



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“MONITOREO DE LA CITOTOXICIDAD DE LA HIERBA DEL BURRO”

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

NOE ALFREDO MARTINEZ GONZALEZ



MEXICO, 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. Isabel del Carmen Rivero Cruz
Secretario	Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano
1er Suplente	Dr. Mario Alberto Figueroa Saldivar
2do Suplente	M. en C. Paulina del Valle Pérez

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Farmacia, Laboratorio 123

Facultad de Química

Universidad Nacional Autónoma de México

Asesor del Tema:

Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano

Supervisor Técnico:

Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda

Sustentante:

Noé Alfredo Martínez González

INDICE

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE CUADROS	ii
LISTA DE DIAGRAMAS	ii
INTRODUCCION	1
MARCO TEÓRICO	4
Familia Lamiaceae	4
Generalidades	4
Familia Lamiaceae en México.....	5
Género <i>Hyptis</i>	10
<i>Hyptis pectinata</i>	12
HIPOTESIS	14
OBJETIVOS	15
METODOLOGÍA	16
Equipos de Análisis	16
Técnicas Cromatográficas	16
Cromatografía en Capa Fina (CCF)	16
Cromatografía en Columna Abierta (CCA).....	16
Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR).....	17
Material Vegetal.....	17
Extracción del Material Vegetal.....	17
Fraccionamiento Primario	18
Fraccionamiento secundario de la fracción de CH ₂ Cl ₂	18
Análisis y purificación por HPLC	19
Ensayo de citotoxicidad	21
Líneas Celulares.....	21
Dilución de las muestras	22
Bioensayo	22
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
CONCLUSIONES	30
BIBLIOGRAFÍA	31

LISTA DE FIGURAS

	PAG
Figura 1. Distribución de la familia Lamiaceae en el mundo	4
Figura 2. Distribución de la familia Lamiaceae en México	6
Figura 3. Ejemplo del género <i>Hyptis</i> (<i>H. urticoides</i>)	10
Figura 4. <i>Hyptis pectinata</i>	12
Figura 5. Espectro de RMN ¹ H de la fracción de diclorometano de <i>Hyptis pectinata</i> .	24
Figura 6. Espectro de RMN ¹ H de la fracción de acetato de etilo de <i>Hyptis pectinata</i> .	24
Figura 7. Cromatoplaca de las 11 fracciones obtenidas	25
Figura 8. Espectro de RMN ¹ H de la Fracción-4	26
Figura 9. Espectro de RMN ¹ H de la Fracción-5	27
Figura 10. Espectro de RMN ¹ H de la Fracción-6	27
Figura 11. Cromatograma de líquidos a nivel analítico de la fracción F-5	28

LISTA DE CUADROS

	PAG
Cuadro 1. Géneros de la familia Lamiaceae cultivados en México.	6
Cuadro 2. Géneros de la familia Lamiaceae presentes en México y las subfamilias en las que están incluidos.	7
Cuadro 3. Géneros de la familia Lamiaceae: riquezas y endemismo.	8
Cuadro 4. Peso de las fracciones primarias sin triperpenos.	18
Cuadro 5. Fraccionamiento secundario de la fracción de CH ₂ Cl ₂ de <i>H. pectinata</i> .	20
Cuadro 6. Ensayo de citotoxicidad de los extractos y fracciones de <i>H. pectinata</i> empleando HCT15 y MCF7.	23
Cuadro 7. Ensayo de citotoxicidad de las 11 fracciones secundarias de <i>H. pectinata</i> .	26

LISTA DE DIAGRAMAS

Diagrama 1. Fraccionamiento primario de <i>Hyptis pectinata</i>	19
--	----

INTRODUCCION

Las plantas, sin lugar a dudas, constituyen el sostén de la biota faunística del planeta; sin ellas, la vida como hoy se le conoce sería imposible. Actualmente, las plantas antofitas (plantas con flores) son las dominantes y se les conoce también como angiospermas o fanerógamas. Las fanerógamas se estima que aparecieron hace cerca 260 millones de años, durante el período Cretácico; coevolucionaron con otros grupos de organismos, tales como los insectos, realizando una simbiosis perfecta que los volvió organismos exitosos dominantes en la Tierra.

Los insectos son, en general, polinizadores de las plantas y esta relación inequívoca ha sido la base de la evolución y la diversificación de ambos grupos, así como sustento de la biodiversidad en todos los aspectos. Es, precisamente, la aparición de las flores lo que permite la evolución del grupo de insectos, pues ellas generan una variedad de satisfactores para diversos organismos. En la flor se alojan las células reproductoras de la planta y es donde los insectos y otros polinizadores encuentran como recompensa el néctar y el polen; de éstos obtienen energía que utilizan para el desarrollo de su actividad biológica (Flores, *et al.* 2009).

Se calcula que existen actualmente unas 300,000 especies de plantas con flores, de las cuales, sólo se conocen 250,000 (Heywood, 2000). En el trópico, en donde se localiza gran parte del Continente Americano, se concentra el 75% de estas especies. De lo anterior, se estima que 300 especies tienen algún grado de domesticación (manejo humano) y, de éstas, sólo 15 constituyen el sustento de la alimentación de los diversos grupos humanos que actualmente pueblan la tierra; estas 15 especies fueron domesticadas por los hombres de antiguas culturas y el hombre moderno sólo las usufructúa (Flores, *et al.* 2009).

México tiene una extensión tropical en la que se concentra una gran diversidad de especies (4º lugar a nivel mundial), lo que aunado a la diversidad de grupos étnicos (68 grupos) (Wolf, 1983) han gestado un conocimiento importante sobre las plantas en México. Se reconocen, al presente, 35 categorías de uso, entre las que hemos de señalar alimenticias, medicinales, textiles, combustibles, colorantes, mágico-religiosas, melíferas, forrajeras y productoras de esencias. Probablemente, el vertiginoso desarrollo de la industria farmacéutica en la centuria pasada trajo, como consecuencia, una notable disminución en el uso de las plantas medicinales. En la actualidad, sin embargo, se hacen grandes esfuerzos para rescatar este conocimiento y canalizarlo hacia la población de escasos recursos económicos. En las plantas se encuentra cifrada, incontestablemente, la cura de diversas enfermedades (Flores, *et al.* 2009).

Entre las plantas existen familias que se caracterizan por poseer exudados y secreciones usadas en la medicina tradicional, como son los aceites esenciales; éstos se conocen desde hace milenios, ya que fueron usados por antiguas civilizaciones como la China, la Hindú, la Egipcia, la Babilónica, la Griega, la Romana y la Maya en el área Mesoamericana. En ésta, todavía se conservan y se utilizan diversas especies mesoamericanas; de las 1,800 especies de plantas medicinales que se reportan en la actualidad para esta región, son muy pocas las empleadas por sus aceites esenciales (Arellano-Rodríguez, 2003).

De nuestra flora mesoamericana actual (endémica y no endémica), es importante mencionar a las conocidas como plantas espirituales, que pertenecen a diversas Familias: 1. Labiaceae (Labiada), con las especies *Hyptis pectinata* Poir, *Hyptis suaveolens* L. Poir, *Mentha citrata* Ehr. (Menta), *Ocimum basilicum* L. (albahaca), *Ocimum micranthum* Wild, *Salvia coccinea* Juss ex Murr. Las plantas de esta Familia son usadas como desinfectantes en heridas, contra infecciones de oídos, nariz, garganta y contra dolores de cabeza; 2. Verbenaceae, con las especies *Lantana camara* y los llamados oréganos, entre otros, *Lippia dulcis* Trav y *Lippia graveolens* HBK. Las Verbenaceas se utilizan contra dolores del aparato digestivo y para darles sabor a diversas comidas; 3.

También existen especies de las Familias Lauraceae, Annonaceae, Myrtaceae (guayaba), Asteraceae, Anacardiaceae, Rutaceae, Burceraceae, Piperaceae, Liliaceae y Poaceae (gramíneas), como la especie *Cymbopogon citratos* (zacate de limón).

Todas estas plantas también son muy importantes en la fabricación de perfumes y, en general, se las conoce como plantas del espíritu o espirituales; ellas son utilizadas en la práctica del chamanismo y por los médicos tradicionales mayas, para la “limpia” y para espantar a los malos espíritus (Flores *et al.*, 1996; Flores *et al.*, 2001).

MARCO TEÓRICO

Familia Lamiaceae

Generalidades.

La familia Lamiaceae es una familia que se puede considerar cosmopolita (*Figura 1*), los individuos de esta familia crecen en todo tipo de hábitat pero en general son especies de lugares abiertos, siendo la cuenca del Mediterráneo una de las regiones de mayor diversidad.

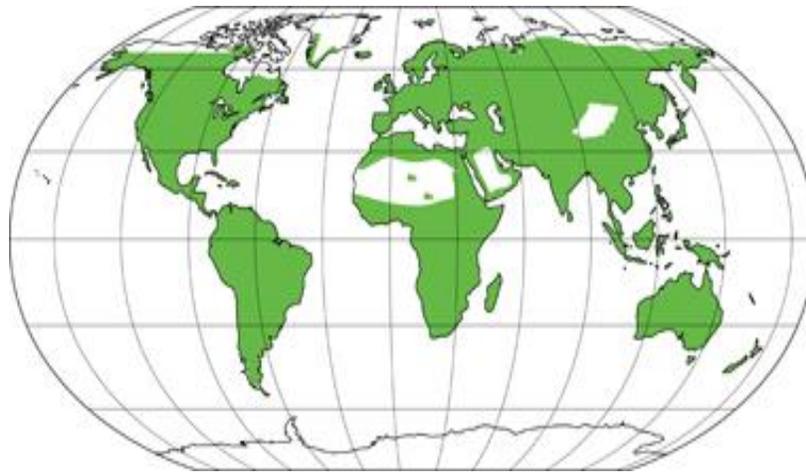


Figura 1. Distribución de la familia Lamiaceae en el mundo. (<http://www.thecompositaehut.com>).

Muchas especies de Lamiaceae son económicamente importantes como ornamentales, especias, esencias, objetos religiosos o medicinales. En los Neotrópicos, las especies de Lamiaceae son particularmente importantes localmente, ya que representan una fuente medicinal económica. Algunas son cultivadas comercialmente a grandes escalas como *Mentha arvensis* subespecie *haplocalix* que produce el aceite de menta para saborizar, y especies de *Lavandula*, de donde se destila el aceite de lavanda, muy usado en el comercio de perfumería.

Muchas especies de Lamiaceae de importancia económica son originalmente importadas del Hemisferio Este, por ejemplo albahaca (*Ocimum basilicum*), y especialmente de la región Mediterránea, como menta (*Mentha*), orégano (*Origanum*), romero (*Rosmarinus*), tomillo (*Thymus*) y salvia (*Salvia*). Los tubérculos de algunas especies de *Stachysson* comestibles. *Tectona* (teca) es un importante árbol maderable (<http://www.thecompositaehut.com>).

Familia Lamiaceae en México

Los primeros trabajos taxonómico-florísticos sobre la familia fueron de Bentham (1832-1836, 1848, 1876), quien describió varios géneros y especies. Briquet (1895-1897), basándose en los trabajos de Bentham propuso una clasificación que ha sido ampliamente usada. En el siglo XX, Erdtman (1945) reconoció 2 subfamilias con base en la morfología del polen y Cantino *et al.* (1992) propusieron una clasificación de la familia y exploraron las posibles relaciones con Verbenaceae. Los resultados de los análisis filogenéticos sustentan la monofilia de Lamiaceae (labiadas), incluyendo algunos géneros de Verbenaceae.

Algunos géneros con revisiones taxonómicas son: *Agastache*, *Asterohyptis*, *Catoferia*, *Cunila*, *Hedeoma*, *Hyptis*, *Monardella*, *Monarda*, *Salvia* subgénero *Calosphace*, *Scutellaria*, *Stachys*, *Teucrium* y *Trichostema*. Este último género es el único con una monografía publicada para la República Mexicana; no obstante, para el país se cuenta con numerosas publicaciones de especies nuevas y sobre su fitoquímica (Martínez-Gordillo, *et al.*, 2013)

En México esta familia se encuentra ampliamente distribuida, principalmente a lo largo de las zonas montañosas y de manera primordial en el eje neo volcánico transversal (*Figura 2*), y se encuentra representada por 32 géneros nativos o naturalizados por un largo periodo, por lo que es común encontrarlos de manera silvestre, además, se encuentran 17 géneros introducidos y/o cultivados, que en ocasiones pueden encontrarse de forma silvestre (*Cuadro 1*). Los géneros pertenecen a 4 subfamilias e incluyen 591 especies (*Cuadro 2*).



Figura 2. .Distribución de la familia Lamiaceae en México (Martínez-Gordillo, et al., 2013).

La familia es una de las más diversas de la República Mexicana, sólo después de la Asteraceae, Fabaceae, Poaceae, Orchidaceae, Cactaceae, Euphorbiaceae y Rubiaceae, representando 13.55% de los géneros y 8.23% de las especies del mundo, presentando un endemismo de 65.82% (Cuadro 3).

Cuadro 1. Géneros de la familia Lamiaceae cultivados en México (Martínez-Gordillo, et al., 2013).

Subfamilia	Géneros cultivados, en ocasiones colectados como silvestres
Ajugoideae	<i>Ajuga, Clerodendrum.</i>
Lamioideae	<i>Lamium, Leonurus, Leonotis, Marrubium, Moluccella, Phlomis, Pogostemon</i>
Nepetoideae	<i>Lavandula, Melissa, Mentha, Nepeta, Origanum, Plectranthus, Rosmarinus, Thymus.</i>

Cuadro 2. Géneros de la familia *Lamiaceae* presentes en México y las subfamilias en las que están incluidos (Martínez-Gordillo, et al., 2013).

Subfamilia	Géneros con especies nativas o naturalizadas por largo tiempo
Viticoideae	<i>Cornutia, Vitex</i>
Ajugoideae	<i>Aegiphylla, Teucrium, Tetraclea, Trichostema, Volkameria.</i>
Scuttellaroideae	<i>Scutellaria</i>
Lamioideae	<i>Stachys, Warnockia</i>
Nepetoideae	<i>Acanthomintha, Agastache, Asterohyptis, Catoferia, Chaunostoma, Clinopodium, Cunila, Hedeoma, Hypenia, Hyptis, Lepechinia, Marsypianthes, Monarda, Monardella, Neoeplingia, Ocimum, Physostegia, Pogogyne, Poliomintha, Prunella, Salvia.</i>
Genera Incertae Sedis	<i>Callicarpa</i>

Los géneros de la *Lamiaceae* mejor representados en el país son *Salvia*, *Scutellaria*, *Stachys* e *Hyptis*, con más de 35 especies cada uno (Cuadro 3).

Géneros con afinidad tropical como *Vitex*, *Callicarpa*, *Aegiphila* y *Volkameria*, que tienen amplia diversidad en Centro y Sudamérica, en México están representados por 5, 2, 9 y 2 especies, respectivamente. 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*.

Cuadro 3. Géneros de la familia *Lamiaceae*: riquezas y endemismo (Martínez-Gordillo, et al., 2013).

Género	Número de especies en el mundo	Número de especies en México	Número de especies endémicas	Porcentaje de endemismo (%)
<i>Acanthomintha</i>	4	1	0	0
<i>Aegiphila</i>	116	10	1	10
<i>Agastache</i>	22	12	5	41.6
<i>Asterohyptis</i>	4	4	3	75
<i>Callicarpa</i>	40	2	1	50
<i>Catoferia</i>	4	3	1	33.3
<i>Chaunostoma</i>	1	1	0	0
<i>Clinopodium</i>	100	14	10	71.4
<i>Cornutia</i>	12	1	0	0
<i>Cunila</i>	20	6	5	83.3
<i>Hedeoma</i>	42	29	21	72.41
<i>Hyperia</i>	23	1	1	100
<i>Hyptis</i>	280	35	17	48.5
<i>Lepechinia</i>	40	10	6	60
<i>Marsypianthes</i>	5 o 6	2	1	50
<i>Monarda</i>	17	6	3	50
<i>Monardella</i>	30	9	2	22.2
<i>Neoplingia</i>	1	1	1	100
<i>Ocimum</i>	30	3	0	0
<i>Physostegia</i>	12	2	0	0
<i>Pogogyne</i>	7	3	1	30
<i>Poliomintha</i>	8	8	5	62.5
<i>Prunella</i>	7	1	0	0
<i>Salvia</i>	900	307	232	75.57
<i>Scutellaria</i>	301	56	38	67.85
<i>Stachys</i>	300	41	29	70.7
<i>Tetraclea</i>	2	1	0	0
<i>Teucrium</i>	100	6	2	33.3
<i>Trichostema</i>	18	9	2	11.11
<i>Vitex</i>	250	4	2	50
<i>Volkameria</i>	25 o 30	2	0	0
<i>Warnockia</i>	1	1	0	0

Esta familia ha aportado importantes recursos para el viejo y nuevo mundo de la medicina, así como medicamentos en cocina regional que han sido de vital importancia. La gente por mucho tiempo le ha asignado importancia a los extractos o aceites esenciales de las Lamiaceae usados para antibacteriales, antivirales y actividades o usos espasmolíticos y carminativos. Los componentes químicos de los aceites de las labiadas y su explotación recientemente han empezado a ser revisados (Pereda-Miranda, 1995)

Estos aceites esenciales o esencias son secretados en las glándulas lisígenas que se encuentran generalmente en las hojas, en las flores, en los nectarios, en los frutos y en la corteza de las plantas. Las esencias, según Font-Quer (2000), son mezclas líquidas volátiles, que no dejan, a diferencia de los aceites grasos, manchas sobre el papel; poseen propiedades aromáticas que pueden tener diversos efectos sobre los organismos, en especial en los sentidos. Razón ésta por la que, en la medicina tradicional maya (Flores *et al.*, 1996) y en la de otras etnias del mundo, se han usado para tratar enfermedades relacionadas con los sentidos (oídos, olfato, gusto) o con el estado anímico o emotivo, enfermedades que antropólogos, etnobiólogos y etnobotánicos llaman filiales o del ánimo. Los componentes químicos de las esencias son muy diversos, pero la mayoría pertenecen al grupo de los terpenos, ya sean hidrocarburos o productos de oxidación como los alcanfores, que son los componentes odoríferos más importantes y que pueden tener efectos sobre algunos microorganismos.

En América, algunas especies de labiadas introducidas desde el viejo mundo son importantes económicamente hablando (pimienta y menta verde) como condimentos, especies, perfumes y remedios. También han jugado un papel importante en economías locales basadas en el intercambio de remedios vegetales, hierbas aromáticas, en los mercados de plantas medicinales. La familia de las labiadas ha aportado remedios importantes especialmente para tratamientos neurológicos, respiratorios, cardiacos y de desórdenes gastrointestinales (Pereda-Miranda, 1995).

Un reciente estudio de la botánica económica de las labiadas americanas arroja datos sobre usos tradicionales sobre esta familia por indígenas y culturas mestizas de México, el Caribe y Centro y Sur América. Un gran número de especies medicinales son usadas frecuentemente como remedios gastrointestinales, y sus usos son integrados dentro de sistemas culturales complejos (Pereda-Miranda, 1995).

Género *Hyptis*

Del griego *Hypo*, abajo, con relación a la posición del labio inferior de la corola. Es un género de c. 280 especies americanas, con mayor diversidad en Brasil. México cuenta con 35 especies repartidas en 8 de las 27 secciones reconocidas por Epling (1949). Son endémicas del país una sección y 17 especies. En México, se distribuye principalmente en las partes tropicales del sur y a lo largo de ambas costas. Son notables 3 de las 8 secciones presentes en México (*Rhytidea*, *Umbellatae* y *Laniflorae*): *H. rhytidea* es endémica desde Michoacán hasta Sinaloa e *H. pseudolantana* es endémica de Guerrero; de las 3 especies de la sección *Umbellatae*, 2 (*H. subtilis* y *H. iodantha*) se encuentran el centro de México y la tercera (*H. tafallae*) en Perú y Bolivia; la sección *Laniflorae* es casi endémica (5 de 6 especies) del país (Martínez-Gordillo, *et al.*, 2013).

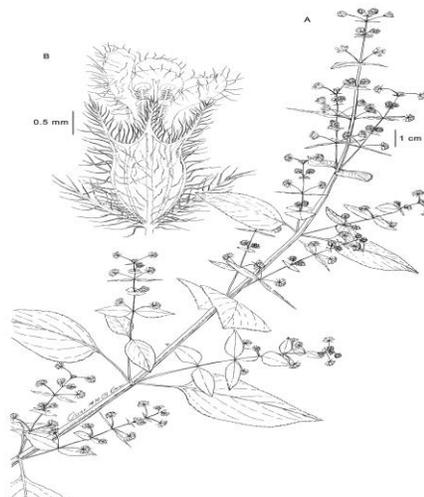


Figura 3. Ejemplo del género *Hyptis* (*Hyptis urticoides*)(Martínez-Gordillo, *et al.*, 2013).

Las 5 secciones no endémicas son: *Minthidium*, *Mesophaeria*, *Pectinaria*, *Polydesmia*, *Vulgares*, *Cephalophyptis* (subsecciones *Marrubiastrae* *Hyptis*) y *Pusillae*. Algunas especies son usadas para comida (semillas), para obtener aceite, madera y/o fibras. Recientemente, se publicó una propuesta nueva de clasificación, donde este género se subdivide en 4: *Cantinoa*, *Condea*, *Hyptis* y *Mesosphaerum* (Harley y Pastore, 2012).

Casi todas las especies del género *Hyptis* son importantes en la medicina popular mexicana por su considerable variedad de usos tradicionales, para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, infecciones de la piel, calambres y dolores musculares. El empleo de algunos miembros de las *Hyptis* se remonta hacia las civilizaciones mesoamericanas. El manuscrito del siglo XVI "Historia de las Plantas de la Nueva España" es un conteo de la herbolaria prehispánica escrita por el español Francisco Hernández, la "Huitsiquia" o "Xoxouhcapatli" se menciona como una efectiva planta medicinal para el tratamiento de la disentería o tumores.

Reumatismo, llagas e infecciones de los ojos también fueron aliviados con una decocción de esta hierba. Recientemente se ha sugerido que estos usos documentados del "Huitsiquia" por los purépechas en Michoacán, también conocido como "Xoxouhcapatli" por los aztecas en el centro de México representa una labiada medicinal probablemente en una especie *Hyptis* (Pereda-Miranda, 1995).

Son cinco las especies de *Hyptis* a las que se le atribuyen propiedades medicinales. Este género tiene un amplio espectro de uso en la Meseta Central, Montañas del Norte, Sierra Madre y Depresión Central. Son utilizadas contra la diarrea (*H. conferta*, *H. verticillata*), problemas menstruales (*H. mutabilis*), enfermedades respiratorias (*H. urticoides*), y hasta padecimientos de tipo traumatológico (*H. verticillata*) como son: inflamaciones, contusiones y heridas de los pies; además, a esta especie se le atribuyen propiedades para acelerar el trabajo de parto (Suarez-Ortíz, 2013) (Figura 3)

Hyptis pectinata

Popularmente conocida como la hierba del burro y con el nombre maya de “xoolte-xnuuk”, es una planta herbácea, con distribución pantropical y un amplio uso medicinal en Centroamérica. Su distribución en México incluye las regiones tropicales e intertropicales donde es valorada por sus cualidades medicinales y por sus propiedades para la cocina regional (Pereda-Miranda, 1995).

Hierba que es alta y tiene pelitos. Las hojas son en forma ovada y con los bordes en forma de sierrita. Las flores son blanquecinas y pequeñas, formando unas espigas largas (*Figura 4*).



Figura 4. *Hyptis pectinata* (Hernández, 2009; <http://www.marinelifephotography.com>).

Planta cosmopolita tropical; habita en clima cálido desde los 20 hasta los 70msnm. Asociada a vegetación perturbada de bosque tropical caducifolio. Se emplea en Yucatán contra ladisentería, para lo cual se muelen las partes subterráneas en seco, se le agrega azúcar, se cuele, y lo comen.

Las propiedades de la planta son usadas en medicina popular como remedios caseros para el tratamiento de fiebres, ciertas enfermedades de la piel, enfermedades gástricas, rinofaringitis, congestiones pulmonares y reumatismo. Es de calidad amarga (Zolla, C. y Argueta, A., 2009).

En el siglo XX, Maximino Martínez la señala como antirreumático (Zolla, C. y Argueta, A., 2009).

El extracto acuoso de las flores ejerce una acción molusquicida, al igual que el extracto metanólico de las hojas, aunque sólo una ligera actividad sobre *Bulinus globosus*. El aceite esencial obtenido de las hojas presentó una acción antibiótica contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichiacoli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiellapneumoniae* y *Streptococcus faecalis*.

La actividad antibiótica demostrada experimentalmente con esta planta, podría validar su aplicación en casos de disentería bacteriana. Se describe en la literatura que las hojas tienen una acción hemolítica en el hombre (Zolla, C. y Argueta, A., 2009).

El aceite esencial de las hojas de *Hyptis pectinata* contiene los monoterpenos camfeno, delta-car-3-ene, carvacrol, para-cimeno, limoneno, linalol, mirceno, beta-ocimeno, alfa y beta-pineno, sabineno, terpinen-4-ol, alfa y gama-terpineno, alfa-terpineol, terpinoleno, tujan-1-ol, alfa-tujan-2-ol, alfa-tujeno, iso-tujona, timol y su ester metílico; y los sesquiterpenos alfa-bergamoteno, óxido de cariofileno, alfa-copaeno, alfa humuleno, selina-4(11)-dieno y beta-salina (Zolla, C. y Argueta, A., 2009).

Además estudios químicos previos describen el aislamiento de cuatro 5,6 dihidro- α -pironas, la hiptólida y las pectinólidas A-C y una furona, la pectinólida H (Pereda Miranda, 1993, Fragoso-Serrano, 2004). De una colecta de la isla Barbados también se ha reportado el aislamiento de las pectinólidas D-G (Boalino, 2003).

HIPOTESIS

Con base en la información científica existente en la literatura donde se pone de manifiesto la gran variedad de compuestos con actividad biológica aislados de la especie *Hyptis pectinata* y con la ayuda de un adecuado monitoreo de una actividad biológica, el estudio químico de la especie que incluye: aislamiento, purificación, evaluación de la citotoxicidad en líneas celulares y elucidación estructural de las moléculas responsables de dicha actividad biológica, se espera que la investigación de una nueva colecta permitirá la búsqueda y la separación de nuevos compuestos con actividad biológica.

OBJETIVOS

Objetivo general

El objetivo general de este trabajo consistió en llevar a cabo un estudio fitoquímico biodirigido usando como ensayo de monitoreo de la actividad biológica la evaluación de la toxicidad de la especie *Hyptis pectinata* con la finalidad de obtener compuestos bioactivos y así poder realizar la comprobación de la información ya existente y poder contribuir al descubrimiento de novedosas moléculas con potencial anticancerígeno.

Objetivos específicos

- Preparación del extracto de acetona.
- Fraccionamiento preliminar del extracto orgánico.
- Evaluación de la citotoxicidad de las fracciones generadas a partir del fraccionamiento primario.
- Fraccionamiento secundario de al menos una de las fracciones más activa.
- Evaluación de la citotoxicidad utilizando líneas celulares provenientes de carcinomas humanos.
- Purificación mediante HPLC.
- Caracterización por RMN de los componentes presentes en las fracciones citotóxicas.

METODOLOGÍA

Equipos de Análisis.

Los espectros de resonancia magnética nuclear fueron registrados en la unidad de servicios de apoyo a la investigación (USAI) de la Facultad de Química, UNAM. Los espectros de RMN Protónica (^1H , 400 MHz) y de carbono-13 (^{13}C , 100 MHz) se generaron en los equipos Varían, modelos VNMRS y MR, utilizando CDCl_3 como disolvente. Los desplazamientos químicos (δ) se expresaron en partes por millón (ppm), usando como referencia interna la señal del tetrametilsilano (TMS)

Técnicas Cromatográficas

Cromatografía en Capa Fina (CCF)

Esta técnica se llevó a cabo en placas de aluminio recubiertas con sílica gel 60 F₂₅₄ marca Merck, la detección de los compuestos se llevó a cabo con una lámpara de luz UV a 254 nm (onda corta) y 365nm (onda larga). Como agente cromógeno se utilizó sulfato cerico amoniacal y calentamiento.

Cromatografía en Columna Abierta (CCA)

Esta técnica se empleó para llevar a cabo el fraccionamiento del extracto, empleando gel de Sílice 60 F₂₅₄ de marca Merck (con un tamaño de partícula de 0.063-0.0200 nm) como fase estacionaria y como fase móvil se utilizaron mezclas entre Hexano-Diclorometano-Acetona-Metanol, pasando por mezclas de Hexano- CH_2Cl_2 ; CH_2Cl_2 -Acetona y Acetona-MeOH en orden creciente de polaridad.

Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR)

La purificación de los compuestos citotóxicos se realizó a través de la cromatografía de líquidos de alta resolución en un equipo marca Waters (Waters Chromatography Division Milford, MA, EEUU) equipado con una bomba modelo 600E, un detector de UV de arreglo de diodos modelo 2996 y una válvula de recirculación de muestra y disolvente. La manipulación del equipo se realizó con el programa Empower 2 (Waters) para el control y procesamiento de los datos.

Material Vegetal

Para el desarrollo de esta investigación se utilizaron las partes aéreas (hojas, tallos y flores) de la especie *Hyptis pectinata*, recolectadas en camino al campo de tiro El Corso entrando por carretera a la Tinaja, municipio de Emiliano Zapata, estado de Veracruz, el 22 de octubre de 2009. La identificación y la recolección del material vegetal se realizó por la bióloga Adriana Hernández Rojas y un ejemplar fue depositado en el herbario del Instituto de Ecología, Xalapa, Veracruz-México (Hernandez-Rojas 111; XAL0000285).

Extracción del Material Vegetal

El material vegetal se dejó secar mediante exposición al aire libre a temperatura ambiente; una vez seco se pulverizó en un molino de cuchillas modelo Willey 4, obteniéndose 2793.4 g de material seco y molido; este material se sometió a una maceración con acetona (cuatro extracciones, con un periodo de 8-10 días).

Después de cada maceración, el extracto se filtró y se concentró a sequedad a presión reducida, obteniéndose 169.28 g de extracto verdoso.

Fraccionamiento Primario

La separación de los triterpenos del extracto total se llevó a cabo a través de extracciones sucesivas (*Diagrama 1*), por triplicado. Por cada 2 g de extracto se emplaron 75 mL de n-Hexano y 75 mL de una mezcla de MeOH-H₂O (4:1). Al suspender el extracto en la mezcla de disolventes se agito por espacio de 30 minutos. Las fases de MeOH acuoso fueron reunidas y concentradas a la cuarta parte; posteriormente, se realizaron extracciones sucesivas con CH₂Cl₂ y AcOEt, todas por triplicado. Cada una de las fases se concentró a presión reducida. De esta forma, se obtuvieron cuatro fracciones primarias cuyos rendimientos se resumen en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Peso de las fracciones primarias sin triperpenos.

<i>n</i> -hexano	57.15g
CH ₂ Cl ₂	20.04g
AcOEt	2.75g
Metanol	4.81g

Fraccionamiento secundario de la fracción de CH₂Cl₂.

El análisis de las fracciones (Cuadro 4) mediante CCF, RMN¹H y determinación de Cl₅₀, permitió seleccionar la fracción de CH₂Cl₂ para realizar su estudio químico. Para lo cual, se llevó a cabo un fraccionamiento en columna abierta con gel de sílice (400 g, porción 20:1). El proceso de elución se inició con n-hexano y posteriormente se utilizó un gradiente de n-hexano-CH₂Cl₂, CH₂Cl₂, CH₂Cl₂-acetona (5%, 10%, 15%, 20%), CH₂Cl₂-acetona (3:7, 1:1, 7:3), acetona, acetona-metanol (3:7, 1:1, 7:3), finalizando con metanol, obteniéndose un total de 49 eluatos, los cuales se analizaron mediante CCF para reunir a los eluatos tomando en cuenta su homogeneidad cromatografica. De esta forma se obtuvieron 11 conjuntos de fracciones (*Cuadro 5*). Estas 11 fracciones se analizaron nuevamente por CCF y se determinó su Cl₅₀.

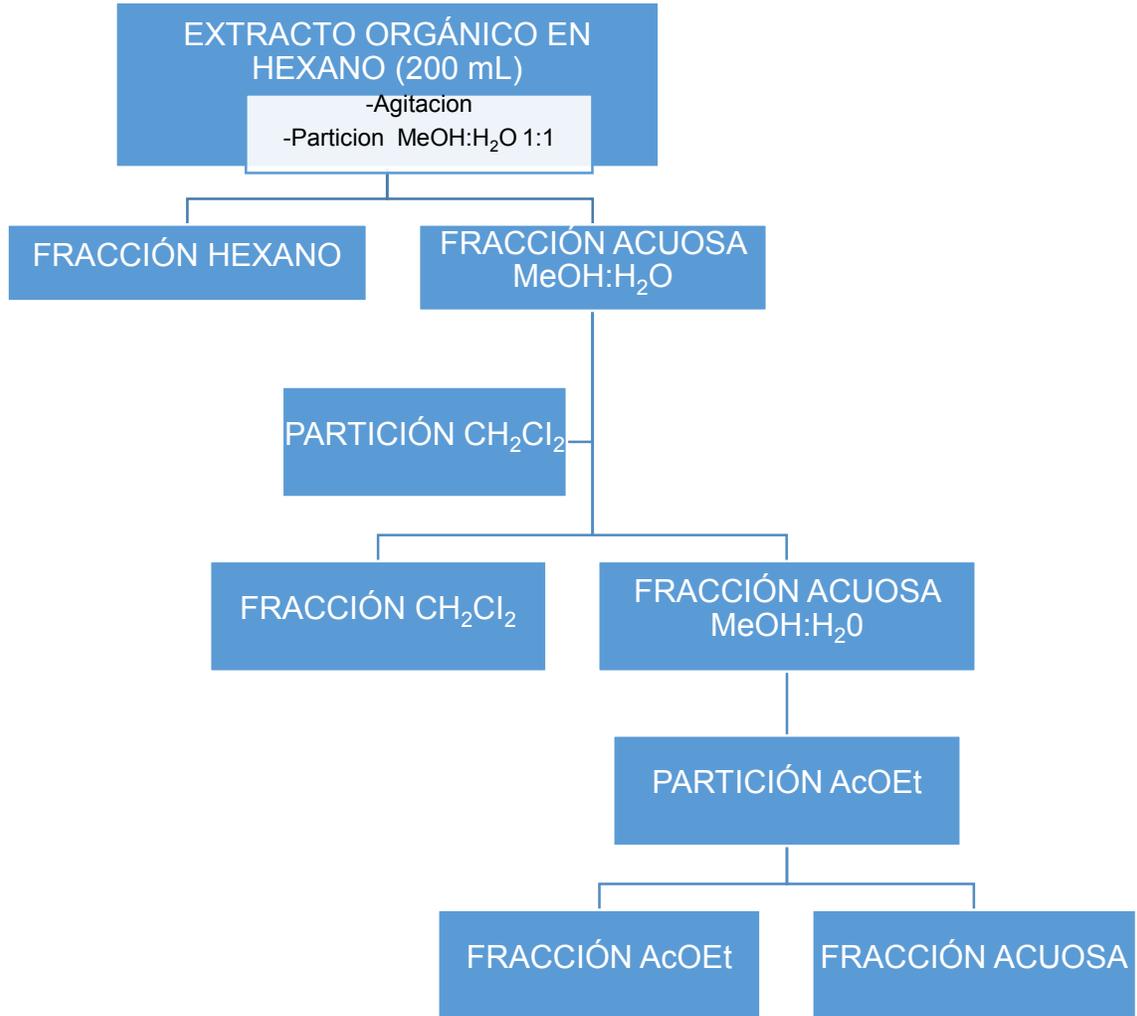


Diagrama 1. Fraccionamiento primario de la especie *Hyptis pectinata*

Análisis y purificación por HPLC

La fracción citotóxica se analizó en fase reversa utilizando un sistema isocrático y nivel analítico (5 μ L, 0,02mg/ μ L) y la separación se realizó utilizando de 40 a 50 mg de muestra en un volumen de 500 μ L; la detección se efectuó a una longitud de onda de 320nm. Los picos mayoritarios fueron separados y purificados empleando metanol como fase móvil con un flujo de 0.4 mL/min y 8.2 mL/min, en un sistema analítico y preparativo, respectivamente.

Cuadro 5. Fraccionamiento secundario de la fracción de CH₂Cl₂ de *Hyptis pectinata*.

Fase Móvil	Proporción (%)	Numero de Fracción	Fracciones combinadas	Clave
n-hexano	100	1	1-11	F1
n-hexano: CH ₂ Cl ₂	30:70	2-4	12	F2
	50:50	5-7	13-15	F3
	70:30	8-10	16-20	F4
CH ₂ Cl ₂	100	11-13	21-24	F5
CH ₂ Cl ₂ :(CH ₃) ₂ CO	95:5	14-16	25-27	F6
	90:10	17-19	28-32	F7
	85:15	20-22	33-34	F8
	80:20	23-25	35-38	F9
	30:70	26-28	39-41	F10
	50:50	29-31	42-49	F11
	70:30	32-34		
(CH ₃) ₂ CO	100	35-37		
(CH ₃) ₂ CO:MeOH	30:70	38-40		
	50:50	41-43		
	70:30	44-46		
MeOH	100	47-49		

De esta forma, se identificaron dos compuestos mayoritarios conocidos como la pectinólida A (**1**) y la pectinólida C (**2**) con tiempos de retención $t_r = 10.78$ minutos y $t_r = 7.58$ minutos, respectivamente.

Pectinólida A: aceite incoloro [α]_D +202 ($c = 0.15$ g/mL, MeOH)

RMN¹H (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'). RMN¹³C (100 MHz, CDCl₃) 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 [α]_D+81 ($c = 0.76$ g/mL, MeOH)

RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) 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'). RMN¹³C (100 MHz, CDCl₃) 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').

Ensayo de citotoxicidad

Líneas Celulares

Se utilizaron dos líneas celulares derivadas de cáncer humano: carcinoma de mama (MCF-7), y carcinoma de colon (HCT-15). Estas líneas se conservaron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino. Todas las líneas se cultivaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5% en aire y 100% de humedad relativa.

Dilución de las muestras

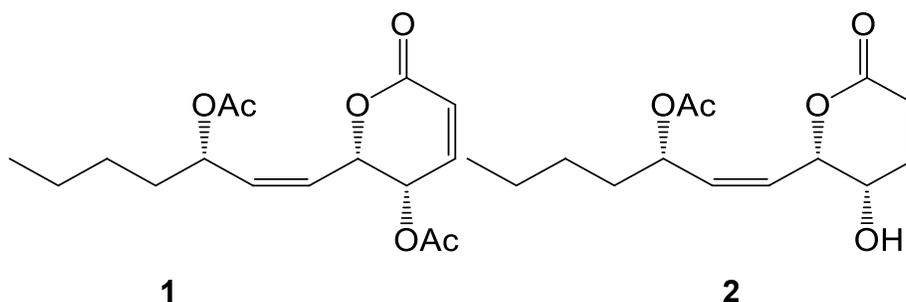
El ensayo se llevó a cabo en micro placas de 96 pozos con una capacidad de 250 μL cada uno y se realizó utilizando células en fase logarítmica. Las muestras se aplicaron por triplicado en distintas concentraciones (25, 5 y 0.5 $\mu\text{g/mL}$).

Bioensayo

Las cajas se incubaron durante 72 horas a 37 °C en atmosfera de 100% humedad y 5% de CO_2 , transcurrido el tiempo de incubación se realizó la fijación celular por medio de la adición de 100 μL de ácido tricloroacético (TCA), incubando 30 minutos en refrigeración, enseguida se decantó el TCA y se lavó por tres ocasiones con agua, se dejó secar la microplaca a temperatura ambiente y se hizo una tinción con 100 μL de sulforodamida B a temperatura ambiente por 30 minutos; posteriormente se eliminó el exceso de colorante lavando con una solución de ácido acético al 1%, y se dejó secar la palca. Finalmente, para poder realizar la lectura, se adicionaron 200 μL de TRIS (tris-hidrometil-aminometano) y se agito la placa por 5 minutos; el TRIS solubiliza el color impregnado en las células que crecieron en la microplaca para realizar la lectura de densidad óptica en un lector de placas a una longitud de onda de 564 nm. Los resultados obtenidos se expresan como la concentración que inhibe el 50% del control de crecimiento después del periodo de incubación (CI_{50}). La vinblastina se utilizó como un control positivo (Skehan *et al.*, 1999).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se aislaron dos 5,6-dihidro- α -pironas que fueron identificadas como la pectinólida A (1) y la pectinólida C (2), las cuales ya habían sido descritas previamente para esta misma especie (Pereda-Miranda *et al*, 1993).



El aislamiento de estos compuestos se logró a partir de la obtención del extracto orgánico total de Acetona a partir de las partes aéreas de *Hyptis pectinata*, empleando una maceración exhaustiva.

Este extracto se sometió a un fraccionamiento primario mediante un proceso de reparto para generar cuatro fracciones y se evaluó la actividad citotóxica de cada una de ellas (Cuadro 6). Los protocolos para la evaluación del potencial citotóxico de extractos vegetales y fracciones, consideran como una actividad significativa aquellos valores de concentración inhibitoria media (CI_{50}) menores a 25 $\mu\text{g/mL}$ (Cordell *et al.*, 1991).

Cuadro 6. Ensayo de citotoxicidad de los extractos y fracciones de *Hyptis pectinata* empleando HCT-15 y MCF-7 (CI_{50} , $\mu\text{g/mL}$)

Fracción	HCT-15*	MCF-7*
Diclorometano	3.4	1.4
Hexano	17.5	24.9
AcOEt	10.2	>25
Metanol	>25	>25

*HCT-15: Carcinoma de colon, MCF-7: Carcinoma de mama

De acuerdo con los resultados obtenidos en el bioensayo, la actividad biológica se concentraba en la fracción de diclorometano. El registro de los espectros de RMN ^1H de esta fracción confirmó su selección para continuar con el estudio químico. En las Figuras 5 y 6 se presentan los espectros de las fracciones de diclorometano y acetato de etilo, donde se observan las señales características para derivados de 5,6-dihidro- α -pironas.

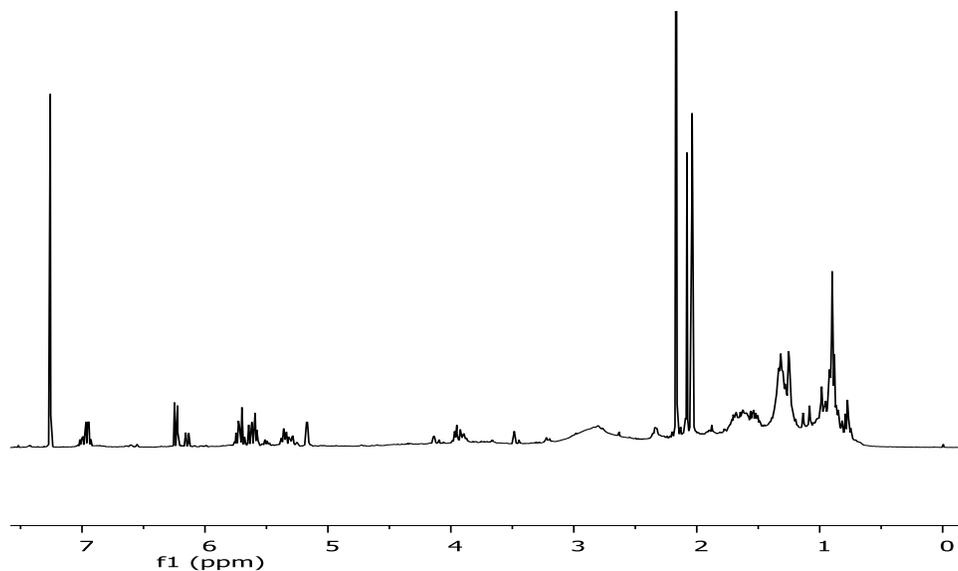


Figura 5. Espectro de RMN ^1H (300 MHz) de la fracción de diclorometano.

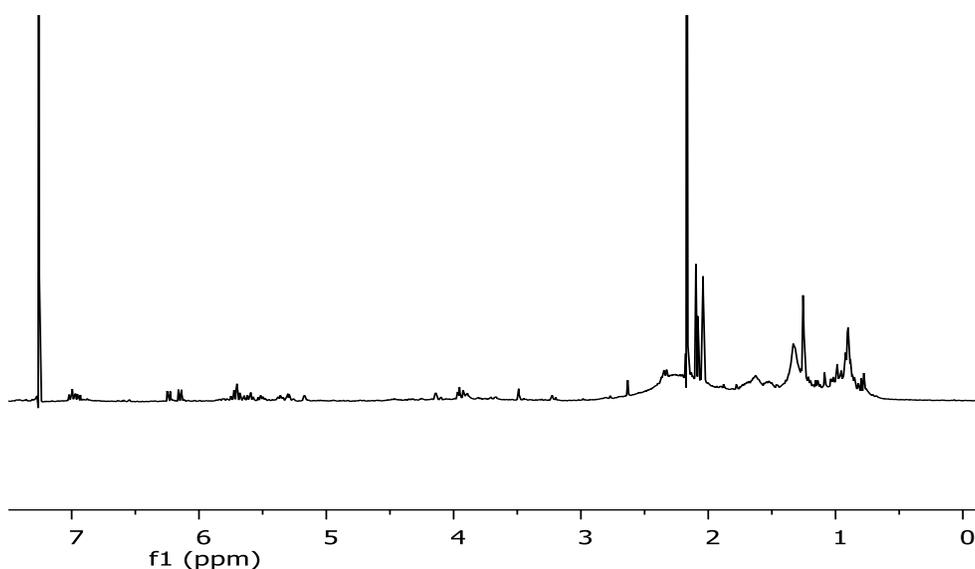
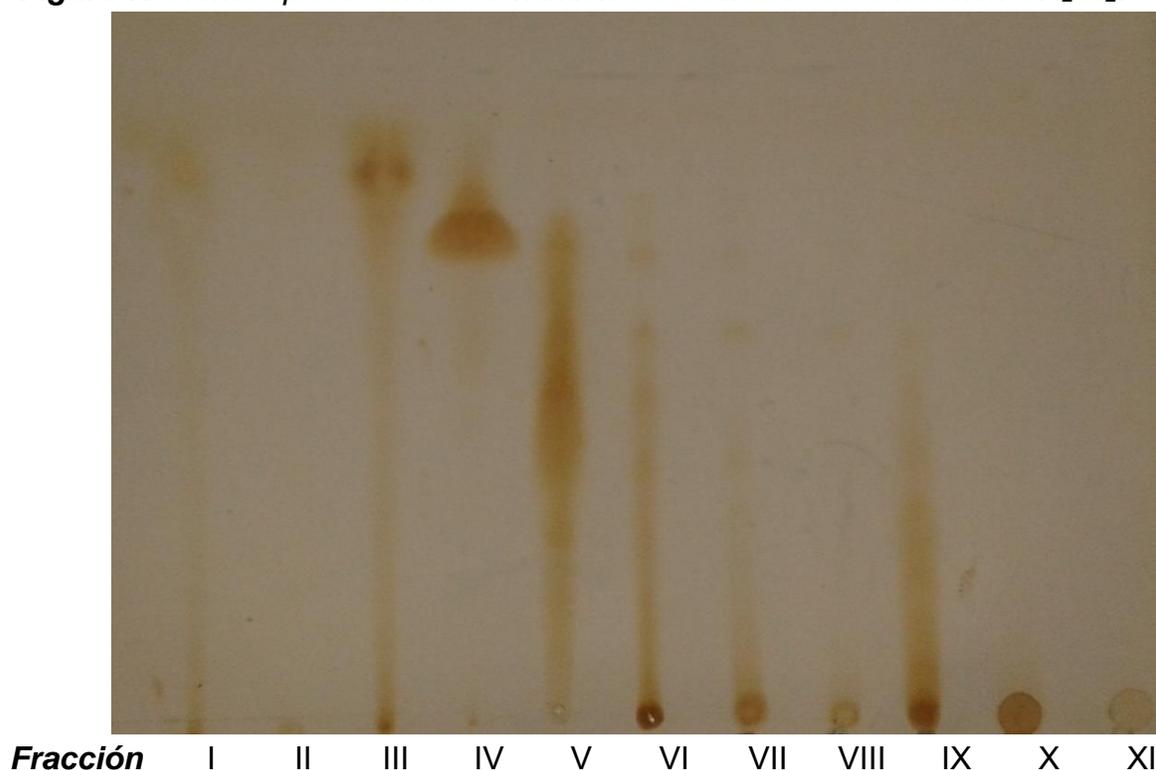


Figura 6. Espectro de RMN ^1H (300 MHz) de la fracción de acetato de etilo.

El fraccionamiento secundario de la fracción de CH₂Cl₂ mediante cromatografía de columna abierta utilizando gel de sílice generó un total de 49 fracciones primarias (ver Cuadro 5, sección experimental). Estas fracciones se reunieron en 11 conjuntas tomando en cuenta su similitud cromatográfica por la técnica de cromatografía en capa fina (*Figura 7*).

Figura 7. Cromatoplaqueta del fraccionamiento secundario de la fracción CH₂Cl₂.



Cada una de estas fracciones se evaluaron para establecer su potencial citotóxico y determinar en qué fracción se concentraba la mayor actividad (*Cuadro 7*), también se registraron espectros de RMN ¹H, (Fracciones IV a VI, Figuras 8 a 10), de estas fracciones.

Cuadro 7. Ensayo de citotoxicidad de las 11 fracciones secundarias de *H. pectinata*.

Fracción	Peso (mg)	MCF7
I	40	>25
II	30	>25
III	40	17.6
IV	2450	<0.05 *
V	970	<0.05*
VI	860	5.5*
VII	370	>25
VIII	50	>25
IX	2870	>25
X	1330	>25
XI	370	>25

*Fracciones activas.

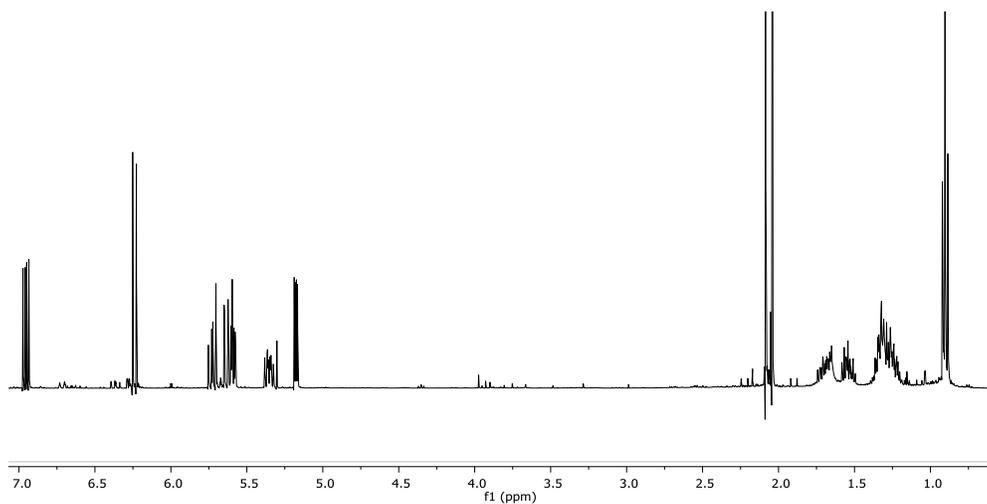


Figura 8. Espectro de RMN ¹H de la fracción IV (300 MHz, CDCl₃).

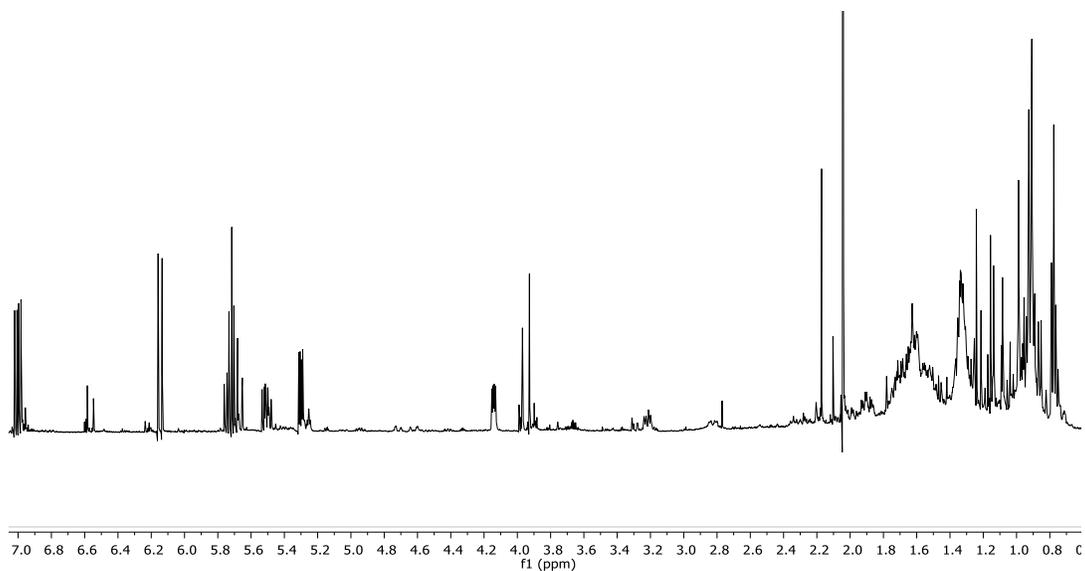


Figura 9. Espectro de RMN ^1H de la fracción V (300 MHz, CDCl_3).

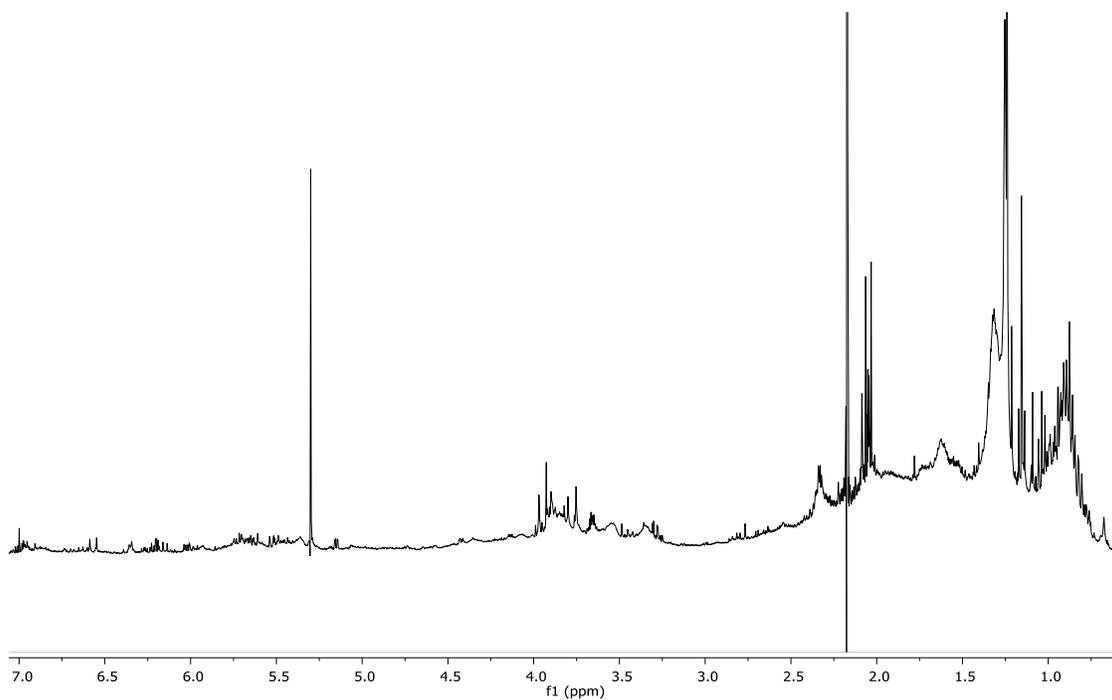


Figura 10. Espectro de RMN ^1H de la fracción VI (300 MHz, CDCl_3).

En estos espectros, se observan señales en aproximadamente $\delta_{\text{H}}6.9$ y 6.2 ppm correspondientes a los protones en las posiciones 4 y 3 respectivamente de una 5,6-dihidro-alfa-pirona, la señal en $\delta_{\text{H}}5.2$ ppm (dd), que corresponde a una doble ligadura, confirma que la posición H-5 se encuentra sustituida. Otra señal diagnóstica puede observarse en 0.9 ppm en forma de triplete que corresponde al metilo en la posición 7' de la cadena lateral.

A continuación se seleccionaron a las fracciones (F-IV y F-V), de mayor actividad citotóxica para su análisis. En la fracción F-IV se detectó a la pectinólida A como constituyente mayoritario. Para llevar a cabo la purificación de la fracción F-V se utilizó a la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), buscando las condiciones adecuadas de separación a nivel analítico en una columna C_{18} . Como sistema de elución se utilizó metanol; posteriormente, las condiciones seleccionadas fueron escaladas a nivel preparativo, inyectando 50 mg de muestra en 500 μL de MeOH.

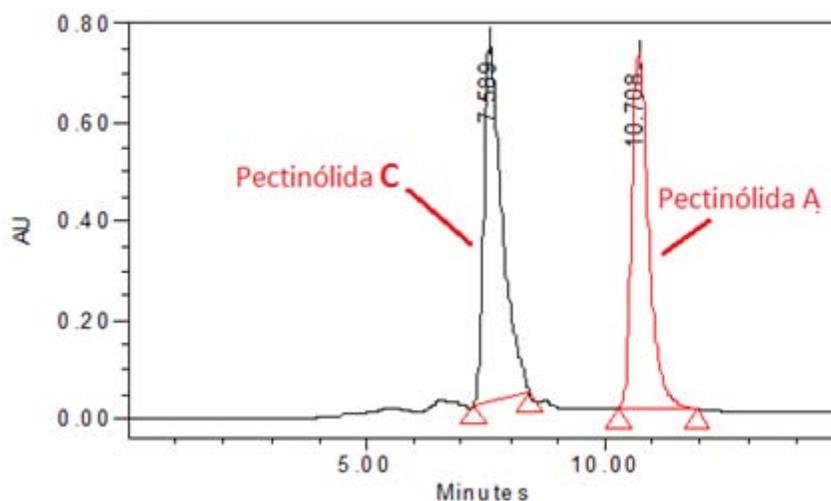


Figura 11. Cromatograma de líquidos a nivel analítico de la fracción F-V que ilustra la separación de las pectinólidas A y C. Condiciones cromatográficas: columna de fase reversa C_{18} ($5 \mu\text{m}$, $4.6 \times 250\text{mm}$); detector de arreglo de diodos (320 nm); fase móvil: MeOH; flujo: 0.4 mL/min.

El primer pico se identificó como la pectinólida C (**2**) (aceite incoloro transparente, t_r 7.59 min, 15.4 mg) y el segundo pico como la pectinólida A (**1**) (aceite incoloro transparente, t_r 10.71 min, 10.3 mg) (Figura 11). Las estructuras de estos compuestos se determinaron mediante la comparación de los espectros de ^1H -RMN obtenidos con aquellos descritos en la literatura (Pereda-Miranda *et al*, 1993).

CONCLUSIONES

- El presente estudio químico de la especie *Hyptispectinata* permitió el aislamiento de dos 5,6-dihidro- α -pironas, las cuales habían sido previamente aisladas a partir de la misma especie y caracterizadas como la pectinólida A (1) y la pectinólida C (2).
- Con el trabajo realizado se puso de manifiesto la utilidad de llevar a cabo un estudio fitoquímico biodirigido en la re-investigación química de la especie *Hyptis pectinata* con la finalidad de obtener compuestos con actividad y así poder realizar la comprobación de la información existente y poder contribuir al descubrimiento de novedosas moléculas citotóxicas.
- Se detectó a la fracción activa F-VI, como fuente de otros derivados de tipo 5,6-dihidro-alfa-pirona minoritaria en la fracción VI y este hallazgo constituye una perspectiva del presente trabajo de investigación.

BIBLIOGRAFÍA

- Arellano-Rodríguez, J. A.; Flores Guido, J. S.; Tun G. J.; Cruz B. M. M. (2003). Nomenclatura, forma de vida, uso, manejo y distribución de las especies vegetales de la Península de Yucatán. Etnoflora yucateca. Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida. México. 815 pp.
- Benth, G. (1832-1836). *Labiatarum Genera et Species*. J. Ridgway & Sons. London. 783 pp.
- Briquet, J. (1895-1897). Labiatae. *In Die natürlichen Pflanzenfamilien*, A. Engler y K. Prantl (eds.). W. Engelmann. Leipzig. pp.183-375
- 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.
- Cantino, P. D.R. M. Harley y S. J. Wagstaff. (1992). Genera of Labiatae: status and classification. *In Advances in Labiatae Sciences*, R. M. Harley y T. Reynolds (eds.). Royal Botanic Gardens, Kew. pp. 511-522.
- Cordell, G. A.; Beecher, C. W.; Pezzuto, J. M. (1991). Can ethnopharmacology contribute to the development of new anticancer drugs? *Journal of Ethnopharmacology* **32** , 117-133.
- Erdtman, G. (1945). Pollen morphology and plant taxonomy. IV. Labiatae, Verbenaceae, Avicenniaceae. *Svensk Botanisk Tidskrift* **39**: 279-285.
- Flores, S. J.; Canto-Aviles, C. O. G.; Flores-Serrano, G. A. (2001). Plantas de la flora yucateca que provocan alguna toxicidad en el humano. *Rev Biomed* **12**:86-96.
- Flores G. S.; Flores A. S.; Pérez M. J. (1996). The secretions and exudates of plants used in traditional Medicine. *J. Herbs Spices & Medicinal Plants* **4**: 53-59.
- Flores, G. S.; Flores A. S.; Pérez M. J. (2009). Las Plantas del Nuevo Mundo y su amplísima utilización en la Medicina tradicional desde los tiempos precolombinos. *Revista Biomedicina*, **20**(1): 1-4.

- Fragoso-Serrano, M; Gibbons, S; Pereda-Miranda, R. (2004). Anty-Staphylococcal and cytotoxic compounds from *Hyptis pectinata*. *Planta Médica* **71** (3): 278-280.
- Font Quer (2000). Diccionario de Botánica. Editorial Península. Barcelona. España
- Harley, R. M y Pastore J. F. B. (2012). A generic revision and new combinations in the *Hyptidinae* (Lamiaceae), based on molecular and morphological evidence. *Phytotaxa* **58**:1-55.
- Heywood, (2000). Las plantas con flores. Editorial Reverté. S.A. Barcelona, España
- Laboratorio Digital de Sistema de Plantas Vasculares, Departamento de Ecología & Ciencias Ambientales, Facultad de Ciencias. <http://www.thecompositaehut.com>. (Consultado el 15 de Agosto del 2015).
- Leal-Luna José Luis (2014). Aislamiento de compuestos bioactivos a partir de *Hyptis spicigera*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Marine Life Photography <http://www.marinelifephotography.com> (Consultado el 23 de Septiembre del 2015).
- Martínez-Fructuoso Lucero (2012). Evaluación citotóxica del extracto clorofórmico de *Hyptis pectinata*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Martínez-Gordillo, M.; Fragoso-Martínez, I.; García-Peña, R.; Montiel, O. (2013). Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. **84** (1): 30-86.
- Pereda-Miranda, R; Hernandez, L; Villavicencio, M, J; Novello, R, Ibarra, P; Chai, H y Pezzuto, M. J (1993). Structure and stereochemistry of pectinolides A-C, nobel antimicrobial and cytotoxic 5,6-dihidro- 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. 84-85.
- Suarez- Ortiz Gloria Alejandra. (2013). Caracterización estructural y análisis conformacional de 6-heptenil-5,6-dihidro-2H-piran-2-onas de origen vegetal. Tesis de Doctorado. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Wolf, R. E. (1983) Pueblos y culturas de Mesoamérica. Ed. ERA, México, pp. 250.
- Zolla, C.; Argueta, A. (2009) Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, México, Universidad Nacional Autónoma de México. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>.