



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

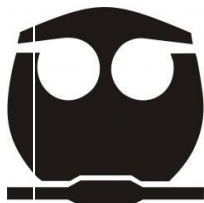
**ESTUDIO QUÍMICO MEDIANTE  
CROMATOGRFÍA DE LÍQUIDOS DE UN  
EXTRACTO ORGÁNICO DE LA ESPECIE  
*Hyptis brevipes***

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**P R E S E N T A**

**ANA KARINA MELÉNDEZ GALICIA**



**CIUDAD DE MÉXICO**

**2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **JURADO ASIGNADO**

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

### **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

Departamento de Farmacia, Laboratorio 123.  
Facultad de Química.  
Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor del tema:

\_\_\_\_\_

Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano

Supervisor técnico:

\_\_\_\_\_

Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda

Sustentante:

\_\_\_\_\_

Ana Karina Meléndez Galicia

## AGRADECIMIENTOS

A la Dirección General de Asuntos de Personal Académico (DGAPA IN215016) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt, proyecto CB220535) por el financiamiento parcial de la investigación.

## LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
AcOEt	Acetato de etilo
c	Cuadruplete
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
CH <sub>3</sub> CN	Acetonitrilo
Cl <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria media
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
d	Doblete
dd	Doble de dobles
Hex	Hexano
Hz	Hertz
iBuOH	Isobutanol
MeOH	Metanol
nm	Nanómetro
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia magnética nuclear
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
SRB	Sulfurodamina B
t <sub>R</sub>	Tiempo de retención
TRIS	Tris (hidroximetil) aminometano
UV	Ultravioleta

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Generalidades de la familia Lamiaceae .....	3
2.1.1 Morfología.....	5
2.1.2 Usos e importancia .....	6
2.2 Género <i>Hyptis</i> .....	6
2.3 Metabolitos del género de <i>Hyptis</i> .....	9
2.3.1 Flavonoides .....	9
2.3.2 Lignanos .....	10
2.3.3 Terpenoides.....	12
2.3.4 Derivados de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas.....	13
2.3.4.1 Biosíntesis de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas .....	14
2.4 Generalidades de <i>Hyptis brevipes</i> .....	15
2.4.1 Clasificación taxonómica. ....	15
2.4.2 Distribución y hábitat.....	15
2.4.3 Morfología.....	15
2.4.4 Usos e importancia .....	16
3. HIPÓTESIS.....	17
4. OBJETIVOS.....	18
4.1 Objetivo general.....	18
4.2 Objetivos particulares.....	18
5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	19
5.1 Material vegetal.....	19

5.2 Extracción del material vegetal .....	19
5.3 Eliminación de triterpenos del extracto total.....	19
5.4 Fraccionamiento del extracto orgánico .....	20
5.5 Técnicas cromatográficas .....	20
5.5.1 Cromatografía en capa fina .....	20
5.5.2 Cromatografía en columna abierta.....	22
5.5.2.1 Fraccionamiento en columna abierta de la fracción II .....	22
5.5.2.2 Fraccionamiento en columna abierta de la fracción III-IV .....	23
5.5.3 Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) a nivel analítico ..	24
5.5.4 Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) a nivel preparativo .....	24
5.6 Resonancia magnética nuclear .....	25
5.7 Evaluación de la citotoxicidad .....	25
5.7.1 Ensayo de citotoxicidad .....	26
5.7.2 Determinación de la $CI_{50}$ .....	26
5.7.3 Criterio de actividad .....	26
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	27
6.1 Obtención del extracto y fracciones .....	27
6.2 Técnicas cromatográficas .....	27
6.2.1 Cromatografía en capa fina .....	27
6.2.2 Cromatografía en columna abierta.....	28
6.2.2.1 Fracción II.....	28
6.2.2.2 Fracciones III y IV.....	28
6.2.3 Cromatografía de líquidos de alta resolución.....	29
6.2.3.1 Fracción D7 .....	29

6.2.3.2 Análisis cromatográfico de la fracción C3.....	32
6.3 Ensayo de la citotoxicidad.....	35
7. CONCLUSIONES .....	36
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	37



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica de la familia Lamiaceae. ....	3
Figura 2. Morfología típica de la flor de las labiadas. ....	5
Figura 3. Estructura química de la fenilbenzopirona. ....	9
Figura 4. Estructura química del cirsilineol.....	10
Figura 5. Estructura química de la cirsimaritina.....	10
Figura 6. Estructura de un lignano. ....	11
Figura 7. Estructura química de la podofilotoxina.....	11
Figura 8. Biosíntesis propuesta de la pironetina.....	14
Figura 9. Fraccionamiento por partición del extracto de acetona de <i>H. brevipes</i> . 21	
Figura 10. Cromatograma a nivel preparativo de la fracción D7. ....	29
Figura 11. Compuestos aislados de la fracción D7. ....	31
Figura 12. Cromatograma a nivel preparativo de la fracción C3. ....	33
Figura 13. Compuestos aislados de la fracción C3. ....	33

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Géneros de la familia Lamiaceae: riqueza y endemismo. ....	4
Tabla 2. Lista de algunas especies de plantas, usos tradicionales y actividad farmacológica de la familia Labiatae. ....	7
Tabla 3. Usos etnofarmacológicos del género <i>Hyptis</i> . ....	8
Tabla 4. Clasificación de los terpenoides según el número de unidades de isopreno presentes.....	12
Tabla 5. Datos de identificación de las colectas de <i>H. brevipes</i> .....	19
Tabla 6. Fraccionamiento por CCA de la fracción II. ....	22
Tabla 7. Fraccionamiento por CCA de la fracción III-IV. ....	23
Tabla 8. Condiciones en CLAR a nivel analítico para las fracciones D7 y C3.....	24
Tabla 9. Condiciones por CLAR a nivel preparativo de las fracciones D7 y C3 ...	25
Tabla 10. Rendimiento del fraccionamiento del extracto de acetona de <i>H. brevipes</i> . .....	27
Tabla 11. Rendimiento de las fracciones D5 a D8. ....	28
Tabla 12. Rendimiento de las fracciones C1 a C7. ....	29
Tabla 13. RMN <sup>1</sup> H de la brevipólida K (300 MHz, δ en ppm, CDCl <sub>3</sub> ).....	31
Tabla 14. RMN <sup>1</sup> H de la brevipólida L (300 MHz, δ en ppm, CDCl <sub>3</sub> ).....	32
Tabla 15. RMN <sup>1</sup> H de la brevipólida M (300 MHz, δ en ppm, CDCl <sub>3</sub> ).....	34
Tabla 16. RMN <sup>1</sup> H de la brevipólida N (300 MHz, δ en ppm, CDCl <sub>3</sub> ). ....	34
Tabla 17. Ensayo de citotoxicidad de las fracciones C1-C7.....	35

# 1. INTRODUCCIÓN

Actualmente, la medicina tradicional ha adquirido una gran relevancia en la industria farmacéutica ya que la disponibilidad y el empleo de medicamentos apropiados es uno de los elementos indispensables para asegurar la atención primaria de la salud (CESOP, 2010) pues su empleo, dosificación y/o posología hoy en día se ve garantizado por la capacitación de su conocimiento mediante diversas investigaciones en botánica o medicina natural.

Durante miles de años, las plantas medicinales han jugado un papel muy importante en la vida del ser humano al ser reconocidas como fuentes naturales de remedios para la prevención y el tratamiento de diversas enfermedades en diferentes épocas y culturas.

Por ende, se define como planta medicinal aquellos vegetales que elaboran unos productos llamados *principios activos*, que son sustancias que ejercen una acción farmacológica, benéfica y/o perjudicial sobre un organismo vivo (Muñoz, 1996).

No obstante, no se sabe a ciencia cierta donde fue la primera vez que se utilizó una planta para tratar algún padecimiento, dado que la mayoría de las veces los descubrimientos fueron un simple resultado de la búsqueda de nuevos alimentos para comprobar si las nuevas especies eran comestibles, lo que los llevó a descubrir en su propio cuerpo que muchas de ellas eran comestibles y otras tóxicas. O más aún, que su consumo producía efectos mortales o verdaderamente diferentes.

Sin embargo, a través del tiempo y al existir una elección de las “posibles plantas comestibles y/o curativas” la información fue recabada de forma concerniente, lo que les permitió a los primeros herbolarios llevar a cabo las primeras aplicaciones medicinales, culinarias, preparación de tintes, perfumes y cosméticos (Haya, 2008).

De manera, que el empleo de plantas medicinales ha generado una alternativa para el tratamiento de algún padecimiento destacado por su utilidad primordial al ser específica, lo que le permite funcionar como medicamento para aliviar alguna enfermedad o restablecer la perdida de la salud.

Algunas enfermedades o trastornos atendidos con medicina tradicional son: obesidad, diabetes, dolor de estómago, quistes, tumores, infecciones respiratorias, infecciones urinarias entre otros.

Además, las plantas medicinales constituyen aproximadamente la séptima parte de las especies existentes al crecer de forma silvestre en un gran número de países puesto que cualquier planta de valor potencial en un país determinado pudo haber sido estudiada por científicos de otras latitudes (Abreu-Rubio, 2017).

Finalmente, la importancia de plantas medicinales no sólo radica en su riqueza como parte de una cultura, sino también en el conocimiento científico que se genera a partir de su estudio y análisis que se realizan por cuestiones ecológicas, geográficas, culturales, farmacológicas y químicas que constituyen el contexto global (Santillán, 2012).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades de la familia Lamiaceae

La familia Lamiaceae por el nombre del género de la familia *Lamium* o conocida de manera botánica como Labiatae (que procede de la forma de pétalos en sus flores como formando dos labios) presenta una distribución cosmopolita y se encuentra en la mayoría de los ecosistemas terrestres (Cuartero, 2016). La mayor parte de los miembros de esta familia se distribuyen en las regiones templadas con hábitos anuales y perennes (Figura 1).

En el mundo existen seis regiones de alta diversidad (Hedge, 1992): Mediterráneo y Asia, África, China, Australia, Sudamérica y Norteamérica (incluido México).



**Figura 1.** Distribución geográfica de la familia Lamiaceae.

La familia Labiatae (Lamiaceae), una de las familias más grandes y más distintivas de plantas, se compone aproximadamente de 236 géneros y 7,713 especies en el mundo (Martínez-Gordillo, 2013). La Tabla 1 muestra información detallada acerca del endemismo y los géneros con una mayor representación en México (*Salvia*, *Scutellaria*, *Stachys* e *Hyptis*).

**Tabla 1.** Géneros de la familia Lamiaceae: riqueza y endemismo.

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

### 2.1.1 Morfología

Las labiadas son una familia de plantas aromáticas constituidas principalmente por hierbas o arbustos (rara vez árboles como *Hyptidendron* o *Lepechinia*), provistas en todas sus partes de glándulas secretoras de aceites esenciales volátiles (que son muy variados en esta familia), con una diversa morfología al estar constituida por ramas terminales generalmente cuadrangulares: hojas opuestas o verticiladas, simples u ocasionalmente pinnadas; inflorescencias de varios tipos, cortas y en verticilastros en cada nudo o en címulas reducidas a flores solitarias; flores bractéolas, perfectas o unisexuales, con el cáliz generalmente persistente, con 5 dientes o bilabiado, corola irregular con 5 lóbulos imbricados y bilabiada, algunas veces unilabiada o regular, con 2 ó 4 estambres, con filamentos unidos al tubo de la corola; ovario súpero, bicarpelar, cada carpelo dividido en dos, dando lugar a un fruto característico de cuatro nueces libres (Fernández-Rivera, 2003). En la Figura 2, se ejemplifica la morfología de la flor típica de las labiadas.



**Figura 2.** Morfología típica de la flor de las labiadas.

### 2.1.2 Usos e importancia

La labiadas constituyen una familia de plantas medicinales de gran valor ya que básicamente en todos los continentes y culturas el hombre ha utilizado numerosas especies de esta familia por su aroma o por sus flores como condimentos (*Origanum, Thymus, Mentha*) y/o como ornamentales (*Coleus, Salvia, Scutellaria*) (Fernández-Rivera, 2003).

Diversas investigaciones científicas han sustentado que las flores y hojas de esta familia, son consideradas plantas aromáticas que producen esencias que las caracteriza por su valor curativo y propiedades medicinales (Tabla 2); tales como actividad antioxidante, antitumoral, manifestación de efectos antivirales, antibacterianos y anti-clamidia. Así como efectos citotóxicos en células cancerosas (Lu y Foo, 2001), por lo anterior, se visualiza la importancia económica a nivel mundial de esta familia.

### 2.2 Género *Hyptis*

*Hyptis* proviene del griego *Hypo*, que significa “abajo” debido a la posición del labio inferior de la corola (Harley *et al.*, 2004). Es un género con 694 especies de plantas perteneciente a la familia Lamiaceae, donde la mayoría de sus especies son nativas de América.

En México, se distribuye principalmente en partes tropicales del Sur y a lo largo de ambas costas, en los estados de Veracruz, Chiapas, Jalisco, Nayarit, Guerrero y Oaxaca (Martínez-Gordillo *et al.*, 2010).

En la República Mexicana, el género de *Hyptis* ocupa el cuarto lugar después de *Salvia, Scutellaria* y *Stachys* (Tabla 1).

*Hyptis* es un género muy rico en especies de gran importancia económica y etnofarmacológica constituido por plantas aromáticas con propiedades organolépticas, actividades antioxidantes y antimicrobianas que se encuentran en sus células epiteliales debido a la presencia de metabolitos secundarios, los cuales son conocidos por su utilidad medicinal, no sólo en poblaciones de México, sino



también en: Brasil, India, China, Ecuador, Tailandia, Caribe, Panamá, Norte de Nigeria y en otras localidades de África (Falcao-Menezes, 2003).

**Tabla 2.** Lista de algunas especies de plantas, usos tradicionales y actividad farmacológica de la familia Labiatae.

Nombre científico	Usos tradicionales	Actividad farmacológica	Preparación
<i>Lavandula angustifolia</i>	Antiinflamatorio Diurético Sedante	Analgésico Antiinflamatorio Anestésico	Extracto
<i>Mentha longifolia</i>	Disnea Flatulencia	Actividad Antiinflamatoria	Decocción
<i>Origanum vulgare</i>	Dolor de muelas Cálculos renales Flatulencia Reumatismo Sedante Ansiedad	Antihiper glucémico Antifúngico	Decocción
<i>Ocimum majorana</i>	Dolor de cabeza y ojos. Reumatismo	Antihelmíntico Analgésico	Infusión
<i>Salvia sclarea</i>	Reconstituyente, Antiséptico	Antifúngico Antimicrobiano	Decocción
<i>Stachys lavandulaefolia</i>	Dispepsia Sedante Flatulencia	Ansiolítico	Infusión Decocción
<i>Thymus serpyllum</i>	Flatulencia Expectorante	Antibacterial	Infusión

Algunos usos etnofarmacológicos que han sido reportados en el género de *Hyptis* se describen en la Tabla 3 (Falcao-Menezes, 2003).

**Tabla 3.** Usos etnofarmacológicos del género *Hyptis*.

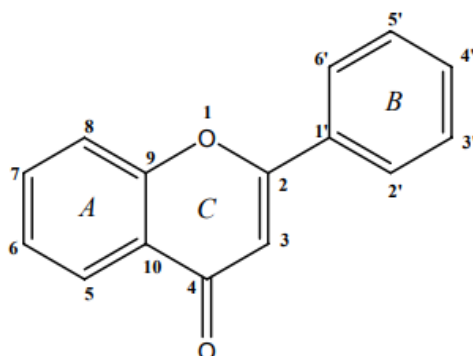
Especie	Usos
<i>H. suaveolens</i>	India: El té preparado con las raíces se utiliza como aperitivo, por sus propiedades estomáquicas; largamente utilizada para tratar varias enfermedades. México: Propiedades antisépticas comprobadas; uso de las hojas en la medicina popular.
<i>H. capitata</i>	China: Usada contra resfriados, fiebre y asma. Ecuador: Enfermedades fúngicas. Tailandia: Gripes, fiebre y asma.
<i>H. verticillata</i>	México: Se emplea para los dolores de cabeza, estómago y desórdenes gastrointestinales. La planta entera es hervida y frotada sobre la piel para el tratamiento de reumatismo e infecciones de ésta; con propiedades antihelmínticas. África y el Caribe: Fiebres y resfriados.
<i>H. spicigera</i>	Norte de Nigeria: Uso del aceite esencial con actividad antiinflamatoria. En varios países africanos: Utilizado para el control de insectos.
<i>H. pectinata</i>	Oeste de África: Utilizada como planta medicinal por sus propiedades antibacterianas y antimicóticas. México: Usado en fiebres, enfermedades de la piel, trastornos gástricos, rinofaringitis y congestión pulmonar.
<i>H. mutabilis</i>	México: Trastornos gastrointestinales y malaria. Brasil: Uso del té de hojas frescas para enfermedades de la mucosa uterina cervical, gastritis, úlcera gástrica, úlceras de piel infectada y conjuntivitis.
<i>H. albida</i>	México: Tratamiento de enfermedades del tracto gastrointestinal y como repelente de insectos. La medicina popular utiliza por sus propiedades antisépticas.

## 2.3 Metabolitos del género de *Hyptis*

La composición química del género *Hyptis* se define por la presencia de compuestos tales como: flavonoides, lignanos, terpenoides y derivados de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas.

### 2.3.1 Flavonoides

Metabolitos secundarios con un esqueleto base de 15 átomos de carbono ( $C_6-C_3-C_6$ ). De biogénesis mixta que se distribuyen ampliamente como glucósidos de diferentes azúcares (glucosa o galactosa) y agliconas, derivados del núcleo fundamental de la fenilbenzopirona, (Figura 3) en órganos de plantas vegetativas y reproductivas para protegerlos contra patógenos, estrés biótico y abiótico (Primo, 1995).



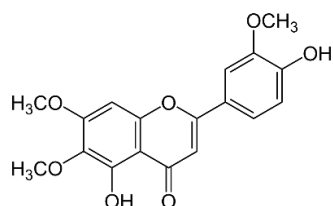
**Figura 3.** Estructura química de la fenilbenzopirona.

Hoy en día, se ha documentado que estos compuestos poseen diversas propiedades biológicas entre las que destaca su actividad: antioxidante, antiviral, antihepatotóxica, antiosteoporótica, antiulcerosa, antibacteriana, anticancerosa, y efectos radioprotectores (Lee *et al.*, 1988; Chen *et al.*, 2012).

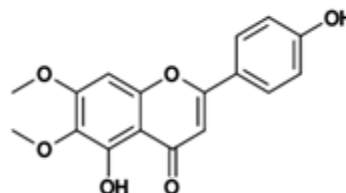
Algunos ejemplos en los que se ha reportado la presencia de flavonoides en especies del género *Hyptis* se mencionan a continuación.

En *Hyptis suaveolens* se reporta un abundante contenido de flavonoides con propiedades fungitóxicas, antioxidante y neuroprotectora (Ghaffari *et al.*, 2014) de un extracto metanólico de la planta. Así mismo, destaca la presencia de compuestos glucósidos como: D-xilosa, D-manosa, D-galactosa, D-glucosa y 4-O-metil-D-glucurónico como constituyentes de sus partes aéreas (Gowda, 1984).

Mientras que en *Hyptis fasciculata*, han sido identificados: cirsilineol (Figura 4) y cirsimaritina (Figura 5), compuestos con actividad antibacteriana contra *Helicobacter pylori* (Isobe *et al.*, 2006).



**Figura 4.** Estructura química del cirsilineol

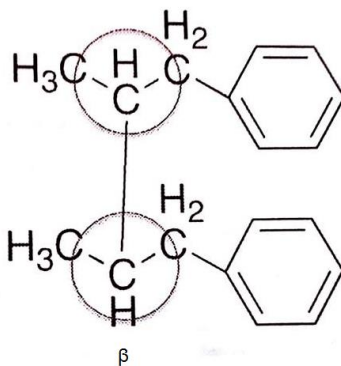


**Figura 5.** Estructura química de la cirsimaritina

Otras especies que contienen estos compuestos son *H. marrubioides*, *H. lantanifolia*, *H. microphylla* e *H. tomentosa* (5-hidroxi-4', 6, 7,8-tetrametoxiflavona; 5-hidroxi-3',4', 6,7-tetrametoxiflavona; Eupatorina) (Kingston *et al.*, 1979).

### 2.3.2 Lignanós

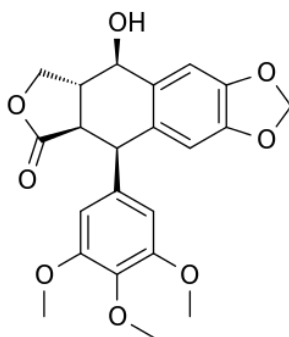
Se definen como productos originados por la dimerización de dos unidades de fenilpropano que están unidas por los carbonos  $\beta$  de su cadena lateral (Dewick, 2001), tal y como se visualiza en la Figura 6.



**Figura 6.** Estructura de un lignano.

Este tipo de compuestos al estar ampliamente distribuidos en el reino vegetal y presentar gran diversidad estructural poseen actividad citotóxica, antineoplásica y antiviral importante (Dewick, 2001).

Destacando a la podofilotoxina (Figura 7), lignano natural sumamente importante en la farmacología que se utiliza en la semisíntesis de fármacos anticancerígenos. Se ha elevado tanto su demanda que actualmente se están investigando nuevas fuentes naturales que la biosintetizen.



**Figura 7.** Estructura química de la podofilotoxina.

La podofilotoxina se ha identificado en cuatro especies: *H. suaveolens*, *H. capitata*, *H. tomentosa* e *H. verticillata*.

*H. verticillata* es la especie con el mayor número de lignanos aislados dentro del género *Hyptis*. El estudio biodirigido del extracto de orgánico permitió el aislamiento de diez lignanos derivados de la podofilotoxina con actividades citotóxicas no específicas ( $CI_{50} < 0.01 \mu\text{g/mL}$ ) (Novelo *et al.*, 1993).

Recientemente, se han identificado 17 lignanos aislados de las partes aéreas, caracterizando el último compuesto como el hiptósido (Hamada *et al.*, 2012).

### 2.3.3 Terpenoides

Metabolitos secundarios biosintetizados por las rutas DOXP o acetato-mevalonato, a partir de la unidad estructural de cinco átomos de carbono denominada unidad isopreno.

Los terpenoides pueden dividirse según el número de unidades de isopreno que contiene en diversas categorías (Tabla 4).

**Tabla 4.** Clasificación de los terpenoides según el número de unidades de isopreno presentes.

Núm. de unidades de isopreno	Grupo de compuestos	Ejemplo
1	Hemiterpenos	Isopreno, alcohol dimetilalílico, isopentenol, alcohol isoamílico
2	Monoterpenos	Constituyentes de los aceites esenciales (geraniol, mentol, timol); iridoides (loganina, secologanina)
3	Sesquiterpenos	Constituyentes de los aceites esenciales (farnesol, bisobolol) y lactonas sesquiterpénicas (matricina, serenina)
4	Diterpenos	Constituyentes de las resinas (ácido ábietico, fitol, vitamina A)
6	Triterpenos	Escualenos, esteroides, triterpenos pentacíclicos

Tradicionalmente, los terpenoides han sido utilizados por humanos en la industria alimenticia, farmacéutica y química, y más recientemente han sido explotados en el desarrollo de productos de biocombustibles (Tholl, 2015).

Dentro del género *Hyptis*, la literatura ha reportado la presencia de compuestos monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos y triterpenos. Sin embargo, dichos compuestos varían dependiendo de la especie.

*H. albida* contiene a los triterpenoides ácido oleanólico, ácido betulínico y el 3 $\beta$ -hidroxiolean-28,13 $\beta$ -olideo (Romo de Vivar, 2006).

Del extracto clorofórmico de *H. dilatata* se logró el aislamiento y la identificación de un terpenoide tipo abietano. Del aceite esencial de *H. suaveolens* se identificó al  $\alpha$ -humuleno, germacreno D, palustrol y aromadentreno (Gordillo, 2016).

Finalmente, *H. pectinata* también ha reportado sesquiterpenos (cariofileno y óxido de cariofileno) como los componentes mayoritarios. (Koba, 2007).

Con base a lo antes descrito, se percibe la gran importancia de investigar la composición del aceite esencial del género *Hyptis*, que posee actividad: antioxidante, antimicrobiana, citotóxica y antiinflamatoria (Koba, 2007).

#### **2.3.4 Derivados de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas**

Compuestos que presentan un núcleo con un anillo  $\delta$ -lactona- $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado, con un grupo sustituyente de tipo alquilo, alquenilo o arilo en la posición C-6 y que puede presentar sustituciones en el núcleo del anillo base.

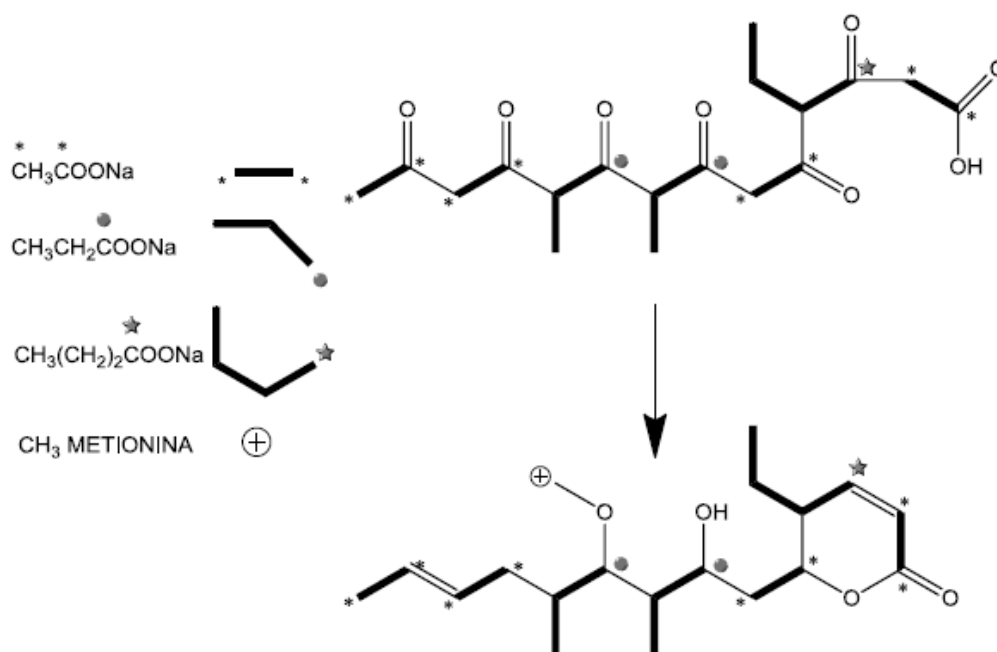
Esta clase de compuestos presentan efectos antioxidantes, ansiolíticos y sedantes (Suárez-Ortiz, 2013) debido a la asociación del poder alquilante del núcleo de la  $\delta$ -lactona- $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturada, la cual es la unidad estructural análoga al grupo farmacóforo de la pironetina.

La primer 5,6-dihidro- $\alpha$ -pirona aislada en el género *Hyptis* fue la hiptólida aislada de *H. pectinata* (Achmad *et al.*, 1987). Posteriormente, Pereda-Miranda y colaboradores (1993) aislaron de esta planta tres moléculas más, a las pectinólidas A-C. Una década después, se aislaron cinco nuevas 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas en esta

especie, las pectinólidas D-G (Boalino *et al.*, 2003) y la pectinólida H (Fragoso-Serrano *et al.*, 2005).

### 2.3.4.1 Biosíntesis de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas

La biosíntesis de las 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas se ha estudiado a través de la pironetina (Figura 8), encontrándose que deriva de cuatro unidades de acetato, dos unidades de propionato, una de butirato y una unidad metilo que proviene de la metionina (Kobayashi, 1994).



**Figura 8.** Biosíntesis propuesta de la pironetina.



## 2.4 Generalidades de *Hyptis brevipes*

### 2.4.1 Clasificación taxonómica (Poit, 1994).

Reino	Plantae
División	Tracheophyta
Clase	Magnoliophyta
Subclase	Asterudae
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Genero	<i>Hyptis</i>
Especie	<i>brevipes</i>

### 2.4.2 Distribución y hábitat

*Hyptis brevipes* es nativa de América y se distribuye en climas tropicales, habitando en la orilla de caminos o a lo largo de veredas en los bosques. En México se ubica en los estados de Chiapas, Tabasco y Veracruz.

Sin embargo, también se localiza en Guatemala, Honduras, Panamá, Brasil, Cuba, Venezuela, Bolivia, Nicaragua, Paraguay, Perú, Ecuador y Colombia. Aunque tiene una distribución secundaria en Tailandia, Vietnam y Oceanía (Epling, 1936).

### 2.4.3 Morfología

*H. brevipes* conocida popularmente como hierba del burro es una hierba erecta de tallo cuadrangular, meduloso de 3 mm de grosor, con esparcidas y diminutas glándulas de acetites esenciales aromáticos, pilosos: tricomas simples, filiformes de menos de 1.5 mm de largo.

Hojas simples opuestas, limbo ovado, lanceolado o linear; base atenuada decurrente al peciolo. Peciolo ausente o corto, hasta de 3 mm de largo, alados y densamente pilosos.

Inflorescencias axilares, solitarias, en glomérulos globulosos de 5-10 mm. Flores sésiles, hermafroditas subtendidas en una serie de pelo hialinos de menos de 3 mm de largo, con cáliz en forma de embudo de coloración blanca a morado blanquecina.

Y da un fruto en forma de nuececilla pequeña arrugada de color oscuro o negro pardoso, con 0.5-0.8 mm de largo (Fuentes *et al.*, 2006).

#### **2.4.4 Usos e importancia**

*H. brevipes* es ampliamente utilizada para tratar problemas gastrointestinales, respiratorios, febriles, reumáticos y dermatológicos. Así como infecciones de la piel (González *et al.*, 1995). Más recientemente se ha reportado su actividad antibacteriana y antifúngica (Goun *et al.*, 2003; Zollo *et al.*, 1998).

Estudios científicos han determinado que *H. brevipes* presenta compuestos con actividad biológica tales como: diterpenoides, flavonoides, lignanos y derivados de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas (Ye Deng *et al.*, 2009; Suárez-Ortiz *et al.*, 2017).

Cabe mencionar que éstos últimos, se caracterizan por su gran actividad citotóxica, al afectar la viabilidad de las células cancerígenas provenientes de diversas líneas tumorales.

### 3. HIPÓTESIS

Tras considerar la gran relevancia del género *Hyptis* (Lamiaceae) en cuanto a su conocimiento etnobotánico, farmacológico y químico que ha permitido la identificación de diversos metabolitos con actividad biológica, se espera lograr el aislamiento de metabolitos secundarios bioactivos a partir de un extracto orgánico de la especie *H. brevipes*.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo principal realizar el aislamiento e identificación de metabolitos secundarios de la especie *Hyptis brevipes* a partir de un extracto orgánico total.

### 4.2 Objetivos particulares

- Obtener un extracto orgánico de acetona de la especie *Hyptis brevipes*.
- Realizar el fraccionamiento primario del extracto total mediante partición con disolventes de baja, media y alta polaridad.
- Por cromatografía en columna abierta disminuir la complejidad de las fracciones elegidas por CCF.
- Por cromatografía de líquidos purificar a los compuestos de interés.
- Identificar al menos un metabolito con actividad biológica de la especie *H. brevipes* y elucidar su estructura molecular por RMN.
- Evaluar la actividad citotóxica de las fracciones obtenidas.

## 5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

### 5.1 Material vegetal

Se trabajó con dos colectas de las partes aéreas de la planta *H. brevipes* ambas provenientes del estado de Veracruz. Los datos de cada colecta se presentan en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Datos de identificación de las colectas de *H. brevipes*.

Clave	Lugar de colecta	Fecha de colecta	Voucher
D	Dos Ríos. E Zapata	13/11/11	XAL-0001403
E	Dos Ríos. E Zapata	20/11/11	XAL-0001401

### 5.2 Extracción del material vegetal

El material vegetal previamente seco y molido se sometió a un proceso de maceración exhaustivo con acetona. Al término de cada una de las extracciones, los macerados se filtraron y concentraron a sequedad por presión reducida, obteniendo 94.0 g del extracto seco.

### 5.3 Eliminación de triterpenos del extracto total

El extracto total seco se sometió a un proceso de eliminación de triterpenos, el cual consistió en solubilizar 1 g del extracto en 50 mL de MeOH, la solución se

dejó reposar a una temperatura de 0 °C durante 48 horas, mediante filtración a vacío se eliminaron los triterpenos de baja polaridad.

La fracción obtenida se redujo a la mitad de su volumen original con ayuda del rotaevaporador, para dejar reposar 48 horas más a 0 °C, permitiendo continuar con el procedimiento ya descrito, obteniendo así 75.2 g de fracción libre de triterpenos.

#### **5.4 Fraccionamiento del extracto orgánico**

La fracción obtenida en el inciso 5.3 se resuspendió en 750 mL de hexano y se realizaron dos lavados con metanol al 20% en proporción 1:1 dando inicio al proceso de partición, luego la fracción de hexano se concentró en el rotaevaporador y se identificó como fracción I.

Mientras a la fracción metanólica se le realizaron dos lavados con diclorometano, y la fase que contenía diclorometano se concentró en el rotaevaporador y se identificó como fracción II.

Posteriormente la fracción de metanol se concentró a la quinta parte para eliminar todo el metanol y la fracción acuosa resultante se le realizaron tres lavados con acetato de etilo primero y enseguida con isobutanol. Cada fracción se llevó a sequedad y se identificó como fracción III, IV y V respectivamente.

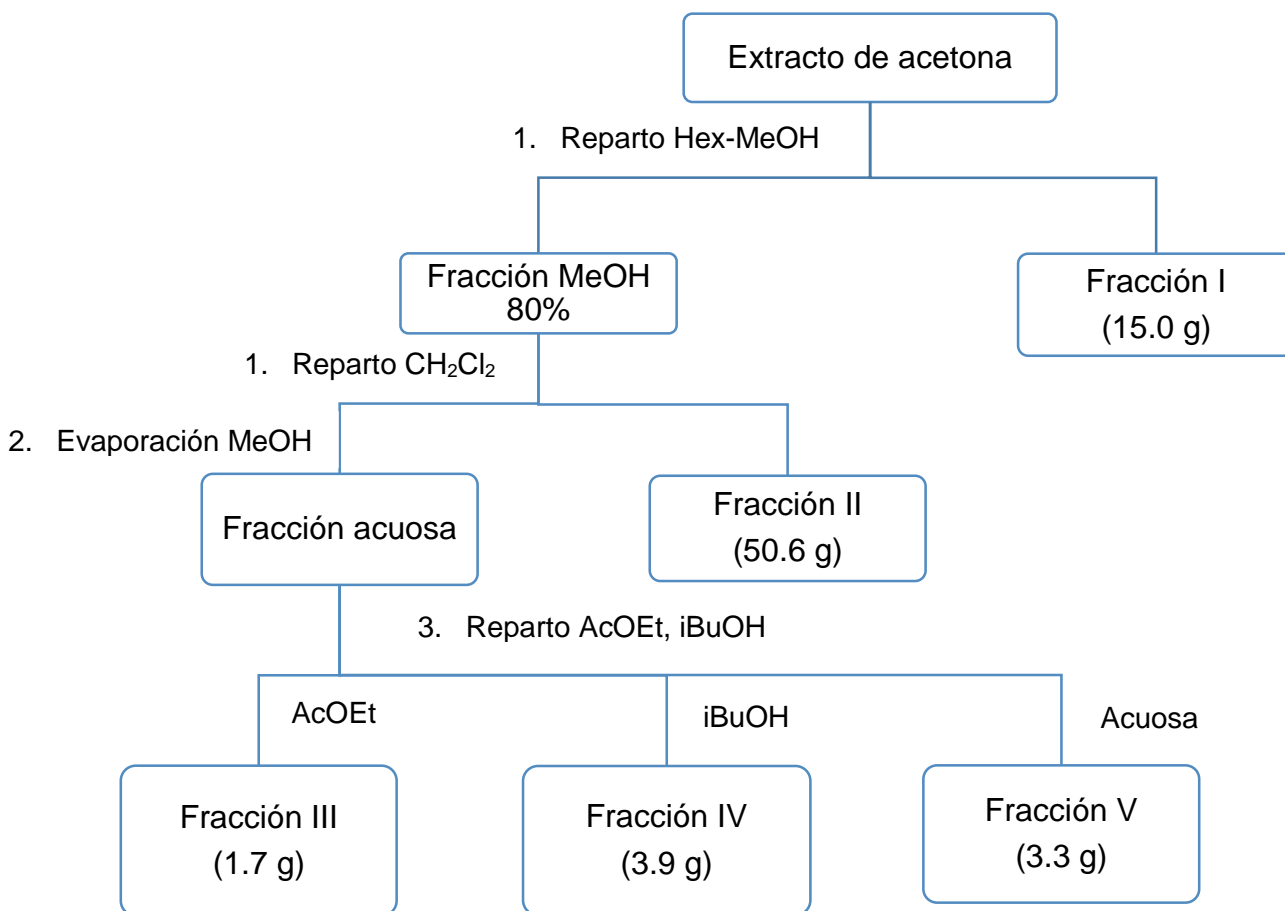
En la Figura 9 se esquematiza el proceso de fraccionamiento anterior.

#### **5.5 Técnicas cromatográficas**

##### **5.5.1 Cromatografía en capa fina**

Se utilizaron cromatoplasmas de aluminio cubiertas con gel de sílice 60F<sub>254</sub> marca Merck para monitorear el perfil de las diferentes fracciones (I, II, III, IV, V),

empleando una lámpara en el UV que permitió observar las cromatoplasmas a dos diferentes longitudes de onda (254 y 365 nm).



**Figura 9.** Fraccionamiento por partición del extracto de acetona de *H. brevipes*.

También se utilizó sulfato cérico amoniacal como solución cromógena, la cual permitió visualizar a los componentes presentes en las muestras por calentamiento (~100 °C).

## 5.5.2 Cromatografía en columna abierta

### 5.5.2.1 Fraccionamiento en columna abierta de la fracción II

Una parte de la fracción II se simplificó mediante CCA. El punto de aplicación se preparó con 50.6 g de sílice y 50.6 g de la fracción disuelta en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . La columna se empacó con sílice en proporción 1:15 respecto al peso de la muestra.

Enseguida se adicionó el punto de aplicación para después emplear disolventes de polaridad creciente (éter de petróleo,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , acetona y MeOH), en proporciones que se describen en la Tabla 6. Se colectaron fracciones de 100 mL. Las fracciones obtenidas y combinadas por similitud mediante CCF se resumen en la misma tabla.

**Tabla 6.** Fraccionamiento por CCA de la fracción II.

Fase móvil	Proporción	Número de fracción	Fracciones combinadas
Éter de petróleo	100	1-7	D1
Éter de petróleo: $\text{CH}_2\text{Cl}_2$	80:20	8	D2
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$ : Acetona	50:50	9-13	D3
		14-15	D4
		16-17	D5
		18-21	D6
		22-23	D7
		24-27	D8
Acetona: MeOH	80:20	28-29	D9
		30-35	D10



### 5.5.2.2 Fraccionamiento en columna abierta de la fracción III-IV

Las fracciones III-IV se simplificaron mediante CCA. En este caso, el gradiente de elución utilizó los siguientes disolventes: Hex, AcOEt, y MeOH en proporciones que se especifican en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Fraccionamiento por CCA de la fracción III-IV.

Fase móvil	Proporción	Numero de fracción	Fracciones combinadas	Clave
Hex	100	F1-F2	F1-F2	C1
Hex-AcOEt	30:70	F3-F5	F3-F4	C2
AcOEt	100	F6- F9	F5- F6	C3
AcOEt- MeOH	90:10	F10- F15	F7- F12	C4
	80:20	F16-F20	F13- F18	C5
	75:25	F21- F25	F19- F29	C6
	70: 30	F26- F30	F30- F57	C7
	65:35	F 31- F35		
	60: 40	F 36- F40		
	50:50	F 41- F45		
	40:60	F 46- F50		
	30:70	F 51- F54		
MeOH	100	F 54- F57		

### 5.5.3 Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) a nivel analítico

Se establecieron las condiciones analíticas adecuadas para el perfil cromatográfico de las fracciones D7 y C3, para identificar al menos un constituyente mayoritario.

Se emplearon diferentes mezclas de disolventes en fase reversa, permitiendo una mejor resolución de picos en las condiciones que se muestran en la Tabla 8.

**Tabla 8.** Condiciones en CLAR a nivel analítico para las fracciones D7 y C3.

<b>Variable</b>	<b>Condición</b>
Fase móvil	Acetonitrilo-Agua 4:6
Flujo	0.4 mL/min
Concentración	1 mg /100 µL
Fase estacionaria	Symmetry C-18 (4.6 x 250 mm x 5 µm)
Volumen	20 µL
Detector	UV, λ 254

### 5.5.4 Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) a nivel preparativo

Se escaló a nivel preparativo para la separación y aislamiento de los compuestos de interés presentes en las fracciones D7 y C3 utilizando las condiciones indicadas en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Condiciones por CLAR a nivel preparativo de las fracciones D7 y C3

<b>Variable</b>	<b>Condición</b>
Fase móvil	Acetonitrilo-Agua 4:6
Flujo	9.0 mL/min
Concentración	5 mg /500 µL
Fase estacionaria	Symmetry C-18 (4.6 x 250 mm x 5 µm)
Volumen	500 µL
Detector	UV, λ 254

## 5.6 Resonancia magnética nuclear

Para la caracterización de los compuestos puros presentes en cada una de las fracciones de interés, éstas se sometieron a un análisis por resonancia magnética nuclear, empleando 10 mg, los desplazamientos químicos se expresan en partes por millón (ppm) a 300 MHz y como disolvente se empleó cloroformo deuterado.

## 5.7 Evaluación de la citotoxicidad

Se evaluó la actividad citotóxica de las fracciones C1-C7. Las fracciones se prepararon a las concentraciones de 25.0, 5.0, 1.0, 0.2 µg/mL.

### 5.7.1 Ensayo de citotoxicidad

En el ensayo de citotoxicidad sobre la línea celular HeLa, se empleó el método de tinción de la sulforodamina B (SRB).

- Las células se utilizaron cuando se observó 60-70% de confluencia.
- Se utilizaron suspensiones celulares con un intervalo de  $5 \times 10^4$  células/mL.
- Se adicionan 190  $\mu$ L de suspensión celular en cajas de 96 pozos donde previamente se adicionaron 10  $\mu$ L de muestras y controles por triplicado, y se incubaron a 37 °C por 3 días.
- Se fijaron las células y se realizó el desarrollo de color para finalmente poder leer a 540 nm.

### 5.7.2 Determinación de la $CI_{50}$

Se determinó el porcentaje de crecimiento mediante la siguiente ecuación:

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

Se realizó un análisis de regresión lineal, al graficar % de crecimiento vs concentración empleando un software Jandel Scientific (Table Curve 2D v 5.0).

### 5.7.3 Criterio de actividad

Se consideró como activos a los extractos que cumplían con el siguiente criterio:  $CI_{50} < 25 \mu\text{g/mL}$ .

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 6.1 Obtención del extracto y fracciones

A partir de la maceración exhaustiva de las partes aéreas de *H. brevipes* con acetona, se obtuvo un extracto total de 94.0 g, el cual se procesó primero para eliminar a los triterpenos presentes y se realizó un fraccionamiento por partición para obtener cinco fracciones (Tabla 10).

**Tabla 10.** Rendimiento del fraccionamiento del extracto de acetona de *H. brevipes*.

Fracción	Peso (g)
I Hexano	15.0
II Diclorometano	50.6
III Acetato de etilo	1.7
IV Isobutanol	3.9
V Acuosa	3.3

### 6.2 Técnicas cromatográficas

#### 6.2.1 Cromatografía en capa fina

Las fracciones de la Tabla 10, se analizaron por CCF con un sistema de elución de AcOEt-MEOH 7:3, y se seleccionaron las fracciones II, III y IV, para

continuar trabajando en ellas y se determinó reunir las fracciones III y IV de acuerdo a su similitud cromatográfica.

## 6.2.2 Cromatografía en columna abierta

### 6.2.2.1 Fracción II

Después de analizar por CCF las fracciones obtenidas en la sección 5.5.2.1, se seleccionaron las fracciones indicadas en la Tabla 11.

**Tabla 11.** Rendimiento de las fracciones D5 a D8.

Fracciones combinadas:	Peso (g)
D5	5.33
D6	4.91
D7	18.19
D8	7.22

### 6.2.2.2 Fracciones III y IV

Al realizar la parte experimental descrita en 5.5.2.2 así como la reunión de las fracciones por CCF, se obtuvieron 7 conjuntos de fracciones (Tabla 12).

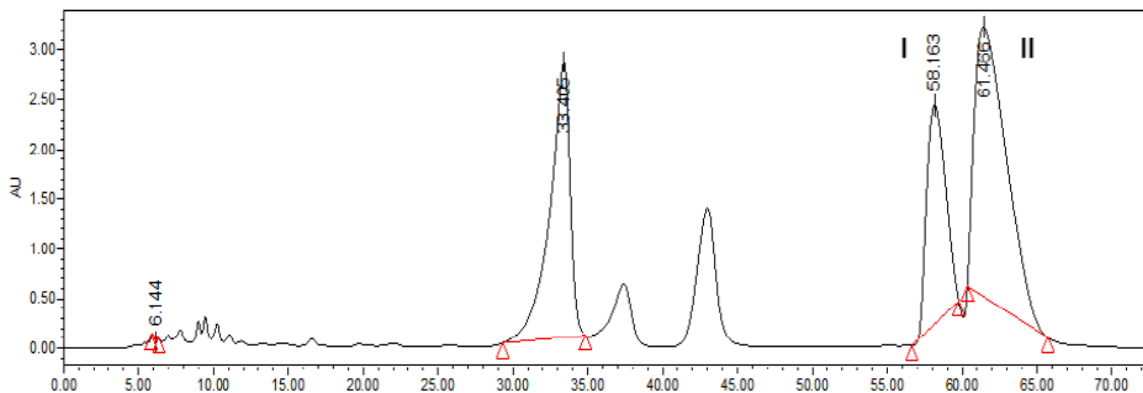
**Tabla 12.** Rendimiento de las fracciones C1 a C7.

Fracción	Peso (g)
C1	0.25
C2	0.28
C3	0.46
C4	0.48
C5	0.39
C6	0.26
C7	0.01

### 6.2.3. Cromatografía de líquidos de alta resolución

#### 6.2.3.1 Fracción D7

Se analizó el perfil cromatográfico de la fracción D7 utilizando las condiciones cromatográficas óptimas por CLAR en fase reversa. La Figura 10 muestra la separación de 2 picos, con un  $t_R = 58.1$  min (pico I) y 61.4 min (pico II).



**Figura 10.** Cromatograma a nivel preparativo de la fracción D7.

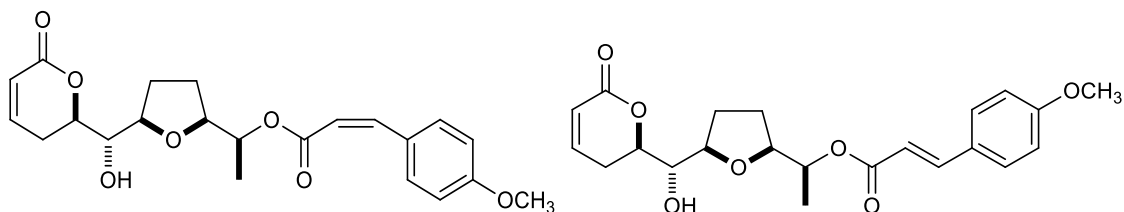
Del pico I se registró el espectro de RMN  $^1\text{H}$  obteniendo los siguientes desplazamientos y constantes de acoplamiento que se describen a continuación, un sistema AB para un anillo aromático *para* sustituido centrado en  $\delta_{\text{H}}$  7.72 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz, H-2", H-6") y 6.87 (2H, d,  $J = 8.7$  Hz, H-3", H-5"); las señales en 6.88 (1H, d,  $J = 15.9$  Hz, H-7") y 5.82 (1H, d,  $J = 15.9$  Hz, H-8") sugieren la presencia de un doble enlace *cis*. También, se observan las señales correspondientes al sistema  $\alpha,\beta$  insaturado del anillo de lactona en 5.93 (1H, d,  $J = 9.8, 1.5$  Hz, H-3) y 6.78 (1H, ddd,  $J = 9.8, 5.8, 2.7$  Hz, H-4). Se detectaron señales adicionales a campo bajo correspondientes a cuatro grupos metinos base de oxígeno, 4.97 (1H, q,  $J = 6.5$ , H-6'),  $\delta_{\text{H}}$  4.24 (ddd,  $J = 10.9, 8.4, 4.5$  Hz, H-6) y 4.36 (t,  $J = 6.4$  Hz, H-2') y 3.96 (1H, c,  $J = 6.1$ , H-5'). El desplazamiento a campo bajo del metino en C-6' ( $\delta_{\text{H}}$  4.97) y el singulete de  $\delta_{\text{H}}$  3.83 corroboran la sustitución de este centro estereogénico por un *p*-metoxicinamoil éster. La señal en  $\delta_{\text{H}}$  3.83 (3H, s,  $-\text{OCH}_3$ ) sugiere la presencia de un grupo metoxilo. La comparación de estos datos con lo reportado en la literatura (Tabla 13) permitió la identificación de la brevipólida K (Figura 11) (Suárez-Ortiz *et al.*, 2017).

El pico II correspondió a la brevipólida L (Figura 11), el isómero geométrico *trans* de la brevipólida K. La principal diferencia se observó en el desplazamiento químico y constante de acoplamiento para los protones que corresponden al doble enlace de los protones 7" y 8" con un desplazamiento de  $\delta_{\text{H}}$  7.65 (1H, d,  $J = 15.9$  Hz, H-7") y  $\delta_{\text{H}}$  6.30 (1H, d,  $J = 15.9$  Hz, H-8"). El resto de las señales fueron muy similares en ambos compuestos (Tabla 14).



**Tabla 13.** RMN <sup>1</sup>H de la brevipólida K (300 MHz, δ en ppm, CDCl<sub>3</sub>).

Posición	Experimentales δ <sub>H</sub> (J en Hz)	Reportados en la literatura δ <sub>H</sub> (J en Hz)
3	5.93 dd (9.8, 1.5)	5.93 dd (9.8, 1.5)
4	6.78 ddd (9.8,5.8, 2.7)	6.78 ddd (9.8,5.8, 2.6)
5 <sub>ec</sub>	2.51 ddd (18.7,5.4, 2.7)	2.51 ddd (18.7,5.4, 2.7)
5 <sub>ex</sub>	2.37 ddd (11.1,2.7)	2.37 ddd (11.1,2.7)
6	4.23 ddd (11.1, 8.4, 4.5)	4.24 ddd (11.1, 8.4, 4.5)
1'	3.50 m	3.51 ddd (9.4, 8.6, 1.3)
2'	4.36 m	4.36 ddd (7.9, 6.8, 1.3)
3'	1.97m	1.96 c (13.6, 8.7, 7.9, 5.7)
4'	2.06 m	2.04 c (13.6, 9.0, 7.9, 6.8)
5'	3.96 m	3.96 ddd (8.0, 6.9, 5.2)
6'	4.97 c (6.4)	4.98 c (6.4)
7'	1.25 d (6.4)	1.25 d (6.5)
2'', 6''	7.72 d (8.7)	7.72 d (8.7)
3'', 5''	6.87 d (8.7)	6.87 d (8.7)
7''	6.88 d (12.8)	6.88 d (12.8)
8''	5.82 d (12.8)	5.82 d (12.8)
-OCH <sub>3</sub>	3.83 s	3.83 s



**Brevipólida K**

**Brevipólida L**

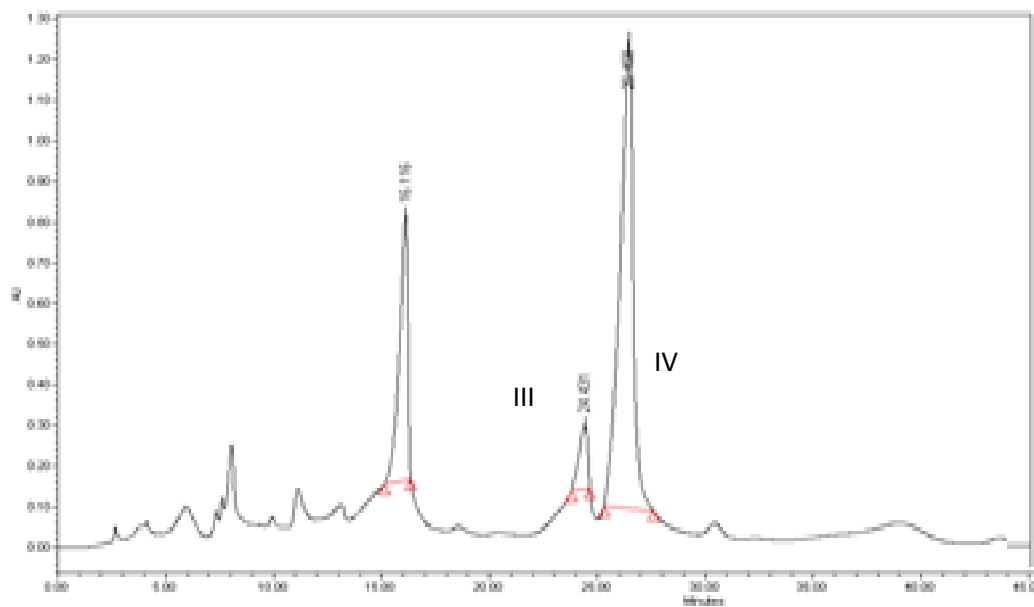
**Figura 11.** Compuestos aislados de la fracción D7.

**Tabla 14.** RMN  $^1\text{H}$  de la brevipólida L (300 MHz,  $\delta$  en ppm,  $\text{CDCl}_3$ ).

Posición	Experimentales	Reportados en la literatura
	$\bar{\delta}_\text{H}$ (J en Hz)	$\bar{\delta}_\text{H}$ (J en Hz)
3	5.96 dd (9.8,1.6)	5.96 dd (9.8,2.6, 1.2)
4	6.88 m	6.88 ddd (9.8, 5.9, 2.6)
5 <sub>ec</sub>	2.70 ddd (18.8, 5.4, 0.9)	2.68 dddd (18.8, 5.4, 0.9)
5 <sub>ex</sub>	2.48 ddd (18.8, 11.0, 2.6)	2.49 dddd (18.8, 11.5, 2.6, 2.6)
6	4.34 m	4.35 ddd (11.5, 8.6, 4.0)
1'	3.56 dd (8.0,1.7)	3.55 m
2'	4.34 m	4.35 ddd (7.9, 6.8, 1.3)
3'	1.97m	1.96 dddd (13.6, 8.7, 7.9, 5.7)
4'	2.08 m	2.05 dddd (13.6, 9.0, 7.9, 5.7)
5'	4.00 ddd (8.0, 6,7, 5.2)	4.00 ddd (8.0, 6.7, 5.2,)
6'	5.03 c (6.5)	5.03 dc (6.7, 6.5)
7'	1.28 d (6.5)	1.28 d (6.5)
2'', 6''	7.47 d (8.7)	7.46 d (8.6)
3'', 5''	6.88 d (8.7) <sup>a</sup>	6.89 d (8.6)
7''	7.65 d (15.9)	7.65 d (15.9)
8''	6.30 d (15.9)	6.30 d (15.9)
-OCH <sub>3</sub>	3.83 s	3.83 s

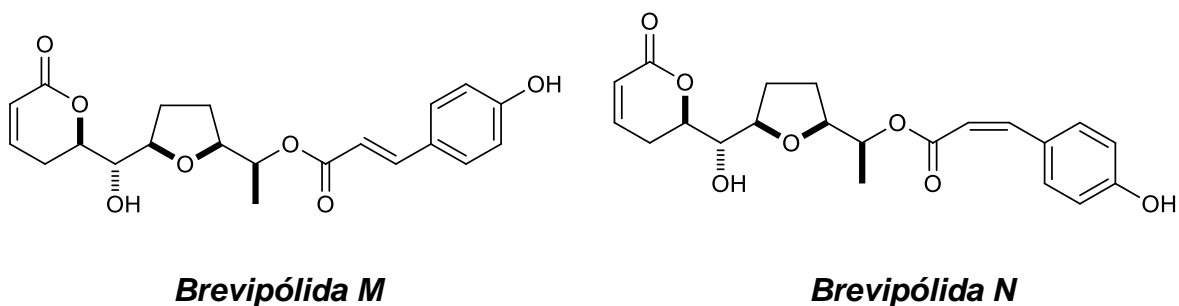
### 6.2.3.2 Análisis cromatográfico de la fracción C3

El perfil cromatográfico de C3 (Figura 12) muestra la presencia de dos picos, con un  $t_R = 24.43$  min (pico III) y 26.45 min (pico IV).



**Figura 12.** Cromatograma a nivel preparativo de la fracción C3.

A partir de estos picos se obtuvieron las brevipólidas M y N (Figura 13) de acuerdo con las constantes registradas por RMN  $^1\text{H}$  (Tablas 15 y 16) (Suárez-Ortiz *et al.*, 2017).



**Figura 13.** Compuestos aislados de la fracción C3.

**Tabla 15.** RMN <sup>1</sup>H de la brevipólida M (300 MHz, δ en ppm, CDCl<sub>3</sub>).

Posición	Experimentales	Reportados en la literatura
	δ <sub>H</sub> (J en Hz)	δ <sub>H</sub> (J en Hz)
3	5.97 dd (9.8, 1.5)	5.96 dd (9.8, 2.6)
4	6.88 ddd (9.8,5.9, 2.6)	6.89 ddd (9.8,5.9, 2.6)
5 <sub>ec</sub>	2.70 ddd (18.8, 4.9, 1.3)	2.70 ddd (18.8, 4.9, 1.3)
5 <sub>ex</sub>	2.50 ddd (18.8, 11.1, 2.6)	2.49 dddd (18.8, 11.0, 2.6, 2.6)
6	4.36 m	4.34 ddd (11.0, 8.6, 4.0)
1'	3.59 dd (8.2, 1.8) <sup>c</sup>	3.60 dd (9.4, 8.6)
2'	4.36	4.32 m
3'	1.99 m	1.90-2.15 m
4'	2.10 m	1.90-2.15 m
5'	4.00 c (7.1)	3.99 ddd (7.8, 6.7, 5.3)
6'	5.04 q (6.5)	5.03 dc (6.7, 6.5)
7'	1.29 d (6.5)	1.28 d (6.5)
2'', 6''	7.38 d (8.6)	7.37 d (8.7)
3'', 5''	6.84 d (8.6)	6.83 d (8.7)
7''	7.62 d (15.9)	7.62 d (15.9)
8''	6.26 d (15.9)	6.25 d (15.9)

**Tabla 16.** RMN <sup>1</sup>H de la brevipólida N (300 MHz, δ en ppm, CDCl<sub>3</sub>).

Posición	Experimentales	Reportados en la literatura
	δ <sub>H</sub> (J en Hz)	δ <sub>H</sub> (J en Hz)
3	5.93 dd (9.8,1.6)	5.92 ddd (9.8,2.6, 1,2)
4	6.77 ddd (9.8, 5.8, 3.0)	6.77 ddd (9.8, 5.9, 2.6)
5 <sub>ec</sub>	2.47 ddd (18.4, 5.1, 1.3)	2.49 dddd (18.4, 5.9, 4.0, 1.2)
5 <sub>ex</sub>	2.35 ddd (18.4, 11.0, 2.6)	2.37 dddd (18.4, 11.0, 2.6,2.6)
6	4.23 m	4.25 ddd (11.0, 8.6, 4.0)
1'	3.51 dd (8.5,1.4) <sup>c</sup>	3.51 dd (8.6, 1.0)
2'	4.36 dd (6.8, 6.8)	4.35 ddd (7.8, 6.8, 1.0)
3'	1.97 m	1.98-2.05 m
4'	2.08 m	1.76-2.07 m
5'	3.95 c (7.1)	3.95 ddd (7.8, 6.7, 5.3)
6'	4.97 q (6.5)	4.97 dc (6.7, 6.5)
7'	1.24 d 6.5	1.24 d (6.5)
2'', 6''	7.67 d (8.6)	7.64 d (8.6)
3'', 5''	6.82 d (8.6)	6.82 d (8.6)
7''	6.83 d (12.8)	6.84 d (12.8)
8''	5.82 d (12.8)	5.81 d (12.8)

### 6.3 Ensayo de la citotoxicidad

Las fracciones C1 a C7 se sometieron a una evaluación citotóxica empleando una línea celular derivada del carcinoma de cérvix (HeLa) mediante el método de tinción de la sulforodamina B (SRB).

La SRB es un colorante de aminoxantano, rosado brillante, que posee dos grupos sulfónicos  $-SO_3^-$  cargados negativamente, capaces de unirse electrostáticamente a cationes que en condiciones ácidas (disuelta en ácido acético 1%) aumenta su afinidad por los aminoácidos básicos de las proteínas, y se fija selectivamente a éstos, proporcionando un índice del contenido de proteína celular si las células son previamente fijadas con ácido tricloroacético y después de eliminar el colorante no fijado. El colorante unido a las células viables se extrae con medio alcalino (solución de Tris pH 10.5) permitiendo leer a una absorbancia a 564 nm.

La literatura describe que en un estudio biodirigido, el fraccionamiento del extracto de una planta monitoreando su actividad biológica permite el aislamiento y la identificación de compuestos bioactivos (Pacheco *et al.*, 2015).

En este caso, se determinó la  $CI_{50}$  de cada una de las fracciones de la Tabla 12 y los resultados obtenidos permitieron la selección de la fracción C3 al presentar valores significativos de  $CI_{50}$  (Tabla 17), satisfaciendo el criterio de actividad ( $CI_{50} < 25 \mu\text{g/mL}$ ). De esta forma, se continuó con aislamiento del posible metabolito responsable de la actividad biológica.

**Tabla 17.** Ensayo de citotoxicidad de las fracciones C1-C7.

Compuesto	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
C1	>25
C2	>25
C3	7.00
C4	20.07
C5	24.06
C6	23.27
C7	>25

## 7. CONCLUSIONES

Se logró el aislamiento de las brevipólidas K, L, M y N, a partir de un extracto orgánico de *H. brevipes*.

Estas 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas fueron detectados principalmente en la fracción que presento actividad citotóxica frente a la línea celular HeLa y fueron purificados mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

Los compuestos derivados de 5,6-dihidro- $\alpha$ -pironas presentan importantes efectos antioxidantes, sedantes, citotóxicos, entre otros, actividades que se han relacionado con la asociación del poder alquilante del núcleo de la  $\delta$ -lactona- $\alpha,\beta$ -insaturada.

De esta forma, se pone de manifiesto que la combinación de los avances en diversas áreas de la ciencia junto con el conocimiento tradicional y popular sobre las plantas medicinales, pueden utilizarse para determinar el efecto potencial de las plantas sobre alguna patología y así, validar sus usos medicinales.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, J.; Rubio, I. (2017). Plantas medicinales y medicina tradicional. *Revista de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias*, **3** (1), 6-11.
- Achmad, S.; Hoyer, t.; Kjaer, S.; Makmur, L.; Norrestam, R. (1987). Molecular and cristal strcture of Hypolide, a natural occurring  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated  $\gamma$ -lactone. *Acta Chemica Scandinavica*, B41, 599-609.
- Boalino, D.; Connolly, J.; Mc Lean, S.; Reynolds, W. (2003).  $\alpha$ -Pyrones and a 2(5H)-furanone from *Hyptis pectinata*. *Phytochemistry*, **64** (7), 1303-1307.
- Centro de Estudios Sociales y de Opinión Pública (2010). Situación del Sector Farmacéutico en México. Comité de Competitividad, 65-113.
- Cuartero, J. (2016). Labiadas. El sentimiento de las plantas medicinales. Punto Rojo Libros, España, 10-15.
- Dewick P. (2001). Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach. John Wiley & Sons. 2ª Edición, England, 130-135.
- Epling, C. (1936). Note on the Distribution of *Hyptis* in the Old World. *Kew Bull.* **4**: 279.
- Falcao, D. Q; Menezes, F. S. (2003) El género *Hyptis*. Revisión etnofarmacológica y química. Revista etnofarmacológica, farmacológica y química del género *Hyptis*. *Revista Brasileira de Ciencias Farmacéuticas*, **84** (3): 69-74.

- Fernández, J.; Rivera, O. (2003). Las labiadas (familia Labiatae). Instituto de Ciencias Naturales, Colombia, 385-395.
- Fragoso-Serrano, M.; Gibbons, S.; Pereda-Miranda, R. (2005). Anti-Staphylococcal and Cytotoxic Compounds from *Hyptis pectinata*. *Planta Medica* **71**, 278-280.
- Fuentes, C.; Segundo, A.; Granados, T. (2006) Lamiaceae (labiatae). Flora arvense asociada con el cultivo del arroz en el departamento de Tolima. Colombia. *Bayer Crop Science*, 134.
- Ghaffari, H.; Behrouz; Jalali Ghassam, S.; Chandra Nayaka, K.; Ramachandra Kini H.; Prakas, S. (2014). Antioxidant and Neuroprotective Activities of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. Against Oxidative Stress-Induced Neurotoxicity. *Cellular and Molecular Neurobiology*, **34** (3), 323-331.
- Gordillo, A. (2016). Estudio fitoquímico del extracto clorofórmico de las flores de la especie *Hyptis dilatata* (Lamiaceae). Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales. Facultad de Ciencias, Bogotá, 34-53.
- Goun, E.; Cunningham, G.; Chu, D.; Nguyen, C.; Miles, D. (2003). Antibacterial and antifungal activity of Indonesian ethnomedical plants. *Phytotherapy*, **74** (6), 592-596.
- Gowda, D. (1984) Polysaccharide components of the seed-coat mucilage from *Hyptis suaveleons*. *Phytochemistry*, **2** (11), 165-168.
- Hamada, Y.; Nakashima, M y Oiso, M. (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.



- Harley, R.; Atkins, S.; Budantsev, A.; Cantino, P.D; Conn, B.; Grayer, R; Harley, M.; De Kok, R; Krestovskaja, T.; Morales, R. ; Paton, A.; Ryding O.; Upson. T. (2004). Labiate. In labiate. The families and genera of vascular plants VII. Flowering plants dicotyledons: lamiales (except Acanthaceae including Avicenniaceae), K. Kubitzki y J. W Kadereit (Eds.) Spring, Berlín 167-275.
- Haya, J. (2008) Consensos en fitoterapia ginecológica. Médica Panamericana, Madrid, 127.
- Hedge, C. (1992) A Global Survey of the Biogeography of the Labiatae. In: Harley, R.M. and Reynolds, T., Eds., Advances in Labiatae Science, Royal Botanic Gardens, Kew, 7-17.
- Isobe, T; Doe, M.; Morimoto, Y.; Nagata,K.; Ohsaki, A. (2006) The anti-Helicobacter pylori flavones in a Brazilian plant, *Hyptis fasciculata*, and the activity of methoxyflavones. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **29** (5), 1039-1041.
- Kingston, D. G. I.; Rao, M. M.; Zucker, W. V. (1979) Plant anticancer agents. IX. Constituents of *Hyptis tomentosa*. *Journal of Natural Products*, **42** (5), 496-499.
- Koba K, Raynaud C, Miller J, Chaumont JP, Sanda K. (2007). Chemical composition of *Hyptis pectinata* L., *H. lanceolata* Poit, *H. suaveolens* (L) Poit and *H. spicigera* Lam. essential oils from Togo. *Journal Essent Oil Bear Plants*, **10** (5), 357 - 364.

- Kobayashi, S.; Tsuchiya, K; Kurokawa, T; Shimada, N. (1994) Pironetin, a novel plant growth regulator produces by *Streptomyces sp.* NK10958. *The Journal of Antibiotics*, **48**, 893-895.
  
- Lee, K.; Lin, Y.; Wu, T.; Zhang, De C.; Yamagishi, T.; Hayashi, T.; Hall, I.; Chang, J.; Wu, R.; Yang, T. Antitumor agentes. LXXXVIII. (1988). The cytotoxic principles of *Prunella vulgaris*, *Psychotria serpens*, and *Hyptis capitata*: ursolic acid and related derivatives. *Planta Medica*, **54**, 308-311.
  
- Lu Y.; Foo L. (2001). Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry*, **75**, 197-202.
  
- Martínez-Gordillo, M.; Fragoso Martínez, I; Fernández Barrera, O; Velázquez Palafox, O. (2010). El género *Hyptis* (Lamiaceae) en México. Herbario de la Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, 780-785.
  
- Martínez-Gordillo, M.; Fragoso Martínez, I; García Peña, M. R.; Montiel, O. (2013). Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo. *Revista Mexicana de Diversidad*, **84**, 30-86.
  
- Muñoz F. (1996) Plantas medicinales y aromáticas. Mundi Prensa., Madrid, 15-22.
  
- Novelo, M.; Cruz, J.; Hernandez, L.; Pereda-Miranda, R.; Chai, H.; Mar, W.; Pezzuto, J. (1993). Chemical studies on Mexican *Hyptis species*. VI. Biologically active natural products from Mexican medicinal plants. II. Cytotoxic constituents from *Hyptis verticillata*. *Journal of Natural Products*, **56**, 1728-1736.
  
- Pacheco, D.; Escalona, J.; Arranz, D.; Tavares, J.; Sobral, M.; D, S. (2015) Fitochemistry evaluation of leaves of *Excoecaria lucida* Sw. (Aité)

(Euphorbiaceae) and isolation e identification of a hemiterpenoid *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, **20** (1), 117.

- Pereda-Miranda, R.; Hernández, L.; Villavicencio, M. J.; Novelo, M.; Ibarra, P.; Chai, H.; Pezzuto, J. M. (1993). Structure and stereochemistry of pectinolides A-C, novel antimicrobial and cytotoxic 5,6-dihydro-  $\alpha$  -pyrones from *Hyptis pectinata*. *Journal of Natural Products*, **56**, 583-593.
- Poit, A. (1994). Clasificación taxonómica de *Hyptis brevipes*. Sistema Internacional de Biodiversidad. Recuperado el 08 MAR 18 de [https://sib.gob.ar/ficha/PLANTAE\\*hyptis\\*brevipes](https://sib.gob.ar/ficha/PLANTAE*hyptis*brevipes)
- Primo, E. (1995). Flavonoides. Química Orgánica Básica y Aplicada: de Molécula a la industria. Editorial Reverte, Barcelona, 915-920.
- Romo de Vivar A. (2006) Química de la Flora mexicana. Investigaciones de Instituto de Química de la UNAM. México, 114.
- Santillán, A. (2012). El uso tradicional de las plantas medicinales, un aporte para la ciencia, Salud. DGDC. UNAM. Recuperado 27 Feb. 18 de: [http://ciencia.unam.mx/leer/97/El\\_uso\\_tradicional\\_de\\_las\\_plantas\\_medicinales\\_un\\_aporte\\_para\\_la\\_ciencia](http://ciencia.unam.mx/leer/97/El_uso_tradicional_de_las_plantas_medicinales_un_aporte_para_la_ciencia).
- Suárez-Ortiz, G.; Cerda, C.; Hernández, A.; Pereda-Miranda, R. (2013). Absolute Configuration and Conformational Analysis of Brevipolides, Bioactive 5,6-Dihydro- $\alpha$ -pyrones from *Hyptis brevipes*, *Journal of Natural Products*, **76**, 72-78.
- Suárez-Ortiz, G.; Cerda, C.; Fragoso-Serrano, M.; Pereda-Miranda, R. (2017). Complementarity of DFT Calculations, NMR Anisotropy, and ECD for

the Configurational Analysis of Brevipolides K–O from *Hyptis brevipes*. *Journal of Natural Products*, **80** (1), 181–189.

- Tholl, D. (2015). Biosynthesis and Biological Functions of Terpenoids in Plants. *Sed to Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, **148**, 63-106.
- Ye Deng, J.; Balunas, J.; Lantvit, D.; Young W.; Chai, H.; Sugiarso, S.; Leonardus, S.; Fong, H, Pezzuto, M.; Swanson, S.; Carcache De Blanco, E. Y Kinghorn, D (2009). Bioactive 5,6-dihydro- $\alpha$ -pyrone derivatives from *Hyptis brevipes*. *Journal of Natural Products*, **72** (5). 1165-1169.
- Zollo, P.; Biyiti, L.; Tchoumboungang, F.; Menut, C.; Lamaty, G. Bouchet, P. (1998). Aromatic plants of Tropical Central Africa. Part XXXII. Chemical composition and antifungal activity of thirteen essential oils from aromatic plants of Cameroon. *Journal Flavour Fragrance*, **13** (2): 107-114.