



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE 6-HEPTENIL-5,6-
DIHIDRO-ALFA-PIRONAS CON ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LA ESPECIE
*HYPTIS PECTINATA***

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. MARTÍNEZ FRUCTUOSO LUCERO MARICELA

TUTOR: Dr. ROGELIO G. PEREDA MIRANDA
FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO D.F., ENERO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Alfonso Romo de Vivar Romo

Vocal: Dr. José Federico del Río Portilla

Vocal: Dra. María Luisa Villareal Ortega

Vocal: Dra. María Isabel Aguilar Laurents

Secretario: Dr. Ricardo Reyes Chilpa

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Farmacia, Laboratorio 123.

Facultad de Química.

Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor: _____

Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda

Sustentante: _____

Q.F.B. Lucero Maricela Martínez Fructuoso

El trabajo se presentó en la modalidad de cartel en el 10^a Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales realizada en Mérida, Yucatán durante Mayo del 2014.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo brindado a las siguientes personas e instituciones:

Al CONACyT (número de becario 288963) por la beca otorgada durante la realización de mis estudios.

A la Dirección General de Asuntos de Personal Académico (IN212813) y al CONACyT (proyecto 220535) por el financiamiento parcial de esta investigación.

A los miembros del jurado por sus observaciones, las cuales me permitieron las correcciones del presente escrito.

A la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI), Facultad de Química, UNAM, por el registro de espectros de Resonancia Magnética Nuclear.

Al Dr. Carlos Martín Cerda García-Rojas del Departamento de Química del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional por la determinación de la rotación óptica.

A la Dra. Mabel Clara Fragosó Serrano por su apoyo y dedicación durante la realización de la presente investigación.

Al Dr. Rogelio Pereda Miranda por permitirme trabajar en su grupo de investigación y por la dedicación brindada durante la dirección de la presente investigación.

*La ciencia es una sola luz, e iluminar con ella cualquier parte,
es iluminar con ella el mundo entero.*

Issac Asimov

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1 Generalidades de la familia Lamiaceae	3
2.2 Género <i>Hyptis</i>	5
2.2.1 Descripción de <i>Hyptis pectinata</i> (L.) Poit.....	8
2.3 Metabolitos secundarios del género <i>Hyptis</i>	11
2.3.1 5,6-dihidro- α -pironas	16
3. Hipótesis y Justificación	20
4. Objetivos	21
5. Parte experimental	22
5.1 Determinación de las constantes espectroscópicas	22
5.2 Material vegetal	22
5.2.1 Extracción del material vegetal.....	23
5.2.2 Eliminación de triterpenos	23
5.3 Técnicas cromatográficas.....	24
5.3.1 Fraccionamiento primario del extracto clorofórmico	25
5.3.2 Análisis y purificación por CLAR	27
5.4 Reacción de acetilación.....	28
5.5 Ésteres de Mosher	29
5.6 Ensayo de citotoxicidad	30
6. Resultados y discusión	32
6.1 Estudio fitoquímico de <i>Hyptis pectinata</i>	32
6.1.1 Aislamiento y purificación de los compuestos 1-2	32
6.1.2 Aislamiento y purificación del compuesto 3.....	35
6.2 Caracterización de la pectinólida I.....	37
6.2.1 Resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas	37
6.2.2 Correlación química.....	43
6.2.3 Evaluación citotóxica	48

Conclusiones	49
Bibliografía	50

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Usos de las plantas de familia Lamiaceae	4
Cuadro 2. Usos tradicionales de especies selectas del género <i>Hyptis</i>	7
Cuadro 3. Taxonomía de <i>Hyptis pectinata</i>	9
Cuadro 4. Ejemplos de terpenoides obtenidos del aceite esencial de algunas especies del género <i>Hyptis</i>	15
Cuadro 5. Peso de los extractos de <i>Hyptis pectinata</i>	24
Cuadro 6. Columnas utilizadas en el equipo de CLAR	25
Cuadro 7. Fracciones reunidas del primer fraccionamiento.....	26
Cuadro 8. Condiciones de separación y análisis de las fracciones.....	27
Cuadro 9. Citotoxicidad del extracto C1 y la fracción E9	33
Cuadro 10. Citotoxicidad del extracto C2 y la fracción F9.....	35
Cuadro 11. Desplazamientos químicos de ¹ H-RMN (400MHz) y ¹³ C-RMN (101MHz) para la pectinólida I en CDCl ₃ y MeOH.....	41
Cuadro 12. Desplazamiento químico ¹ H-RMN de las señales de los derivados de éster (<i>S</i> -y (<i>R</i>)-MTPA de la Pectinólida I peracetilada	48
Cuadro 13. Citotoxicidad de la Pectinólida I	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribución de la familia Lamiaceae en México	3
Figura 2. Ejemplo de diversas especies pertenecientes a la familia Lamiaceae. (A) <i>Brazoria truncata</i> (B) <i>Clerodendrum grandiflorum</i> (C) <i>Menta piperita</i> (D) <i>Melissa Officinalis</i> (E) <i>Salvia officinalis</i> (F) <i>Scutellaria baicalensis</i>	5
Figura 3. Distribución de <i>Hyptis pectinata</i>	8
Figura 4. Morfología de <i>Hyptis pectinata</i>	11
Figura 5. Lignanos citotóxicos aislados de <i>Hyptis verticillata</i>	13
Figura 6. Diterpenos con núcleo labdánico de <i>Hyptis spicigera</i>	14

Figura 7. Triterpenoides citotóxicos selectos del género <i>Hyptis</i>	14
Figura 8. Ejemplos de 6-heptenil-5,6-dihidro- α -pironas del género <i>Hyptis</i>	17
Figura 9. . 5,6-dihidro- α -pironas aisladas de <i>Hyptis brevipes</i>	18
Figura 10. Ejemplar de <i>H. pectinata</i> del Herbario de Xalapa, Veracruz.....	22
Figura 11. 5,6-dihidro- α -pironas aisladas de <i>Hyptis pectinata</i>	32
Figura 12. Cromatograma de líquidos a nivel preparativo de la fracción E9. Condiciones cromatográficas: columna de fase reversa C ₁₈ (7 μ m, 19 \times 300 mm); detector de arreglo de diodos (320 nm); fase móvil: MeOH; flujo de elución: 8.18 mL/min	33
Figura 13. Purificación del pico B a través de la técnica de reciclaje. Condiciones cromatográficas: columna de fase reversa C ₁₈ (7 μ m, 19 \times 300 mm); detector de arreglo de diodos (320nm); fase móvil: MeOH; flujo de elución: 8.18mL/min	34
Figura 14. Cromatograma de líquidos a nivel analítico de los picos B y D correspondientes a las pectinólida A y C. Condiciones cromatográficas: columna de fase reversa C ₁₈ (5 μ m, 4.6 \times 250mm); detector de arreglo de diodos (320 nm); fase móvil: MeOH; flujo de elución: 0.4 mL/min	34
Figura 15. Cromatograma de líquidos a nivel preparativo de la fracción F9. Condiciones cromatográficas: columna de fase reversa C ₁₈ (7 μ m, 4.6 \times 300 mm); detector de arreglo de diodos (320 nm); fase móvil: MeOH:H ₂ O (7:3); flujo de elución: 6.14 mL/min.	36
Figura 16. Purificación del pico II a través de la técnica de reciclaje. Condiciones cromatográficas: columna de fase reversa C ₁₈ (10 μ m, 10 \times 250 mm); detector de arreglo de diodos (320 nm); fase móvil: MeOH; flujo de elución: 1.42 mL/min	36
Figura 17. Cromatograma de líquidos a nivel analítico del pico II. Condiciones cromatográficas: columna de fase reversa C ₁₈ (5 μ m, 4.6 \times 250 mm); detector de arreglo de diodos (320 nm); fase móvil: MeOH:H ₂ O (7:3); flujo de elución: 0.3 mL/min	37
Figura 18. Patrón de fragmentación en impacto electrónico.....	38
Figura 19. Electrospray negativo (ES ⁻ , superior) y positivo (ES ⁺ , inferior).....	38
Figura 20. Espectros de ¹³ C-RMN de la Pectinólida I, rojo CDCl ₃ y azul MeOD (101MHz)	39
Figura 21. Espectros de ¹ H-RMN de la Pectinólida I, rojo CDCl ₃ , azul MeOD (400MHz)	40
Figura 22. Espectro bidimensional ¹ H- ¹ H COSY de la Pectinólida I en CDCl ₃	42

Figura 23. Espectro bidimensional ^1H - ^{13}C HSQC de la Pectinólida I en CDCl_3	42
Figura 24. Correlaciones químicas entre pectinólidas.....	43
Figura 25. Espectro de ^1H -RMN de la Pectinólida I peracetilada en CDCl_3 (400MHz).....	44
Figura 26. Curvas de DC en MeOH, a) pectinólida A, b) pectinólida B y c) pectinólida C.	44
Figura 24. Correlaciones químicas reportadas para las pectinólidas A-C.....	45
Figura 28. Espectros de ^1H -RMN de los ésteres <i>R</i> - y <i>S</i> -MTPA de la pectinólida I monoacetilada en CDCl_3 (300MHz).....	46
Figura 29. Modelo de correlación configuracional para los ésteres (<i>R</i>)- y (<i>S</i>)-MTPA.	46
Figura 30. Modelo para determinar la configuración absoluta a través de los ésteres (<i>S</i>)- y (<i>R</i>)-MTPA.....	47
Figura 31. Valores de $\Delta\delta$ ($\delta_{S\text{-MTPA}} - \delta_{R\text{-MTPA}}$) para los ésteres de Mosher de la Pectinólida I	47

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
AcOEt	Acetato de etilo
CCF	Cromatografía en capa fina
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
COSY	Correlation Spectroscopy
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
δ	Desplazamiento químico
d	Doblete
dd	Doble de doble
ddd	Doble de doble de doble
DC	Dicroísmo circular
DMAP	4-Dimetilaminopiridina
ESI-MS	Espectrometría de masas de ionización por electrospray
HCT15	Carcinoma de colon
HeLa	Carcinoma de cérvix
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
HT-29	Adenocarcinoma de colon grado II
Hz	Hertz
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media
MCF7	Carcinoma de mama
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
KB	Carcinoma nasofaríngeo
m/z	Relación masa carga
MeOH	Metanol
MeOD	Metanol deuterado
(<i>S</i>)- y (<i>R</i>)-MTPA	(<i>S</i>)- o (<i>R</i>)- α -metoxi- α -(trifluorometil)fenilacetil

PBS	Phosphate buffered saline
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia magnética nuclear
¹ H-RMN	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
¹³ C-RMN	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
t	Triplete
TMS	Tetrametilsilano
t _r	Tiempo de retención

1. INTRODUCCIÓN

Desde tiempos muy antiguos, las plantas superiores han sido una fuente inagotable de materia prima para la obtención de distintos fármacos. Estudios antropológicos y arqueológicos demuestran el extendido uso medicinal que tenían las plantas dentro de las antiguas culturas alrededor del mundo. Unos cuantos ejemplos de los documentos que existen acerca del uso terapéutico de las plantas son los ideogramas sumerios que datan de hace 2,500 años A.C. haciendo referencia al uso medicinal de las plantas, el papiro egipcio de *Ebers* (ca. 1500 A.C.) y el *Códice de la Cruz-Badiano* (Cortez-Gallardo *et al.* 2004, Ríos *et al.*, 2012).

Dentro del campo científico, el conocimiento del uso de las plantas en la medicina tradicional no se ha quedado en el olvido, y ciencias multidisciplinarias como la etnofarmacología y la farmacognosia se encargan de su estudio. La primera da un enfoque científico de las actividades biológicas de cualquier preparado utilizado por los seres humanos, ya sean efectos farmacológicos directos benéficos o tóxicos, utilizando la combinación de estudios antropológicos, farmacológicos y toxicológicos de estas preparaciones (Heinrich, 2014). Mientras que la farmacognosia se encarga de estudiar la historia, el cultivo, la recolección, la preparación, la preservación, la distribución, la identificación, la comercialización y la evaluación de los componentes químicos de origen natural, además de analizar moléculas que sirvan como modelo estructural para la síntesis de nuevos compuestos con mayor potencia y de materias primas para los procesos de semisíntesis y obtención de sustancias activas como hormonas esteroides, anestésicos locales y antibióticos (Cortez-Gallardo *et al.* 2004).

La familia Lamiaceae es muy diversa, incluye 236 géneros y 7,173 especies. En México, se encuentra ampliamente distribuida, principalmente a lo largo de las zonas montañosas y, de manera primordial, en el eje neovolcánico transversal. Esta familia tiene importancia económica en varias partes del mundo, ya que muchas de sus especies se usan como condimentos (*Origanum*, *Thymus*, *Mentha*), para obtener aceites esenciales

(*Lavandula*, *Pogostemon*, *Salvia*) o como ornamentales (*Coleus*, *Salvia*, *Scutellaria*) (Martínez-Gordillo *et al.*, 2013).

Las especies del género *Hyptis* perteneciente a esta familia cuentan con una gran relevancia dentro de la medicina tradicional mexicana puesto que se usan para el tratamiento de malestares gastrointestinales, infecciones de la piel, dolores reumáticos, musculares y calambres. Este género conocido popularmente con el nombre de “hierba del burro”, al igual que todas las especies de lamiaceas, es rico en aceites esenciales y éstos son los principales responsables de sus bondades medicinales. Sin embargo, presenta un grupo de compuestos marcadores del tipo 6-heptenil-5,6-dihidro-2*H*-piran-2-onas, el cual contribuye con sus propiedades antimicrobianas, citotóxicas y antitumorales. El sistema δ -lactona- α,β insaturado es el grupo farmacofórico responsable de las propiedades citotóxicas de estos principios bioactivos (López-Vallejo *et al.*, 2011); por ejemplo, las brevipólidas aisladas de *Hyptis brevipes* desarrollaron una citotoxicidad moderada en contra de la línea celular de carcinoma nasofaríngeo (KB: IC₅₀ 0.3–8.0 $\mu\text{g/mL}$) (Suárez-Ortíz *et al.*, 2013).

En el presente estudio, se realizó una nueva investigación química de la planta *Hyptis pectinata* conocida como “poleo” o “hierba del burro”, de la cual han sido reportadas propiedades fisiológicas tales como relajantes del músculo liso, antiinflamatorias, antipiréticas, antifúngicas y antimicrobianas (Pereda-Miranda, 1995). Las 6-heptenil-5,6-dihidro-2*H*-piran-2-onas aisladas de *Hyptis pectinata* exhibieron una IC₅₀ menor a 4 $\mu\text{g/mL}$ frente a diversas líneas celulares (Pereda-Miranda, 1993). Con base en estos estudios previos, el presente trabajo se enfocó en el aislamiento, la purificación y la caracterización estructural de un compuesto citotóxico novedoso y su evaluación frente a distintas líneas celulares derivadas de tumores humanos.

2. ANTECEDENTES

2.1 GENERALIDADES DE LA FAMILIA LAMIACEAE (LABIATAE).

En México esta familia está constituida por 32 géneros nativos o naturalizados por un largo período, por lo que es común encontrarlos de manera silvestre y ampliamente distribuidos, como el caso de *Salvia*. Los géneros pertenecen a 4 subfamilias e incluyen 591 especies. Es una de las familias más diversas del país, sólo después de las familias Asteraceae, Fabaceae, Poaceae, Orchidaceae, Cactaceae, Euphorbiaceae y Rubiaceae (Martínez-Gordillo *et al.*, 2013).

Los géneros mejor representados en el país son *Salvia*, *Scutellaria*, *Stachys* e *Hyptis*, con más de 35 especies cada uno. Géneros con afinidad tropical como *Vitex*, *Callicarpa*, *Aegiphila* y *Volkameria*, que tienen amplia diversidad en Centro y Sudamérica, en México están representados por un número muy reducido de especies. En el norte de la República se encuentran una serie de géneros compartidos con el sur de Estados Unidos que crecen en zonas áridas con una diversidad apreciable, como es el caso de *Hedeoma*, *Monarda*, *Monardella*, *Poliomintha*, *Tetraclea*, *Trichostema* y *Warnockia* (Figura 1) (Martínez-Gordillo *et al.*, 2013).



Figura 1. Distribución de la familia Lamiaceae en México.

La familia Lamiaceae está formada principalmente por hierbas o arbustos provistos en todas sus partes de glándulas secretoras de aceites esenciales volátiles. Los tallos son cuadrangulares y las hojas siempre opuestas; las inflorescencias son terminales o laterales, de aspecto racemoso (espigas o panículas) constituidas por agrupaciones de flores de tipo cimoso (verticilastros), que se ubican en cada par de brácteas. Las flores presentan cáliz bilabiado o regular de cinco piezas parcialmente soldadas, que a veces crece rodeando el fruto, y la corola tiene los pétalos unidos, simetría dorsiventral, con una parte cilíndrica (tubo) y otra rasgada que consta de cinco lóbulos parcialmente soldados y orientados formando dos labios. El superior frecuentemente recto y en forma de casco (gálea), suele proteger a los estambres y el inferior trilobado y más extendido, sirve como plataforma a los insectos en el proceso de polinización (Figura 2) (Fernández-Alonso y Rivera-Díaz, 2006).

Las plantas de esta familia son frecuentemente aromáticas y tienen amplios usos culinarios, así como ornamentales, medicinales y en la perfumería. Los constituyentes medicinales incluyen aceites esenciales, taninos, saponinas y ácidos orgánicos que pueden tener propiedades sedativas, diuréticas, antiespasmódicas y antisépticas, entre otras (Cuadro 1) (Ramasubramania, 2012).

Cuadro 1. Usos de las plantas de familia Lamiaceae*

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

*Ramasubramania, 2012

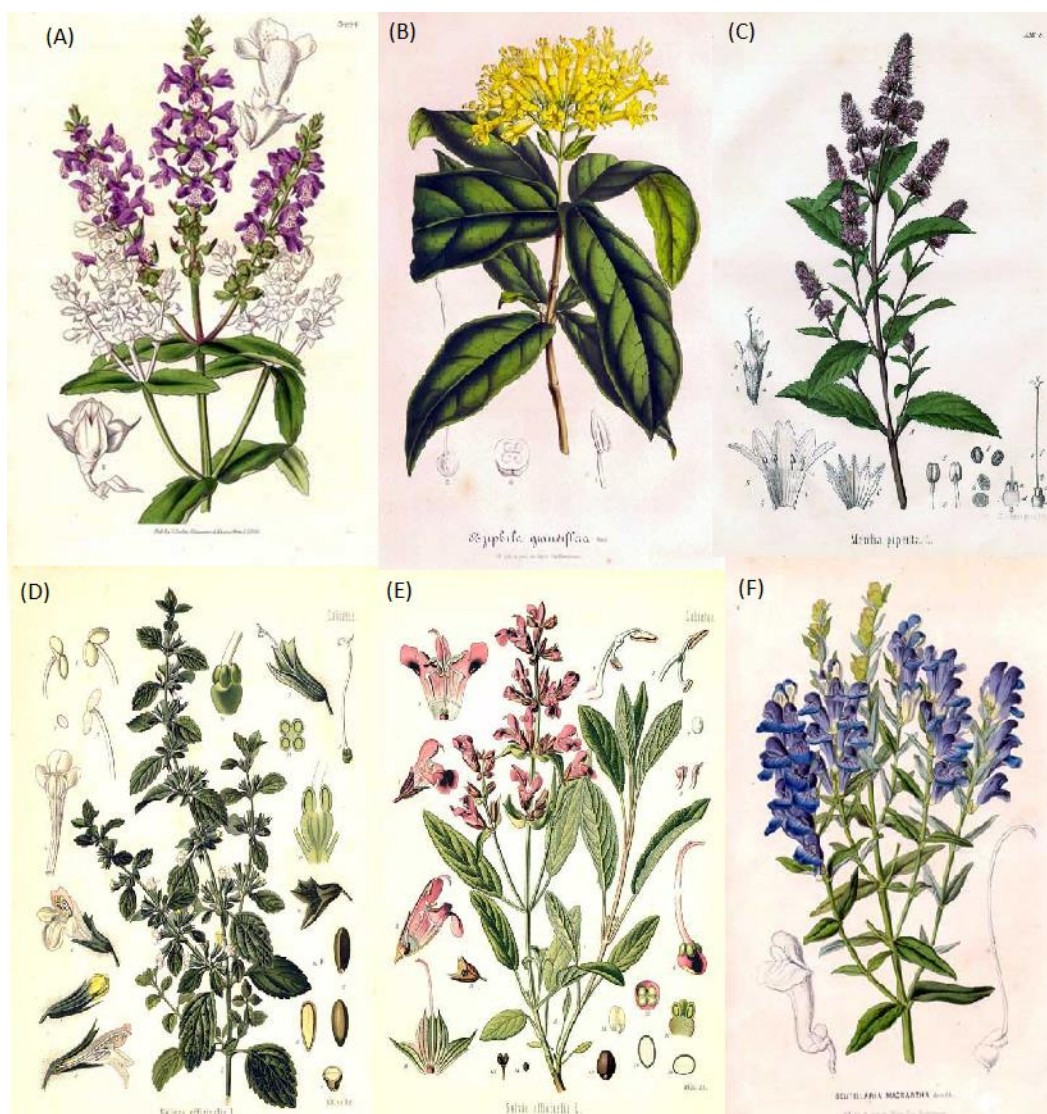


Figura 2. Ejemplo de diversas especies pertenecientes a la familia Lamiaceae. (A) *Brazoria truncata*, (B) *Clerodendrum grandiflorum*, (C) *Menta piperita*, (D) *Melissa officinalis*, (E) *Salvia officinalis*, (F) *Scutellaria baicalensis*. (<http://www.meemelink.com/>)

2.2 GÉNERO *HYPTIS*.

Hay 280 especies en el mundo pertenecientes a este género, de las cuales 35 se encuentran en México y 17 son endémicas y se distribuyen principalmente en las partes tropicales del sur y a lo largo de ambas costas (Martínez-Gordillo *et al.* 2013). En América, el uso de algunas especies pertenecientes al género *Hyptis* se remonta a las civilizaciones mesoamericanas. En el siglo XVI, el manuscrito “*Historia Plantarum Novae Hispanae*”, un escrito colonial de la herbolaria prehispánica redactado por el médico español Francisco

Hernández, menciona la “huistsiquia” o “xoxouhcaptli” para el tratamiento de la disentería y los tumores. Reumatismo, llagas e infecciones oculares también son aliviados por la decocción de esta planta (Pereda-Miranda, 1995).

Alrededor del mundo, los usos tradicionales del género *Hyptis* son diversos. En el cuadro 2 se incluyen especies representativas y sus usos medicinales; algunos de estos son sustentados a través de estudios farmacológicos. El extracto etanólico de las partes aéreas de *Hyptis rhomboides* presentó una mayor actividad antixantina oxidasa que el alopuridol, medicamento utilizado frente a la hiperuricemia (Tsai y Lee, 2014). Estudios con el extracto de éter de petróleo de las hojas de *H. suaveolens* demostró su actividad contra *Plasmodium falciparum* (Chukwujekwu *et al.*, 2005). El extracto metanólico de las hojas de esta planta presentó actividad antidiabética en ratas (Danmalam *et al.*, 2009). Los extractos acuosos e hidroetanólico de las hojas presentaron actividad antiviral contra el virus causante de la fiebre chikunguña o artritis epidémica chikunguña (Kothandan y Swaminathan, 2014) y el aceite esencial de sus partes aéreas presentó actividad contra el género *Aspergillus* (Pessoa-Moreira *et al.*, 2010). Todas las esencias de las especies de *Hyptis*, por ejemplo, *H. brevipes*, *H. rhomboides* (Xu *et al.*, 2013) y *H. crenata* (Diniz *et al.*, 2013) presentan actividad antimicrobiana. Las propiedades como repelente de insecto han sido comprobadas para el extracto hexánico y aceites esenciales de *H. spicigera* (Wekesa *et al.*, 2011).

El extracto acuoso de las partes aéreas de *H. lantanifolia* muestra ser un potente inhibidor de la VIH transcriptasa reversa (Matsuse *et al.*, 1999). El extracto hidroetanólico de las hojas de *H. fruticosa* presenta actividad antioxidante y un efecto antinociceptivo asociado a la inhibición de la transmisión periférica y central del dolor orofacial (De Lima *et al.*, 2013). Estudios del aceite esencial de las hojas de *H. martiussi* apoyan sus propiedades contra problemas gastrointestinales a través de una actividad antiulcerogénica (Caldas *et al.*, 2011), además de la actividad antimicrobiana mediada por luz del extracto etanólico de las partes aéreas (Coutinho *et al.*, 2009) y de sus propiedades antifúngica y antiprotozoaria contra *Trypanozoma cruzi* (Santos *et al.*, 2013).

Cuadro 2. Usos tradicionales de especies selectas del género *Hyptis*

	Padecimiento					
	Fiebre	Dolor	gastrointestinales	Respiratorios	Cutáneos	Otros
<i>H. suaveolens</i> 17 8 14 18	x	x	x	x	X	Dismenorrea Tuberculosis Malaria
<i>H. verticillata</i> ^{12 16}		x	x	x	x	Reumatismo
<i>H. capitata</i> ^{3 13}	x			x		Antifúngico
<i>H. macrostachys</i> ¹				x		
<i>H. umbrosa</i> ¹			x	x		auriculares
<i>H. emory</i> ⁴			x	x		Cáncer gástrico
<i>H. spicigera</i> ¹⁰ 22 23	x		x	x		insecticida
<i>H. martiusii</i> ²			x			
<i>H. fasciculata</i> ¹⁷	x			x		Gota
<i>H. crenata</i> ⁹			x			
<i>H. salzmanii</i> ¹⁵						Antibacteriano
<i>H. brevipes</i> ⁶			x		x	Calambres
<i>H. oblongifolia</i> ²¹						Repelente de insectos
<i>H. albida</i> ¹⁹			x			Repelente de insectos
<i>H. lanceolata</i> ¹¹		x		x	x	Infecciones parasitarias
<i>H. fruticosa</i> ²				x		
<i>H. mutabilis</i> ⁵ 20			x			Malaria

¹Agra *et al.*, 2007, ²Agra *et al.*, 2008, ³Almatorp *et al.*, 1991, ⁴Alonso-Castro *et al.*, 2012, ⁵Barbosa y Barbosa, 1992, ⁶Bhuiyan *et al.*, 2010, ⁷Bunalema *et al.*, 2014, ⁸Chukwujekwu *et al.*, 2005, ⁹Diniz *et al.*, 2013, ¹⁰Fragoso-Serrano *et al.*, 1999, ¹¹Igwe, 2014, ¹²Kuhnt *et al.*, 1994, ¹³Lee *et al.*, 1988, ¹⁴Lingaraju *et al.*, 2013, ¹⁵Messana *et al.*, 1990, ¹⁶Novelo *et al.*, 1993, ¹⁷Ohsaki *et al.*, 2005, ¹⁸Olorunnisola *et al.*, 2013, ¹⁹Pereda-Miranda, 1990, ²⁰Pereda-Miranda y Gascón-Figueroa, 1988, ²¹Pereda-Miranda *et al.*, 1990, ²²Pereda-Miranda *et al.*, 2001, ²³Takayama *et al.*, 2011.

2.2.1 DESCRIPCIÓN DE *HYPTIS PECTINATA* (L.) POIT.

Las sinonimias más comunes para esta especie son *Mesosphaerum pectinatum* (L.), Kuntze, *Hyptis nepetoides* Fisch. ex Schrank, *Hyptis racemosa* Zuccagni y *Nepeta pectinata* L. (Flora de Santa Catarina , 2014). Comúnmente conocida como “Hierba del burro” y con el nombre maya de xoolte’xnuuk en Yucatán y en San Luis Potosí con el nombre de terek de task maape’ (Biblioteca Tradicional de la Medicina Mexicana, 2009). En Brasil se conoce como “mercúrio do campo” o “Canudinho” en los estados de Sergipe y Alagoa (Bispo *et al.*, 2001). En el resto de los países hispanoparlantes de América, se conoce como “poleo” (Rentería *et al.*, 2006). Es una planta originaria de América, pero se ha introducido en África y Asia. En México se distribuye en el eje volcánico transversal, en el pacífico desde Nayarit hasta Chiapas, en los estados del Golfo de México y de la península de Yucatán. Es abundante en América Central y las islas del Caribe. En Sudamérica se distribuye en los estados de la cuenca del mar Caribe, en el litoral brasileño hasta el norte de Argentina y en la costa del pacífico hasta Perú y Bolivia. Es una planta de ruderal que aparece en hábitats alterados por la acción del ser humano, como bordes de caminos o zonas urbanas. Puede ser invasora de cultivos, jardines y huertos.

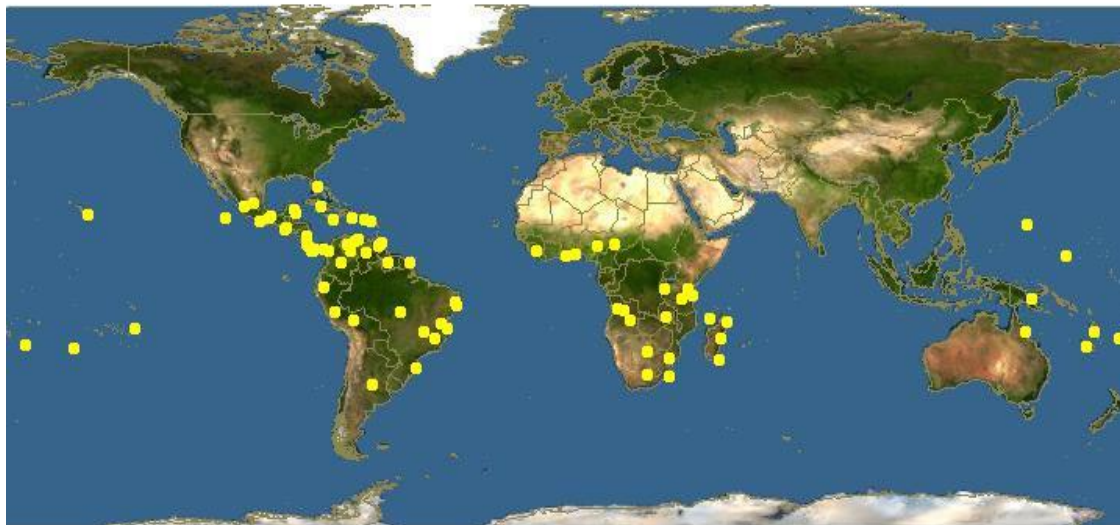


Figura 3. Distribución de *Hyptis pectinata* (Missouri Botanical Garden, 2014)

Son hierbas o arbustos pequeños, erectos, hasta 2 m de alto, aromáticas o con olor fétido; tallos jóvenes tomentosos. Hojas ovadas o lanceoladas, 1.5–9 cm de largo y 1.3–6 cm de ancho, ápice agudo o acuminado (apiculado), base redondeada o truncada, margen serrado o biserrado (subentero), envés densamente tomentoso; pecíolo 0.4–6.5 cm de largo. Inflorescencia panícula de cimbras a veces amontonadas y espiciformes, 0.3–0.6 cm de largo y 0.4–1 cm de ancho, (similar en fruto, pero más helicoidales), frecuentemente con 2–3 ramas helicoidales, 7–15 flores, pedúnculo 0.1–0.3 cm de largo, brácteas filiformes, 3–4 mm de largo, inconspicuas, híspidas o puberulentas; cáliz 2–2.5 mm de largo, externamente el tubo veloso, internamente con tricomas largos en el ápice del tubo y en fruto como fascículos conspicuos de tricomas exertos desde los senos, dientes espiniformes, erectos, 1.2–1.5 mm de largo, híspidos; corola blanca, purpúreo pálida, anaranjado pálido, amarillo pálido o rojo-purpúrea, tubo 1.5–2 mm de largo, limbo 0.5–1.5 mm de largo. Cáliz fructífero 3.2–5 mm de largo y 1–1.2 mm de ancho, dientes 1.2–2 mm de largo; nuececillas 0.7–1 mm de largo, glabras. En México pueden crecer a la altitud del nivel del mar hasta 2,150 m por sobre este (Missouri Botanical Garden, 2014). La clasificación taxonómica de *Hyptis pectinata* se encuentra en el cuadro 3.

Cuadro 3. Taxonomía de *Hyptis pectinata**

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Género	<i>Hyptis</i>
Especie	<i>H. pectinata</i> (L.) Poit.

*Flores de Santa Catarina, 2014

Hyptis pectinata ha tenido diversos usos en la medicina tradicional de diversos países, en México ha sido usada para el tratamiento de fiebres, problemas cutáneos, gastrointestinales, rinofaringitis y congestión pulmonar (Pereda-Miranda *et al.*, 1993). En Brasil, se utiliza en desórdenes del hígado, asma, tos, bronquitis y dismenorrea (Agra *et al.*,

2007). Las inflorescencias secas se utilizan en forma del cigarrillo contra dolores de cabeza y dolores crónicos del diente. Las infusiones se utilizan contra amenorreas y dismenorreas. Las partes aéreas se indican contra hepatalgias bajo la forma de decocción. Es apreciada por sus características carminativas y antirreumáticas. Todavía en la medicina popular la utilizan para tratar la rinofaringitis, la congestión nasal, enfermedades de la piel, problemas gástricos y fiebre, infecciones bacterianas y fúngicas. Se utiliza en la inflamación, en el dolor y el cicatrizado de heridas. Los efectos antiedematogénico y antinociceptivo del extracto acuoso han sido comprobados. También, se describió su efecto hepatoprotector después de una hepatectomía parcial (Renata Lemos Silva *et al.*, 2002). En el oeste de África, se usa como antimicrobiano, antimicótico y contra la tos (Malan *et al.*, 1989). Investigaciones contemporáneas han comprobado diversas actividades farmacológicas, los extractos acuosos de las hojas han presentado efectos en la estimulación de la regeneración del hígado (Melo *et al.*, 2006) y efectos antinociceptivos y antiedematogénicos (Bispo *et al.*, 2001) en modelos animales. Los efectos antinociceptivos (Arrigoni-Blank *et al.*, 2008), mediados a través de los receptores opiodes y colinérgicos se han presentado en el aceite esencial de *Hyptis pectinata*, junto con la actividad antiinflamatoria a través de la inhibición de la producción óxido nítrico y la prostaglandina E2 (Raymundo *et al.*, 2011), propiedades antioxidantes (Russo *et al.*, 2012), actividad contra bacterias Gram positivas como *Streptococcus mutans* (Nascimento *et al.*, 2008) y levaduras (Santos *et al.*, 2008). Los extractos orgánicos presentaron actividad antileishmanicida contra el promastigote de *Leishmania braziliensis* (Falcão *et al.*, 2013).

El aceite esencial de esta especie es rico en timol y, por lo tanto, un gran número de las aplicaciones terapéuticas de esta planta en la medicina tradicional están asociadas con su contenido de aceites esenciales. Los compuesto del tipo 5,6-dihidro- α -pironas obtenidos del extracto clorofórmico, llamados con el nombre de pectinólidas A-C, presentaron una actividad citotóxica ($IC_{50} < 4 \mu\text{g/mL}$) para distintas líneas celulares, además de actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* en un rango 6.25–12.5 $\mu\text{g/mL}$ (Pereda-Miranda *et al.*, 1993), mientras que la pectinólida H presentó un rango de 32-69 $\mu\text{g/mL}$ contra cuatro cepas multirresistentes a fármacos de *S. aureus* (Fragoso-Serrano *et al.*, 2005).

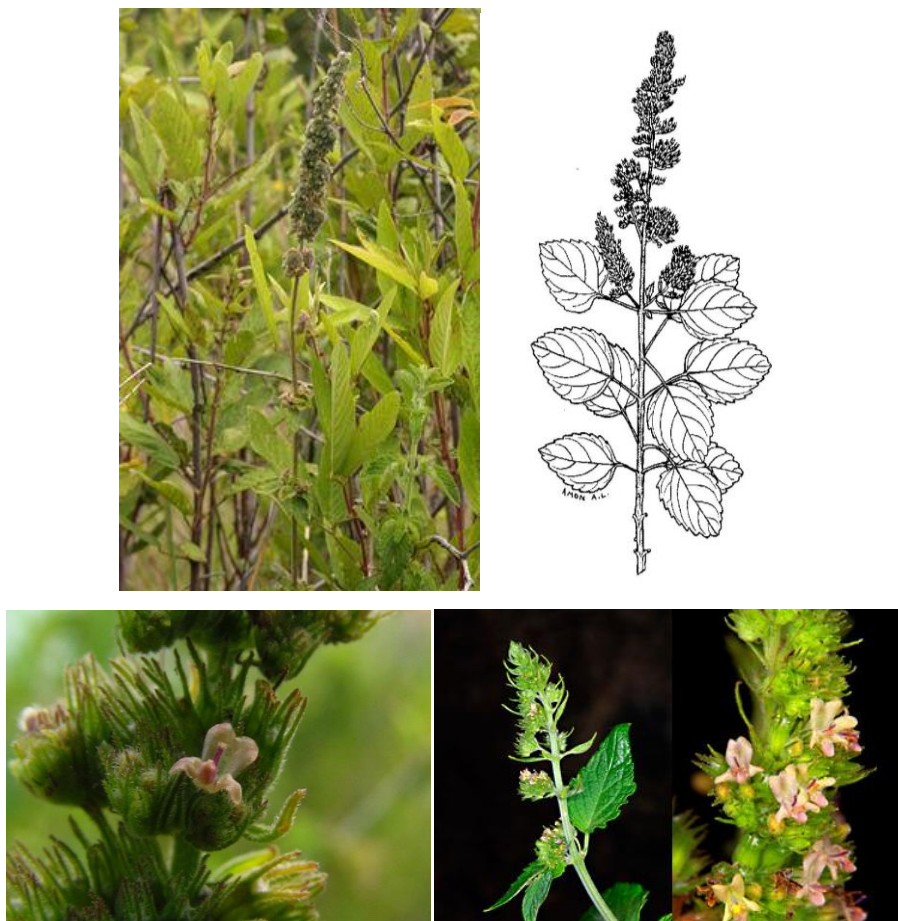


Figura 4. Morfología de *Hyptis pectinata* (<http://www.marinelifephotography.com>)

2.3 METABOLITOS SECUNDARIOS DEL GÉNERO *HYPTIS*.

Diversos productos del metabolismo primario se han identificado en la chia (*Hyptis suaveolens*). De sus tallos se han caracterizado aminoácidos como treonina, valina, arginina, serina, metionina, alanina, glutamina, isoleucina y leucina. De los frutos se han obtenido fenilalanina, glicina, triptófano, lisina y prolina (Tiwari *et al.*, 1979). Del mucílago de la cubierta de la semilla de esta especie, se identificaron los carbohidratos L-fucosa, D-xilosa, D-manosa, D-galactosa y el ácido 4-*O*-metil-D-glucurónico (Gowda, 1984). Además, una gran variedad de metabolitos secundarios han sido obtenidos del género *Hyptis*, entre los que destacan los terpenoides, los flavonoides, los lignanos y las 5,6-dihidro- α -pironas. También, se han identificado compuestos de origen esteroidal en *H.*

suaveolens (β -sitosterol y su D-glicósido, campesterol), *H. capitata* (estigmasterol), *H. romboides* (estigmasterol, β -sitosterol y sus glicósidos) (Falcao y Menezes, 2003). De tipo alcaloide, se aisló el (*R*)-5-hidroxi-pirrolidin-2-ona de la especie *H. verticillata* (Kuhnt *et al.*, 1995).

Las plantas de la familia Lamiaceae son de gran importancia económica gracias a su alto contenido de aceites esenciales que son los responsables de las actividades farmacológicas demostradas para estas esencias (Falcao y Menezes, 2003). Los principales compuestos presentes en los aceites esenciales son los monoterpenos y sesquiterpenos (cuadro 4), aunque otras sustancias han sido identificadas como ácidos grasos C₁₆ y C₁₈ esterificados en *H. spicigera*, fenol en *H. pectinata* y acetato de decilo en *H. emory*, entre otros (Falcao y Menezes, 2003).

Los principales compuestos responsables de las actividades citotóxicas descritas para los extractos orgánicos de estas especies son los lignanos con esqueleto de ariltetralinas de la serie de la podofilotoxina (Figura 5). Las propiedades antisépticas de las infusiones preparadas con las partes aéreas de *H. verticillata* y su empleo para eliminar verrugas es un resultado la actividad antimitótica establecida por su alto contenido de lignanos citotóxicos ($ED_{50} < 10^{-2}$ $\mu\text{g/mL}$) (Novelo *et al.*, 1993; Kuhnt *et al.*, 1994). La desoxipodofilotoxina aislada de la *H. tomentosa* presentó actividad citotóxica junto con los flavonoides 5-hidroxi-4',6,7,8-tetrametoxiflavona y 5-hidroxi-4',3,6,7,8-pentametoxiflavona (Kingston *et al.*, 1979). También, de las partes aéreas de *H. verticillata* se aisló la Sideritoflavona (5,3',4'-trihidroxi-6,7,8-trimetoxi-flavona, KB: ED_{50} 1.6 $\mu\text{g/mL}$) (Kuhnt *et al.*, 1995).

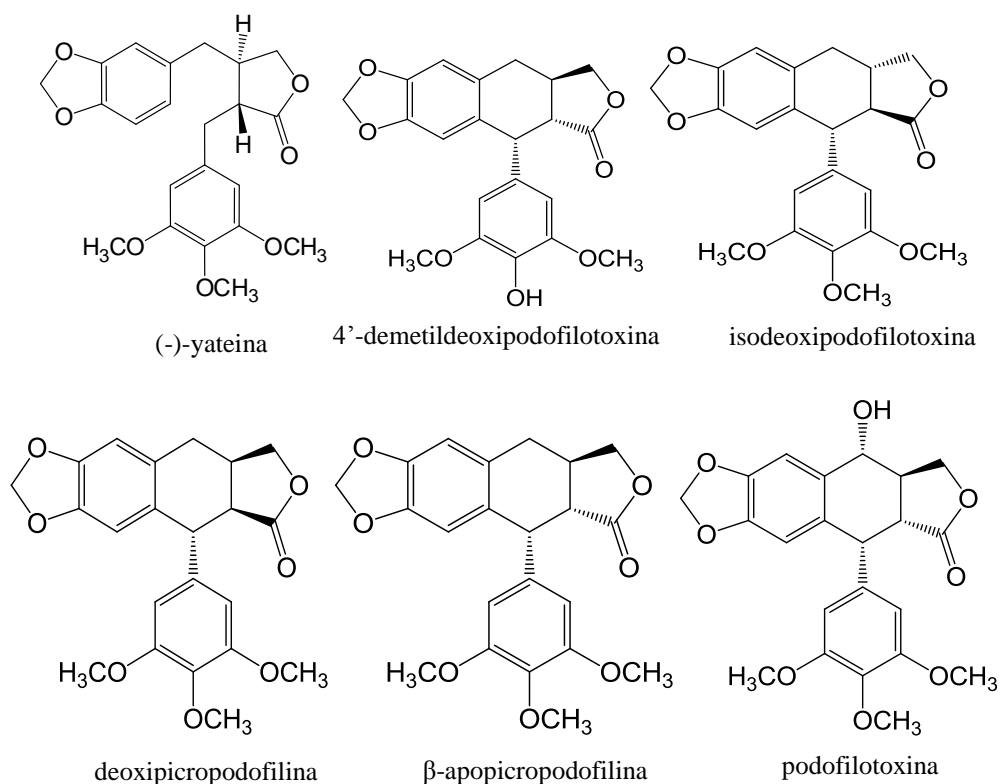


Figura 5. Lignanos citotóxicos aislados de *Hyptis verticillata*.

Destacan algunos terpenoides bioactivos como los diterpenos labdánicos (Figura 6) con propiedades insecticidas aislados de las partes aéreas de *Hyptis spicigera* (Fragoso-Serrano *et al.*, 2000). Sobresalen por su alto contenido en los extractos orgánicos de las partes aéreas, los triterpenos pentacíclicos; un ejemplo son los ácidos aislados de *H. capitata* (Figura 7) que resultaron tóxicos contra células de tumor de colon (HCT-8) (Yamagashi *et al.*, 1988).

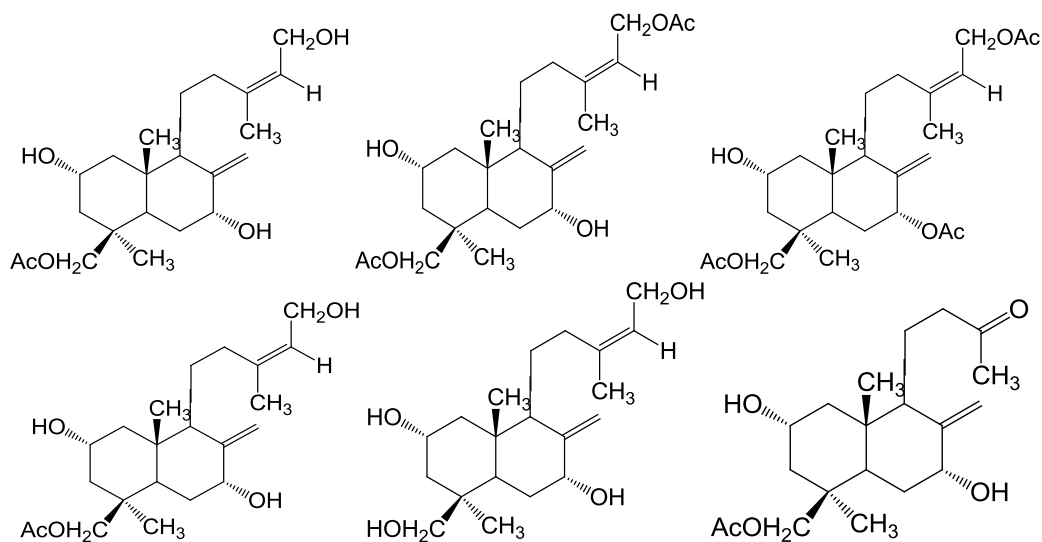


Figura 6. Diterpenos con núcleo labdánico de *Hyptis spicigera*.

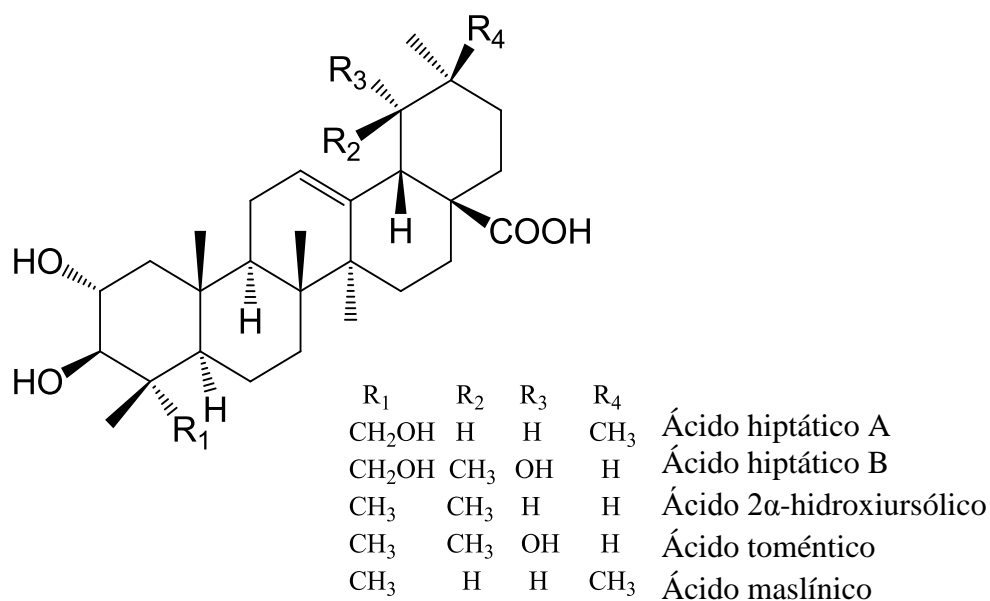


Figura 7. Triterpenoides citotóxicos selectos del género *Hyptis*.

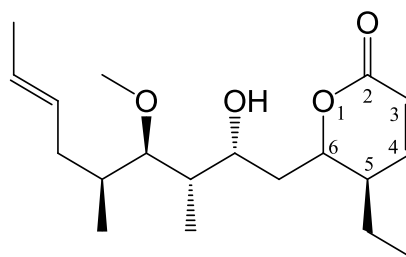
Cuadro 4. Ejemplos de terpenoides obtenidos del aceite esencial de algunas especies del género *Hyptis*.

Compuesto	Fuente de donde fueron aislados
α -Tujeno	HS, HSP, HL, HM
α -pineno	HS, HSP, HL, HM, HV, HC
β -pineno	HV
Canfeno	HSP, HM, HC
Sabineno	HS, HSP, HL, HM
β -pineno	HS, HSP, HL, HM
Limoneno	HS, HSP, HL, HP, HM, HB
α -terpineno	HC
γ -terpineno	HS, HSP, HM
Linalol	HS, HL, HR, HB
Canfor	HS, HC, HMR
Ledeno	HC, HMR
Micerno	HC
Terpinoleno	HS, HSP
δ -elemeno	HP
α -cubebeno	HP, HR, HB, HS
Germacreno D	HP, HSP, HL, HMR, HR, HB, HS
δ -amorfeno	HP
γ -cadineno	HP, HSP, HL
globulol	HS, HSP, HMR
Epiglobulol	HMR
α -humuleno	HMR, HB, HR
18-cineol	HMR, HS, HR
Timol	HV, HR, HS, HB, HP
Cubenol	HS, HB
Borneol	HB, HR
Copaeno	HR, HS, HB

HS= *Hyptis suaveolens*, HP= *Hyptis pectinata*, HSP= *Hyptis spicigera*, HL= *Hyptis lanceolata*, HM= *Hyptis mutabilis*, HMR= *Hyptis martiusii*, HR= *Hyptis rhomboidea*, HB= *Hyptis brevipes*, HC= *Hyptis crenata*, HV= *Hyptis verticillata* (Tchoumboungang, 2005; Aguilar, *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2013; Diniz *et al.*, 2013; Tanowitz *et al.*, 1984; Kuhnt, 1995; Caldas *et al.*, 2011).

2.3.1 5,6-DIHIDRO- α -PIRONAS

Las 5,6-dihidro- α -pironas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza. Se han aislado de especies de la familia Lamiaceae como *Sycolostemon argentus* (Prasad y Gutala, 2013), *S. parviflorus* (Davies-Coleman y Rivett, 1996) y *Tetradenia riparia* (Davies-Coleman, 1995). Dentro de otras familias se han aislado de las especies *Passiflora foetida* (Echeverri *et al.*, 2001), *Sorbus aucuparia* (Crombie y Firth, 1968), de tres especies del género *Criptocarya*: *C. mostacha* (Cavalheiro y Yoshida, 2000), *C. latifolia* (Drewes *et al.*, 1995) y *C. rugulosa* (Meragelman *et al.*, 2009). Cuentan con un anillo de δ -lactona- α,β -insaturada con un grupo sustituyente alquilo o arilo en la posición C-6 y, ocasionalmente, sustituciones en el anillo (Figura 8).



Pironetina

La actividad biológica de estos compuestos se relaciona con el sistema de δ -lactona- α,β -insaturada (López-Vallejo *et al.*, 2013). La pironetina, aislada de cultivos de *Streptomyces sp.*, es un ejemplo representativo de este tipo de compuestos citotóxicos. Su mecanismo se lleva a cabo a través de una adición tipo Michael en la subunidad α del dímero de tubulina; la reacción sucede entre el nitrógeno terminal de la lisina-352 con el carbono cuatro del doble enlace del anillo de δ -lactona- α,β -insaturada. La cadena lateral interacciona por medio de enlaces de hidrógeno con los grupos funcionales de los aminoácidos cercanos al sitio de acción (Usui *et al.*, 2004; Bañuelos-Hernández, *et al.*, 2014).

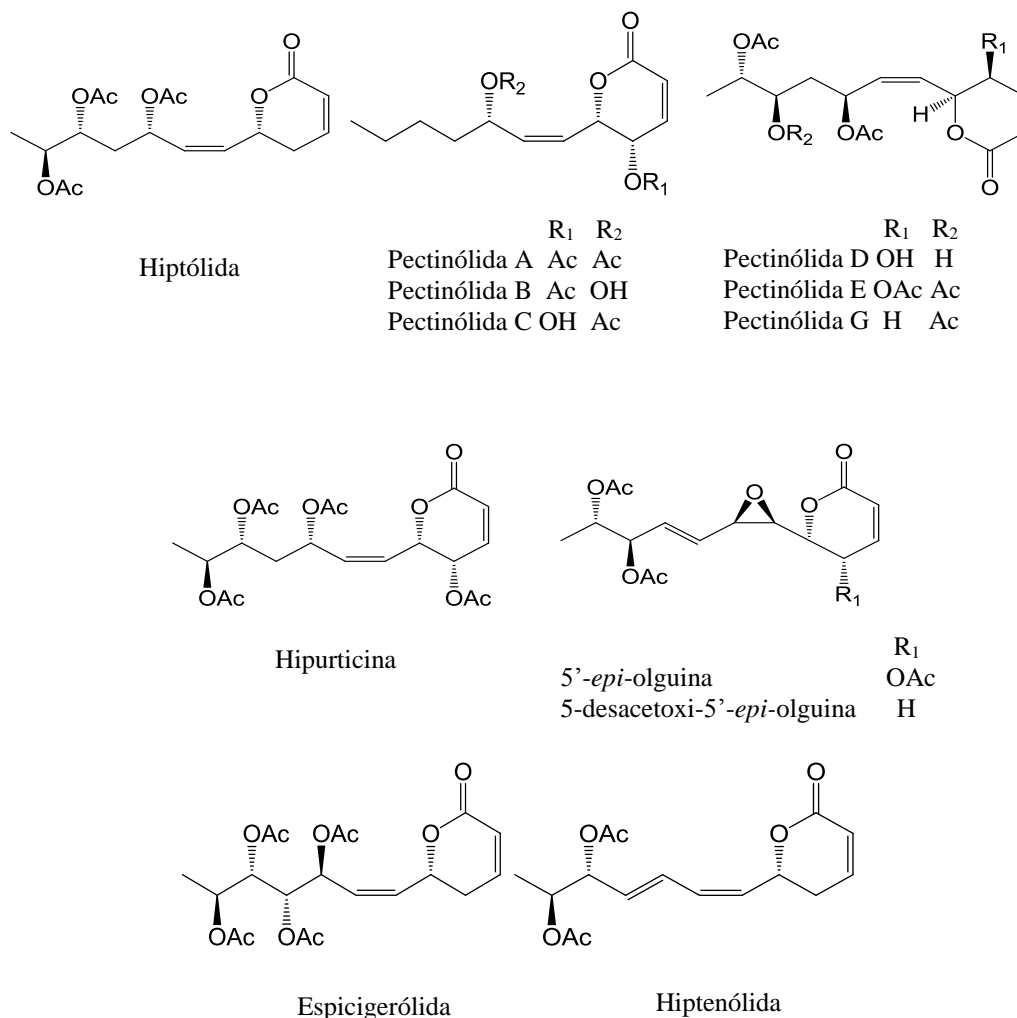
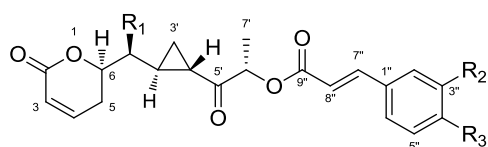


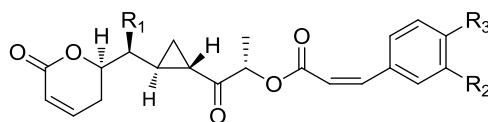
Figura 8. Ejemplos de 6-heptenil-5,6-dihidro- α -pironas del género *Hyptis*.

El primer compuesto perteneciente a esta clase de compuestos en *H. pectinata* se conoce como hiptólida (Achmad *et al.*, 1987). De esta especie, también se han aislado las pectinólidas A-C, las cuales poseen actividad citotóxica para una variedad de líneas celulares ($IC_{50} < 4 \mu\text{g/mL}$), y antimicrobiana frente *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* ($6.25\text{--}12.5 \mu\text{g/mL}$) (Pereda-Miranda *et al.*, 1993). Se han aislado otros compuestos denominados pectinólidas de la D a la G (Boalino *et al.*, 2003). La pectinólida H que corresponde a una butenólida estructuralmente relacionada con la pectinólida D presenta una actividad antimicrobiana contra cepas multirresistentes a fármacos de *S. aureus* (Fragoso-Serrano, 2005). De *H. urticoides* se aisló la hipurticina (Romo de Vivar *et al.*, 1991), cuya reasignación estructural y configuracional se estableció recientemente

mediante el empleo de cálculos teóricos DFT y simulación espectral (RMN) (Mendoza-Espinosa *et al.*, 2009). Para *H. oblongifolia* se han reportado la 5'-*epi*-olguina, 5-desacetoxi-5'-*epi*-olguina (Pereda-Miranda *et al.*, 1990) y la 10-*epi*-olguina la cual también ha sido reportada para *H. capitata* (Almtorp, 1991). En *H. spicigera* se aisló la denominada con el nombre trivial de espicigérolida, 6*R*-[3'*S*,4'*S*,5'*S*,6'*S*-tetraacetiloxi-1*Z*-heptenil]-5,6-dihidro-2*H*-piran-2-ona, la cual presentó una actividad citotóxica contra la línea celular de carcinoma nasofaríngeo (Fragoso-Serrano, 2000, Pereda-Miranda *et al.*, 2001). De las partes áreas de *H. macrostachys* se aisló la 6*R*-[(5'*S*,6'*S*-diacetoxi)-1'*Z*,3'*E*-heptenil]-5,6-dihidro-2*H*-piran-2-ona, denominada hiptenólida, la cual ha presentado una actividad antiespasmolítica en íleon de conejillo de indias inducida por histamina y carbacol (Costa *et al.*, 2014). De *H. brevipes* se obtuvieron diez compuestos llamados brevipólidas A-J (Figura 9), los cuales contiene un ciclopropano en su esqueleto y la cadena se extiende con un grupo cinamoilo que esterifica al hidroxilo de la posición C-6' de la cadena lateral. Las brevipólidas G a la J han presentado una actividad citotóxica en contra de líneas celulares de carcinoma nasofaríngeo (KB), mientras que las brevipólidas B y F presentaron actividad frente a líneas celulares de carcinoma de mama (MCF7) y adenocarcinoma de colon grado II (HT-29) (Deng, *et al.*, 2009, Suárez-Ortíz, 2013).



A	R ₁ = OAc	R ₂ = H	R ₃ = OH
C	R ₁ = OH	R ₂ = OH	R ₃ = OH
E	R ₁ = OAc	R ₂ = OH	R ₃ = OH
G	R ₁ = OH	R ₂ = H	R ₃ = OH
H	R ₁ = OH	R ₂ = H	R ₃ = OMe
J	R ₁ = OH	R ₂ = OH	R ₃ = OMe



B	R ₁ = OAc	R ₂ = H	R ₃ = OH
D	R ₁ = OH	R ₂ = OH	R ₃ = OH
F	R ₁ = OAc	R ₂ = H	R ₃ = OH
I	R ₁ = OH	R ₂ = H	R ₃ = OMe

Figura 9. 5,6-dihidro- α -pironas aisladas de *Hyptis brevipes*

Aun cuando varios de estos compuestos se aislaron desde hace varias décadas, no se conocía con certeza su estructura y configuración absoluta. Fue hasta el final de la década de los ochenta cuando se logró establecer la configuración de algunas de estas estructuras. La anamarina y la olguina fueron las primeras 5,6-dihidro- α -pironas aisladas del género *Hyptis*, se registraron en 1979, y sus estructuras se determinaron mediante experimentos de RMN y cristalografía de Rayos X. Más tarde, para la hiptólida se emplearon estudios de espectroscopía de dicroísmo circular para determinar la configuración absoluta del centro estereogénico C-6 (Achmad *et al*, 1987).

3. HIPÓTESIS Y JUSTIFICACIÓN

El género *Hyptis* cuenta con una amplia información documentada sobre su uso en la medicina tradicional y diversos estudios químicos han demostrado la presencia de 5,6-dihidro- α -pironas, compuestos responsables de su actividad citotóxica. Debido a esto, se puede sustentar el análisis químico de la especie *Hyptis pectinata* con el fin de aislar, purificar y caracterizar nuevos compuestos citotóxicos y, de esta forma, contribuir al conocimiento de la diversidad estructural de las 5,6-dihidro- α -pironas como uno de los principios responsables de la actividad biológica de interés terapéutico de las especies del género *Hyptis*.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

El objetivo fundamental del presente trabajo de investigación consistió en aislar, purificar y caracterizar las 5,6-dihidro- α -pironas citotóxicas a partir del extracto lipofílico de la especie *Hyptis pectinata*, una planta de uso en la medicina tradicional de diversos países.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1. Obtener del extracto clorofórmico y fraccionamiento del mismo a través de cromatografía en columna abierta.

4.2.2. Purificar de 5,6-dihidro- α -pironas mediante CLAR.

4.2.3. Caracterizar la estructura química de los compuestos obtenidos utilizando la técnica espectroscópica de resonancia magnética nuclear (RMN- ^1H , RMN- ^{13}C , COSY, HSQC), así como la espectrometría de masas (ESI-MS).

4.2.4. Realizar derivatizaciones y correlaciones químicas para establecer la configuración absoluta de los principios aislados.

4.2.5. Evaluar el potencial citotóxico del extracto, las fracciones y los compuestos puros utilizando líneas celulares provenientes de carcinomas humanos.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 DETERMINACIÓN DE CONSTANTES ESPECTROSCÓPICAS

Los espectros de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas fueron registrados en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación de la Facultad de Química. Los espectros de RMN protónica (400 MHz) y de carbono-13 (100 MHz) se generaron en equipos Varian, utilizando CDCl_3 como disolvente en ambos casos. Los desplazamientos químicos (δ) se expresaron en partes por millón (ppm), utilizando como referencia interna al tetrametilsilano (TMS). La rotación óptica se obtuvo con un polarímetro modelo Perkin-Elmer 341, utilizándose metanol. Los espectros de masas se registraron mediante ionización por electrospray (ESI-MS) en el modo positivo y negativo.

5.2 MATERIAL VEGETAL

Se reinvestigaron las partes aéreas de dos colectas de *Hyptis pectinata* provenientes de Dos Ríos (C-1), depositada en el herbario con el número de voucher XAL0001406, y camino a campo de tiro El Corso entrando por carretera a la Tinaja (C-2), depositada en el herbario con el número de voucher XAL0000285, municipio de Emiliano Zapata, estado de Veracruz y colectadas el 6 de diciembre del 2010 y el 22 de Octubre del 2009.

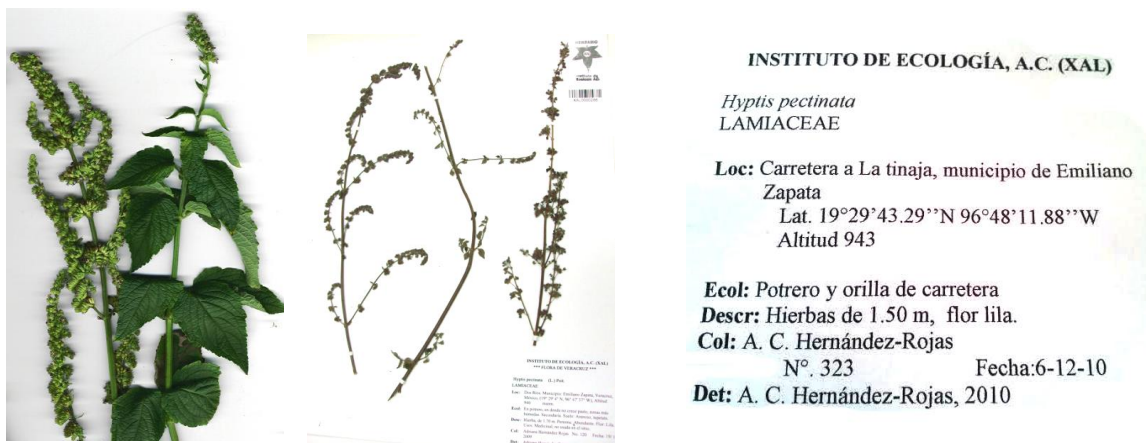


Figura 10. Ejemplar de *H. pectinata* depositado en el Herbario de XAL, Veracruz.

5.2.1 EXTRACCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

El material vegetal se secó al aire libre a temperatura ambiente, se molió en un molino de cuchillas modelo Wiley 4. Se obtuvieron 2.77 Kg para C-1 y 2.79 Kg para C-2 de material seco y molido. La extracción se realizó a temperatura ambiente vía maceración con CH_2Cl_2 , el proceso se repitió cuatro veces y cada periodo de extracción comprendía de 48 a 72 horas. Después de filtrar y concentrar el disolvente a presión reducida, se obtuvieron 125.8 (C-1) g y 169.3 g (C-2) de extracto de coloración verde.

5.2.2 ELIMINACIÓN DE TRITERPENOS

La eliminación de triterpenos de C-1 se llevó a cabo a través de la precipitación de estos utilizando metanol. El extracto C-1 se disolvió con metanol, agregando 50 mL por cada gramo de extracto, y se dejó 12 horas a 0°C , tiempo en el cual los triterpenos precipitaron; posteriormente, se filtró y concentró hasta la mitad del volumen. Se repitió el proceso, esta vez concentrando el extracto a sequedad.

En el caso de C-2, la eliminación de triterpenos se realizó por un método distinto: extracciones sucesivas. El extracto fue disuelto en hexano, 75 mL por cada 2.0 g de extracto y se agitó durante 30 minutos. Se realizó una primera extracción por triplicado con una mezcla metanol:agua (4:1) en una relación 1:1 con el hexano. Las fases metanólicas fueron reunidas y concentradas hasta retirar el metanol; posteriormente, se restableció el volumen con agua destilada. Se realizó una segunda y tercera extracción con CH_2Cl_2 y acetato de etilo, ambas por triplicado. Cada una de las fases se concentró a presión reducida. La fracción obtenida de la fase de diclorometano del extracto C-2 fue seleccionada para su fraccionamiento.

Cuadro 5. Peso de los Extractos de *Hyptis pectinata*

C-1 sin triterpenos	18.79g
C-2	
<i>n</i> -hexano	57.15g
CH ₂ Cl ₂	20.04g
AcOEt	2.75g
Metanol	4.81g

5.3 TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

Para el fraccionamiento primario de los extractos se utilizó la cromatografía en columna abierta utilizando columnas de vidrio empacadas con gel de sílice 60 (con tamaño de partícula de 0.063-0.200mm). Los extractos fueron adsorbidos en una relación 1:1 con gel de sílice y los disolventes utilizados fueron grado químicamente puro. El análisis de las fracciones obtenidas a través de esta técnica se llevó a cabo por medio de cromatografía en capa fina (CCF), utilizando placas de aluminio con gel de sílice 60 F₂₅₄ marca Merck. Las placas se observaron en una lámpara de UV a 254 nm y 356 nm y como agente cromógeno se usó una mezcla de ácido sulfúrico con sulfato cérico y calentamiento para su revelado.

El aislamiento y la purificación de los compuestos citotóxicos se realizó a través de la cromatografía de líquidos de alta resolución con un equipo marca Waters (Millipore Corporation, Waters Chromatography Division milford, MA, EEUU) que contaba con una bomba modelo 600E, un detector de UV de arreglo de diodos modelo 2996 y una válvula de recirculación de muestra y disolvente. El equipo estuvo adaptado a un equipo de cómputo marca Dell con sistema operativo Windows XP, el cual contaba con el programa Empower 2 (Waters) para el control del cromatógrafo y procesamiento de los datos.

Se utilizaron disolventes grado analítico y las siguientes columnas de fase reversa para el análisis, la separación y la purificación de las muestras:

Cuadro 6. Columnas utilizadas en el equipo de CLAR

Tipo de columna	Tamaño de partícula/ dimensiones
Waters Symmetry C18 analítica	5µm, 4.6 × 250mm
Waters Symmetry C18 preparativa	7µm, 19 × 300mm
ISCO C18 semipreparativa	10µm, 10 × 250mm
ISCO sílica semipreparativa	10µm, 10 × 250mm

Para el escalamiento del método analítico a nivel semipreparativo y preparativo, se utilizó la siguiente fórmula:

$$F_p = F_a (l_p/l_a)(d_p^2/d_a^2)$$

F_p =Flujo columna preparativa/semipreparativa

F_a =Flujo columna analítica

l_p =Longitud de columna preparativa

l_a =longitud columna analítica

d_p =Diámetro columna preparativa

d_a =Diámetro columna analítica

5.3.1 FRACCIONAMIENTO PRIMARIO DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO

El fraccionamiento primario para ambos extractos fue el mismo. La muestra se adsorbió en gel de sílice con una relación 1:1 y aplicó a una columna abierta de sílice en una proporción 1:20 con base en el peso del material vegetal. La elución comenzó con *n*-hexano y la polaridad se incrementó utilizando los siguientes disolventes: CH₂Cl₂, acetona y metanol. Los eluatos colectados se analizaron mediante CCF para determinar su similitud cromatográfica y proceder a la reunión de fracciones.

Cuadro 7. Fracciones reunidas del primer fraccionamiento

Extracto C1		Extracto C2	
Sistema de elución	Fracciones colectadas	Sistema de elución	Fracciones colectadas
Hexano	1-4 (E1) 5-10 (E2) 11-12 (E3)	Hexano	1-2 (F1)
Hexano:CH₂Cl₂ (7:3)	13-14 (E3) 15-17 (E4) 18-20 (E5)	Hexano:CH₂Cl₂ (7:3)	3-5 (F1)
Hexano:CH₂Cl₂ (5:5)	21-22 (E5) 23-28 (E6)	Hexano:CH₂Cl₂ (5:5)	6-8 (F1)
CH₂Cl₂	29-30 (E7) 31-32 (E8) 33-40 (E9)	Hexano:CH₂Cl₂ (3:7)	9-11 (F1)
CH₂Cl₂:Acetona (9:1)	41-43 (E9) 44-46 (E10) 47 (E11)	CH₂Cl₂	12 (F2) 13-14 (F3)
CH₂Cl₂:Acetona (7:3)	48(E11) 49-52 (E12)	CH₂Cl₂:Acetona (95:5)	15 (F3) 16-17 (F4)
CH₂Cl₂:Acetona (5:5)	53-55 (E12)	CH₂Cl₂:Acetona (9:1)	18-20(F4)
Acetona	56-59 (E13) 60-61 (E14)	CH₂Cl₂:Acetona (85:15)	21-23 (F5)
Acetona:Metanol (7:3)	61-64 (E14)	CH₂Cl₂:Acetona (8:2)	24 (F5) 25-26 (F6)
Metanol	65 (E15)	CH₂Cl₂:Acetona (7:3)	27 (F6) 28-29 (F7)
		CH₂Cl₂:Acetona (5:5)	30-32 (F7)
		CH₂Cl₂:Acetona (3:7)	33-34 (F8) 35 (F9)
		Acetona	36-38 (F9)
		Acetona: Metanol (7:3)	39-41 (F10)
		Acetona: Metanol (5:5)	42-44 (F11)
		Acetona:Metanol (3:7)	45-47 (F11)
		Metanol	48-49 (F11)

5.3.2 ANÁLISIS Y PURIFICACIÓN POR CLAR

Las fracciones se analizaron en fase reversa con una elución isocrática y volúmenes de inyección de 5 μL a una concentración de 0.02 mg/ μL y la separación se hizo utilizando de 40 a 50 mg de muestra en un volumen de 500 μL ; la detección se efectuó a una longitud de onda de 320 nm. Los diferentes picos fueron separados y purificados mediante las técnicas de corte de núcleo y reciclaje de muestra.

Cuadro 8. Condiciones de separación y análisis de las fracciones

	E9	F7	F9
Fase móvil	Metanol	Metanol:H ₂ O (7:3)	Metanol:H ₂ O (7:3)
Flujo analítico (mL/min)	0.4	0.3	0.3
Flujo preparativo (mL/min)	8.18	6.14	6.14

De la fracción E9 se obtuvieron los compuestos reportados en la literatura conocidos como pectinólida A (**1**) y C (**2**) con tiempos de retención $t_r = 10.78$ y $t_r = 7.58$ min, respectivamente. A partir de la fracción F9 se obtuvo un pico con un tiempo de retención de 10.12 min el cual se recicló cuatro veces en una columna C-18 semipreparativa con un flujo de 1.42 mL/min utilizando la misma fase móvil empleada durante la separación. El compuesto corresponde a una estructura inédita en la literatura, el cual fue nombrada como pectinólida I (**3**). Este compuesto también fue detectado en la fracción E12 a través de RMN-¹H.

Pectinólida A: aceite incoloro $[\alpha]_D^{+20} = +202^\circ$ ($c = 0.15$ g/mL, MeOH)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.95 (dd, $J = 9.7, 5.7$ Hz, 1H, H-4), 6.24 (d, $J = 9.7$ Hz, 1H, H-3), 5.73 (dd, $J = 10.9, 8.4$ Hz, 1H, H-1'), 5.64 (dd, $J = 10.5, 10.1$ Hz, 1H, H-2'), 5.59 (dd, $J = 8.1, 12.9$ Hz, 1H, H-6), 5.35 (ddd, $J = 10.1, 7.4, 6.3$ Hz, 1H, H-3'), 5.18 (dd, $J = 5.7, 3.0$ Hz, 1H, H-5), 2.08 (s, 3H, 5-OAc), 2.04 (s, 3H, 3'-OAc), 1.70 (m, 2H, H-4'), 1.54 (m, 2H, H-5'), 1.30 (m, 2H, H-6'), 0.90 (t, $J = 7.1$ Hz, 3H, H-7'). ¹³C NMR (100 MHz,

CDCl_3 δ 170.26, 169.81 (Me-CO-), 162.09 (C-2), 139.89 (C-4), 133.16 (C-1'), 126.24 (C-2'), 124.81 (C-3), 75.07 (C-6), 69.39 (C-3'), 64.49 (C-5), 34.05 (C-4'), 27.23 (C-5'), 22.46 (C-6'), 21.10 (C-7'), 20.49 (s), 13.88 (Me-CO-).

Pectinólida C: aceite incoloro $[\alpha]_D +80.99^\circ$ ($c = 0.76$ g/mL, MeOH)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.01 (dd, $J = 9.8, 5.4$ Hz, 1H, H-4), 6.08 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H, H-3), 5.82 (dd, $J = 11.2, 8$ Hz, 1H, H-1'), 5.66 (dd, $J = 11.2, 9.2$ Hz, 1H, H-2'), 5.44 (ddd, $J = 9.2, 6.8, 5.8$ Hz, 1H, H-3'), 5.35 (dd, $J = 8.0, 3.0$ Hz, 1H, H-6), 4.12 (dd, $J = 5.4, 3.0$ Hz, 1H, H-5), 2.04 (s, 3H, MeOAc), 1.68 (m, 2H, H-4'), 1.55 (m, 2H, H-5'), 1.29 (m, 2H, H-6'), 0.90 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H-7'). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 171.03 (Me-CO-), 162.67 (C-2), 144.14 (C-4), 134.15 (C-2'), 125.49 (C-1'), 122.83 (C-3), 77.88 (C-6), 70.96 (C-3'), 63.13 (C-5), 34.21 (C-4'), 27.17 (C-5'), 22.44 (C-6'), 21.18 (Me-CO-), 13.92 (C-7').

Pectinólida I: aceite amarillo, $[\alpha]_D +12.5$ ($c = 2$ mg/mL, MeOH)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.97 (dd, $J = 9.8, 5.1$ Hz, 1H, H-4), 6.12 (d, $J = 9.8$ Hz, 1H, H-3), 5.80 (qd, $J = 11.6, 7.3$ Hz, 2H, H-1', H-2'), 5.35 (dd, $J = 7.3, 3.3$ Hz, 1H, H-6), 4.47 (ddd, $J = 6.4, 6.7$ Hz, 1H, H-3'), 4.23 (dd, $J = 4.9, 3.5$ Hz, 1H, H-5), 1.51 (m, 2H, H-4'), 1.28 (m, 4H, H-5', H-6'), 0.90 (t, $J = 6.9$ Hz, 3H, H-7'). ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 163.94 (Me-CO-), 144.80 (C-4), 138.97 (C-2'), 123.61 (C-1'), 122.45 (C-3), 77.18 (C-6), 68.59 (C-3'), 62.91 (C-5), 36.90 (C-4'), 27.41 (C-5'), 22.58 (C-6'), 13.97 (C-7').

5.4 REACCIÓN DE ACETILACIÓN

5 mg de la pectinólida I (**3**) se disolvieron en 0.5 mL de piridina anhidra y 0.5 mL de anhídrido acético (Ac_2O). La mezcla de reacción se agitó durante 45 minutos a temperatura ambiente. El curso de la reacción se observó a través de CCF hasta la desaparición de la pectinólida I. Posteriormente, se adicionaron 5 mL de agua destilada y se realizaron dos extracciones sucesivas utilizando en cada una 10 mL de acetato de etilo.

Las fases orgánicas se reunieron y se trataron con 10 mL de HCl 1N, seguido de una solución saturada de NaHCO₃. La fase orgánica se lavó en dos ocasiones con 5 mL de agua destilada y se secó con Na₂SO₄ anhidro para finalmente concentrarla a presión reducida. El crudo de la reacción se analizó por CLAR, usando las mismas condiciones analíticas para la purificación de la fracción E9, donde se mostró un pico con un $t_r = 10.37$ min que coeluyó con una muestra auténtica de la pectinólida A (**1**) con un $t_r = 10.33$ min. La identificación de este compuesto se realizó mediante comparación de los datos espectroscópicos en la RMN-¹H. Posteriormente, se repitió el proceso de acetilación utilizando de 0.1 mL de anhídrido acético (Ac₂O). La reacción se monitoreó por CCF hasta la desaparición de la pectinólida I y la aparición de los productos monoacetilados, las pectinólidas B y C (Figura 11). Para su purificación se utilizaron las mismas condiciones cromatográficas descritas con anterioridad y se identificaron mediante coelución con muestras auténticas.

5.5 ESTERES DE MOSHER

Se disolvieron 1.4 mg de pectinólida B, generada durante la acetilación parcial de la pectinólida I, en 500 μ L de diclorometano (CH₂Cl₂), de estos se dividieron en 250 μ L en dos tubos de RMN y se evaporó el disolvente a sequedad con vacío. Posteriormente, se adicionaron 0.7 mg DMAP, respectivamente y 7 μ L de cloruros de (*S*)- o (*R*)- α -metoxi- α -(trifluorometil)fenilacetil [(*S*)- o (*R*)-MTPA-Cl] en forma independiente en cada uno de los tubos. Las dos mezclas de reacción se purgaron con nitrógeno para después colocar un “septum” y dejar un globo con nitrógeno. Se mezclaron y calentaron a una temperatura de 50-60 °C durante cuatro horas. Al cabo de este tiempo, se registró el espectro de RMN ¹H. Para el aislamiento de los ésteres obtenidos, se trasvasó el contenido de cada uno de los tubos a un embudo de separación de 30 mL que contenían 5 mL de CH₂Cl₂ y 3 mL de HCl 0.5 N. La fase orgánica se lavó tres veces con 6 mL de HCl 0.5 N y, posteriormente, con 6 mL con agua. Ambas fases se secaron a presión reducida. Los compuestos resultantes se separaron por CLAR utilizando una fase normal, la mezcla de hexano-acetato de etilo (1:1) y un flujo de 2 mL/min. Se obtuvo un t_r 9.93 min para el éster *R* y un t_r 9.87 para el éster *S*. Ambos compuestos fueron analizados por ¹H-RMN.

5.6 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD

Para este estudio se utilizaron tres líneas celulares: HCT15 (carcinoma de colon), MCF7 (carcinoma de mama) y HeLa (carcinoma de cérvix). Estas líneas se cultivaron en medio de suero bovino fetal, a 37° C bajo atmósfera de CO₂ al 5% en el aire y 100% de humedad relativa. La preparación del ensayo consistió en permitir su crecimiento hasta el 60-70% de confluencia. El medio se cambió para incubar las líneas durante 24 horas adicionales. Posteriormente, las células se lavaron con 5 mL de PBS y se agregó 0.3 mL de tripsina para su separación de la caja de crecimiento; se incubó por 5 min y se comprobó su dispersión a través de observación por microscopio. Se agregaron 5 mL de medio y con una cámara de Neubauer se llevó a cabo el conteo celular y se calculó el volumen necesario para tener una suspensión de 10⁴ células. De esta suspensión se tomaron 190 µL y se agregaron en las 96 cavidades de 250 µL de las microplacas de plástico con 10 µL de las diferentes concentraciones de las muestras a analizar y los controles, cada una por triplicado. Para las células que servirían como blanco, al tiempo inicial, se incubaron los 190 µL por 30 minutos en las condiciones de crecimiento anteriormente descritas. La microplaca se incubó por 72 horas y concluido el tiempo, las células se fijaron con 100 µL de ácido tricloroacético TCA y se colocaron a 4° C por 30 minutos. Pasado el tiempo, se decantó el TCA y se lavó por cuatro ocasiones con agua fría, se secaron al aire libre para después teñir cada pozo con 100 µL de sulforodamida B (SRB) al 0.4% en ácido acético al 1% por 30 minutos. Se lavó el exceso de colorante con ácido acético al 1% y después se llevó a cabo un segundo secado. La SRB se solubilizó con 200 µL de Tris base 10 mM (pH 10) y se agitó por 5 minutos. La densidad celular se determinó utilizando un lector para ELISA a 564 nm. Como control positivo se utilizaron disoluciones de 4 mg/mL de vinblastina y colchicina, se realizaron tres diluciones (2 µg/mL-0.016 µg/mL) utilizando DMSO al 10%. Para las fracciones analizadas se prepararon disoluciones de una concentración de 4 mg/mL y a partir de esta se hicieron cuatro diluciones (20 µg/mL-0.16 µg/mL) para los extractos y fracciones y tres diluciones para el compuesto puro (2 µg/mL-0.02 µg/mL). Los valores obtenidos en las diferentes concentraciones del control positivo y las muestras fueron promediados y se determinó el porcentaje de crecimiento con la siguiente fórmula:

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

El porcentaje de crecimiento fue graficado junto con sus respectivas concentraciones utilizando el programa Table Curve 2D v5.01. Se consideraron activas las fracciones con una $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/mL}$ y los compuestos puros con una $IC_{50} \leq 4 \mu\text{g/mL}$.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 ESTUDIO FITOQUÍMICO DE *HYPTIS PECTINATA*

A partir de los extractos clorofórmicos de dos colectas de *Hyptis pectinata*, se aislaron dos 5,6-dihidro- α -pironas que fueron identificadas como la pectinólida A (1) y C (2), las cuales ya habían sido descritas para esta especie (Pereda-Miranda *et al*, 1993). Un tercer compuesto novedoso en la literatura se identificó como la 6S-[3'S-hidroxi-1'Z-heptenil]-5S-hidroxi-5,6-dihidro-piran-2-ona, denominado como la pectinólida I (3).

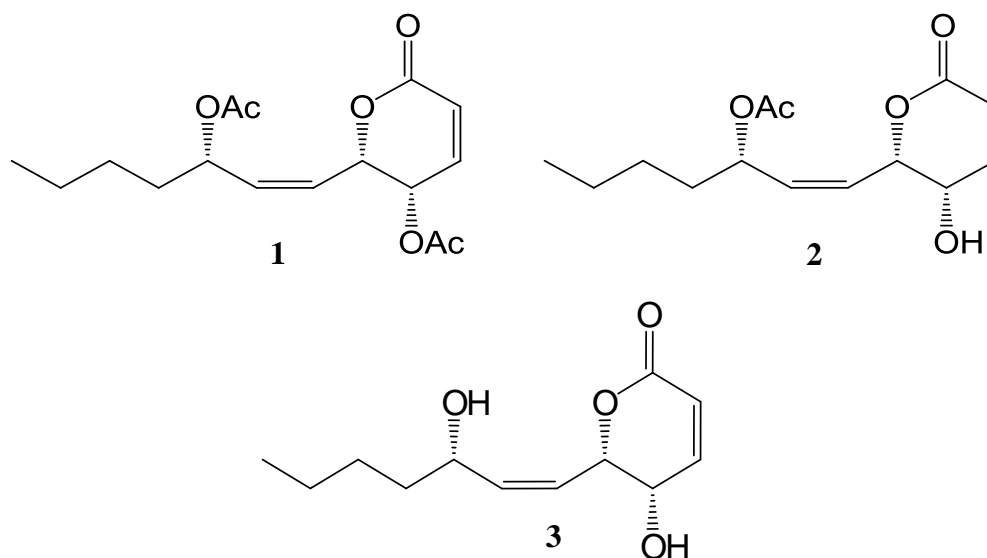


Figura 11. 5,6-dihidro- α -pironas aisladas de *Hyptis pectinata*.

6.1.1 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS 1-2

En un estudio inicial, el extracto orgánico C1 libre de triterpenos se sometió a la evaluación de su potencial citotóxico frente a tres líneas celulares (MFC7, HTC15, HeLa) y, posteriormente, a su fraccionamiento primario a través de columna abierta en un soporte de gel de sílice, sus fracciones también fueron sometidas a la evaluación citotóxica para seleccionar aquellas donde la actividad biológica se concentraba. De las 15 fracciones obtenidas, se seleccionó la fracción E9 para su purificación (Cuadro 9) debido a que

concentró la actividad citotóxica, aunado a la observación por CCF que permitió identificar la presencia de las 5,6-dihidro- α -pironas mediante su absorción en el UV a 255 y 365 nm.

Cuadro 9. Citotoxicidad del extracto C1 y la fracción E9

	Línea celular ($\mu\text{g/mL}$)		
	HCT15	HeLa	MCF7
C1	17.45	0.99	9.21
E9	3.87	3.76	7.47
Vinblastina	0.03	<0.016	0.015

Para llevar a cabo la purificación de E9 se utilizó la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), buscando las condiciones adecuadas de separación a nivel preparativo utilizando una columna C_{18} . Como sistema de elución se seleccionó metanol; posteriormente, las condiciones seleccionadas fueron escaladas a nivel preparativo, inyectando 50 mg de muestra en 500 μL de vehículo (MeOH). Se obtuvieron cuatro picos (Figura 12) y el pico D (t_r 10.7 min) fue seleccionado para su purificación mediante la técnica de reciclaje durante 8 ciclos (Figura 13) debido a que era el mayoritario.

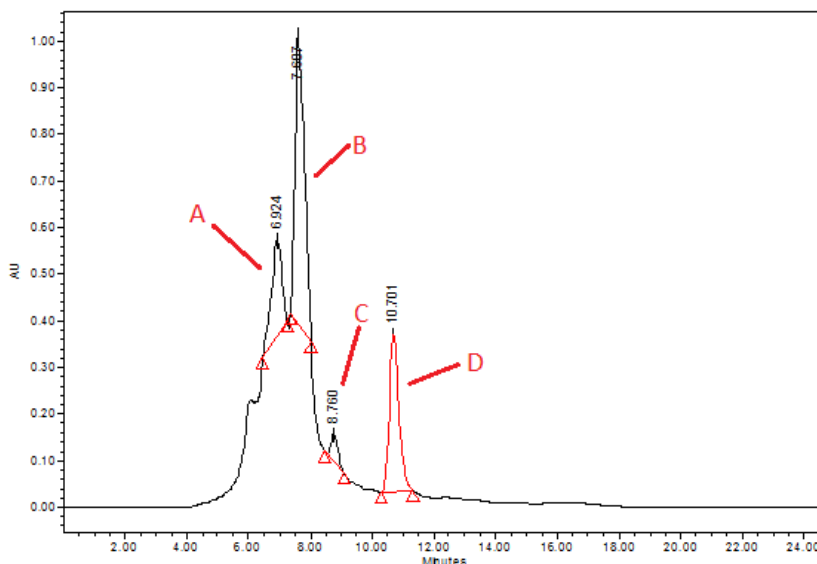


Figura 12. Cromatograma de líquidos a nivel preparativo de la fracción E9. Condiciones cromatográficas: columna de fase reversa C_{18} ($7\mu\text{m}$, 19×300 mm); detector de arreglo de diodos (320 nm); fase móvil: MeOH; flujo de elución: 8.18 mL/min.

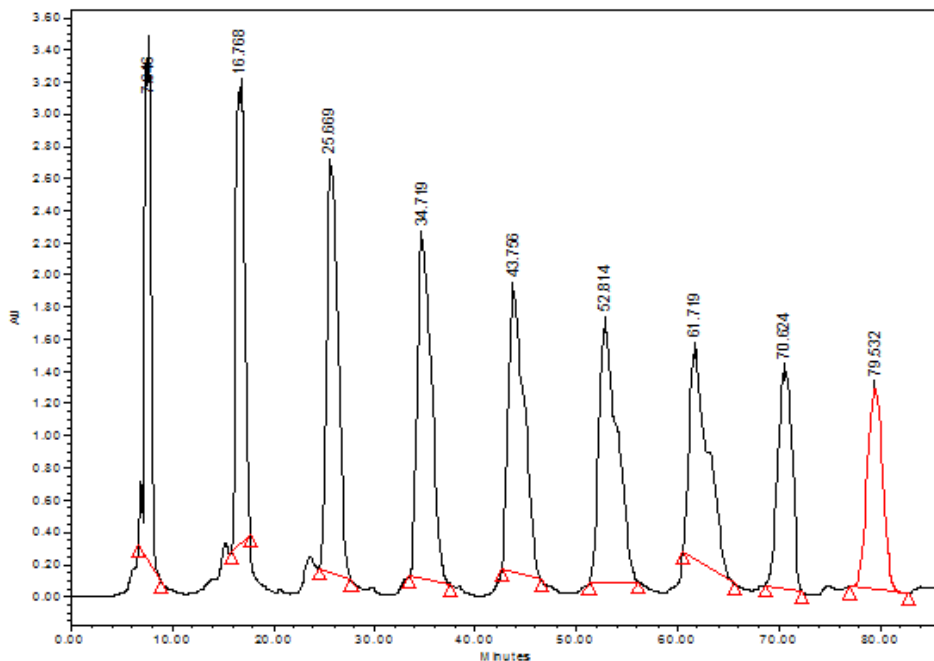


Figura 13. Purificación del pico B a través de la técnica de reciclaje. Condiciones cromatográficas: columna de fase reversa C_{18} ($7\mu\text{m}$, 19×300 mm); detector de arreglo de diodos (320 nm); fase móvil: MeOH; flujo de elución: 8.18 mL/min.

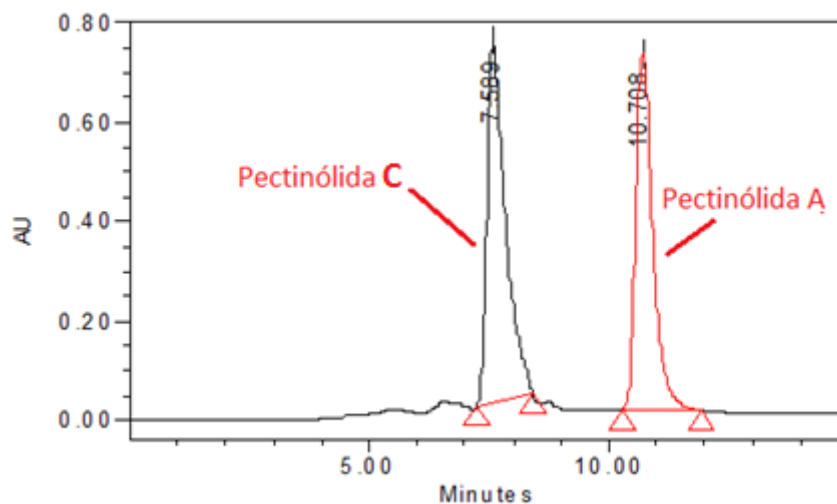


Figura 14. Cromatograma de líquidos a nivel analítico de los picos B y D correspondientes a las pectinólida A y C. Condiciones cromatográficas: columna de fase reversa C_{18} ($5\mu\text{m}$, 4.6×250 mm); detector de arreglo de diodos (320 nm); fase móvil: MeOH; flujo de elución: 0.4 mL/min.

Del pico B se obtuvo la pectinólida C (**2**) (aceite incoloro transparente, t_r 7.59 min, 15.4 mg) y del pico D se obtuvo la pectinólida A (**1**) (aceite incoloro transparente, t_r 10.71 min, 10.3 mg) (Figura 14). Las estructuras de estos compuestos se determinaron mediante la comparación con los espectros de ^1H -RMN descritos en la literatura (Pereda-Miranda *et al*, 1993).

6.1.2 AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DEL COMPUESTO 3

De la misma forma que para el extracto C1 y sus fracciones, se realizó la evaluación citotóxica de las cuatro subfracciones obtenidas de C2 a partir del proceso de partición. Este bioensayo indicó a la fracción clorofórmica como activa y que esta actividad se concentró en la fracción F9 (Cuadro 10), de las once fracciones obtenidas a través del fraccionamiento primario.

Cuadro 10. Citotoxicidad del extracto C2 y la fracción F9

	Línea celular ($\mu\text{g/mL}$)		
	HCT15	HeLa	MCF7
C2	15.89	5.29	12.73
F9	1.27	0.97	1.04
Vinblastina	0.03	<0.016	0.015

La fracción F9 fue analizada por CLAR, utilizando una fase estacionaria C_{18} se determinó que el sistema óptimo de elución era una fase móvil $\text{MeOH:H}_2\text{O}$ en una proporción 7:3. Se inyectaron 40 mg de muestra en $500\mu\text{L}$ de vehículo (MeOH). De esta fracción, se obtuvieron 9 picos diferentes (Figura 15) de los cuales se seleccionó el pico II por presentar señales características del anillo α - β -insaturado de la pirona en su espectro de ^1H -RMN. Éste se purificó en una columna C_{18} semipreparativa utilizando la misma fase móvil e inyectando 10 mg en $200\mu\text{L}$ de vehículo. Se utilizó la técnica de reciclaje durante tres ciclos (Figura 16) y se obtuvieron 8.0 mg de muestra de un aceite amarillo con un t_r 10.12 min (Figura 17).

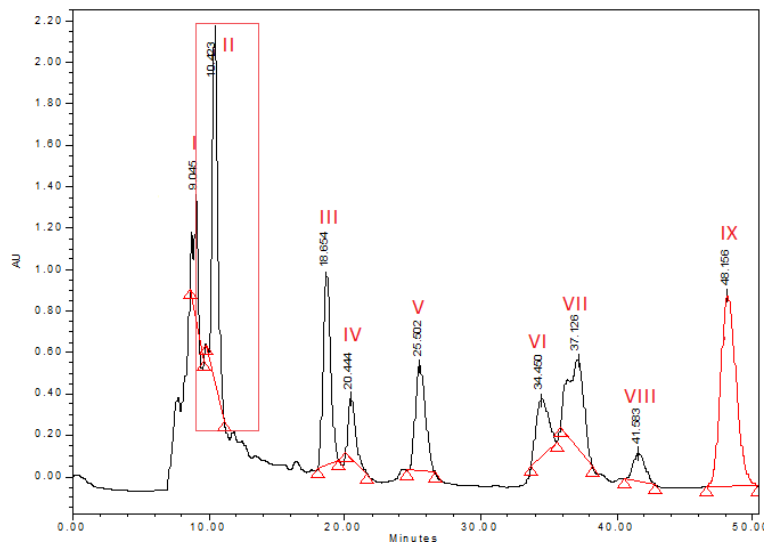


Figura 15. Cromatograma de líquidos a nivel preparativo de la fracción F9. Condiciones cromatográficas: columna de fase reversa C₁₈ (7 μ m, 4.6 \times 300 mm); detector de arreglo de diodos (320 nm); fase móvil: MeOH:H₂O (7:3); flujo de elución: 6.14 mL/min.

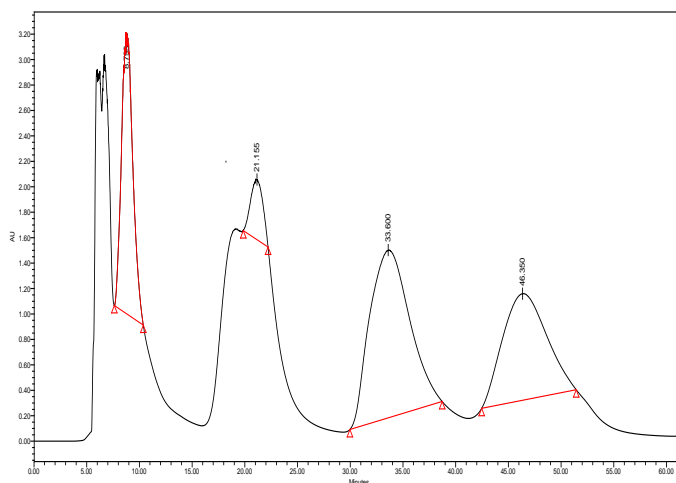


Figura 16. Purificación del pico II a través de la técnica de reciclaje. Condiciones cromatográficas: columna de fase reversa C₁₈ (10 μ m, 10 \times 250 mm); detector de arreglo de diodos (320 nm); fase móvil: MeOH; flujo de elución: 1.42 mL/min

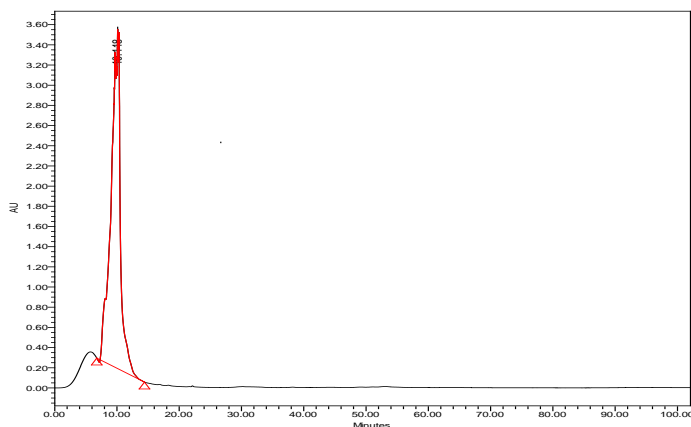


Figura 17. Cromatograma de líquidos a nivel analítico del pico II. Condiciones cromatográficas: columna de fase reversa C₁₈ (5µm, 4.6 × 250 mm); detector de arreglo de diodos (320 nm); fase móvil: MeOH:H₂O (7:3); flujo de elución: 0.3 mL/min.

6.2 CARACTERIZACIÓN DE LA PECTINÓLIDA I

6.2.1 RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS

A partir del pico II se obtuvo un compuesto novedoso en forma de un aceite incoloro transparente. Su fórmula molecular se determinó como C₁₂O₄H₁₈ a través de los iones cuasimoleculares de m/z 249 [M + Na]⁺ y 225 [M – H][–] registrados en electroespray en modo positivo y negativo, respectivamente. Los principales fragmentos en impacto electrónico que caracterizan a las 5,6-dihidro- α -pironas sustituidas en la posición C-6 se producen mediante la ruptura α inducida por el oxígeno heterociclíco provocando la ruptura de la cadena lateral (Figura 18) (Villavicencio-González, 1993). En el electroespray en modo positivo, los iones de m/z 85 y 55 se forman a través de esta ruta mientras que el ión de m/z 209 [M + H – H₂O]⁺ corresponde a la deshidratación de la molécula (Figura 19).

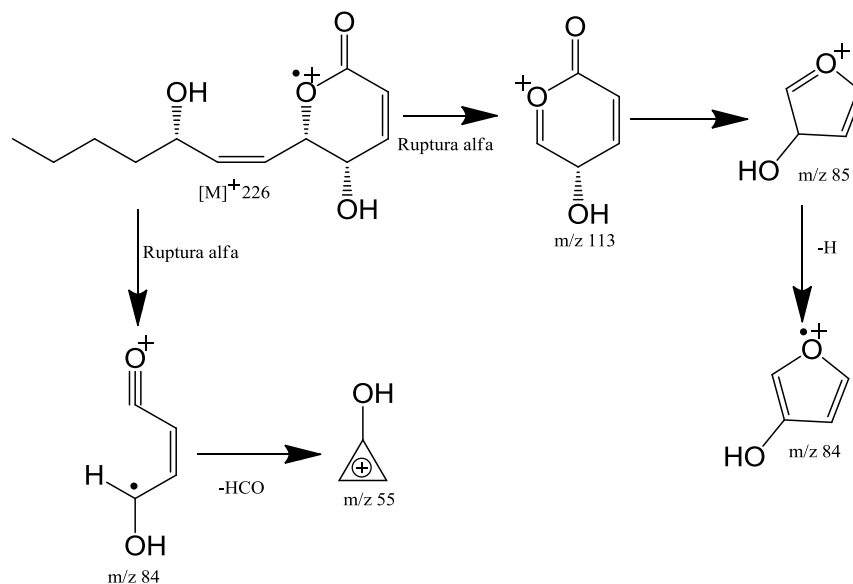


Figura 18. Patrón de fragmentación en impacto electrónico.

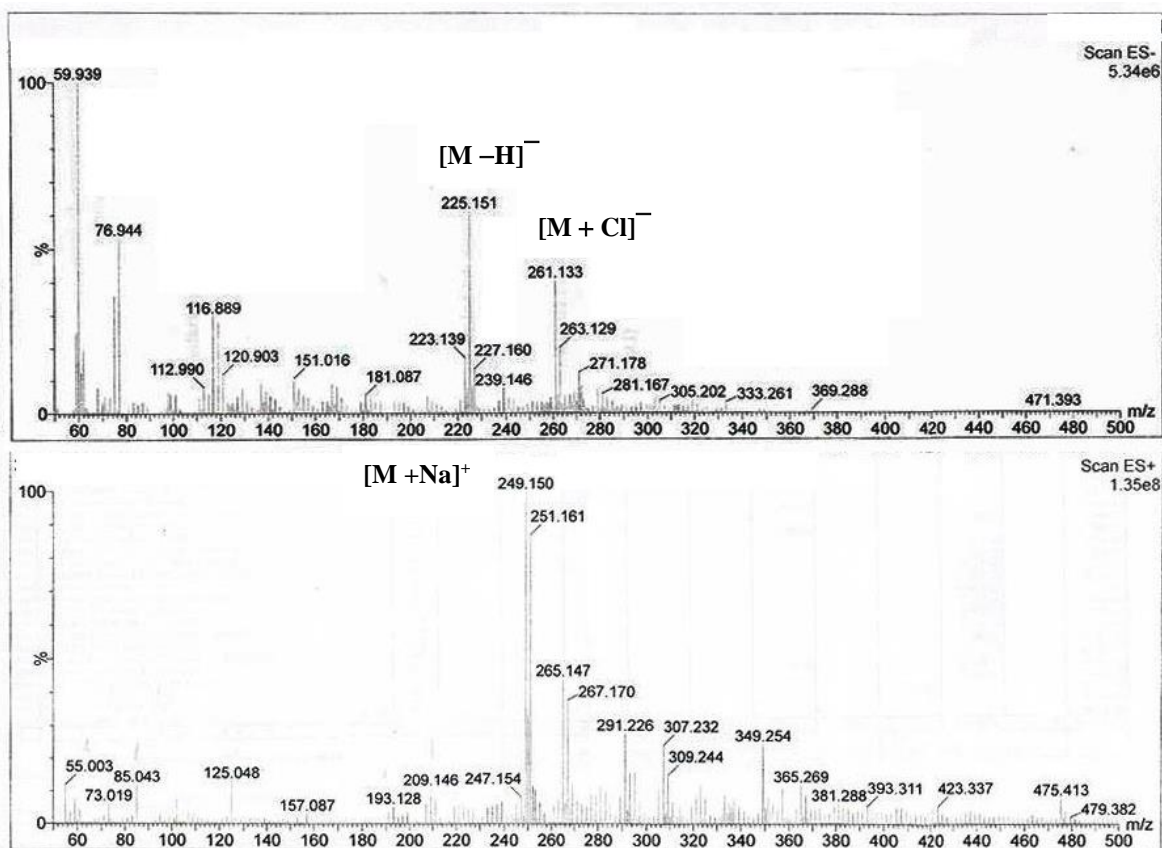


Figura 19. Electrospray negativo (ES⁻, superior) y positivo (ES⁺, inferior).

En el espectro de ^{13}C -RMN se observaron doce señales, de las cuales se observa un carbono cuaternario correspondiente al carbonilo de la lactona (δ 163.02), cuatro carbonos vinílicos pertenecientes a los dobles enlaces de la lactona (C-3 y C-4) y la cadena sustituyente en C-6 (C-1' y C-2'). Se presentan tres carbonos unidos a oxígeno pertenecientes a C-3, C-5 y C-3', la presencia de un sólo carbonilo permite suponer que las sustituciones en C-5 y C-3' corresponden a grupos hidroxilo; el resto de los carbonos presentes en el espectro corresponden a la cadena alifática (Figura 20).

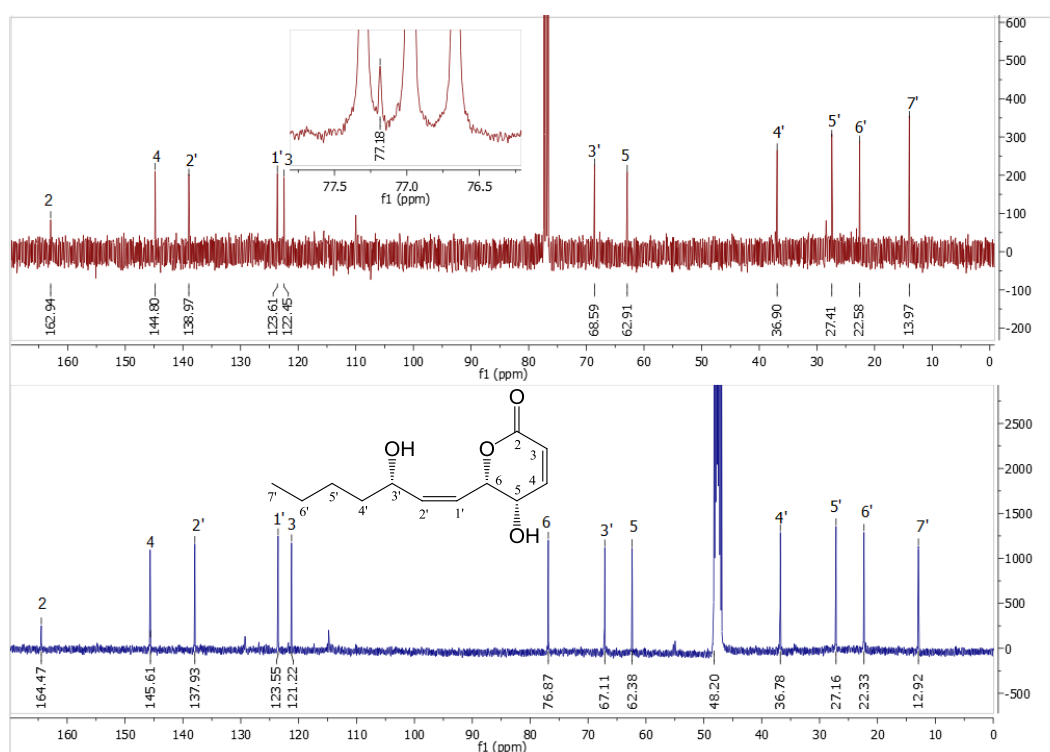


Figura 20. Espectros de ^{13}C -RMN de la pectinólida I, rojo: CDCl_3 ; azul: MeOD .

El espectro de ^1H -RMN de la pectinólida I (Figura 21) presentó el mismo sistema ABX para el núcleo de 5,6-dihidro- α -pirona de las pectinólidas A-C reportadas anteriormente en la literatura, correspondientes al doblete, por su acoplamiento con H-4, en δ 6.12 (H-3) y al doblete de dobletes, multiplicidad debida a su acoplamiento con H-3 y H-5, en δ 6.97 (H-4), pertenecientes a los protones vinílicos del doble enlace conjugado al carbonilo de la pirona; el desplazamiento de H-4 es típico para un carbono β enlazado a un

cromóforo de carbonilo α,β -insaturado (Davies-Coleman y Rivett, 1989, Pereda-Miranda, 1995); además, se observó el doblete de dobletes en δ 4.23 para el protón alílico H-5, la hidroxilación de la posición 5 provoca un desplazamiento a campo bajo para este protón (Fragoso-Serrano, 2000). Se observa en el espectro que el desplazamiento para H-5 se encuentra en 4.23 ppm debido a la ausencia de señales de grupos acetoxilo ($\delta \approx 2.00$), se puede concluir que el grupo sustituyente en la posición 5 es un grupo hidroxilo; la constante de acoplamiento entre H-5 y H-6 tiene un valor de 3.5 Hz, lo cual permite observar la orientación ecuatorial de H-5 y una posición axial para el H-6.

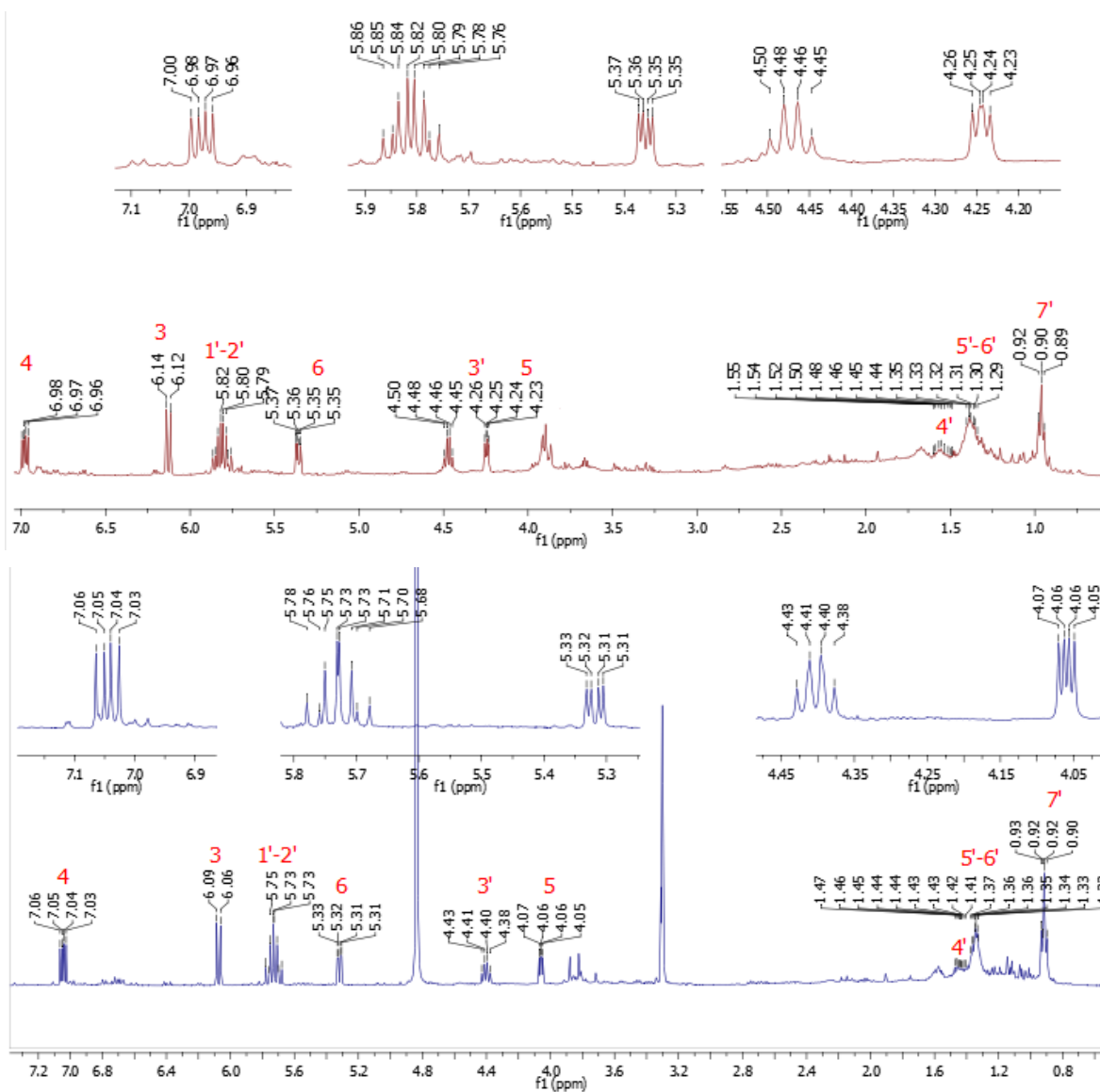


Figura 21. Espectros de ¹H-RMN de la pectinólida I, rojo: CDCl₃; azul: MeOD (400MHz).

Debido al entorno químico similar, oxígenos en posición β de los protones vinílicos de la cadena pseudo-ecuatorial (H-1', H-2') se presentan con prácticamente el mismo desplazamiento (δ 5.75-5.86) y con una multiplicidad de doblete de dobletes con un acoplamiento vinílico *cis* ($J_{H-1'-H-2'} = 11.6$ Hz). El protón de la posición 3' se encuentra en δ 4.47 con una multiplicidad de doblete de dobletes de dobletes (tripleto de dobletes con una apariencia de cuarteto) debido a su acoplamiento con H-2' y el metileno en C-4, la ausencia de grupo acetoxilo indica que el sustituyente presente es un grupo hidroxilo; el valor de desplazamiento químico para H-3' es similar al de la pectinólida B (δ 4.39), cuyo grupo hidroxilo se encuentra en esta posición (Pereda-Miranda *et al.*, 1993).

A través de los experimentos ^1H - ^1H COSY (Figura 22) y ^1H - ^{13}C HSQC (Figura 23) se observaron las correlaciones presentes y se asignaron los protones a sus respectivos carbonos. Entre las correlaciones más relevantes se encuentran las interacciones de los protones pertenecientes al núcleo de α -pirona; la señal correspondiente a los protones vinílicos H-1' y H-2' presentan correlación con H-3' y H-6. El experimento HSQC permitió distinguir entre los protones vinílicos de la cadena y los pertenecientes al núcleo α -pirona, se muestra que los protones alifáticos H-5' y H-6' presentan el mismo desplazamiento químico, ya que a estos están asignados dos carbonos. Los desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento de la pectinólida I se presentan en el cuadro 11.

Cuadro 11. Desplazamientos químicos de ^1H -RMN (400MHz) y ^{13}C -RMN (100MHz) para la pectinólida I en CDCl_3 y MeOH

Posición	CDCl_3		MeOD	
	δ_{H}, J en Hz	δ_{C}	δ_{H}, J en Hz	δ_{C}
2	-	163.94	-	164.47
3	6.12 d (9.8)	122.45	6.07 d (9.8)	121.22
4	6.97 dd (9.8, 5.1)	144.80	7.05 dd (9.8, 5.6)	145.61
5	4.23 dd (4.9, 3.5)	62.91	4.06 dd (5.6, 3.0)	62.38
6	5.35 dd (7.3, 3.3)	77.18	5.32 dd (7.7, 3.0)	76.87
1'	5.80 dd (11.6, 7.3)	123.61	5.73 dd (11.5, 8.0)	123.55
2'	5.80 dd (11.6, 7.3)	138.97	5.73 dd (11.5, 8.0)	137.93
3'	4.47 ddd (6.4, 6.7)	68.59	4.40 ddd (6.1, 7.2)	67.11
4'	1.51 (m)	36.90	1.44 (m)	36.78
5'	1.28 (m)	27.41	1.34 (m)	27.16
6'	1.28 (m)	22.58	1.34 (m)	22.33
7'	0.90 t (6.9)	13.97	0.92 t (7.0)	12.92

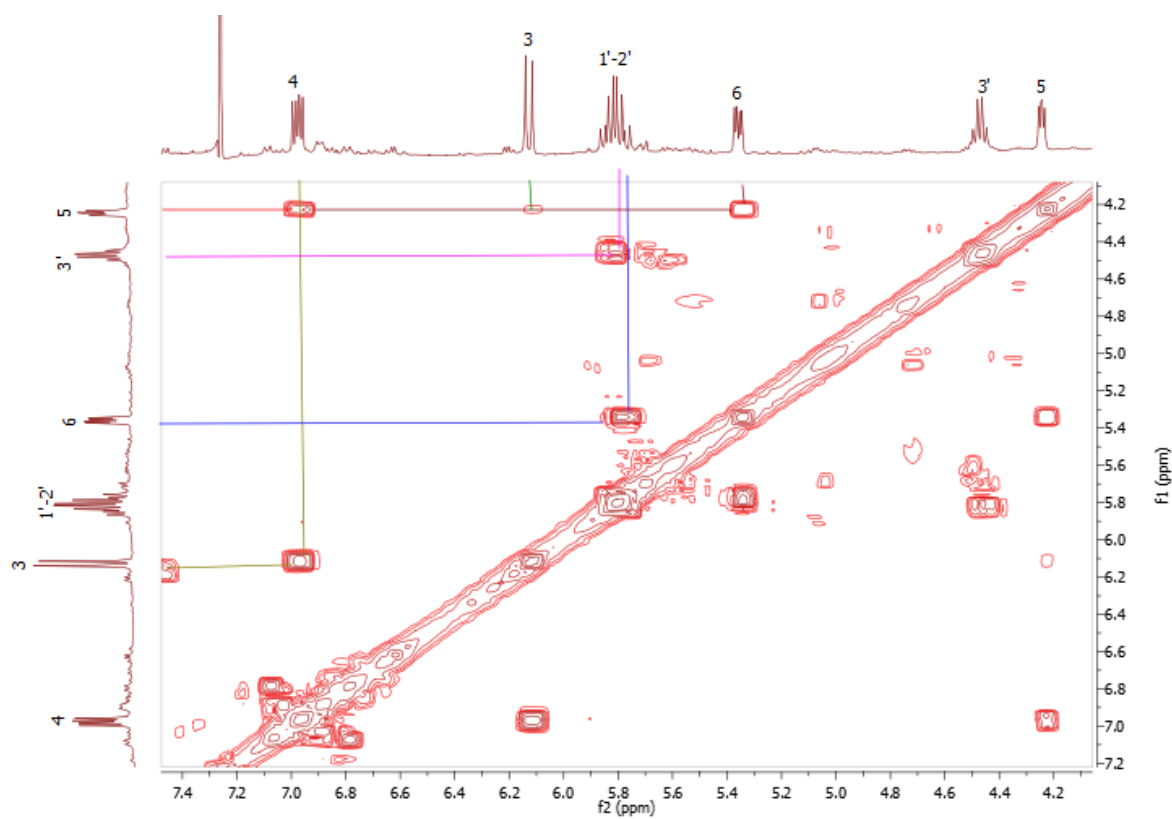


Figura 22. Espectro bidimensional ^1H - ^1H COSY de la Pectinólida I en CDCl_3

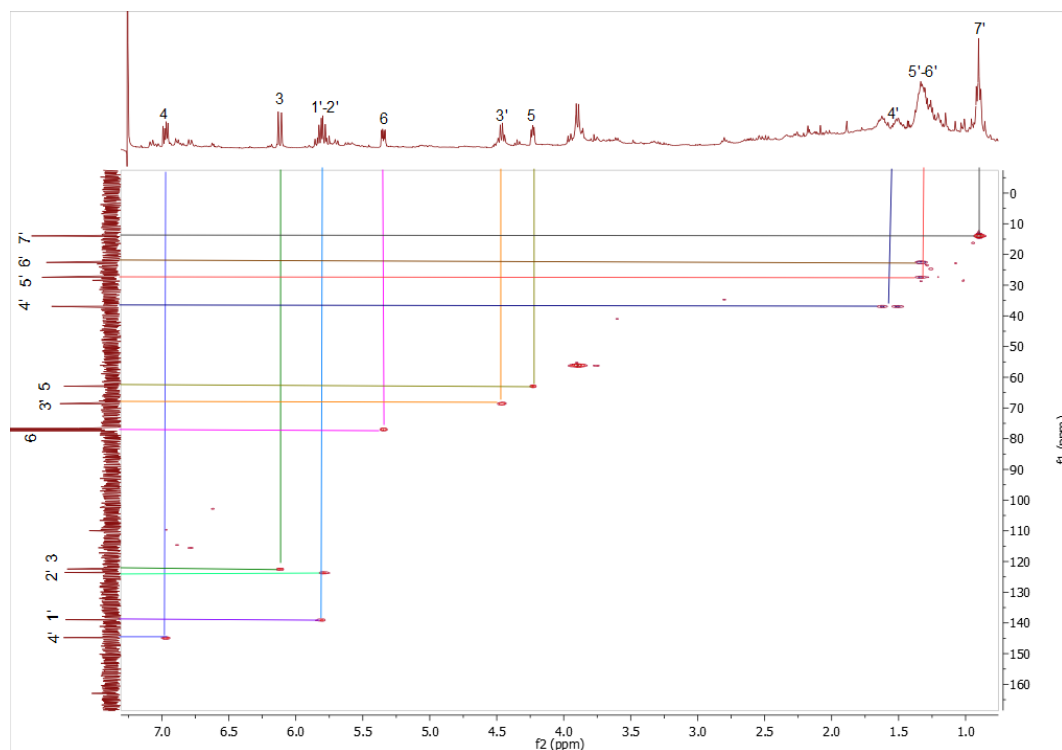


Figura 23. Espectro bidimensional ^1H - ^{13}C HSQC de la Pectinólida I en CDCl_3

6.2.2 CORRELACIÓN QUÍMICA

Para determinar la configuración absoluta de la pectinólida I (**3**) se estableció primeramente la orientación axial del grupo sustituyente en la posición cinco y la configuración pseudoecuatorial para la cadena lateral en la posición seis a través del valor de la constante de acoplamiento entre H-5 y H-6 ($J_{5ec,6} = 3.5$ Hz). Posteriormente, se realizaron reacciones de acetilación total y parcial, además de la preparación de los ésteres de Mosher a partir de uno de los productos de la acetilación parcial (Figura 24) para corroborar la configuración absoluta.

El producto de reacción de la acetilación total de la pectinólida I (**3**) se analizó mediante CLAR donde se observó un pico con un t_r de 10.33 min y que coeluyó con el estándar utilizado, la pectinólida A (**1**). Con el objetivo de verificar la estructura del producto de acetilación, se obtuvo su espectro de $^1\text{H-RMN}$ y se comparó con el espectro de la pectinólida A, encontrándose que ambos presentaban las mismas señales características correspondientes al anillo de δ -lactona- α,β -insaturada y el doble enlace de la cadena lateral (H-1', H-2') y H-3' (Figura 25).

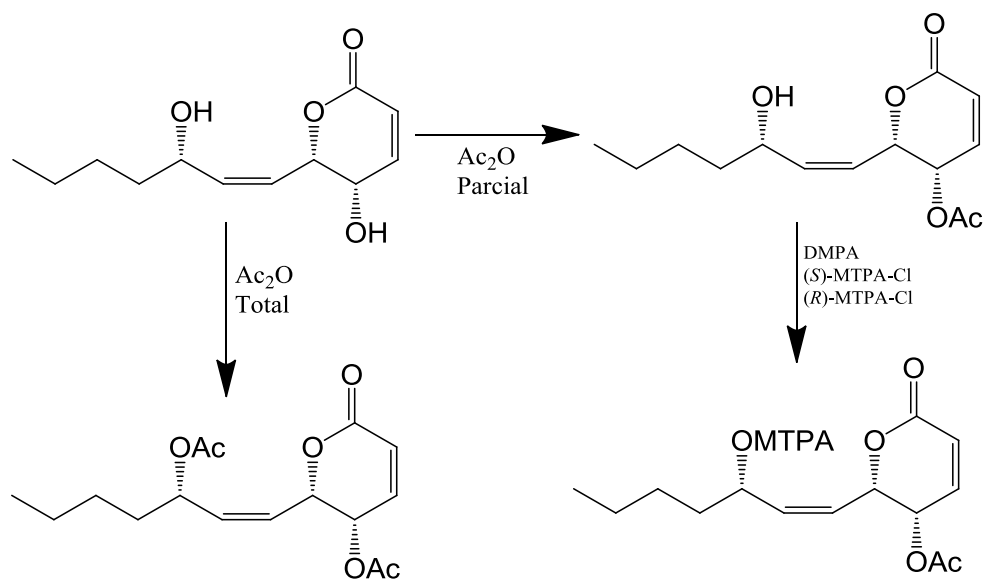


Figura 24. Correlaciones químicas entre pectinólidas.

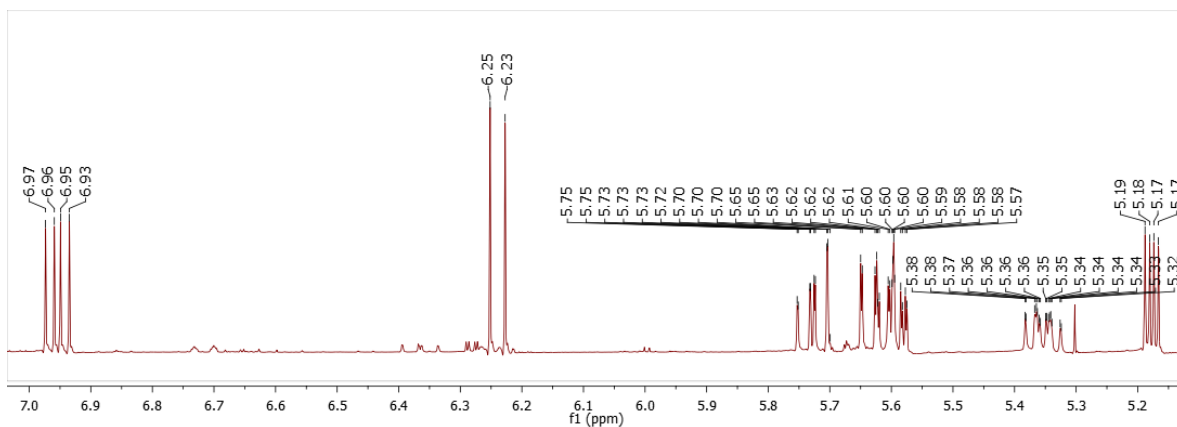


Figura 25. Espectro de ^1H -RMN de la Pectinólida I peracetilada en CDCl_3 (400MHz).

Previamente, se había establecido la configuración absoluta *S* para el centro quiral en la posición seis de la pectinólida A (**1**), la cual se fundamentó por el efecto Cotton positivo para la curva obtenida en el diroísmo circular (DC) y la transición $n \rightarrow \pi^*$ del carbonilo (260-270 nm) de la δ -lactona (Figura 25), el mismo resultado se observa para las pectinólidas B y C (Villavicencio Gonzáles, 1993). El espectro de ^1H -RMN de la pectinólida I peracetilada es idéntico al registrado por la pectinólida A, tanto en el desplazamiento químico de las señales como en sus multiplicidades (Figura 25) y, por lo tanto, se puede concluir que el nuevo producto natural presenta la misma configuración absoluta de las pectinólidas A-C.

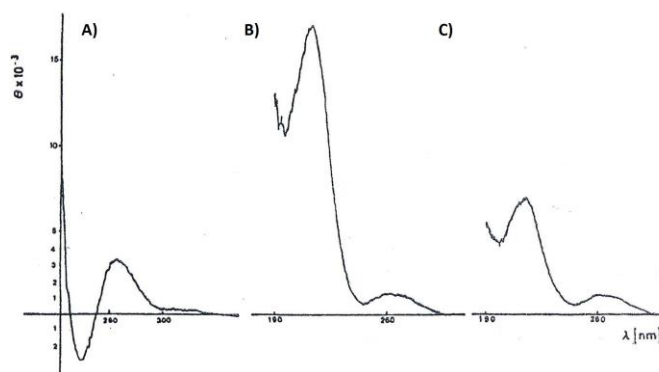


Figura 26. Curvas de DC en MeOH, a) pectinólida A, b) pectinólida B y c) pectinólida C.

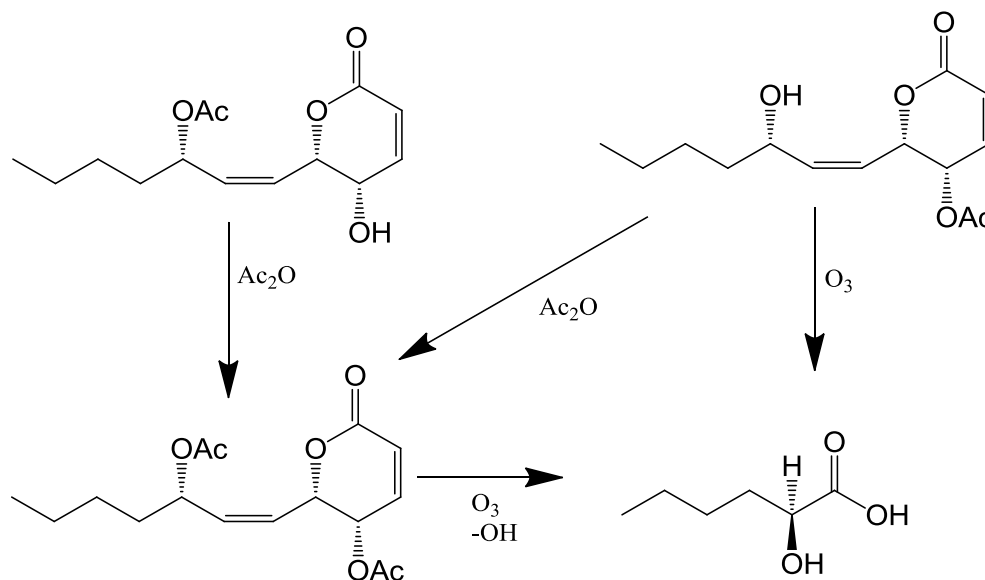


Figura 27. Correlaciones químicas reportadas para las pectinólidas A-C.

La estereoquímica absoluta de la posición C-3' sustituida por el grupo hidroxilo en la cadena lateral de las pectinólidas B y C se estableció mediante una reacción de oxidación con ozono e hidrólisis del producto mayoritario para general el ácido 2*R*-hidroxihexanoico ópticamente activo (Figura 26) (Pereda-Miranda *et al.*, 1993). Sin embargo, para evitar la posibilidad de un error en esta asignación del producto debido a la racemización del centro quiral alfa al grupo hidroxilo, se decidió confirmar la configuración absoluta para este centro quiral a través de la derivatización de la pectinólida B con los ésteres de *R*- y *S*-MTPA (Figura 24). A partir de los espectros de ¹H-RMN (Figura 27) de ambos compuestos y teniendo en cuenta los modelos configuracionales descritos para esta metodología se obtuvo el valor de $\Delta\delta = \delta_{S\text{-MTPA}} - \delta_{R\text{-MTPA}}$ (Snatzke y Hänsel, 1968; Seco *et al.*, 2004). A través de este método se observa que debido al efecto diamagnético del anillo aromático, el sustituyente L₂ del éster (*R*)-MTPA presenta su señal a campos más altos en comparación con el mismo sustituyente en el éster (*S*)-MTPA (Figura 28). El efecto anisotrópico del anillo aromático del MTPA afecta a los protones presentes hasta 10 nanómetros de distancia.

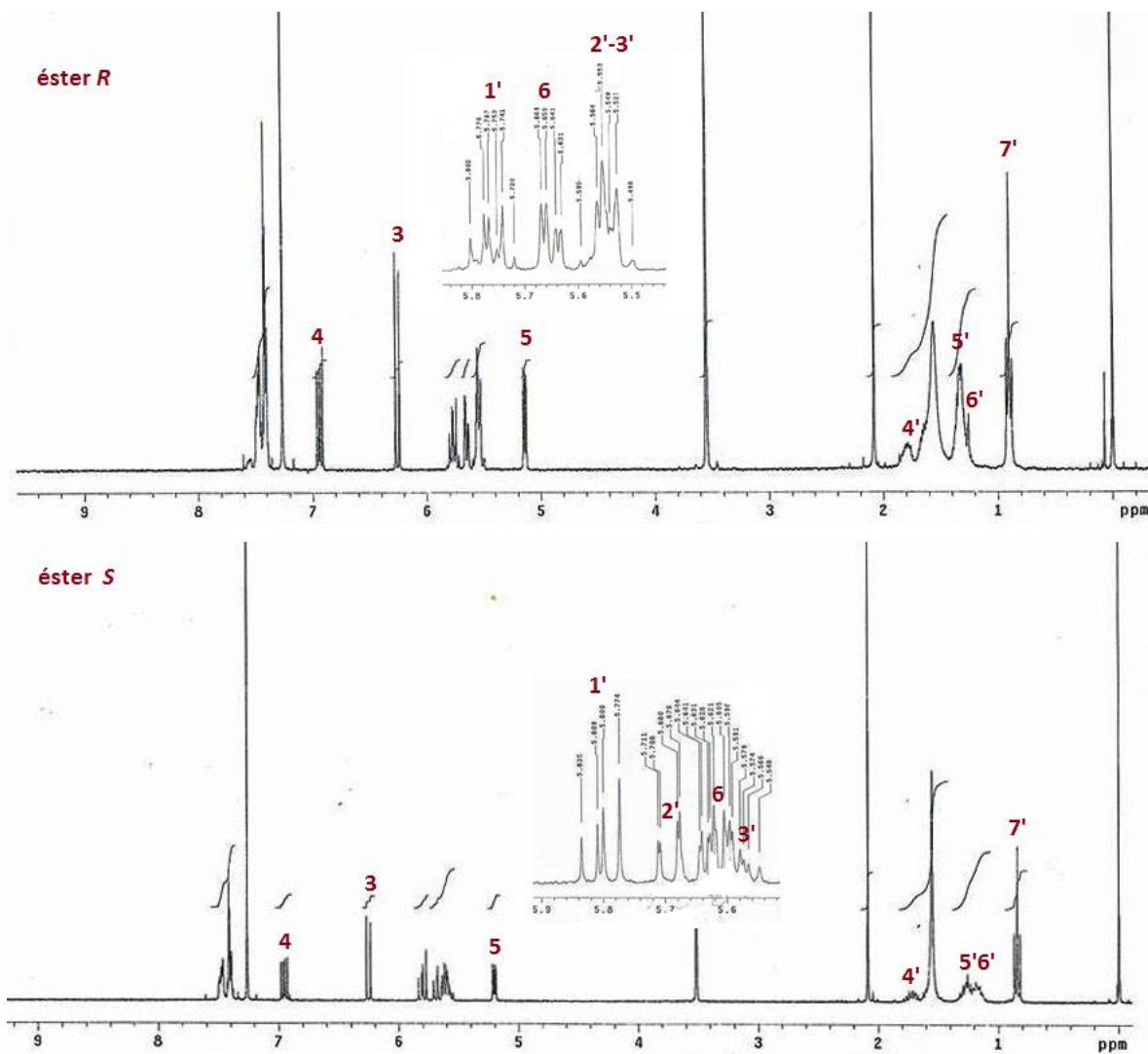


Figura 28. Espectros de $^1\text{H-RMN}$ de los ésteres *R*- y *S*-MTPA de la pectinólida I monoacetilada en CDCl_3 (300MHz).

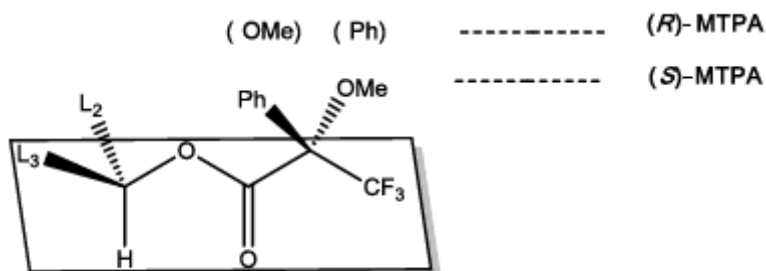


Figura 29. Modelo de correlación configuracional para los ésteres (*R*)- y (*S*)-MTPA.

Kakisawa planteó un método para determinar la configuración absoluta, el cual consiste en la asignación de los protones para ambos ésteres y obtener los valores de $\Delta\delta = \delta_{S\text{-MTPA}} - \delta_{R\text{-MTPA}}$ (Cuadro 12); posteriormente, se construye un modelo del compuesto ubicando los protones con $\Delta\delta > 0$ a la derecha y $\Delta\delta < 0$ a la izquierda, conforme a la representación configuracional de la Figura 29. Los valores absolutos de $\Delta\delta$ deben reflejar cualitativamente la distancia con el MTPA. A través de estas condiciones, el modelo planteado confirmó la configuración absoluta para el centro quiral C-3' de la pectinólida B como *S* (Figura 30). Consecuentemente, las reacciones de acetilación y derivatización con los ésteres de Mosher confirmaron que la pectinólida I presenta la misma configuración que la pectinólida A y sus derivados monoacetilados (pectinólida B y C). Por lo tanto, la estructura de la pectinólida I corresponde a la 6*S*-[3'*S*-hidroxi-1'*Z*-heptenil]-5*S*-hidroxi-5,6-dihidro-piran-2-ona.

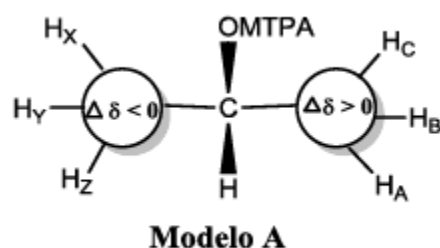


Figura 30. Modelo para determinar la configuración absoluta a través de los ésteres (*S*)- y (*R*)-MTPA.

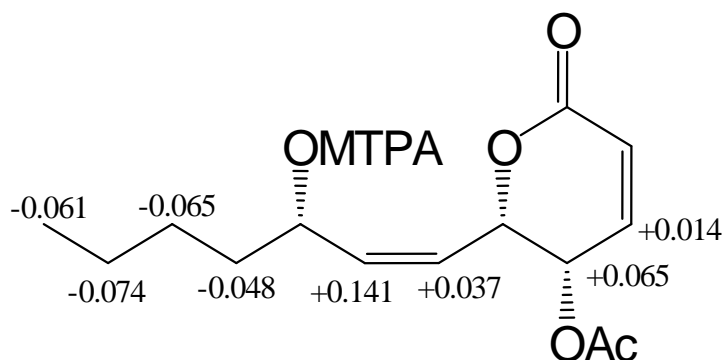


Figura 31. Valores de $\Delta\delta$ ($\delta_{S\text{-MTPA}} - \delta_{R\text{-MTPA}}$) para los ésteres de Mosher de la Pectinólida I

Cuadro 12. Desplazamiento químico ^1H -RMN de las señales de los derivados de éster (S)- y (R)-MTPA de la Pectinólida I peracetilada.

Éster MTPA	Desplazamiento químico de protón ($\Delta\delta = \delta_{S\text{-MTPA}} - \delta_{R\text{-MTPA}}$)							
	H-4	H-5	H-1'	H-2'	H-4'	H-5'	H-6'	H-7'
S	6.950	5.205	5.804	5.694	1.713	1.262	1.180	0.843
$\Delta\delta$	+0.014	+0.065	+0.037	+0.141	-0.048	-0.065	-0.074	-0.061
R	6.936	5.140	5.767	5.553	1.761	1.327	1.254	0.904

6.2.3 EVALUACIÓN CITOTÓXICA

El potencial citotóxico de la pectinólida I fue evaluado en tres líneas celulares y el valor de la IC_{50} muestra en el Cuadro 12. El criterio de actividad establecido por el Instituto Nacional de Cáncer de los estados Unidos considera un valor significativo para la IC_{50} aquellas concentraciones menores a 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para los compuestos puros (Suffnes y Pezzuto, 1991). Por lo tanto, se observa que para las tres líneas celulares una citotoxicidad significativa. Se pone en manifiesto que la citotoxicidad presente en los extractos de orgánicos de *Hyptis pectinata* se debe la presencia de las pectinólidas a través de la capacidad alquilante del núcleo de δ -lactona α,β -insaturada descrita en la literatura (Usui *et al.*, 2004; Bañuelos-Hernández, *et al.*, 2014).

Cuadro 13. Citotoxicidad de la Pectinólida I

	Línea celular ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
	HCT15	HeLa	MCF7
Colchicina	0.01	0.02	0.05
Pectinólida I	1.66	1.40	1.38

7. CONCLUSIONES

El presente estudio fitoquímico del extracto clorofórmico de la especie *Hyptis pectinata* permitió el aislamiento de tres 5,6-dihidro- α -pironas, dos de las cuales habían sido previamente identificadas como las pectinólida A (**1**) y las pectinólida C (**2**); además de un compuesto novedoso nombrado como la pectinólida I (**3**), el cual presentó actividad citotóxica frente a tres líneas celulares: HCT15 (carcinoma de colon), MCF7 (carcinoma de mama) y HeLa (carcinoma de cérvix).

La utilización de la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), en su modalidad de reciclaje de la muestra, resulta una importante herramienta para la separación y la purificación de compuestos naturales. Las técnicas espectroscópicas como la RMN y la espectrometría de masas permitieron la elucidación estructural de la pectinólida I como uno de los compuestos bioactivos mayoritarios. La combinación de metodologías quirópticas y correlaciones químicas como la acetilación y la esterificación con reactivos quirales (ésteres de Mosher) permitieron la caracterización de la configuración absoluta del nuevo compuesto.

BIBLIOGRAFÍA

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

Aguiar, E. H.; Zoghbi, M.; Silva, M. H. L.; Maia, J. G.; Rojas Amasifén, J. M.; Rojas, U. M. (2003) Chemical variation in the essential oils of *Hyptis mutabilis* (Rich.) Briq., *Journal of Essential Oil Research*, **15** (2), 130-132.

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

Agra, M.F.; Silva, K.N.; Basílio, I.J.L.D.; França, P.F.; Barbosa-Filho, J.M.; (2008) Survey of medicinal plants used in the region northeast of Brazil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **18**, 472–508.

Almatorp, T.G.; Hazell, C.A.y Torssell, B.G.K. (1991) A lignan and pyrone and other constituents from *Hyptis capitata*. *Phytochemistry* **30**, 2753-2756.

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

Alonso-Castro, A.J.; Maldonado-Miranda, J.J.; Zarate-Martínez, A.; Jacobo-Salcedo, M. del R.; Fernández-Galicia, C.; Figueroa-Zuñiga, L.A.; Rios-Reyes, N.A.; de León-Rubio, M.A.; Medellín-Castillo, N.A.; Reyes-Munguia, A.; Méndez-Martínez, R.; Carranza-

Alvarez, C. (2012) Medicinal plants used in the Huasteca Potosina, México. *Journal of Ethnopharmacology* **143**, 292-298.

Antiquariaat Jan Meemelink. <http://www.meemelink.com/> (Consultada el 1 de Septiembre del 2014).

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

Bañuelos-Hernández, A.E.; Mendoza-Espinoza, J.A.; Pereda-Miranda, R.; Cerda García-Rojas, C.M. (2014) Studies of (–)-Pironetin Binding to α -Tubulin: Conformation, Docking, and Molecular Dynamics. *J. Org. Chem.*, **79**, 3752–3764.

Barbosa P.P.P.; Barbosa, C.P.(1992) Studies on the antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis mutabilis* Briq. in rats. *Phytotherapy Research*, **6** (2), 114-115.

Basílio, I.J.L.D.; Agra, M. de F.; Rocha, E.A.; Leal, C.K.A. y Abrantes, H.F. (2006) Estudo Farmacobotânico Comparativo das Folhas de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. e *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). *Acta Farm. Bonaerense* **25** (4): 518-25.

Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, Universidad Nacional Autónoma de México. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx> (Consultada el 30 de Agosto del 2014).

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

Bhuiyan, N.I.; Begum, J.; Nandi, N.C. (2010) Chemical component studies on the leaf and inflorescent essential oil of *Hyptis brevipes* (Poit.). *Journal of Medicinal Plants Research* **4** (20), 2128-2131.

Boalino D. M.; Connolly J. D.; McLean S.; Reynolds W. F. y Tinto, W. F. (2003) Alpha-pyrone and a 2(5H)-furanone from *Hyptis pectinata*. *Phytochemistry* **64** (7), 1303-1307.

Bunalema, L.; Obakiro, S.; Tabuti, J. R.S.; Waako, P. (2014) Knowledge on plants used traditionally in the treatment of Tuberculosis in Uganda. *Journal Ethnopharmacology* **151**, 999-1004.

Caldas, G.F.R.; Costa, I.M.A.; Silva, J.B.R.; Nóbrega, R.F.; Rodrigues, F.F.G.; Costa, J.G.M.; Wanderley, A.G. (2011) Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis martiussi* Benth.(Lamiaceae). *Journal Ethnopharmacology* **137**, 886-892.

Cavalheiro, A.J. y Yoshida, M. (2000) 6-[ω -arylalkenyl]- 5,6-dihydro- α -pyrones from *Cryptocarya mostacha* (Lauraceae). *Phytochemistry* **53**, 811-819.

Chukwujekwu, J.C.; Smith, P.; Coombes, P.H.; Mulholland, D.A.; Van Staden, J. (2005) Antiplasmodial diterpenoid from the leaves of *Hyptis suaveolens*. *Journal of Ethnopharmacology* **102**, 295-297.

Cortez-Gallardo, V.; Macedo-Ceja, J.P.; Hernández-Arroyo, M.; Arteaga-Aureoles, G.; Espinosa-Galván, D.; Rodríguez-Landa, J.F. (2004) Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas. *Revista Biomédica* **15**, 123-136.

Costa, V.C.O.; Tavares, J.F.; Silva, A.B.; Duarte, M.C.; Agra, M.F.; Barbosa-Filho, J.M.; de Souza, I.L.L.; da Silva, B.A.; Silva, M.S. (2014) Hyptenolide, a new α -pyrone with spasmolytic activity from *Hyptis macrostachys*. *Phytochemistry Letters* **8**, 32-37.

Coutinho, H.D.M.; Costa, J.G.M.; Lima, E.O.; Siqueira-Júnior, J.P. (2009) In vitro phototoxic activity of *Eugenia jambolana* L. and *Hyptis martiusii* Benth. *Journal of Photochemistry and photobiology B: Biology* **96**, 63-65.

Crombie, L y Firth P.A. (1968) Biosynthesis of Parasorbic Acid (Hex-2-en-5-olide) by the Rowan Berry (*Sorbus aucuparia* L.). *Journal of Chemical Society*. 2852-2856.

Davies-Coleman, M.T. y Rivett, D.E.A. (1996) Structure of the 5,6-dihydro- α -pyrone, umuravumbolide. *Phytochemistry* **38** (3), 791-792.

Davies-Coleman, M.T. y Rivett, D.E.A. (1996) 5,6-dihydro- α -pyrones from *Syncolostemon parviflorus*. *Phytochemistry* **41** (4), 1085-1092.

Danmalam, U.H.; Abdullahi, L.M.; Agunu A.; Musa, K.Y. (2009) Acute toxicity studies and hypglycemic activity of the methanol extract of the leaves of *Hyptis suaveolens* Poit. (Lamiaceae). *Nigerian Journal of Pharmaceutical Sciences* **8** (2), 87-92.

De Lima, K.S.B.; Pimenta, A.T.A.; Guedes, M.L.S.; Lima, M.A.S.; Silveira, E.R. (2012) Abietane diterpenes from *Hyptis carvalhoi* Harley. *Biochemical Systematics and Ecology* **44**, 240-242.

De Lima, C.B.A.; Paixao, M.S.; Melo, M.; de Santana, T.M.; Damascena, P.N.; Dias, S. A., Porto, C.B.S.Y.; Fernandes, X.A.; Santos, C.S.C.; Lima, A.C.; Quintans Júnior, J.L.; dos S. Estevam, C.; Araújo, S.B. (2013) Orofacial antinociceptive effect and antioxidant properties of hydroethanol extract of *Hyptis fruticosa* salmz ex Benth. *Journal of Ethnopharmacology* **146**, 192-197.

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

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

Diniz, L.R.L.; Vieira, C.F.X.; dos Santos, E.C.; Lima, G.C.; Aragao, K.K.V.; Vasconcelos, E.C.; Araújo, P.C.C.; Vasconcelos, Y.A.G.; Oliveira, A.C.; Oliveira, H.D.; Portella, V.G.; Coelho-de-Souza, A.N. (2013) Gastroprotective effects of the essential oil of *Hyptis crenata* Pohl ex Benth. On gastric ulcer models. *Journal of Ethnopharmacology* **149**, 694-700.

Drewes, S.E.; Bethuel, M.S.; Horn, M.M.; Scott-Shaw, R.; Sandor, P. (1995) 5,6- dihydro- α -pyrones and two bicyclic tetrahydro- α -pyrone derviates from *Cryptocarya latifolia*. *Phytochemistry* **38** (6), 1427-1430.

Echeverri, F.; Arango, V.; Quiñones, W.; Torres, F.; Escobar, G.; Rosero, Y.; Archbold, R. (2001) Passifloricins, polyketides α -pyrones from *Passiflora foetida* resin. *Phytochemistry* **56**, 881-885.

Falcao, D.Q. y Menezes F.S. (2003) Revisao etnofarmacológica, farmacológica e química do genero *Hyptis*. *Revista brasileira de farmacia* **84** (3), 69-74.

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

Fernández-Alonso, J.L. y Rivera-Díaz, O. (2006) Las labiadas. En: García, N. y G. Galeno (eds) Libro Rojo de Plantas de Colombia. Bogotá, Colombia. Instituto Alexander von Humboldt, Instituto de Ciencias Naturales de la Universidad Nacional de Colombia, Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, 385-582.

Flora de Santa Catarina.
<https://sites.google.com/site/biodiversidadecatarinense/plantae/magnoliophyta/lamiaceae/hyptis-pectinata-sambacaita>

Fragoso-Serrano, M.; Gonzalez-Chimeo, E.; Pereda-Miranda, R. (1999) Novel labdane diterpenes from the insecticidal plant *Hyptis spicigera*. *Journal of Natural Products* **62**, 45–50.

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

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

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

Harley, R., França, F.; Santos, E.P. y Santos, J.S. (2012) *Lamiaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB008239>

Heinrich, M. (2014) Ethnopharmacology: quo vadis? Challenges for the future. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **24**, 99-102.

Herbert, R.B. (1989) The Biosynthesis of Secondary Metabolites. *Springer Science & Business Media*, pp. 213.

Holker, J.S.E. y Simpson, T.J. (1981) Studies on fungal metabolites. Part 2. Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance biosynthetic studies on pentaketide metabolites of *Aspergillus mellus*: 3-(1,2-epoxypropil)-5,6-dihydro-5-hydroxy-6-methyl-pyran-2-one and mellein. 1397-1400.

Igwe, O.U. (2014) Chromatographic and spectrometric characterization of bioactive compounds from the leaves of *Hyptis lanceolata* Poir. *International Journal of Chemistry and Pharmaceutical Sciences* **2** (1), 547-553.

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

Kobayashi, S.; Tsuchiya, K.; Nishide, M.; Nishikioro, T.; Nakagawa, T.; Shimada, N. (1995) Pironetin, a novel plant grow regulator produced by *Streptomyces* sp. NK10958. III. Biosynthesis. *The Journal of Antibiotics* **48** (8), 893-895.

Kothandan, S. y Swaminathan, R. (2014) Evaluation of *in vitro* antiviral of *Vitex Negundo* L., *Hyptis suaveolens* (L) poit., *Decalepis hamiltonii* Wigh and Arn., to Chikungunya virus. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* **4(suppl 1)**, S111-S115.

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

Kuhnt, M.; Proebstle, A.; Rimpler, H.; Bauer, R.; Heinrich, M. (1995) Biological and pharmacological activities and further constituents of *Hyptis verticillata*. *Planta Medica* **61** (3), 227-32.

Lee, K.H.; Lin, Y.M.; Wu, T.S.; Zhang, De C.; Yamagishi, T.; Hayashi, T.; Hall, I.H.; Chang, J.J.; Wu, R.Y.; Yang, T.H. (1988) Antitumor agents. LXXXVIII. The cytotoxic principles of *Prunella vulgaris*, *Psychotria serpens*, and *Hyptis capitata*: ursolic acid and related derivatives. *Planta Medical*, **54**(4), 308-11.

Lingaraju, D.P.; Sudarshana, M.S.; Rajashekar, N. (2013) Ethnopharmacological survey of traditional medicinal plants in tribal areas of Kodagu district, Karnataka, India. *Journal of Pharmacy Research* **6**, 284-297.

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

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

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

Marine Life Photography <http://www.marinelifephotography.com> (Consultado el 1 de Septiembre del 2014).

Matsuse, I.T.; Lim, Y.A.; Correa, M.; Gupta, M.P. (1999) A search for anti-viral propeties in Panamanian medicinal plants. The effects on HIV and its essential enzymes.

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

Meragelman, T.L.; Scudiero, D.A.; Davis, R.E.; Staudt, L.M.; McCloud, T.G.; Cardellina II, J.H.; Shoemaker, R.H. (2009) Inhibitors of the NF- κ B Activation Pathway from *Cryptocarya rugulosa*. *Journal of Natural Products* **72**, 336-339.

Messana, I.; Ferrari, F.; Souza, M.A. De M.; Gacs-Baitz, E. (1990) (-)-Salzol, an isopimarane diterpene, and a chalcone from *Hyptis salzmanii*. *Phytochemistry* **29** (1), 329-32.

Missouri Botanical Garden <http://www.tropicos.org> (Consultado el 30 de Agosto del 2014).

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

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

Ohsaki, A.; Kishimoto, Y.; Isobe, T.; Fukuyama, Y. (2005) New labdane diterpenoids from *Hyptis fasciculata*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **53** (12), 1577-1579.

Olorunnisola, O.S.; Adetutu, A.; Balogun, E.A.; Afolayan, A.J. (2013) Ethnobotanical survey of medicinal plants used in the treatment of malarial in Ogbomoso, Southwest of Nigeria. *Journal of Ethnopharmacology* **150**, 71-78.

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

Pereda-Miranda, R. y Delgado, G. (1990) Triterpenoids and flavonoids from *Hyptis albida*. *Journal of Natural Products* **53**(1), 182-185.

Pereda-Miranda, R.; García, M.; Delgado, G. (1990) Structure and stereochemistry of four α -pyrones from *Hyptis oblongifolia*. *Phytochemistry* **29** (9), 2971-2974.

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

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

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

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

Pessoa-Moreira, A.C.; de Oliveira-Lima, E.; Alves-Wanderley, P.; Santos-Carmo, E.; Leite de Souza, E. (2010) Chemical composition and antifungal activity of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit leaves essential oil against *Aspergillus* species, *Brazilian Journal of Microbiology* **41**, 28-33.

Prasad, K.R. y Gutala, P. (2013) Total synthesis and determination of the absolute configuration of 5,6- dihydro- α -pyrone natural product synargentolide B. *The Journal of Organic Chemistry* **78**, 3313-3322.

Ramasubramania, R. (2012) Medicinally potential plants of Labiatae (Lamiaceae) family: an overview. *Research Journal of Medicinal Plant* 6 3, 203-213.

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

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

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

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

Rocha-Caldas, G.F.; Macedo do Amaral Costa, I.; Bezerra Rodrigues da Silva, J.; Farias da Nóbrega, R.; Fernandes Galvao Rodrigues, F.; Martins da Costa, J.G.; Gonçalves Wanderley, A. (2011) Antiulcerogenic activity of the esencial oil of *Hyptis martiussi* Benth. (Lamiaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 137,886-892.

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

Russo Serafini, M.; Campos Vergne, D.M.; Rabelo, T.K.; dos Passos Menezes, P.; Fagundes da Rocha, R.; Fonseca Moreira, J.C.; Amaral da Silva, F.; Barreto Alves, P.;

Ramos de Jesus, H.C.; Souza Araújo, A.A.; PensGelain, D. (2012) Determination of chemical and physical properties of *Hyptis pectinata* essential oil and their redox active profile. *Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research* **3** (1), 1-9.

Santos, K.A.A.; Matias, F.F.E.; Sobral-Souza, C.E.; Tintino, S.R.; Morais-Braga, F.B.M.; Guedes, M.M.G.; Rolón, M.; Coronel, C.; Alfonso, J.; Vega, C.; Costa, G.M.J.; Menezes, R.A.I.; Coutinho, D. M.H. (2013) Trypanocide, cytotoxic, and anti-*Candida* activities of natural products: *Hyptis martiussi* Benth. *European Journal of Integrative Medicine* **5**, 427-431.

Santos, P.O.; Costa, M. de J.C.; Alves, J.A.B.; Nascimento, P.F.C.; de Melo, D.L.F.M.; Barbosa Jr., A.M.; Trindade, R. de C.; Blank, A.F.; Arrigoni-Blank, M.F.; Alves, P.B.; do Nascimento, M.P.F. (2008) Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hyptis pectinata* (L.) Poit. *Quimica Nova* **31** (7), 1648-1652.

Seco, J.M.; Quiñoá, E.; Riguera, R. (2004) The assignment of absolute configuration by NMR. *Chemical Reviews* **104**, 17-118.

Silva, G.C.; Raulino, R.J.; Cerqueira, D.M.; Mannarino, S.C.; Pereira, M.D.; Panek, A.D.; Silva, J.F.M.; Menezes, F.S.; Eleutherio, E.C.A. (2009) *In vitro* and *In vivo* determination of antioxidant activity and mode of action of isoquercetin and *Hyptis fasciculata*. *Phytomedicine* **16**, 761-767.

Snatzke, G.; Hänsel, R. (1968) Die absolutkon Figuration der kawa-lactone. *Tetrahedron letters* **9**, 1797-1799.

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

Suffnes, M. Y Pezzuto, J.M. (1991) Assay related to cancer drug discovery. En Methods in Plant Biochemistry. K. Hostettmann (Ed.) **6**, 71-133.

Takayama, C.; Fariab, F.M.; Almeida, A.C.A.; Valim-Araújo, D.A.O.; Rehena, C.S.; Dunderb, R.J.; Socca, E.A.R.; Manzo, L.P.; Rozza, A.L.; Salvador, M.J.; Pellizzon, C.H.; Hiruma-Lima, C.A.; Luiz-Ferreira, A.; Souza-Brito, A.R.M. (2011) Gastroprotective and ulcer healing effects of essential oil from *Hyptis spicigera* Lam. (Lamiaceae). *Journal of Ethnopharmacology* **135**, 147–155.

Tanowitz, B.D.; Junak, S.A.; Smith, D.M. (1984) Terpenoids of *Hyptis emoryi*. *Journal of Natural products* **47** (4), 739-740.

Tchoumboungang, F.; Amvam Zollo, P. H.; Fekam Boyom, F.; Nyegue, M. A.; Bessièrè, J. M.; Menut, C. (2005) Aromatic plants of tropical Central Africa. XLVIII. Comparative study of the essential oils of four *Hyptis* species from Cameroon: *H. lanceolata* Poit., *H. pectinata* (L.) Poit., *H. spicigera* Lam. and *H. suaveolens* Poit. *Flavor and Fragrance Journal* **20**, 340-343.

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

Tolmacheva, N.A.; Gerus, I.I.; Dolovanyuk, V.G.; Kondratov, I.S.; Haufe, G. (2009) Synthesis of New δ -(Polyflouroalkyl)- δ -hydroxy- α -amino Acids. *European Journal of Organic Chemistry*, **29**, 5012-5019.

Tsai S.F.; Lee, S.S. (2014) Neolignans as Xanthine oxidase inhibitors from *Hyptis rhoboides*. *Phytochemistry* **101**, 121-127.

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

Villavicencio Gonzáles, J. M. (1993) Purificación y caracterización de las pectinólidas A-C, principales constituyentes citotóxicos y antimicrobianos de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. Tesis de maestría, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, México, 65 p.

Wekesa, I.; Onok, L.A.; Deng, A.L.; Hasanali, A.; Othira, J.O. (2011) Toxicity and repellent potency of *Hyptis spicigera* extracts on *Sitophilus zeamidis* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of Stored Products and Postharvest Research* **2** (6), 113-119.

Xu, D.H.; Huang, Y.S.; Jiang, D.Q.; Yuan, K. (2013) The essential oils chemical composition and antimicrobial, antioxidant activities and toxicity of three *Hyptis* species. *Pharmaceutical Biology* **51** (9), 1121-1130.

Yamagishi, T.; Zhang, D.C.; Chang, J.J.; McPhail, D.R.; McPhail, A.T.; Lee, K.H. (1988) The cytotoxic principles of *Hyptis capitata* and structures of the new triterpenes hyptatic acid-A and B. *Phytochemistry* **27** (10), 3213-3216.