



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN
CITOTÓXICA DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS DE
*HYPTIS BREVIPES***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA-FARMACEÚTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

VIRIDIANA MAGAÑA MORALES



MÉXICO, D.F.

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: Dra. María Isabel Aguilar Laurents

Vocal: Dra. Rachel Mata Essayag

Secretario: Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano

1er Suplente: Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz

2do Suplente: Dr. Mario Alberto Figueroa Saldivar

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Farmacia, Laboratorio 123.

Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor: _____

Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano

Supervisor Técnico: _____

Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda

Sustentante: _____

Viridiana Magaña Morales

INDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
2.	ANTECEDENTES	3
	2.1 Familia <i>Lamiaceae</i>	4
	2.2 Género <i>Hyptis</i>	6
	2.2.1 Metabolitos secundarios	8
	2.2.1.1 Triterpenoides	8
	2.2.1.2 Lignanos	8
	2.2.1.3 Flavonoides	9
	2.2.1.4. Derivados de 5, 6-dihidro- α -pironas	9
	2.3 <i>Hyptis brevipes</i>	12
	2.3.1 Derivados de 5, 6-dihidro- α -pironas de <i>Hyptis brevipes</i>	13
3.	HIPÓTESIS	15
4.	OBJETIVOS	16
	4.1 Objetivo General	16
	4.2 Objetivos Específicos	16
5.	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	17
	5.1 Material vegetal	17
	5.2 Extracción del material vegetal	17
	5.3 Fraccionamiento primario del extracto de diclorometano	17
	5.4 Técnicas cromatográficas	19
	5.4.1 Cromatografía en capa fina	19
	5.4.2 Cromatografía en columna	19
	5.4.3 Cromatografía de líquidos de alta resolución	20
	5.4.3.1 CLAR a nivel analítico	21
	5.4.3.2 CLAR a nivel preparativo	21
	5.5 Elucidación Estructural	22
	5.6 Evaluación de la Citotoxicidad	22
	5.6.1 Preparación de controles	22
	5.6.2 Preparación de muestras	23

5.6.3 Ensayo de citotoxicidad	23
5.6.4 Determinación de la CI_{50}	24
5.6.5 Criterios de actividad	24
6. RESULTADOS	25
6.1 Obtención del extracto y fraccionamiento primario	25
6.2 Aislamiento de los compuestos I-IV	26
6.2.1 Separación por CLAR a nivel preparativo	26
6.2.2 Fraccionamiento por CLAR de los compuestos I-IV	27
6.2.3 RMN- 1H de los compuestos I-IV	30
6.3 Aislamiento de los compuestos G1-G3	32
6.3.1 Fraccionamiento secundario por cromatografía en columna	32
6.3.2 Perfil cromatográfico de las subfracciones A-H	32
6.3.3 Subfracción G	37
6.3.4 RMN- 1H de los compuestos G1-G3	39
6.4 Elucidación estructural	41
6.4.1 Caracterización del compuesto IV (Brevipólida H)	41
6.4.2 Caracterización del compuesto G2 (Brevipólida P)	43
6.5 Evaluación de citotoxicidad	45
7. DISCUSIÓN	46
8. CONCLUSIONES	48
9. PERSPECTIVAS	49
10. BIBLIOGRAFÍA	50
9.1 Referencias de figuras	55

Glosario de Abreviaturas

<i>Abreviatura</i>	<i>Significado</i>
AcOEt	Acetato de Etilo
c	Cuadruplete
CC	Cromatografía en Columna
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CDCl ₃	Cloroformo Deuterado
CH ₃ CN	Acetonitrilo
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria 50
CLAR	Cromatografía de Líquidos en Alta Resolución
CoA	Coenzima A
d	Doblete
dd	Doble de dobles
ddd	Doble de dobles de dobles
DMSO	Dimetilsulfóxido
H ₂ O	Agua
Hz	Hertz
Me ₂ CO	Acetona
MeOH	Metanol
OD	Optical Density (Densidad Óptica)
pH	Potencial de Hidrógeno
ppm	Partes por millón
q	Quintuplete
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
SRB	Sulforodamina B
t	Triplete
TCA	Ácido Tricloroacético
t _R	Tiempo de retención

TRIS
UV

Tris(hidroximetil)aminometano
Ultravioleta

Índice de Figuras

Figura 1. Distribución de la Familia <i>Lamiaceae</i> en México. _____	5
Figura 2. Especies del género <i>Hyptis</i> en México. _____	6
Figura 3. Estructura química de la flavona. _____	9
Figura 4. Estructura de δ -lactona- α,β -insaturado. _____	10
Figura 5. Estructura química de la pironetina. _____	11
Figura 6. Distribución de <i>Hyptis brevipes</i> en el mundo. _____	12
Figura 7. Morfología de la especie <i>Hyptis brevipes</i> . _____	13
Figura 8. Brevipólicas previamente aisladas de <i>Hyptis brevipes</i> . _____	14
Figura 9. Metodología general del fraccionamiento primario. _____	18
Figura 10. Espectro RMN- ¹ H de la fracción de AcOEt en CDCl ₃ . _____	25
Figura 11. Cromatograma de líquidos a nivel analítico de la fracción AcOEt. _____	26
Figura 12. Cromatograma de líquidos a nivel analítico del fraccionamiento del pico I _____	27
Figura 13. Cromatograma de líquidos a nivel analítico del fraccionamiento del pico II. _____	27
Figura 14. Cromatograma de líquidos a nivel analítico del fraccionamiento del pico III. _____	28
Figura 15. Cromatograma de líquidos a nivel analítico del fraccionamiento del pico IV. _____	28
Figura 16. Cromatograma a nivel preparativo de la purificación del compuesto pico IV, a través de la técnica de rasurado de pico y reciclaje de muestra en CLAR. _____	29
Figura 17. Espectro RMN- ¹ H del pico I en CDCl ₃ (400 MHz). _____	30

Figura 18. Espectro RMN- ¹ H del pico II en CDCl ₃ (400 MHz).	30
Figura 19. Espectro RMN- ¹ H del pico III en CDCl ₃ (400 MHz).	31
Figura 20. Espectro RMN- ¹ H del pico IV en CDCl ₃ (400 MHz).	31
Figura 21. Cromatograma de líquidos a nivel preparativo de la subfracción A.	33
Figura 22. Cromatograma de líquidos a nivel preparativo de la subfracción B.	34
Figura 23. Cromatograma de líquidos a nivel preparativo de la subfracción C.	34
Figura 24. Cromatograma de líquidos a nivel preparativo de la subfracción D.	35
Figura 25. Cromatograma de líquidos a nivel preparativo de la subfracción E.	35
Figura 26. Cromatograma de líquidos a nivel preparativo de la subfracción F.	36
Figura 27. Cromatograma de líquidos a nivel preparativo de la subfracción G.	36
Figura 28. Cromatograma de líquidos a nivel preparativo de la subfracción H.	37
Figura 29. Espectro RMN- ¹ H de la subfracción G en CDCl ₃ (400 MHz).	38
Figura 30. Cromatograma de líquidos a nivel preparativo de la purificación del pico G2	38
Figura 31. Espectro RMN- ¹ H del compuesto aislado G1 en CDCl ₃ (400 MHz).	39
Figura 32. Espectro RMN- ¹ H del compuesto aislado G2 en CDCl ₃ (400 MHz).	40
Figura 33. Espectro RMN- ¹ H del compuesto aislado G3 en CDCl ₃ (400 MHz).	40
Figura 34. Espectro RMN- ¹ H de la brevipólida H en CDCl ₃ (400 MHz).	41
Figura 35. Brevipólida H.	42
Figura 36. Espectro RMN- ¹ H de la brevipólida P en CDCl ₃ (400 MHz).	43
Figura 37. Brevipólida P.	44

Índice de Tablas

Tabla 1. Especies representativas del género <i>Hyptis</i> en México y sus usos tradicionales. _____	7
Tabla 2. Gradiente de elución utilizado en el fraccionamiento secundario en CC de la fracción AcOEt de <i>Hyptis brevipes</i> . _____	20
Tabla 3. Cantidades obtenidas a partir del fraccionamiento primario. _____	25
Tabla 4. Fraccionamiento secundario de la fracción de AcOET de <i>Hyptis brevipes</i> . _____	33
Tabla 5. Cantidades obtenidas de los compuestos G1-G3 aislados a partir de la Subfracción G mediante CLAR a nivel preparativo. _____	39
Tabla 6. Desplazamientos químicos en RMN- ¹ H de la 5,6-dihidro- α -pirona aislada (Brevipólida H) de <i>Hyptis brevipes</i> en CDCl ₃ (400 MHz). _____	42
Tabla 7. Desplazamientos químicos en RMN- ¹ H de la 5,6-dihidro- α -pirona aislada (Brevipólida P) de <i>Hyptis brevipes</i> en CDCl ₃ (400 MHz). _____	44
Tabla 8. Citotoxicidad del compuesto IV y compuesto G2 frente a diversas líneas celulares humanas. _____	45

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, la investigación química y farmacológica en el campo de la terapéutica se encuentra ampliamente dirigida hacia el descubrimiento de nuevos agentes citotóxicos a partir de productos naturales.

Sin embargo, el uso de los productos naturales por la humanidad se remonta miles de años atrás, conforme la especie humana se propagó, las distintas civilizaciones alrededor del mundo utilizaron plantas con propósitos medicinales. Su conocimiento ha persistido a través de los siglos, mediante escritos, registros, y tradiciones orales, los cuales, conforman la base de la medicina tradicional hoy en día. Esta valiosa información etnomédica ha contribuido al desarrollo de la medicina moderna pues antes del siglo XIX, era la única manera de tratar enfermedades. Se ha descrito que al menos el 12% de las plantas posee actividad biológica de valor farmacológico.¹

El género *Hyptis* (perteneciente a la familia *Lamiaceae* se encuentra conformado por aproximadamente 300 especies, variando desde pequeñas hierbas hasta grandes arbustos, las cuales se encuentran distribuidas en los trópicos y regiones cálidas alrededor del mundo.² Este género de plantas presenta una destacada relevancia etnofarmacológica la cual reside en su uso como planta medicinal sustentada con una larga historia tradicional, que se remonta a las antiguas culturas de Mesoamérica, incluyendo la civilización maya y azteca.³

Las preparaciones tradicionales consisten en infusiones, decocciones o maceraciones de las partes aéreas de las plantas, aunque también se documenta el empleo de las raíces, pero con menor frecuencia. Su uso tradicional es amplio y variado, siendo utilizada en el tratamiento de padecimientos que afectan al sistema respiratorio, problemas gastrointestinales, infecciones bacterianas, artritis, fiebre, dolor de cabeza así como para el tratamiento de algunas afecciones dermatológicas.³

Por otra parte, estudios científicos previos acerca de la composición química de diversas especies del género *Hyptis* han determinado la presencia de compuestos con actividad biológica tales como diterpenoides, flavonoides, lignanos y derivados de α -pironas.² Éstos últimos compuestos, se caracterizan por su marcada actividad citotóxica, al afectar la viabilidad de las células cancerígenas provenientes de diversas líneas tumorales.

2. ANTECEDENTES

Las plantas han sido utilizadas como medicinas por miles de años, en diversos preparados tales como cataplasmas, tinturas, polvos, infusiones y decocciones. La información concerniente a plantas medicinales fue reunida y registrada en códices. El aislamiento y la caracterización de compuestos farmacológicamente activos a partir de productos naturales es de gran relevancia en la actualidad, ya que constituyen una fuente importante de nuevos fármacos potenciales y de nuevas entidades químicas. Así, proveen un punto de partida para compuestos sintéticos ya que pueden presentar estructuras complejas y múltiples estereocentros difíciles de obtener de manera sintética.⁴ Aproximadamente el 22% de los medicamentos existentes entre el periodo de 1981 a 2010 consisten de derivados de productos naturales mientras que el 4% incluyen a productos naturales.⁵

El descubrimiento de compuestos activos a partir de productos naturales tiene un importante rol en el tratamiento de cáncer y muchas de las aplicaciones clínicas de compuestos obtenidos a partir de metabolitos secundarios de plantas han sido dirigidas para el combate del cáncer.⁴

Las plantas producen una amplia variedad de productos naturales, entre ellos, los metabolitos secundarios, constituyen moléculas activas importantes que difieren ampliamente en términos estructurales y propiedades biológicas. El origen de estos metabolitos puede ser explicado por un proceso de evolución de las plantas mediante selección y la adquisición de defensa contra insectos y microbios.⁶

Debido a su privilegiada posición geográfica, México presenta una amplia y diversa flora (con 21,841 especies conocidas y se estima que el total sea de alrededor de 30, 000 especies)⁷ derivado de los diferentes tipos de climas y ecosistemas presentes, de las cuales. Muchas de estas especies son utilizadas como plantas medicinales. La diversidad etnobotánica en México, basada en la interacción de la diversidad cultural y biológica, es muy grande.⁸

Una medida de la importancia de las plantas medicinales radica en su utilización directa por la gente a través del tiempo debido a su efectividad terapéutica y, ha servido como guía para la selección de muestras para análisis fitoquímicos y farmacológicos. El Códice Badiano y el Códice Florentino destacan importantes referencias documentales históricas acerca de las plantas medicinales del periodo colonial y muy probablemente reflejan el conocimiento anterior de los nativos a la llegada de los conquistadores. En dichos documentos se refleja la importancia y el uso que les otorgaban a las diversas plantas medicinales.⁸

2.1 Familia Lamiaceae

Las especies de la familia *Lamiaceae* destacan por su amplia distribución alrededor del mundo e incluyen especies como romero, salvia, lavanda, orégano, timo, entre otras.⁹ Son utilizados en medicina y como agentes de control de plagas.¹⁰ Además, muchas de las especies de esta familia se usan como remedios tradicionales, así como para la obtención de aceites esenciales e incluso con fines ornamentales y culinarios como especias y condimentos. También se ha reportado que varias de las especies de la familia *Lamiaceae* representan una fuente rica de

compuestos con actividad antioxidante y que podrían ser aplicadas en la prevención y terapia de padecimientos asociados a radicales libres, como cáncer, enfermedades de la piel, arterioesclerosis, enfermedades cardiovasculares y cataratas, entre otras.⁹

La familia *Lamiaceae* está constituida por 236 géneros y 7,173 especies. Presenta distribución subcosmopolita y es muy diversa en zonas templadas, particularmente en el Mediterráneo y la región central de Asia. Se encuentra distribuida en México en zonas preferentemente templadas, aunque géneros como *Hyptis* y *Asterohyptis* se desarrollan en climas cálidos (Figura 1). Se trata de una de las familias con mayor diversidad en el país, con 32 géneros nativos o naturalizados por un largo periodo, 17 géneros introducidos y/o cultivados y que a su vez pertenecen a cuatro subfamilias e incluyen 591 especies.⁹



Figura 1. Distribución de la Familia *Lamiaceae* en México.

2.2 Género *Hyptis*

La palabra *Hyptis*, proviene del griego Hypo, que significa 'abajo' debido a la posición del labio inferior de la corola. Dicho género está conformado por aproximadamente 280 especies, provenientes de América, las cuales son plantas anuales o perennes, siendo mayoritariamente herbáceas, otras arbustivas y en menor cantidad pequeños arboles. Son ligeramente aromáticas, con flores pequeñas de varios colores, sin dos bractéolas en la base del cáliz, hojas simples, ovadas a lanceoladas.⁹

En México se encuentran 35 especies de éste género (Figura 2), de las cuales 17 son endémicas, por lo que el porcentaje de endemismo es de 48.5 %, y se distribuyen principalmente en las partes tropicales del sur del país y a lo largo de ambas costas. Algunas de las especies son utilizadas con fines culinarios, obtención de aceite, madera y fibras.⁹

<i>Hyptis albida</i>	<i>Hyptis iodantha</i>	<i>Hyptis recurvata</i>
<i>Hyptis americana</i>	<i>Hyptis laniflora</i>	<i>Hyptis rhytidea</i>
<i>Hyptis anitae</i>	<i>Hyptis lantanifolia</i>	<i>Hyptis septentrionalis</i>
<i>Hyptis atrorubens</i>	<i>Hyptis macrocephala</i>	<i>Hyptis sinuata</i>
<i>Hyptis brevipes</i>	<i>Hyptis madrensis</i>	<i>Hyptis spicigera</i>
<i>Hyptis capitata</i>	<i>Hyptis mixta</i>	<i>Hyptis suaveolens</i>
<i>Hyptis collina</i>	<i>Hyptis mutabilis</i>	<i>Hyptis tephrodes</i>
<i>Hyptis conferta</i>	<i>Hyptis oblongifolia</i>	<i>Hyptis tomentosa</i>
<i>Hyptis decipiens</i>	<i>Hyptis pectinata</i>	<i>Hyptis urticoides</i>
<i>Hyptis emoryi</i>	<i>Hyptis pinetorum</i>	<i>Hyptis verticillata</i>
<i>Hyptis intermedia</i>	<i>Hyptis pseudolantana</i>	
<i>Hyptis involucrata</i>	<i>Hyptis pulegioides</i>	

Figura 2. Especies del género *Hyptis* en México.

Tabla 1. Especies representativas del género *Hyptis* en México y sus usos tradicionales.⁹

Especie	Usos tradicionales
<i>Hyptis albida</i>	Tratamiento de molestias gastrointestinales, dolor de oídos, tratamiento de dolor reumático, repelente de insectos.
<i>Hyptis mutabilis</i>	Tratamiento de padecimientos gastrointestinales, dolores estomacales, fiebre, propiedades carminativas.
<i>Hyptis pectinata</i>	Tratamiento de fiebre, afecciones dermatológicas, congestión pulmonar, reumatismo, rinofaringitis.
<i>Hyptis suaveolens</i>	Tratamiento de dolores estomacales, diarrea, parásitos gastrointestinales, padecimientos renales, fiebre.
<i>Hyptis verticillata</i>	Tratamiento de indigestión, dolores estomacales, cólicos, dolores de cabeza, infecciones en piel (heridas y picaduras de insectos)

El empleo de algunas especies de *Hyptis* se remonta a las civilizaciones mesoamericanas. En el manuscrito que data del siglo XVI “Historia Plantarum Novae Hispaniae” cuyo contenido trata de la herbolaria prehispánica, “huitsiquia” es mencionada como una planta medicinal efectiva para el tratamiento de la disentería y tumores. Las infecciones en los ojos, dolores y reumatismo se aliviaban con una decocción de esta hierba.⁸

Diversas especies pertenecientes al género *Hyptis* constituyen una importante fuente de componentes bioactivos, conocidos por su amplio rango de actividad antimicrobiana, insecticida y citotóxica.¹¹

Previos estudios han demostrado la actividad antimicrobiana de *Hyptis* frente a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas y antifúngica frente a *Candida albicans*.⁶ Por otra parte, también han demostrado actividad citotóxica frente a diversas líneas celulares derivadas de carcinomas humanos.¹²

2.2.1 Metabolitos secundarios del género *Hyptis*

De acuerdo a estudios previos los metabolitos secundarios de las plantas del género *Hyptis* incluyen triterpenoides, lignanos, flavonoides y derivados de 5,6-dihidro- α -pironas, los cuales se detallan a continuación.

2.2.1.1 Triterpenoides

Estos compuestos están constituidos por un esqueleto C₃₀, y son abundantes en la naturaleza, particularmente en resinas, y puede presentarse como ésteres o glicósidos.¹³ Se han hallado derivados de triterpenoides en *Hyptis albida*.¹⁴

2.2.1.2 Lignanos

Los lignanos están conformados por un grupo de compuestos formados por la condensación de unidades de fenilpropano¹⁵, cuya estructura está determinada esencialmente por la unión entre los carbonos β de las cadenas laterales de dos unidades derivadas de 1-fenilpropano.¹⁶ El uso de plantas ricas en derivados de lignanos data de aproximadamente mil años por diversas culturas incluyendo a los nativos del Himalaya, indios americanos, japoneses y chinos, con variados fines como agentes catárticos, purgante, antihelmíntico, antirreumático, entre otros. Tienen un importante rol en la regulación del crecimiento de las plantas así como

mecanismo de defensa frente a ataques fúngicos e insectos.¹⁷ Se ha reportado la presencia de derivados de lignanos en *Hyptis capitata*¹⁸, *Hyptis verticillata*¹⁹ e *Hyptis tomentosa*.²⁰

2.2.1.3 Flavonoides

Los flavonoides son una familia muy diversa de compuestos y se trata del grupo más grande de compuestos fenólicos de origen natural. Tienen una presencia amplia en plantas, y son responsables de la coloración de flores, frutas y en ocasiones, hojas.¹⁶ Presentan un esqueleto C₆-C₃-C₆, con dos anillos bencénicos unidos por tres átomos de carbono y en la mayoría de los casos por un átomo de oxígeno (Figura 3). La biosíntesis de los flavonoides, resulta de la condensación de tres unidades de acetato (vía malonil-CoA) y ácido hidroxilcinámico¹⁶ (vía ácido siquímico).²¹ Las flavonas y sus derivados generalmente tienen una coloración amarilla.¹³ Son importantes en el crecimiento y maduración de la planta, y participan en el mecanismo de defensa contra bacterias.²¹

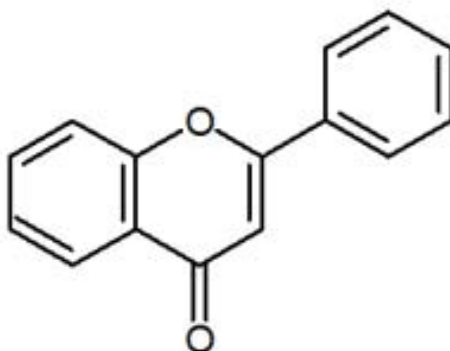


Figura 3. Estructura química de la flavona.

Algunos flavonoides se caracterizan por su actividad antiinflamatoria y por su capacidad de disminuir la fragilidad y permeabilidad capilar.¹⁶ Algunos de ellos poseen propiedades antibacteriales y antifúngicas.¹⁵

Se conoce la presencia de flavonoides en *Hyptis brevipes*², *Hyptis suaveolens*²² e *Hyptis spicigera*.²³ De la especie *Hyptis albida* se han encontrado cinco flavonoides.¹⁴

2.2.1.4 Derivados de 5,6-dihidro- α -pironas

Las 5,6-dihidro- α -pironas son compuestos con anillo δ -lactona- α,β -insaturado (Figura 4) con un grupo sustituyente de tipo alquilo, alquenilo o arilo en la posición C-6, y pueden presentar sustituciones en el anillo. Tienen una distribución amplia en plantas, hongos y bacterias. Por lo general estos compuestos tienen actividad biológica, como antimicrobiana y citotóxica contra diversas líneas de células tumorales.²⁴

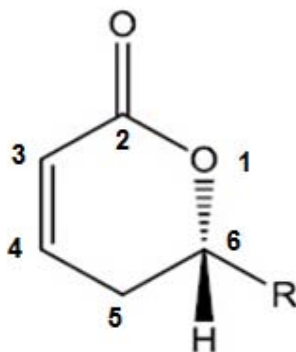


Figura 4. Estructura de δ -lactona- α,β -insaturado.

Se ha reportado la presencia de derivados de 5, 6-dihidro- α -pironas de diversas especies de *Hyptis*. Se ha encontrado que dichos metabolitos generalmente presentan una sustitución hidroxilo o acetoxilo y pueden ser agrupadas en dos

categorías: aquellas que presentan una epoxidación y las que no están epoxidadas en el lado de la cadena del núcleo de la α -pirona.²⁴

Las propiedades de estos compuestos se encuentran asociadas al poder alquilante del núcleo de la δ -lactona- α,β -insaturado, la cual es la unidad estructural análoga al grupo farmacofórico de la pironetina.²⁴

La pironetina (Figura 5) es un potente inhibidor del ensamblaje de tubulina y detiene la progresión del ciclo celular en la Fase-M y se trata del primer compuesto que se une covalentemente a la α -tubulina (el sitio de unión es la Lys352).²⁴ Fue aislado a partir del caldo de cultivo de *Streptomyces sp.* Como un regulador del crecimiento de la planta que inducía el acortamiento de la altura de la planta de arroz. Ha demostrado una potente actividad supresora en la blastogénesis de células T y B, así como ha demostrado actividad antitumoral. Tales características de la pironetina, las cuales difieren de otros agentes que se unen a la tubulina, podrían convertirla en un compuesto líder para el desarrollo de fármacos para terapias de cáncer.²⁴

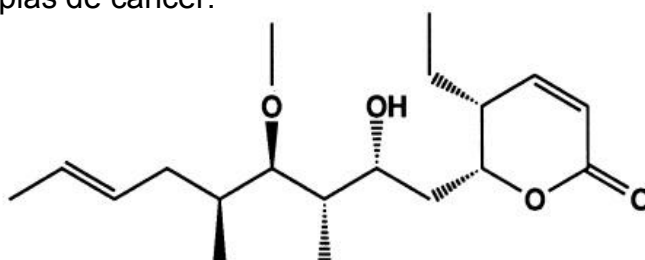


Figura 5. Estructura química de la pironetina.

Tales derivados de 5, 6-dihidro- α -pironas se han aislado a partir de *Hyptis brevipes*², *Hyptis oblongifolia*²⁷ *Hyptis pectinata*²⁸ e *Hyptis spicigera*.²⁹

2.3 *Hyptis brevipes*

Es una especie nativa de América, distribuida en regiones de clima tropical, como el sureste de México, Guatemala, Costa Rica, Panamá, Honduras y América del Sur³⁰. También se encuentra distribuida en otras regiones tropicales del mundo como especie invasiva. Se distribuye de manera secundaria en Burma, Tailandia, Islas Filipinas, Taiwan y Vietnam. En México tiene una distribución registrada en Chiapas, Tabasco y Veracruz (Figura 6). Puede encontrarse a lo largo de veredas en bosques, áreas perturbadas abiertas y áreas cultivadas, consideradas como malezas en cultivos de plantación y arroz.³¹

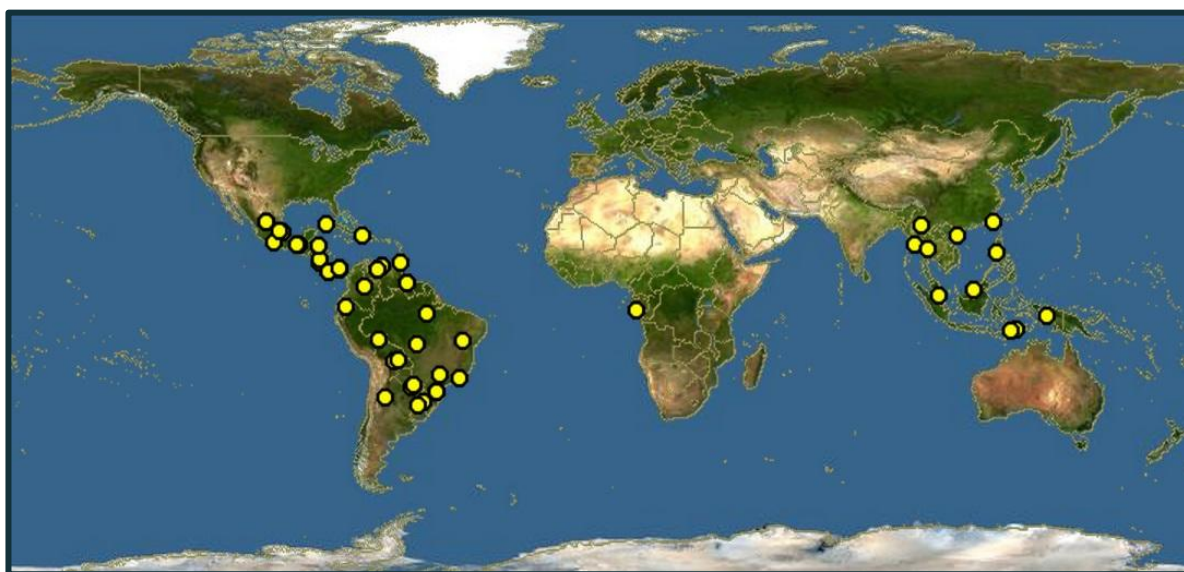


Figura 6. Distribución de *Hyptis brevipes* en el mundo

Las plantas usualmente miden 30-60 cm pero pueden alcanzar un tamaño de hasta 1.5 m de alto, con tallo ramificado y pelos antrorsos. Las hojas son ovado-lanceoladas o elíptico-lanceoladas con tamaño variando de 15-80 mm por 5-22 mm, ápice acuminado y pelo blanco en ambos lados; la inflorescencia está compuesta por cabezuelas en las axilas de las hojas. Las flores tienen cáliz con forma de embudo de coloración blanca a morado-blanquecina. Las semillas son

de color café oscuro o negro, oblongas, de 0.5 a 0.8 mm de largo, lisas o poco estriadas.³⁰ Estudios biológicos en los extractos crudos de ésta planta han mostrado actividad inhibitoria contra el crecimiento fúngico y bacteriano.²

Entre los distintos usos de *Hyptis brevipes* en la medicina tradicional se encuentra el tratamiento de asma, malaria, conservación de cereales y como repelente de mosquitos.³²



Figura 7. Morfología de la especie *Hyptis brevipes*.

2.3.1 Derivados de 5, 6-dihidro- α -pironas de *Hyptis brevipes*

De la especie *Hyptis brevipes* se han caracterizado diversas 6-alkil-5,6-dihidro- α -pironas, nombradas brevipólidas (Figura 8), las cuales pueden presentar un anillo de ciclopropano o un anillo de tetrahydrofurano. Dichas brevipólidas desarrollaron una citotoxicidad moderada en contra de la línea celular de carcinoma nasofaríngeo KB (IC₅₀ 0.3-8.0 μ g/mL).³³

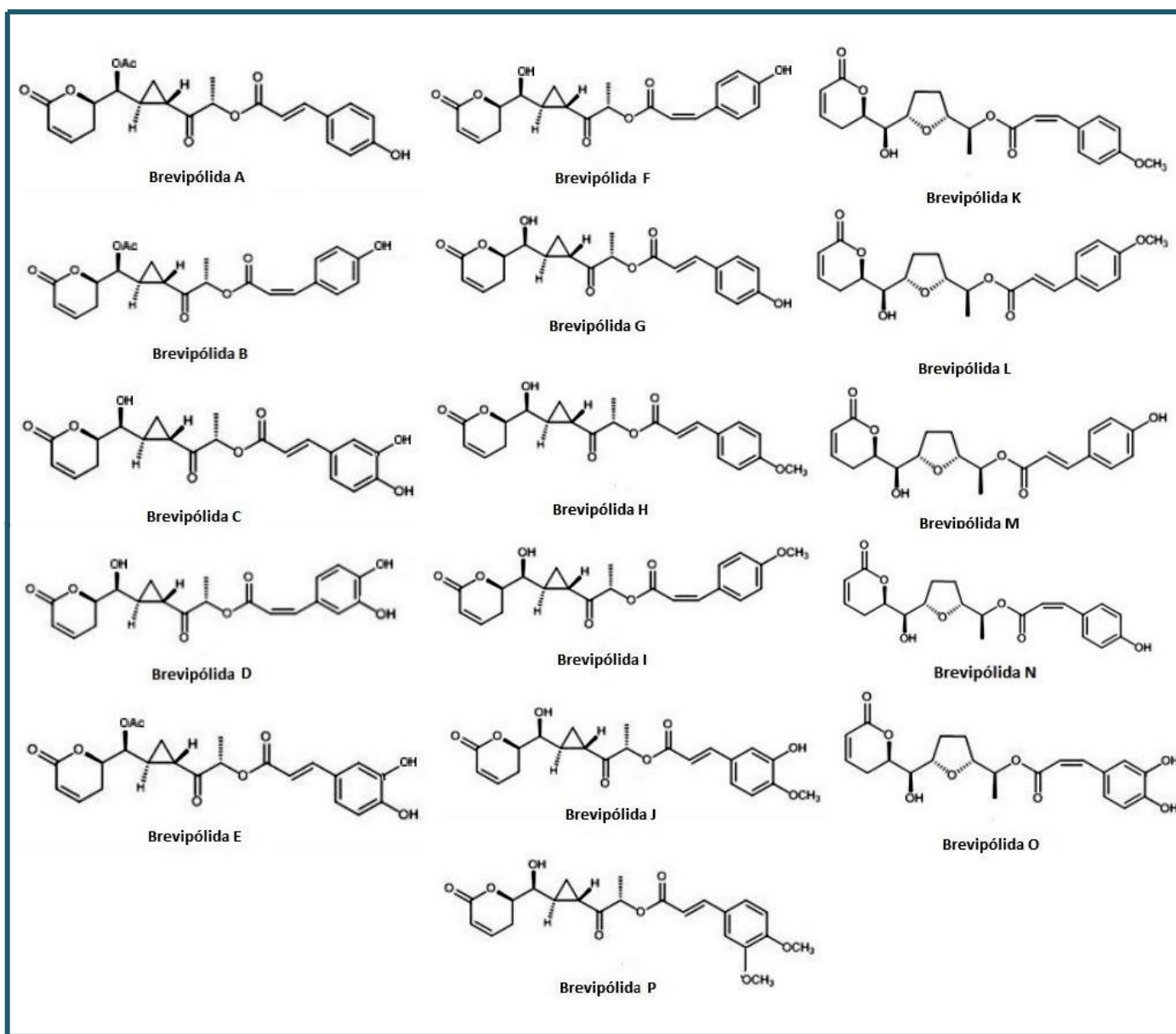


Figura 8. Brevipólidas aisladas de *Hyptis brevipes*.^{2,24,33,34}

3. HIPÓTESIS

De acuerdo con los antecedentes etnobotánicos, la información acerca del uso medicinal y la investigación científica previa que demuestra la relevancia y la presencia de compuestos de interés en especies del género *Hyptis*, se sustenta su estudio químico con la aplicación de técnicas cromatográficas adecuadas y otros procedimientos de separación, con lo cual, será posible el aislamiento de metabolitos secundarios con actividad biológica a partir del material vegetal de *Hyptis brevipes*.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

- ❖ Aislar e identificar los metabolitos secundarios a partir de una nueva recolecta del material vegetal de *Hyptis brevipes* mediante la aplicación de técnicas apropiadas de extracción y fraccionamiento.

4.2 Objetivos Específicos

- Obtener el extracto total de una colecta de *Hyptis brevipes* mediante maceración.
- Realizar el fraccionamiento primario y fraccionamiento secundario del extracto total obtenido utilizando un proceso de reparto y cromatografía en columna, respectivamente.
- Aislar los compuestos químicos de interés haciendo uso de la cromatografía de líquidos de alta resolución.
- Elucidar la estructura molecular de los compuestos obtenidos a través de diversos análisis espectrométricos.
- Realizar la evaluación citotóxica de los compuestos químicos aislados en diversas líneas celulares humanas mediante el ensayo de sulforodamina.

5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

5.1 Material vegetal

Se utilizaron las partes aéreas de una colecta de *Hyptis brevipes* que fue recolectada en la Carretera Federal 125 en el municipio de Angostillo, Veracruz, México el 8 de enero de 2013. La identificación y la recolección del material vegetal fue realizado por la bióloga Adriana Hernández Rojas. Un ejemplar de la especie fue depositado en el Herbario del Instituto de Ecología en Xalapa, Veracruz con el número de voucher XAL0001395.

5.2. Extracción del material vegetal

El material vegetal seco y molido (883 g) se maceró exhaustivamente con diclorometano a temperatura ambiente. El proceso se repitió cinco veces a intervalos de 48 h. Al término de cada extracción, el macerado se filtró y se concentró a sequedad por presión reducida. Se obtuvieron 41.0 g de extracto total.

5.3. Fraccionamiento primario del extracto de diclorometano.

A partir del extracto total seco, se llevó a cabo el fraccionamiento primario (Figura 9) mediante un proceso de reparto, el cual además de permitir la separación del extracto favorece la eliminación de triterpenos como componentes no deseados. El proceso consistió en la solubilización de 2 g de extracto total en 75 mL de hexano durante 30 minutos con agitación magnética, seguido de una extracción por triplicado con MeOH: H₂O (4:1), obteniendo así dos fracciones (hexánica y

MeOH: H₂O). La fase polar se concentró a aproximadamente una quinta parte del volumen obtenido y se realizó una segunda extracción por triplicado con acetato de etilo, para finalmente llevar a sequedad. Este proceso se realizó hasta agotar el extracto total.

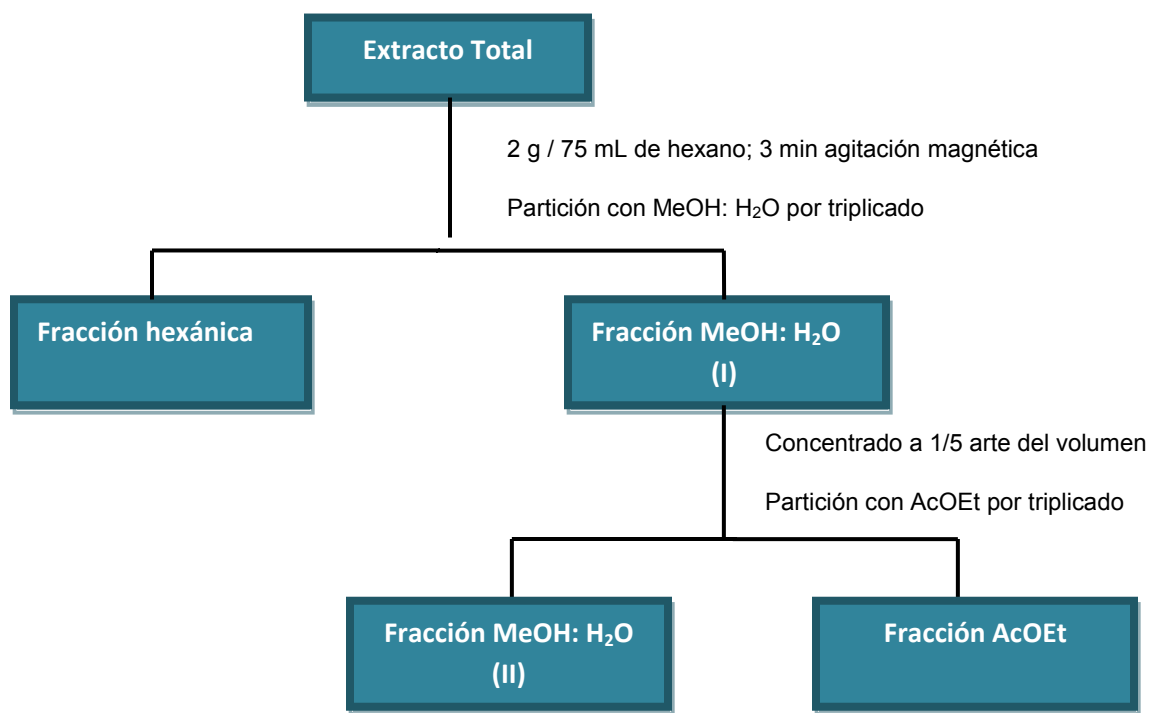


Figura 9. Metodología general del fraccionamiento primario.

5.4. Técnicas cromatográficas

Se emplearon diversas técnicas cromatográficas a lo largo del proyecto para lograr la separación y el aislamiento de los compuestos.

5.4.1 Cromatografía en capa fina

Las fracciones obtenidas fueron sometidas a una técnica de CCF, en placas de aluminio con gel de sílice 60 F₂₅₄ y para detectar la presencia de compuestos de interés, se utilizó una cámara con lámpara de UV a dos diferentes longitudes de onda (254 nm y 365 nm); posteriormente se revelaron con una solución cromógena de sulfato cérico-H₂SO₄.

5.4.2. Cromatografía en columna

La cromatografía en columna abierta se utilizó para conseguir un fraccionamiento secundario de la fracción elegida de acuerdo a los resultados obtenidos en CCF y RMN-¹H. Se empleó como fase estacionaria gel de sílice 60 (tamaño de partícula 0.063-0.2 mm) y como fase móvil se utilizó inicialmente hexano y se fue incrementando la polaridad de manera gradual con acetona en diferentes proporciones para finalizar con metanol (tabla 3). Se monitoreó con CCF con dos propósitos, para determinar la presencia de compuestos de interés con absorbancia al UV de 254 nm, así como para reunir las fracciones similares.

Tabla 2. Gradiente de elución utilizado en el fraccionamiento secundario en CC de la fracción AcOEt de *Hyptis brevipes*.

Fase móvil	Proporción
Hexano	100
Hexano: Me ₂ CO	90:10
	80:20
	70:30
	60:40
	50:50
	40:60
	30:70
	20:80
	10:90
	Me ₂ CO:MeOH
50:50	
MeOH	100

5.4.3. Cromatografía de líquidos de alta resolución

Se utilizó un equipo cromatográfico de la marca comercial Waters (Millipore Corporation, Waters Chromatography Division Milford, MA, EE. UU.) equipado con una bomba modelo 515, un detector de absorbancia dual modelo 2487 acoplados a un equipo de cómputo (OptiPlex GX280, Dell). El control del equipo, la adquisición de datos, el proceso y el manejo de la información cromatográfica se hizo a través de un software Empower v 2 (Waters).

5.4.3.1 CLAR a nivel analítico

Se eligió la fracción de AcOEt que de acuerdo a los resultados obtenidos presentan a los compuestos de interés. Se determinó a nivel analítico las condiciones que permitieran la mejor resolución de los picos en el cromatograma correspondiente a los compuestos presentes en la fracción elegida.

Condiciones utilizadas en CLAR a nivel analítico

Detector: UV, $\lambda=254$ nm, $\lambda=280$ nm

Fase estacionaria: Columna Symmetry C-18 (4.6 x 250 mm) Tamaño de partícula: 5 μ m

Fase móvil: CH₃CN: H₂O (4:6)

Flujo: 0.4 mL/min

Volumen de inyección: 10 μ L

Concentración de la muestra: 1 mg/10 μ L

5.4.3.2. CLAR a nivel preparativo

Una vez determinadas las condiciones adecuadas, se escaló a nivel preparativo para la separación y aislamiento de los compuestos presentes en la fracción de interés de modo que también se obtuvieran cantidades suficientes de compuestos separados. Se realizó el aislamiento de los compuestos presentes en la fracción AcOEt a través de inyecciones a nivel preparativo en las siguientes condiciones:

Condiciones utilizadas en CLAR a nivel preparativo

Detector: UV, $\lambda = 254 \text{ nm}$, $\lambda = 280 \text{ nm}$

Fase estacionaria: Columna Symmetry C-18 (19 x 300 mm). Tamaño de partícula: 7 μm

Fase móvil: CH₃CN: H₂O (4:6)

Flujo: 6 mL/min

Volumen de inyección: 500 μL

Concentración de la muestra: 100 mg/1 mL

5.5 Elucidación de la Estructura Molecular

Se realizó el análisis para identificar la estructura molecular de los compuestos obtenidos mediante la técnica espectroscópica estructural RMN-¹H. Se utilizó CDCl₃ como disolvente para la realización de los análisis. Los desplazamientos químicos están expresados en ppm y se registraron a 400 MHz.

5.6 Evaluación de la Citotoxicidad

5.6.1. Preparación de controles

- Se pesó 1 mg de vinblastina o colchicina y se disolvieron en 250 μL de DMSO.
- Se realizaron las diluciones que permitirán tener concentraciones de 10 a 0.00064 $\mu\text{g/mL}$.

5.6.2. Preparación de muestras

- Se pesó 1 mg del extracto y se disolvieron en 250 μ L de DMSO.
- Se realizaron diluciones subsecuentes para obtener las concentraciones de 20, 4, 0.8 y 0.16 μ g/mL.

5.6.3 Ensayo de citotoxicidad

El método fue desarrollado por Skehan y colaboradores³⁵ y consiste en la unión del colorante rojo ácido 52, también llamado sulforodamina, a los aminoácidos básicos de las proteínas celulares de una capa celular fijada en una microplaca. La cuantificación de la densidad óptica del colorante a 540 nm ayuda a estimar el total de la masa proteica, la cual está relacionada al número de células viables después de adicionar un material citotóxico de prueba, comparado con un grupo control positivo (células en contacto con compuestos químicos ensayados y causales de muerte celular, como vinblastina y colchicina) y un grupo control blanco (células a las cuales no se les adicionó material citotóxico). El procedimiento utilizado se indica a continuación.

- Las células se utilizaron cuando se observó en las cajas un 60-70 % de confluencia.
- Se cambió el medio 24 h antes del ensayo.
- Se siguió el procedimiento de mantenimiento de células.
- Se calculó la cantidad de suspensión celular requerida para tener entre 3-5 $\times 10^4$ cel/mL.
- Se mezclaron 190 μ L de suspensión celular en las cajas de 96 pozos que previamente contenían 10 μ L de controles y muestras de prueba por triplicado, homogenizando posteriormente.
- Se incubaron a 37 °C por 72 horas.
- Se fijaron las células y se realizó el desarrollo de color para proceder a leer a 540 nm.

5.6.4. Determinación de la CI₅₀

- Se promediaron los valores obtenidos a las diferentes concentraciones.
- Se determinó el porcentaje de crecimiento a través de la siguiente ecuación.

$$\% \text{ crecimiento} = \frac{\text{D.O. células + muestra} - \text{D.O. células día cero}}{\text{D.O. células + DMSO 10\%} - \text{D.O. células día cero}} \times 100$$

- Se realizó un análisis de regresión lineal, graficando el % de crecimiento contra la concentración, empleando el programa TableCurve 2D v 5.0 (2003) de la compañía Systat.

5.6.5. Criterios de actividad

Se consideraron activos los extractos que presentaron una CI₅₀ ≤ 20 µg/mL.

6. RESULTADOS

6.1 Obtención del extracto y fraccionamiento primario

El material vegetal de *Hyptis brevipes* (883.5 g) se sometió a maceración con CH_2Cl_2 y se obtuvieron 41.2 g de extracto.

El extracto de diclorometano se sometió a un fraccionamiento primario, se obtuvieron tres fracciones primarias cuyos rendimientos se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Cantidades obtenidas a partir del fraccionamiento primario.

Fracción	Cantidad obtenida (g)
Hexánica	18.35
AcOEt	6.92
MeOH-H ₂ O	2.16

De acuerdo a los resultados de RMN-¹H para cada una de ellas, se eligió continuar con la fracción AcOEt, cuyo espectro de RMN-¹H se presenta en la Figura 10.

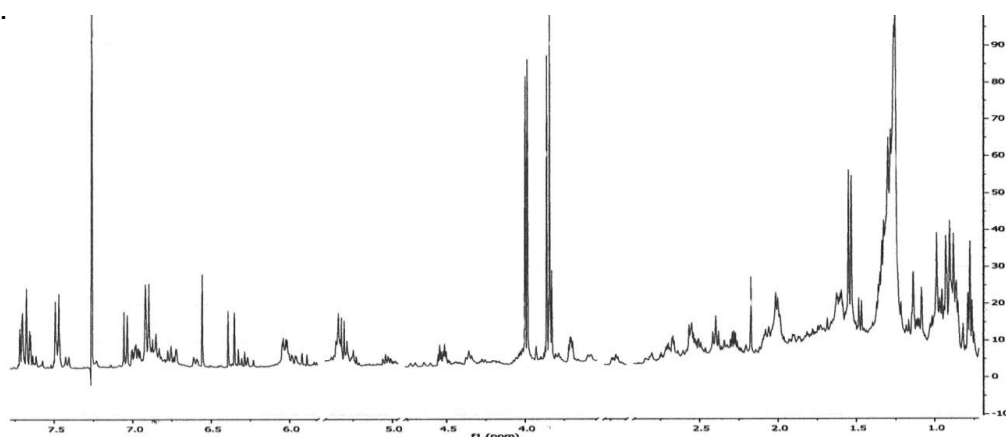


Figura 10. Espectro RMN-¹H de la fracción de AcOEt.

6. 2 Aislamiento de los compuestos I-IV

Para lograr el aislamiento de los compuestos de interés de la fracción AcOEt se utilizó CLAR a nivel preparativo.

6.2.1 Separación por CLAR a nivel preparativo

En la Figura 11 se presenta el perfil cromatográfico de la fracción de AcOEt, obtenido de acuerdo las condiciones indicadas en la sección 5.4.3.2 (CLAR a nivel preparativo). Un total de 5.80 g de la fracción fue separado por esta técnica, mediante la inyección de 50 mg/ 500 μ L. Se realizó el aislamiento de cuatro picos identificados como I, II, III y IV (Figura 11) con t_R de 11.46 min, 16.12 min, 49.65 min y 53.20 min, respectivamente.

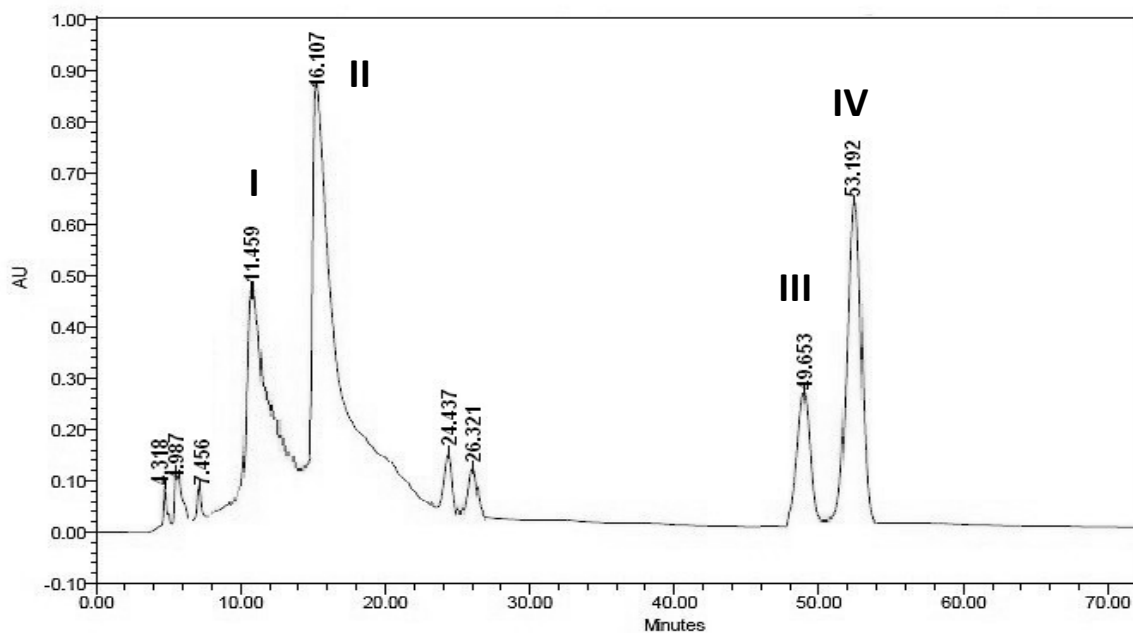


Figura 11. Cromatograma de líquidos a nivel analítico de la fracción AcOEt

6.2.2 Fraccionamiento por CLAR de los compuestos I-IV

Se logró la purificación de cada uno de los compuestos anteriores mediante la reinyección de éstos en el CLAR a nivel preparativo (Figuras 12 a 15).

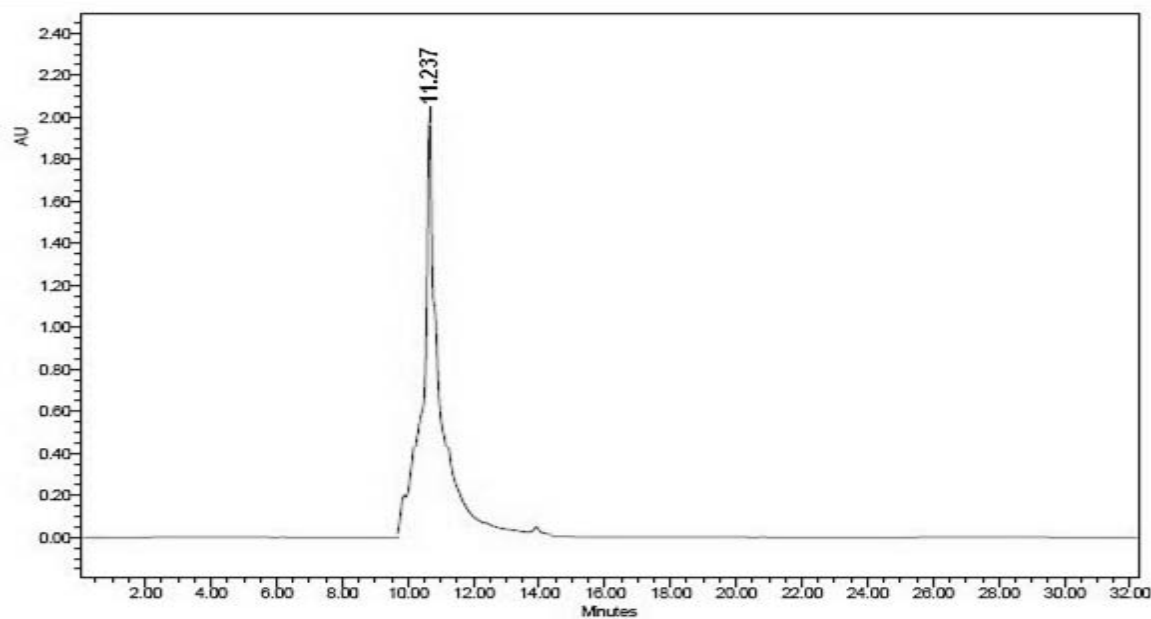


Figura 12. Cromatograma a nivel analítico del fraccionamiento del pico I.

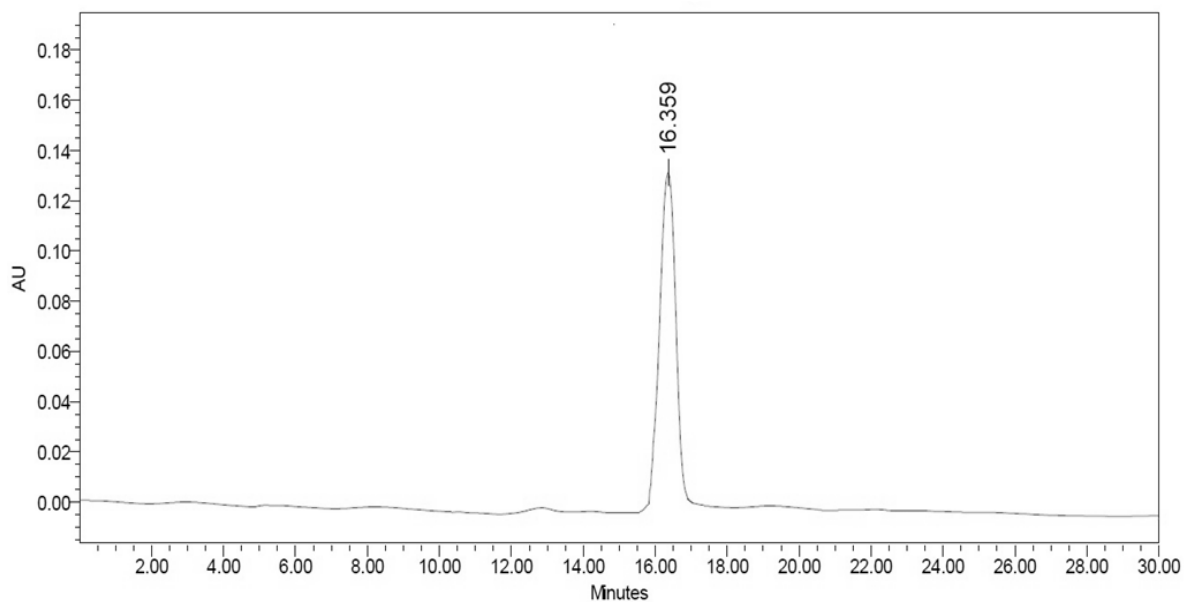


Figura 13. Cromatograma a nivel analítico del fraccionamiento del pico II.

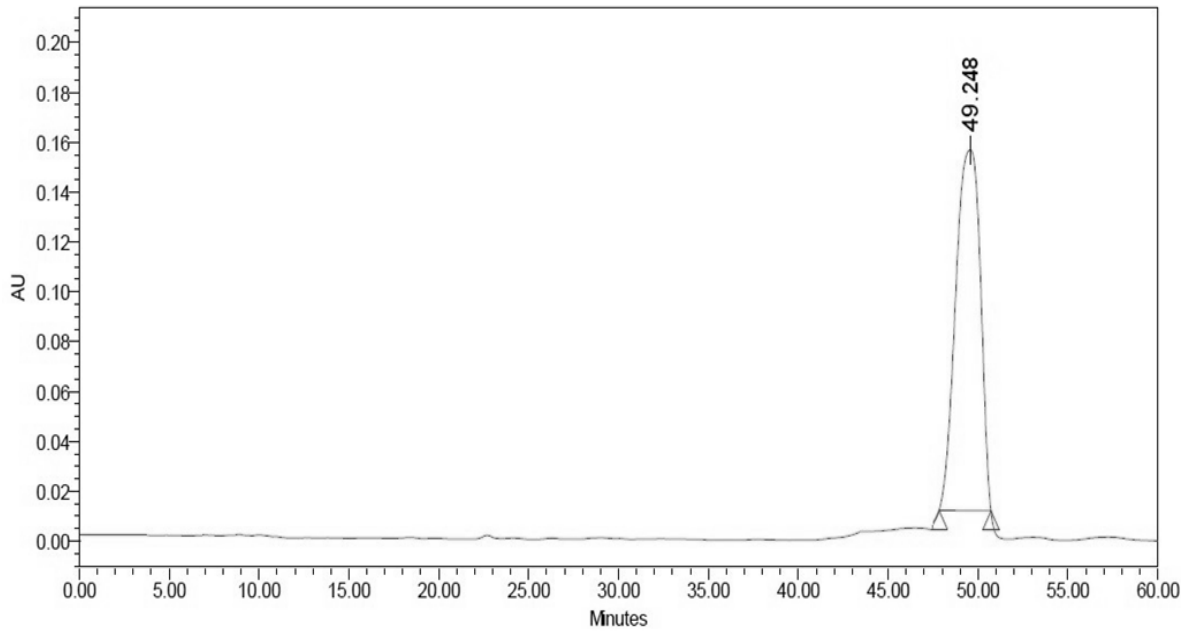


Figura 14. Cromatograma a nivel analítico del fraccionamiento del pico III

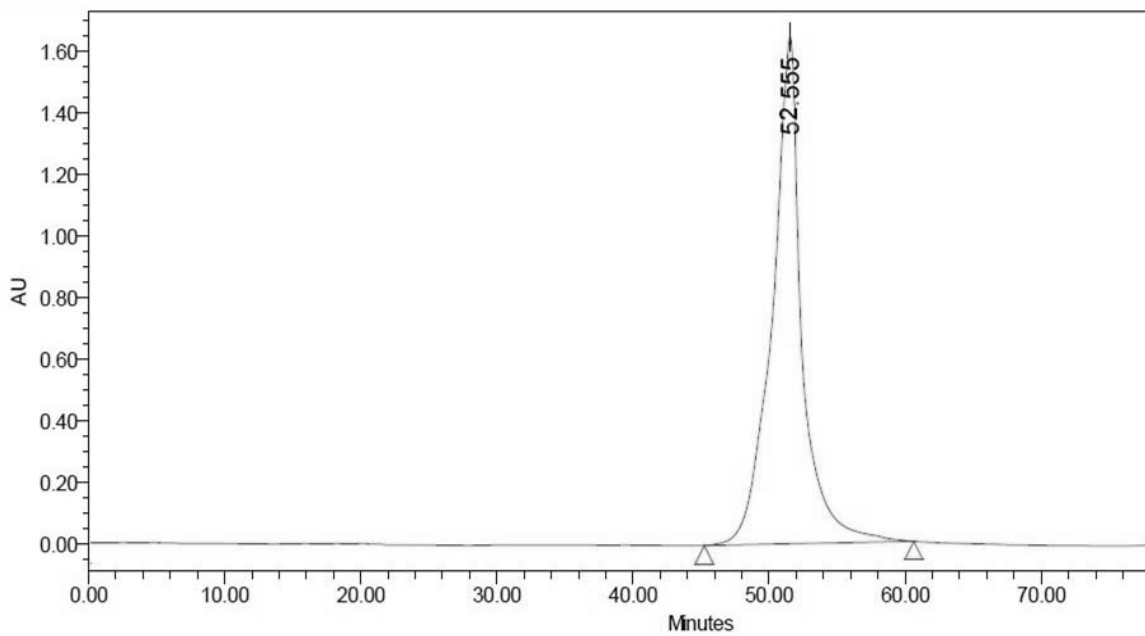


Figura 15. Cromatograma a nivel analítico del fraccionamiento del pico IV.

Se logró obtener en cantidades suficientes el compuesto del pico IV para llevar a cabo la purificación utilizando la técnica de rasurado de pico y reciclaje, el cual es presentado en la Figura 16.

La separación y aislamiento de los compuestos presente en el pico IV se realizó de manera satisfactorio. Sin embargo, durante la purificación del resto de los picos mediante la técnica de reciclaje utilizando CLAR, se obtuvieron rendimientos muy bajos, debido a que existió una pérdida consecutiva de cantidades significativas de muestra debido a una falla técnica del sistema de la válvula de reciclaje del equipo.

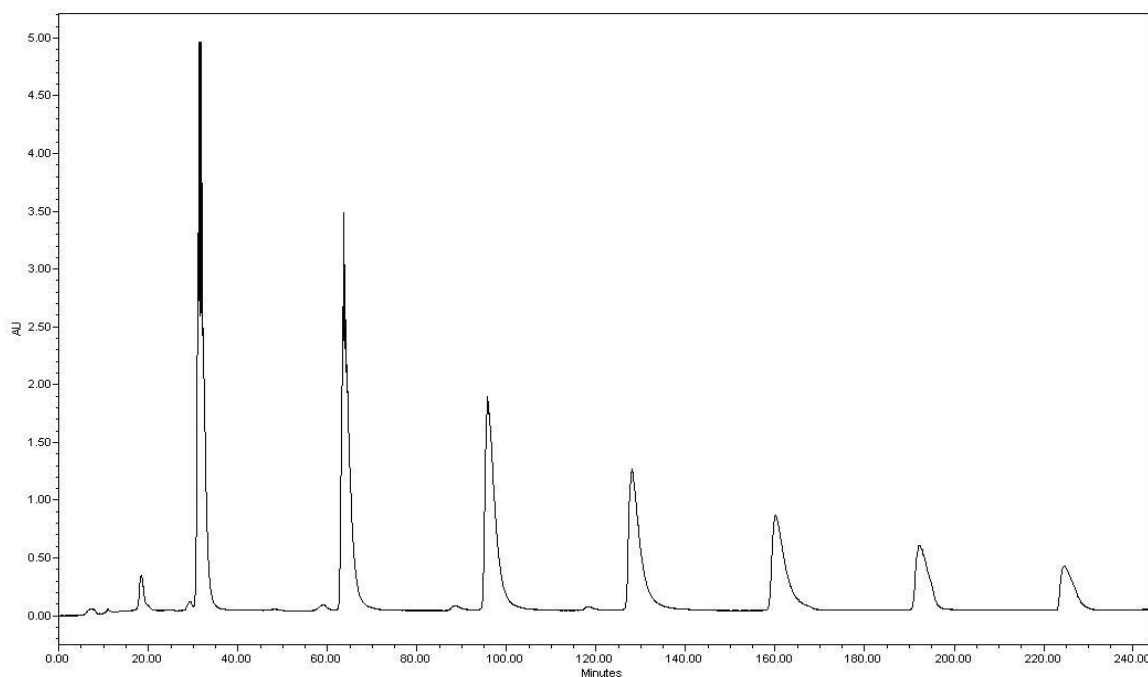
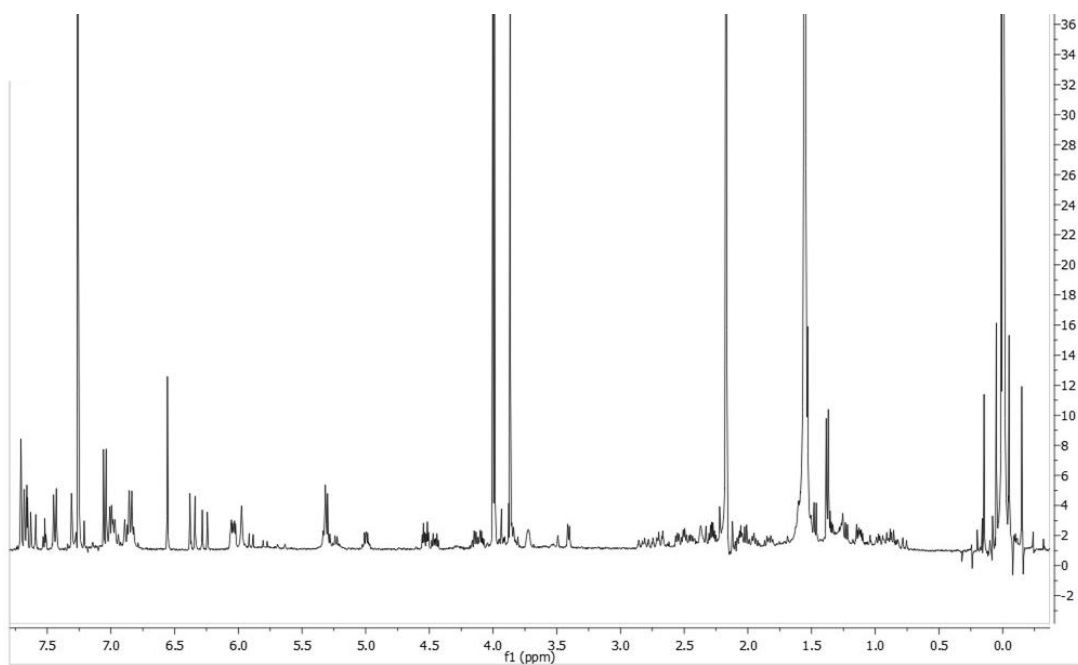
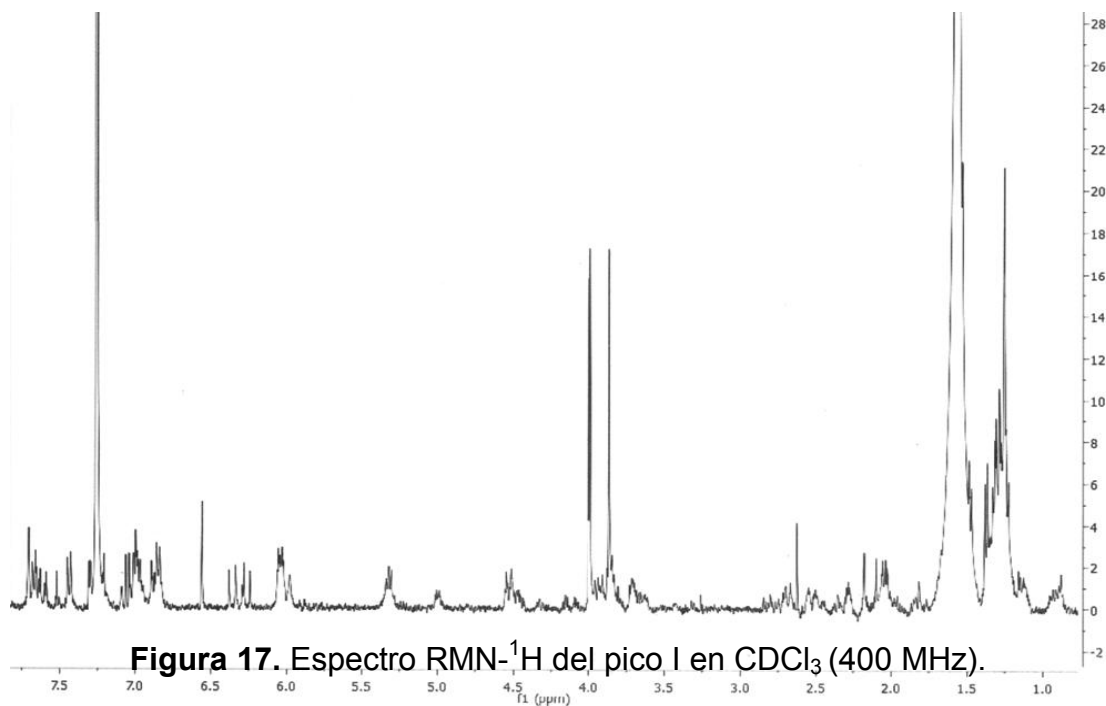


Figura 16. Cromatograma a nivel preparativo de la purificación del pico IV, a través de la técnica de rasurado de pico y reciclaje de muestra en CLAR (Fase móvil: AcCN: H₂O, 1:1).

6.2.3 RMN-¹H de los compuestos I-IV

En las figuras 17-20 se presenta el espectro de RMN-¹H de los picos I-IV.



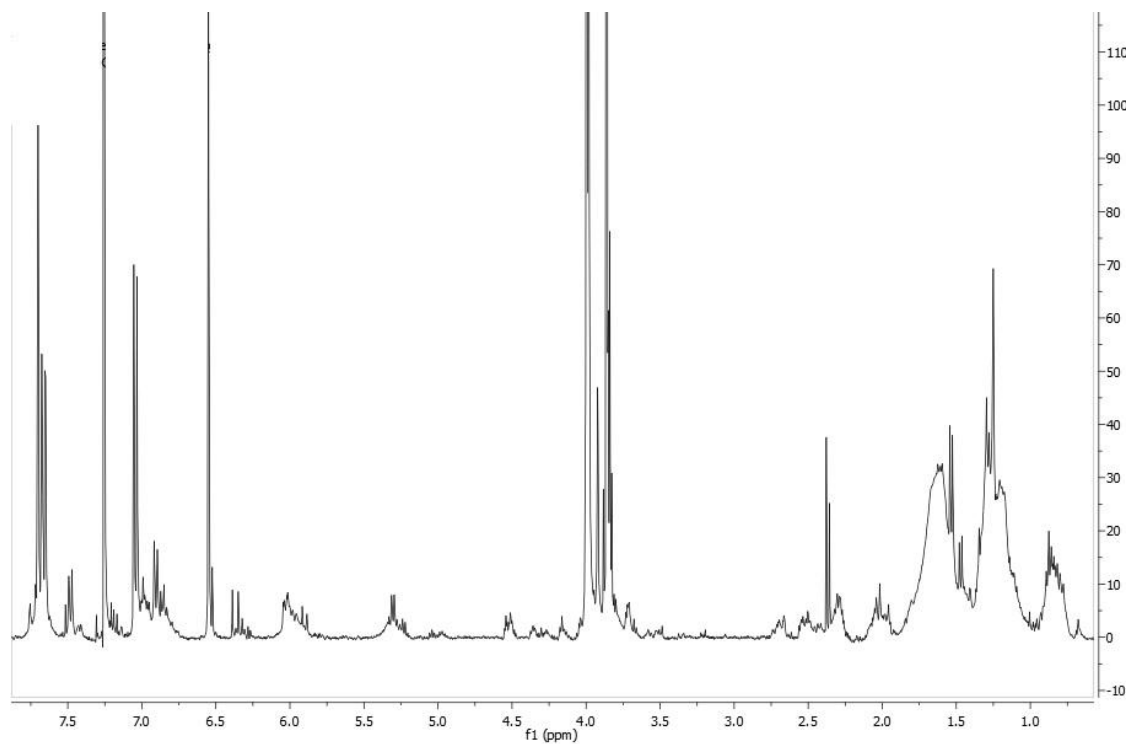


Figura 19. Espectro RMN-¹H del pico III en CDCl₃ (400 MHz).

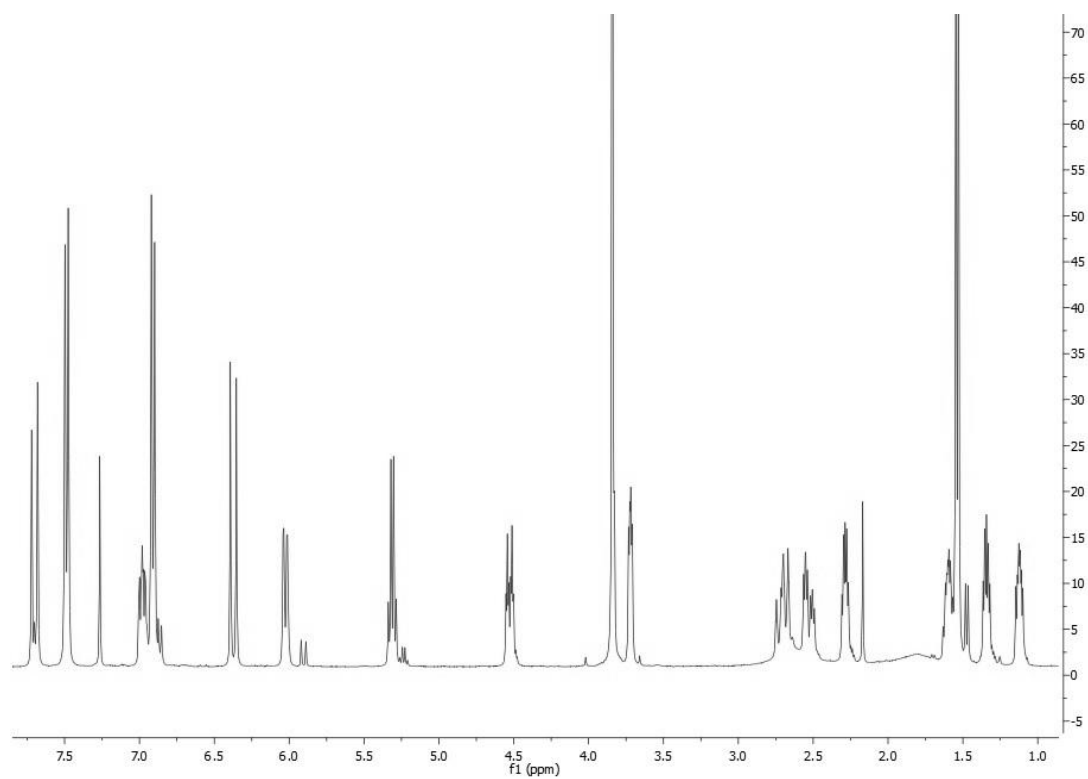


Figura 20. Espectro RMN-¹H del pico IV en CDCl₃ (400 MHz).

6. 3 Aislamiento de los compuestos G1- G3

6.3.1 Fraccionamiento secundario por cromatografía en columna

Se decidió realizar el fraccionamiento secundario por cromatografía en columna abierta de la fracción de AcOEt remanente (0.85 g de muestra) con la finalidad de obtener en cantidad suficiente el compuesto del pico I, un derivado de 5,6-dihidro- α -pirona³⁴ para su caracterización adecuada. El fraccionamiento secundario se realizó de acuerdo a lo indicado en la Tabla 7. De las 100 fracciones eluidas, se obtuvieron trece subfracciones a reunidas de acuerdo a su similitud al ser analizadas por la técnica de CCF, utilizando como sistema de elución hexano: AcOEt (3:2) y la posterior visualización en lámpara UV a onda corta 254 nm y onda larga 365 nm.

6.3.2 Perfil cromatográfico de las Subfracciones A-H

En las figuras 21-28 se presentan los correspondientes cromatogramas a nivel preparativo de las subfracciones A-H

Tabla 4. Fraccionamiento secundario de la fracción de AcOEt de *Hyptis brevipes*.

Fase móvil	Proporción	Fracciones combinadas	Cantidad (mg)	Clave
Hexano	100	F 1	-	-
Hexano: Me ₂ CO	90:10	F2-F7	31.5	A
	80:20	F8-F27	174.2	B
	70:30	F28-F50	257.7	C
	60:40	F51-F55	47.3	D
	50:50	F56-F60	38.1	E
	40:60	F61-F64	38.9	F
	30:70	F65-F70	161.1	G
20:80	F71-F74			
Me ₂ CO:MeOH	10:90	F75-F79		
	70:30	F80-F88		
	50:50	F89-F95		
MeOH	100	F96-F100	17.3	H

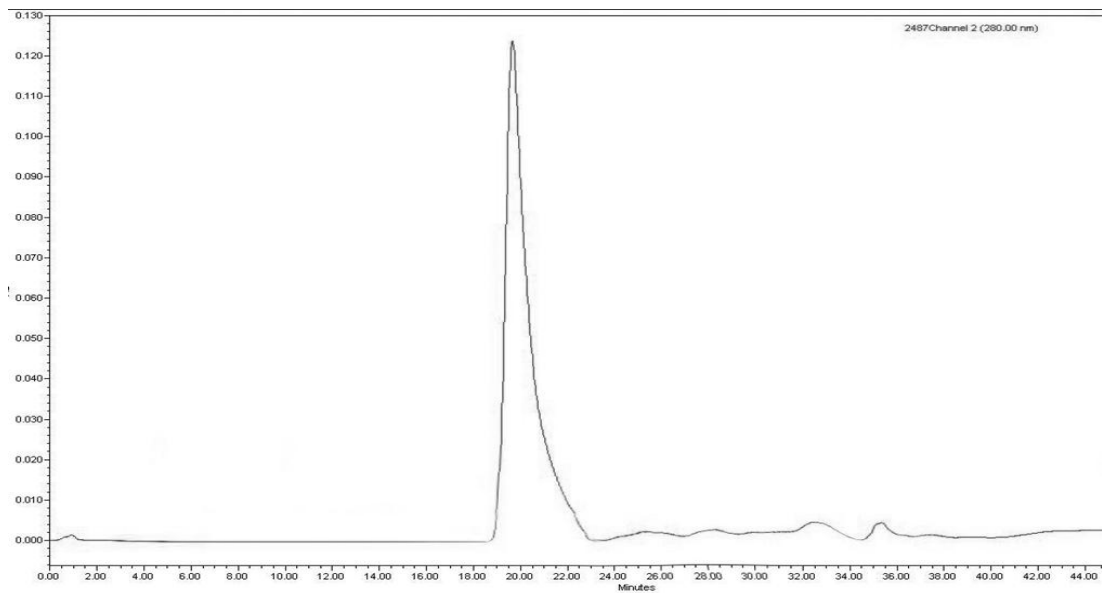


Figura 21. Cromatograma de líquidos a nivel preparativo de la subfracción A.

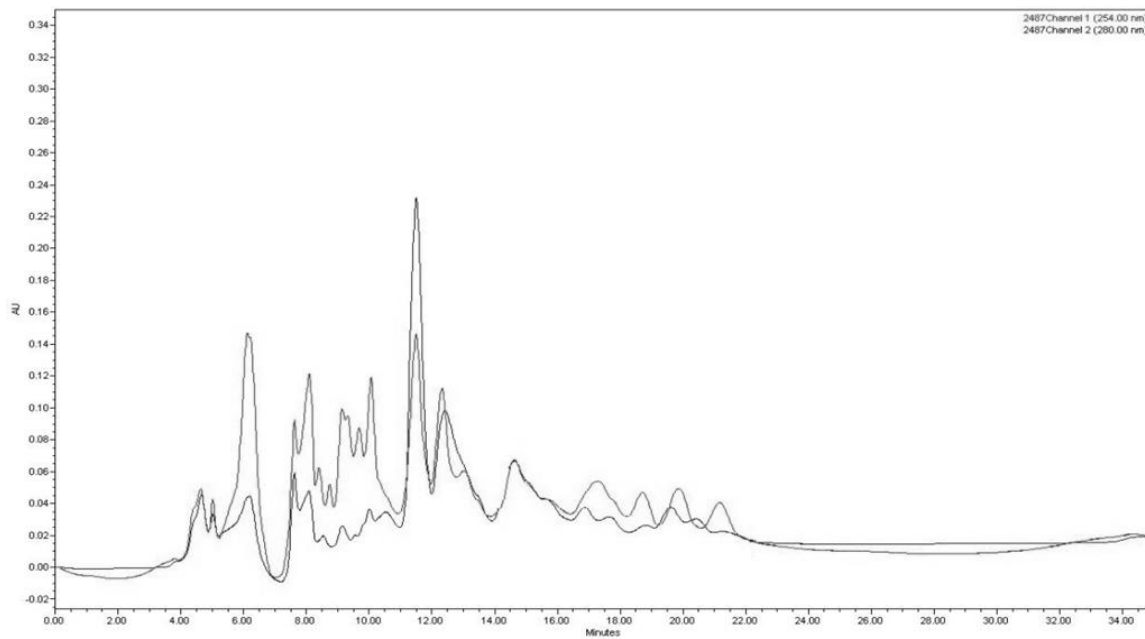


Figura 22. Cromatograma de líquidos a nivel preparativo de la subfracción B.

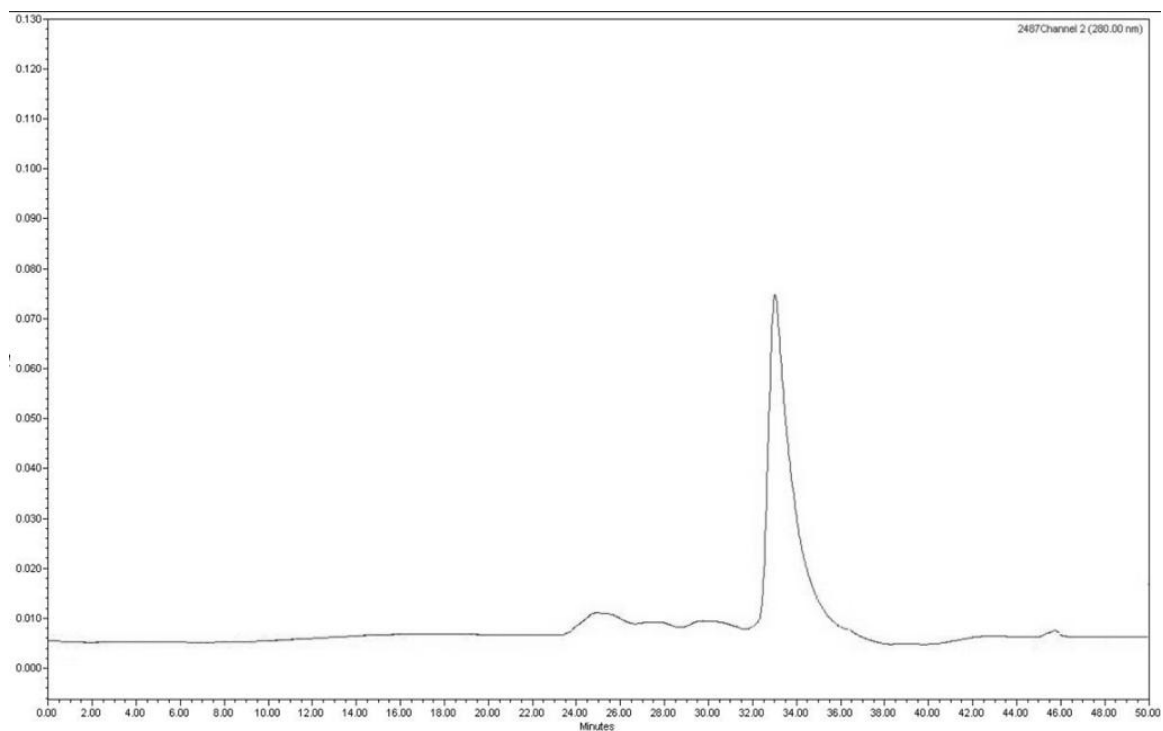


Figura 23. Cromatograma de líquidos a nivel preparativo de la subfracción C.

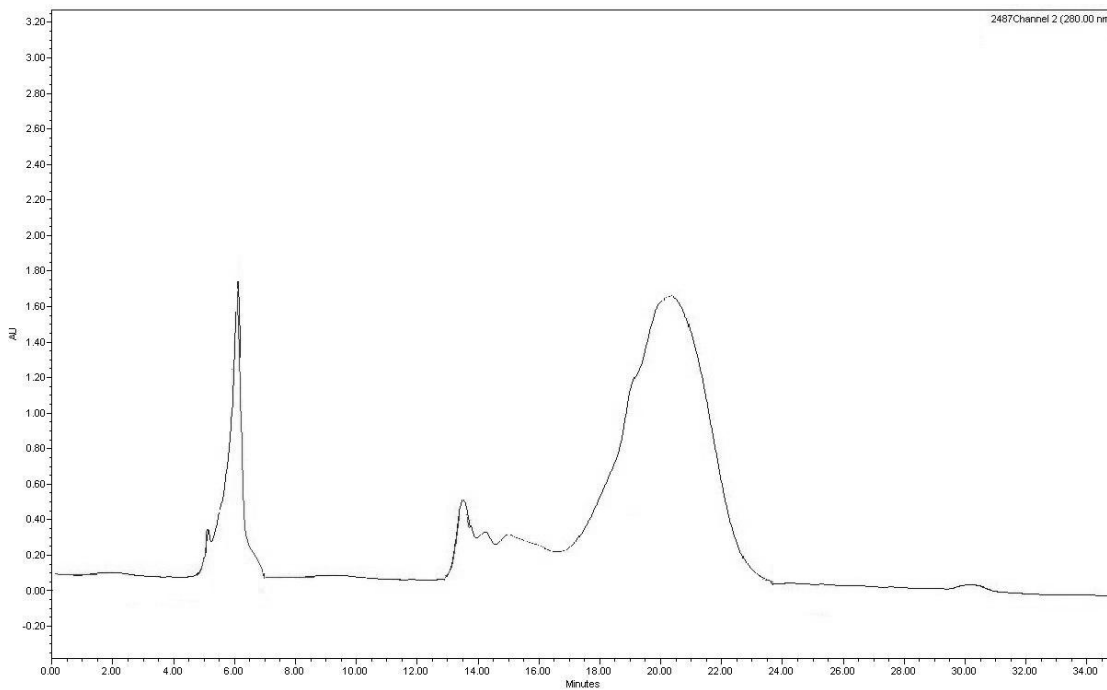


Figura 24. Cromatograma de líquidos a nivel preparativo de la subfracción D

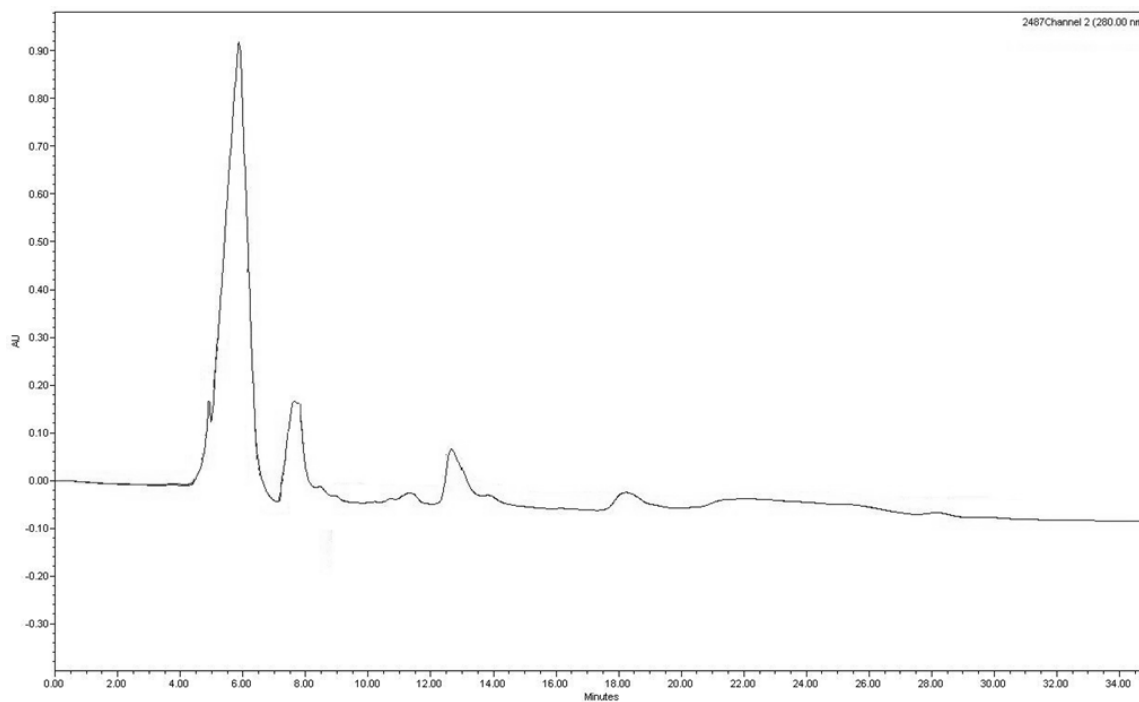


Figura 25. Cromatograma de líquidos a nivel preparativo de la subfracción E.

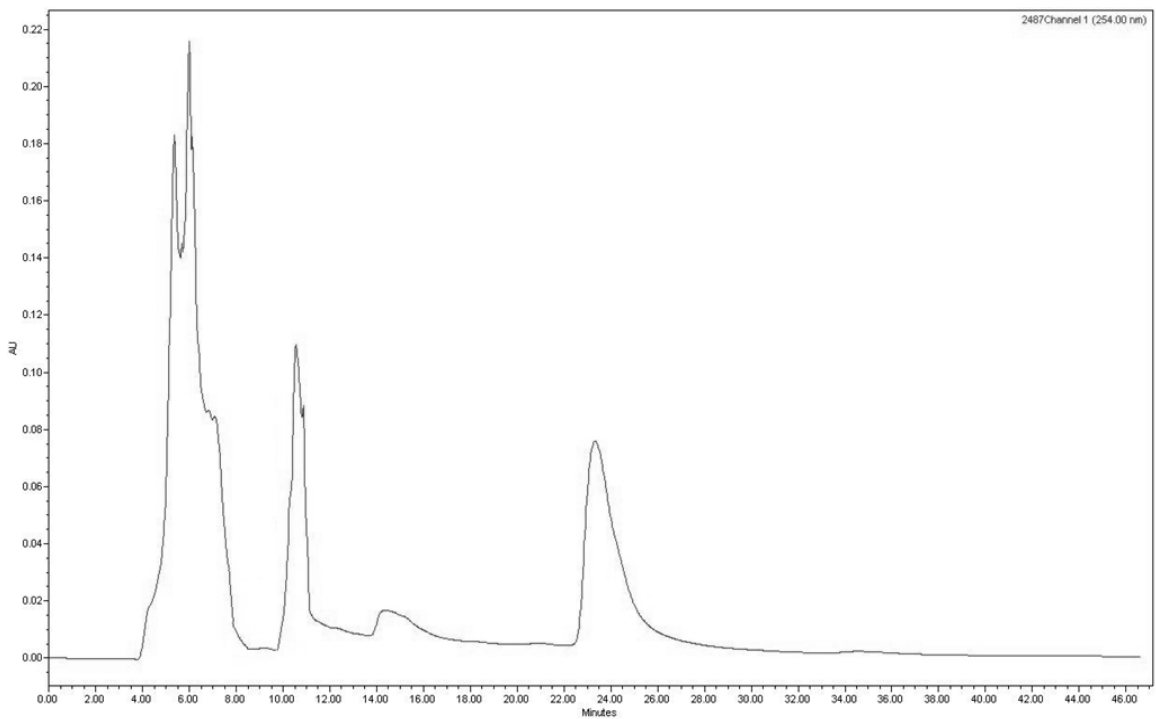


Figura 26. Cromatograma de líquidos a nivel preparativo de la subfracción F.

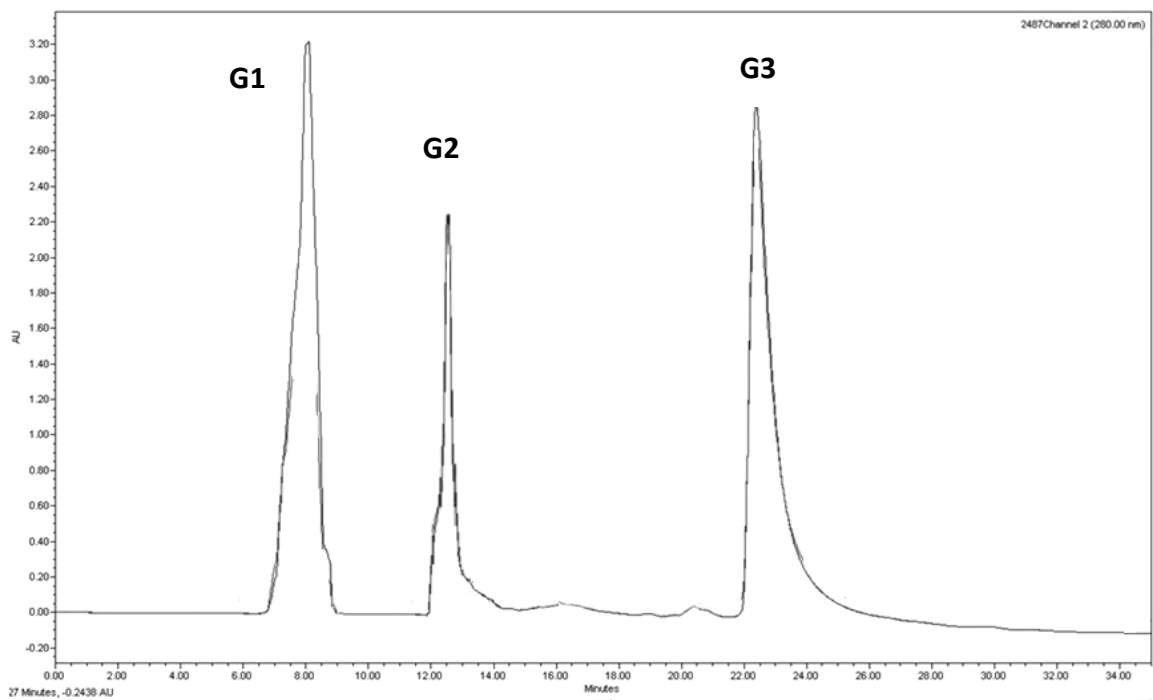


Figura 27. Cromatograma de líquidos a nivel preparativo de la subfracción G.

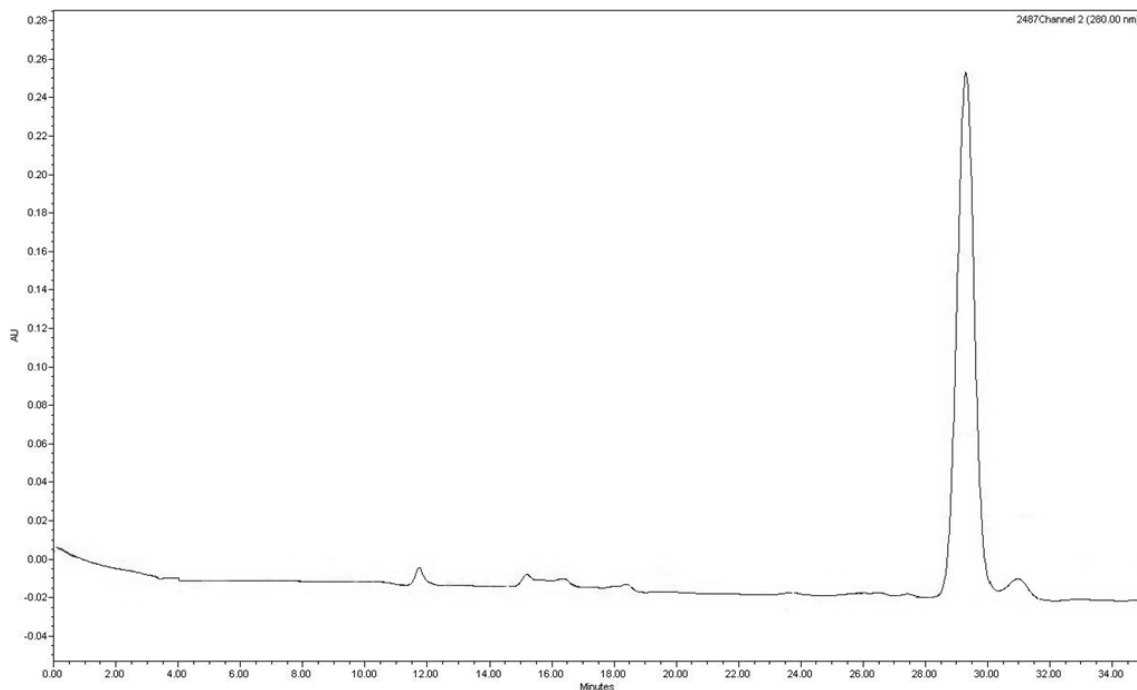


Figura 28. Cromatograma de líquidos a nivel preparativo de la subfracción H.

De acuerdo a lo anterior, se realizó la separación de los compuestos presentes en la subfracción A y la subfracción G mediante HPLC a nivel preparativo.

6.3.3 Subfracción G

La selección de la fracción G para la búsqueda de compuestos de tipo 5,6-dihidro- α -pironas se sustentó mediante el análisis por CCF, el perfil cromatográfico (Figura 27) y el espectro de RMN ^1H (Figura 30).

Se separaron y aislaron del mediante CLAR a nivel preparativo los tres picos presentes en la subfracción G. Se logró la purificación del compuesto correspondiente al pico G2 con t_R de 12.43 min.

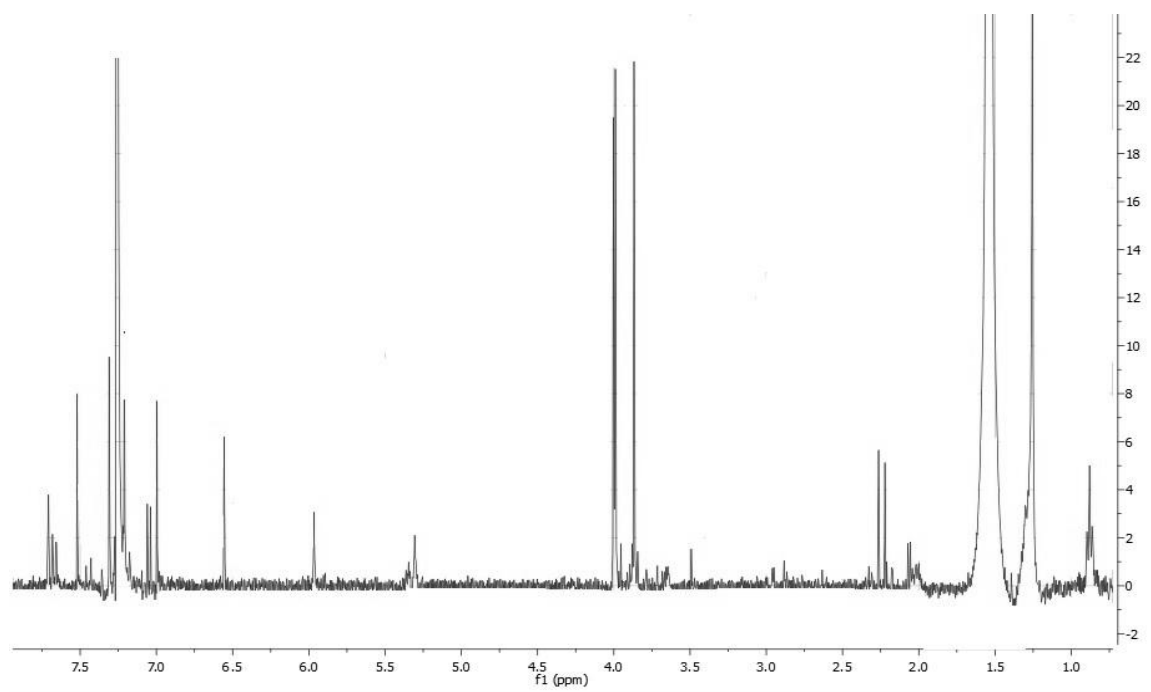


Figura 29. Espectro RMN-¹H de la subfracción G en CDCl₃ (400 MHz).

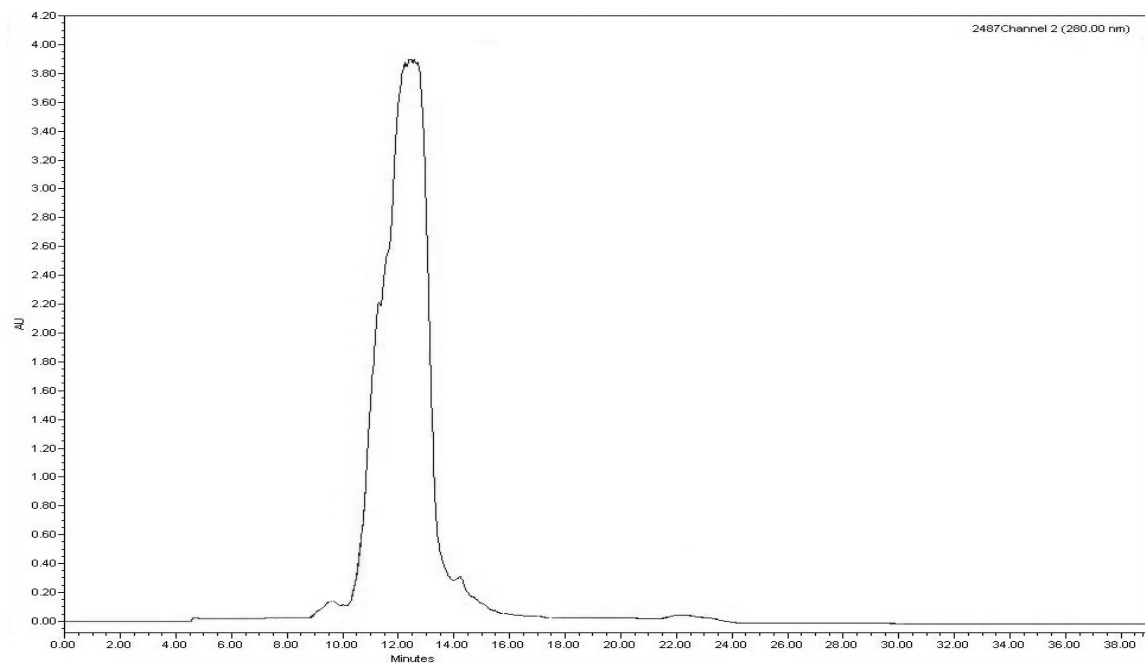


Figura 30. Cromatograma a nivel preparativo de la purificación del pico G2

Tabla 5. Cantidades obtenidas de los compuestos G1-G3 aislados a partir de la subfracción G mediante CLAR a nivel preparativo.

SubFracción G	Cantidad obtenida (mg)
G1	31.8
G2	24.5
G3	33.4

6.3.4 RMN-¹H de los compuestos G1-G3

Se registraron los espectros RMN ¹H para cada uno de los compuestos aislados G1-G3 (Figuras 32-34).

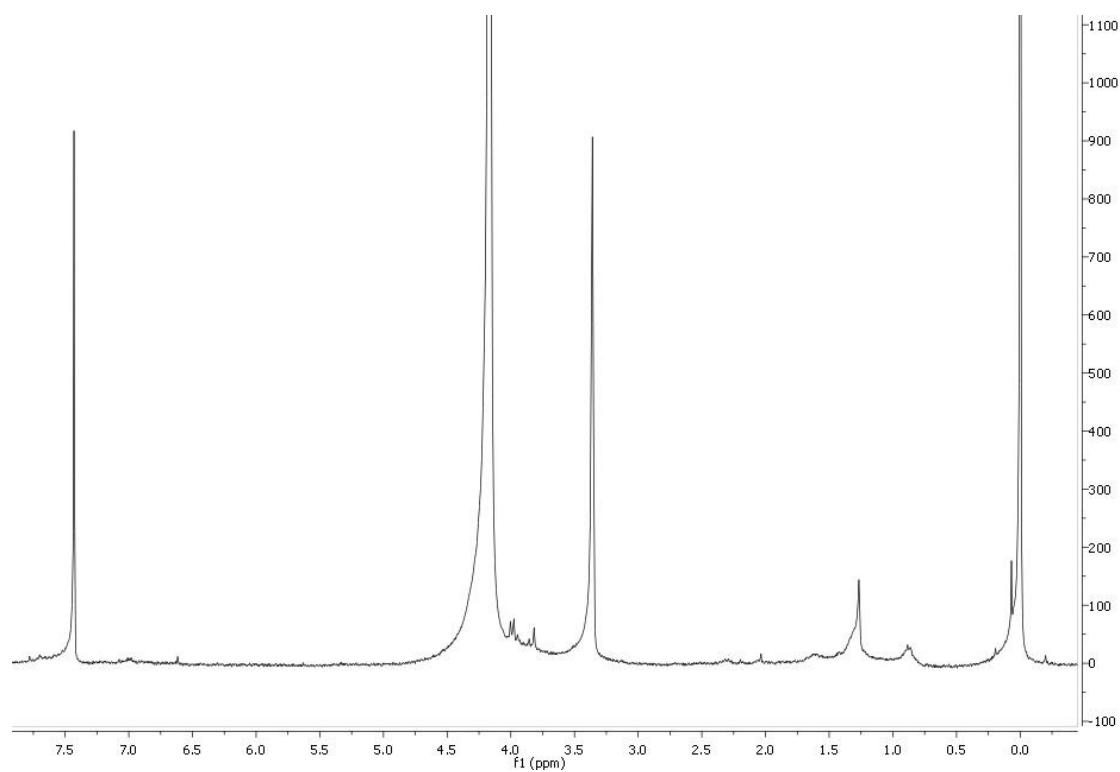


Figura 31. Espectro RMN-¹H del compuesto aislado G1 en CDCl₃ (400 MHz).

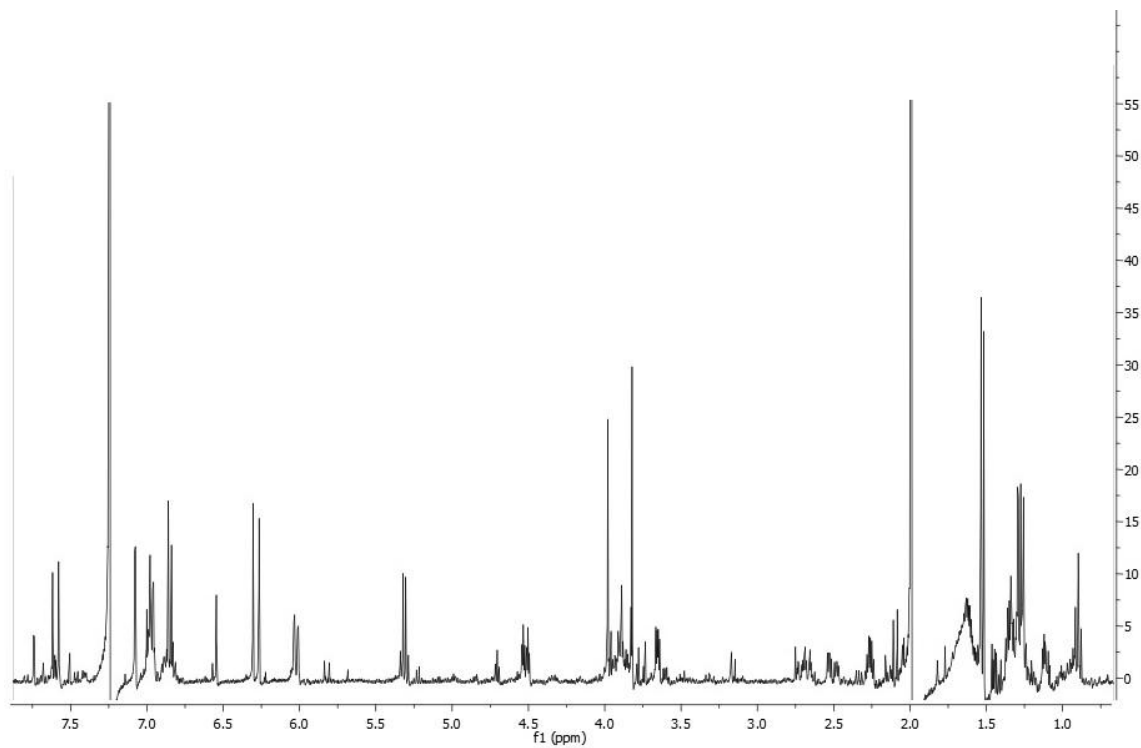


Figura 32. Espectro RMN-¹H del compuesto aislado G2 en CDCl₃ (400 MHz).

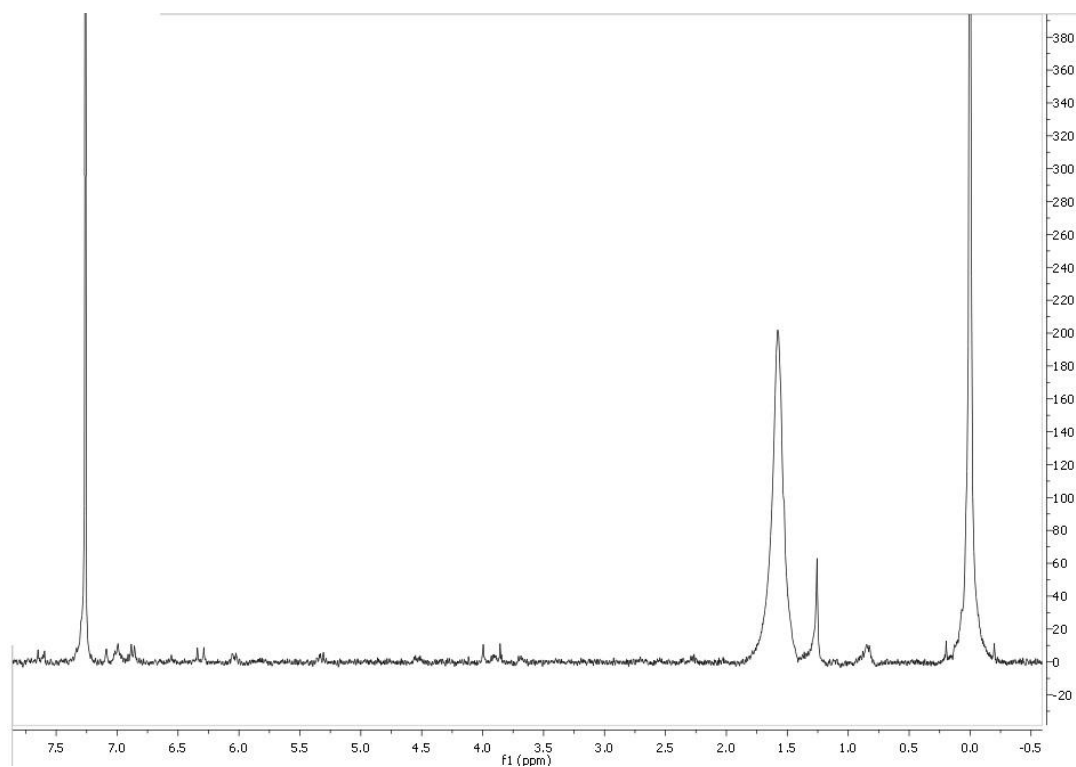


Figura 33. Espectro RMN-¹H del compuesto aislado G3 en CDCl₃ (400 MHz).

6.4 Elucidación estructural

6.4.1 Caracterización del compuesto IV (Brevipólida H)

Al llevar a cabo el análisis del espectro de RMN¹H (Figura 35) del compuesto aislado a partir del pico IV de la fracción de AcOEt se determinó que el espectro presenta señales características de una 5,6-dihidro- α -pirona, los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento se presentan en la Tabla 6, al ser comparados con las brevipólidas previamente reportadas en la literatura, se encontró que corresponde a la brevipólida H (Figura 36).³⁴

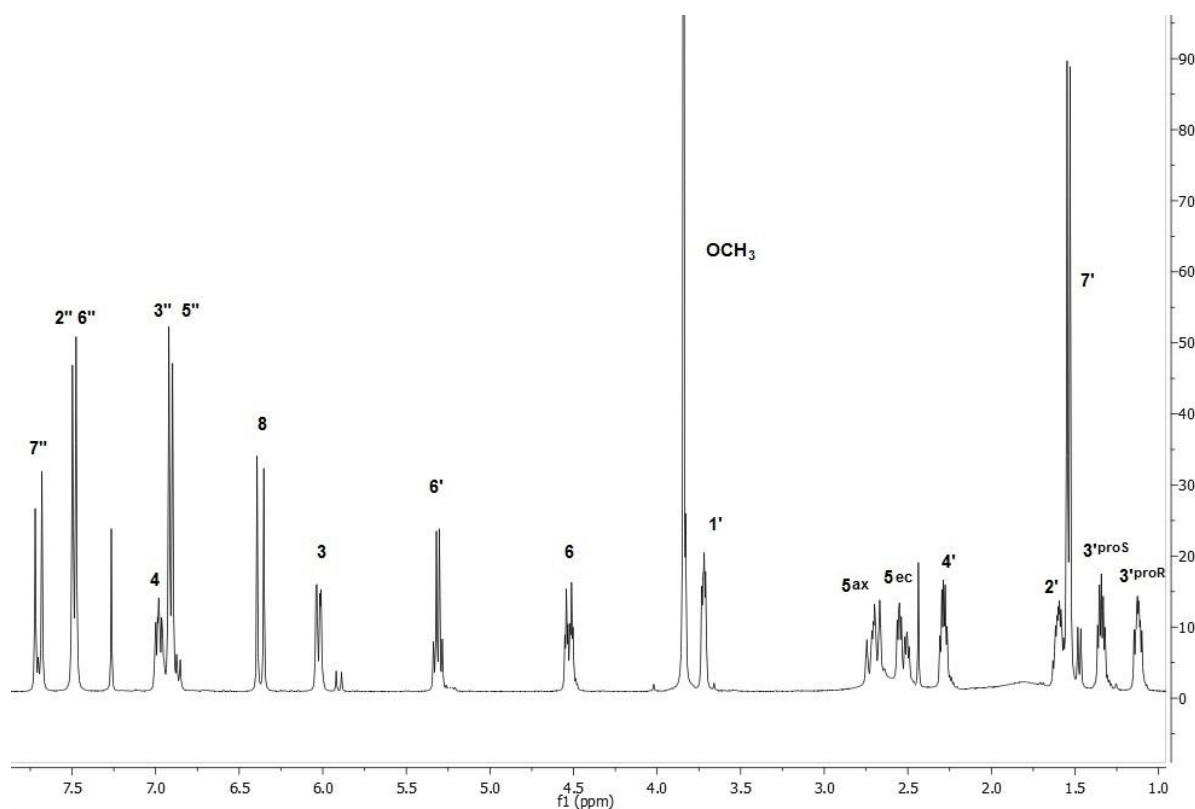


Figura 34. Espectro RMN-¹H de la brevipólida H en CDCl₃ (400 MHz).

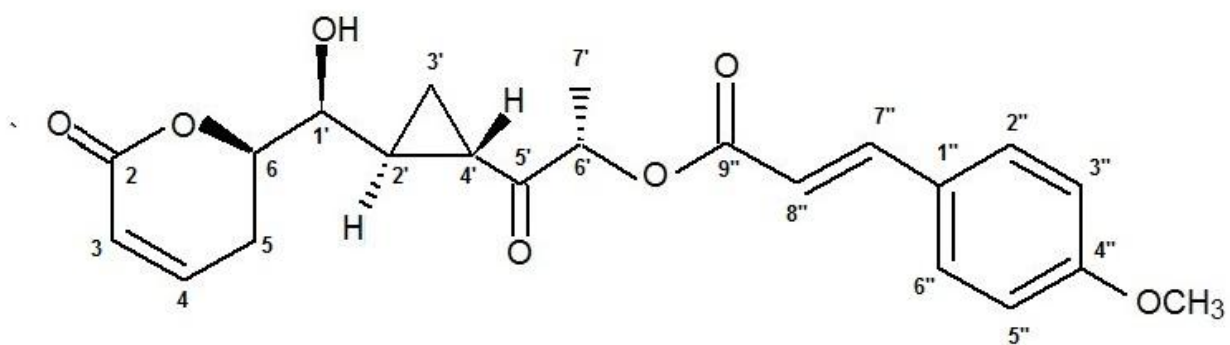


Figura 35. Brevipólida H

Tabla 6. Desplazamientos químicos en RMN-¹H de la 5,6-dihidro-α-pirona aislada (Brevipólida H) de *Hyptis brevipes* en CDCl₃ (400 MHz).

Posición	Brevipólida H δ _H (J en Hz)
3'proR	1.12 ddd (8.0, 6.3, 4.0)
3'proS	1.35 ddd (8.9, 4.0, 3.9)
7'	1.54 d (7.0)
2'	1.60 dddd (8.9, 6.3, 6.3, 3.4)
4'	2.28 ddd (8.3, 3.9, 3.4)
5ec	2.53 dddd (18.6, 6.5, 4.0, 3.8)
5ax	2.71 dddd (18.6, 12.3, 2.2, 2.0)
1'	3.73 dd (6.3, 3.8)
OCH ₃	3.84 s
6	4.53 ddd (12.3, 4.0, 3.8)
6'	5.30 q (7.0)
3	6.04 ddd (9.7, 2.0, 0.8)
8''	6.38 d (16.0)
5''	6.91 d (8.9) ^a
3''	6.91 d (8.9) ^a
4	7.00 dd (9.7, 6.5, 2.2)
6''	7.49 d (8.9) ^a
2''	7.49 d (8.9) ^a
7''	7.70 d (16.0)

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

6.4.2 Caracterización del compuesto G2 (Brevipólida P)

En la Figura 37 se presenta el espectro RMN ^1H del compuesto aislado a partir del pico G2 de la subfracción G, en la que se identificaron las señales que permitieron la caracterización de la estructura de la 5,6-dihidro- α -pirona aislada, la cual corresponde a la Brevipólida P (Figura 38). En la tabla 8 se presentan los valores de desplazamiento químico y constantes de acoplamiento que confirmaron su identificación.

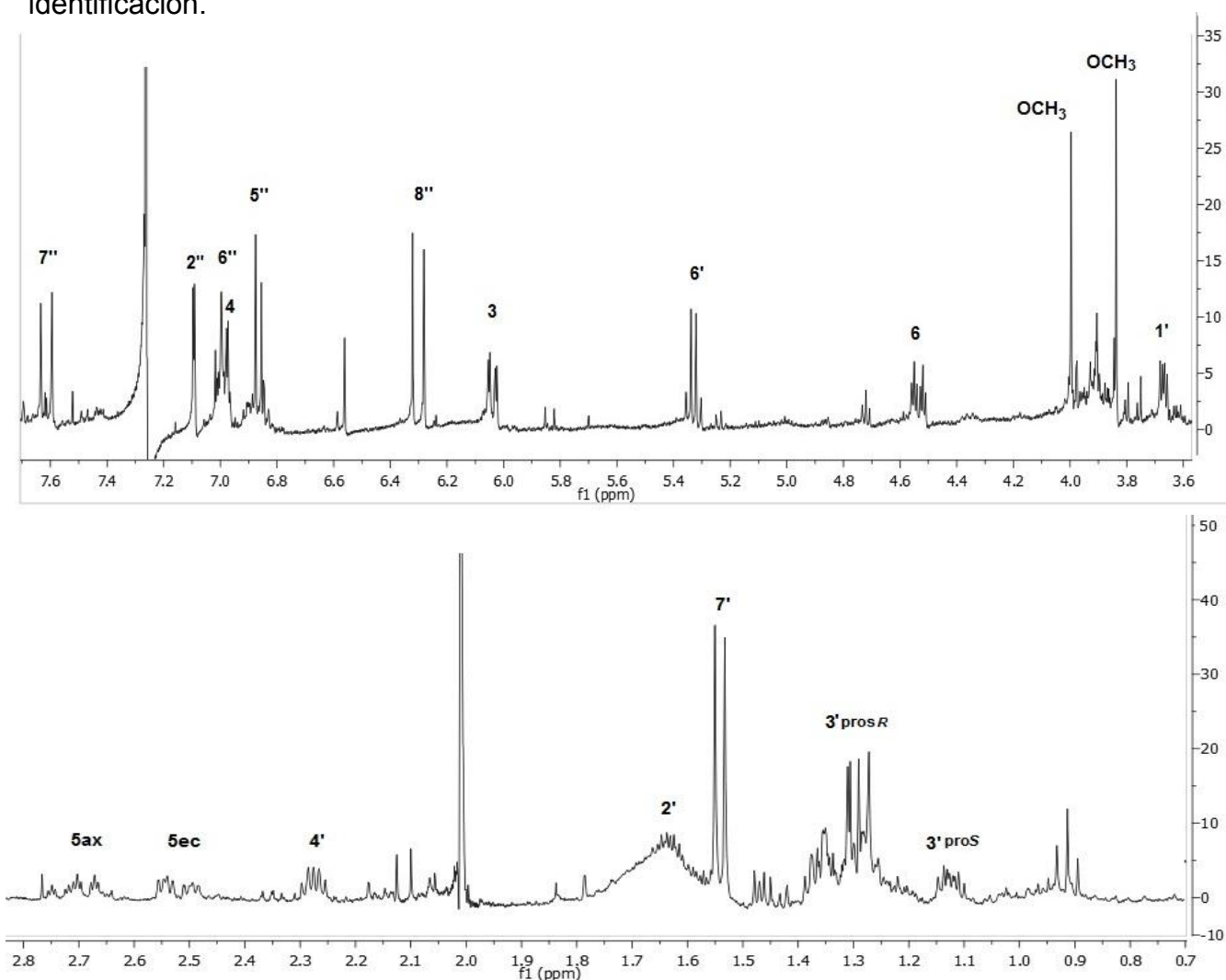


Figura 36. Espectro RMN- ^1H de la brevipólida P (400 MHz).

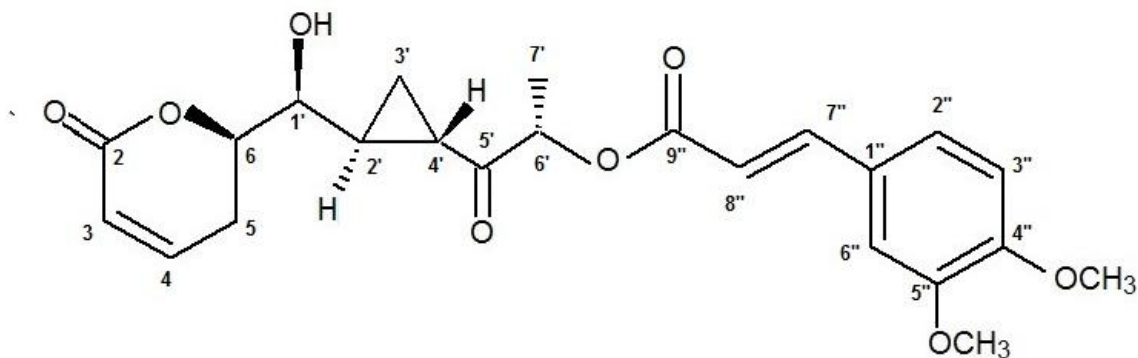


Figura 37. Brevipólida P

Tabla 7. Desplazamientos químicos en RMN-¹H de la 5,6-dihidro-α-pirona aislada (Brevipólida P) de *Hyptis brevipes* en CDCl₃ (400 MHz).

Posición	Brevipólida P δ _H (J en Hz)
3'proS	1.12 ddd (8.2, 6.6, 4.2)
3'proR	1.36 ddd (8.6, 3.8, 3.8)
7'	1.54 d (7.0)
2'	1.63 ddd (9.6, 6.4, 5.6, 4.2)
4'	2.28 ddd (8.6, 3.8, 3.8)
5ec	2.52 dddd (18.3, 6.3, 3.8, 0.8)
5ax	2.70 dddd (18.3, 12.5, 2.2, 2.2)
1'	3.67 dd (6.4, 3.8)
OCH ₃	3.84 s, 3.99 s
6	4.53 ddd (12.3, 3.8, 3.8)
6'	5.33 c (7.0)
3	6.03 ddd (9.7, 2.2, 0.8)
8''	6.30 d (15.9)
5''	6.86 d (8.2)
4	6.98 ddd (9.7, 6.3, 2.2)
6''	6.98 dd (8.0, 2.1)
2''	7.09 d (2.0)
7''	7.61 d (16.0)

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

6.5 Evaluación de citotoxicidad

Se realizó el ensayo de SRB de los compuestos aislados frente a las siguientes líneas celulares humanas: HCT-15 (carcinoma de colon), HeLa (carcinoma de cérvix), MCF-7 (carcinoma de mama) y PC-3 (carcinoma de próstata), los valores obtenidos de CI_{50} son presentados en la Tabla 8.

Tabla 8. Citotoxicidad de la Brevipólida H y P frente a diversas líneas celulares humanas.

Compuesto	Línea Celular Humana			
	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)			
	HCT-15	HeLa	MCF-7	PC-3
Brevipólida H	6.8	5.8	5.2	5.4
Brevipólida P	>20.0	1.9	5.3	4.7
Colchicina	0.008	0.019	0.036	0.017
Vinblastina	0.002	0.001	0.004	0.001

7. DISCUSIÓN

A partir del extracto de las partes aéreas de una colecta de la especie *Hyptis brevipes* se obtuvieron dos compuestos derivados de las 6-heptil-5,6-dihidro- α -pironas; en la que ambos presentan en su estructura un anillo de ciclopropano, y que han sido aislados previamente a partir de esta especie, conocidas como Brevipólida H y Brevipólida P.

El uso de las diversas técnicas cromatográficas es crítico para lograr la separación, el aislamiento y la purificación de los compuestos obtenidos; a lo largo del proyecto fueron utilizados desde cromatografía en capa fina para la visualización preliminar y monitoreo de las fracciones, la cromatografía en columna para lograr una separación más detallada y aprovechamiento de la muestra, y por último el uso de la cromatografía de líquidos permitió el aislamiento y purificación de los compuestos obtenidos.

A pesar de que la separación y aislamiento de los dos compuestos identificados se realizó de manera satisfactoria; en primera instancia la purificación realizada de los picos I-IV obtenidos a partir de la fracción de AcOEt presentó la pérdida consecutiva de cantidades significativas de muestra debido a una falla técnica del sistema de la válvula de reciclaje del CLAR, por lo que se obtuvieron rendimientos bajos. No obstante, de esta manera se consiguió el aislamiento y la purificación exitosa del compuesto mayoritario (Brevipólida H). Para lograr la obtención de la Brevipólida P, que había sido identificada en los cromatogramas de la fracción de AcOEt, como el perteneciente al compuesto del pico I, resultó necesario la

aplicación de diversas estrategias cromatográficas con el remanente de muestra de la fracción de AcOEt, tales como la cromatografía en columna y el posterior uso del CLAR para la purificación por medio de la reinyección de la muestra.

Se ratifica que tanto la procedencia de la colecta como la época del año de la recolección de la planta influye en la concentración y diversidad de los compuestos generados a partir del metabolismo secundario, en este caso de las 5,6-dihidro- α -pironas, lo cual explica la presencia o ausencia de estos diferentes derivados a pesar de tratarse de la misma especie. Los meses de recolección de las plantas de *Hyptis brevipes* han sido de octubre a enero, y todas proceden del estado de Veracruz. En general, existe una mayor variedad de estos compuestos en los meses de octubre y noviembre. En una colecta de *Hyptis brevipes* proveniente del Km. 16 de la carretera Jalapa-Veracruz no se reportó la presencia de 5,6-dihidro- α -pironas³⁶, mientras que las colectas provenientes de la localidad de Dos Ríos, han presentado mayor riqueza de brevipólidas.^{24, 34} En el presente trabajo, fueron aislados dos brevipólidas a partir de una colecta procedente de Angostillo, recolectadas en el mes de enero.

Debido a que se ha encontrado que la actividad citotóxica es una característica importante de este tipo de compuestos, su evaluación frente a diversas líneas celulares humanas resulta de interés. La brevipólida H presentó mayor actividad citotóxica frente a MCF-7 (carcinoma de mama) mientras que la brevipólida P demostró mayor actividad citotóxica frente a HeLa (carcinoma de cérvix), aunque el rango de actividad se encuentra de 1.9 a 6.8 $\mu\text{g/mL}$, pero resalta el hecho de observar que la brevipólida P no demostró actividad frente al carcinoma de colon.

8. CONCLUSIONES

El estudio fitoquímico continuo de *Hyptis brevipes* contribuye a la caracterización de sus metabolitos secundarios entre los que destacan los derivados de 5,6-dihidro- α -pironas debido a su actividad citotóxica, y cuyo género además de ser relevante por sus componentes fitoquímicos con actividad diversa, también destaca por su amplio uso en la historia de la medicina tradicional de diversos países, principalmente México, el cual presenta el mayor endemismo de las especies de éste género.

Se consiguió el aislamiento y la identificación de dos 6-alkil-5,6-dihidro- α -pironas en la que ambos compuestos presentan un anillo de ciclopropano, conocidas como Brevipólida H y Brevipólida P.

Aunado a los diversos estudios fitoquímicos realizados previamente acerca de las especies del género *Hyptis*, que han aportado y permitido la profundización de conocimiento fitoquímico, el presente proyecto permitió la continuidad y comprensión acerca de la variada composición de compuestos químicos generados por metabolismo secundario, los cuales presentan actividad citotóxica frente a líneas celulares derivadas de carcinomas humanos, sin demostrar una selectividad marcada en el caso de la brevipólida H.

9. PERSPECTIVAS

Debido a que se ha encontrado que la especie *Hyptis brevipes*, tanto en estudios previos y en el presente proyecto, contiene compuestos de interés como parte del metabolismo secundario, en particular, derivados de 5,6-dihidro- α -pironas, es importante continuar con el seguimiento de la investigación fitoquímica no sólo en dicha especie sino en el género.

La caracterización de 5,6-dihidro- α -pironas y otros metabolitos secundarios, a partir de colectas de distintas procedencias y épocas del año permitiría un mayor conocimiento de ésta especie en lo que respecta a la variabilidad química.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Cordell, G.A. (2014) Phytochemistry and traditional medicine. The revolution continues. *Phytochemistry Letters* **10**, 26-40.
2. Deng, Y.; Balunas, M.J.; Jeong-Ah K.; Young-Won, C. (2009) Bioactive 5,6-Dihydro- α -pyrone: Derivatives from *Hyptis brevipes*. *Journal of Natural Products* **72**, 1165-1169.
3. Picking D.; Delgoda R.; Boulogne I.; Mitchell S. (2013) *Hyptis vercillata* Jacq: A review of its traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology. *Journal of Ethnopharmacology* **147**, 16-41.
4. Balunas, M.J.; Kinghorn, D.A. (2005) Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences* **78**, 431-441.
5. Newman, D.J.; Cragg, G.M. (2012) Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products* **75**, 311-335
6. Silva, C.; Raulino R.; Cerqueira, D.; Mannarino, S.; Pereira, M.; Panek, A.; Silva, J.; Menezes, F.; Eleutherio, E. (2009) In vitro and in vivo determination of antioxidant activity and mode of action of isoquercitin and *Hyptis fasciculata*. *Phytomedicine* **16**, 761-767.
7. Villaseñor, J.L.; Ortiz, E. (2014) Biodiversidad de las plantas con flores (División Magnoliophyta) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **85**, 134-142.

8. Arnason, J.; Mata, R.; Romeo, J.; 1995 *Phytochemistry of Medicinal Plants. Recent advances in Phytochemistry. Bioactive Natural Products from Traditionally Used Mexican Plants*. Pereda-Miranda R. Vol. 29, 65-112. Plenum Press. United States of America.
9. 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.
10. Fragoso-Serrano, M.; González-Chimeo, E.; Pereda-Miranda, R. (1999) Novel Labdane Diterpenes from the Insecticidal Plant *Hyptis spicigera*. *Journal of Natural Products* **62**, 45-50.
11. Picking, D.; Delgoda, R.; Boulogne, I.; Mitchell, S. (2013) *Hyptis vercillata* Jacq: A review of its traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology. *Journal of Ethnopharmacology* **147**, 16-41.
12. Pereda-Miranda R.; Fragoso-Serrano M.; Cerda-García, C. (2001) Application of molecular mechanics in the total stereochemical elucidation of spicigerolide, a cytotoxic 6-tetraacetyl-oxyheptenyl-5,6 dihidro- α -pyrone from *Hyptis spicigera*. *Tetrahedron* **57**, 47-53.
13. Evans, W. (2002) *Pharmacognosy*. 15th edition. WB Saunders. China
14. Pereda-Miranda R.; Delgado G. (1990) Triterpenoids and Flavonoids from *Hyptis albida*. *Journal of Natural Products* **53**, 182-185.
15. Ikan, R. (1991) *Natural Products. A Laboratory Guide*. 2nd edition. Academic Press. United States of America.
16. Bruneton, J. (1999) *Pharmacognosy. Phytochemistry Medicinal Plants*. 2nd edition. Lavoiser Publishing. France.

17. Ayres, D.; Loike, J. (1990) *Lignans. Chemical, biological and clinical properties. Chemistry and Pharmacology of Natural Products.* Cambridge University Press. Australia.
18. Almtorp, G.; Hazell, A.; Torssell, K. (1991) A lignin and pyrone and other constituents from *Hyptis capitata*. *Phytochemistry* **30**, 8, 2753-2756.
19. Kuhnt, M.; Rimpler, H.; Heinrich, M. (1994) Lignans and other compounds from the mixe indian medicinal plant *Hyptis verticillata*. *Phytochemistry* **36**, 2, 485-489.
20. Kingston, D.G.I.; Mannava, M.R.; Zucker, W.V. (1979) Plant anticancer agents. IX. Constituents of *Hyptis tomentosa*. *Journal of Natural Products* **42**, 8, 496-499.
21. Xu, R.; Ye, Y.; Zhao, W. (2012) *Introduction to Natural Products. Chemistry.* Science Press. China
22. Edeoga, H.O.; Omusun, G.; Uche, L.C. (2006) Chemical composition of *Hyptis suaveolens* and *Ocimum gratissimum* hybrids from Nigeria. *African Journal of Biotechnology* **5**, 10, 892-895.
23. Ladan, Z.; Amupitan, J.O.; Oyewale, O. A.; Ayo, R.G.; Temple, E.; Ladan, E.O. Phytochemical screening of the leaf extracts of *Hyptis spicigera* plant. *African Journal of Pure and Applied Chemistry* **8**, 5, 83-88.
24. Suárez Órtiz, G.A. (2013) *Caracterización estructural y análisis conformacional de 6-heptenil-5,6-dihidro-2H-piran-2-onas de origen vegetal.* Tesis de Doctorado. Posgrado Ciencias Químicas. Universidad Nacional Autónoma de México.

25. Usui T.; Watanabe H.; Nakayama H.; Tada Y.; Kanoh N.; Kondoh M.; Asao T.; Takio K.; Watanabe H.; Nishikawa K.; Kitahara T.; Osada H. (2004) The Anticancer Natural Product Pironetin Selectively Targets Lys532 of α -Tubulin. *Chemistry and Biology* **11**, 799-806.
26. Kondoh M.; Usui T.; Kobayashi S.; Tsuchiya K.; Nishikawa K.; Nishikori T.; Mayumi T.; Osada H. (1998) Cell cycle arrest and antitumor activity of pironetin and its derivatives. *Cancer Letters* **126**, 29-32.
27. Pereda-Miranda R.; García M.; Delgado G. Structure and Stereochemistry of four α -pyrones from *Hyptis oblongifolia*. *Phytochemistry*. **1990**, 29, 9, 2971-2974.
28. Boalino, D.M.; Conolly J.D.; McLean, S.; Reynolds, W.F.; Tinto, W.F. (2003) α -Pyrones and a 2(5H)-furanone from *Hyptis pectinata*. *Phytochemistry* **64**, 1303-1307.
29. Pereda-Miranda, R.; Fragoso-Serrano, M.; Cerda-García-Rojas, C. (2001) Application of molecular mechanics in the total stereochemical elucidation of spicigerolide, a cytotoxic 6-tetraacetyl-oxyheptenyl-5,6, dihidro- α -pyrone from *Hyptis spicigera*. *Tetrahedron* **57**, 47-53.
30. *Hyptis brevipes*. Poit., Lamiaceae. PIER. US Forest Service. Institute of Pacific Islands Forestry. Última actualización: 14Mar2012 Recurso en línea: [http://www.hear.org/pier/species/hyptis_brevipes.htm] Fecha de consulta: 13Ago2015.
31. Mondrágón J.P.; Heike V. (ed.) Malezas de México. Lamiaceae. *Hyptis brevipes*. CONABIO. Recurso en línea: [<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/lamiaceae/hyptis->

brevipes/fichas/pagina1.htm] Última modificación: 23Jul2009. Fecha de consulta: 13Ago2015.

32. Xu D.H.; Huang Y.S.; Jiang D.Q.; Yuan K. (2013) The essential oils chemical compositions and antimicrobial, antioxidant activities and toxicity of three *Hyptis* species. *Pharmaceutical Biology* **51**, 9, 1125-1130.
33. Suárez-Ortiz, A., Cerda-García-Rojas, C.M., Hernández-Rojas, A., Pereda-Miranda, R. (2013) Absolute Configuration and Conformational Analysis of Brevipolides, Bioactive 5,6-Dihydro- α -pyrones from *Hyptis brevipes*. *Journal of Natural Products* **76**, 72-78.
34. Ortega Soto, A.K. (2014) *Perfil cromatográfico y evaluación biológica de diferentes extractos de la planta Hyptis brevipes*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
35. Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D. (1990) New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer Drug Screening, *Journal of the National Cancer Institute* **82**, 1107-1112
36. Cadena Ríos, M. (2008) *Estudio químico de Hyptis brevipes*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.

10.1 Referencias de Figuras

Figura 1. Distribución de la Familia *Lamiaceae* en México. Martínez-Gordillo M.; Fragoso-Martínez I.; García-Peña M.R.; Montiel O.; Géneros de *Lamiaceae* de México, diversidad y endemismo. Revista Mexicana de Biodiversidad (2013), 84, 30-86

Figura 6. Map of *Hyptis brevipes* distribution. Discover Life. Global Mapper.

Missouri Botanical Garden. Recurso en línea:

[<http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Hyptis+brevipes>] Fecha de consulta:

16Ago15

Figura 7. (A) Placa de Libro. Dibujo. *Hyptis brevipes*. Fransisco Manuel Blanco.

Flora de Filipinas. Gran Atlas I. 1880. (B) Fotografía *Hyptis brevipes* proveniente de Córdoba, Veracruz. Pedro Tenorio Lezama 2006.