolitos de tipo diterpenoide, flavonoide, lignano y alfa-pironas (Deng, 2009).

Aunque los metabolitos mencionados anteriormente son los más abundantes en el género, en la especie *Hyptis suaveolens* se han logrado identificar algunos

glucósidos como: L-fucosa, D-xilosa, D-manosa, D-galactosa, y 4-O-metil-D-glucurónico (Gowda, 1984). También se han identificado aminoácidos como: treonina, valina, arginina, serina, metionina, alanina, glutamina, isoleucina y leucina en los tallos; por otro lado, en los frutos se han identificado, fenilalanina, glicina, triptófano, lisina y prolina (Tiwari, 1979).

2.3.1 Terpenoides.

En los aceites esenciales obtenidos del género *Hyptis* se han identificado monoterpenos como α -pineno y sabieno; y también sesquiterpenos como α -humuleno y β -cariofileno (Kini, 1993).

Otro tipo de terpenos que se han identificado son los diterpenos, estos son uno de los compuestos más abundantes en el género, algunos de tipo abietano como carnosol, rosmanol y metilrosmanol (Mukherjee, 1984).

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

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

2.3.2 Flavonoides.

Las flavonas también han podido identificarse en el género *Hyptis*, de la especie *Hyptis verticillata*, se aisló la sideritoflavona, metabolito con importante actividad contra el carcinoma epidermoide oral humano (Novelo, 1993).

Esta también inhibe a la enzima prostaglandina sintetasa y presenta un efecto antiserotoninérgico (Kuhnt, 1995). Otras dos flavonas aisladas son la cirsilineol y cirsimaritina con actividad moderada contra *Helicobacter pylori* (Isobe, 2006).

2.3.3 Lignanós.

En el género *Hyptis* también se han identificado algunos compuestos de tipo lignano, este grupo incluye a la podofilotoxina, conocido por ser un precursor importante para la semisíntesis de derivados utilizados como agentes quimioterapéuticos en el tratamiento contra el cáncer testicular y leucemia (Charlton, 1998).

Asimismo, la desoxipodofilotoxina aislada de *Hyptis tomentosa* presentó una potente actividad citotóxica contra la línea celular KB (Kingston, 1979). Por otro lado, de un estudio diferente sobre *Hyptis verticillata* se aislaron la β -apopropodofilina y la dimetildesoxi-podofilotoxina que presentaron una actividad citotóxica contra células murinas de leucemia linfocítica P-388 (Novelo, 1993).

2.3.4 5,6-dihidro-alfa-pironas.

Las 5,6-dihidro-alfa-pironas representan otro grupo de metabolitos presentes en *Hyptis*, estos compuestos presentan en su núcleo un anillo de δ -lactona- α,β -insaturada con sustituyentes alquilo, alquenilo o arilo en posiciones C-6 y ocasionalmente sustituciones en el núcleo base (Figura 4). Una gran variedad de estos compuestos son biológicamente activos, exhibiendo una importante citotoxicidad contra diferentes líneas de células tumorales y/o actividad antimicrobiana (Collett, 1998).

El poder alquilante de los metabolitos se atribuye al núcleo de la δ -lactona- α,β -insaturada (Figura 4), siendo además estructuralmente análoga al grupo farmacofórico de la pironetina (Rojas, 1992).

La pironetina (Figura 5) es un compuesto que ha demostrado una potente actividad antitumoral, el mecanismo de acción mediante el cual ejerce su efecto

farmacológico es a través de una adición tipo Michael en la subunidad α del dímero de tubulina. La reacción se lleva a cabo entre el nitrógeno terminal de la lisina-352 con la posición C-4 del doble enlace del sistema lactónico α,β -insaturado, mientras que la cadena lateral interactúa por medio de enlaces de hidrógeno con los grupos funcionales de los aminoácidos cercanos al sitio de acción. La pironetina ha llegado a la fase clínica II y se estima que esta molécula puede presentar una toxicidad asociada a su capacidad de generar estas uniones covalentes irreversibles (Usui, 2004).

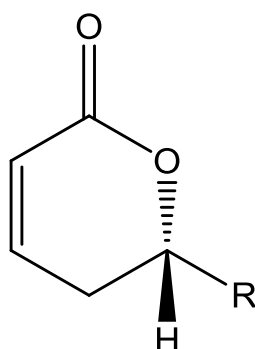


Figura 4. Estructura del anillo de la δ -lactona- α,β -insaturada.

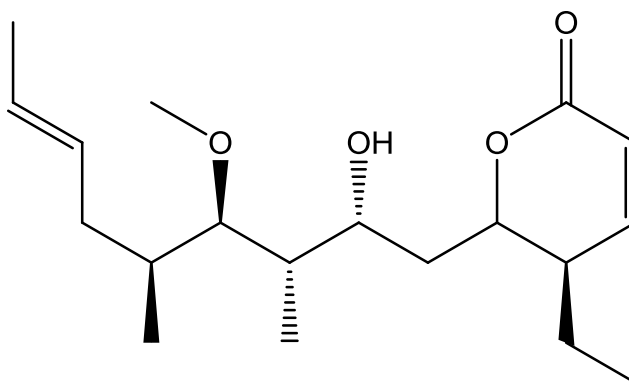


Figura 5. Estructura de la pironetina.

De este género se han reportado diferentes análogos de 5,6-dihidro-alfa-pironas, por ejemplo: de la especie mexicana *Hyptis oblongifolia* se han aislado cuatro derivados y particularmente la 4-deacetoxi-10-epi-olguina presentó actividad citotóxica significativa en diversas líneas celulares de cáncer (Delgado, 1985).

Otra 5,6-dihidro-alfa-pirona aislada del género *Hyptis* es la espicigerólida, obtenida de las partes aéreas de *Hyptis spicigera* (Fragoso-Serrano, 2000).

De *Hyptis pectinata* se han logrado aislar una serie de pectinólidas (A-C), con actividad citotóxica y antimicrobiana (Pereda-Miranda, 1993). Posteriormente, se identificaron a las pectinólidas D-G (Boalino, 2003) y a la pectinólida H (Fragoso-Serrano, 2005).

La primera 6-alquenil-5,6-dihidro-alfa-pirona aislada en la familia de las labiadas es la hiptólida obtenida a partir de *Hyptis pectinata* (Achmad, 1987).

Previamente, de *Hyptis brevipes* se han aislado diferentes derivados, con núcleo de ciclopropano y una cadena que se extiende con el grupo cinamoilo que esterifica al hidroxilo de la posición C-6' de la cadena lateral, los cuales fueron designados como brevipólidas A-F (Deng, 2009).

Posteriormente, en otro estudio se encontraron cinco compuestos derivados de 5,6-dihidro-alfa-pironas con anillo de tetrahydrofurano, algunos de estos compuestos presentaron actividad citotóxica selectiva contra la línea celular de carcinoma nasofaríngeo KB (Suárez-Ortíz, 2013)

Tanto farmacólogos como químicos orgánicos dedicados a la síntesis se han interesado en derivados de las 6-heptenil-5,6-dihidro-alfa-pironas por su similitud estructural con agentes citotóxicos como la pironetina, ya que podrían presentar una actividad alquilante relevante.

2.4 Biosíntesis de las 5,6-dihidro-alfa-pironas.

El inicio en la investigación de la biosíntesis de derivados de las 5,6-dihidro-alfa-pironas incluye al ácido parasorbico, la aspirona, la psitolina y la pironetina. La ruta biosintética de la pironetina (Figura 6), propone la formación de la cadena policétida lineal de 14 carbonos. Se concluyó que la pironetina deriva de cuatro unidades de acetato, dos unidades de propionato, una de butirato y una unidad de metilo proveniente de la metionina (Kobayashi, 1994).

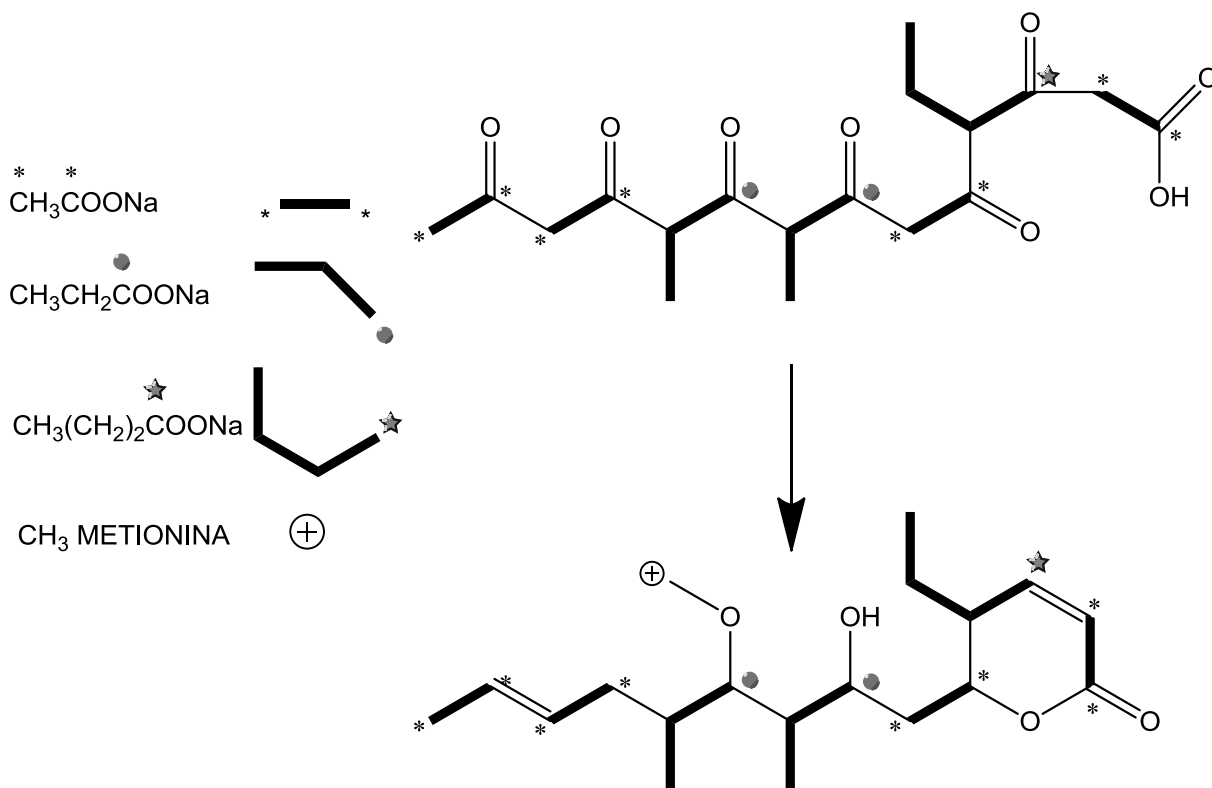


Figura 6. Biosíntesis propuesta de la pironetina.

2.5 *Hyptis brevipes*.

2.5.1 Descripción y características botánicas.

Se trata de una planta erecta anual, llega alcanzar hasta 1 m de altura, con el típico tronco cuadrado de las labiadas, a menudo muy peluda. Las hojas son gruesas y peludas en las dos superficies, estrechamente ovoides o lanceoladas de 5-7 cm de longitud y 2 cm de ancho, cuneadas en la base. La inflorescencia es un racimo denso globuloso de 14 mm de diámetro sobre un pedúnculo de alrededor de 1 cm de longitud, en la mayoría de las axilas de las hojas. Tiene corola blanca de cinco lóbulos irregulares de 5 mm de longitud. El cáliz mide 4 mm de longitud, también cuenta con cinco lóbulos finamente dentados. Las semillas son ovoides café oscuro de 1 mm de longitud, estriado con la cicatriz visible (Figura 7) (Parker, 2007).

2.5.2 Biología y Ecología.

Hyptis brevipes es una planta que prospera en áreas de cultivo (Figura 8), también crece en los bordes de bosques, tierra húmeda y cultivos de arroz; se ve ampliamente favorecida por la humedad continua, sin estación seca prolongada (Parker, 2007).



Figura 7. *Hyptis brevipes*.



Figura 8. Crecimiento de *Hyptis brevipes*.

2.5.3 Clasificación Taxonómica.

Del griego *Hypo*, abajo, con relación a la posición del labio inferior de la corola (Harley, 2004). Esta clasificación taxonómica se resume en la Tabla 2.

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

2.5.4 Distribución.

Hyptis brevipes es una planta originaria de la región de América tropical, pero actualmente se encuentra ampliamente distribuida en otras regiones tropicales del mundo como una especie exótica invasora (Deng, 2009). Aunque su distribución parece casi estrictamente tropical, hay cierta ocurrencia en la región subtropical del sur de Brasil. Es nativa en países de América como: Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Guyana, México, Cuba, Paraguay, entre otros. *Hyptis brevipes* también ha sido naturalizada en Asia en países como Indonesia, Malasia, Filipinas, Singapur, Taiwán, Tailandia y Vietnam. Otro continente donde se localiza es África, particularmente en Gabón (Figura 9) (<http://www.discoverlife.org>).

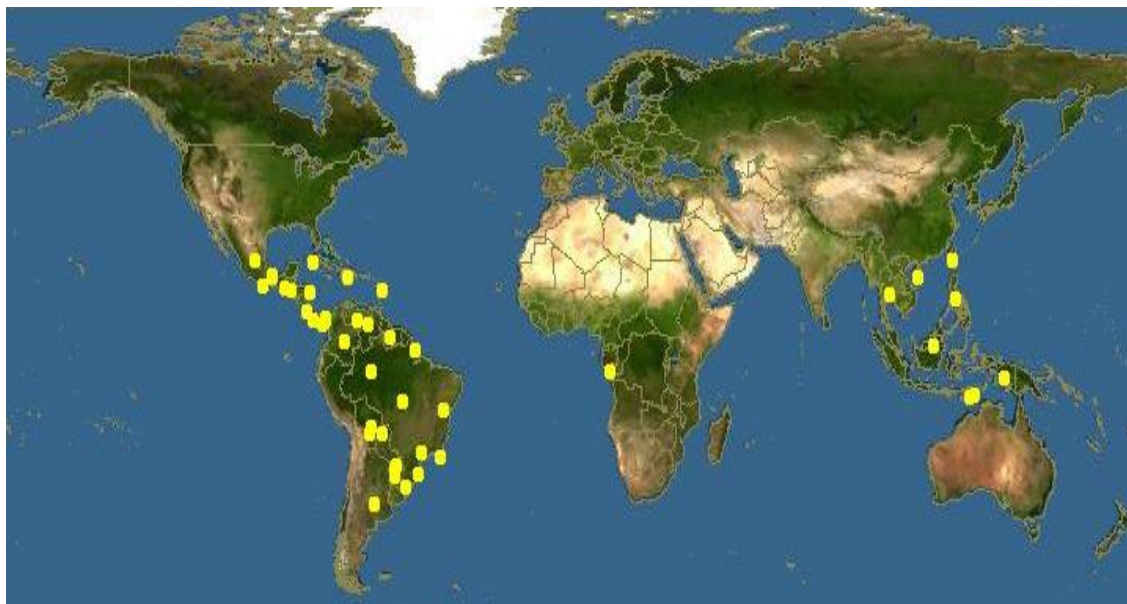


Figura 9. Distribución mundial de *Hyptis brevipes*.

2.5.5 Usos Tradicionales.

Los estudios biológicos con extractos crudos de *Hyptis brevipes* han demostrado su eficacia sobre la inhibición del crecimiento de bacterias y hongos, así como agentes intercaladores del ADN (Deng, 2009).

También se han realizado estudios con los aceites esenciales de la planta mediante CG-EM, en ellos se identificaron algunos derivados del cariofileno: alfa-cariofileno o humuleno, beta-cariofileno y óxido de cariofileno; éstos son sesquiterpenos bicíclicos, que en conjunto son los responsables de la actividad antimicrobiana demostrada por la esencia. Particularmente el óxido de cariofileno actúa como insecticida y antifúngico, por lo cual también ha sido utilizado tradicionalmente en la conservación de cereales y como repelente de mosquitos (Bhuiyan, 2010).

En la medicina tradicional el aceite de esta planta se ha utilizado para el tratamiento de la malaria y el asma. Recientemente, *Hyptis brevipes* también mostró una actividad significativa como agente antioxidante (Xu, 2013).

Los aceites obtenidos de diferentes especies de *Hyptis* se han utilizado en la cosmética y como saborizantes, entre otros usos, de tal manera que han motivado el inicio de diversos estudios químicos (Piozzi, 2009).

2.6 Métodos de análisis.

2.6.1 Cromatografía de Líquidos.

La cromatografía de líquidos se definió en 1900 por el botánico ruso, Mikhail Tswett. Sus primeros estudios se centralizaron en la separación de compuestos (pigmentos), extraídos de plantas utilizando disolventes, para ello utilizaba una columna de vidrio empacada con partículas de tiza (carbonato de calcio) y alúmina. Colocó su muestra (el extracto obtenido de la planta con el disolvente) en la columna y éste atravesó la cama de partículas, seguido de disolvente puro (Figura 10).

A medida que la muestra pasó a través de la columna por gravedad, se dio la separación analítica de los compuestos debido a la fuerza de atracción química diferente entre cada compuesto con las partículas. Se definió como fase móvil a la porción de disolvente en movimiento y como fase estacionaria a las partículas.

Tswett acuñó el nombre de cromatografía (del griego *chroma*: color, y *graph*: escritura; la escritura de color) para describir su colorido experimento.



Figura 10. Experimento de Tswett's.

2.6.1.1 Técnicas de Cromatografía de Líquidos (CL).

En general, la cromatografía de líquidos se puede realizar utilizando técnicas planas o técnicas de columna. La cromatografía de líquidos en columna es la más potente y tiene mayor capacidad para la muestra. En todos los casos, la muestra se disuelve primero en un líquido.

2.6.1.1.1 Cromatografía en Capa Fina (CCF).

Se trata de una técnica plana en la que la muestra fluye a través de una capa delgada de partículas cromatográficas (fase estacionaria) fijadas sobre la superficie en una placa de vidrio (Figura 11). El borde inferior de la placa se coloca en un disolvente. El flujo es creado por la acción capilar del disolvente (fase móvil) que se difunde en la capa de partículas secas.

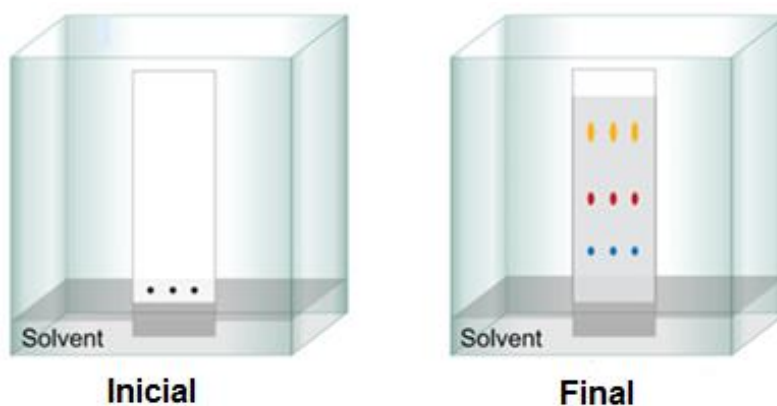


Figura 11. Cromatografía en capa fina (CCF).

2.6.1.1.2 Cromatografía en Columna.

En esta técnica la muestra pasa por una columna que contiene partículas adecuadas para el tipo de separación que se desee (fase estacionaria) y el disolvente (fase móvil) que fluye a través de la columna. Los compuestos de la muestra se separan por viajar a diferentes velocidades a través de la columna. Se utilizan diversos disolventes para la separación de los componentes (Figura 12).

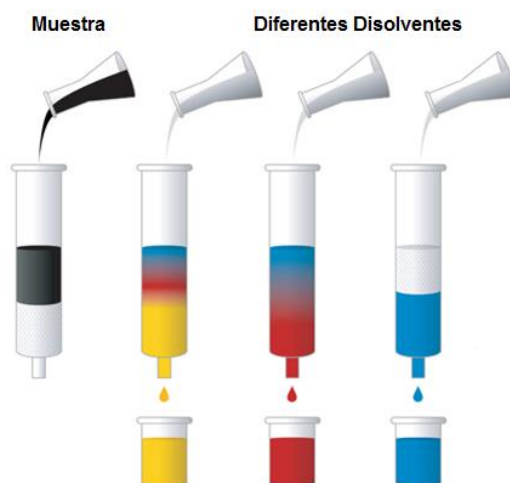


Figura 12. Cromatografía en columna.

Algunas columnas no pueden soportar la presión, por lo cual el flujo se logra mediante gravedad o vacío, como en las columnas de vidrio abiertas. Generalmente, las partículas en este caso son más grandes de diámetro (> 50 micras) de modo que hay menos resistencia al flujo. Las partículas más pequeñas (< 10 micras) presentan mayor resistencia al flujo, por ello se necesitan presiones más altas para crear la tasa de flujo de disolvente deseada. Se utilizan bombas y columnas diseñadas para soportar una alta presión para el flujo del disolvente a través de la columna cromatográfica, esta técnica se denomina HPLC.

2.6.1.1.3 Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC).

Las siglas HPLC fueron acuñadas por Csaba Horváth e indican el hecho de que se utiliza alta presión para generar el flujo necesario para la cromatografía de líquidos en columnas. La técnica realmente comenzó a tomar fuerza a mediados y finales de la década de 1970 debido a su alta eficiencia. Actualmente es una de las herramientas más poderosas en la química analítica. Tiene la capacidad de separar, identificar y cuantificar los compuestos que están presentes en una gran variedad de muestras que se pueden disolver en un líquido. Hoy en día, compuestos en concentraciones tan bajas como partes por billón (ppb) pueden ser fácilmente identificados. Esta técnica se ha aplicado a casi cualquier muestra,

tales como productos farmacéuticos, alimentos, cosméticos, matrices ambientales, muestras forenses, productos químicos industriales y naturales, entre otros.

El sistema por el cual trabaja la cromatografía de líquidos de alta eficiencia parte de un depósito que contiene el disolvente (fase móvil), luego una bomba de alta presión que funciona como un sistema que suministra el disolvente y se utiliza para generar un flujo específico. Luego existe un inyector, el cual es capaz de introducir (inyectar) la muestra en la corriente de la fase móvil que fluye continuamente por la columna que contiene el material cromatográfico empaquetado necesario para efectuar la separación, este material de empaquetamiento se llama fase estacionaria. También se requiere de un detector para ver las bandas de los compuestos separados, ya que la mayoría de los compuestos no tienen color. Posteriormente, la fase móvil sale del detector y puede ser enviada a los residuos o ser colectada.

Con respecto al detector, éste se encuentra conectado a una computadora, que es el componente del sistema que registra la señal necesaria para generar un cromatograma en la pantalla y para identificar y cuantificar la concentración de los constituyentes de la muestra. Los detectores utilizados son diferentes, dependiendo de las características de los compuestos, si un compuesto puede absorber luz ultravioleta, se utiliza un detector de absorbancia UV. Si el compuesto emite fluorescencia, se utiliza un detector de fluorescencia, etc., este proceso se ejemplifica en la Figura 13.

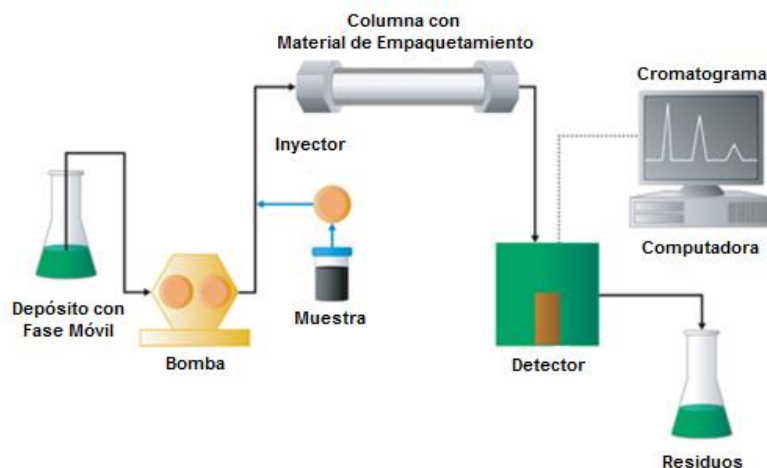


Figura 13. Sistema HPLC.

El modo en el que se lleva a cabo la separación de los compuestos es el siguiente: La fase móvil entra en la columna y pasa a través de ella, después de unos minutos, los componentes se desplazan de manera diferente, esto es porque existe una competencia entre la fase móvil y la fase estacionaria para la atracción de cada uno de los componentes o analitos. Dado que cada banda de compuestos se mueve a una velocidad diferente, es posible separar e identificar por cromatografía (<http://www.waters.com>).

2.6.2 Resonancia magnética nuclear (RMN).

La resonancia magnética nuclear fue descubierta en el año 1945-1946 por dos grupos de físicos, pero actualmente es una técnica utilizada en diversos campos. Se ha popularizado entre la Física, Química, Bioquímica, Farmacia, Fisiología, Veterinaria, Medicina, entre otras. Particularmente, es utilizada sobre todo por los químicos como herramienta para la elucidación de la estructura y la confirmación de los compuestos sintetizados y naturales. La energía irradiada sólo puede interactuar con el estado cuántico de espín nuclear, si un campo magnético producido artificialmente afecta a la generación de dos niveles de energía diferentes, puede medirse (Holzgrabe, 2008).

Un protón está cargado de partículas elementales y su movimiento se traduce en la generación de un campo magnético, por lo tanto, los protones podrían ser descritos como imanes elementales. El fenómeno de resonancia magnética nuclear se puede describir de la siguiente manera: si una muestra se coloca en un campo magnético y se somete a energía de radiofrecuencia (RF) de radiación (energía) a la frecuencia apropiada, los núcleos en la muestra puedan absorber la energía.

La frecuencia de la radiación necesaria para la absorción de la energía depende de tres factores. Primero, la característica del tipo de núcleo (por ejemplo, ^1H o ^{13}C). Segundo, la frecuencia depende del entorno químico del núcleo. Por ejemplo, los protones de metilo e hidroxilo de metanol absorben a diferentes frecuencias, y

los protones amida de dos residuos de triptófano diferentes en una proteína nativa absorben a diferentes frecuencias ya que están en diferentes ambientes químicos. La frecuencia también depende de la ubicación espacial en el campo magnético si ese campo no es uniforme en todas partes. Después de la absorción de energía por los núcleos, la longitud de tiempo y la manera en que los núcleos disipan la energía también se puede utilizar para revelar información sobre una variedad de compuestos (James, 1998).

2.7 Ensayo de Citotoxicidad.

Las investigaciones iniciales sobre plantas utilizadas para el tratamiento del cáncer, son generalmente ensayos basados en líneas celulares, en las que el efecto tóxico de los extractos de plantas o compuestos aislados puede ser medido. Según el Instituto Nacional del Cáncer (INC), los extractos de plantas y compuestos puros que presentan valores de actividad citotóxica $DE_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$ y $\leq 4 \mu\text{g/mL}$, respectivamente, se consideran activos (Alonso-Castro, 2011).

2.7.1 Fundamento del ensayo de sulforodamina B.

La sulforodamina B (SRB) es un colorante fluorescente usado ampliamente en las ciencias biológicas, incluyendo los estudios *in vivo*. Particularmente, se ha utilizado considerablemente como medio de contraste en las ciencias biológicas. El ensayo con SRB es un método bien conocido para medir la citotoxicidad inducida por un fármaco y la proliferación celular *in vitro* (Kitamura, 2013).

El ensayo se basa en que la sulforodamina B (colorante de aminoxantano, rosado brillante) posee dos grupos sulfónicos $-\text{SO}_3^-$ (Figura 14) cargados negativamente, los cuales, son capaces de unirse electrostáticamente a cationes. Entonces, en condiciones ácidas (disuelta en ácido acético 1%), la SRB aumenta su afinidad por los aminoácidos básicos de las proteínas, y se fija selectivamente a éstos, proporcionando una relación del contenido de proteína celular.

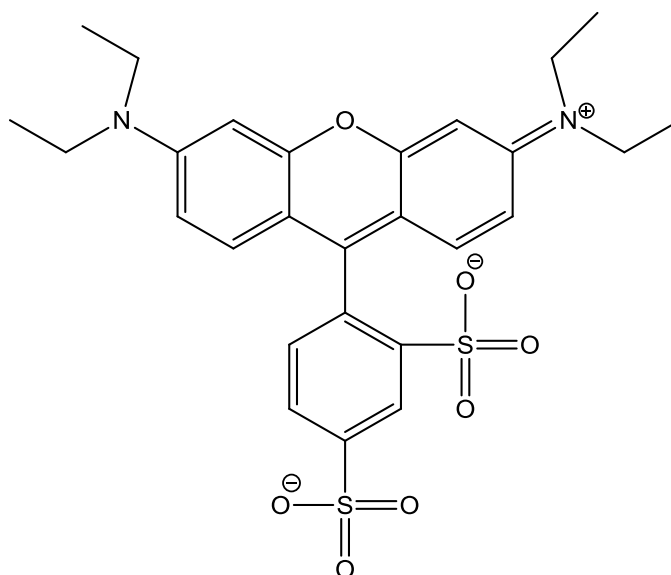


Figura 14. Estructura de la sulforodamina B.

Las células son previamente fijadas con ácido tricloroacético (TCA), posteriormente se elimina el colorante no fijado, mientras que el colorante unido a las células viables se extrae con medio alcalino (Solución de Tris pH 10.5) y para la determinación de la densidad óptica se lee la absorbancia a 564 nm en una placa de microtitulación de 96 pozos (Skehan, 1990).

La evaluación colorimétrica proporciona una estimación de la masa total de proteína que está relacionada con el número de células. El método ha sustituido a los ensayos con tetrazolium ya que presenta un considerable número de ventajas como: mejor linealidad, mayor sensibilidad y menor costo (Papazisis, 1997). Además, proporciona un punto final colorimétrico que es no destructivo, indefinidamente estable y visible a simple vista (Skehan, 1990).

3 HIPÓTESIS

En la búsqueda de compuestos novedosos de origen natural, el conocimiento etnobotánico y la información quimiotaxonómica han sido importantes herramientas de información acerca de los usos y actividad biológica del género *Hyptis*. En este caso, de la especie *Hyptis brevipes* se espera que, partiendo de procesos de fraccionamiento empleando diferentes disolventes y metodologías, se obtendrán diversas fracciones en donde se concentrarán e identificarán compuestos de tipo 5,6-dihidro-alfa-pironas, por lo cual, estas fracciones presentarán la inhibición del crecimiento de células derivadas de carcinomas de humano.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general.

Esta investigación tiene como objetivo general registrar los perfiles cromatográficos de diferentes fracciones de la especie *Hyptis brevipes*, para así, identificar a las 5,6-dihidro-alfa-pironas presentes y determinar la actividad biológica de las fracciones como agentes anticancerígenos.

4.2 Objetivos específicos.

- 4.2.1. Obtener los extractos de diclorometano de cada una de las diferentes colectas de *Hyptis brevipes*.
- 4.2.2. Realizar el fraccionamiento de los extractos mediante procesos cromatográficos y/o métodos de partición.
- 4.2.3. Establecer los perfiles cromatográficos de las fracciones que presenten señales características de 5,6-dihidro-alfa-pironas en el análisis por RMN.
- 4.2.4. Identificar a las 5,6-dihidro-alfa-pironas en las fracciones mediante el uso de HPLC, utilizando como referencia compuestos previamente aislados de la misma especie.
- 4.2.5. Evaluar la citotoxicidad de las fracciones en donde se identificaron a las 5,6-dihidro-alfa-pironas sobre las líneas celulares MCF-7 (carcinoma de mama) y KB (carcinoma nasofaríngeo).
- 4.2.6. Aislar a los compuestos novedosos bioactivos a partir de las fracciones de *Hyptis brevipes* y elucidar su estructura molecular.

5 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

5.1 Material vegetal.

Se trabajó con siete colectas de las partes aéreas de la especie *Hyptis brevipes*, todas ellas provenientes del estado de Veracruz, pero de diversas zonas y fechas, la identificación y la recolección del material vegetal se realizó por la bióloga Adriana Hernández Rojas. Los ejemplares de las especies se depositaron en el Herbario del Instituto de Ecología en Xalapa, Veracruz. Los datos de cada colecta se presentan en la Tabla 3.

5.2 Extracción del material vegetal.

Cada colecta se secó, se molió y se sometió a un proceso de maceración exhaustiva con diclorometano. Al término de cada una de las extracciones, los macerados se filtraron y se concentraron a sequedad a presión reducida, los rendimientos obtenidos se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Datos de las colectas de <i>Hyptis brevipes</i> .					
Clave	Lugar de colecta	Fecha de colecta	Voucher	Material vegetal (g)	Extracto CH ₂ Cl ₂ (g)
A	Miradores del Mar, E. Zapata.	20-Nov-11	XAL 00001400	4033.9	178.0
B	El castillo, El lencero	21-Nov-10	XAL 0001416	100.3	5.7
C	Miradores del Mar, E. Zapata	06-Dic-10	XAL 0001460	100.0	2.1
D	Dos Ríos, E. Zapata.	13-Nov-11	XAL 0001403	100.0	4.4
E	Dos Ríos, E. Zapata.	20-Nov-11	XAL 0001401	100.1	3.9
F	Miradores del Mar. E. Zapata.	04-Dic-09	XAL 0000291	283.1	16.1
G	Carretera Federal 125 Angostillo.	08-Ene-13	XAL 0001395	883.52	41.0

5.2.1 Fraccionamiento primario del extracto orgánico A.

Los extractos de las colectas identificadas con las claves A y B se sometieron a un fraccionamiento primario con metanol para separar a los triterpenos mediante su precipitación.

La metodología consistió en la disolución de un gramo de extracto en 50 mL de metanol, se dejó reposando a una temperatura $< 0^{\circ}\text{C}$ durante dos días y enseguida se filtró con vacío. El sólido obtenido se lavó con metanol frío y el filtrado se concentró en el rotaevaporador hasta aproximadamente la mitad de su volumen original, se dejó reposando nuevamente a una temperatura $< 0^{\circ}\text{C}$ por un día más.

Por último, se realizó una segunda filtración para asegurar la eliminación de la mayor parte de componentes de baja polaridad y se concentró a sequedad en el rotaevaporador obteniéndose 88.7 g de un residuo verdoso libre de triterpenos de la colecta A y 2.0 g de la colecta B.

5.2.2 Fraccionamiento por partición de los extractos orgánicos B-G.

Los extractos totales obtenidos de las colectas con clave B-G se fraccionaron mediante un proceso de partición. Se disolvieron 2 g de cada extracto en 75 mL de hexano, para mejorar la disolución se dejó por 30 min en agitación magnética. Posteriormente, se realizaron extracciones por triplicado con una mezcla de MeOH-H₂O (4:1).

La fracción de MeOH-H₂O (4:1) se concentró en el rotaevaporador aproximadamente a una quinta parte. A continuación, se llevó a cabo una extracción con acetato de etilo, y finalmente se concentraron a sequedad cada una de las fracciones.

En la Figura 15 se describe el proceso de partición y en la Tabla 4 se muestran los pesos obtenidos de cada una de las fracciones obtenidas.

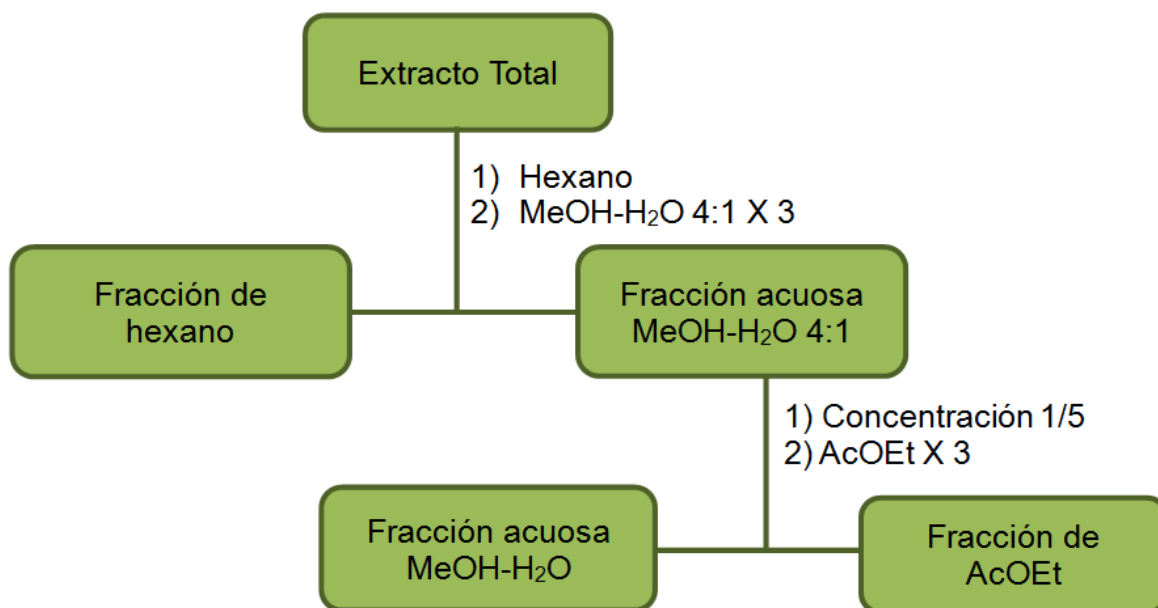


Figura 15. Proceso de partición de las colectas con las claves B-G.

Tabla 4. Peso de las fracciones obtenidas del proceso de partición de *Hyptis brevipes*.

FRACCIÓN	B (g)	C (g)	D (g)	E (g)	F (g)	G (g)
Hexano	0.75	0.78	0.97	1.49	5.86	7.35
AcOEt	0.52	0.55	0.58	1.09	2.83	11.92
MeOH-H ₂ O	0.09	0.09	0.21	0.17	0.49	1.16

5.3 Técnicas Cromatográficas.

5.3.1 Fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta del extracto orgánico A.

Dentro de las técnicas analíticas utilizadas se encuentra la cromatografía en columna abierta. Esta técnica se utilizó para el fraccionamiento secundario del extracto orgánico A. Para ello, partiendo de la fracción libre de triterpenos de la colecta A se consideró el tamaño de la columna a utilizar, ya que mientras mejor resolución se lograra, la separación de los compuestos sería mejor. Se trabajó con una columna de 78 cm de altura por 4.75 cm de radio, resultando un volumen de 5528.81 cm³.

Ecuación	Sustituyendo
$V = \pi r^2 h$ donde;	$V = (3.1416)(4.75\text{cm})^2(78\text{cm})$
$\pi = 3.1416$	$V = 5528.81\text{ cm}^3$
$r = \text{radio}$	
$h = \text{altura}$	

Para empacar la columna se empleó gel de sílice 60 Merck (70-230 mesh) como fase estacionaria, en una relación 1:17.5. La fracción de metanol libre de triterpenos se disolvió en CH₂Cl₂, luego se absorbió en 150 g de gel de sílice y se dejó secar. Enseguida, la columna cromatográfica se empacó con una suspensión de 1400 g de gel de sílice en hexano. Finalmente, se realizó la siembra del punto de aplicación. Para proceder a la resolución de la muestra, se colectaron eluatos de 500 mL, el proceso de elución se inició con hexano y posteriormente se utilizó un gradiente de polaridad con mezclas de hexano-diclorometano, diclorometano-acetona y acetona-metanol para finalizar con metanol.

En la Tabla 5, se resume este fraccionamiento, así como los sistemas de elución empleados.

Tabla 5. Fraccionamiento secundario del extracto orgánico A de *Hyptis brevipes*.

Fracción	Fase Móvil	Proporción	Fracción	Fase Móvil	Proporción
1-3	Hexano	100 %	68-71	CH ₂ Cl ₂ - Acetona	45:55
4-7	Hexano- CH ₂ Cl ₂	7:3	72-75		4:6
8-11		1:1	76-79		35:65
12-15		3:7	80-83		3:7
16-19	CH ₂ Cl ₂	100 %	84-87		2:8
20-23	CH ₂ Cl ₂ - Acetona	97:3	88-91	Acetona	1:9
24-27		94:6	92-95		100 %
28-30		91:9	96-99	Acetona- MeOH	9:1
31-36		88:12	100-103		8:2
37-40		85:15	104-109		7:3
41-43		8:2	110-113		6:4
44-47		75:25	114-116		1:1
48-51		7:3	117-119		4:6
52-55		65:35	120-122		3:7
56-59		6:4	123-125		2:8
60-63		55:45	126-128		1:9
64-67		1:1	129-135		MeOH

5.3.2 Cromatografía en Capa Fina (CCF).

El seguimiento del fraccionamiento indicado en el inciso 5.3.1 se realizó mediante una cromatografía en capa fina, se manejaron cromatoplasmas de aluminio recubiertas con gel de sílice 60-F₂₅₄ (Merck), estas se observaron en la cámara de luz UV a dos diferentes longitudes de onda (254 nm y 365 nm) para detectar a los componentes presentes en las muestras, posteriormente, estas placas fueron reveladas con una solución cromógena de H₂SO₄-sulfato cérico, desarrollando color por calentamiento en una parrilla.

Cada una de las 135 fracciones se analizó por CCF, para ello, se eligieron los sistemas de fase móvil que permitieran la mejor resolución de los componentes presentes en cada fracción, reuniéndose aquellas similares y obteniéndose a cabo

de este proceso un conjunto de 9 fracciones finales (Tabla 6). En la Figura 16 se presenta el proceso total mediante el cual se llegó a las fracciones finales.

Tabla 6. Reuniones del fraccionamiento secundario del extracto orgánico A de *Hyptis brevipes*.

Número de fracción	Reunión de fracciones	Número de fracción	Reunión de fracciones
1-2	AA	37-40	AF
3		41-70	AG
4-11	AB	71-92	
12-16		93-101	
17	AC	102-105	AH
18-23		106-111	
24-26		112-121	
27-30	AD	122-129	AI
31-36	AE	130-135	

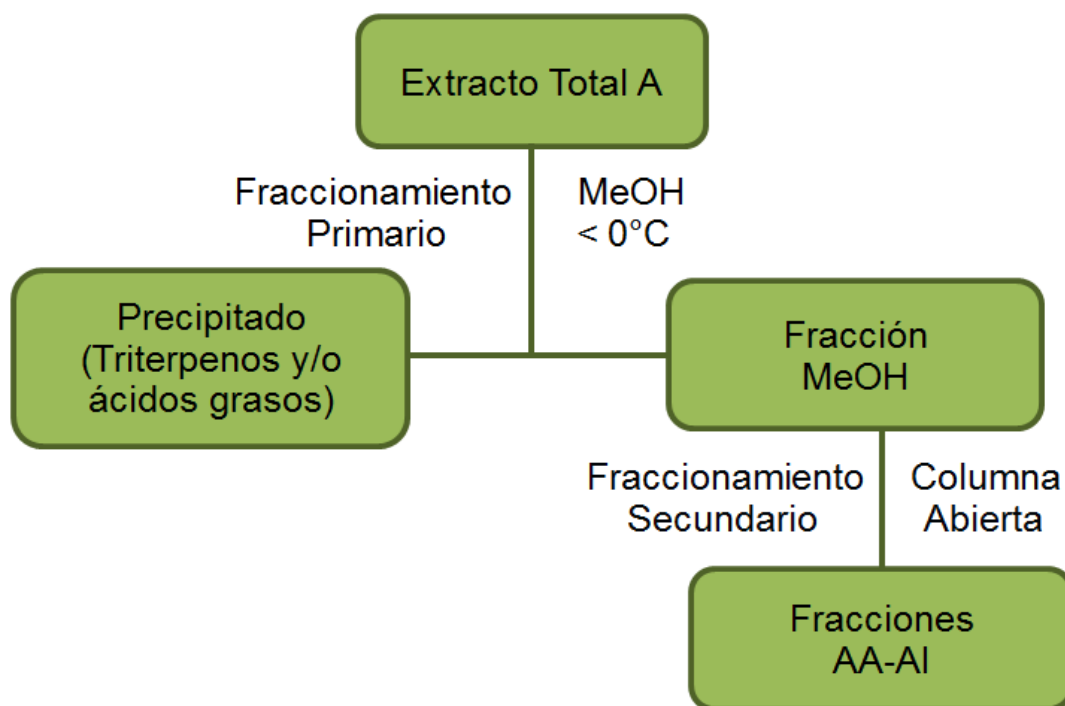


Figura 16. Proceso de obtención de las fracciones finales del extracto orgánico A.

5.3.3 Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC) a nivel analítico.

Se establecieron las condiciones analíticas para el desarrollo de un óptimo perfil cromatográfico y por lo tanto establecer la información adecuada para la identificación de 5,6-dihidro-alfa-pironas en cada fracción analizada.

Para ello se utilizaron diferentes condiciones en fase reversa y el sistema que permitió la mejor resolución de los picos, así como sus tiempos de retención es resumido en la Tabla 7.

Tabla 7. Condiciones utilizadas en HPLC a nivel analítico.	
Variable	Condición
Fase estacionaria	Symmetry C-18 (4.6 x 250 mm x 5µm)
Fase móvil	Acetonitrilo-Agua (4:6)
Flujo	0.4 mL/min
Detector	UV, λ: 254 nm
Volumen de inyección	20 µL
Concentración de muestras y referencias.	1 mg/100 µL = 0.01 mg/µL

5.3.4 Preparación de referencias y muestras de análisis.

Para poder identificar a las 5,6-dihidro-alfa-pironas presentes en las diferentes fracciones trabajadas, primero se prepararon siete referencias de 5,6-dihidro-alfa-pironas (**1-7**) y una flavona (**8**) que habían sido aisladas previamente por el grupo de investigación de la misma especie. La estructura de las referencias se muestra en la Figura 19 en la sección 6.2.1.

Posteriormente, también se prepararon las muestras para identificar a las 5,6-dihidro-alfa-pironas. Tanto las referencias como las muestras fueron analizadas a la misma concentración y condiciones descritas en la Tabla 7.

5.3.5 Identificación de 5,6-dihidro-alfa-pironas en las fracciones obtenidas.

La identificación de las 5,6-dihidro-alfa-pironas en cada muestra se llevó a cabo por la comparación de los perfiles cromatográficos, en su mayoría por los tiempos de retención, pero en algunos casos, debido a que los tiempos eran muy similares entre otras referencias, se procedió a realizar coeluciones.

Las coeluciones que se realizaron entre las referencias y las muestras a analizar se prepararon tomando 10 μL de cada uno. Posteriormente, para homogeneizar la mezcla se sonicaron durante 10 min y se inyectaron 20 μL en el HPLC bajo las condiciones descritas en la Tabla 7.

5.3.6 Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (HPLC) a nivel preparativo.

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia se utilizó para el aislamiento de los compuestos de interés, las condiciones cromatográficas utilizadas son las que se describen en la Tabla 8.

Tabla 8. Condiciones utilizadas en HPLC a nivel preparativo.	
Variable	Condición
Fase estacionaria	Symmetry C-18 (19 × 300 mm, 7 μm)
Fase móvil	Acetonitrilo-Agua (4:6)
Flujo	9.0 mL/min
Detector	UV, λ : 254 nm
Volumen de inyección	500 μL
Concentración	50 mg/500 μL = 0.1 mg/ μL

5.4 Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Otra técnica utilizada para la identificación de las 5,6-dihidro-alfa-pironas (**1-7**) y de la flavona (**8**) (Ver sección 6.2.1, Figura 19) fue la Resonancia Magnética Nuclear

Protónica (RMN-¹H), los espectros fueron registrados en un equipo Varian Unity-Inova a 400 MHz utilizando como disolvente cloroformo deuterado (CDCl₃).

De cada muestra se trabajó con 5 a 10 mg y los desplazamientos químicos son expresados en ppm. Se compararon las señales entre los espectros de las referencias y los registrados para cada muestra.

5.5 Ensayo de Citotoxicidad.

Se utilizaron dos líneas celulares: carcinoma nasofaríngeo (KB) y carcinoma de mama (MCF-7). Estas líneas se mantuvieron en medio RMPI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal. Ambas líneas se cultivaron a 37 °C bajo atmósfera de CO₂ al 5% en aire y 100% de humedad relativa. Las células se utilizaron cuando estaban en la fase logarítmica de crecimiento.

La citotoxicidad se determinó usando el ensayo de Sulforodamina B (SRB) en placas de 96 pozos de 250 µL, colocando en cada uno de los pozos 190 µL de las suspensiones celulares, previamente, se habían adicionado 10 µL de las muestras a las diferentes concentraciones a evaluar por triplicado. En el caso de las fracciones secundarias de la colecta A se emplearon concentraciones de 0.16-20 µg/mL. Por otra parte, las fracciones derivadas de las colectas B-G solo se evaluaron a las concentraciones de 2 y 20 µg/mL.

También se prepararon controles utilizando 190 µL de suspensión celular y 10 µL de DMSO al 10%, los controles positivos fueron vinblastina y colchicina. Tanto las muestras a analizar como los controles se incubaron a 37 °C por 72 hrs.

Finalizando este periodo, las células se fijaron con 50 µL de ácido tricloroacético (TCA) al 50% y se incubaron a 4 °C por 30 min, posteriormente se lavaron con agua corriente y se tiñeron con sulforodamina B (0.4%) en ácido acético (1%) durante 30 min.

El exceso de tinción se eliminó lavando con ácido acético al 1% y se secaron en la campana de extracción. A continuación, el colorante unido a las proteínas se solubilizó agitando con 200 µL de Tris base 10 mM (tris-hidroximetil-aminometano)

a un pH=10 por 5 min. Finalmente, se registró la densidad óptica en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 564 nm.

El porcentaje del crecimiento celular se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\left(\frac{M-I}{C-I} \right) \times 100, \text{ donde}$$

M = Promedio de la densidad óptica de las muestras.

I = Promedio de la densidad óptica inicial.

C = Promedio de la densidad óptica de los controles.

Finalmente, se determinó la CI_{50} utilizando el programa Jandel Scientific, únicamente cuando se emplearon cuatro concentraciones.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados derivados del presente proyecto de investigación se resumen en dos partes, en la primera se describen las etapas de extracción y fraccionamiento de todas las colectas de *Hyptis brevipes* utilizadas. La segunda parte detalla los análisis cromatográficos a nivel analítico y preparativo, así como los estudios de RMN que permitieron identificar a los principios citotóxicos de interés, en particular a los derivados de las 5,6-dihidro- α -pironas.

6.1 Fraccionamiento de las muestras.

6.1.1 Fraccionamiento primario.

Se compararon dos procesos de fraccionamiento primario con la finalidad de precipitar a los triterpenos presentes y facilitar la separación de las 5,6-dihidro- α -pironas, los procesos son:

- a) Precipitación de triterpenos con metanol (colectas A-B).
- b) Fraccionamiento mediante partición (colectas B-G).

En la Figura 17 se presenta una cromatoplaaca que compara las diferentes fracciones obtenidas de la colecta B donde se emplearon ambos procesos: (1) extracto total de diclorometano; (2) fracción de hexano; (3) fracción de acetato de etilo; (4) fracción de MeOH-H₂O; y (5) fracción de MeOH.

Estos resultados, permitieron la selección del proceso de partición como método de fraccionamiento primario para las colectas B-G. El proceso de partición, presentó los siguientes beneficios:

- 1) Optimización de recursos en el proceso total de fraccionamiento y la obtención de las fracciones finales.

- 2) Menor tiempo requerido para el proceso total de fraccionamiento de las muestras a analizar.

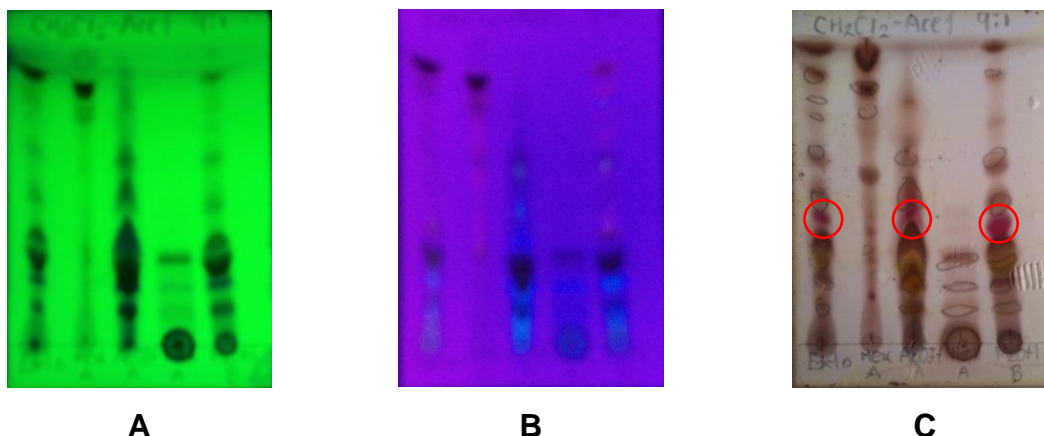


Figura 17. Cromatoplaqa de la comparación entre el proceso metanólico y el proceso de partición. Sistema de Elución CH₂Cl₂-acetona (9:1). Lámpara de UV: (A) Longitud de onda 356 nm, (B) Longitud de onda 254 nm, (C) Revelado con mezcla H₂SO₄-sulfato cérico. En círculos rojos se resalta la presencia de triterpenos.

6.1.2 Fraccionamiento secundario.

El fraccionamiento secundario por columna abierta en gel de sílice de la colecta A permitió obtener 9 fracciones (Ver sección 5.3.2, Tabla 6). En la Figura 18 se presenta la cromatoplaqa con las fracciones finales de este proceso. El análisis por CCF y RMN permitió la selección de las fracciones AE y AF para la búsqueda de compuestos de tipo 5,6-dihidro-alfa-pirona.

6.2 Aplicación de Perfiles Cromatográficos y Espectros de RMN.

6.2.1 Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia.

En la cromatografía de líquidos de alta eficiencia se buscaron las condiciones que otorgaran la mejor resolución de los picos, y por tanto, el mejor perfil cromatográfico de cada fracción y las referencias.

La Figura 19 presenta la estructura de las referencias a identificar, las cuales se aislaron en un estudio previo realizado con la misma especie (Suárez-Ortíz, 2013), como puede observarse, **3** y **4** son isómeros, el primero en posición *cis* y el segundo en posición *trans*; y finalmente, **5** en posición *trans* y **6** en posición *cis*.

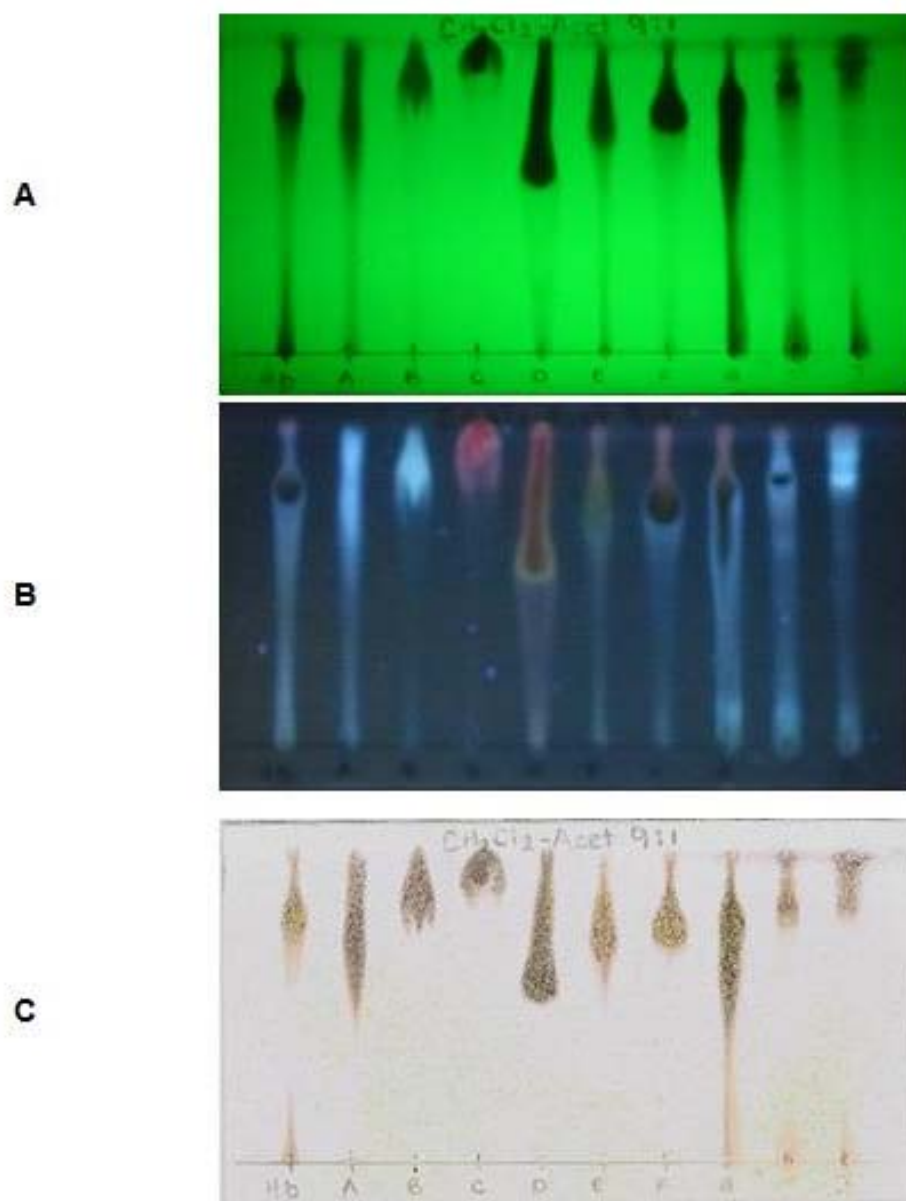


Figura 18. Cromatoplate de las fracciones finales de la colecta A. Sistema de Elución CH₂Cl₂-acetona (9:1). Lámpara de UV: (A) Longitud de onda 356 nm, (B) Longitud de onda 254 nm, (C) Revelado con mezcla H₂SO₄-sulfato cérico.

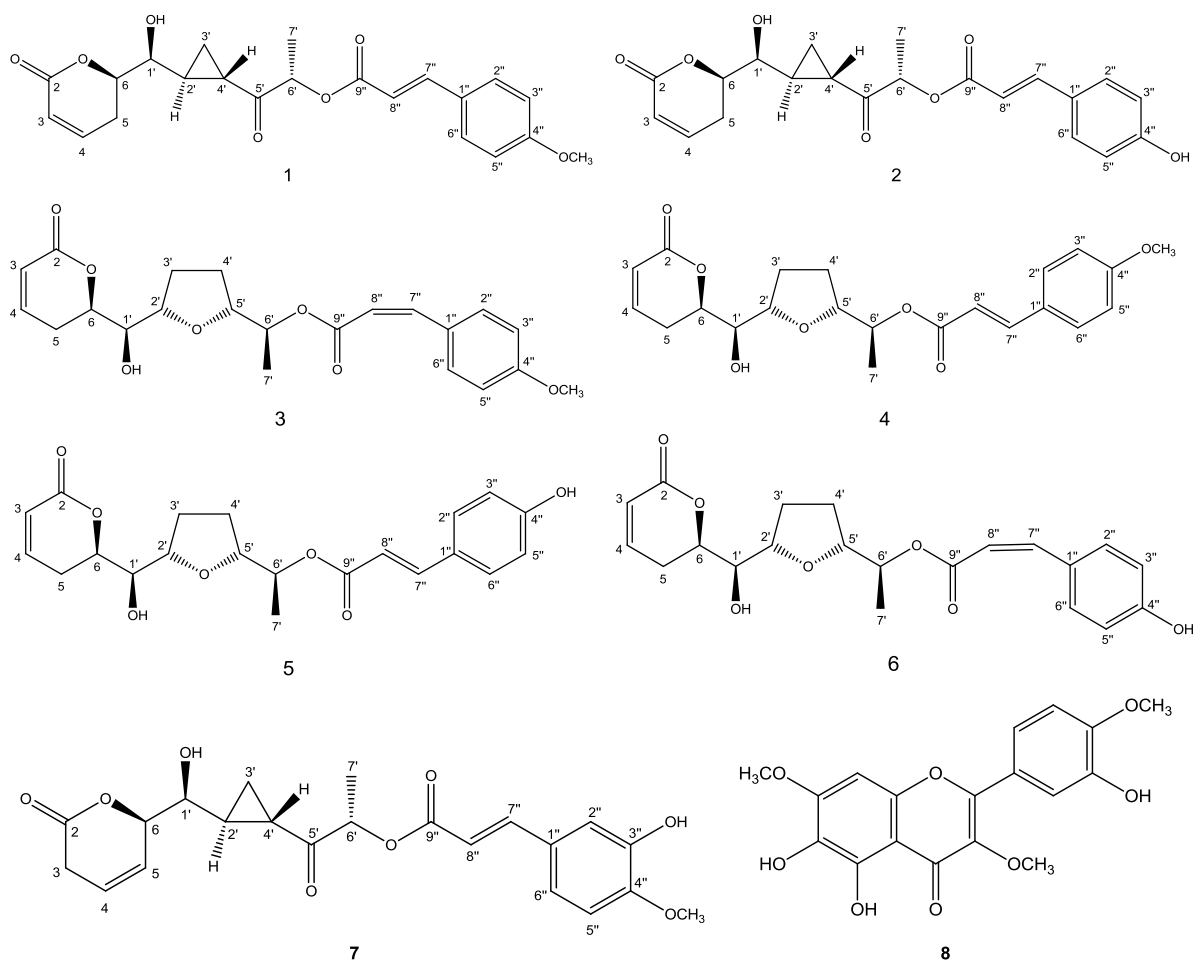


Figura 19. Compuestos aislados de *Hyptis brevipes* en estudios previos. Derivados de 5,6-dihidro- α -pironas con anillo ciclopropano (**1**, **2** y **7**) y anillo tetrahidrofurano (**3-6**). 5,6,3'-trihidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona (**8**).

Para identificar a las referencia(s) presentes en cada fracción analizada, se procedió a la obtención de los perfiles cromatográficos por HPLC. Para cada referencia se determinaron los tiempos de retención (Tabla 9), se enuncian dos tiempos de retención para cada referencia, ya que se encuentran en equilibrio ambas estructuras, dependiendo del desplazamiento del equilibrio se observa en los cromatogramas picos más grandes o más pequeños. Estos fueron registrados bajo la metodología y condiciones descritas en la Tabla 7 (Ver Procedimiento Experimental, inciso 5.3.3).

Tabla 9. Tiempos de retención de las referencias de *Hyptis brevipes*.

Referencia	Tiempo de Retención (min)	
1	51.10	55.44
2	18.69	20.86
3	70.79	76.19
4	73.80	79.03
5	30.07	31.93
6	25.0	26.67
7	17.77	19.68
8	17.19	

Una vez determinados los tiempos de retención de las referencias se procedió a identificar en cada fracción las 5,6-dihidro-alfa-pironas mediante:

- 1) Comparación de tiempos de retención;
- 2) Coeluciones; y
- 3) Comparación de señales en los espectros de resonancia magnética nuclear.

Para el análisis cromatográfico, se trabajó con dos de las fracciones de la colecta A, conseguidas mediante la columna abierta y las fracciones de AcOEt de las colectas B-G.

6.2.2 Resonancia magnética nuclear.

Se procedió con la adquisición de los espectros de RMN de cada una de las fracciones, con la finalidad de seleccionar aquellos que manifestaran las señales características de 5,6-dihidro-alfa-pironas, y así, poder identificar en ellos las referencias (compuestos **1** a **8**, Figura 19), o incluso, encontrar compuestos novedosos.

En la Tabla 10 se presentan los desplazamientos químicos de las referencias **1** a **6**, esta información se utilizó en la búsqueda e identificación de éstos compuestos en los espectros de RMN de cada fracción, en particular, las señales que corresponden a las posiciones 3 y 4 de la 5,6-dihidro-alfa-pirona presente en la estructura química.

En los espectros presentados en este apartado se observan señales de anillos de tipo ciclopropano y tetrahidrofurano, algunas de las señales se observan sobrepuestas, debido a que cada fracción debería presentar más de una 5,6-dihidro-alfa-pirona y quizás, otros compuestos como flavonas.

Tabla 10. Desplazamientos químicos de las referencias de 5,6-dihidro-alfa pironas (1-6) aisladas de *Hyptis brevipes*.

POSICIÓN	1 δ_H (J en Hz)	2 δ_H (J en Hz)	3 δ_H (J en Hz)	4 δ_H (J en Hz)	5 δ_H (J en Hz)	6 δ_H (J en Hz)
3	6.04 ddd (9.7, 2.0, 0.8)	6.04 ddd (9.7, 2.5, 0.8)	5.93 dd (9.8, 1.5)	5.96 dd (9.8, 1.6)	5.97 dd (9.8, 1.6)	5.93 dd (9.8, 1.6)
4	7.00 ddd (9.7, 6.5, 2.2)	6.98 ddd (9.7, 6.2, 2.2)	6.78 ddd (9.8, 5.8, 2.7)	6.88 ^a	6.88 ddd (9.8, 5.9, 2.6)	6.77 ddd (9.8, 5.8, 3.0)
5ax	2.71 dddd (18.6, 12.3, 2.2, 2.0)	2.71 dddd (18.5, 12.3, 2.5, 2.2)	2.37 ddd (18.7, 11.1, 2.7)	2.48 ddd (18.8, 11.0, 2.6)	2.50 ddd (18.8, 11.1, 2.6)	2.34 ddd (18.4, 11.0, 2.6)
5ec	2.53 dddd (18.6, 6.5, 4.0, 0.8)	2.53 dddd (18.5, 6.2, 4.0, 0.8)	2.51 ddd (18.7, 5.4, 2.7)	2.70 ddd (18.8, 5.4, 0.9)	2.70 ddd (18.8, 4.9, 1.3)	2.47 ddd (18.4, 5.1, 1.3)
6	4.53 ddd (12.3, 4.0, 3.8)	4.54 ddd (12.3, 4.0, 3.8)	4.24 ddd (11.1, 8.4, 4.5)	4.34 ^a	4.36 ^a	4.23 ddd (11.0, 8.4, 4.5)
1'	3.73 dd (6.3, 3.8)	3.71 dd (6.3, 3.8)	3.46 t sa	3.56 dd (8.0, 1.7)	3.59 dd (8.2, 1.8)	3.51 dd (8.5, 1.4)
2'	1.60 dddd (8.9, 6.3, 6.3, 3.4)	1.63 dddd (8.9, 6.3, 6.3, 3.4)	4.36 dd (6.4, 6.4)	4.34 ^a	4.36 ^a	4.36 dd (6.8, 6.8)
3'	---	---	1.97 m	1.97 m	1.99 m	1.97 m
3'proS	1.35 ddd (8.9, 4.0, 3.9)	1.37 ddd (8.9, 4.0, 4.0)	---	---	---	---
3'proR	1.12 ddd (8.0, 6.3, 4.0)	1.14 ddd (8.3, 6.3, 4.0)	---	---	---	---
4'	2.28 ddd (8.0, 3.9, 3.4)	2.29 ddd (8.3, 3.9, 3.4)	2.06 m	2.08 m	2.10 m	2.08 m
4'	---	---	1.77 m	1.80 m	1.80 m	1.76 m
5'	---	---	3.96 c (6.9)	4.00 c (7.1)	4.00 c (7.1)	3.95 c (7.1)
6'	5.30 q (7.0)	5.31 q (7.0)	4.97 q (6.4)	5.03 q (6.5)	5.04 q (6.5)	4.97 q (6.5)
7'	1.54 d (7.0)	1.54 d (7.0)	1.25 d (6.4)	1.28 d (6.5)	1.29 d (6.5)	1.24 d (6.5)
1''	---	---	---	---	---	---
2''	7.49 d (8.9)	7.39 d (8.5)	7.72 d (8.7)	7.47 d (8.7)	7.38 d (8.6)	7.67 d (8.6)
3''	6.91 d (8.9)	6.83 d (8.5)	6.87 d (8.7)	6.88 d (8.7) ^a	6.84 d (8.6)	6.82 d (8.6)
4''	---	---	---	---	---	---
5''	6.91 d (8.9)	6.83 d (8.5)	6.87 d (8.7)	6.88 d (8.7) ^a	6.84 d (8.6)	6.82 d (8.6)
6''	7.49 d (8.9)	7.39 d (8.5)	7.72 d (8.7)	7.47 d (8.7)	7.38 d (8.6)	7.67 d (8.6)
7''	7.70 d (16.0)	7.64 d (15.9)	6.88 d (12.8)	7.65 d (15.9)	7.62 d (15.9)	6.83 d (12.8)
8''	6.38 d (16.0)	6.31 d (15.9)	5.82 d (12.8)	6.30 d (15.9)	6.26 d (15.9)	5.82 d (12.8)
9''	---	---	---	---	---	---
OCH ₃	3.84 s	---	3.83 s	3.83 s	---	---

^a Señal sobrepuesta. s = singulete, d = doblete, t = triplete, c = cuadruplete, q = quintuplete, m = multiplete.

6.3 Identificación de 5,6-dihidro-alfa-pironas en las fracciones de *Hyptis brevipes*.

6.3.1 Fracción secundaria AE.

En el perfil cromatográfico de esta fracción (Figura 20) se observan varios picos, particularmente se muestran interesantes dos parejas de picos, la primera con tiempos de retención de 23.925 y 24.748 min y la segunda de 27.684 y 28.970 min, que podrían corresponder a las referencias **5** y **6** por las señales identificadas de 5,6-dihidro-alfa-pironas de anillo tetrahidrofurano y también por tener cierta semejanza con los tiempos de retención de estas referencias.

En la Figura 21 del espectro de resonancia magnética nuclear de la fracción AE, se observan señales en aproximadamente 6.87 y 5.97 ppm correspondientes a los protones en la posición 4 y 3 respectivamente de una 5,6-dihidro-alfa-pirona con anillo tetrahidrofurano, también se observaron señales entre 2.33 y 2.70 ppm, pero se dificulta identificar las señales que corresponden a $H_{5_{ax}}$ y $H_{5_{eq}}$, ya que se encuentran sobrepuestas.

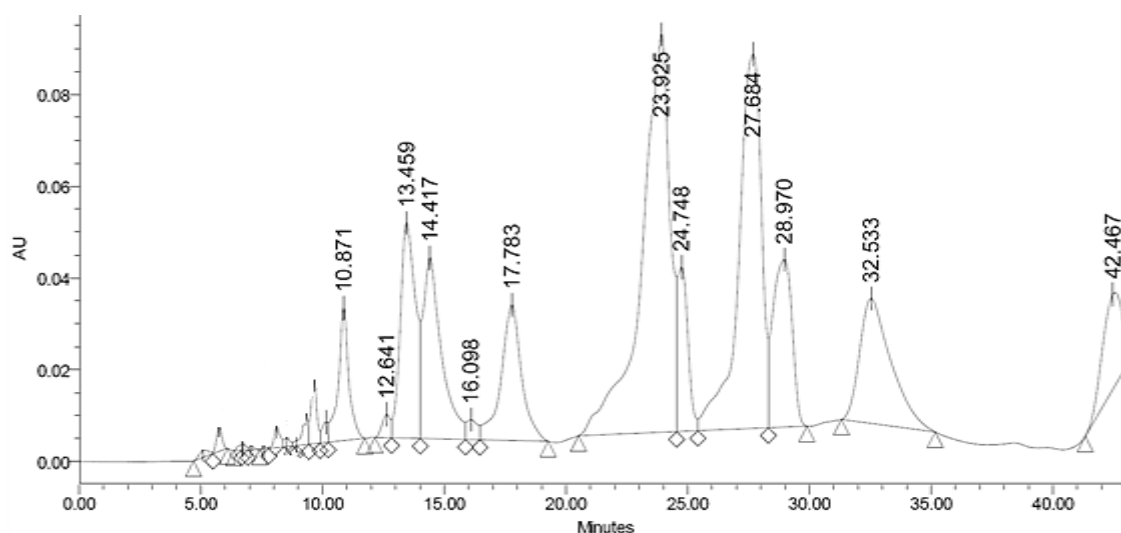


Figura 20. Cromatograma de líquidos a nivel analítico de la fracción secundaria AE.

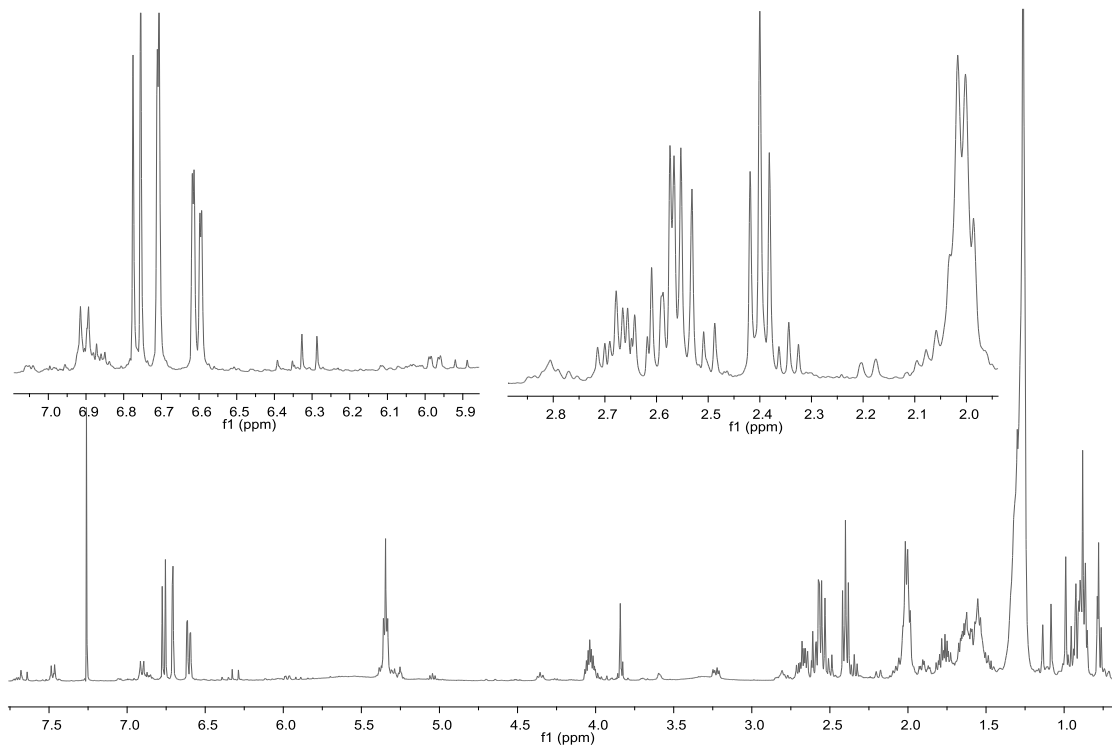


Figura 21. Espectro de RMN-¹H de la fracción secundaria AE en CDCl₃ (400 MHz).

6.3.2 Fracción secundaria AF.

La siguiente muestra analizada fue la fracción secundaria AF, cuyo perfil cromatográfico se presenta su en la Figura 22.

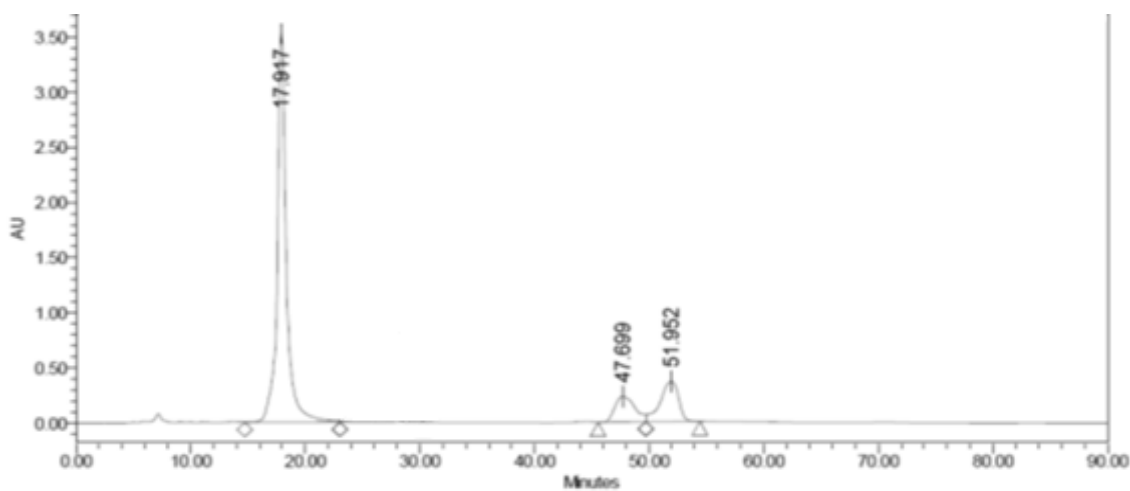


Figura 22. Cromatograma de líquidos a nivel analítico de la fracción secundaria AF.

La fracción analizada presenta un pico mayoritario con un tiempo de retención de 17.92 min y otros picos en 47.70 y 51.95 min, estos se identificaron utilizando los siguientes criterios. El pico observado en 17.92 min corresponde a la referencia **8**. Inicialmente, por el tiempo de retención se consideró que podría tratarse de la referencia **2**, pero se realizó una coelución entre la fracción secundaria AF y la referencia **8**, obteniendo el perfil cromatográfico de la Figura 23.

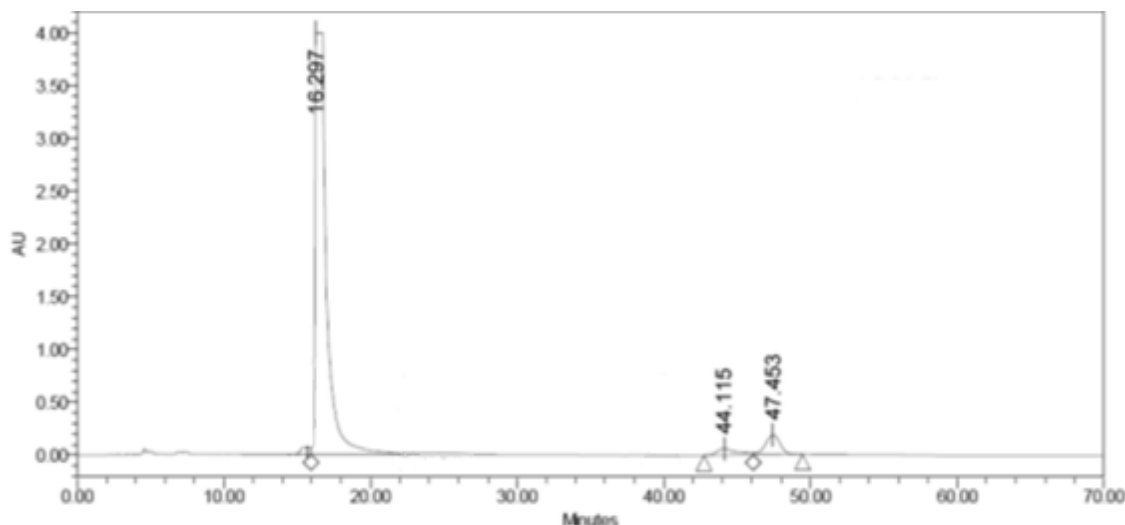


Figura 23. Cromatograma de líquidos a nivel analítico de la coelución entre la referencia **8** y la fracción secundaria AF.

En la coelución, al inyectarse 10 μL de la fracción secundaria AF y 10 μL de la referencia **8**, la absorbancia de este pico se observa aumentada a diferencia de cuando se inyectó la fracción secundaria AF sola.

También al comparar el espectro de resonancia magnética nuclear de la referencia **8** (Figura 24) con el de la fracción secundaria AF (Figura 26) se observan señales semejantes entre ambos, lo cual permite confirmar la presencia de la referencia **8** en la fracción secundaria AF.

La pareja de picos con tiempos de retención en 47.70 y 51.95 min corresponden con la referencia **1** al presentar tiempos de retención similares y para establecer que se trataba de **1**, se realizó una coelución de la fracción secundaria AF y la referencia **1**, el perfil cromatográfico obtenido se presenta en la Figura 25.

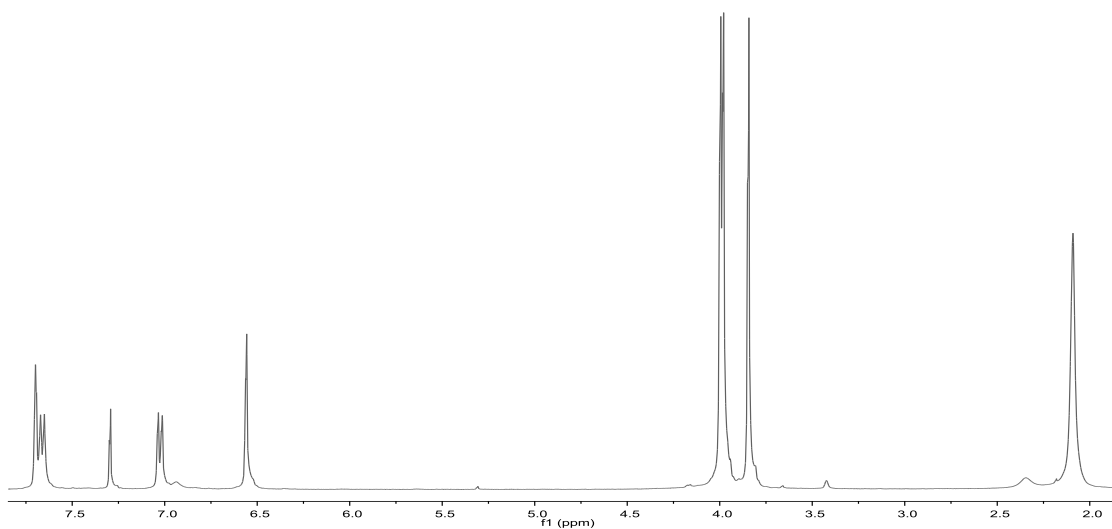


Figura 24. Espectro de RMN-¹H de la referencia **8** en CDCl₃ (400 MHz).

Como puede observarse, la absorbancia de los picos correspondientes a la referencia **1** incrementó, lo cual, confirma que se trata del compuesto **1**. Además, en la Figura 26, se cotejan señales propias de este compuesto en aproximadamente 6.38 ppm (H_{8''}), 6.91 ppm (H_{3''} y H_{5''}), 7.49 ppm (H_{2''} y H_{6''}), 7.70 ppm (H_{7''}) y, en 3.84 también se observan señales, pero estas están sobrepuestas, debido a la presencia de las señales de la referencia **8**.

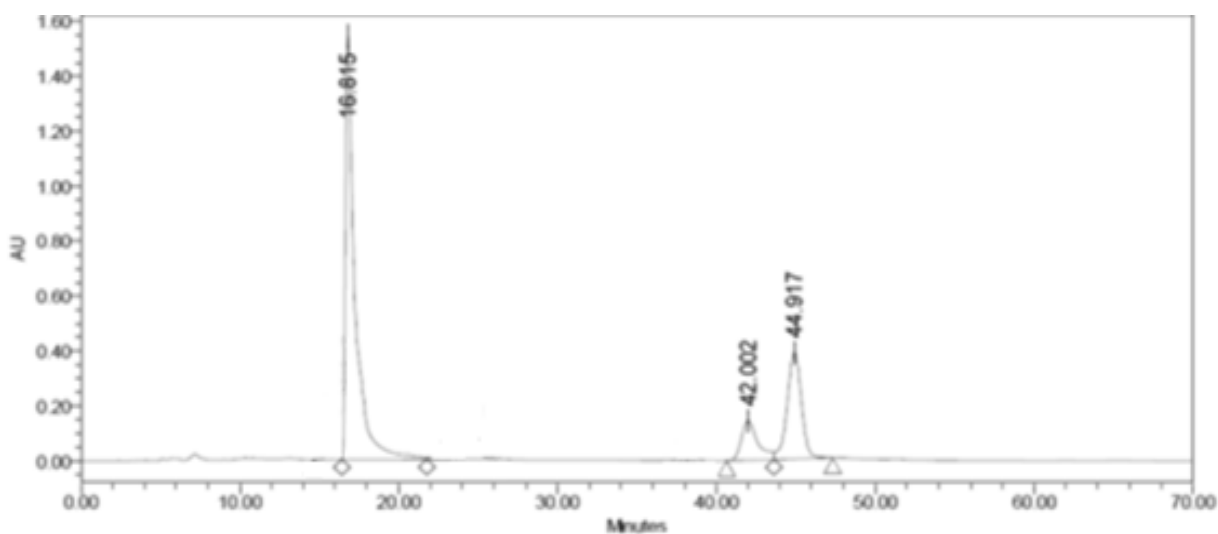


Figura 25. Cromatograma de líquidos a nivel analítico de la coelución entre la referencia **1** y la fracción secundaria AF.

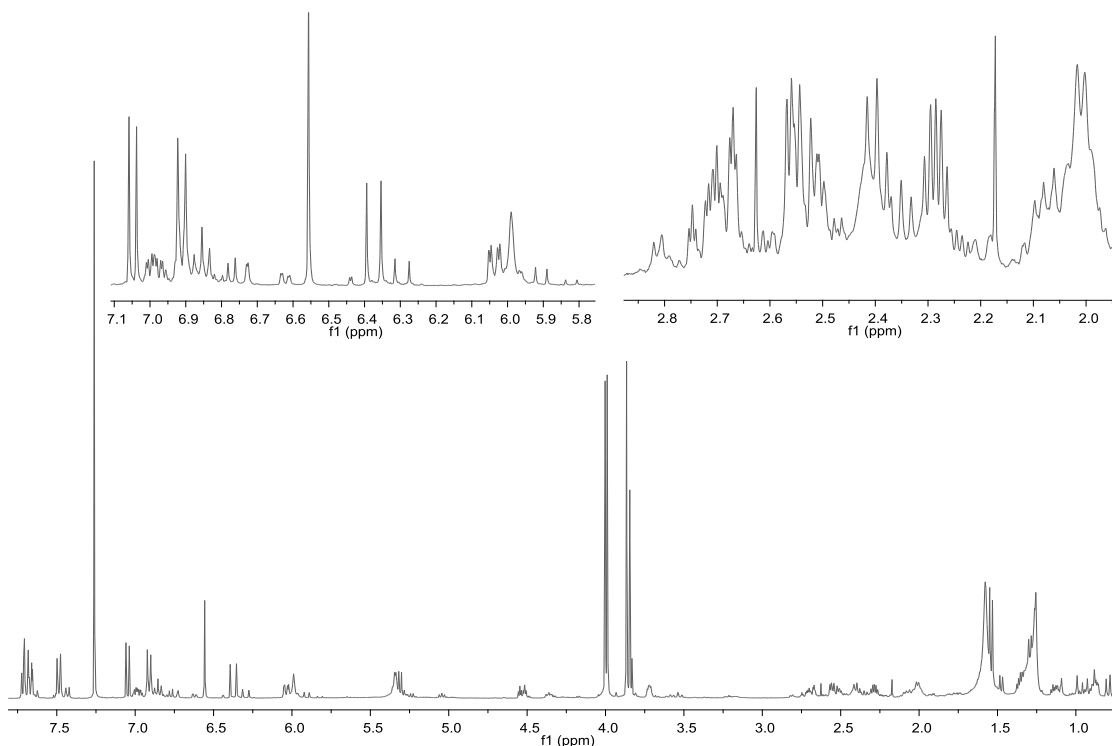


Figura 26. Espectro de RMN- ^1H de la fracción secundaria AF en CDCl_3 (400 MHz).

6.3.3 Fracción B-AcOEt.

Para identificar las referencias presentes en el fracción B-AcOEt se obtuvo su perfil cromatográfico (Figura 27). Se observaron tres parejas de picos, la primera con tiempos de retención de 18.92 y 20.36 min, la segunda de 28.56 y 30.38 min, y finalmente, la tercera de 51.83 y 55.87 min.

La primera pareja de picos se identificó como la referencia **2**, por los tiempos de retención obtenidos en el perfil de la muestra similar al de la referencia.

La identificación de **2** se confirmó en los espectros de RMN con las señales obtenidas (Figura 28), donde se lograron identificar las señales de $\text{H}_{6''}$ y $\text{H}_{2''}$ (7.39 ppm) y $\text{H}_{8''}$ (6.31 ppm). Adicionalmente, también se observan señales en 6.83 ppm ($\text{H}_{2''}$ y $\text{H}_{6''}$) y 7.64 ppm ($\text{H}_{7''}$), además de las señales características de la lactona en una 5,6-dihidro-alfa-pirona con anillo ciclopropano.

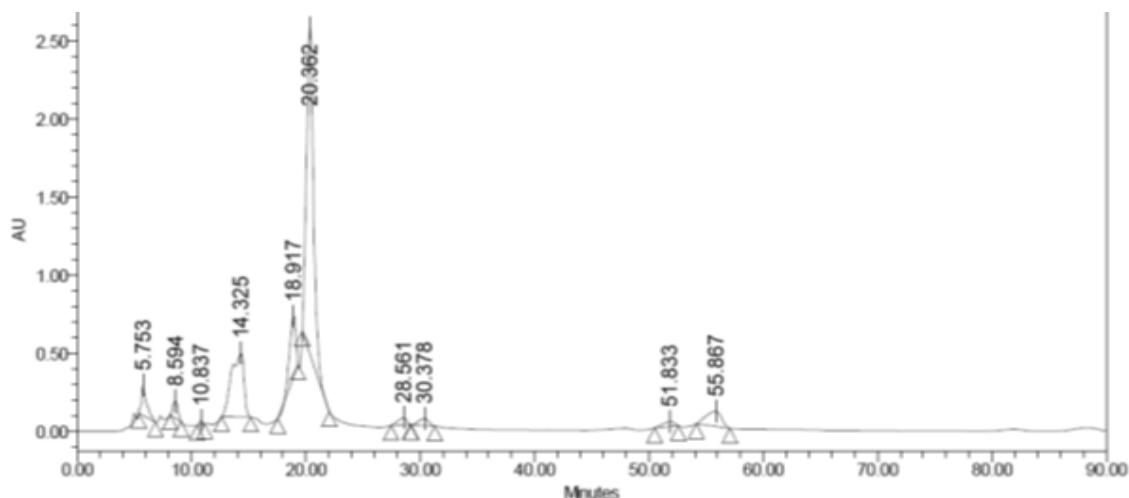


Figura 27. Cromatograma de líquidos a nivel analítico de la fracción B-AcOEt.

Posteriormente, se identificó a la segunda pareja de picos con tiempos de retención de 28.56 y 30.38 min como la referencia **5**, mediante la coelución entre la fracción de AcOEt y la referencia **5**, el perfil cromatográfico obtenido se presenta en la Figura 29.

Como puede observarse, la absorbancia de la segunda pareja de picos, se ve incrementada al comparar el perfil cromatográfico de la coelución con respecto al inicial (Figura 27).

También, al analizar la Figura 28 se pueden encontrar señales de la referencia **5**, que identifican a los protones $H_{6''}$ y $H_{2''}$ (7.38 ppm), $H_{3''}$ y $H_{5''}$ (6.84 ppm), $H_{7''}$ (7.62 ppm) y $H_{8''}$ (6.26 ppm).

Finalmente, la última pareja de picos con tiempos de retención de 51.83 y 55.87 min se identificó como la referencia **1**, ya que al observar el espectro de resonancia magnética de la Figura 28, se detectan las señales características de esta referencia en 7.49 ppm ($H_{2''}$ y $H_{6''}$), 6.91 ppm ($H_{3''}$ y $H_{5''}$), 7.70 ppm ($H_{7''}$), 6.38 ppm ($H_{8''}$) y 3.84 ppm (OCH_3).

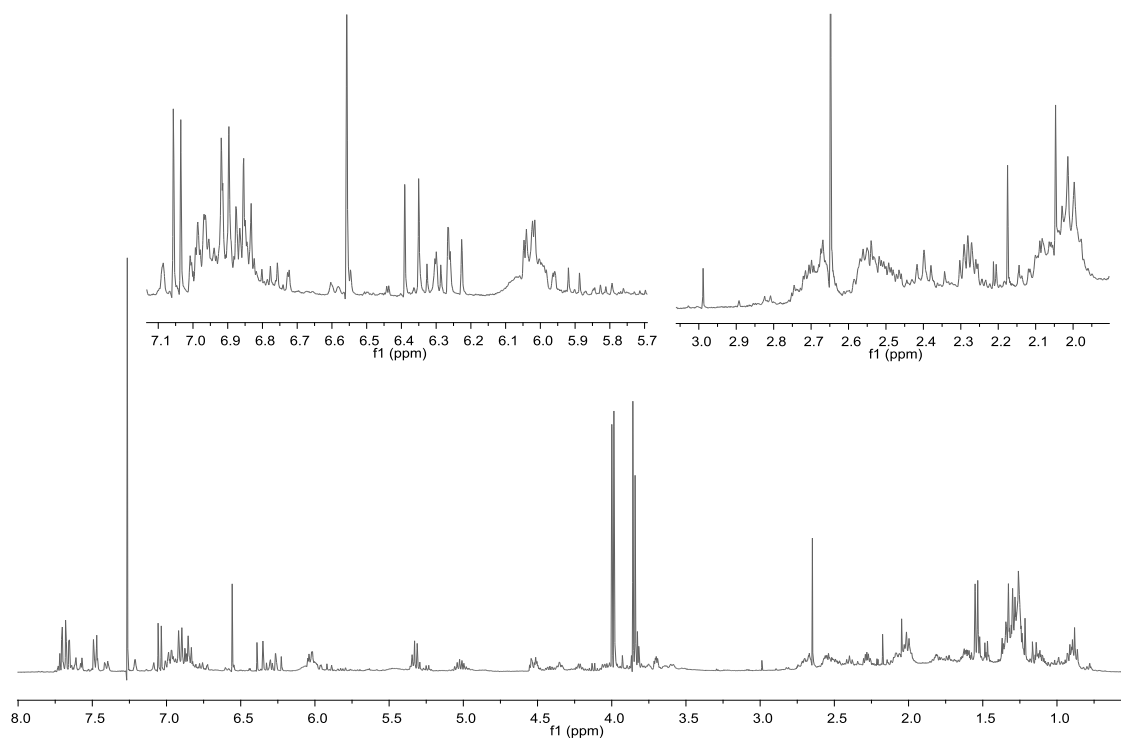


Figura 28. Espectro de RMN-¹H de la fracción B-AcOEt en CDCl₃ (400 MHz).

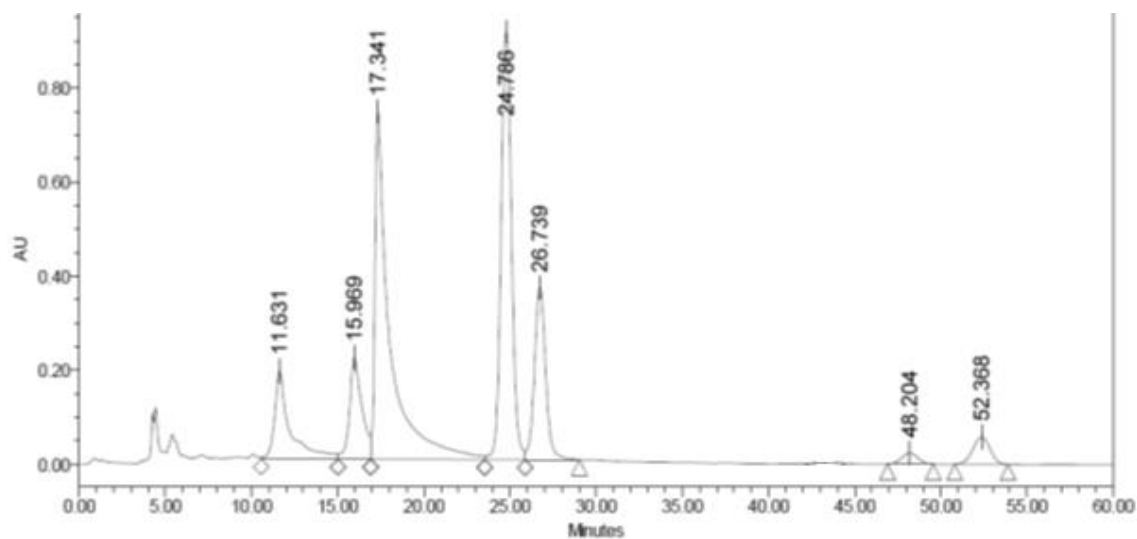


Figura 29. Cromatograma de líquidos a nivel analítico de la coelución entre la referencia **5** y la fracción B-AcOEt.

6.3.4 Fracción C-AcOEt.

En la Figura 30 se presenta el perfil cromatográfico de la fracción C-AcOEt, en la que se puede observar una pareja de picos con tiempos de retención de 17.13 y 18.57 min. Debido a la similitud con el tiempo de retención de la referencia **2** se realizó la coelución, obteniendo el perfil cromatográfico que se presenta en la Figura 31.

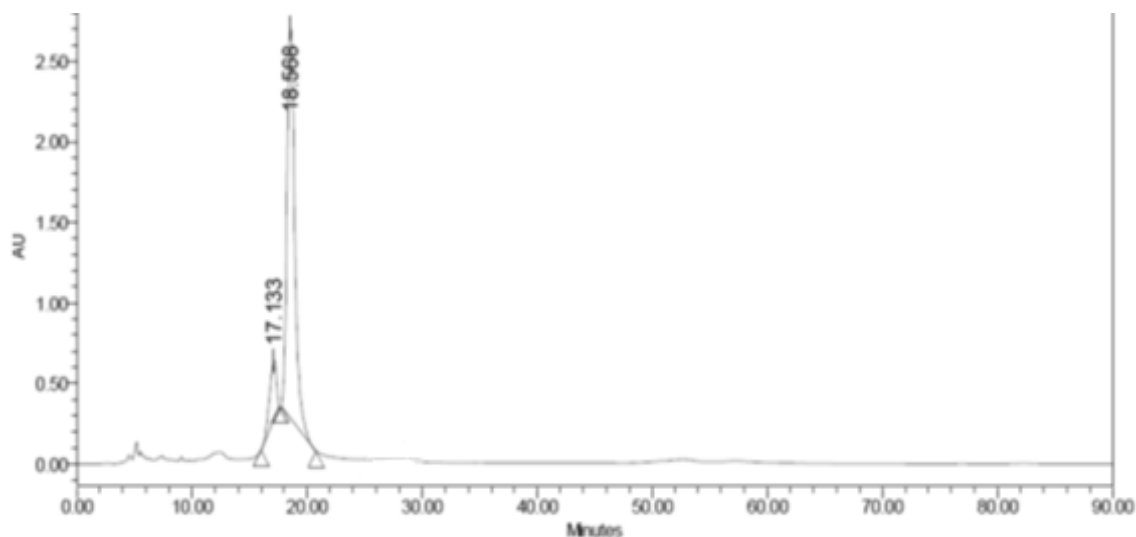


Figura 30. Cromatograma de líquidos a nivel analítico de la fracción C-AcOEt.

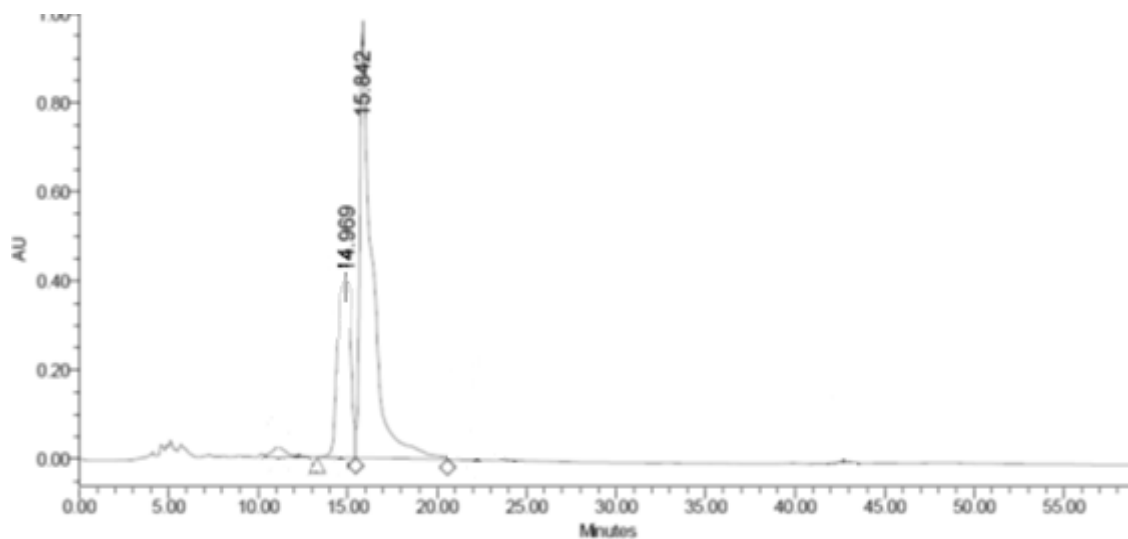


Figura 31. Cromatograma de líquidos a nivel analítico de la coelución entre la referencia **2** y la fracción C-AcOEt.

En el cromatograma se aprecia que se sobreponen los picos de la referencia **2** y la fracción C-AcOEt, así como también, la absorbancia se ve incrementada. La identificación de **2** se confirmó mediante las señales observadas en el espectro de RMN de la muestra (Figura 32), donde se observan las señales de H_{7''} (7.64 ppm), H_{2''} y H_{6''} (7.39 ppm), H_{3''} y H_{5''} (6.83 ppm), H_{8''} (6.31 ppm).

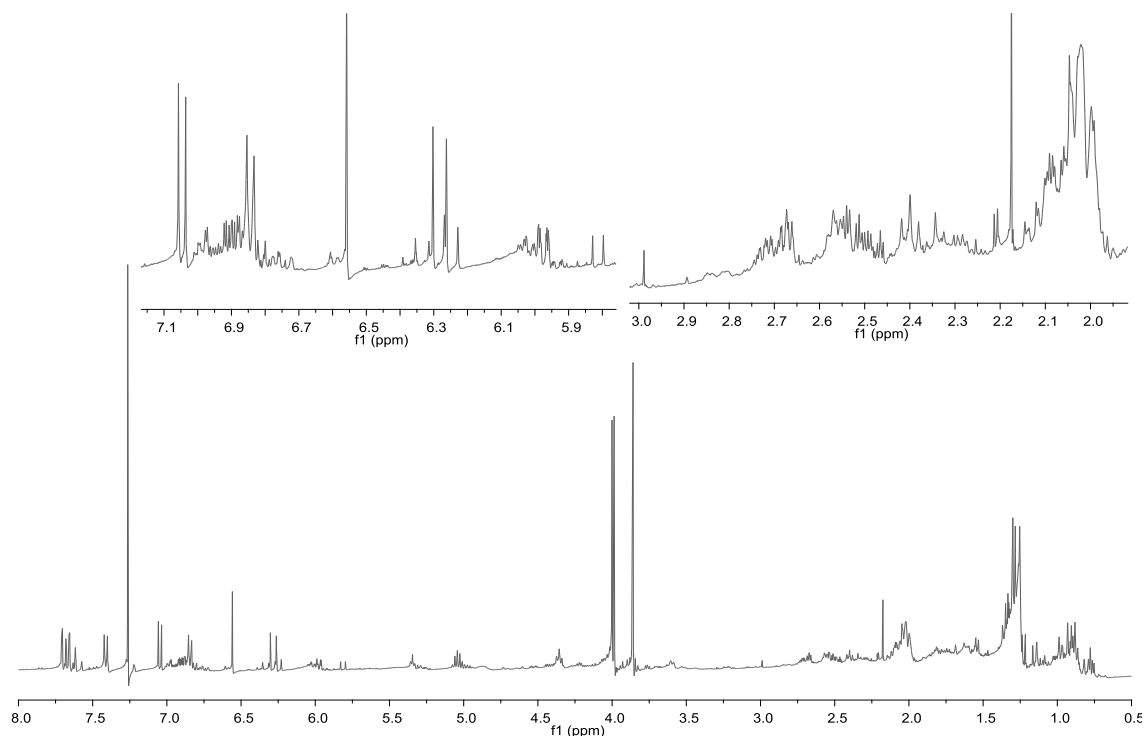


Figura 32. Espectro de RMN-¹H de la fracción C-AcOEt en CDCl₃ (400 MHz).

6.3.5 Fracciones D-AcOEt y E-AcOEt.

Las siguientes dos fracciones, D-AcOEt y E-AcOEt se analizaron simultáneamente, ya que mostraron una gran semejanza tanto en su perfil cromatográfico, como en sus respectivos espectros de resonancia magnética nuclear. En la Figura 33 se presenta el perfil cromatográfico de la fracción D-AcOEt, el cual, al compararlo con el perfil cromatográfico de la fracción E-AcOEt en la Figura 34, se observan cuatro parejas de picos con tiempos de retención prácticamente iguales. La pareja de picos con tiempos de retención de 16.22 y 17.52 min corresponden a la referencia **2**.

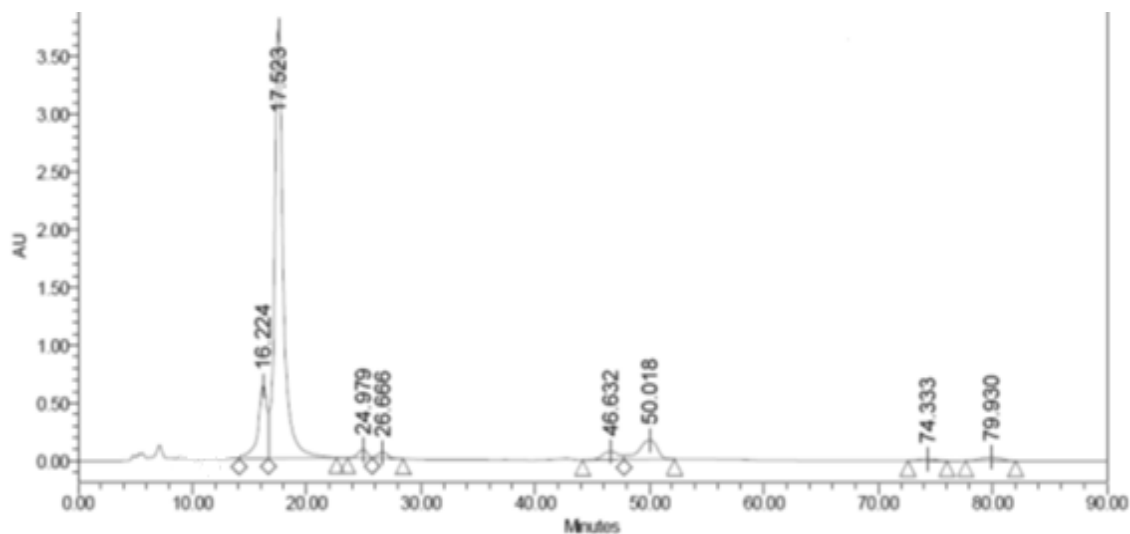


Figura 33. Cromatograma de líquidos a nivel analítico de la fracción D-AcOEt.

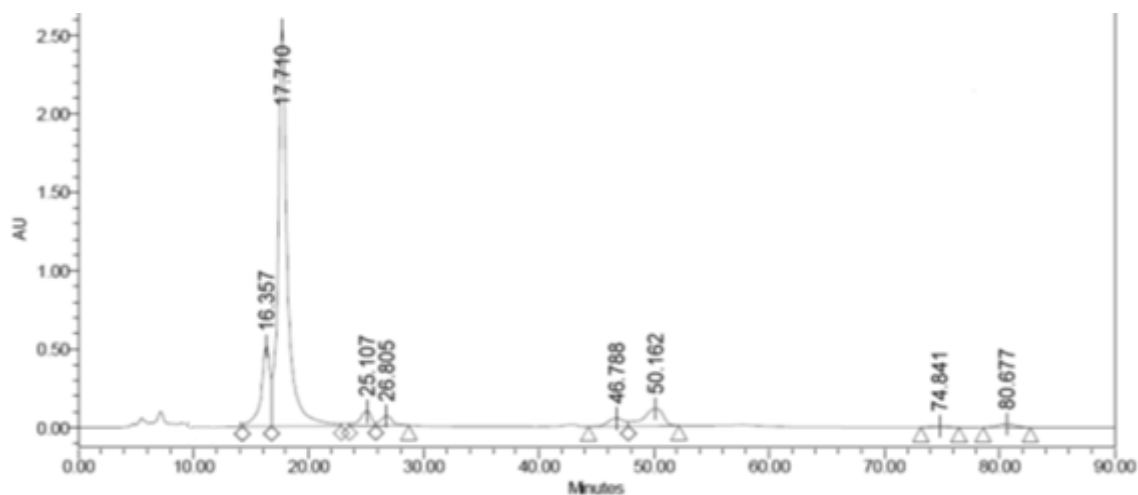


Figura 34. Cromatograma de líquidos a nivel analítico de la fracción E-AcOEt.

En el espectro de resonancia magnética nuclear de cada una de las fracciones se logró identificar a la referencia **2** por las señales que se observan en aproximadamente 6.83 ppm ($H_{2''}$ y $H_{6''}$), 7.64 ppm ($H_{7''}$), 7.39 ppm ($H_{3''}$ y $H_{5''}$) y 6.31 ppm ($H_{8''}$), ver Figura 35 y 36.

La pareja de picos con tiempos de retención en 24.98 y 26.67 min se identificaron como la referencia **6**, así mismo se encontraron las señales de esta referencia en los espectros de resonancia magnética nuclear indicadas en las Figuras 35 y 36, encontrando, H₂' y H₆' (7.67 ppm), H₃' y H₅' (6.82 ppm), H₇' (6.83 ppm) y H₈' (5.82 ppm). Adicionalmente, también se identifican las señales características de la lactona en una 5,6-dihidro-alfa-pirona con anillo tetrahydrofurano.

Las siguientes parejas de picos se identificaron usando coeluciones, los picos con tiempos de retención de 46.63 y 50.02 min con la referencia **1** (Figura 37) y los picos en 74.33 y 79.93 min con la referencia **4** (Figura 38).

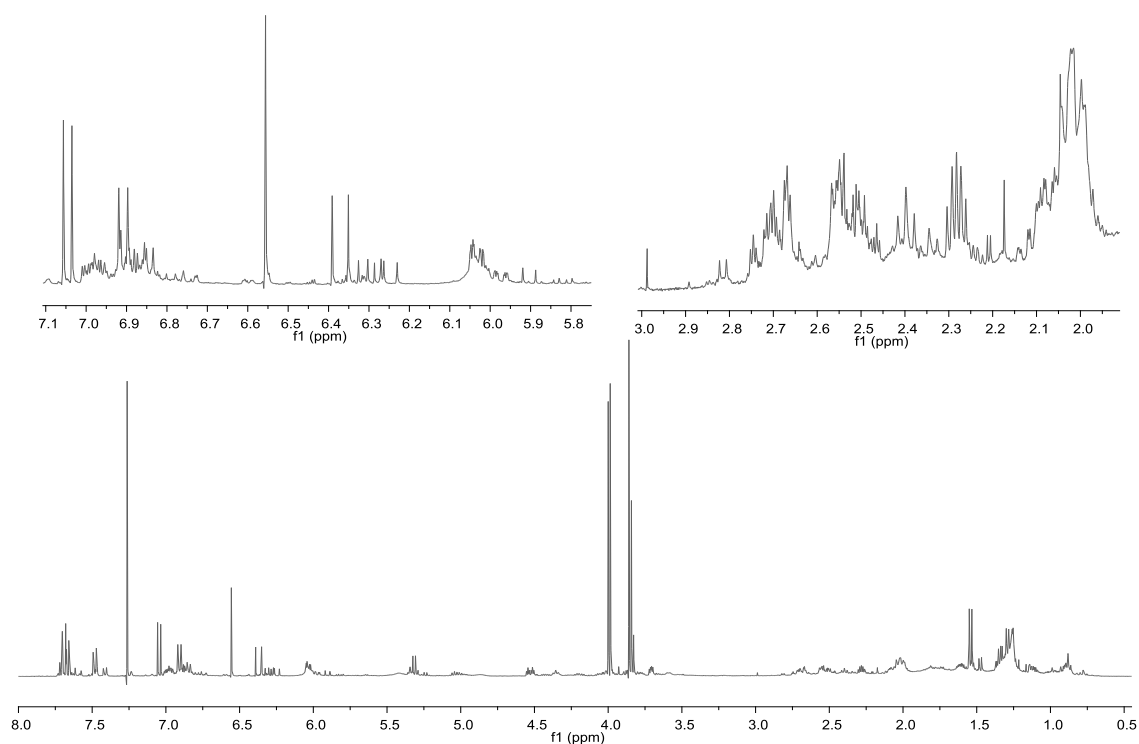


Figura 35. Espectro de RMN-¹H de la fracción D-AcOEt en CDCl₃ (400 MHz).

En la Figura 37, se observa como la tercera pareja de picos se enriquece con la referencia **1**. Lo mismo ocurre con la última pareja de picos para la referencia **4** en la Figura 38.

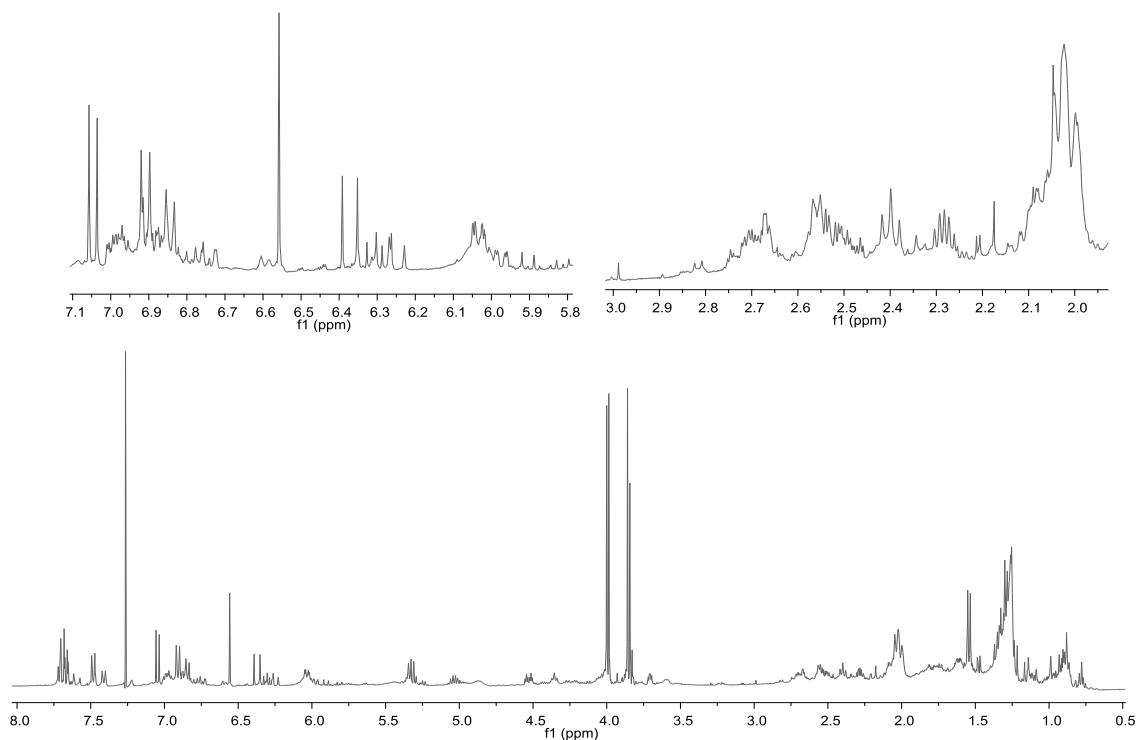


Figura 36. Espectro de RMN-¹H de la fracción E-AcOEt en CDCl₃ (400 MHz).

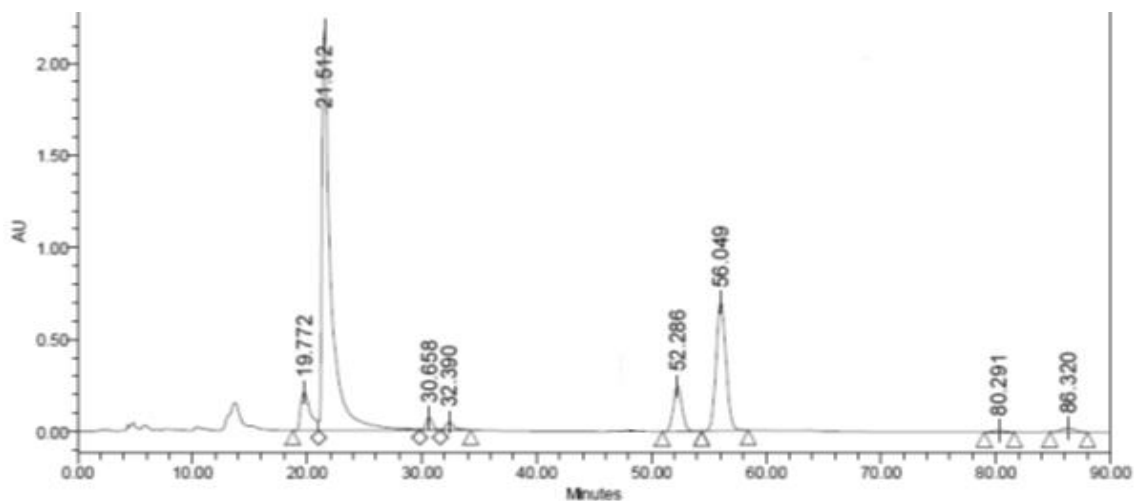


Figura 37. Cromatograma de líquidos a nivel analítico de la coelución entre la referencia **1** y la fracción D-AcOEt.

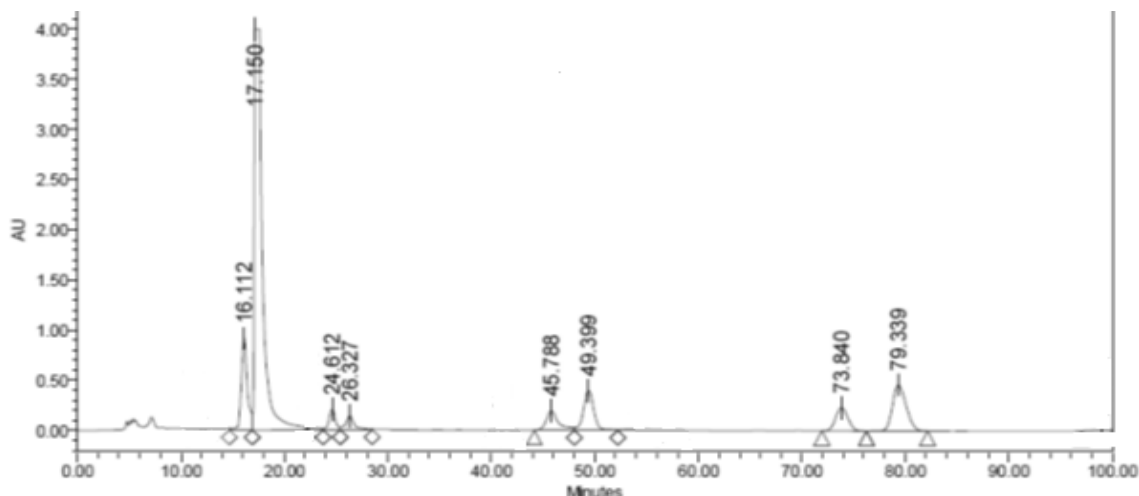


Figura 38. Cromatograma de líquidos a nivel analítico de la coelución entre la referencia **4** y la fracción D-AcOEt.

6.3.6 Fracción F-AcOEt.

Para la identificación de las 5,6-dihidro-alfa-pironas presentes en la fracción F-AcOEt se registró como en los demás, el perfil cromatográfico (Figura 39). Se pueden observar tres parejas de picos. La pareja de picos con tiempos de retención en 16.69 y 18.17 min se identificó por su semejanza en tiempos de retención con la referencia **2**, además esto se confirmó mediante el análisis de las señales observadas en el espectro de resonancia magnética nuclear como se puede analizar en la Figura 40, para los protones $H_{6''}$ y $H_{2''}$ (7.39 ppm) y $H_{8''}$ (6.31 ppm), $H_{2''}$ y $H_{6''}$ (6.83 ppm) y $H_{7''}$ (7.64 ppm).

La identificación de la pareja de picos con tiempos de retención de 50.35 y 54.21 min se hizo con la coelución de la referencia **1**, el cromatograma obtenido se muestra en la Figura 41, se observa que los picos se encuentran empatados y que la absorbancia es mayor que en el cromatograma inicial (Figura 39).

Para confirmar que se trataba de la referencia **1** se buscaron las señales de ésta en el espectro de resonancia magnética nuclear de la Figura 40, se encontraron las señales en 7.49 ppm ($H_{2''}$ y $H_{6''}$), 6.91 ppm ($H_{3''}$ y $H_{5''}$), 7.70 ppm ($H_{7''}$), 6.38 ppm ($H_{8''}$) y 3.84 ppm (OCH_3).

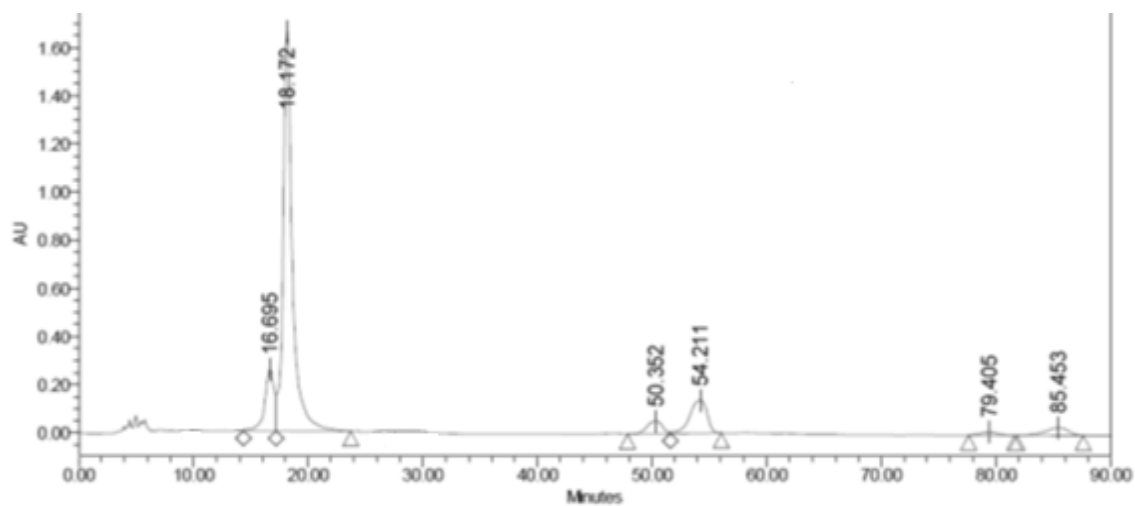


Figura 39. Cromatograma de líquidos a nivel analítico de la fracción F-AcOEt.

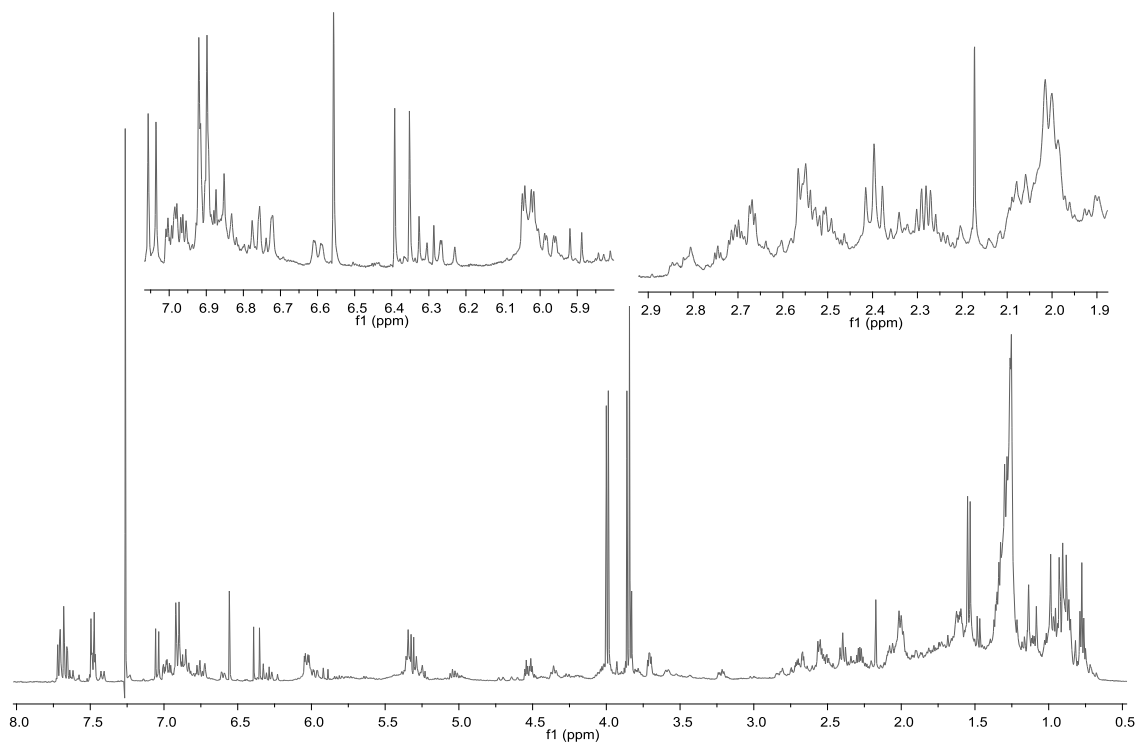


Figura 40. Espectro de RMN-¹H de la fracción F-AcOEt en CDCl₃ (400 MHz).

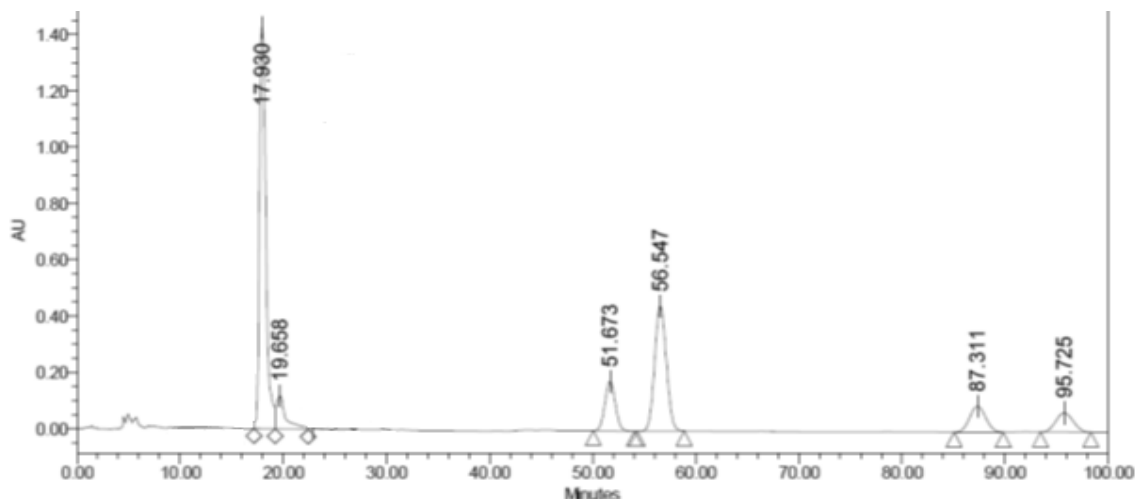


Figura 41. Cromatograma de líquidos a nivel analítico de la coelución entre la referencia **1** y **3** con la fracción F-AcOEt.

Posteriormente, la última pareja de picos se identificó por medio de una coelución con la referencia **3**, ya que, a pesar de que los tiempos en el cromatograma de la Figura 41 salen recorridos, estos picos están empatados y no se observan más picos.

Se confirmó la presencia de la referencia **3** por medio del hallazgo de señales de esta referencia en el espectro de resonancia magnética nuclear de la Figura 40. Se observaron las siguientes señales, en 7.72 ppm ($H_{2''}$ y $H_{6''}$), 6.87 ppm ($H_{3''}$ y $H_{5''}$), 6.88 ppm ($H_{7''}$) y 5.82 ppm ($H_{8''}$).

6.3.7 Fracción G-AcOEt.

La última fracción a identificar fue G-AcOEt, en la Figura 42 se presenta su perfil cromatográfico, se observan tres parejas de picos, la pareja con tiempos de retención de 17.23 y 18.82 min se identificaron por medio de una coelución con la referencia **2** y la pareja de picos obtenida en 49.79 y 53.63 min, se coeluyó con la referencia **1**. Ambas parejas de picos de la fracción G-AcOEt se encuentran empatados con las referencias, el cromatograma obtenido de las coeluciones se muestra en la Figura 43 y la absorbancia también se ve incrementada.

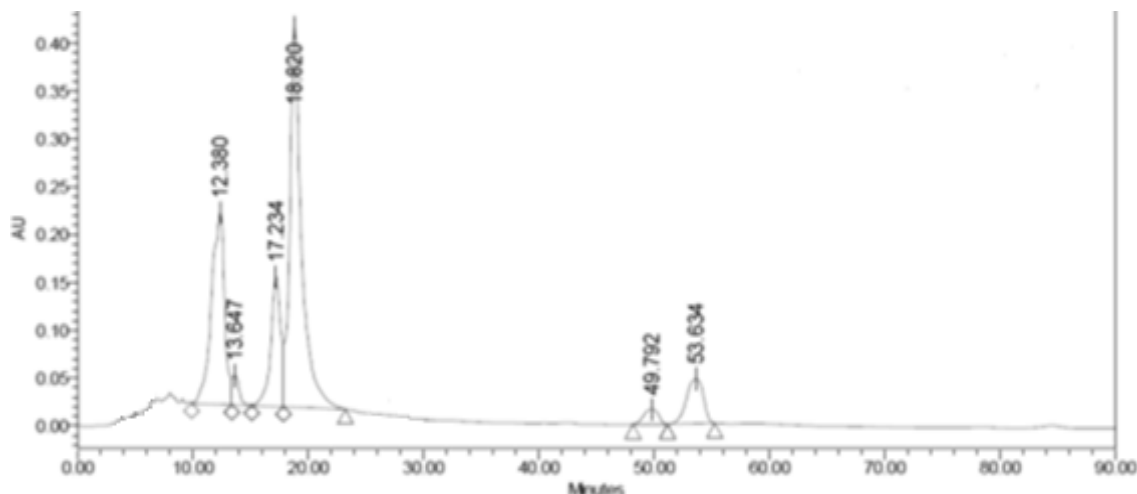


Figura 42. Cromatograma de líquidos a nivel analítico de la fracción G-AcOEt.

De estas dos referencias también se pudieron localizar sus señales en el espectro de resonancia magnética nuclear de la fracción (Figura 44). Las señales que identificaron a la referencia **2** son las que se observaron en 6.83 ppm ($H_{3''}$ y $H_{5''}$), 7.39 ppm ($H_{2''}$ y $H_{6''}$), 7.64 ppm ($H_{7''}$) y 6.31 ppm ($H_{8''}$).

Para la referencia **1** (Figura 44), se identifican señales en 7.49 ppm ($H_{2''}$ y $H_{6''}$), 6.91 ppm ($H_{3''}$ y $H_{5''}$), 7.70 ppm ($H_{7''}$), 6.38 ppm ($H_{8''}$) y 3.84 ppm (OCH_3).

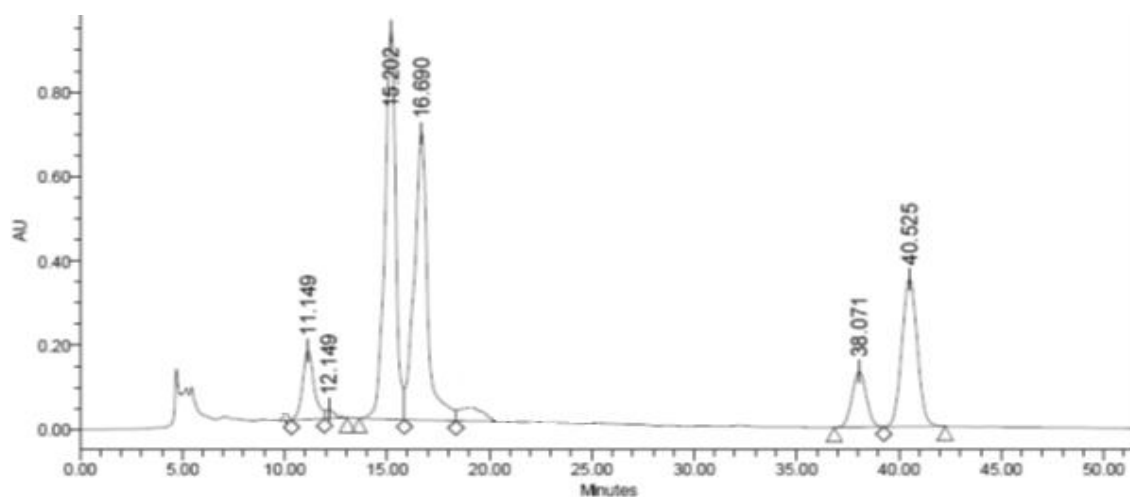


Figura 43. Cromatograma de líquidos a nivel analítico de la coelución entre las referencias **1** y **2** con la fracción G-AcOEt.

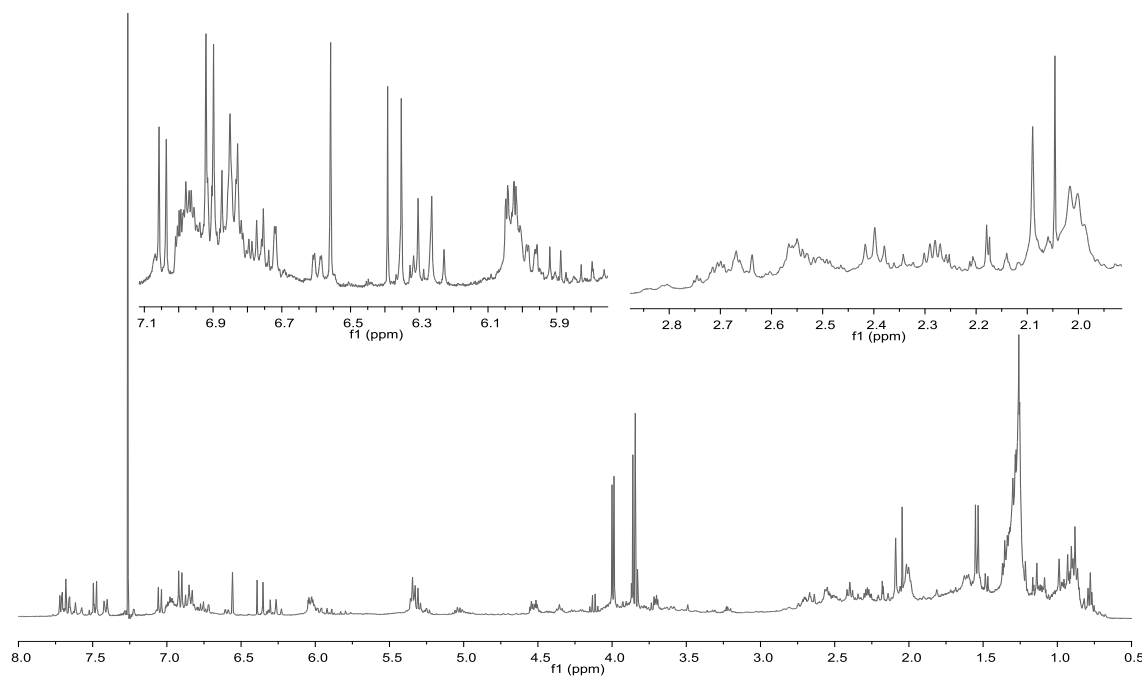


Figura 44. Espectro de RMN- ^1H de la fracción G-AcOEt en CDCl_3 (400 MHz).

6.3.7.1 Fraccionamiento a nivel preparativo de los picos con tiempos de retención de 12.38 y 13.65 min.

En la Figura 42 se observa una pareja de picos con tiempos de retención de 12.38 y 13.65 min. Con el fin de identificar los compuestos presentes en estos picos, se realizaron varias inyecciones a nivel preparativo bajo las condiciones indicadas en la Tabla 8 (Ver Procedimiento Experimental, inciso 5.3.6). La estructura de este compuesto fue determinada por comparación de los datos espectroscópicos obtenidos en la RMN- ^1H (Tabla 11) con los descritos en la literatura para la referencia 7.

Se obtuvo su espectro de resonancia magnética nuclear (Figura 45), un primer análisis permitió encontrar señales de 5,6-dihidro-alfa-pirona con anillo de ciclopropano, posteriormente, se compararon las señales registradas con todas referencias previamente aisladas (Suárez-Ortíz, 2013) y se encontró semejanza

con la referencia **7** (Tabla 11). La principal diferencia es que se observan dos señales de metoxilo. Finalmente, la estructura propuesta para el compuesto **9** se presenta en la Figura 46, la cual puede ser nombrada como Brevipólida P.

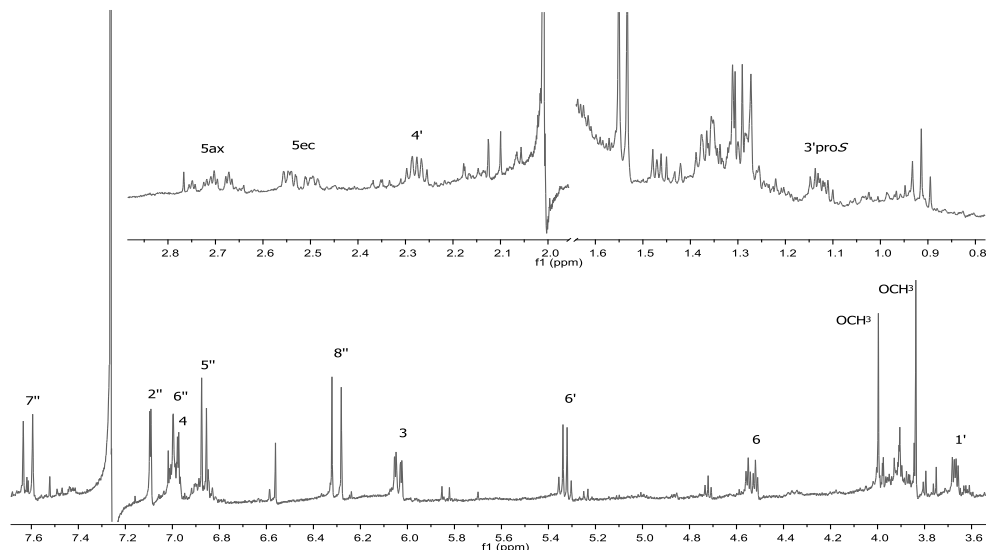


Figura 45. Espectro de RMN-¹H del compuesto **9** aislado de la fracción G-AcOEt en CDCl₃ (400 MHz).

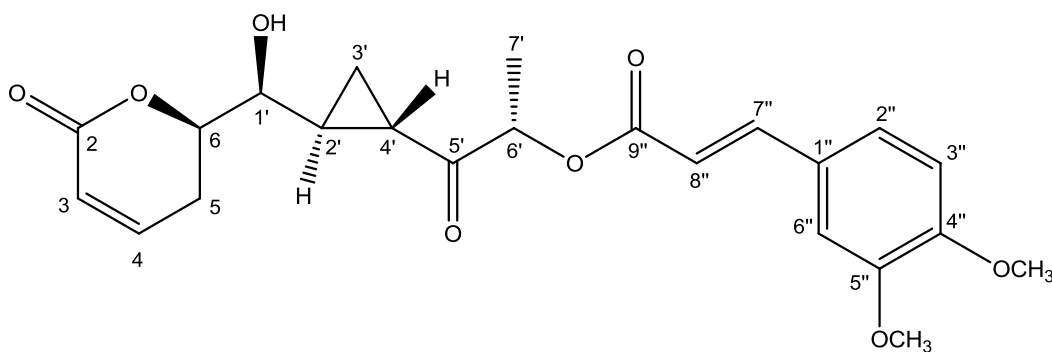


Figura 46. Estructura propuesta para la Brevipólida P (**9**).

Tabla 11. Desplazamientos químicos de la referencia **7** y el compuesto **9**.

POSICIÓN	Referencia 7 δ_H (J en Hz)	Compuesto 9 δ_H (J en Hz)
3	6.02 ddd (9.7, 2.2, 0.9)	6.03 ddd (9.7, 2.2, 0.8)
4	6.98 ddd (9.7, 6.4, 2.2)	6.98 ddd (9.7, 6.3, 2.2)
5ax	2.70 dddd (18.5, 12.3, 2.2, 2.2)	2.70 dddd (18.3, 12.5, 2.2, 2.2)
5ec	2.52 dddd (18.5, 6.4, 3.8, 0.9)	2.52 dddd (18.3, 6.3, 3.8, 0.8)
6	4.52 ddd (12.3, 3.8, 3.8)	4.53 ddd (12.3, 3.8, 3.8)
1'	3.70 dd (6.3, 3.8)	3.67 dd (6.4, 3.8)
2'	1.60 dddd (8.9, 6.3, 6.3, 3.4)	1.63 dddd (9.6, 6.4, 5.6, 4.2)
3'proS	1.12 ddd (8.9, 6.3, 4.0)	1.12 ddd (8.2, 6.6, 4.2)
3'proR	1.34 ddd (8.5, 4.0, 3.9)	1.36 ddd (8.6, 3.8, 3.8)
4'	2.28 ddd (8.5, 3.9, 3.4)	2.28 ddd (8.6, 3.8, 3.8)
6'	5.30 c (7.0)	5.33 c (7.0)
7'	1.60 d (7.0)	1.54 d (7.0)
2''	7.13 d (1.9)	7.09 d (2.0)
5''	6.84 d (8.3)	6.86 d (8.2)
6''	7.03 dd (8.3, 1.9)	6.98 dd (8.0, 2.1)
7''	7.64 d (15.9)	7.61 d (16.0)
8''	6.34 d (15.9)	6.30 d (15.9)
OCH₃	3.92 s	3.84 s, 3.99 s

Finalmente, se presenta en la Tabla 12 un resumen de las referencias identificadas en cada una de las diferentes fracciones.

Tabla 12. Referencias identificadas en las diferentes fracciones de *Hyptis brevipes*.

FRACCIÓN	REFERENCIAS/COMPUESTOS							
	1	2	3	4	5	6	8	9
AE					✓	✓		
AF	✓						✓	
B-AcOEt	✓	✓			✓			
C-AcOEt		✓						
D-AcOEt	✓	✓		✓		✓		
E-AcOEt	✓	✓		✓		✓		
F-AcOEt	✓	✓	✓					
G-AcOEt	✓	✓						✓

Como se pudo observar, la especie *Hyptis brevipes* tiene una amplia distribución en el estado de Veracruz, dependiendo de la localidad, se observó la presencia de diferentes 5,6-dihidro-alfa-pironas, esto se pone en manifiesto claramente en la Tabla 12.

En la localidad de Angostillo correspondiente a la fracción identificada como G-AcOEt se pudieron encontrar las referencias **1** y **2**, mientras que las fracciones identificadas como D-AcOEt y E-AcOEt provenientes de la localidad de Dos Ríos fue posible identificar a las referencias **1**, **2**, **4** y **6**.

Por otro lado, en la localidad de Miradores del Mar, las fracciones que la representaron fueron las fracciones AE y AF, además de las fracciones C-AcOEt y F-AcOEt, en los cuales se identificaron las referencias **1**, **2**, **3**, **5**, **6** e incluso una

flavona. Finalmente, en la fracción B-AcOEt, procedente de la localidad de El Castillo se encontraron las referencias **1**, **2** y **5**.

En la Tabla 12 podemos analizar que las referencias más comunes en este estudio en la especie *Hyptis brevipes*, son las referencias **1** y **2**.

Cuando se comparan la misma localidad en distintas temporadas, como es el caso de Dos Ríos, se encontraron las siguientes situaciones; en las fracciones D-AcOEt del 13-Nov-11 y E-AcOEt del 20-Nov-11 se detectaron las mismas referencias de 5,6-dihidro-alfa-pironas, es decir, en un lapso de 7 días entre colecta y colecta no se observa diversidad metabólica.

En contraste, en Miradores del Mar, en las fracciones C-AcOEt del 06-Dic-10 y F-AcOEt 04-Dic-09 se observa una diferencia importante, pues de sólo poseer la referencia **2**, incrementó su riqueza metabólica al contar además con la referencia **1** y **3**.

Aunque las fracciones AE y AF analizadas también provienen de la localidad de Miradores del Mar, pero con fecha del 21-nov-11, presentaron diferencias con respecto a las otras colectas de la misma localidad.

Esto pudo deberse a los diferentes métodos de fraccionamiento, es posible que las referencias no halladas en una u otra colecta se encuentren en otras fracciones obtenidas en el fraccionamiento secundario por columna abierta o en las fracciones adquiridas del fraccionamiento por partición.

6.4 Ensayo de Citotoxicidad.

Finalmente, se evaluó la actividad citotóxica de las diferentes muestras analizadas contra las líneas celulares de carcinomas humanos. Los valores de CI_{50} de las fracciones de la columna abierta se muestran en la Tabla 13. En esta tabla, se observa que la fracción AF es la más potente contra la línea celular KB, en esta muestra se identificó a las referencias **1** y **8** como los componentes mayoritarios. Por otra parte, la fracción AB también presentó una actividad importante, sin

embargo, al ser obtenida de las eluciones con hexano, su actividad citotóxica puede deberse a la presencia de triterpenos de baja polaridad y componentes grasos.

Tabla 13. Citotoxicidad de fracciones obtenidas de la columna abierta.

Fracciones	KB ¹ CI ₅₀ (µg/mL)	MCF-7 ² CI ₅₀ (µg/mL)
AA	> 20.00	> 20.00
AB	3.16	> 20.00
AC	17.46	> 20.00
AD	> 20.00	0.02
AE	15.11	3.66
AF	1.00	10.94
AG	18.88	2.92
AH	> 20.00	> 20.00
AI	> 20.00	> 20.00
EXTRACTO	2.34	> 20.00

¹ KB, carcinoma nasofaríngeo, ² MCF-7, carcinoma de mama.

Para MCF-7, las fracciones que presentaron mejor actividad citotóxica fueron AD y AG, las fracciones AE y AF presentaron una CI₅₀ moderada. En estas fracciones se detectaron 5,6-dihidro-alfa-pironas, observando diferentes valores de actividad inhibitoria del crecimiento celular posiblemente debido a la presencia de estos compuestos en diferentes concentraciones.

La Tabla 14 presenta los resultados obtenidos de la evaluación de cada fracción a dos concentraciones distintas frente a las mismas líneas celulares, no se determinó la CI₅₀ ya que el objetivo era saber si manifestaban actividad citotóxica.

Como era de esperarse, al tener un conjunto de 5,6-dihidro-alfa-pironas en las diferentes fracciones, todas muestran una mayor actividad inhibitoria del crecimiento a una concentración de 20 µg/mL en las fracciones obtenidas en AcOEt, excepto en la fracción MeOH-H₂O de la colecta C, sin embargo, la fracción C-AcOEt presenta importante inhibición del crecimiento celular a esta concentración.

Para KB la fracción que presenta un menor % de crecimiento es B-AcOEt (4.74%) y el mayor porcentaje lo presenta C-AcOEt (53.53%). Lo que permite suponer que la referencia **5** es la que tiene mayor actividad contra KB, ya que la fracción B-AcOEt es el único donde se puede identificar plenamente esta referencia, pues aunque la fracción AE tiene actividad contra KB sólo se supone su presencia.

Por otro lado, para MCF-7 la fracción más activo es E-AcOEt, pues a una concentración de 20 µg/mL el porcentaje de crecimiento es de 2.60 y el menos activo es D-AcOEt con 43.11% de crecimiento, aquí juega un papel importante la temporada del año, ya que dependiendo de ésta, la abundancia de las 5,6-dihidro-alfa-pironas se ve modificada.

Algo sobresaliente de analizar, es que no todas las fracciones tienen la misma potencia para ambas líneas celulares.

Haciendo una comparación de los dos métodos utilizados para separar los compuestos en base a su polaridad a partir de las fracciones, se observa una gran diferencia al trabajar con uno u otro. En este caso en particular, resultó más eficiente trabajar con el fraccionamiento por partición, ya que los perfiles cromatográficos que arrojaron fueron más sencillos y con picos más definidos, de modo que se pudo omitir un fraccionamiento secundario para las colectas trabajadas con esta metodología.

Tabla 14. Citotoxicidad de las fracciones evaluadas de las colectas B-G.

EXTRACTO	FRACCIÓN	CONCENTRACIÓN (µg/mL)	KB ¹ % CRECIMIENTO	MCF-7 ² % CRECIMIENTO
B	HEXANO	20	107.74	81.30
		2	89.74	90.11
	AcOEt	20	4.74	12.88
		2	95.03	102.54
	MeOH-H ₂ O	20	93.55	100.11
		2	107.03	92.09
C	HEXANO	20	83.99	84.69
		2	117.04	81.58
	AcOEt	20	53.53	30.51
		2	108.07	102.99
	MeOH-H₂O	20	49.79	64.46
		2	103.10	111.75
D	HEXANO	20	103.87	92.99
		2	106.23	116.21
	AcOEt	20	25.60	43.11
		2	100.54	111.41
	MeOH-H ₂ O	20	32.31	65.76
		2	98.79	115.42
E	HEXANO	20	108.22	117.97
		2	116.80	118.59
	AcOEt	20	19.85	2.60
		2	117.49	79.32
	MeOH-H ₂ O	20	76.19	38.42
		2	152.98	91.86
F	HEXANO	20	145.11	95.93
		2	165.25	121.86
	AcOEt	20	11.71	29.04
		2	83.99	74.58
	MeOH-H ₂ O	20	64.57	72.37
		2	107.29	80.56
G	HEXANO	20	100.58	87.12
		2	118.52	83.45
	AcOEt	20	35.72	25.14
		2	116.13	78.87
	MeOH-H ₂ O	20	110.78	71.07
		2	124.46	91.13

¹ KB, carcinoma nasofaríngeo, ² MCF-7, carcinoma de mama.

7 CONCLUSIONES

Se obtuvieron los extractos totales de las siete colectas trabajadas de *Hyptis brevipes*, los cuales se trabajaron bajo diferentes metodologías de fraccionamiento encontrando que el realizado por partición es más rápido, se requieren menos recursos y la separación de compuestos es satisfactoria.

En las fracciones analizadas se pudieron identificar a las 5,6-dihidro-alfa-pironas mediante el uso de técnicas analíticas como el HPLC donde se obtuvieron los perfiles cromatográficos que permitieron la comparación de tiempos de retención con las referencias y también se realizaron coeluciones; además, la RMN permitió establecer la presencia de grupos de señales diagnósticas para las referencias **1-6** y **8** analizadas.

Todas las muestras fueron evaluadas para establecer su actividad inhibitoria sobre el crecimiento de las líneas celulares KB y MCF-7, encontrando que su actividad biológica se encuentra en función de la abundancia y la presencia de los derivados de 5,6-dihidro-alfa-pironas presentes en cada muestra comportándose diferente para cada línea celular.

Se logró identificar en la colecta obtenida de la Carretera Federal 125 Angostillo una novedosa 5,6-dihidro-alfa-pirona, de la cual, se propuso su estructura química y fue caracterizado como Brevipólida P.

8 BIBLIOGRAFÍA

Achmad, S.; Hoyer, T.; Kjaer, S.; Makmur, L.; Norrestam, R. Molecular and crystal structure of Hyptolide, a natural occurring α,β -unsaturated γ -lactone. *Acta Chemica Scandinavica*, **1987**, B41, 599-609.

Alonso-Castro, A. J.; Villarreal M. L.; Salazar-Olivo L. A.; Gomez-Sanchez M.; Dominguez F.; Garcia-Carranca A. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies, *Journal of Ethnopharmacology*, **2011**, 133, 945–972.

Bhuiyan, M. N. I.; Begum, J.; Nandi, N. C. Chemical component studies on the leaf and inflorescence essential oil of *Hyptis brevipes* (Poit.). *Journal of Medicinal Plants Research*, **2010**, 4, 2128-2131.

Boalino, D. M.; Connolly, J. D.; McLean, S.; Reynolds, W. F.; Tinto, W. F. Alpha-pyrone and 2(5H)-furanone from *Hyptis pectinata*. *Phytochemistry*, **2003**, 64, 1303-1307.

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

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

Delgado, G.; Pereda-Miranda, R.; Romo de Vivas, A. Structure and stereochemistry of 4-deacetoxy-10-epi-oliguine, a new γ -lactone from *Hyptis oblongifolia* Betham (Labiatae), *Heterocycles*, **1985**, 23, 1869-1872.

Deng, Y.; Balunas, M. J.; Kim, J.-A.; Lantvit, D. D.; Chin, Y.-W.; Chai, H.; Sugiarto, S.; Kardono, L. B. S.; Fong, H. H. S.; Pezzuto, J. M.; Swanson, S. M.; Carcache de Blanco, E. J.; Kinghorn, A. D. Bioactive 5,6-Dihydro- α -pyrone Derivatives from *Hyptis brevipes*. *Journal of Natural Products*, **2009**, *72*, 1165-1169.

Discover Life, <http://www.discoverlife.org>, consultada el 26 de marzo de 2014.

Fragoso-Serrano, M. Elucidación estructural y establecimiento de la configuración absoluta de metabolitos secundarios biodinámicos aislados de la planta medicinal *Hyptis spicigera*. Aplicación de la mecánica molecular en la elucidación estereoquímica de la espicigerólida, una 5,6-dihidro-alfa-pirona citotóxica. **2000**, Tesis de Doctorado, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 271 p.

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

Gordaliza, M. Natural products as leads to anticancer drugs, *Clinical and Translational Oncology*, **2007**, *9*, 767-776.

Gowda, D. C. Polysaccharide components of the seed-coat mucilage from *Hyptis suaveolens*, *Phytochemistry*, **1984**, *23*, 337-338.

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. Labiatae. *In* Labiatae. The families and genera of vascular plants VII. Flowering plants dicotyledons: lamiales (except Acanthaceae including Avicenniaceae), K. Kubitzki y J. W. Kadereit (eds.). Springer, Berlin 167-275.

Holzgrabe, U, NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis, Elsevier, Hungría, **2008**, 528 p.

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

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

James, Thomas, Fundamentals of NMR, Department of Pharmaceutical Chemistry, University of California, **1998**, 31 p.

Kingston, D.; Rao, M.; Zucker, W. Plant anticancer agents. IX. Constituents of *Hyptis tomentosa*, *Journal of Natural Products*, **1979**, 42, 496-9.

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

Kitamura, M.; Murakami, K.; Yamada, K.; Kawai, K.; Kunishima, M. Binding of sulforhodamine B to human serum albumin: A spectroscopic study. *Dyes and Pigments*, **2013**, 99, 588-593

Kobayashi, S.; Tsuchiya, K.; Kurokawa, T.; Nakagawa, T.; Shimada, N. Pironetin, a novel plant growth regulator produced by *Streptomyces* sp. NK10958. *The Journal of Antibiotics*, **1994**, 48, 893-895.

Kuhnt, M.; Pröbstle, A.; Rimpler, H.; Bauer, R.; Heinrich, M. Biological and pharmacological activities and further constituents of *Hyptis verticillata*, *Planta Medica*, **1995**, 61, 227-232.

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

Martínez Gordillo, M.; Fragoso Martínez, I.; Fernández Barrera, O.; Velásquez Palafox, O. El género *Hyptis* (Lamiaceae) en México, Herbario de la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, **2010**.

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

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

Parker, C.; Catan, B. P.; Fowler, L. Invasive plant Fact Sheets. *Weed Science*, **2007**, 55, 386-397.

Pazasisis, K.; Geromichalos, G.; Dimitriadis, K.; Kortsaris, A. Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay, *Journal of Immunological Methods*, **1997**, 208, 151-158.

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

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

Pereda-Miranda, R. Bioactive natural products from traditionally used Mexican plants. En: *Phytochemistry of Medicinal Plants*, Arnason J. T.; Mata, R.; Romeo, J. T. (editors), Plenum Press, New Press, New York, **1995**, 83-112.

Piozzi, F.; Bruno, M.; Rosselli, S.; Maggio, A. The diterpenoids from the genus *Hyptis* (Lamiaceae). *Heterocycles*, **2009**, 78, 1413-1426.

Ramamoorthy, T. P.; Bye, R.; Lot, A.; Fa, J. Lamiaceae de México, diversidad, distribución, endemismo y evolución. En: *Diversidad Biológica de México, Orígenes y Distribución*. Instituto de Biología, UNAM, México, **1998**, pp. 507-526.

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

Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D. New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening, *Journal of the National Cancer Institute*, **1990**, 82, 1107-1112.

Suárez-Ortiz, G. A.; Cerda-García-Rojas, C. M.; Hernández-Rojas, A.; Pereda-Miranda, R. Absolute Configuration and Conformational Analysis of Brevipolides, Bioactive 5,6-Dihydro- α -pyrones from *Hyptis brevipes*, *Journal of Natural Products*, **2013**, 76, 72-78.

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

Tiwari, V. K.; Rajwar, G. S.; Rajwar, G. S. Protein and aminoacid content of *Hyptis suaveolens* Poit. *Journal of Scientific Research in Plants and Medicines*, **1979**, 1, 48-51.

Usui T.; Watanabe, H.; Nakayama, H.; Tada, Y; Kanoh, N.; Kondoh, M.; Asao, T.; Takio, K.; Watanabe, H.; Nishikawa, K.; Kitahara, T.; Osada, H. The anticancer natural product pironetin selectively targets Lys352 of alpha-tubulin, *Chemistry & Biology*, **2004**, 11, 799-806.

Waters, <http://www.waters.com/waters/home.htm>, consultada el 2 abril 2014.

Xu, D. H.; Huang, Y. S.; Jiang, Y. S.; Yuan, K. The essential oils chemical compositions and antimicrobial, antioxidant activities and toxicity of three *Hyptis* species. *Pharmaceutical Biology*, **2013**, 9, 1125-1130.

9 APÉNDICE

Figura A1. Espectro de RMN- ¹ H de la fracción secundaria AC en CDCl ₃ (400 MHz). _____	74
Figura A2. Espectro de RMN- ¹ H de la fracción secundaria AD en CDCl ₃ (400 MHz). _____	74
Figura A3. Espectro de RMN- ¹ H de la fracción secundaria AG en CDCl ₃ (400 MHz). _____	75
Figura A4. Espectro de RMN- ¹ H de la fracción secundaria AH en CDCl ₃ (400 MHz). _____	75
Figura A5. Espectro de RMN- ¹ H de la fracción secundaria AI en CDCl ₃ (400 MHz). _____	76
Figura A6. Espectro de RMN- ¹ H de la fracción B-Hex en CDCl ₃ (400 MHz). _____	76
Figura A7. Espectro de RMN- ¹ H de la fracción B-MeOH/H ₂ O en CDCl ₃ (400 MHz). _____	77
Figura A8. Espectro de RMN- ¹ H de la fracción C-Hex en CDCl ₃ (400 MHz). _____	77
Figura A9. Espectro de RMN- ¹ H de la fracción C-MeOH/H ₂ O en CDCl ₃ (400 MHz). _____	78
Figura A10. Espectro de RMN- ¹ H de la fracción D-Hex en CDCl ₃ (400 MHz). _____	78
Figura A11. Espectro de RMN- ¹ H de la fracción D-MeOH/H ₂ O en CDCl ₃ (400 MHz). _____	79
Figura A12. Espectro de RMN- ¹ H de la fracción E-Hex en CDCl ₃ (400 MHz). _____	79
Figura A13. Espectro de RMN- ¹ H de la fracción E-MeOH/H ₂ O en CDCl ₃ (400 MHz). _____	80
Figura A14. Espectro de RMN- ¹ H de la fracción F-Hex en CDCl ₃ (400 MHz). _____	80
Figura A15. Espectro de RMN- ¹ H de la fracción F-MeOH/H ₂ O en CDCl ₃ (400 MHz). _____	81
Figura A16. Espectro de RMN- ¹ H de la fracción G-Hex en CDCl ₃ (400 MHz). _____	81
Figura A17. Espectro de RMN- ¹ H de la fracción G-MeOH/H ₂ O en CDCl ₃ (400 MHz). _____	82

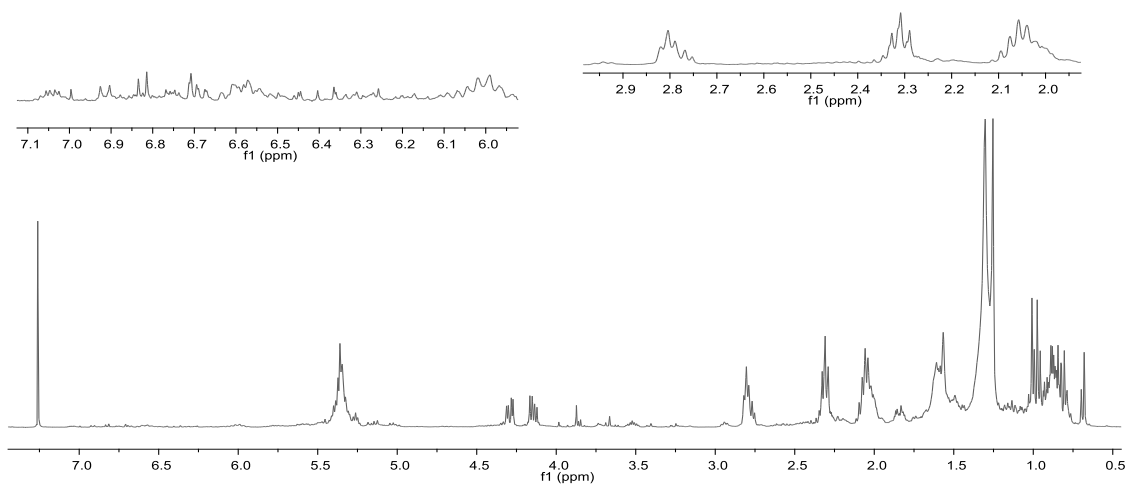


Figura A1. Espectro de RMN- ^1H de la fracción secundaria AC en CDCl_3 (400 MHz).

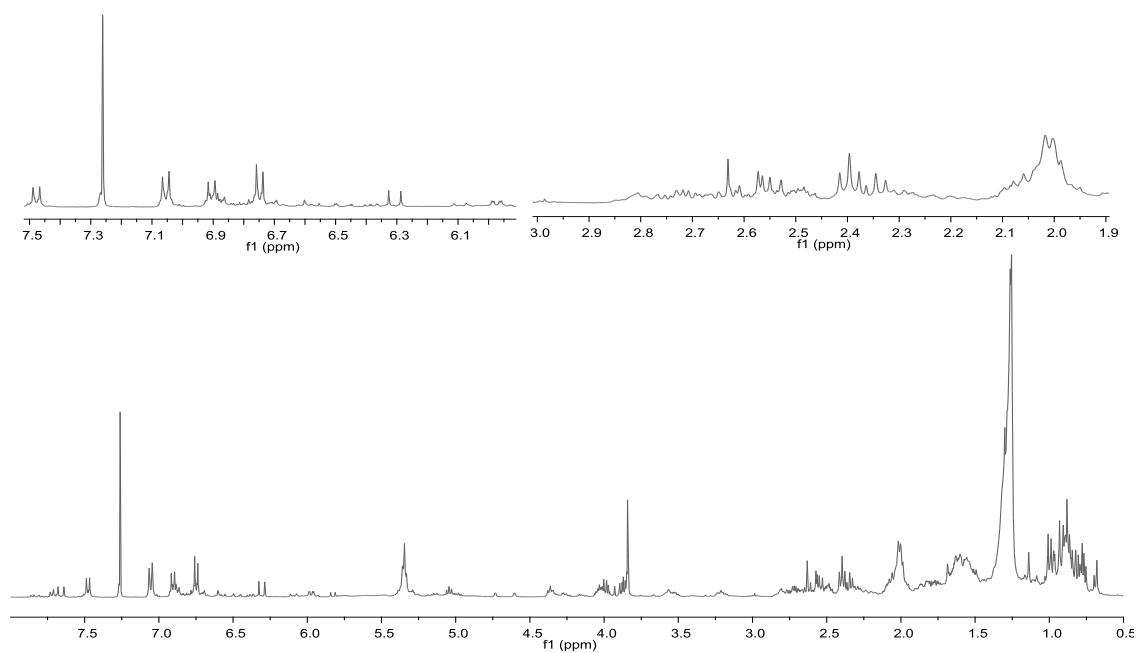


Figura A2. Espectro de RMN- ^1H de la fracción secundaria AD en CDCl_3 (400 MHz).

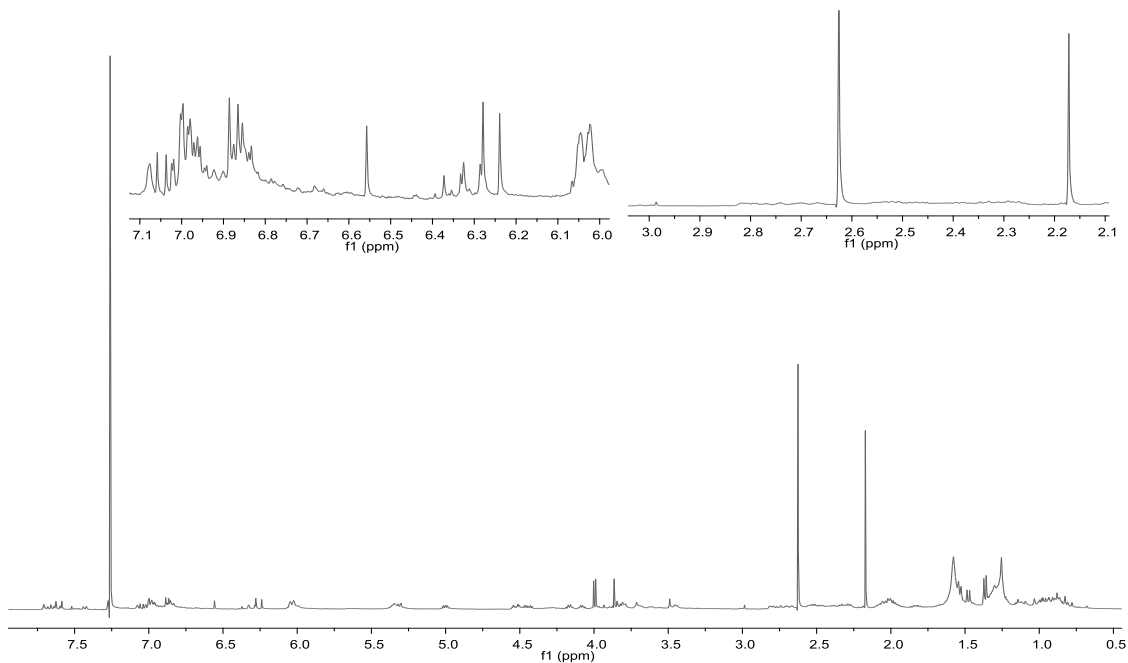


Figura A3. Espectro de RMN-¹H de la fracción secundaria AG en CDCl₃ (400 MHz).

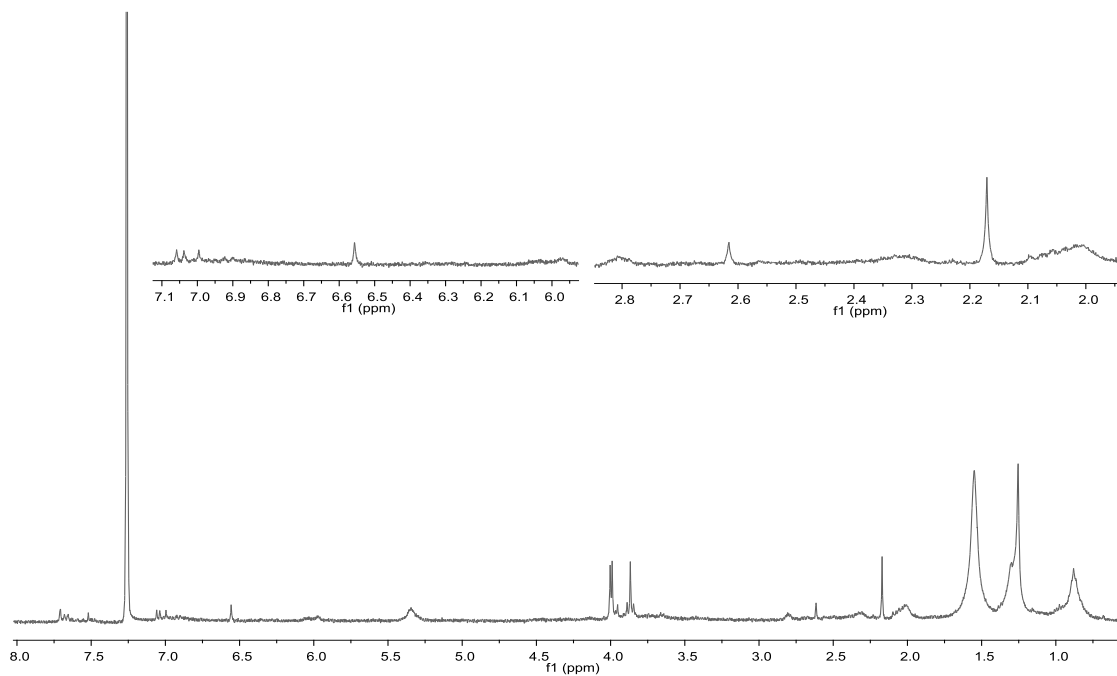


Figura A4. Espectro de RMN-¹H de la fracción secundaria AH en CDCl₃ (400 MHz).

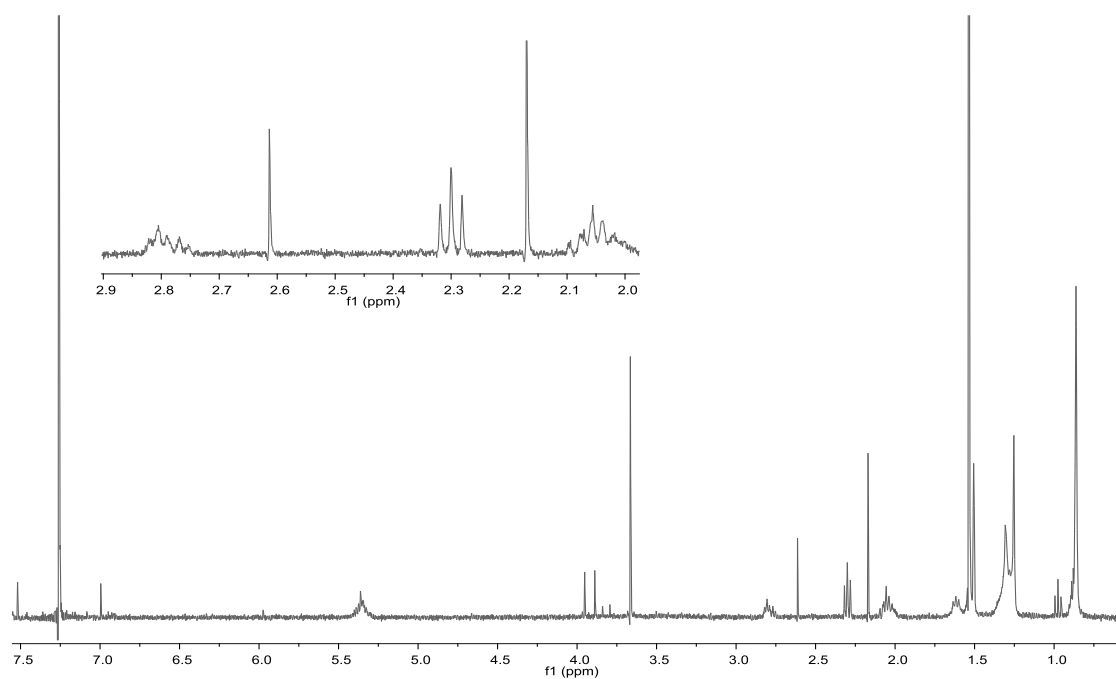


Figura A5. Espectro de RMN- ^1H de la fracción secundaria AI en CDCl_3 (400 MHz).

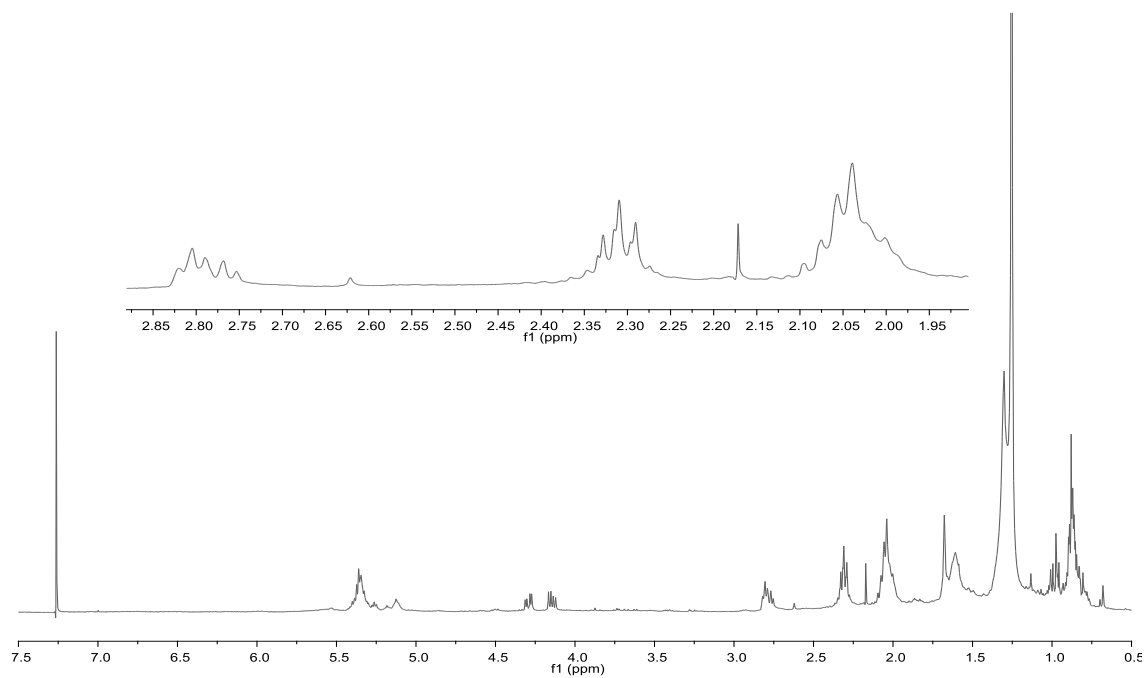


Figura A6. Espectro de RMN- ^1H de la fracción B-Hex en CDCl_3 (400 MHz).

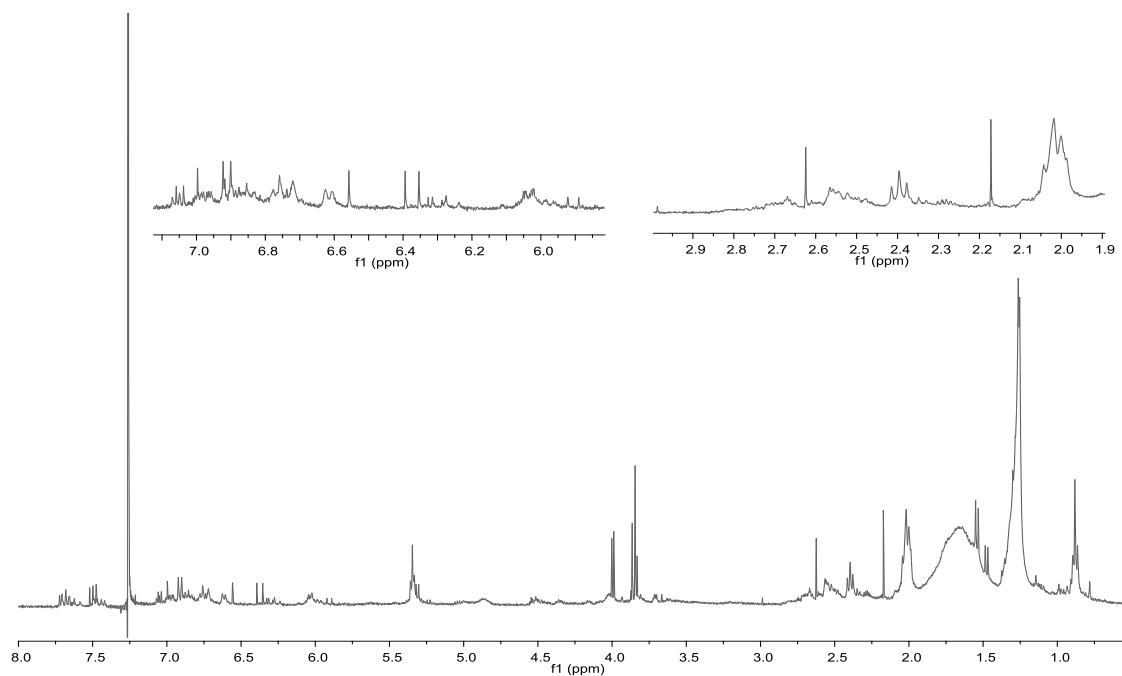


Figura A7. Espectro de RMN- ^1H de la fracción B-MeOH/H₂O en CDCl₃ (400 MHz).

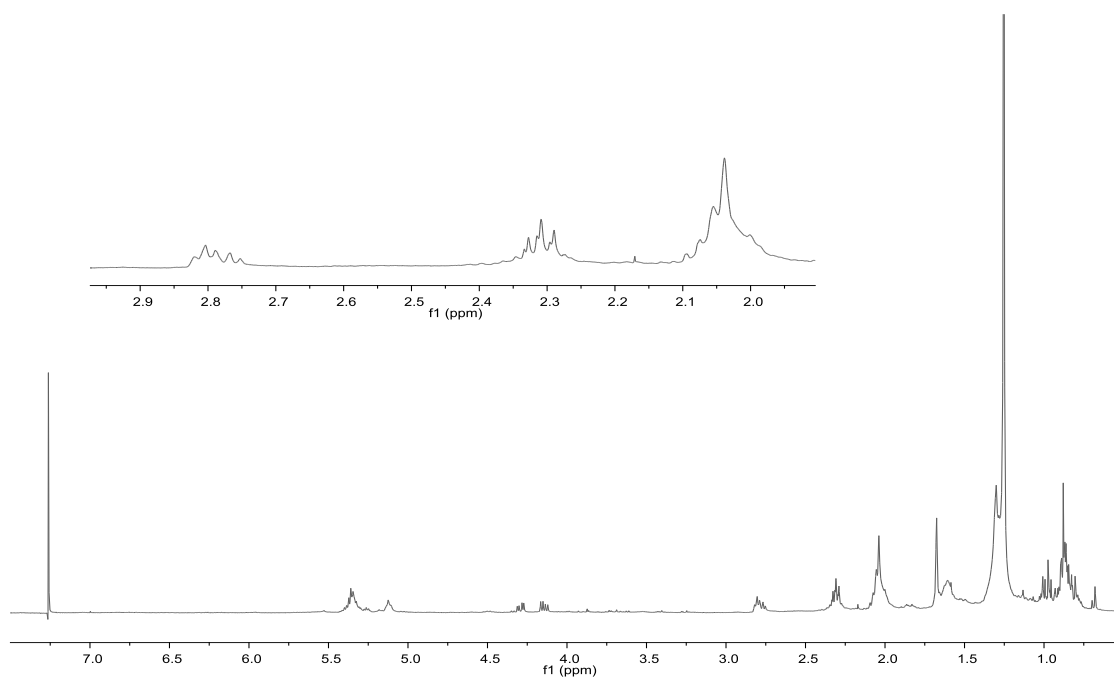


Figura A8. Espectro de RMN- ^1H de la fracción C-Hex en CDCl₃ (400 MHz).

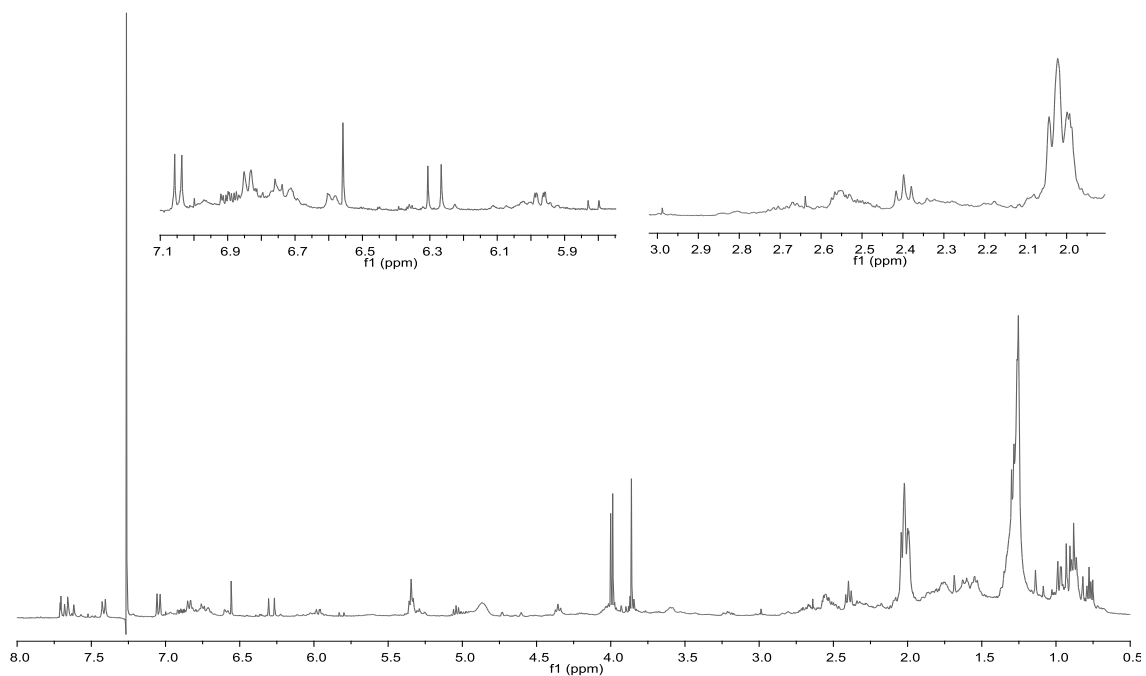


Figura A9. Espectro de RMN- ^1H de la fracción C-MeOH/H₂O en CDCl_3 (400 MHz).

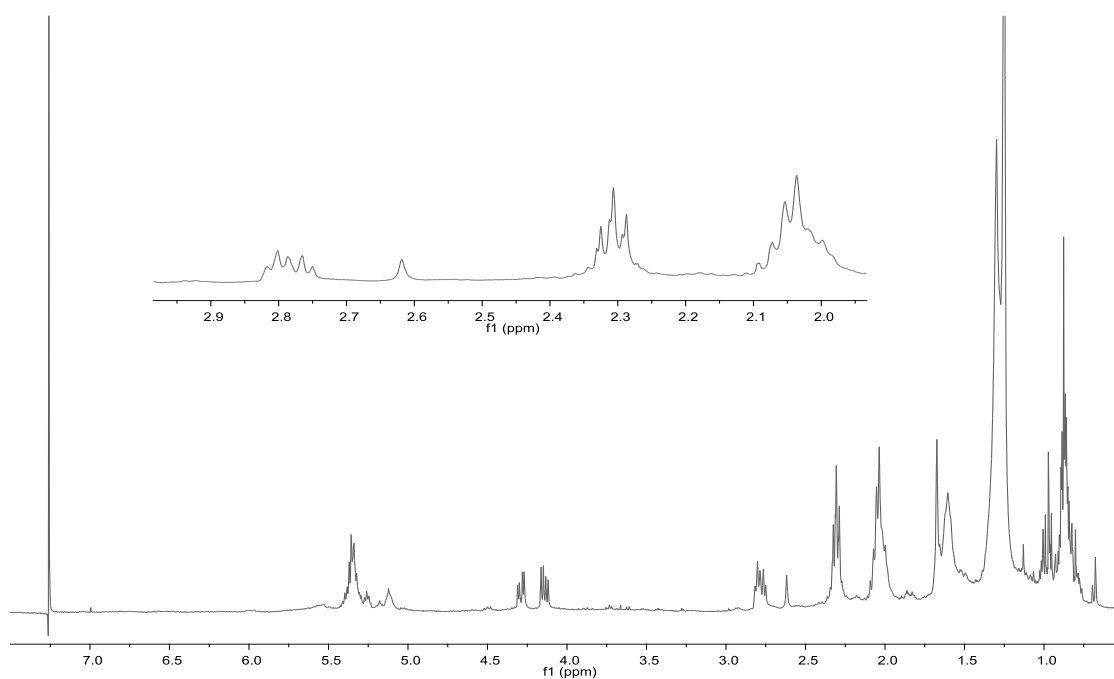


Figura A10. Espectro de RMN- ^1H de la fracción D-Hex en CDCl_3 (400 MHz).

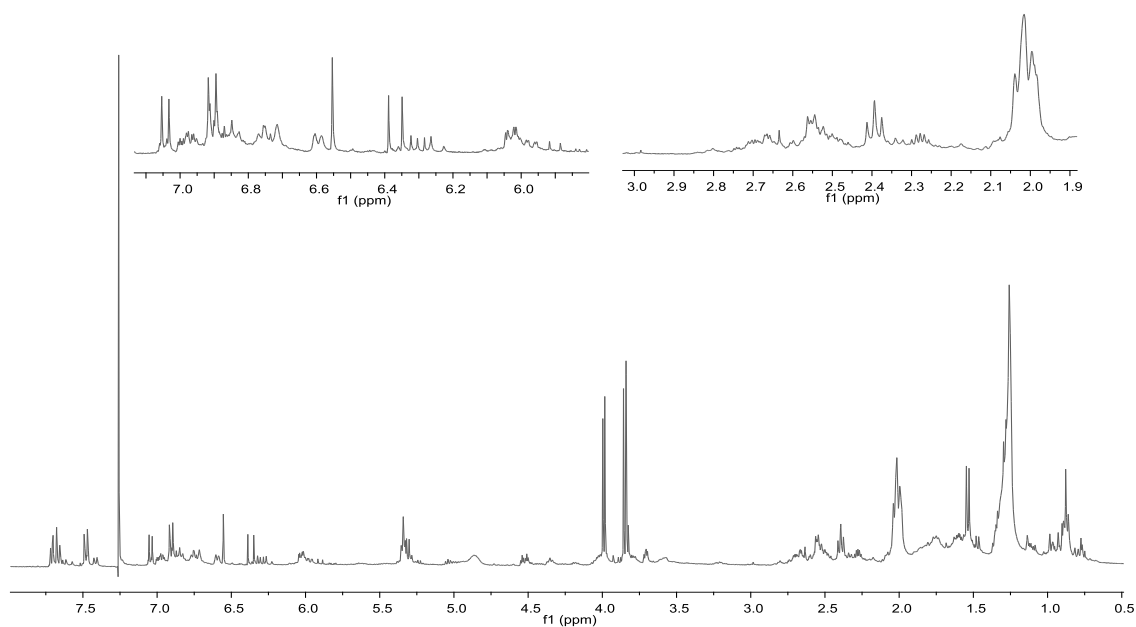


Figura A11. Espectro de RMN- ^1H de la fracción D-MeOH/H₂O en CDCl₃ (400 MHz).

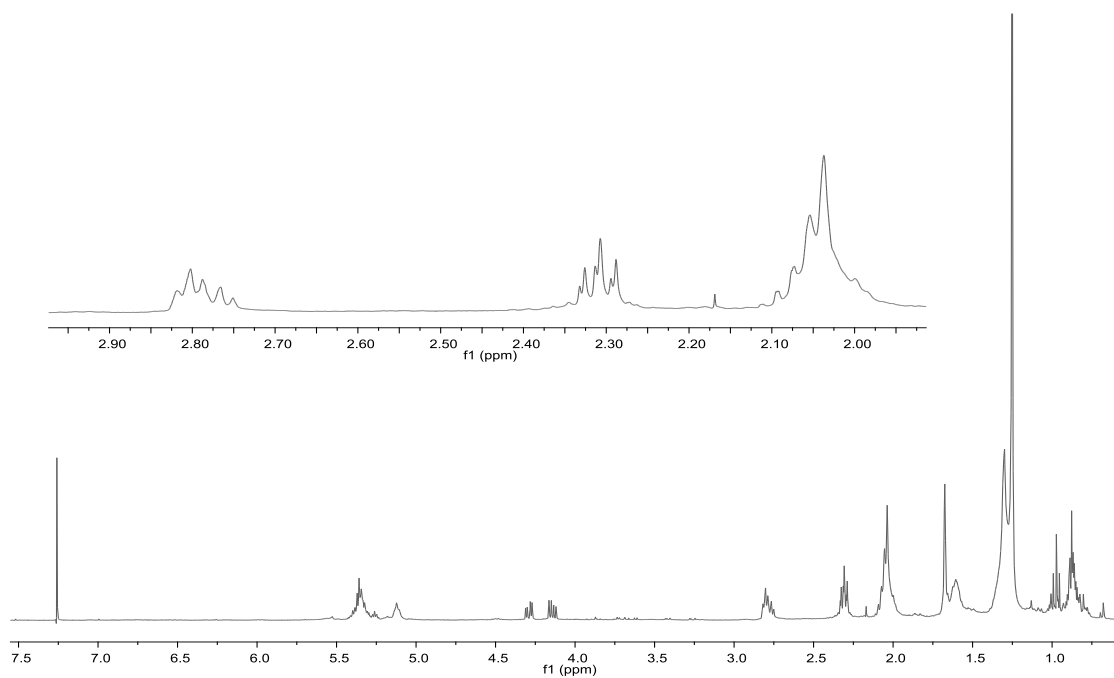


Figura A12. Espectro de RMN- ^1H de la fracción E-Hex en CDCl₃ (400 MHz).

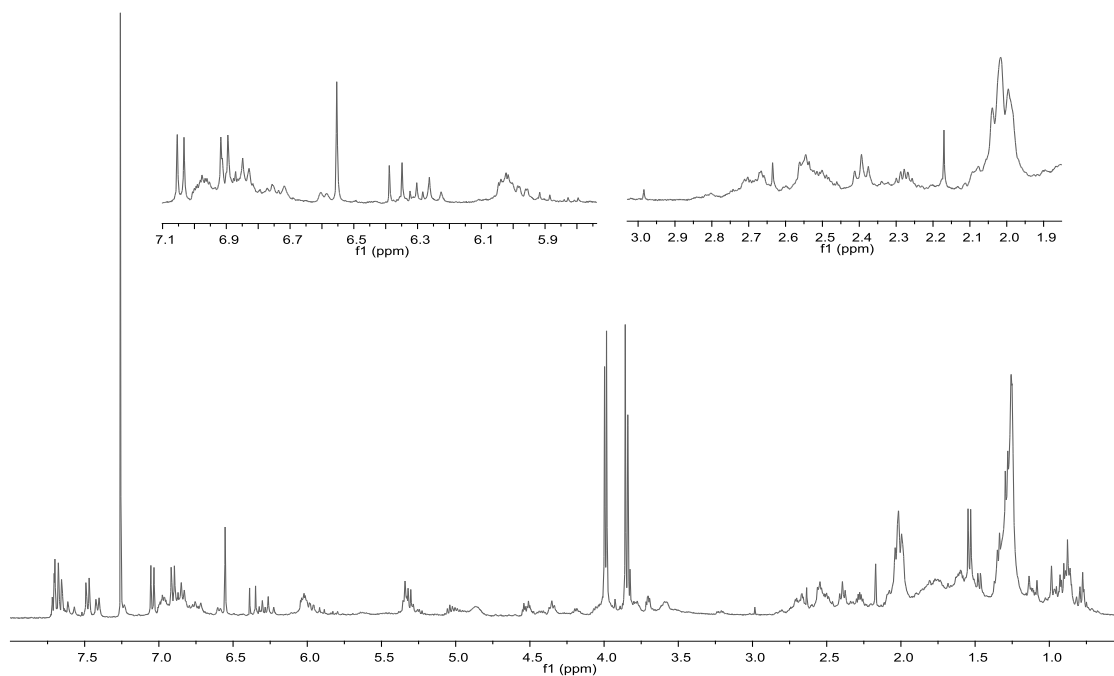


Figura A13. Espectro de RMN- ^1H de la fracción E-MeOH/H₂O en CDCl₃ (400 MHz).

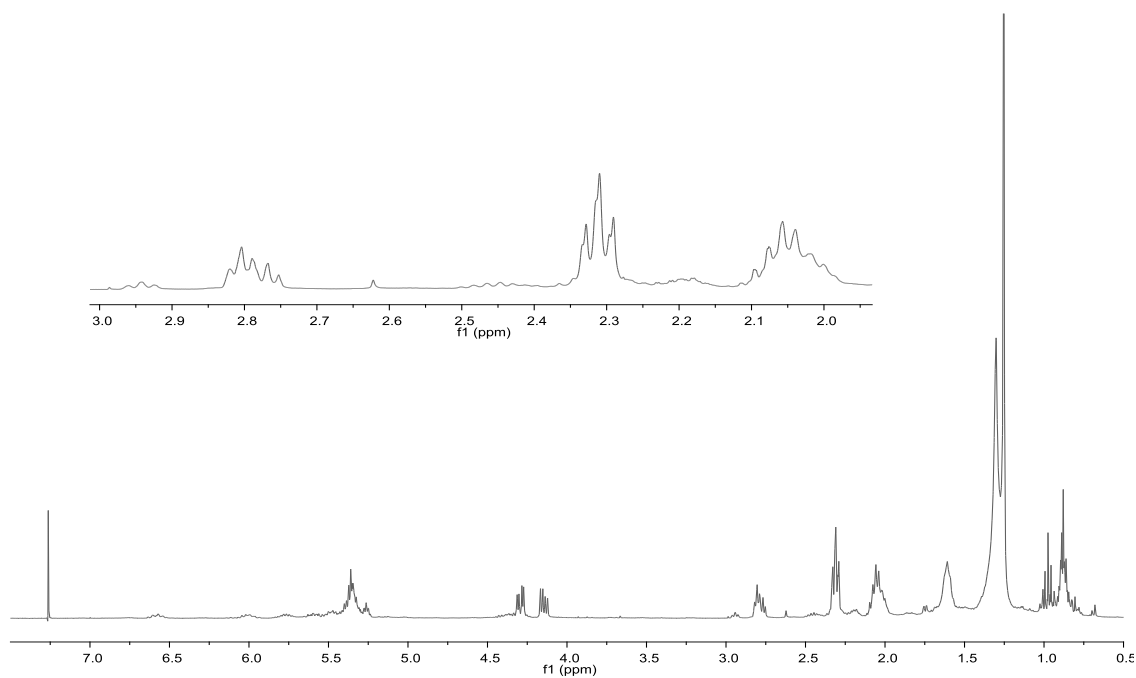


Figura A14. Espectro de RMN- ^1H de la fracción F-Hex en CDCl₃ (400 MHz).

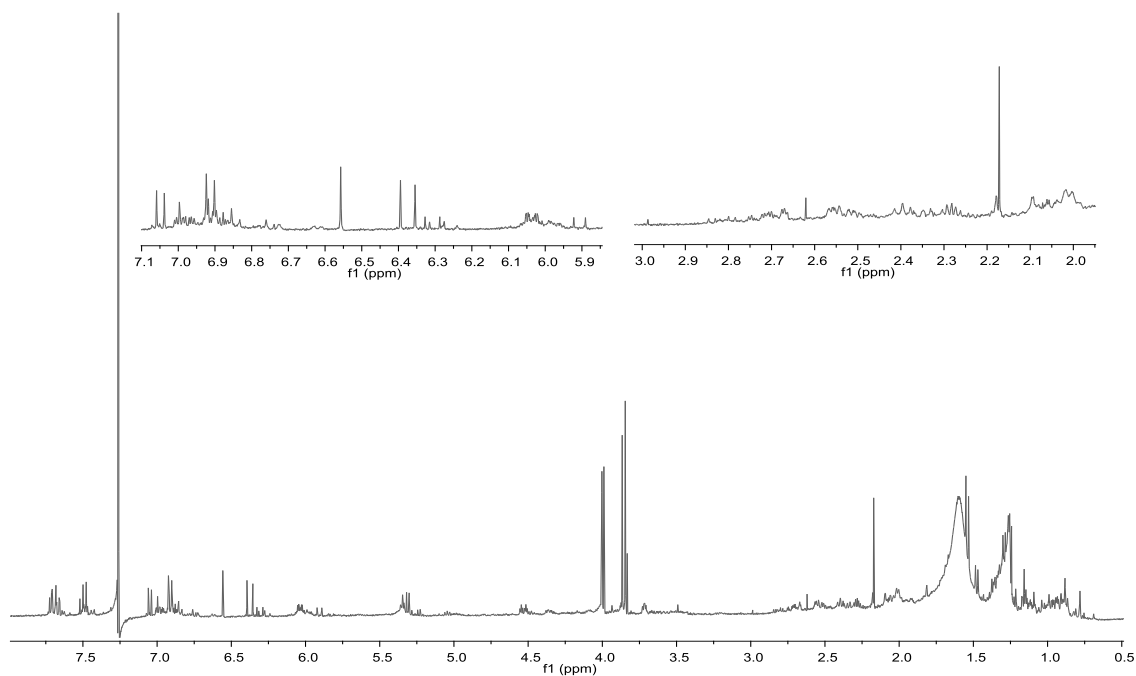


Figura A15. Espectro de RMN- ^1H de la fracción F-MeOH/H₂O en CDCl₃ (400 MHz).

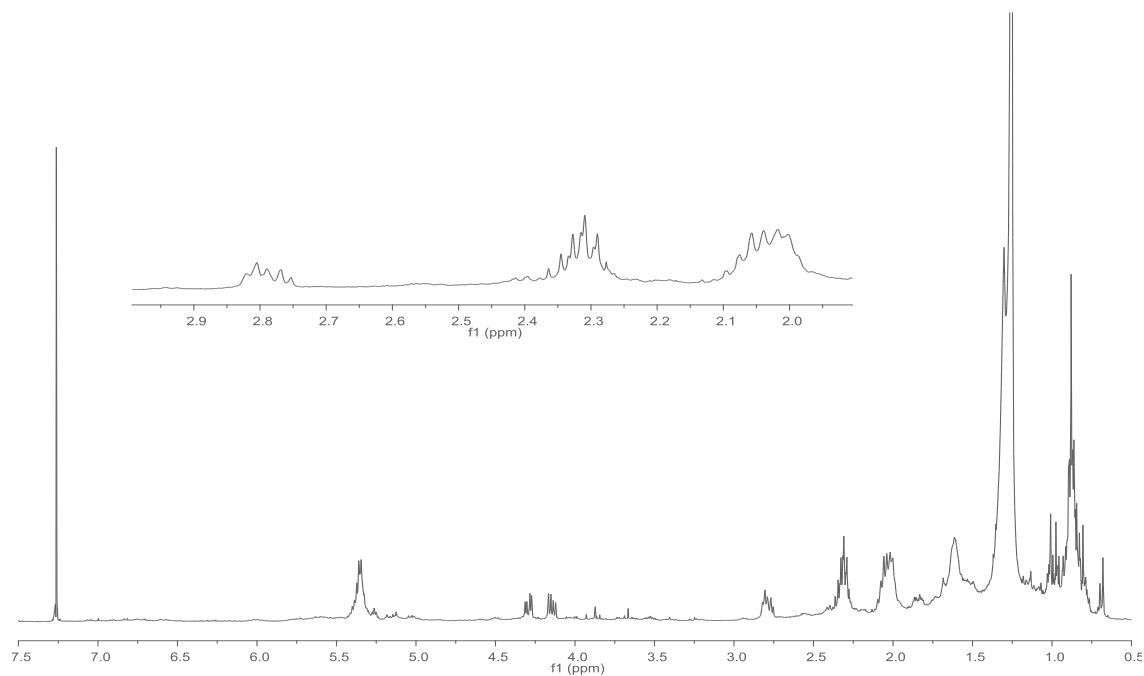


Figura A16. Espectro de RMN- ^1H de la fracción G-Hex en CDCl₃ (400 MHz).

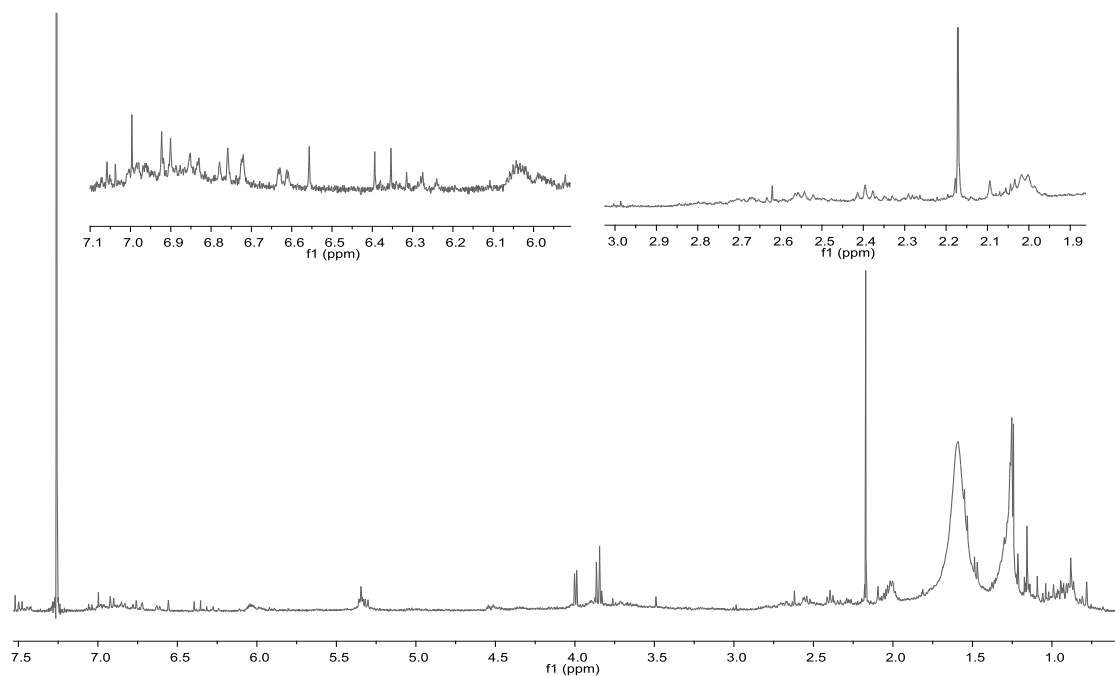


Figura A17. Espectro de RMN- ^1H de la fracción G-MeOH/H₂O en CDCl_3 (400 MHz).