



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**MONITOREO DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE LOS EXTRACTOS OBTENIDOS  
DE LAS PARTES AÉREAS DE LA PLANTA *HYPTIS VERTICILLATA***

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**EDUARDO ARTURO ORENDAIN ADALID**



**MÉXICO D. F.**

**2016**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **Profesor: AGUILAR LAURENTS MARIA ISABEL**

**VOCAL:**               **Profesor: MATA ESSAYAG RACHEL**

**SECRETARIO:**       **Profesor: FRAGOSO SERRANO MABEL CLARA**

**1er. SUPLENTE:**      **Profesor: DEL VALLE PÉREZ PAULINA**

**2° SUPLENTE:**       **Profesor: PEREDA MIRANDA ROGELIO GREGORIO**

## **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:**

**EDUARDO ARTURO ORENDAIN ADALID**

## Índice

<b>1. Introducción</b> .....	1
<b>2. Antecedentes</b> .....	3
2.1 Generalidades de la familia Lamiaceae y del género <i>Hyptis</i> .....	3
2.2 <i>Hyptis verticillata</i> .....	4
2.2.1 Descripción y características botánicas .....	4
2.2.2 Clasificación taxonómica .....	6
2.2.3 Distribución .....	6
2.2.4 Usos tradicionales .....	7
2.3 Lignanos del tipo 1-ariltetrahydro-naftaleno .....	8
2.3.1 Características generales .....	8
2.3.2 Biosíntesis .....	11
2.3.3 Lignanos 1-ariltetrahydro-naftaleno aislados de <i>Hyptis verticillata</i> .....	13
2.3.4 Acciones y mecanismos farmacológicos de los lignanos 1-aril-tetrahydro-naftaleno .....	18
2.4 Otros compuestos encontrados en <i>Hyptis verticillata</i> .....	22
<b>3. Justificación</b> .....	23
<b>4. Objetivos</b> .....	24
4.1 Objetivo general .....	24
4.2 Objetivos particulares .....	24
<b>5. Procedimiento experimental</b> .....	25
5.1 Material vegetal .....	25
5.2 Extracción del material vegetal .....	25
5.3 Fraccionamiento de los extractos crudos .....	25
5.4 Cromatografía en capa fina (CCF) de los extractos crudos .....	27
5.5 Proceso de decoloración .....	27
5.6 Ensayo de citotoxicidad .....	27
5.7 Purificación de los extractos mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) .....	28
5.7.1 Metodología en modo analítico .....	29
5.7.2 Metodología en modo preparativo .....	29
5.7.3 Preparación de muestras .....	31
5.8 Obtención de espectros RMN- <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C .....	31
5.9 Purificación y caracterización de fracciones mediante CLAR-Espectrometría de masas (EM) .....	31

<b>6. Resultados y discusión</b> .....	33
6.1 Pesos y rendimiento de los extractos y fracciones de <i>H. verticillata</i> .....	33
6.2 CCF de los extractos y fracciones .....	34
6.3 Concentración inhibitoria media (CI <sub>50</sub> ) de los extractos y fracciones.....	36
6.4 Cromatogramas de los extractos seleccionados.....	37
6.4.1 Cromatogramas en modo analítico .....	37
6.4.2 Cromatogramas en modo preparativo.....	41
6.5 Pesos y rendimientos de las subfracciones obtenidas.....	42
6.6 Concentración inhibitoria media (CI <sub>50</sub> ) de las subfracciones obtenidas.....	43
6.7 Espectros de RMN- <sup>1</sup> H de las subfracciones de HvF6dec.....	44
6.8 Espectros de RMN- <sup>13</sup> C de las subfracciones de HvF6dec.....	46
6.9 CCF de las subfracciones obtenidas de HvF3.....	47
6.10 CCF de las subfracciones obtenidas de HVF6 .....	47
6.11 Análisis por CLAR-EM.....	50
6.11.1 Cromatograma y EM de las subfracciones HvF3 .....	51
6.11.2 EM de las subfracciones HvF6.....	57
7. Conclusiones.....	61
<b>8. Perspectivas</b> .....	62
<b>9. Bibliografía</b> .....	63

## Índice de figuras

Figura 1. Características generales de <i>Hyptis verticillata</i> .....	5
Figura 2. Ácido guayarático y estructura básica de los lignanos (C8-C8').....	9
Figura 3. Estructura general de los lignanos 1-ariltetrahidro-naftaleno más comunes y sus derivados glucosídicos.....	10
Figura 4. Biosíntesis propuesta de la podofilotoxina y de los demás lignanos 1-ariltetrahidro-naftaleno.....	12
Figura 5. Etopósido y Tenipósido.....	19
Figura 6. Resumen de los mecanismos de inhibición de la podofilotoxina y sus análogos con sustituyentes voluminosos en el ciclo celular.....	20
Figura 7. Estructuras de los compuestos distintos al grupo de los lignanos aislados de <i>Hyptis verticillata</i> .....	22
Figura 8. Resumen del proceso de extracción y fraccionamiento de las partes aéreas de <i>H. Verticillata</i> .....	26
Figura 9. Perfil en CCF de las fracciones finales con la $\alpha$ -peltatina como referencia.....	35
Figura 10. Cromatograma correspondiente a la $\alpha$ -peltatina.....	37
Figura 11. Cromatograma correspondiente a la podofilotoxina.....	38
Figura 12. Cromatograma analítico de la fracción HvF3 (hexano).....	39
Figura 13. Cromatograma analítico de la fracción HvF6 (AcOEt).....	39
Figura 14. Cromatograma analítico de la fracción decolorada HvF6dec.....	40
Figura 15. Cromatograma preparativo de la fracción HvF3.....	41
Figura 16. Cromatograma preparativo de la fracción HvF6.....	42
Figura 17. Espectro de RMN- <sup>1</sup> H de la fracción HvF6-4dec.....	46
Figura 18. Espectro de RMN- <sup>13</sup> C de la fracción HvF6-12dec.....	47
Figura 19. Perfil en CCF de las subfracciones purificadas por CLAR de HvF3 (hexano).....	48
Figura 20. Perfil en CCF de las subfracciones purificadas por CLAR de HvF6 (AcOEt).....	49
Figura 21. Patrón de fragmentación para las ariltetralinas mediante ionización por electrospray.....	51

Figura 22. Cromatograma de la subfracción HvF3 generado por CLAR-EM.....	52
Figura 23. Espectro de electrospray de la podofilotoxina (tr 3.91min) .....	53
Figura 24. Espectro de electrospray de la deshidropodofilotoxina (tr 4.27 min).....	54
Figura 25. Espectro de electrospray de la desoxipodofilotoxina (tr 4.46 min).....	55
Figura 26. Espectro de electrospray de la yateina (tr 4.78 min).....	56
Figura 27. Espectro de electrospray de la 5-metoxideshidropodofilotoxina (tr 4.87 min).	57
Figura 28. Espectro de electrospray del glucósido de la $\beta$ -peltantina (tr 3.08 min) .....	58
Figura 29. Espectro de electrospray de la sideritoflavona (tr 3.94 min).....	59

## Índice de cuadros

Cuadro 1. Clasificación taxonómica detallada de la planta en estudio <i>Hyptis verticillata</i> ...	6
Cuadro 2. Lignanos caracterizados en <i>Hyptis verticillata</i> hasta 2012.....	14
Cuadro 3. Condiciones experimentales en el modo analítico.....	29
Cuadro 4. Condiciones experimentales en el modo preparativo.....	30
Cuadro 5. Pesos finales y rendimiento de los extractos definitivos con respecto al material vegetal original.....	33
Cuadro 6. Valores de concentración inhibitoria media (CI <sub>50</sub> ) de los extractos y fracciones contra diferentes líneas derivadas de carcinomas humanos.....	36
Cuadro 7. Pesos obtenidos en gramos de todas las subfracciones, así como su porcentaje de rendimiento con respecto al material vegetal inicial.....	43
Cuadro 8. CI <sub>50</sub> de las subfracciones de HvF3 y HvF6 contra las líneas celulares de carcinoma mamario sensible y resistente a vinblastina (V <sup>+</sup> ).....	44
Cuadro 9. Señales de RMN- <sup>1</sup> H principales para los lignanos 1-ariltetrahidro-naftaleno...	45
Cuadro 10. Iones característicos en EM-ESI modo negativo para algunos compuestos citotóxicos de <i>Hyptis verticillata</i> .....	50
Cuadro 11. Compuestos identificados en la colecta de <i>Hyptis verticillata</i> .....	60



## Lista de abreviaturas

<b>Abreviatura</b>	<b>Significado</b>
$\delta$	Desplazamiento químico
AcOEt	Acetato de etilo
CCF	Cromatografía en capa fina
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
CH <sub>3</sub> CN	Acetonitrilo
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria media
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
EM	Espectrometría de masas
L-Phe	L-fenilalanina
m/z	Relación masa/carga
MeOH	Metanol
nm	Nanómetros
ppm	Partes por millón
QP	Químicamente puro
RA	Reactivo analítico
R <sub>f</sub>	Factor de retención
RMN- <sup>13</sup> C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN- <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear Protónica
SRB	Sulforodamida B
t <sub>R</sub>	Tiempo de retención
TMS	Tetrametilsilano

## 1. Introducción

Dentro de las plantas superiores, las especies del género *Hyptis* (Lamiaceae) representan un importante recurso de compuestos bioactivos. Estos son conocidos por su amplio rango de actividades de uso terapéutico, como la antimicrobiana y anticancerígena, principalmente.<sup>1</sup>

*Hyptis verticillata* es una de las plantas medicinales más importantes en América Central gracias a su larga historia sobre sus usos tradicionales que datan desde las antiguas civilizaciones mayas y aztecas; no hay indicios del uso de esta planta fuera de su área de distribución geográfica.<sup>1</sup> Las extracciones alcohólicas de la hierba martina, como se conoce en el sureste de México a esta planta, se aplican para infecciones cutáneas e inflamación y para la eliminación de verrugas. Este uso recuerda al uso tradicional de *Podophyllum peltatum*, fuente de la podofilotoxina, por los nativos norteamericanos.

Entre 1948 y 2001, *Hyptis verticillata* fue identificada como una de las 18 especies de plantas con actividad farmacológica significativa y una de las siete más bioactivas de una lista de 334 plantas con propiedades medicinales de acuerdo a una investigación realizada en la Universidad de las Indias Occidentales (University of the West Indies), Mona, Jamaica.<sup>1,2</sup>

Estudios farmacológicos han demostrado actividad significativa que apoyan el uso tradicional de *Hyptis verticillata* como antiinflamatorio, antimicrobiano y modulador de la secreción hormonal; además, los estudios han identificado actividad anticancerígena, antihelmíntica, expectorante, acaricida, insecticida y moluscicida.<sup>1,12</sup> Siendo los lignanos (de los que se hablará más adelante), algunos sesquiterpenos y triterpenos, ciertos flavonoles, como la sideritoflavona, el ácido rosmarínico, y la cadina-4,10(15)-dien-3-ona, los compuestos responsables de las acciones farmacológicas mencionadas anteriormente.<sup>2,3</sup>

Las plantas que contienen lignanos han sido usadas desde hace aproximadamente mil años en medicina tradicional; así se ha registrado en las culturas china, japonesa en el mundo oriental.<sup>4</sup>

Los lignanos del tipo 1-ariltetrahidro-naftalenos están entre los compuestos mejor conocidos por la actividad citotóxica, antimutagénica, antitumoral y antimetástática de los extractos, tanto acuosos como orgánicos polares de *Hyptis verticillata*. Sin embargo, esta actividad puede no ser específica contra una línea celular. De esta clase de compuestos citotóxicos, diecisiete son constituyentes conocidos en esta especie y otras como las del género *Podophyllum* (Berberidaceae). En tanto que son cuatro los principios de más reciente descubrimiento, la 5'-metoxidehidropodofilotoxina y el deshidro- $\beta$ -peltatina metil éter fueron aislados y caracterizados de una colecta mexicana y posteriormente de un espécimen jamaicano, la hiptinina ha sido completamente caracterizada en estudios independientes a partir del extracto metanólico de las partes aéreas de la planta.<sup>1,5</sup> Más recientemente, investigadores japoneses identificaron un nuevo lignano en plantas originarias de Jamaica, inicialmente llamado 4-MTDND; abreviatura de 4-metoxi-9-(3,4,5-trimetoxifenil)-8,9-dihidrofuro[3',4':6,7]-nafto[2,3-D][1,3]dioxol-6(5H)-ona, nombrado finalmente hiptósido.<sup>1,6,7</sup>

Así, el uso intensivo en la medicina herbolaria hace de los lignanos una importante familia de compuestos que sirven de esqueletos básicos para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos basados en modificaciones estructurales de dichos compuestos.<sup>4</sup>

## 2. Antecedentes

### 2.1 Generalidades de la familia Lamiaceae y del género Hyptis

Las plantas pertenecientes a la familia Lamiaceae presentan una amplia variedad de taxones medicinales, debido a su alto contenido en aceite esencial que les confieren propiedades espasmolíticas y carminativas. Entre ellos destacan la lavanda (*Lavandula angustifolia*), el toronjil (*Melissa officinalis*), la menta (*Mentha spicata*), la salvia (*Salvia officinalis*), el romero (*Rosmarinus officinalis*) y el tomillo (*Thymus vulgaris*), siendo importante su presencia en la culinaria.<sup>3,8</sup> La mayoría de los taxones de esta familia son hierbas o arbustos aromáticos anuales o perennes; sus flores son bisexuales, cigomórficas, dispuestas en espigas terminales, con cinco sépalos fusionados, cinco pétalos generalmente cigomórficos, 4 a 2 estambres. Todas las especies tienen hojas dispuestas de forma opuesta simple o raramente pinadas que cuentan con finos pelos al igual que otras partes aéreas que sirven de glándulas para la secreción de los aceites esenciales.<sup>8</sup> Es una familia de distribución cosmopolita con 200 géneros y de 3000 a 5600 especies, pero su centro de distribución está mejor caracterizado en el mediterráneo y Asia central.<sup>3</sup>

Además de los aceites esenciales, hay metabolitos secundarios abundantes en la familia entre los que destacan diterpenos, triterpenos, saponinas, algunos alcaloides pirrolidínicos y piridínicos, polifenoles (lignanós), taninos, iridoides (monoterpenoides glicosídicos), quinonas, cumarinas y por último gran cantidad de los azúcares rafinosa y estaquiós.<sup>3,8</sup>

En cuanto al género *Hyptis*, éste se compone de una gran diversidad en la forma vegetativa desde anuales efímeras hasta subarbustos o hierbas perennes, naciendo a menudo de un tallo leñoso; hojas también variables, predominantemente ovaladas, pecioladas o sésiles; flores predominantemente en capítulos globosos o hemisféricos generalmente pedunculados, raramente solitarias, opuestas o dispuestas en panojas difusas. Las características más uniformes vienen siendo la corola y el cáliz; este último, generalmente, en la

antesis, pero llega a ser diverso en la longitud relativa de sus dientes y en el fruto. El género se compone de 301 especies distribuidas desde el sur de Estados Unidos hasta Argentina.<sup>9</sup>

## **2.2 *Hyptis verticillata***

### **2.2.1 Descripción y características botánicas**

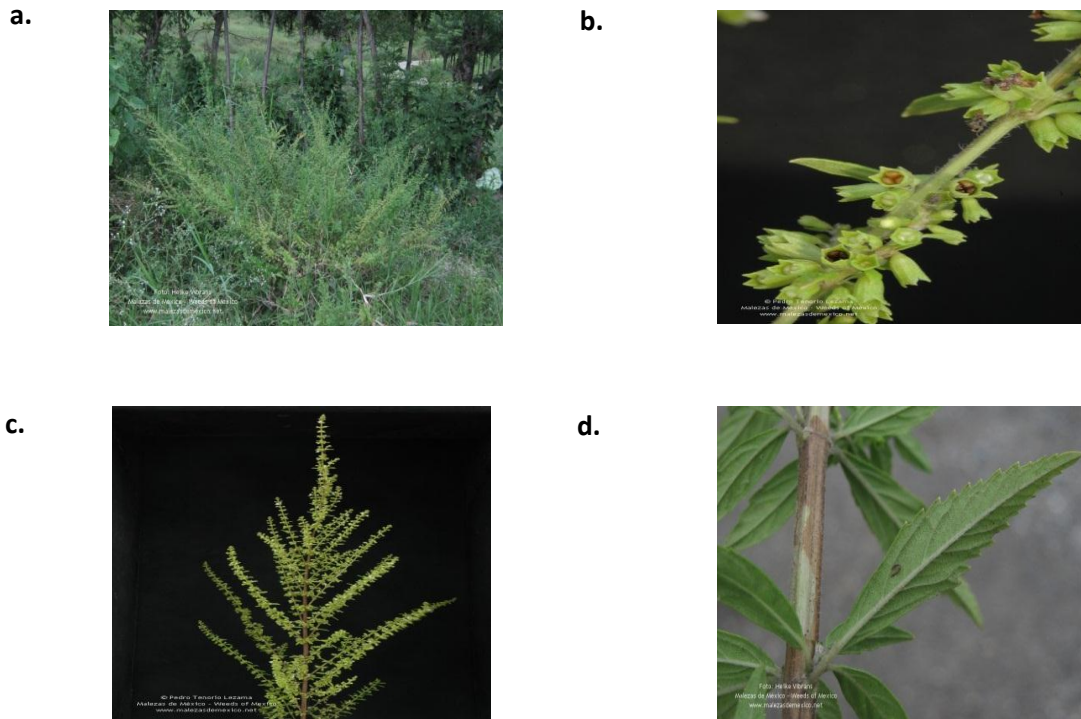
*Hyptis verticillata* es una de las especies más abundantes del género *Hyptis*; se trata de una hierba perenne de 1-3 metros de alto o más; de tallo muy ramificado, grueso, leñoso y erecto, sus ramas delgadas, alargadas, a veces revestidas con pelos en el caso de los especímenes más jóvenes.<sup>1,9,10</sup>

Posee hojas comúnmente verde oscuras, elípticas u oblongo-lanceoladas (más anchas en la base que en el ápice) de 3-10 cm de largo (frecuentemente 4-5 cm) y en promedio de 1-1.5 cm de ancho; agudamente aserradas pero desigualmente en los 2/3 apicales, casi glabras (sin tricomas), raramente semienteras, tiene presencia de finos pelos sobre los nervios del envés y con pecíolos de 0 a 2 cm.<sup>9,10</sup>

Sus flores generalmente crecen en las axilas de las hojas superiores, más o menos reducidas, están sostenidas por diminutas bractéolas cetáceas apretadas en glomérulos moniliformes y comúnmente apanojadas; las panojas pueden ser a veces hojosas en toda su extensión o aparentemente desnudas; el tubo de cáliz de la flor tiene 1 mm de largo, corola blanca o violeta claro con tubo de 2 mm de largo y presentan aroma.<sup>9</sup> Los frutos con tamaño de 1-1.5 mm, son de forma de nuez oblonga con terminación redonda truncada en el ápice y diminutamente reticulada, es decir en forma de red.

Las plantas forman grandes grupos en pastizales y a lo largo de las carreteras y están asociadas a vegetación perturbada derivada de bosques tropicales subperennifolios y perennifolios.<sup>1,9</sup> Se puede confundir con otras especies del género *Hyptis*, o con algunas especies de *Salvia* que es el principal género de la

familia de las lamiáceas que habitan en el trópico mexicano. Se distingue principalmente por no tener flores en las cabezuelas, sino una inflorescencia laxa parecida a una espiga (pero con las flores en verticilos).<sup>10</sup>



**Figura 1.** Características generales de *Hyptis verticillata*. Mostrando la forma general de un arbusto (a), los frutos diminutos (b), las espigas florales (c), hojas aserradas (d).

## 2.2.2 Clasificación taxonómica

Rango	Nombre científico/nombre común
Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Superdivisión	Spermatophyta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Género	<i>Hyptis</i>
Especie	<i>Hyptis verticillata</i> Jaqc.

**Cuadro 1.** Clasificación taxonómica detallada de la planta en estudio, *Hyptis verticillata*.

En este cuadro, el subreino Tracheobionta indica que pertenece al conjunto de las plantas vasculares, la superdivisión Spermatophyta engloba a todas las plantas que producen semillas, mientras la división Magnoliophyta agrupa a todas las plantas que dan flores y, finalmente, la clase Magnoliopsida se refiere a las dicotiledóneas.<sup>11</sup>

## 2.2.3 Distribución

La planta se distribuye desde el sur de los Estados Unidos (Florida), México, Centroamérica hasta Colombia, pasando por las Indias Occidentales y las Antillas Mayores y Menores.<sup>1,2,9</sup> Sin embargo, se considera una planta invasiva a lo largo de su distribución en los Estados Unidos.<sup>12</sup> En cuanto a nuestro país, la hierba Martina es más abundante en los estados de Veracruz, Puebla, San Luis Potosí y Oaxaca.<sup>9</sup>

#### 2.2.4 Usos tradicionales

La distribución geográfica cubre más de diecisiete países y sólo se tiene usos conocidos en diez países. Sorpresivamente no se han reportado usos tradicionales en países como Cuba, República Dominicana, Haití, Dominica y Martinica.<sup>1</sup>

Los usos tradicionales más destacados consisten en tratar condiciones que afectan el tracto gastrointestinal, sistema ginecológico y respiratorio (en resfriados) a usos externos como afecciones cutáneas (psoriasis, picazón, dermatitis eccematosa, sarna), músculo esqueléticas (artritis); así como gota, marasmo y pie de atleta. La presencia de estos usos varía en función de su distribución local a nivel nacional e internacional.<sup>1,2,13</sup>

En general se emplean los extractos acuosos para usos internos, preparados por infusión, decocción o maceración. Las extracciones con alcohol fueron reportadas sólo en México; siendo estas exclusivamente de uso externo, donde se usan casi siempre las partes aéreas.<sup>1</sup> Las extracciones alcohólicas se aplican para infecciones cutáneas e inflamación; donde la planta es sumergida en alcohol. Mientras que las tisanas preparadas con una generosa cantidad de hojas frescas son útiles para problemas gastrointestinales.<sup>1,3</sup>

Para nuestro país, los usos tradicionales más comunes se enfocan en las propiedades antiinfecciosas, su administración vía oral para el alivio de las jaquecas, dolores estomacales y otras dolencias gastrointestinales; el uso de la planta entera, hervida y fricciónada en la piel es ampliamente conocido por los indígenas oaxaqueños para el tratamiento de infecciones cutáneas y reumatismos.<sup>13</sup> Aún es usada en baños (una planta entera es hervida por 10 minutos y adicionada a un galón de agua) con el propósito de sanar dolencias, incluso aún no diagnosticadas.<sup>13,14</sup> En el Estado de Hidalgo, Oaxaca y Veracruz, se incluye en los ramos con los que se "barre" a las personas cuando se les realiza una limpia. Para el mal aire, en Puebla, colocan una ramita bajo la almohada del niño o le dan una "barrida". En caso de mal de ojo, en Veracruz, las



barridas se hacen con hierba del negro, epazotillo (*Hyptis verticillata*) y un huevo. Como analgésico para el dolor de reuma, con las hojas se prepara un tamalito (cataplasma) que se aplica caliente, o se ponen las hojas curtidas en aguardiente en la parte dolorida. Para el dolor de estómago, se bebe el cocimiento de las ramas, preparado junto con hojas de hediondilla (*Larrea tridentata*) y guayabo (*Psidium sartorianum*) o se aplica sobre el estómago una cataplasma hecha con las ramas maceradas en aguardiente. Para el cólico o ventiadura, las hojas de la planta se ponen en el estómago junto con dos huevos de gallina cocidos en un comal. Contra el dolor de cabeza o de cuerpo, se aplica la planta completa machacada, localmente o en frotaciones. Se utiliza para infecciones de la piel en general. En el caso de granos, se coloca un emplasto con las hojas molidas, y para los mezquinos y la tiña se aplica la savia directamente. Para algunos problemas del aparato digestivo, como diarrea, se bebe el cocimiento de las ramas tiernas (cogollo), al igual que en caso de pujos por disentería, latido y contra lombrices, también, para el tratamiento de hemorragias, pasmo, tlazole o delgadez extrema.

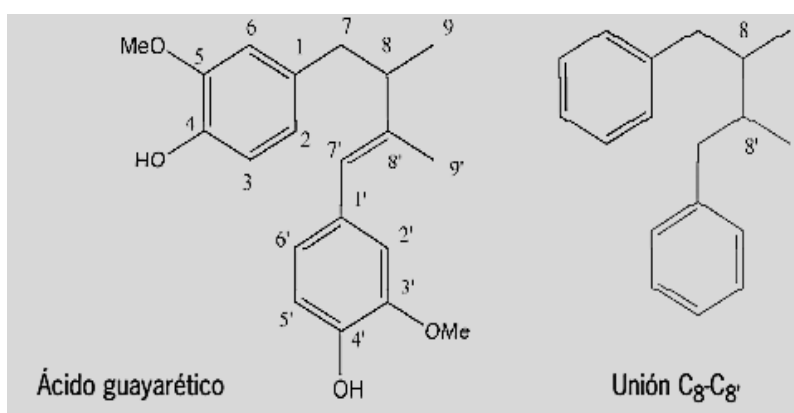
## **2.3 Lignanos del tipo 1-ariltetrahidro-naftaleno**

### **2.3.1 Características generales**

La podofilotoxina y sus análogos pertenecen al grupo de los compuestos denominados lignanos del tipo 1-ariltetrahidro-naftaleno. Estos se definen como dímeros de bajo peso molecular formados por el acoplamiento de dos unidades de fenilpropeno ( $C_6-C_3$ ) a través del  $C_3$  de la cadena lateral.<sup>3</sup> Pero más frecuentemente, se restringe a las unidades de fenilpropeno acopladas en el carbono central de la cadena lateral, si se da el acoplamiento de otra manera se utiliza la denominación de neolignano.<sup>15,16</sup>

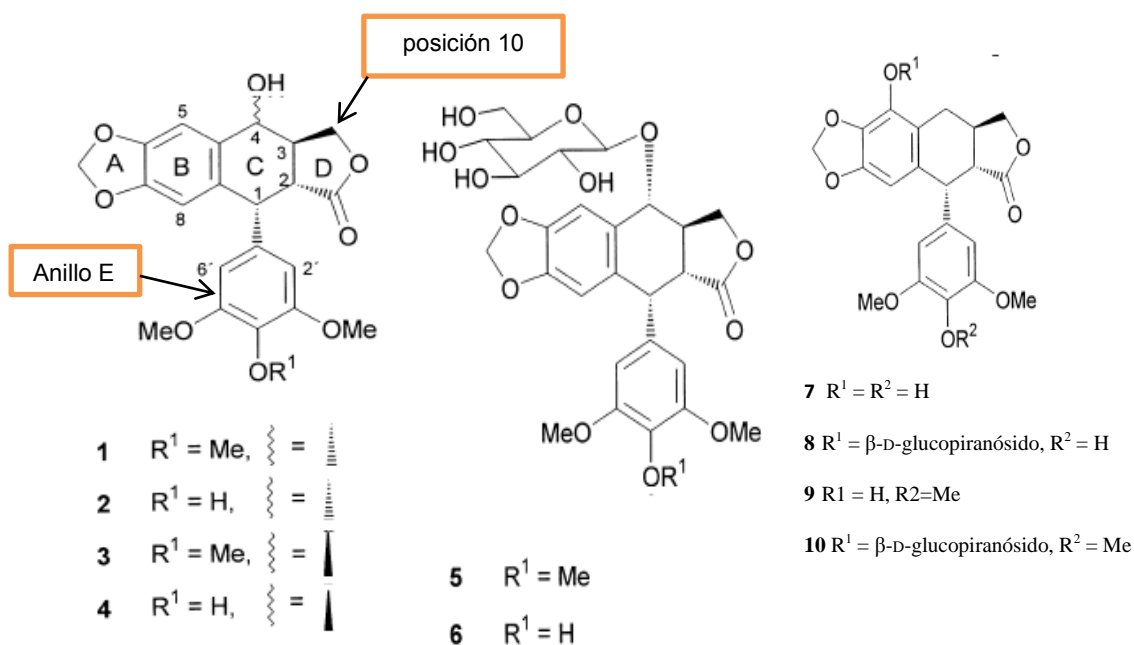
Los lignanos del tipo 1-ariltetrahidro-naftaleno pertenecen al grupo de los ciclolignanos, que tienen un enlace adicional carbono-carbono que da lugar a la formación de un nuevo anillo, formándose entre las dos unidades de fenilpropano

mediante dos enlaces simples carbono-carbono a través de las cadenas laterales, uno de ellos en las posiciones  $\beta$ - $\beta'$ ; a diferencia de los lignanos simples que sólo tienen la unión lateral ( $C_8$ - $C_8'$ , Figura 2). Este acoplamiento no es aleatorio, sino que es controlado por enzimas que controlan tanto la regioquímica como la estereoquímica, lo que explica el hecho de que puedan separarse en formas enantioméricamente puras.<sup>4,16</sup> Entre los lignanos aislados a finales del siglo XIX, destacó el ácido guayarético (Figura 2), cuya estructura fue resuelta por Schroeter y colaboradores.<sup>16</sup>



**Figura 2.** Ácido guayarético y estructura básica de los lignanos ( $C_8$ - $C_8'$ ).

Al igual que los otros tipos de lignanos, esta clase se encuentra ampliamente distribuida en el reino vegetal, siendo la fuente primaria el rizoma seco y las raíces colectadas en estado salvaje de *Podophyllum hexandrum* o de *Podophyllum peltatum* (Berberidaceae) de la podofilotoxina, la 4'-dimetilpodofilotoxina, la  $\alpha$ -peltatina y la  $\beta$ -peltatina, ya sea en estado libre o en forma de sus glucósidos.<sup>15</sup> En cuanto a la familia Lamiaceae, investigadores turcos describieron el hallazgo de la podofilotoxina en los géneros *Nepeta*, *Phlomis*, *Salvia*, *Teocrium* y *Thymus* en cantidades que van del orden de 0.05 a 0.14%.<sup>17</sup> A continuación, se ilustra la estructura básica de los lignanos 1-ariltetrahidronaftaleno y ciertas características estructurales que resultan importantes de resaltar (Figura 3).



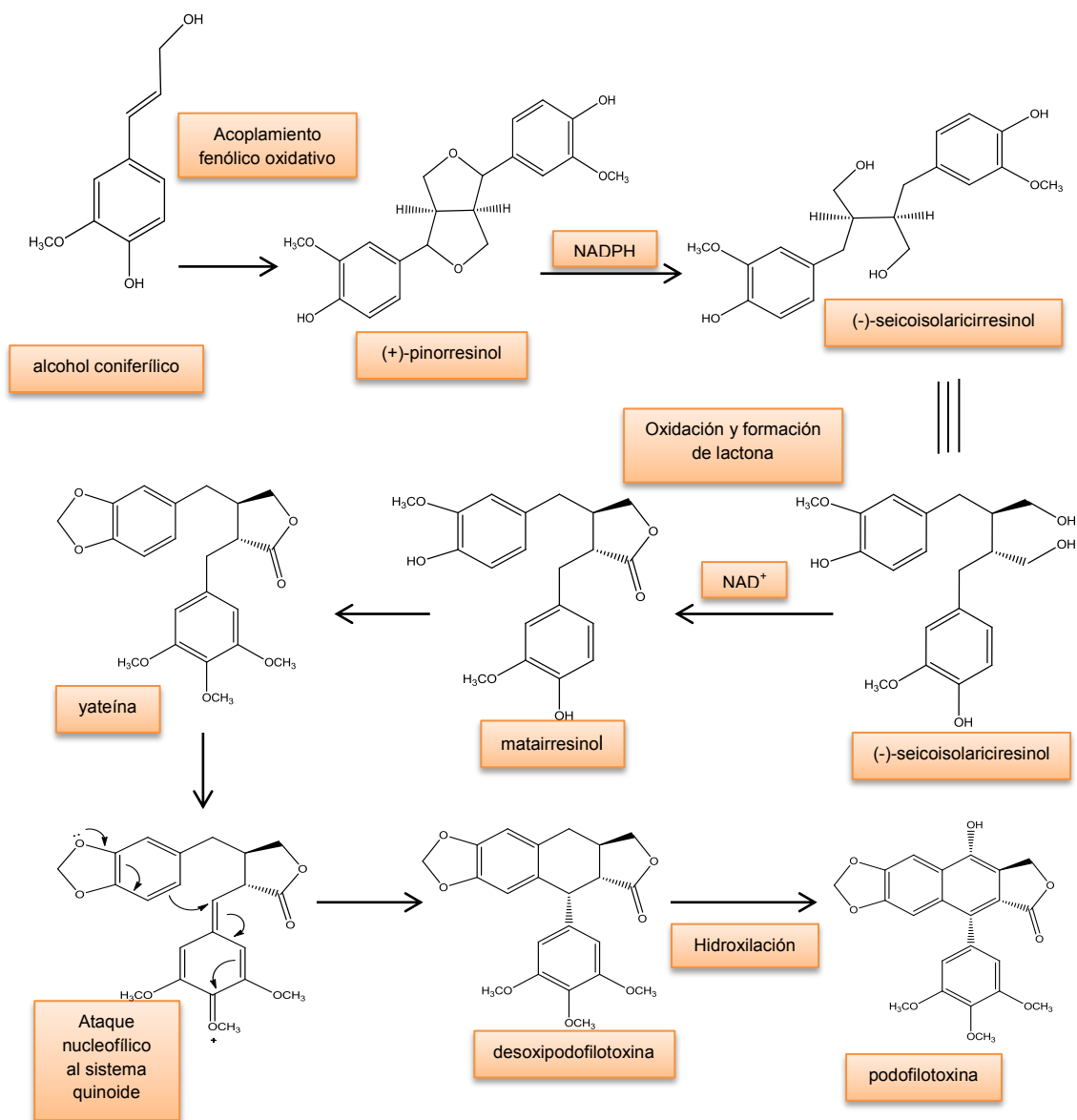
**Figura 3.** Estructura general de los lignanos 1-ariltetrahidronaftaleno más comunes y sus derivados glucosídicos. Podofilotoxina (1), 4'-desmetilpodofilotoxina (2), epipodofilotoxina (3),  $\beta$ -D-glucopiranosido de podofilotoxina (5),  $\beta$ -D-glucopiranosido de podofilotoxina (4'-dimetil),  $\alpha$ -peltatina (7),  $\beta$ -peltatina (9) y sus respectivos glucopiranosidos (8 y 10).

Respecto a su estructura, se resaltan aspectos conformacionales en el anillo de lactona (D); siendo la configuración 1,2-*cis*-2,3-*trans* crucial para la actividad biológica. La picropodofilotoxina (diastéromero en C-2 de la podofilotoxina) es resultado de la epimerización a la forma menos tensa pero inactiva de *cis*-lactona. Mientras que la conformación en C-4 es menos importante para la actividad citotóxica desde que se vio que la podofilotoxina y la epipodofilotoxina son fácilmente interconvertibles.<sup>18</sup> En cuanto a la sustitución glucosídica, ésta les aporta un carácter más hidrofílico que a los lignanos libres. Su toxicidad disminuye, pero también su actividad citostática disminuye en el mismo grado.<sup>18</sup>

### 2.3.2 Biosíntesis

Los lignanos se sintetizan por la ruta del ácido siquímico o del siquimato. Este precursor sufre por una serie de reacciones intermediarias para formar los aminoácidos aromáticos; de éstos, la L-fenilalanina (L-Phe) que es la precursora del ácido *trans* (E) cinámico a través de la eliminación E2 del grupo amino por la fenilalanina amino liasa (PAL); L-Phe, mediante reacciones complejas de óxido-reducción, metilación e hidroxilación forma los monómeros más importantes (los alcoholes p-cumarílico, coniferílico y sinapílico) para la síntesis de la lignina, que es el material que le da rigidez a la membrana de la célula vegetal actuando como matriz para las microfibras de celulosa.<sup>15</sup>

La síntesis de los lignanos 1-ariltetrahidronaftaleno se inicia con el acoplamiento del alcohol coniferílico vía de las dibencilbutirolactonas, matairresinol y yateína.<sup>15</sup> Primeramente, el alcohol coniferílico es convertido en (+)-pinoresinol mediante un acoplamiento intermolecular 8-8' que es regio y estereoselectivo. El (+)-pinorresinol da lugar al (-)-secoisolaricirresinol que es predominante por reducción estereoselectiva, dando también como resultado el cambio de configuración C-2 y C-5 del pinorresinol que se cree que ocurre por un mecanismo SN2 o por reducción de una quinona intermediaria. Después la oxidación estereoselectiva del (-)-secoisolaricirresinol da el (-)-matairresinol que es el precursor común de los lignanos 1-ariltetrahidronaftaleno. Adicionalmente, el (-)-matairresinol presumiblemente se convierte en la yateína o 4'-dimetilyateína que también forma los lignanos mediante las quinonas intermediarias apropiados (Figura 14).<sup>18</sup> En esta biosíntesis, la ciclación adicional y otras modificaciones pueden crear lignanos de diferentes tipos estructurales. Por lo que no resulta extraño que tengan numerosas funciones fisiológicas en las plantas y con actividades farmacológicas muy variadas.<sup>15,16</sup>



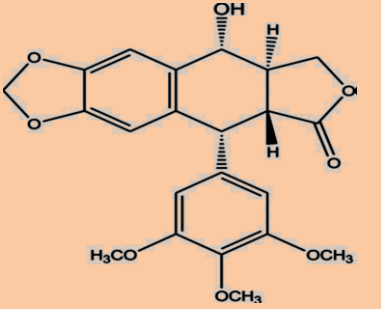
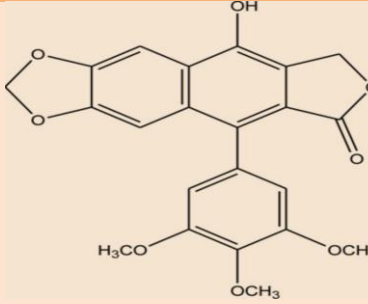
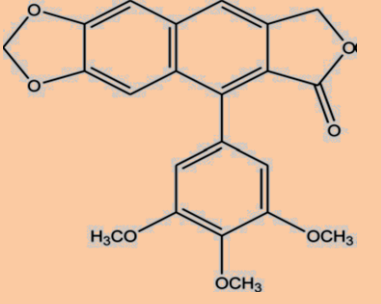
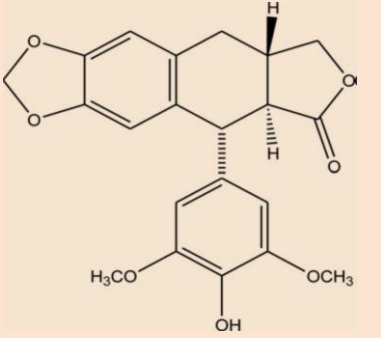
**Figura 4.** Biosíntesis propuesta de la podofilotoxina y lignanos 1-ariltetrahidronaftaleno

### 2.3.3 Lignanos aislados de *Hyptis verticillata*

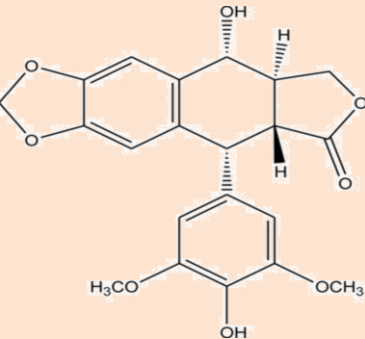
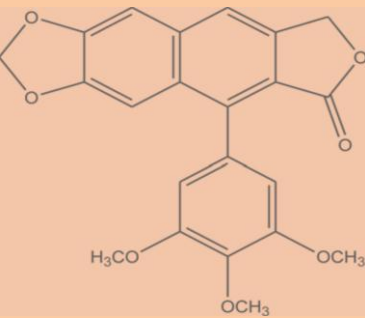
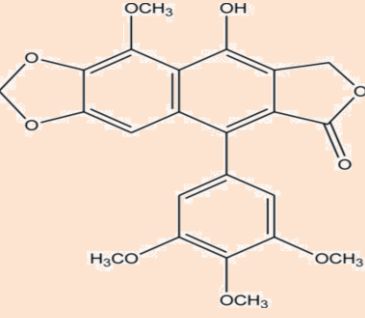
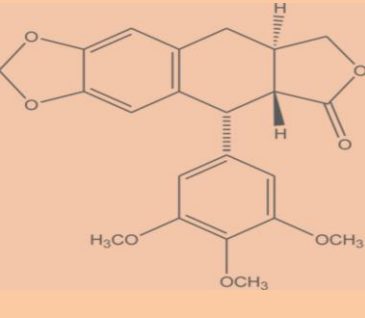
Hasta la fecha se han identificado diecisiete lignanos, cuatro de los cuales son nuevos (Cuadro 2). La investigación más temprana reveló la presencia de dos lignanos de la clase 1-aryl-tetrahydro-naftaleno: la 4'-dimetildesoxipodofilotoxina y la  $\beta$ -peltatina que presentaron la misma actividad antimetabólica de los extractos polares de *Hyptis verticillata*.<sup>1</sup> Posteriormente, Kuhnt y colaboradores, obtuvieron el extracto de acetona-agua 4:1 de las partes aéreas, el fraccionamiento primario generó una fase de éter etílico que se purificó con distintas técnicas cromatográficas y permitió la identificación de numerosos lignanos mediante RMN, UV, IR y EM, uno de ellos fue descubierto en ese estudio y se nombró como la hiptinina.<sup>5</sup>

Casi simultáneamente, se descubrieron dos nuevos lignanos mediante ensayos biodirigidos contra varias líneas celulares humanas y de leucemia linfocítica murina (P-388), cuya acción citotóxica fue marginal. Éstos fueron identificados como la 5-metoxideshidropodofilotoxina y el éter metílico de la deshidro- $\beta$ -peltatina. Sin embargo, el segundo se obtuvo previamente por la deshidrogenación del éter metílico de la  $\beta$ -peltatina.<sup>19</sup>

El descubrimiento más reciente fue hecho por investigadores japoneses; detectaron un nuevo compuesto mediante ensayos biodirigidos y que fue caracterizado como la 4-metoxi-9-(3,4,5-trimetoxifenil)-8,9-dihidrofuro [3',4':6,7]nafto[2,3-D][1,3]dioxol-6(5H)-ona (4-MTDND), llamado más tarde hiptósido. Este posee baja toxicidad en leucocitos de donadores sanos, actividad no específica contra numerosas líneas celulares y sus contrapartes resistentes a la quimioterapia con valores para la concentración inhibitoria media (IC<sub>50</sub> 0.0048-0.007 nM) más baja que compuestos similares y análogos como el etopósido. Los datos espectroscópicos indicaron una similitud razonable con la hiptinina ya que su estructura corresponde al 5-metoxi derivado.<sup>6,7</sup>

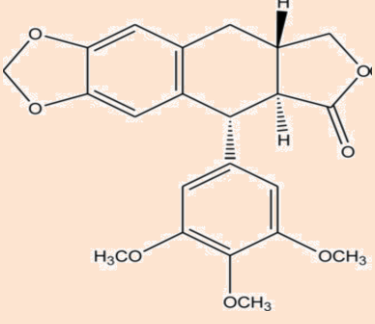
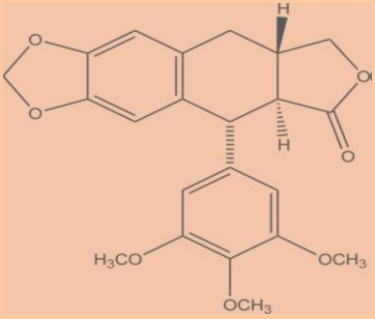
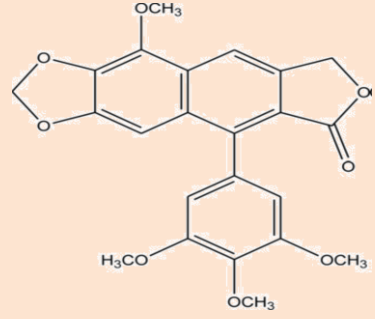
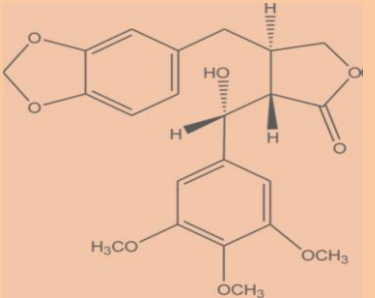
Nombre	Estructura	Actividad
Podofilotoxina (1)		citotóxico, antimitótico, antisoriático, antiviral, antibacterial, antifúngico, insecticida.
Deshidropodofilotoxina (2)		citotóxico, antimitótico, antibacterial.
Desoxideshidropodofilotoxina (3)		antimitótico
4'-Desmetildesoxipodofilotoxina (4)		antimitótico, citotóxico y antifúngico.

**Cuadro 2.** Lignanos caracterizados en *Hyptis verticillata* hasta 2012.<sup>1</sup> Descubrimiento reciente(\*)

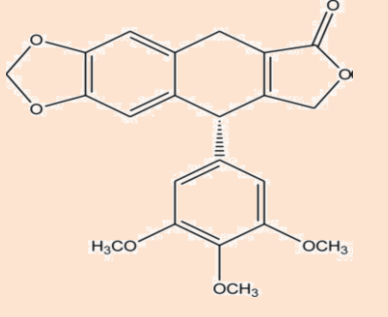
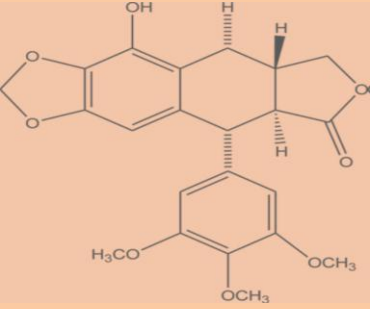
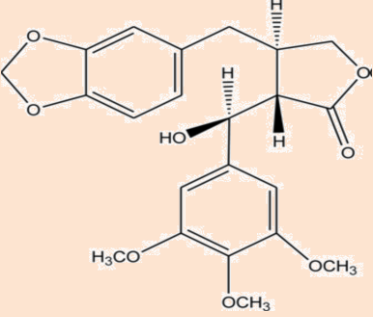
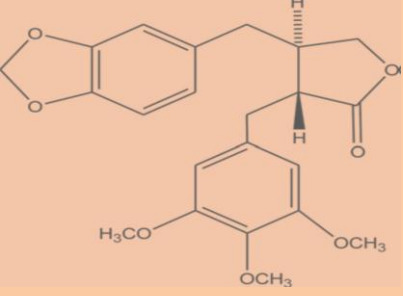
<p>4'-Desmetilpodofiloxina (5)</p>		<p>sin actividad reportada</p>
<p>Deshidrodesoxipodofiloxina (6)</p>		<p>No citotóxico</p>
<p>5'-Metoxideshidropodofiloxina* (7)</p>		<p>antimitótico</p>
<p>Isodesoxipodofiloxina (8)</p>		<p>antimitótico, citotóxico</p>

**Cuadro 2.** (continuación).

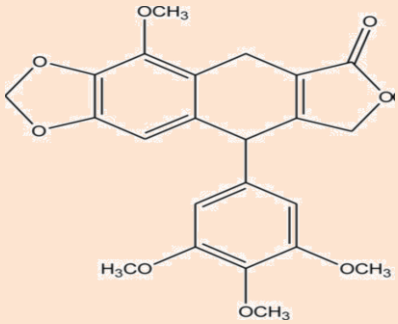


Desoxipicropodofilotoxina (9)		antimitótico, citotóxico
$\beta$ -Apopicropodofilotoxina (10)		antimitótico
Éter metílico de la deshidro $\beta$ -peltatina* (11)		antimitótico
Epipodorrizol (12)		sin actividad reportada

**Cuadro 2.** (continuación).

<p>Hiptinina* (13)</p>		<p>citotóxico</p>
<p><math>\beta</math>-Peltatina (14)</p>		<p>antimitótico, citotóxico, antiviral</p>
<p>Podorrizol (15)</p>		<p>Sin actividad reportada</p>
<p>Yateína (16)</p>		<p>antimitótico, citotóxico, antifúngico</p>

**Cuadro 2.** (continuación).

<p>Hiptósido* (17)</p>		<p>Antimitótico, citotóxico; induce apoptosis</p>
------------------------	--	---

**Cuadro 2.** (continuación).

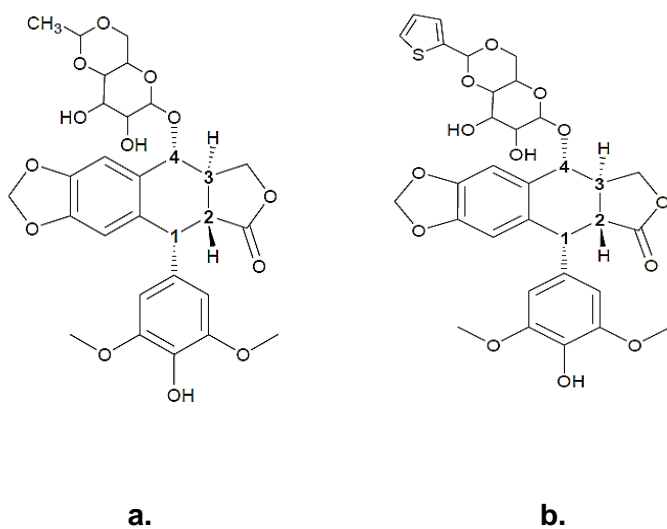
De los diecisiete lignanos, los compuestos **1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 10, 11, 14** y **16** fueron reportados por Novelo y colaboradores en 1993. Mientras que los compuestos **1, 2, 4, 5, 6, 12, 13** y **15** por Kuhnt y colaboradores en 1994.<sup>1,4,19</sup> Algunos metabolitos intermedios, como la yateína y la desoxipodofilotoxina (Figura 4), se incluyen en el cuadro 2.

#### **2.3.4 Acciones y mecanismos farmacológicos de los lignanos 1-aryl-tetrahidro-naftaleno**

Actualmente hay diversas actividades biológicas en estos compuestos que los hacen interesantes para la investigación como lo son: la inhibición de la transcriptasa reversa, anti-VIH, inmunomoduladora, efectos en el sistema cardiovascular, antileishmaniasis, acción en las lipoproteínas de alta densidad HDL, propiedades hipolipemiantes, inhibición de la 5-lipooxigenasa. Por último, son antifúngicos, antireumáticos, fuertes antibacterianos, antipalúdicos y antiasmáticos. Pero las propiedades citotóxicas y antivirales son las actividades más importante que mantiene el interés farmacéutico de los lignanos.<sup>4</sup>

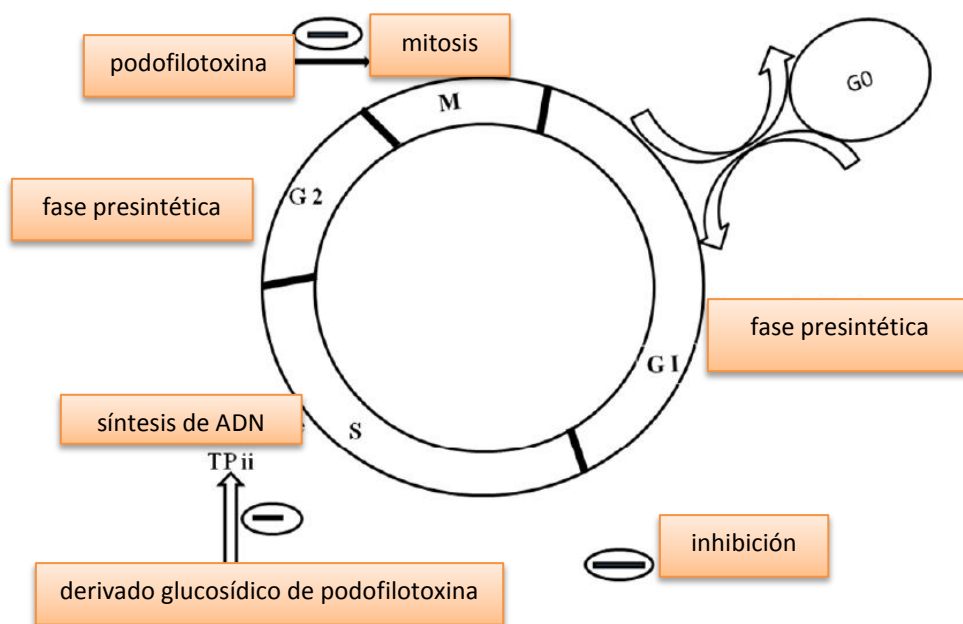
La farmacodinamia antitumoral se debe a la inhibición del ensamblaje de los microtúbulos (transporte axoplásmico) gracias a que se une a la tubulina, interfiriendo con la tubulina polimerasa para formar las fibras del uso mitótico que provocan la inhibición del ciclo celular en la metafase (fase M).<sup>20,21,22</sup> Pero esta

actividad antimetabólica depende del tipo de sustituyente en la posición C-4 del anillo C y de las características estéricas de los sustituyentes en la posición C-12 del anillo D, siendo medido por su radio de Van der Waals. Lo que sugiere que los anillos C y D están involucrados en la interacción con el sitio de unión de la podofilotoxina en la tubulina.<sup>20</sup> Dando como resultado un cambio en el mecanismo de acción y pérdida de la acción antimetabólica en cuanto mayor sea el sustituyente en la posición C-4. Los análogos semisintéticos como el tenipósido y el etopósido (Figura 5) son los mejor conocidos por bloquear la actividad de la topoisomerasa II por estabilización del enlace covalente enzima-ADN.<sup>20,21</sup> Además este mecanismo sobre la topoisomerasa II sucede durante las fases S o en G<sub>2</sub> (Figura 6).<sup>20</sup>



**Figura 5.** Etopósido (a) y tenipósido (b)

Se puede decir que anteriormente se pensaba que los 5 anillos eran importantes para la actividad de los lignanos. En el anillo D, la lactona *trans* es preferida, ya que el isómero *cis*, la picropodofilotoxina, es 135 veces menos afín a la tubulina. La adición de sustituyentes glucosídicos voluminosos en la posición C-4 del anillo C, como se muestra en la figura 5, es la más aceptable generando preferentemente actividad antitopoisomerasa y ligera actividad citotóxica. La modificación en el anillo B resulta en la pérdida de actividad. Por último la libre rotación del anillo E es necesaria para la actividad antitumoral.<sup>21, 22</sup>



**Figura 6.** Resumen de los mecanismos de inhibición de la podofilotoxina y sus análogos con sustituyentes voluminosos en el ciclo celular. En este caso la fase G<sub>0</sub> representa a las células en reposo pero que no proliferan. G<sub>1</sub> marca el final de la mitosis y el comienzo de la síntesis de ADN. La fase S es donde se produce la replicación de ADN. G<sub>2</sub> marca el final de la replicación y transición a la división mitótica M.<sup>23</sup>

Además de abortar el ciclo celular entre G<sub>2</sub> y M. La podofilotoxina y algunos derivados promueve la sobreexpresión de genes y proteínas proapoptóticos en forma dosis dependiente como el gen p53 (supresor de tumores) y la BAX o proteína Bcl-2 donde algunos de sus miembros promueven la apoptosis induciendo daño mitocondrial y liberación de citocromo C, acompañado de activación potenciada de la caspasa 9 que es una pieza clave junto al citocromo C en el apoptosoma, que sirve para activar a la caspasa 3 efectora y la polipolimerasa (ADP ribosa) dando lugar, finalmente, a la muerte celular.<sup>6,23</sup> El mecanismo anterior se conoce como la vía mitocondrial, donde se mide el potencial de membrana que termina decreciendo en el proceso apoptótico. Este mecanismo se ha descrito en varios tipos de cáncer, incluyendo al gástrico (células SGC-7901).<sup>24</sup>

Un ejemplo de toxicidad de la podofilotoxina, es la inhibición de la respiración de los tejidos linfáticos de ratas sanas como el bazo, los ganglios linfáticos y las glándulas del timo al igual que la colchicina y la mostaza nitrogenada, disminuyendo un 50% la respiración del bazo después de 6 horas para la podofilotoxina. El timo fue el más sensible de los órganos estudiados con una reducción de la respiración de 66% después de administrar la podofilotoxina. Esta sensibilidad se controla por la glándula suprarrenal, siendo la inhibición considerablemente menor en animales con la glándula extirpada.<sup>25</sup>

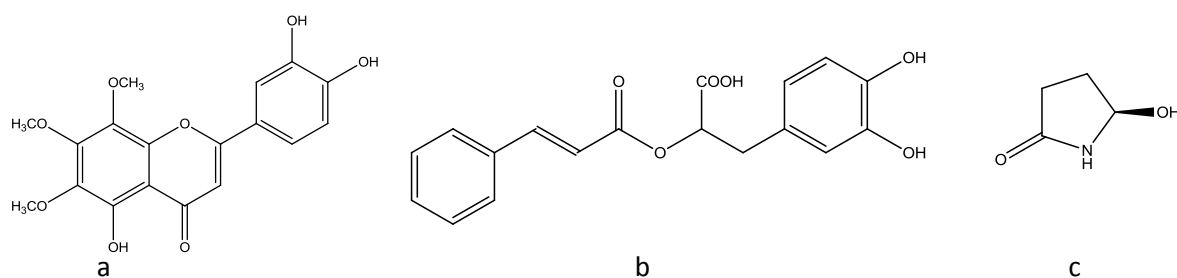
Para los sistemas enzimáticos y metabólicos *in vitro*, la glicólisis anaerobia en el embrión de pollo y en el testículo de rata se inhibe en presencia de altas concentraciones de podofilotoxina, pero se estimula en bajas concentraciones. También, la oxidación *in vitro* del acetato, el succinato, el piruvato y el butirato en el riñón se ve inhibida con administración 10<sup>-8</sup> M de podofilotoxina en un lapso de 2 a 3 horas.<sup>26</sup>

## 2.4 Otros compuestos encontrados en *Hyptis verticillata*

En la hierba martina, se han encontrado otros compuestos que comparten propiedades con los lignanos tales como la actividad antibacteriana, antioxidante y antiinflamatoria. Entre estos compuestos destacan el ácido rosmarínico, la sideritoflavona y la 5-(R)-hidroxipirrolidin-2-ona (Figura 7).<sup>1,3,27</sup> Se han descrito propiedades particulares e interesantes de estos compuestos, como la del ácido rosmarínico que muestra una actividad estabilizadora de capilares empleando la membrana alantoide del corion en el huevo incubado de gallina (HET-CAM) como modelo. Donde son medidas la actividad antiinflamatoria, estabilizante y de inhibición en la permeación de capilares. En el experimento que consistió en aplicar el extracto crudo a la membrana alantoides (CAM), a diversas concentraciones, se observó un retraso significativo en los fenómenos de irritación de la inyección, hemorragia y lisis.<sup>27</sup>

La sideritoflavona tiene un efecto antiinflamatorio al inhibir la prostaglandina sintasa en medida significativa así como una actividad antisecretora<sup>1,27</sup> además de que presenta citotóxicidad contra la línea de carcinoma nasofaríngeo (KB) con una  $Cl_{50}$  de 1.6  $\mu\text{g/mL}$ .<sup>19</sup>

La 5-(R)-hidroxipirrolidin-2-ona es el único alcaloide caracterizado en *Hyptis verticillata* y descrito en los trabajos de Kunt *et al.* (1995) y Heinrich *et al.* (2003) que contribuye a las bondades de la planta en el aspecto antibacteriano.<sup>1,27</sup>



**Figura 7.** Estructuras de compuestos diferentes al grupo de lignanos aislados de *Hyptis verticillata*: (a) sideritoflavona; (b) ácido rosmarínico; (c) 5-(R)-hidroxipirrolidin-2-ona.

### 3. Justificación

La producción de lignanos del tipo 1-ariltetrahidro-naftaleno no suele ser constante de un tipo de planta a otro, sobre todo considerando la influencia de los factores ambientales como la época del año en la que se realizó la colecta, condiciones de estrés tales como el entorno climático general y el tipo de cultivo, ya que se ha observado que la producción puede variar el perfil de los lignanos, como se reportó en las plántulas de *Hyptis verticillata* cultivadas *in vitro* que presentaron un nuevo lignano análogo a la podofilotoxina, que no estuvo presente en plantas aclimatadas bajo fotoperiodo y tampoco en las silvestres.<sup>28</sup>

Dos coletas de la hierba martina procedentes del Estado de Oaxaca se analizaron con anterioridad y es posible que el estudio de una nueva colecta procedente de Veracruz proporcioné una composición química diferente. En cuanto al tipo de sustituyentes dentro de la estructura general bioactiva, es posible encontrar lignanos diferentes a los reportados; seguramente por las diferencias en las condiciones ambientales y el tiempo de recolección de la planta para este estudio y la colecta de las plantas estudiadas en los estudios previos. Es posible esperar que las variaciones estructurales en estos nuevos compuestos influyan en su actividad citotóxica, rango terapéutico y mecanismo de acción, pudiendo otorgar mejores características en su potencial terapéutico a la droga cruda que los lignanos conocidos o afectar en forma negativa con una mayor toxicidad (no específico contra células cancerosas).



## 4. Objetivos

### 4.1 Objetivo general

Obtener el perfil general de lignanos del tipo 1-ariltetrahidro-naftaleno presentes en una colecta veracruzana de las partes aéreas de *Hyptis verticillata* mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y establecer en forma cualitativa la composición de sus principios citotóxicos mediante el empleo de esta técnica analítica acoplada a la espectrometría de masas (PHLC-EM).

### 4.2 Objetivos particulares

- Establecer la presencia de lignanos tipo 1-ariltetrahidro-naftaleno en el extracto de acuerdo a su similitud con los compuestos de referencia y su actividad citotóxica.
- Verificar la efectividad de las condiciones cromatográficas analíticas descritas en la literatura para la purificación mediante HPLC de los lignanos 1-ariltetrahidro-naftaleno y su escalamiento a nivel preparativo.
- Caracterizar los lignanos tipo 1-ariltetrahidro-naftaleno con el empleo de HPLC acoplado a la espectrometría de masas mediante la técnica de ionización por electrospray en modo positivo.

## **5. Procedimientos experimentales**

### **5.1 Material vegetal**

Para el presente estudio, el material vegetal (partes aéreas) se colectó el día 7 de diciembre de 2012 e identificado por la bióloga Adriana Hernández Rojas (XAL0001390) en la región de Xoltepec en el municipio Emiliano Zapata, Veracruz, México, con las siguientes coordenadas: Lat. 19° 26' 42.44", N, Long. 96° 47' 28.85" W Altitud 40 msnm.

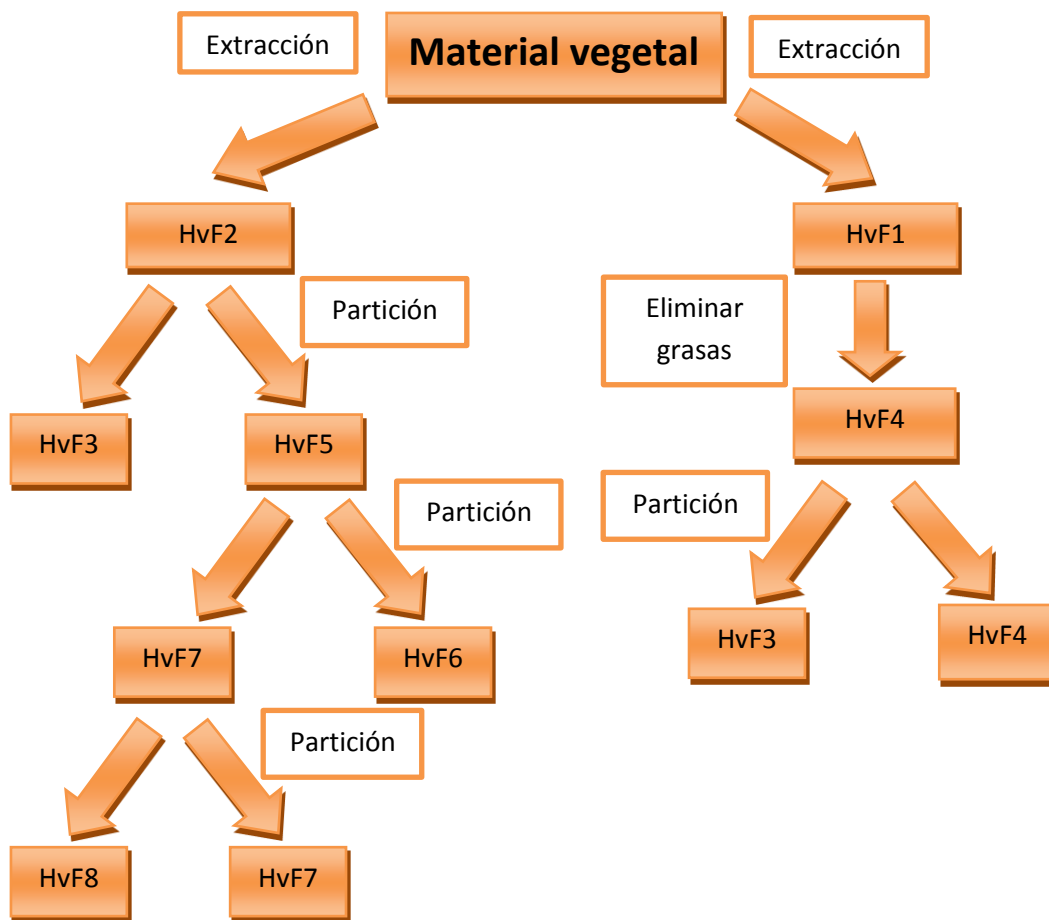
### **5.2 Extracción del material vegetal**

El material vegetal se secó al aire libre a temperatura ambiente, se molió en un molino de cuchillas modelo Wiley 4. Se obtuvieron 1542.56 g de material seco y molido. La extracción se realizó a temperatura ambiente vía maceración con acetona (5 ocasiones en total) y 4 maceraciones con metanol, todas por un periodo de 3 días. Al término de cada periodo, se filtró y concentró a presión reducida, con estos procedimientos se obtuvieron los extractos crudos de acetona (HvF1) y metanol (HvF2), respectivamente.

### **5.3 Fraccionamiento de los extractos crudos**

El extracto HvF1 se sometió a un fraccionamiento primario cuya finalidad es eliminar triterpenos, empleando la siguiente metodología. El extracto se disolvió en metanol en una relación de 50 mL/g extracto con agitación magnética y se dejó en refrigeración por 3 días, pasado ese tiempo se filtraron al vacío los triterpenos precipitados y se redujo el volumen total del filtrado aproximadamente a la mitad con presión reducida. La solución se sometió de nuevo a refrigeración por el mismo periodo de tiempo para repetir la operación de filtrado. Con el filtrado se

realizó un reparto líquido-líquido con hexano, dando lugar a una fracción hexánica (HvF3) y una fracción libre de sustancias grasas (HvF4) que fue llevada a sequedad. Se siguió la misma metodología para el fraccionamiento del extracto crudo de metanol (HvF2) pero con la proporción de 25 mL/g de muestra. El filtrado se concentró a sequedad y se resuspendió en agua (aprox 175 mL) para realizar 3 repartos con volúmenes iguales de acetato de etilo (AcOEt). Se reunieron las fases orgánicas y se evaporaron para obtener una subfracción de AcOEt (HvF6) y una acuosa parcialmente decolorada (HvF7) que fue extraída con *n*-butanol (*n*-BuOH) por 3 ocasiones. Finalmente, se separaron las fases y se evaporaron hasta sequedad para obtener la fase orgánica de *n*-BuOH (HvF8) y la fase acuosa (HvF7).



**Figura 8.** Resumen del proceso de extracción y fraccionamiento de las partes aéreas.

## **5.4 Cromatografía en capa fina (CCF) de los extractos crudos**

Cada una de las fracciones se analizaron mediante CCF y comparándolas con referencias de la podofilotoxina y la  $\alpha$ -peltatina. Se emplearon como fase estacionaria gel de sílice Merck 60 F<sub>254</sub> y como fase móvil una mezcla CHCl<sub>2</sub>-acetona (95:5). Después de eluir la placa se analizó al UV (365 y a 254 nm) para visualizar los compuestos que fluorescen en esas longitudes de onda y, por último, se reveló con solución de sulfato cérico amoniacal y se aceleró la oxidación mediante un leve calentamiento.

## **5.5 Proceso de decoloración**

Las fracciones activas fueron seleccionadas mediante el ensayo de citotoxicidad y se procedió a su decoloración. Cada una de éstas se disolvió en una cantidad mínima de mezcla MeOH-CHCl<sub>2</sub>. El proceso se llevó a cabo en una columna abierta, después de empacar la columna con Tonsil 40, se lavó el soporte a vacío con AcOEt. La fracción se dejó eluir a través del soporte con ayuda de vacío y para finalizar se enjuaga de nuevo con una pequeña cantidad de AcOEt para asegurar la elución de los compuestos de interés.

## **5.6 Ensayo de citotoxicidad**

### **5.6.1 Líneas celulares**

La línea celular MCF-7 derivada de carcinoma de mama fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC HTB-22), La línea celular HeLa derivada de carcinoma cérvico-uterino (ATCC CCL-2) y por último la línea HTC-15 procedente de carcinoma de colon (ATCC CCL-225). Todas las células fueron mantenidas en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB y cultivadas a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en aire y 100% de humedad.

### 5.6.2 Ensayo

Las células fueron cosechadas hasta la fase logarítmica de su ciclo de crecimiento y fueron tratadas por triplicado con varias concentraciones de los compuestos de prueba (0.2 – 25 µg/mL) e incubadas por 72 h a 37 °C en atmósfera de 100% humedad y 5% de CO<sub>2</sub>.

El ensayo de la sulforodamida B (SRB) (colorante amino xantano, de color rosa brillante) es muy usado para la determinación de la densidad celular mediante el contenido de proteínas celulares con el propósito de medir la citotoxicidad inducida por un compuesto y la proliferación celular *in vitro*.<sup>30,31</sup> El ensayo se basa en la unión electrostática del colorante a los aminoácidos básicos de las proteínas que es muy dependiente del pH; esta interacción es favorecida en medio ácido (SRB disuelta en ácido acético 1%). Su sensibilidad es comparable con muchos ensayos fluorométricos y superior a los métodos de Lowry y Bradford; además de que necesita de equipamiento sencillo y reactivos accesibles.<sup>31</sup> Las líneas celulares previamente se fijan con ácido tricloroacético (TCA), se decanta el colorante libre y el colorante unido a las células viables se extrae con medio alcalino (solución Tris pH 10.5) y se lee la absorbancia a 564 nm en placa de microtitulación de 96 pozos. Este método proporcionando un punto final colorimétrico no destructivo, muy estable y visible a simple vista.<sup>30,31</sup> Los resultados obtenidos se expresan como la concentración que inhibe el 50% del control de crecimiento después del periodo de incubación (CI<sub>50</sub>). Los valores fueron estimados a partir de una curva semilogarítmica de la concentración del fármaco (µg/mL) contra el porcentaje de inhibición de crecimiento. La vinblastina se utilizó como un control positivo.

### 5.7 Purificación de los extractos mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR)

Se empleó la técnica de CLAR, teniendo un potencial de aplicación más amplio que la cromatografía de gases debido a que el 85% de los compuestos conocidos no son lo suficientemente volátiles o estables para ser separados por

cromatografía de gases; siendo el secreto de su éxito las partículas pequeñas y uniformes que producen poca difusión y su rápida transferencia de masa.<sup>32</sup>

### 5.7.1 Metodología en modo analítico

Este modo tiene por objetivo observar de manera general los perfiles de los extractos así como establecer las condiciones que permiten una mejor visualización de los compuestos. Se trabajó con las condiciones descritas en la literatura.<sup>17,33</sup> En el siguiente cuadro se enlistan las condiciones empleadas.

<b>Equipo (modelo)</b>	CLAR Waters 2487
<b>Columna</b>	Symmetry Waters C18 4.6 x 250 mm
<b>Detector</b>	detector absorbancia dual (210 nm)
<b>Fase móvil</b>	CH <sub>3</sub> CN-H <sub>2</sub> O (1:1)
<b>Velocidad de flujo</b>	0.3 mL/min
<b>Tipo de elución</b>	Isocrática

**Cuadro 3.** Condiciones experimentales en el modo analítico.

### 5.7.2 Metodología en modo preparativo

En esta modalidad, se permite inyectar una mayor cantidad de muestra en un mayor volumen con el propósito de recuperar la máxima cantidad de analito para su posterior identificación. Primeramente, se calculó el flujo a emplear debido al incremento en la longitud y el diámetro de la columna preparativa mediante la fórmula:

$$F_p = F_a \times \frac{L_p}{L_a} \times \frac{d_p^2}{d_a^2}$$

Dónde:

F<sub>p</sub>= flujo a emplear en modo preparativo (mL/min)

F<sub>a</sub>= flujo empleado en el modo analítico (mL/min)

L<sub>p</sub>= longitud a emplear en el modo preparativo (mm)

L<sub>a</sub>= longitud empleada en el modo analítico (mm)

d<sub>p</sub>= diámetro de la columna preparativa (mm)

d<sub>a</sub>= diámetro de la columna analítica (mm)

Las condiciones empleadas se muestran a continuación:

<b>Equipo (modelo)</b>	CLAR Waters 2487
<b>Columna</b>	Symmetry Waters C18 19 x 250 mm
<b>Detector</b>	Absorbancia dual (210 nm)
<b>Fase móvil</b>	CH <sub>3</sub> CN-H <sub>2</sub> O (1:1)
<b>Velocidad de flujo</b>	7 mL/min
<b>Tipo de elución</b>	Isocrática

**Cuadro 4.** Condiciones experimentales en el modo preparativo.

### **5.7.3 Preparación de muestras**

En el modo analítico se pesaron 2 mg de cada extracto, se disolvieron en 500  $\mu\text{L}$  de MeOH y, finalmente, se inyectaron 10  $\mu\text{L}$ , comparándolo contra un blanco de disolvente (MeOH) que fue inyectado primero en las mismas condiciones cromatográficas mencionadas anteriormente.

Con el modo preparativo, se disolvió una cantidad aproximada de 100 mg de cada extracto en 1 mL de MeOH. Se tomaron 300  $\mu\text{L}$  y se diluyeron con 200  $\mu\text{L}$  adicionales de MeOH.

### **5.8 Obtención de espectros RMN- $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$**

Se registraron los espectros de RMN en equipos Varian, modelos VNMRS y MR, operando a una frecuencia de 400 MHz en  $^1\text{H}$  y 100 MHz en  $^{13}\text{C}$  empleando cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ). Expresando los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) en partes por millón (ppm) y utilizando como referencia interna la señal de tetrametilsilano (TMS).

### **5.9 Purificación y caracterización de fracciones mediante CLAR-EM**

Se empleó la técnica de Ionización mediante electrospray de alta resolución (HRESIMS por sus siglas en inglés). Se empleó el equipo Thermo QExactive Plus MS (Thermo-Fischer) que fue ajustado para coleccionar datos de 150 a 2000 m/z con una resolución de 70 000. La disociación mediante colisión (HCD) usó una energía normalizada de 35 V para todos los compuestos; el voltaje para ambos modos de ionización positivo y negativo fue de 3.7 kV, con nitrógeno como gas nebulizador a



25 bar junto con un gas auxiliar a 5 bar. El anillo de guía de los iones fue llevado a la radiofrecuencia de 50.00 con temperatura capilar a 350 °C.<sup>34, 35</sup>

Para el segmento CLAR, se utilizó una columna BEH C18 (2.1 x 50 mm x 1.7 µm) equilibrada a 40 °C; la velocidad de flujo se llevó a 0.3 mL/min con fase móvil que consistió en CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O de Fischer Optima y grado CLAR-EM previamente acidificada con ácido fórmico 1%. Comenzando con un 15% de CH<sub>3</sub>CN hasta incrementarlo linealmente a 100% en un lapso de 8 minutos. Para el detector de fotodiodos las condiciones fueron ajustadas para un barrido de 200-500 nm con 4 nm de resolución.<sup>34, 35</sup>

Para la preparación de la muestra, ésta se disolvió en volúmenes iguales de MeOH y dioxano para obtener una concentración final de 2 mg/mL con un volumen de 150 µL.

## 6. Resultados y discusión

### 6.1 Pesos y rendimiento de los extractos y fracciones de *H. verticillata*

Se hicieron las maceraciones necesarias para obtener cantidades suficientes de las fracciones HvF1 y HvF2, sin embargo, el rendimiento respecto al material vegetal resultó menor del 5%. A continuación, se procedió a realizar la precipitación de triterpenos y, posteriormente, un fraccionamiento mediante un proceso de reparto. En el Cuadro 5, se incluye el rendimiento para cada fracción.

Fracción	Peso obtenido (g)	Rendimiento (%)
HvF1	35.78	2.32
HvF2	14.78	0.96
HvF3	5.87	0.38
HvF4	12.95	0.84
HvF6	3.93	0.25
HvF6dec	0.14	0.009
HvF7	3.43	0.22
HvF8	1.47	0.10

**Cuadro 5.** Pesos finales y rendimiento de los extractos definitivos con respecto al peso del material vegetal original. HvF1=acetona, HvF2=MeOH, HvF3= hexánico, HvF4= acetona sin triterpenos, HvF6= AcOEt, HvF7= acuosa, HvF8= n-BuOH

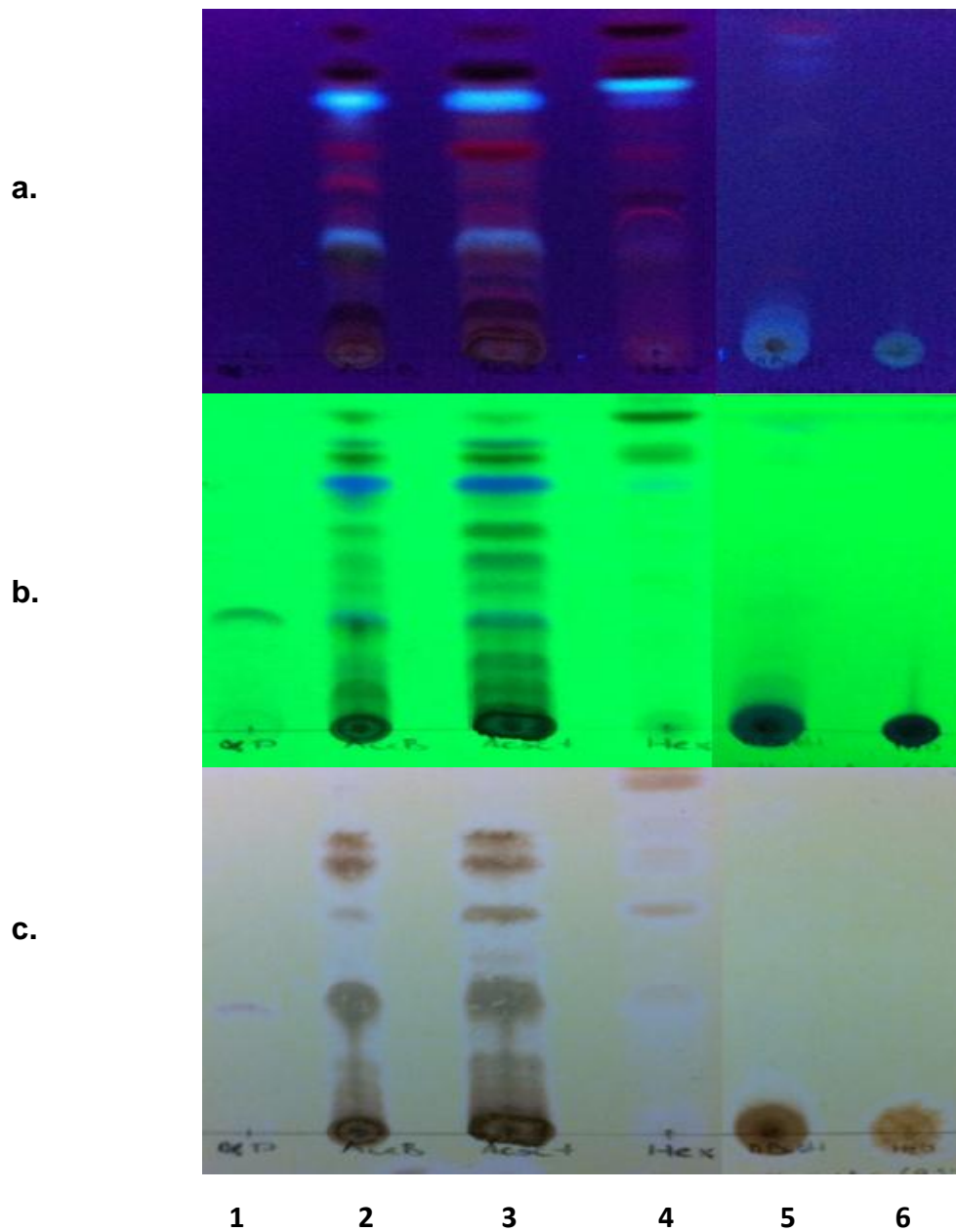
## 6.2 CCF de los extractos y fracciones

Se analizaron los extractos y fracciones mediante CCF (Figura 10). En el análisis al UV, tanto a 254 nm como a 365 nm, se pueden apreciar 2 bandas intensas de color azul fluorescente con Rf muy diferente en los carriles 2, 3 y 4, pero son muy tenues en la parte inferior del carril 4 y 5, estas bandas representan compuestos de diferente polaridad y con grupos funcionales diferentes a los pigmentos y triterpenos, como puede ser el caso de un compuesto aromático conjugado.

En el caso de los lignanos también se presenta absorción tanto para la referencia como en los carriles 2 y 3 a 365 nm,<sup>36</sup> pero por efectos de una baja concentración de las muestras, la absorción es casi imperceptible.

A 264 nm los lignanos aparecen como manchas oscuras sobre el fondo verde,<sup>36</sup> esto se puede ilustrar con la pequeña banda para la referencia de  $\alpha$ -peltatina y con las absorciones en los carriles 2 y 3, cuyo Rf similar conduce a inferir la presencia de este compuesto en esas fracciones. La aparente ausencia de esta banda en el carril 4 se debe a la baja solubilidad de la  $\alpha$ -peltatina en hexano.

Pero al rociar sulfato cérico de manera uniforme en la placa, las bandas azul fluorescente cambiaron a color marrón. Se alcanza a apreciar mejor la banda con Rf similar a la  $\alpha$ -peltatina en el carril 4, así como las demás bandas que conservan similitud en Rf con la  $\alpha$ -peltatina que se visualizaron mejor ya que el sulfato cérico es un revelador universal.



**Figura 9.** Perfil en CCF de las fracciones finales con la  $\alpha$ -peltatina como referencia y empleando 365 nm (a), 264 nm (b) y sulfato cérico (c). Donde:  $\alpha$ -peltatina (1), HvF4= acetona sin triterpenos (2), HvF6= AcOEt (3), HvF3= hexánico (4), HvF8= *n*-BuOH (5) y HvF7= acuosa (6).

### 6.3 Concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) de los extractos y fracciones

Se determinaron los valores de CI<sub>50</sub> de las diferentes fracciones (Cuadro 6). De acuerdo con los criterios de citotoxicidad, la mayoría de las fracciones son activas puesto que tienen un valor menor a 20 µg/mL. Al comparar los valores de CI<sub>50</sub> de cada fracción para las tres líneas celulares evaluadas, no se observa una diferencia marcada.

Fracción	HTC 15	HeLa	MCF 7
HvF3	1.79	0.32	0.92
HvF4	NE	NE	<0.2
HvF6	<0.2	<0.2	<0.2
HvF6dec	14.65	15.38	15.02
HvF7	>25	>25	>25
HvF8	17.94	10.25	15.82

**Cuadro 6.** Valores de concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) de los extractos y fracciones contra diferentes líneas derivadas de carcinomas humanos. (HTC15 = adenocarcinoma de colon, HeLa = carcinoma cérvico-uterino, MCF7= carcinoma mamario).

Se observa la mayor actividad citotóxica en las fracciones de baja a mediana polaridad, HvF3 (hexano), HvF4 (acetona sin triterpenos) así como HvF6 (AcOEt); gracias a la solubilidad de los lignanos en estos disolventes. En el caso del HvF3, se encontraron lignanos también debido al carácter hidrofóbico que confieren los anillos aromáticos a estos compuestos.

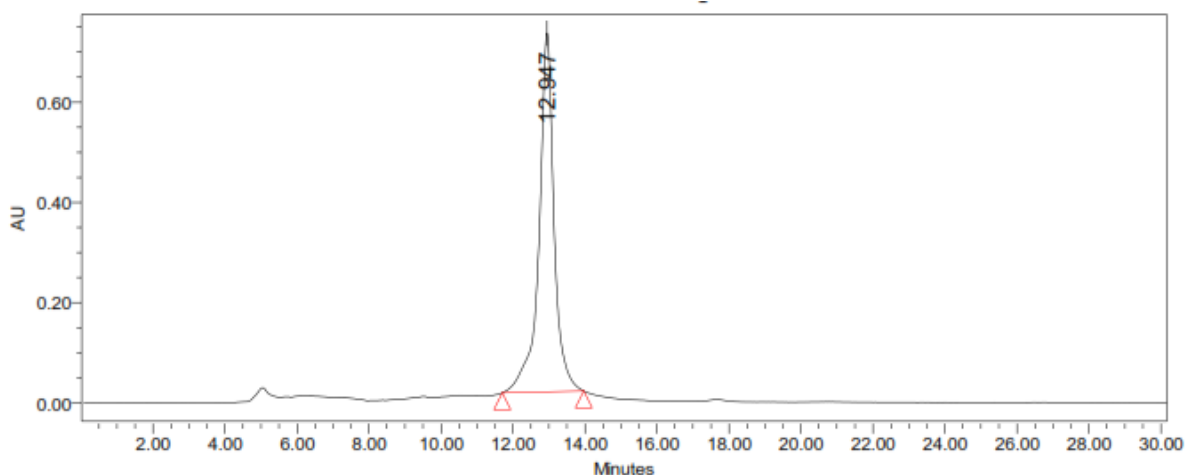
En las fracciones HvF6dec (AcOEt decolorado), HvF7 (acuoso), HvF8 (n-BuOH) se obtuvo una actividad muy reducida en comparación de las fracciones HvF3, HvF4 y HvF6. En el caso de HvF6dec que fue tratada con Tonsil 40, el valor de CI<sub>50</sub> aumentó, posiblemente porque retuvo a los lignanos junto con los pigmentos o por degradación de la muestra.

En la fracción HvF7, no se detectó actividad, por la poca solubilidad de los lignanos en agua, de hecho, se documenta que los lignanos más tóxicos son extraídos en muy bajas cantidades si la planta se prepara como una tisana.<sup>3</sup> En el caso de la fracción HvF8 se esperaría una actividad similar a HvF3, pero su actividad fue baja comparada con esta fracción porque se preparó a partir de la fase acuosa que contiene muy pocos agentes citotóxicos de interés. Lo que se puede demostrar en el análisis con sulfato cérico, donde los carriles 5 y 6 tienen una mancha en el punto de elución, lo que revela corresponde a compuestos muy polares.

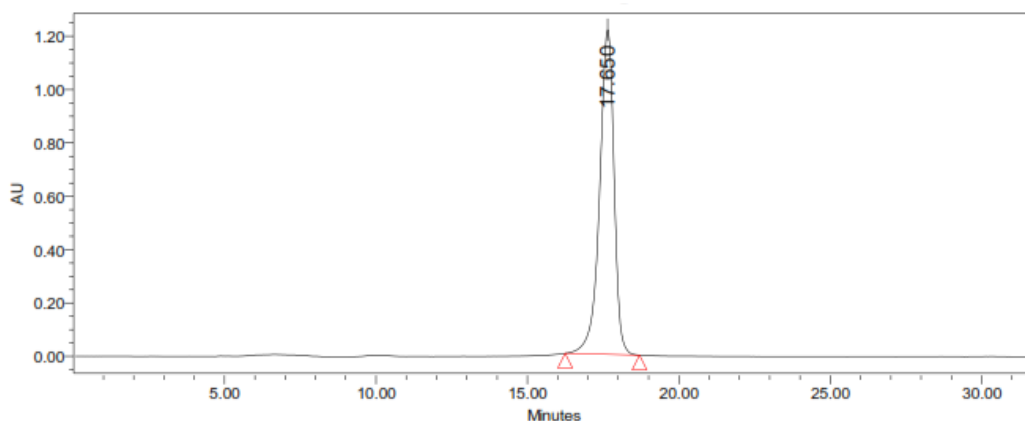
## 6.4 Cromatogramas de los extractos seleccionados

### 6.4.1 Cromatogramas en modo analítico

Se procedió al registro de los espectros de CLAR de las fracciones. En primer lugar, se registraron los cromatogramas de podofilotoxina y de  $\alpha$ -peltatina (Figuras 11 y 12).



**Figura 10.** Cromatograma correspondiente a la  $\alpha$ -peltatina ( $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$  1:1, flujo 0.3 mL/min, 210 nm)

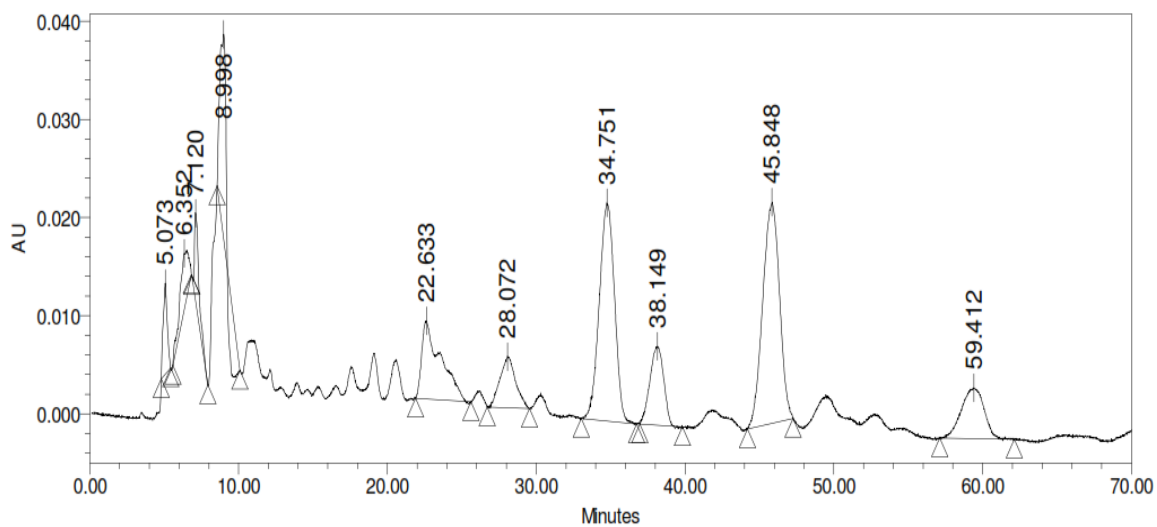


**Figura 11.** Cromatograma correspondiente a la podofilotoxina ( $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$  1:1, flujo 0.3 mL/min, 210 nm).

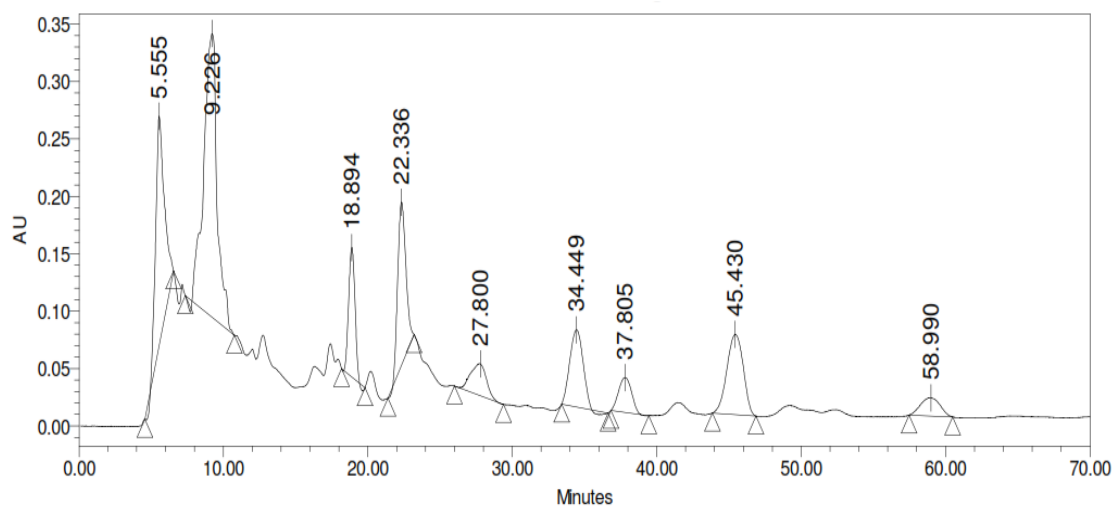
Ambos lignanos difieren un poco en su tiempo de retención, la  $\alpha$ -peltatina eluye primero en la columna de fase reversa (C18, octadecil silano) ( $t_R$  12.95 min) que la podofilotoxina ( $t_R$  17.65) debido a sus diferencias estructurales ya que la  $\alpha$ -peltatina posee un grupo hidroxilo en el anillo E, confiriéndole una mayor polaridad que la podofilotoxina. Con el registro de estos cromatogramas, se puede estimar que el tiempo de retención para la mayoría de los lignanos 1-ariltetrahidro-naftaleno estará muy cercano a estos.

Con las condiciones empleadas en CLAR a nivel analítico, se observa una buena separación para la mayoría de los picos y al escalar a nivel preparativo permitió la colecta de las fracciones purificadas. En la fracción HvF3 se observan los picos con menor magnitud de absorbancia en los primeros picos eluidos que en la HvF6 (figura 13 y 14), que demuestra que hay una concentración mayor de compuestos no polares, esto también queda confirmado en los resultados del ensayo de citotoxicidad.

Debido a que la fracción HvF6 concentró la mayor actividad para todas las líneas celulares empleadas, se decidió decolorar una parte de esta fracción (2 g) con Tonsil 40. El perfil cromatográfico de esta fracción se presenta en la figura 15.

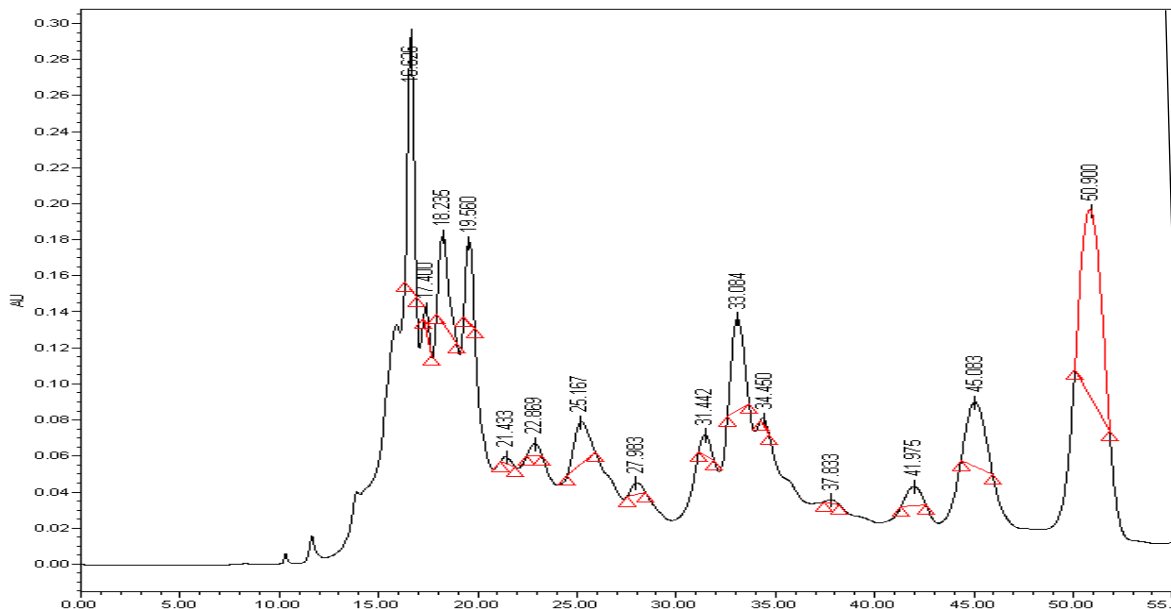


**Figura 12.** Cromatograma analítico de la fracción HvF3 (hexano). Fase móvil: CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O 1:1, flujo 0.3 mL/min. 210 nm.



**Figura 13.** Cromatograma analítico de la fracción HvF6 (AcOEt). Fase móvil: CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O 1:1, flujo 0.3 mL/min. 210 nm.



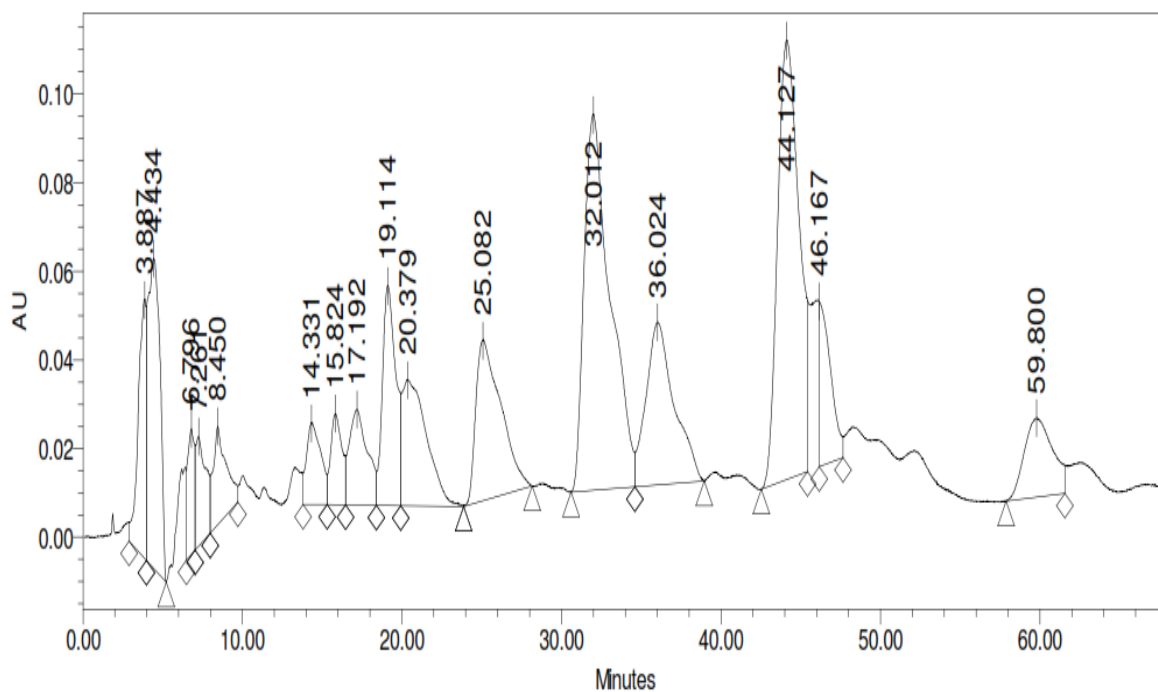


**Figura 14.** Cromatograma analítico de la fracción decolorada HvF6dec. Fase móvil: CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O 6:4, flujo 0.3 mL/min, 210 nm.

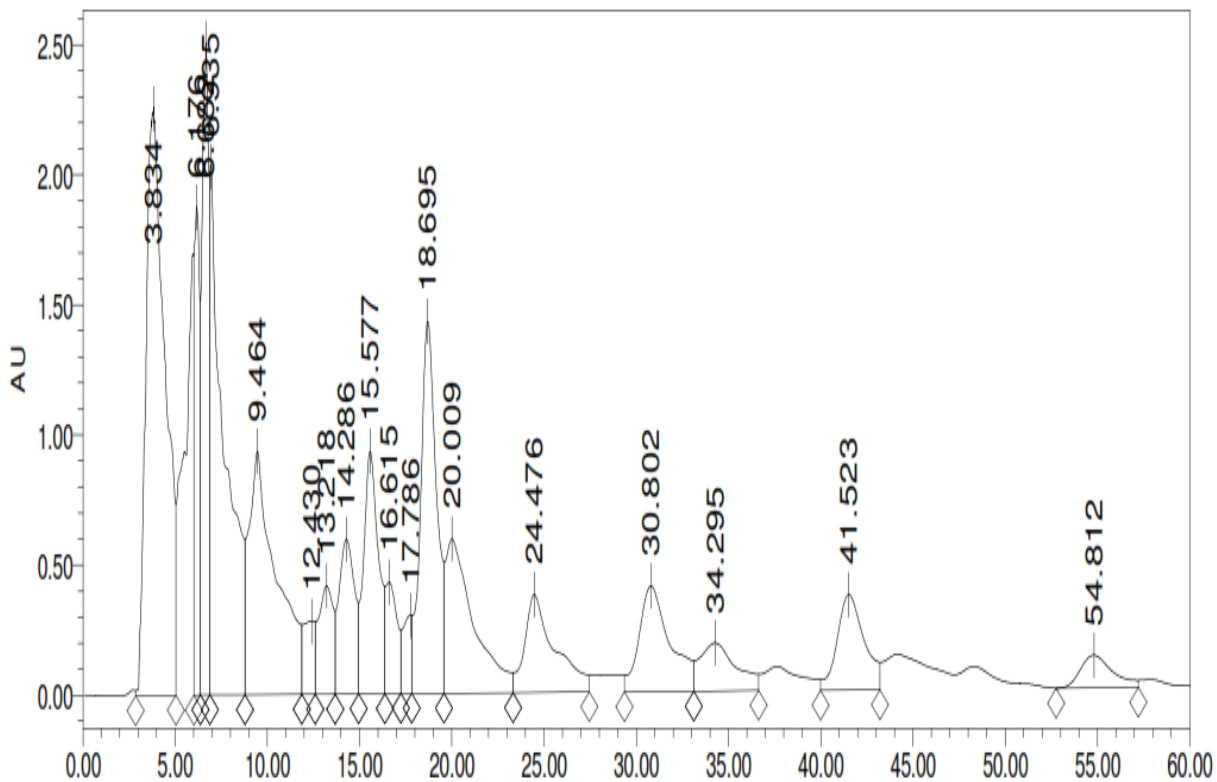
Al comparar los cromatogramas de la fracción antes y después de decolorar, se observan picos semejantes, como, por ejemplo, en los tres últimos picos. Se observa una mayor complejidad en el cromatograma de la Figura 15, que puede atribuirse a la descomposición de la fracción por el tratamiento con Tonsil, lo que también se refleja con el registro de la actividad citotóxica, que se pierde en la fracción decolorada. Este proceso se llevó a cabo en columna abierta empacada Tonsil 40, que es una efectiva tierra blanqueadora fabricada por activación ácida de la bentonita de calcio. Entre sus características físicas más importantes es que es un polvo verdoso-amarillo con estructura interna altamente porosa. Su propiedad química más relevante está en que posee sitios ácidos en la superficie que le permite la quimisorción y la catálisis ácida para la adsorción de compuestos polares como clorofila, carotenoides, fosfolípidos y peróxidos. En este caso el número 40 indica el grado de filtración rápida medido en segundos.<sup>29</sup>

### 6.4.2 Cromatogramas en modo preparativo

Se realizó el escalamiento a nivel preparativo, presentando en las figuras 16 y 17 los cromatogramas. En total se obtuvieron catorce subfracciones, nueve para HvF6 y cinco para HvF3. En todos los casos se tienen subfracciones con tiempo de retención de entre 13 a 17 min, que representan el tiempo promedio para las referencias podofilotoxina y  $\alpha$ -peltatina, pero no se descartaron los picos vecinos con tiempos de retención fuera de ese rango, ya que podían corresponder a otros compuestos citotóxicos con diferencias en su patrón de sustitución.



**Figura 15.** Cromatograma preparativo de la fracción HvF3. Fase móvil: CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O 1:1, flujo 8 mL/min. 210 nm.



**Figura 16.** Cromatograma preparativo de la fracción HvF6. Fase móvil: CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O 1:1, flujo 8 mL/min. 210 nm.

### 6.5 Pesos y rendimientos de las subfracciones obtenidas

En el cuadro 7 se incluyen las cantidades y los porcentajes de rendimiento de cada una de las fracciones generadas por CLAR.

Subfracción	Peso (g)	% rendimiento
HvF3-25	0.0036	0.00023
HvF3-32	0.0057	0.00037
HvF3-36	0.0018	0.00012
HvF3-44	0.0015	0.000097
HvF3-59	0.0023	0.00015
HvF6-04	0.017	0.011
HvF6-06	0.0093	0.0006
HvF6-10	0.014	0.00091
HvF6-15	0.0051	0.00033
HvF6-18	0.0025	0.00016
HvF6-24	0.0032	0.00021
HvF6-30	0.0014	0.000091
HvF6-41	0.0017	0.00011
HvF6-54	0.0021	0.00014

**Cuadro 7.** Pesos obtenidos en gramos de todas las subfracciones, así como su porcentaje de rendimiento con respecto al material vegetal inicial.

## 6.6 Concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) de las subfracciones obtenidas

Del segundo fraccionamiento se determinó la CI<sub>50</sub> (Cuadro 8). La mayoría de las subfracciones desarrollan una citotóxicidad marcada, siendo similar para las líneas sensibles y la resistente de MCF-7, en las fracciones HvF3 (12 a 20) y HvF6 (11 a 17), se observa una actividad menor a la concentración evaluada por lo que es de esperarse que los lignanos 1-aril-tetrahidronaftaleno estén presentes en estas fracciones. El resto de las fracciones, a excepción de HvF10, tienen una actividad marginal, principalmente en las células resistentes a vinblastina; puede ser por la

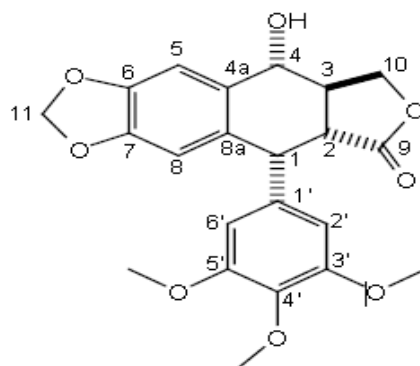
presencia de pigmentos y triterpenos, u otros lignanos con otro patrón de sustitución e isomería en la fusión de los anillos C/D que los hagan menos activos.

Fracción	CI <sub>50</sub> (µg/mL) MCF 7	CI <sub>50</sub> (µg/mL) MCF 7 V <sup>+</sup>
HvF3-25	9.55	16.51
HvF3-32	<0.2	<0.2
HvF3-36	<0.2	<0.2
HvF3-44	<0.2	<0.2
HvF3-59	8.28	18.24
HvF6-04	3.63	24.66
HvF6-06	0.67	0.78
HvF6-10	<0.2	<0.2
HvF6-15	<0.2	<0.2
HvF6-18	<0.2	<0.2
HvF6-24	<0.2	<0.2
HvF6-30	<0.2	<0.2
HvF6-41	18.71	24.55
HvF6-54	>25	>25

**Cuadro 8.** CI<sub>50</sub> de las subfracciones de HvF3 y HvF6 contra las líneas celulares de carcinoma mamario sensible y resistente a vinblastina (V<sup>+</sup>)

### 6.7 Espectros de RMN-<sup>1</sup>H de las subfracciones de HvF6dec

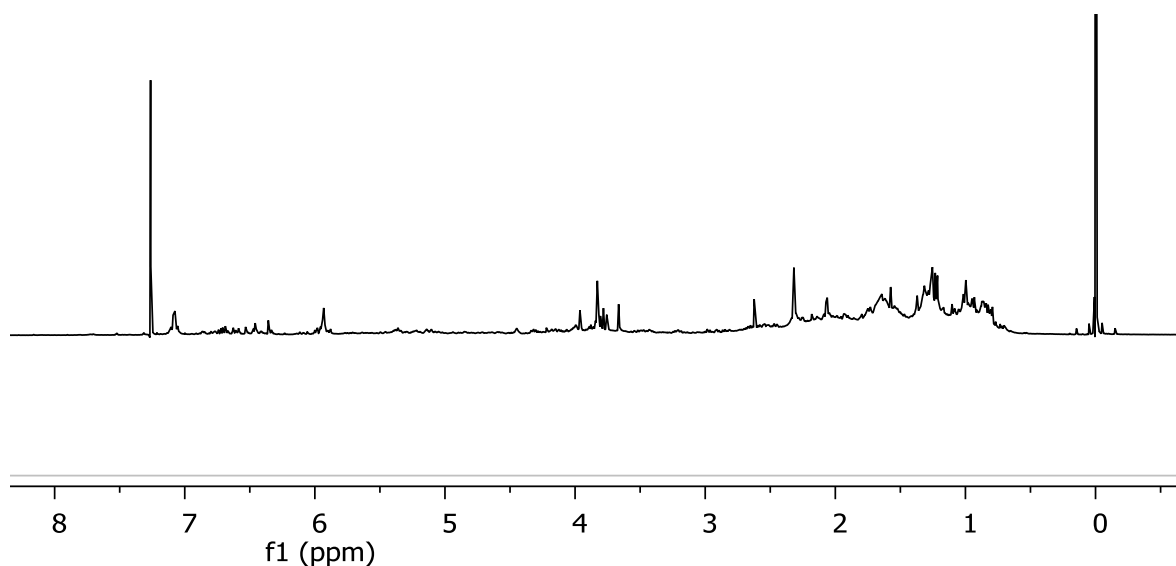
La podofilotoxina y los demás lignanos 1-ariltetrahidronaftaleno tienen en común el núcleo estructural de 4 anillos, cuyas señales más importantes son en la mayoría de los casos las que se ilustran en el cuadro 9.



Cantidad de señales	Desdoblamiento	$\delta$ (ppm)	Protón
1	doblete	4.5	1 (carácter bencílico)
2	singulete	6.55 y 6.71	5 y 8 (identidad aromática)
2	doblete	5.5-5.9	11 (grupo metilendioxi)
1	singulete	6.3-6.6	2' y 6'
1	Singulete	3.78	3' y 5' (metoxilos)
1	singulete	3.8	4' (metoxilo)

**Cuadro 9.** Señales de RMN- $^1\text{H}$  principales para los lignanos 1-ariltetrahidronaftaleno.<sup>33</sup>

Se registraron los espectros de RMN  $^1\text{H}$  para todas las fracciones. El conjunto de señales muy traslapadas que aparecen justo después del TMS corresponden a los triterpenos y pigmentos que estuvieron en mayor número en las muestras al ser metabolitos secundarios abundantes (Fig. 18). Al tratar de localizar señales características para los lignanos, se observaron señales aromáticas entre 6-7 ppm. Las señales centradas aproximadamente en 4 ppm (singuletes) que representarían a los grupos metóxilo en el anillo E.

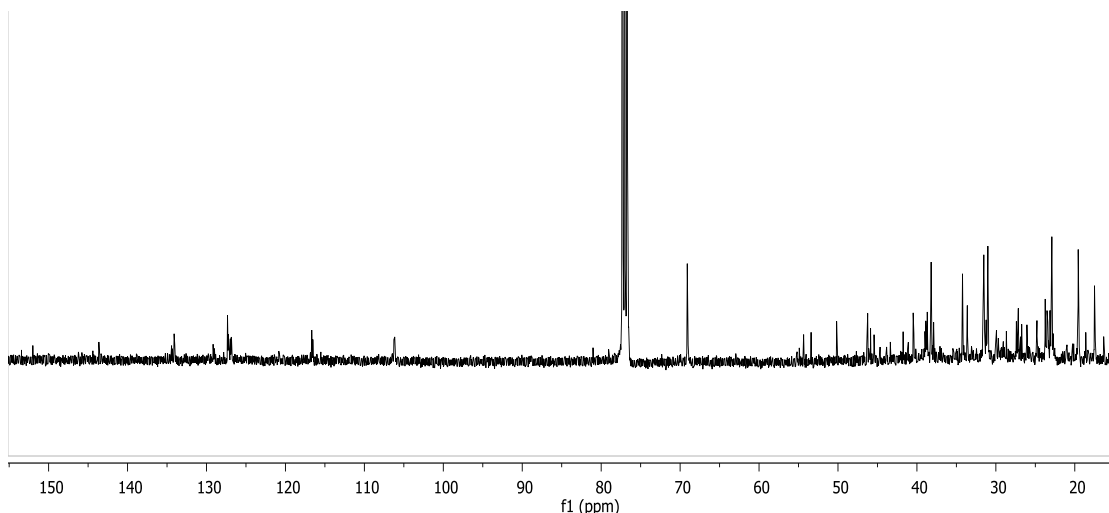


**Figura 17.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H de la fracción HvF6-4dec (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

### 6.8 Espectros de RMN-<sup>13</sup>C de las subfracciones de HvF6dec

En general, en estos espectros se aprecian numerosas señales a campo más alto (desplazamiento químico de 10 a 60 ppm) que pertenecen a los triterpenos cuya estructura básica consiste en metilos (CH<sub>3</sub>), metilenos (CH<sub>2</sub>) y metilos (CH).

Con respecto a las señales aromáticas de los lignanos, estas son casi imperceptibles entre la línea base por la baja concentración de las muestras, a excepción del espectro de la muestra HvF6-12dec, donde se observa un conjunto de señales de 105 a 135 ppm, es decir a un campo más bajo desprotegido; que es el desplazamiento químico más común para los dobles enlaces y los anillos aromáticos (Figura 19).



**Figura 18.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C de la subfracción HvF6-12 dec (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>)

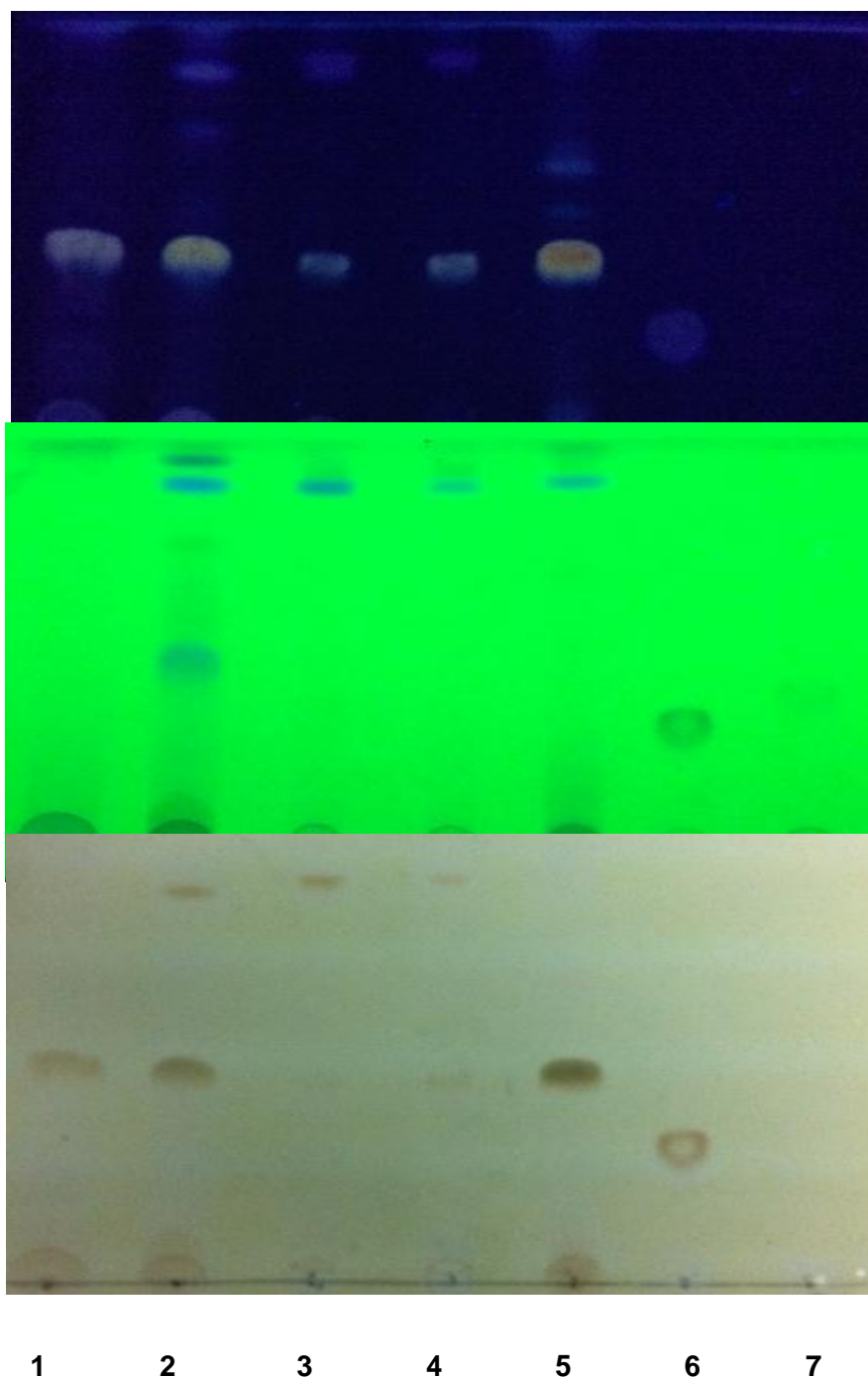
### 6.9 CCF de las subfracciones obtenidas de HvF3

Las subfracciones obtenidas de HvF3 fueron analizadas por CCF, en la figura 20 se muestra la cromatoplaqueta visualizada a 254 nm y 365 nm, así como el resultado del empleo del agente cromógeno sulfato cérico/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. En primer lugar, se observó la presencia de compuestos altamente conjugados con un valor de R<sub>f</sub> alto. Los compuestos con un R<sub>f</sub> cercano a 0.5 que se aproximan a la α-peltatina (apenas perceptible a 254 nm), no se lograron apreciar a 365 nm posiblemente por efectos de la concentración. Pero al ser visualizados con el agente cromógeno sulfato cérico/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se desarrolló color en las bandas con un R<sub>f</sub> idéntico al del compuesto control en todas las subfracciones, lo que supone que se trate de compuestos isoméricos.

### 6.10 CCF de las subfracciones obtenidas de HVF6

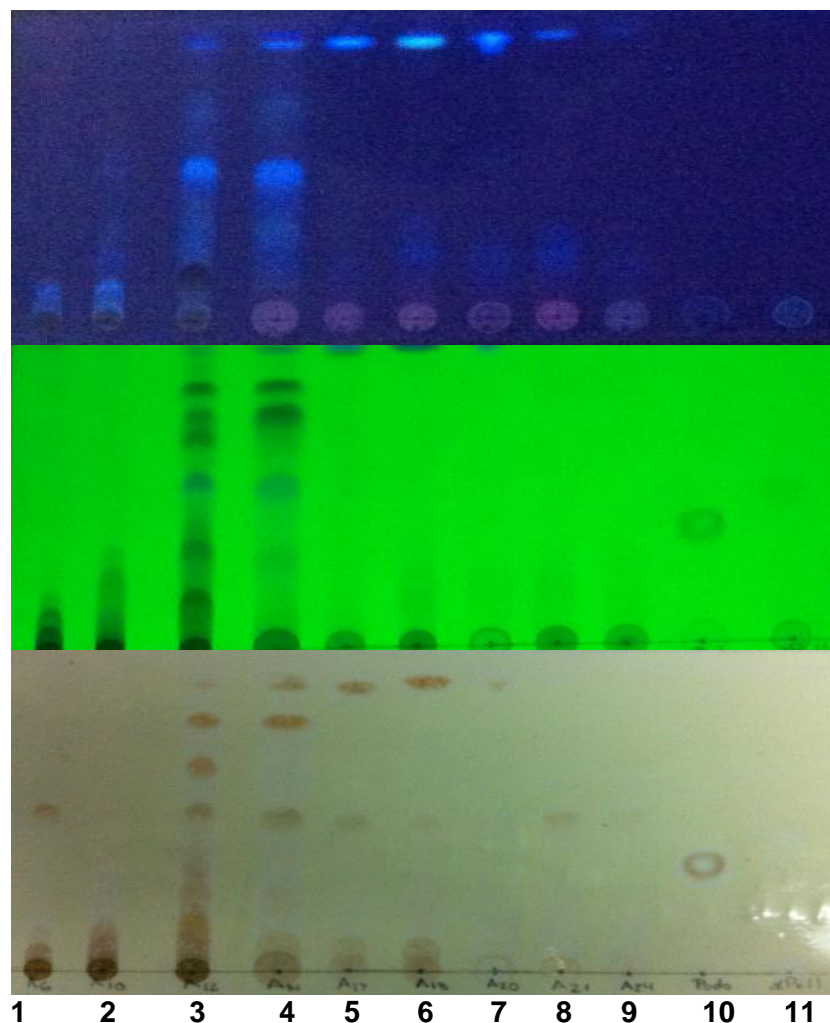
En la figura 21 se pueden apreciar compuestos altamente conjugados para casi todos los carriles, pero su R<sub>f</sub> no corresponde a ninguna de las referencias empleadas





**Figura 19.** Perfil en CCF de las subfracciones purificadas por CLAR de HvF3 (hexano). Donde 1= HvF3-25, 2= HvF3-32, 3= HvF3-36, 4= HvF3-44, 5=HvF3-59, 6= referencia de podofilotoxina y 7= referencia de  $\alpha$ -peltatina.

En el caso de los lignanos, las referencias son apenas visibles a 254 nm, principalmente la  $\alpha$ -peltatina y ningún compuesto con Rf parecido puede apreciarse tanto a 254 nm como a 365 nm, salvo en los carriles 3 y 4. Al rociar con sulfato cérico aparecen bandas de distinta concentración con Rf intermedio parecido al de  $\alpha$ -peltatina en casi todos los carriles.



**Figura 20.** Perfil en CCF de las subfracciones purificadas por CLAR de HvF6 (AcOEt). Donde: HvF6-04 (1), HvF6-06 (2), HvF6-10 (3), HvF6-15 (4), HvF6-18 (5), HvF6-24 (6), HvF6-30 (7), HvF6-41 (8), HvF6-54 (9), referencia de podofilotoxina (10), referencia de  $\alpha$ -peltatina (11).

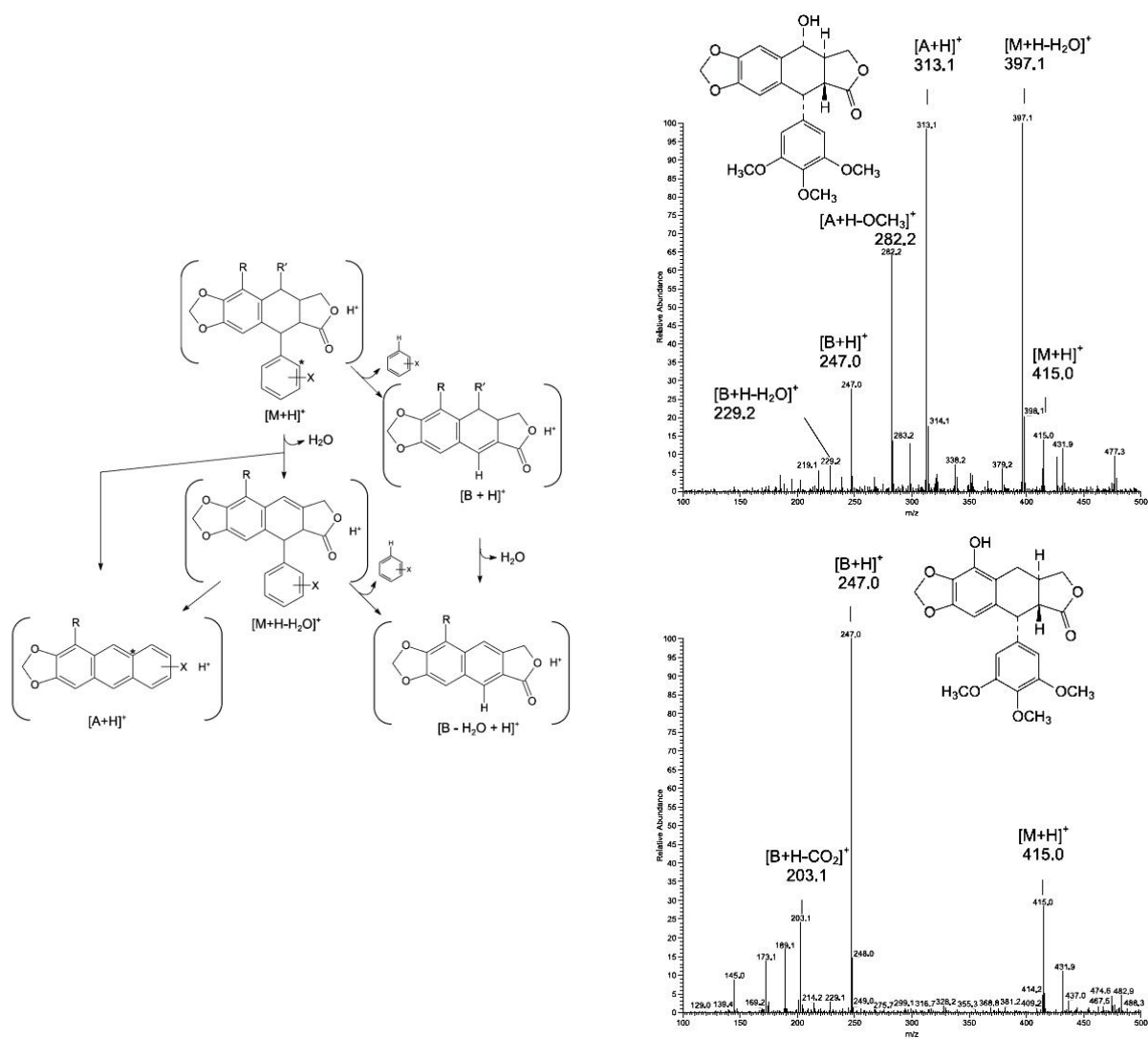
## 6.11 Análisis por CLAR-EM.

La fragmentación general de los lignanos 1-aril-tetrahidronaftaleno, bajo ionización por electrospray en modo positivo, se produce a través de la eliminación del anillo E  $[B+H]^+$  y la subsecuente pérdida de  $CO_2$  del anillo de lactona  $[B-CO_2+H]^+$ , este último fragmento suele ser muy débil. El catión  $[B+H]^+$  sufre una deshidratación  $[B-H_2O+H]^+$  que genera un producto más estable y, por lo tanto, con señal más intensa (Figura 22). En el cuadro 10 se presentan los iones característicos para la identificación de algunos compuestos aislado de *Hyptis verticillata*.<sup>37</sup>

El peso de los fragmentos en la  $\alpha$ -peltatina corresponde a valores de  $m/z$  247  $[B+H]^+$ , 229  $[B-CO_2+H]^+$  y 185  $[A]^+$ . Para la podofilotoxina son 313  $[A+H]^+$ , 247  $[B+H]^+$ , 229  $[B-CO_2+H]^+$  y 185  $[B+H-H_2O-CO_2]^+$ .  $\beta$ -Peltatina tiene el mismo patrón de fragmentación que la  $\alpha$ -peltatina pero con el fragmento adicional de 203  $[B-CO_2+H]^+$  y finalmente el éter metílico de la  $\beta$ -peltatina presenta los siguientes fragmentos de  $m/z$  261  $[B+H]^+$  y 217  $[B-CO_2+H]^+$  (Figura 22).<sup>37,38</sup>

**Cuadro 10.** Iones característicos en EM-ESI modo negativo para algunos de los compuestos citotóxicos de *Hyptis verticillata*.

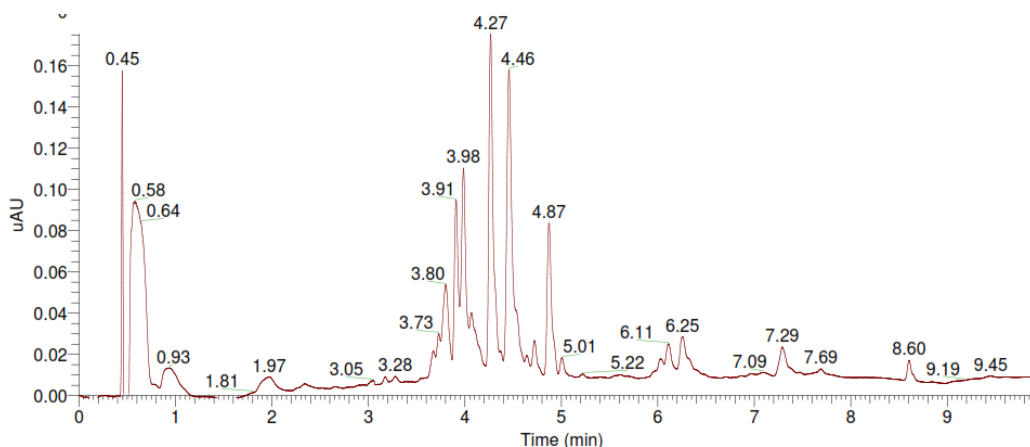
Compuesto	Peso Molecular	$[M+H]^+$	$[M+NH_4]^+$	Fragmentación ( $m/z$ )
$\alpha$ -peltatina	400	401	418	247, 203, 189
podofilotoxina	414	415	432	397, 313, 282, 247, 229, 185
$\beta$ -peltatina	414	415	432	247, 229, 203, 189, 185, 173
desoxipodofilotoxina	398	399	416	231, 187, 173
yateína	400	401	418	223, 181
éter metílico de la $\beta$ -peltatina	428	429	446	261, 217
deshidropodofilotoxina	410	411	428	no se observa



**Figura 21.** Patrón de fragmentación para las ariltetralinas mediante ionización por electrospay modo negativo (izquierda). Espectros de masas para la podofilotoxina (superior derecha) y la  $\beta$ -peltantina (inferior derecha).

### 6.11.1 Cromatograma y EM de las subfracciones HvF3

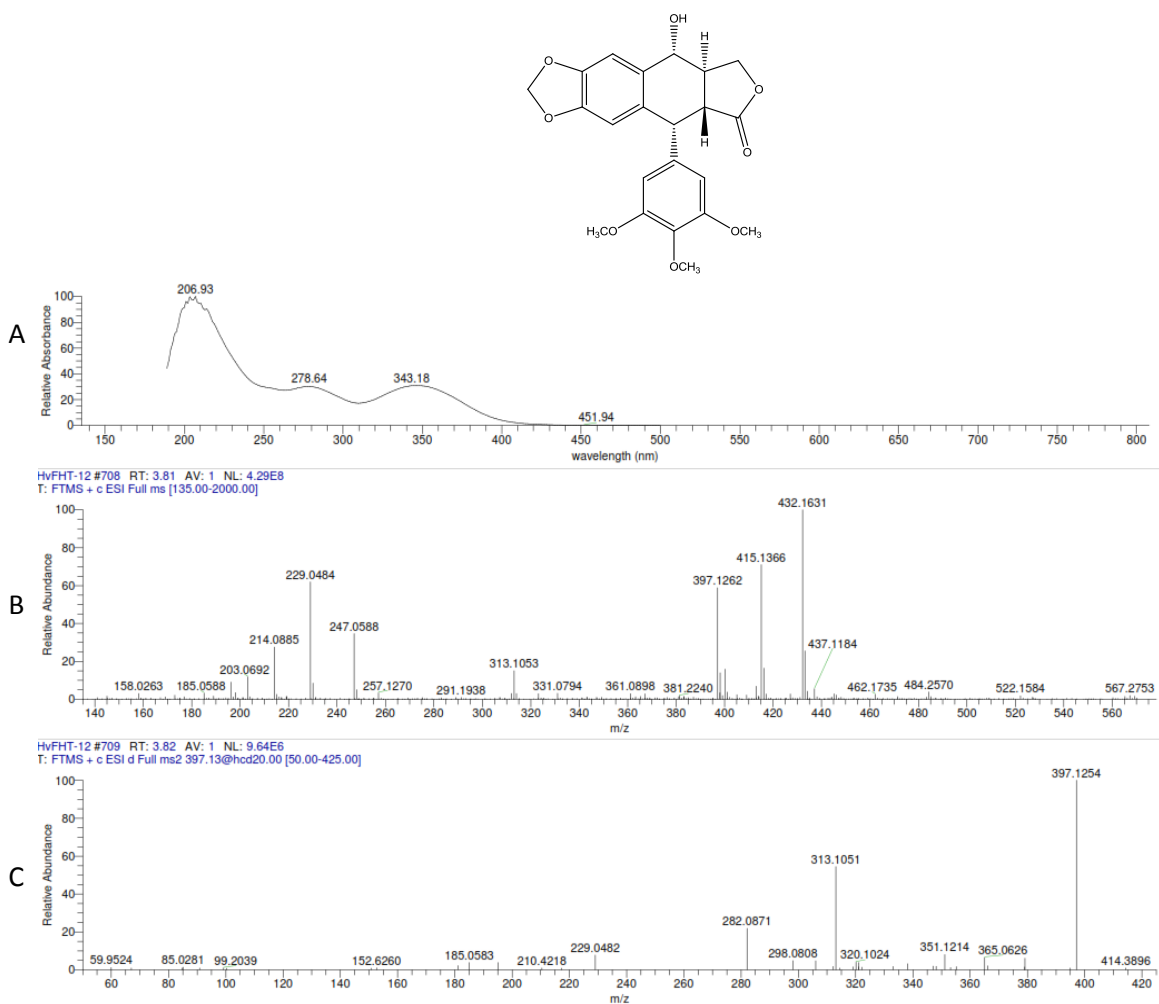
Los criterios de selección para este análisis fue el rendimiento de cada una de las fracciones y su actividad citotóxica registrada. El cromatograma de la subfracción HvF3 generado en el equipo CLAR-EM se presenta en la figura 23. Cada pico mayoritario se sometió a la ionización mediante electrospay en modo positivo.



**Figura 22.** Cromatograma de la subfracción HvF3 generado por CLAR-EM.

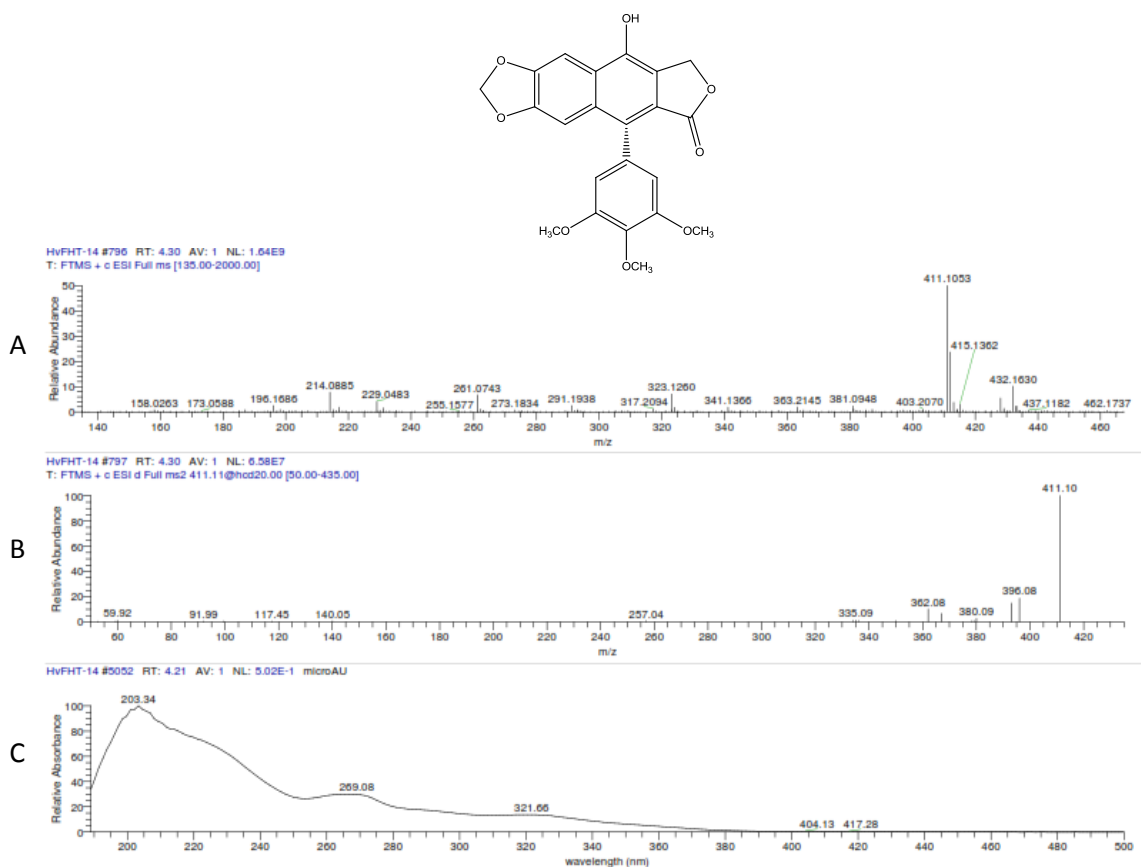
Se analizaron los espectros que se obtuvieron en el modo positivo mediante comparación de los valores de  $m/z$  para cada señal con los valores presentados en el Cuadro 10. En las figuras 24 a 29 se presentan los espectros ESI en modo positivo, el espectro masas-masas y el espectro de UV de los picos que permitieron identificar lignanos.

La subfracción con  $t_R$  3.91 min (HvF3-32,  $Cl_{50} < 0.2 \mu\text{g/ml}$ ) corresponde a la podofilotoxina con  $m/z$  de 415.1366  $[M + H]^+$  con una abundancia del 70%, una abundancia del 100% para el aducto con amoníaco  $[M + NH]^+$  de  $m/z$  432.1631. En el espectro de masas-masas se observa el fragmento con  $m/z$  de 397.1254 que corresponde a la pérdida del grupo hidróxilo  $[M - OH]^+$ , además de los fragmentos con  $m/z$  313  $[A + H]^+$ , 247  $[B + H]^+$ , 229  $[B + H - H_2O]^+$  y 185  $[B + H - H_2O]^+$  (Figura 24).



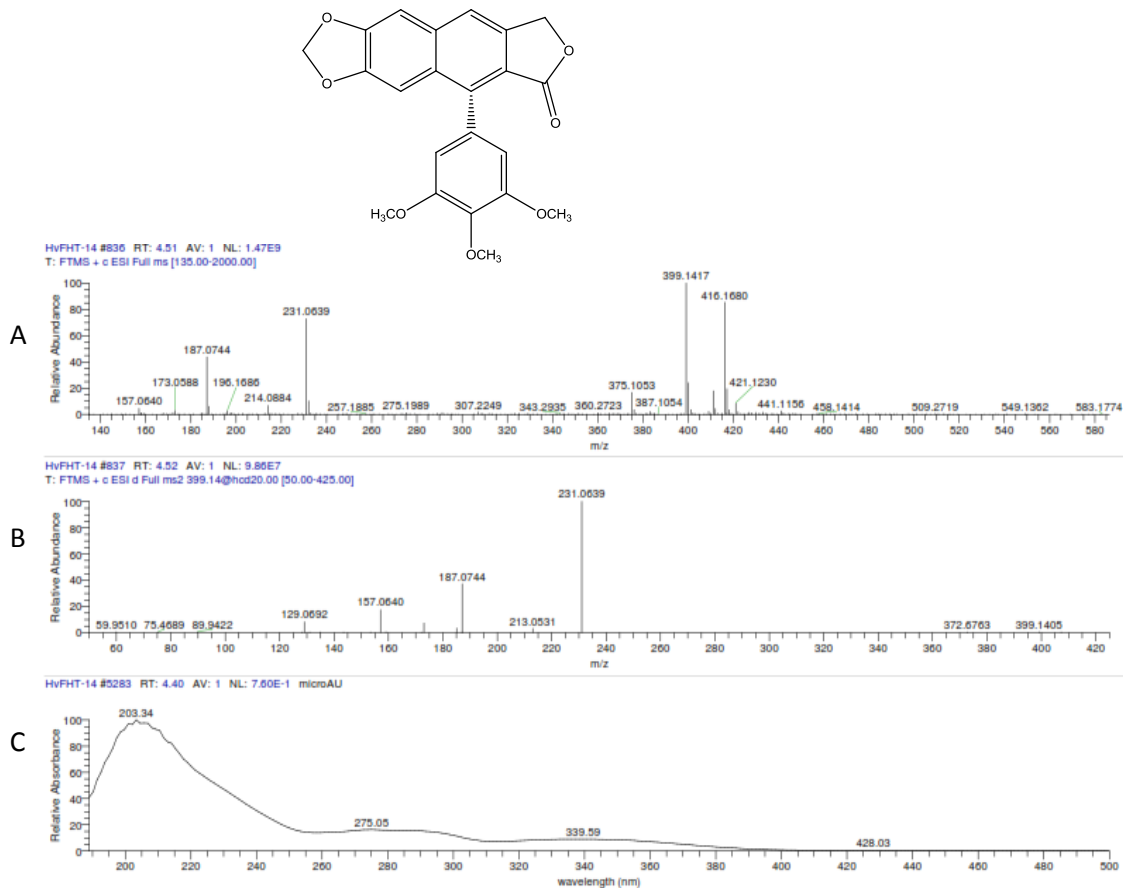
**Figura 23.** Espectro de electrospray de la podofilotoxina (tr 3.91 min). A. Espectro de UV; B. Electropray en modo positivo; C. Espectro masas-masas para el pico  $m/z$  397.1254.

La subfracción con  $t_R$  4.27 min (Hv3-32,  $Cl_{50}$  <0.2  $\mu\text{g/ml}$ ) corresponde a la deshidropodofilotoxina con  $m/z$  de 411.1052 y 100% de abundancia para el ión cuasimolecular  $[M + H]^+$ . Se observa el aducto con amoniaco  $[M + NH]^+$  de  $m/z$  428 con una intensidad muy baja (Figura 25). Debido a su núcleo de arilnaftaleno no presenta fragmentaciones adicionales como el resto de los ligandos analizados.



**Figura 24.** Espectro de electrospray de la deshidropodofilotoxina (tr 4.27 min). A. Electrospray en modo positivo; B. Espectro masas-masas; C. Espectro de UV.

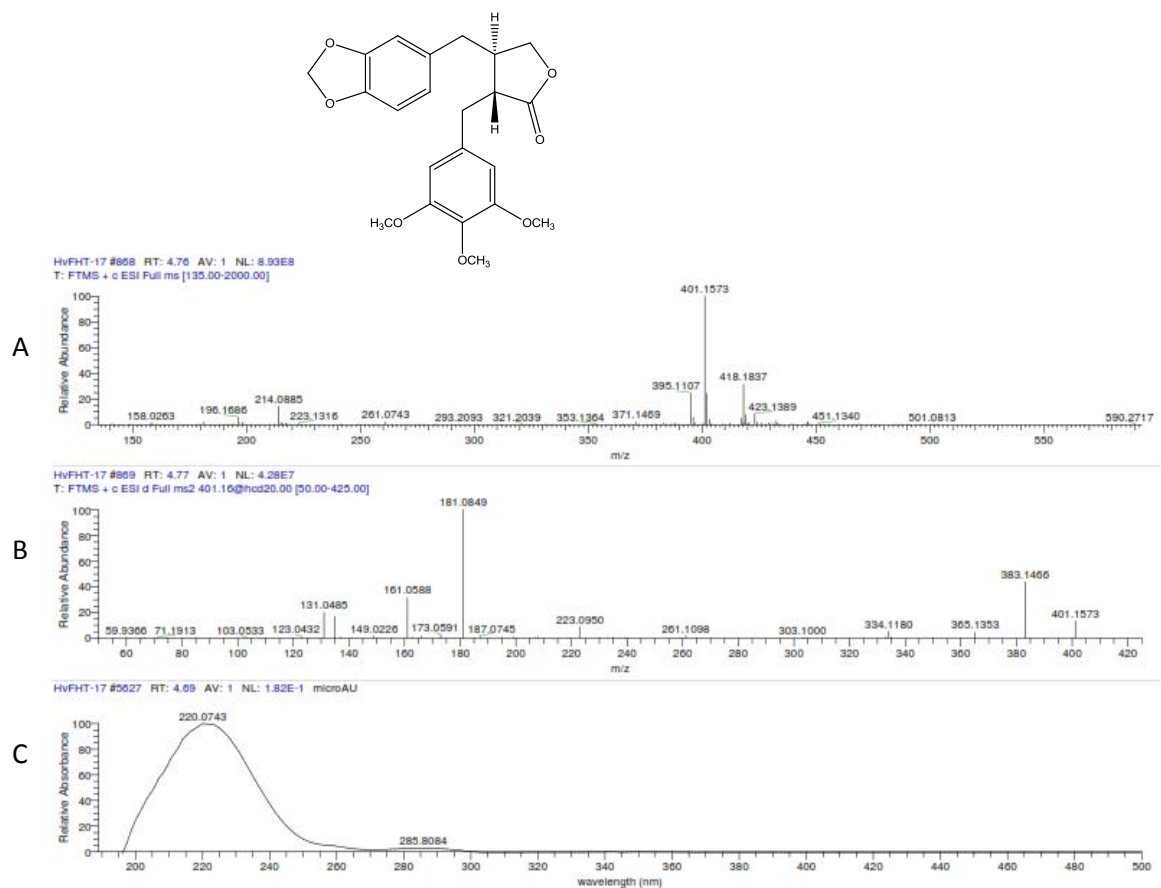
En la subfracción con  $t_R$  4.46 min (HvF3-36,  $Cl_{50}$  <0.2  $\mu\text{g/ml}$ ) se tiene uno de los compuestos mayoritarios y corresponde a la desoxipodofilotoxina que tiene el pico base con una  $m/z$  de 399.1416 y una abundancia de alrededor 100% que representaría  $[M+H]^+$ , se puede observar el otro ión cuasimolecular  $[M + NH_4]^+$  con  $m/z$  416.1680 y una abundancia de alrededor de 75-80%, así como el patrón de fragmentación descrito para este lignano con cationes característicos de  $m/z$  231 y 187 (Figura 26).



**Figura 25.** Espectro de electrospray de la desoxipodofilotoxina (tr 4.46 min). A. Electrospray en modo positivo; B. Espectro masas-masas para el pico de  $m/z$  399.1417; C. Espectro de UV.

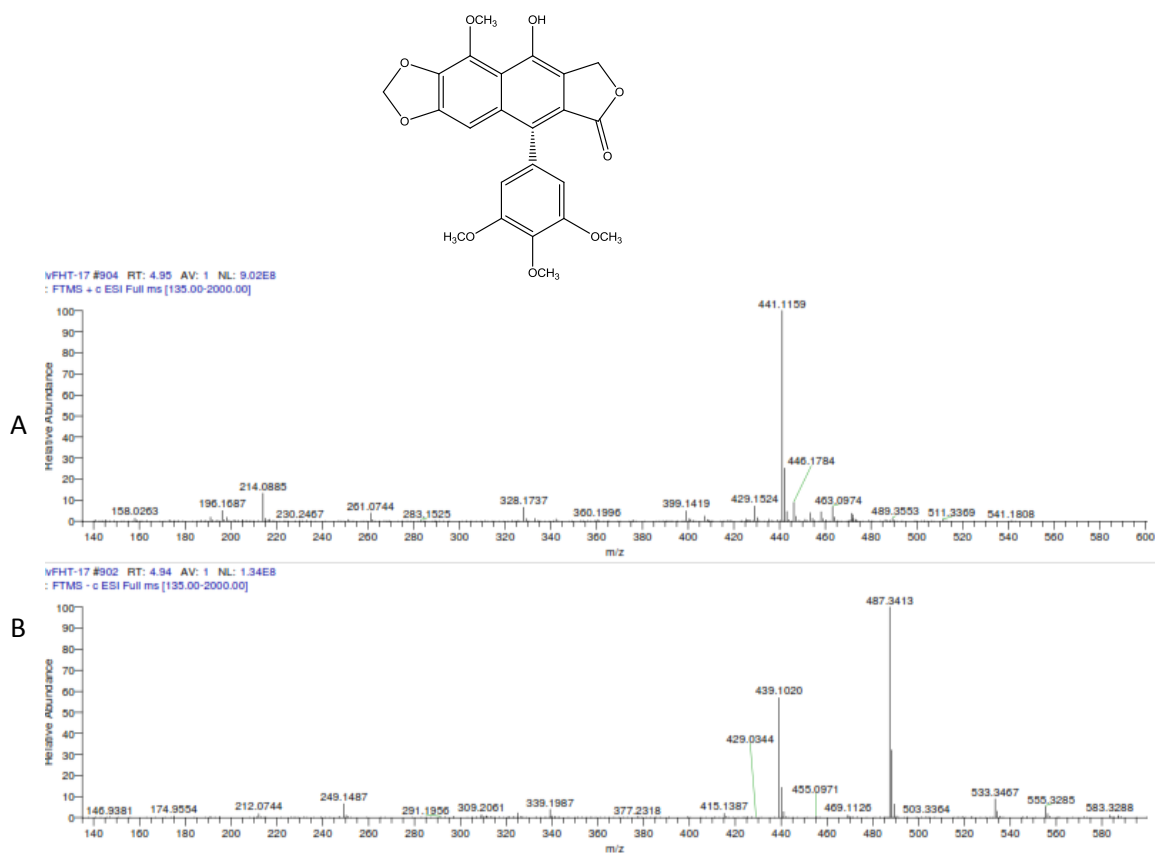
En la figura 27 se pueden apreciar los picos de los iones pseudomoleculares  $[M+H]^+$  y  $[M+NH_4]^+$  con  $m/z$  de 401.1573 y 418.1873, respectivamente, para el eluato de tr 4.78 min (HvF3-36,  $Cl_{50} < 0.2 \mu\text{g/ml}$ ). Los fragmentos de  $m/z$  223 y 181, detectados en la secuencia de fragmentación tándem para el  $[M+H]^+$ , se producen a partir de las rupturas bencílicas y permiten asignar la estructura de la yateína de acuerdo con los fragmentos presentados en el cuadro 10.





**Figura 26.** Espectro de electrospay de la yateina (tr 4.78 min). A. Electrospay en modo positivo. B. Espectro masas-masas para el pico de  $m/z$  401.1572; C. Espectro de UV.

En el pico con  $t_R$  4.87 min (HvF3-44,  $Cl_{50} < 0.2 \mu\text{g/ml}$ ) se identificó a la 5-metoxideshidropodofilotoxina con el ion base  $m/z$  441.1159 (Figura 28) y, al igual que con la deshidropopofilotoxina no se observó el aducto con amoniaco  $[M + NH]^+$  y no se observaron fragmentaciones (Figura 24), debido a la estabilidad de su núcleo de arilnaftaleno. Por lo tanto, la presencia de esta clase de lignano explica la baja citotoxicidad de la fracción analizada.

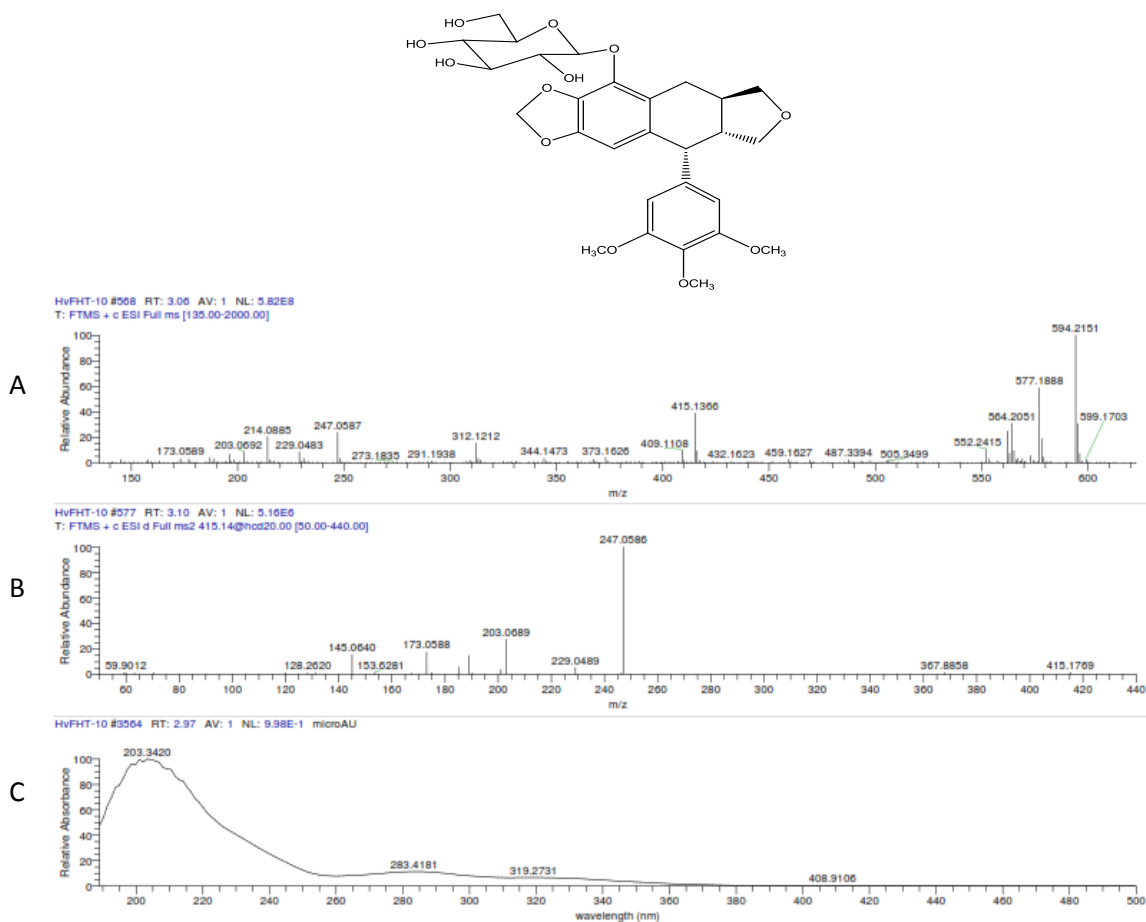


**Figura 27.** Espectro de electro spray de la 5-metoxideshidropodofilotoxina (tr 4.87 min). A. Electro spray en modo positivo. B. Electro spray en modo negativo.

### 6.11.2 EM de las subfracciones HvF6

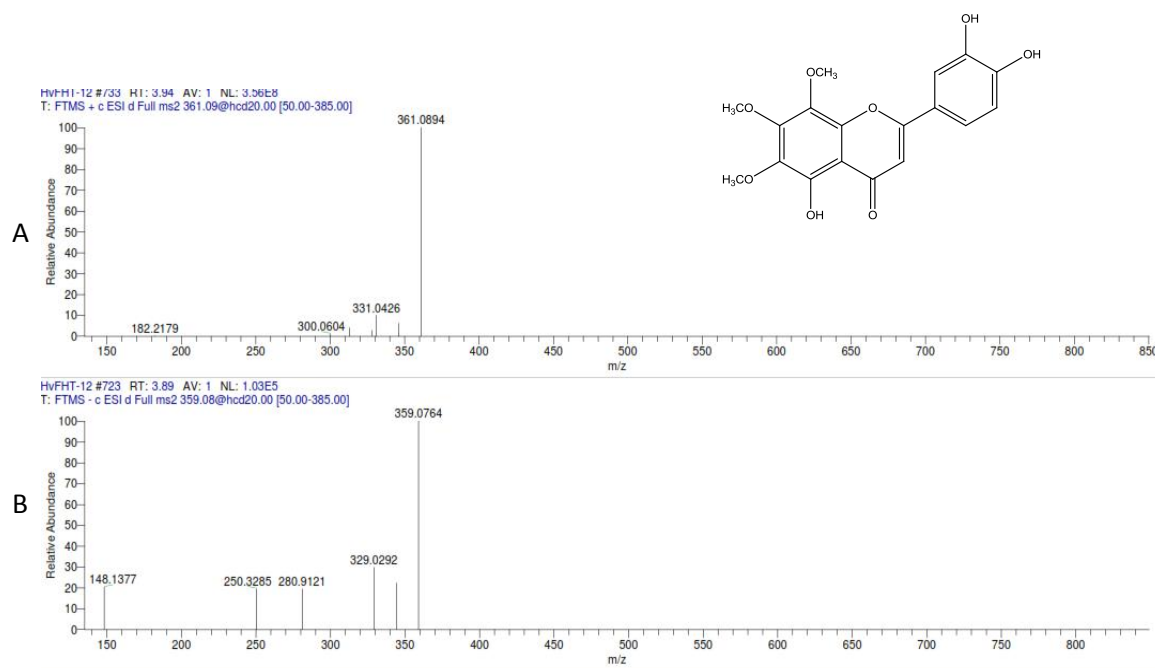
En la fracción HvF6 se detectaron algunos de los compuestos identificados en la fracción HvF3 (Cuadro 12). También, se identificó para el tr 3.08 min (HvF6-06,  $Cl_{50}$  0.67  $\mu\text{g/ml}$ ), de mayor polaridad, al glucósido de la  $\beta$ -peltatina (Figura 29). En el espectro, se puede apreciar que se trata de un lignano unido a un azúcar, ya que se detecta un ión con valor de  $m/z$  594.2151  $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$ , que corresponde al pico base, un segundo pico con abundancia de 60% con  $m/z$  577  $[\text{M} + \text{H}]^+$  y el ión correspondiente al núcleo de lignano de  $m/z$  415.1366, éste último se genera por

la pérdida de la unidad de glucosa. El patrón de fragmentación de esta molécula, cuando se analizó en tándem para el catión de  $m/z$  415.1366, generó los cationes característicos que permitieron la identificación de la  $\beta$ -peltantina en valores de  $m/z$  247, 229, 203, 189, 185 y 173.<sup>39</sup> Los fragmentos catiónicos que caracterizarían al glucósido de la podofilotoxina tendrían valores de  $m/z$  397, 313 y 282. Por lo tanto, la presencia del glucósido de la  $\beta$ -peltantina, como un constituyentes de la fracción con tr 3.08 min (HvF6-06), explica un aumento en el valor de la  $Cl_{50}$  de esta fracción y su mayor polaridad.



**Figura 28.** Espectro de electro spray del glucósido de la  $\beta$ -peltantina (tr 3.08 min). A. Electro spray en modo positivo; B. Espectro masas-masas para el pico  $m/z$  415.1769; C. Espectro de UV.

Adicionalmente, se registró un espectro de masas donde se observa un pico base de  $m/z$  361.0897  $[M+H]^+$  y con la ausencia del aducto  $[M+NH_4]^+$  que es característico de los lignanos (Figura 30). Posiblemente, este metabolito corresponde a la sideritoflavona que se ha descrito previamente en los extractos de esta planta. En el cuadro 12 se enumeran los compuestos identificados en las dos fracciones analizadas y sus tiempos de retención.



**Figura 29.** Espectro de electrospray de la sideritoflavona (tr 3.94 min). A. Electrospray en modo positivo. B. Espectro masas-masas.

<b>Subfracción</b>	<b>t<sub>R</sub></b>	<b>Compuesto</b>
HvF3	3.91	Podofilotoxina (1)
HvF3	3.98	Sideritoflavona (17)
HvF3	4.27	Deshidropodofilotoxina (2)
HvF3	4.46	Desoxipodofilotoxina (3)
HvF3	4.78	Yateína (16)
HvF3	4.87	5-metoxideshidropodofilotoxina (7)
HvF6	3.08	Glucósido de la $\beta$ -peltantina (18)*
HvF6	3.85	Podofilotoxina (1)
HvF6	4.32	Deshidropodofilotoxina (2)
HvF6	4.58	Desoxipodofilotoxina (3)
HvF6	4.79	Yateína (16)

**Cuadro 11.** Compuestos identificados en la colecta de *Hyptis verticillata*.

## 7. Conclusiones

- A partir del extracto citotóxico de la hierba martina (*Hyptis verticillata*), se caracterizaron seis lignanos mayoritarios responsables de la actividad tóxica de esta planta medicinal mexicana: la podofilotoxina, la deshidropodofilotoxina, la desoxipodofilotoxina, la yateína, la 5-metoxideshidropodofilotoxina y el glucósido de la  $\beta$ -peltantina.
- La podofilotoxina se describe por primera vez en una colecta mexicana de *Hyptis verticillata* y el glucósido de la  $\beta$ -peltantina es reportado por primera vez en esta especie.
- Las condiciones experimentales utilizadas permitieron la separación de los compuestos citotóxicos principales mediante el empleo de la cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa.
- La técnica CLAR-EM mediante ionización por electrospray en modo positivo permitió la identificación de los compuestos a través del análisis de los iones cuasimoleculares  $[M+H]^+$  y  $[M+NH_4]^+$ .
- El análisis de cada uno de los compuestos aislados mediante espectrometría de masas en tándem ( $MS^2$ ) permitió la generación de patrones de fragmentación característicos para la identificación inequívoca de cada uno de los lignanos mayoritarios que constituyen la fracción citotóxica del material vegetal en estudio.

## 8. Perspectivas

Desarrollar un método en la cromatografía de líquidos de alta resolución utilizando la podofilotoxina para el análisis cuantitativo de los lignanos presentes en la hierba martina.

Identificar los constituyentes citotóxicos minoritarios mediante HPLC-EM MS/MS utilizando la ionización por electrospray en modo positivo.

Purificar las fracciones remanentes citotóxicas mediante CLAR, contemplando la modificación de las condiciones instrumentales para el escalamiento preparativo y, de esta forma, caracterizar los principios citotóxicos mediante el empleo de resonancia magnética nuclear.

## 9. Bibliografía

- <sup>1</sup> Picking D, Delgoda R, Boulogne I, Mitchell S. **2013**, *Hyptis verticillata* Jacq: a review of its traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology; *Journal of Ethnopharmacology*, 147,16-40.
- <sup>2</sup> Mitchell S. A, Ahmad M. H. **2006**. A review of medicinal plant research at the University of the West Indies, Jamaica 1948-2001; *West Indian Medical Journal*, 55, 243-269.
- <sup>3</sup> Heinrich M, Barnes J, Gibbons S, Williamson E M. **2012**, *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*; Churchill Livingstone Elsevier; 2da edición. 39, 55, 72, 112, 129.
- <sup>4</sup> Gordaliza M. **2006**. Podophyllotoxin: sources, extraction and preparation of cytotoxic analog compounds. Departamento de Química Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Salamanca.
- <sup>5</sup> Kuhnt M, Rimpler H, Heinrich M. **1994**. Lignans and other compounds from the Mixe indian medicinal plant *Hyptis verticillata*. *Phytochemistry*, 36, 485-489.
- <sup>6</sup> White Y, Hamada T, Yoshimitsu M, Nakashima M, Hachiman M, Kozako T, Matsushita K, Ouzumi K, Suzuki S, Kofune H, Furukawa T, Arima N. **2011**. Novel cytotoxic isolated from Jamaican *Hyptis verticillata* jacq induces apoptosis and overcomes multidrug resistance. *Anticancer Research*, 31, 4231-4258.
- <sup>7</sup> Hamada T, White Y, Nakashima M, Oiso Y, Fujita M. J, Okamura H, Iwagawa T, Arima N. **2012**. The bioassay guided isolation of growth inhibitors of adult T-cell leukemia (ATL) from the jamaican plant *Hyptis verticillata*, and NMR characterization of hyptoside. *Molecules*, 17(8), 9931-9938.
- <sup>8</sup> Trease and Evans W. C. **2002**. *Pharmacognosy*. W. B. Saunders, 15<sup>a</sup> edición. Reino Unido. 33, 34



- <sup>9</sup> Epling C. **1949**. Revisión del género *Hyptis* (Labiatae). *Revista del museo de la Plata*, 30 (7). 1, 5, 248, 249.
- <sup>10</sup> CONABIO- Sitio oficial de la Comisión nacional para el Conocimiento y uso de la Biodiversidad (*Hyptis verticillata* Jacq. Hierba de San Martín). (<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/lamiaceae/hyptis-verticillata/fichas/ficha.htm>)
- <sup>11</sup> United States Department of Agriculture (Natural Resources Conservation Service) (<http://plants.usda.gov/core/profile?symbol=HYVE4>)
- <sup>12</sup> Institute of Systematic Botany; Atlas of Florida Vascular Plants (<http://www.florida.plantatlas.usf.edu/Plant.aspx?id=494>)
- <sup>13</sup> Falcão D. Q, Menezes F. S. **2003**. The *Hyptis* genus: an ethnopharmacological and chemical review. *Revista Brasileira de Farmácia*. 84(3), 69-74.
- <sup>14</sup> Del Amo R. S. **1980**. Plantas medicinales del estado de Veracruz; Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bióticos INIREB; 2ª edición, 111.
- <sup>15</sup> Dewick M. P. **1997**. Medicinal Natural Products A Biosynthetic Approach. Wiley & Sons. 1ra edición. Reino Unido. 110 - 122.
- <sup>16</sup> Boluda J. C, Duque B, Aragón Z. **2005**. Lignanós (I): estructura y funciones en la planta. *Revista de Fitoterapia*. 5(2), 135-147.
- <sup>17</sup> Koniklugil B. **1996**. Investigation of phodophyllotoxin in some plants in Lamiaceae using HPLC. *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara*. 25(1), 23-27.
- <sup>18</sup> Canel C, Moraes M. R, Dayan E. F, Ferreira D. **2000**. Phodophyllotoxin. *Phytochemistry*, 54 (2000), 115-120.
- <sup>19</sup> Novelo M, Cruz J. G, Hernández L, Pereda-Miranda R. **1993**. Cytotoxic constituents of *Hyptis verticillata*. *Journal of Natural Products*, 56 (10), 1728-1736.

- <sup>20</sup> Desbené S, Giorgi-Renault S. **2002**. Drugs that inhibit tubulin polymerization: the particular case of podophyllotoxin and analogues. *Current Medicinal Chemistry Anticancer Agents*, 2(1), 71-90.
- <sup>21</sup> Nagar N, Jat R. K, Saharan R, Verma S, Sharma D, Bansal K. **2011**. Podophyllotoxin and their glycosidic derivates. *Pharmacophore*, 2(2), 124-134.
- <sup>22</sup> Paulson J. C, McClure W. O. **1975**. Microtubules and axoplasmic transport. *The Journal of Cell Biology*. 67, 461-467.
- <sup>23</sup> Cooper G. M, Hausman R. E. **2007**. La Célula; Marbán; 3ra edición; España; 580-582.
- <sup>24</sup> Ji Chen-Feng, Ji Yu-Bin. **2014**. Apoptosis of human cáncer SGC-7901 cells induced by podophyllotoxin. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 7, 1317-1322.
- <sup>25</sup> Miller B. Z, Davison C, Smith K. P. **1950**. The effect of podophyllotoxin, colchicine, urethane and nitrogen mustard on the respiration of normal and suprarenalectomized rat lymphatic tissue. Department of Pharmacology, The George Wahington University School of Medicine, Washington D.C.
- <sup>26</sup> Miller B. Z, Davison C, Smith K. P. **1949**. The effect of podophyllotoxin on tissue metabolism and enzyme systems. Department of Pharmacology, The George Wahington University School of Medicine, Washington D.C.
- <sup>27</sup> Heinrich M, Gibbons S. **2001**. Ethnopharmacology in drug discovery: an analysis of its role and potential contribution. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53, 425-432.
- <sup>28</sup> Trujillo V. M. A, Pereda M. R, Villareal M. L. Identificación y cuantificación de lignanos análogos a la podofilotoxina en diferentes cultivos de *Hyptis verticillata*. XIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. 2009; Acapulco, Guerrero.

<sup>29</sup> Tierra blanqueadora altamente activa Tonsil ® Optimum 210 FF. Süd Chemie; información técnica.

([http://www.vulcascot.at/media/content/downloads/tonsil\\_optimum\\_210\\_ff.pdf](http://www.vulcascot.at/media/content/downloads/tonsil_optimum_210_ff.pdf))

<sup>30</sup> Ortega Soto A. K. **2014**. Perfil cromatográfico y evaluación biológica de diferentes extractos de la planta *Hyptis brevipes*. Departamento de Farmacia; laboratorio 123, Facultad de Química UNAM. 46-48.

<sup>31</sup> Voight W. **2005**. Sulforhodamide B assay and chemosensitivity. *Methods in Molecular Medicine*, 110, 39-48.

<sup>32</sup> Christian D. G. **2009**. Química Analítica; McGraw Hill; 6a edición; México; 604, 605.

<sup>33</sup> García Mendoza A. D. **2008**. Purificación por HPLC de los lignanos mayoritarios de la resina Podofilina (*Podophyllum peltatum*) de la marca comercial Sigma. Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca. Departamento de Farmacia; laboratorio 123 Facultad de Química UNAM; 25, 26, 27, 38.

<sup>34</sup> Sica V. P, Raja H. A, El-Elimat T, Kertesz V, Van Berkel G. J, Pearce C. J, Oberlies N. H. **2015**. Dereplicating and spatial mapping of secondary metabolites from fungal cultures *in Situ*. *Journal of Natural Products*, 78, 1926-1936.

<sup>35</sup> El-Elimat T, Figueroa M, Ehrmann B. M, Cech N. B, Pearce C. J, Oberlies N. H. **2013**. High resolution MS, MS/MS, and UV database of fungal secondary metabolites as a dereplication protocol for bioactive natural products. *Journal of Natural Products*, 76, 1709-1716.

<sup>36</sup> Ayres D. C, Loike J. D. **1990**. Lignans. Chemical, biological and clinical properties. Cambridge University Press. 1ra edición. Reino Unido. 149.

<sup>37</sup> Hendrawati O, Woerdenbag H. J, Michiels P. J, Aantjes H. G, van Dam A, Kayser O. **2011**. Identification of lignans and related compounds in *Anthriscus silvestris* by LC-ESI-MS/MS and LC-SPE-NMR. *Phytochemistry*, 72, 2172-2179.

<sup>38</sup> Schmidt J. S., Hemmati S., Fuss E. Alfermann W.A. **2006**. A combined HPLC-UV and HPLC-MS method for the identification of lignans and its application to the lignans of *Linum usitatissimum* L. and *L. bienne* Mill. *Phytochemical Analysis*, 17, 299-311.

<sup>39</sup> Cong H.L., Dauwe R., Lequart M., Vinchon S., Renouard S., Fliniaux O., Colas C., Corbin C., Doussot J., Hano C., Lamblin F., Molinié R., Pilard S., Jullian N., Boitel M., Gintier E., Mesnard F., Laberche J.C. **2015**. Kinetic of glucosylated and non-glucosylated aryltetralin lignans in *Linum* hairy root cultures. *Phytochemistry*, 115, 70-78.