



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad antimicrobiana,
antioxidante y fotoprotectora de *Hyptis mociniana* (Benth).”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

BIOL. ERICK NOLASCO ONTIVEROS

TUTOR(A) PRINCIPAL DE TESIS: DR. JOSÉ GUILLERMO AVILA ACEVEDO
FES-IZTACALA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. ANA MARÍA GARCÍA BORES
FES-IZTACALA UNAM

DR. RICARDO REYES CHILPA
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

CD. MX.

OCTUBRE 2018



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.

OFICIO CPCB/947/2018

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

Lic. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas celebrada el día 6 de agosto de 2018 se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **NOLASCO ONTIVEROS ERICK** con número de cuenta 408081540, con la tesis titulada "**Estudio fitoquímico y evaluación de la actividad antimicrobiana, antioxidante y fotoprotectora de *Hyptis mociniana* (Benth)**", realizada bajo la dirección del **DR. JOSÉ GUILLERMO ÁVILA ACEVEDO**:

Presidente: DRA. CLAUDIA TZASNÁ HERNÁNDEZ DELGADO
Vocal: DRA. PATRICIA GUEVARA FEFER
Secretario: DRA. ANA MARÍA GARCÍA BORES
Suplente: DRA. GABRIELA BARDENAS MORALES
Suplente: DR. IGNACIO PEÑALOSA CASTRO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 1 de octubre de 2018.

DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



c.c.p Expediente del (la) interesado (a)

Agradecimientos

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada, para la realización de este proyecto (CVU 699403).

Al proyecto PAPIIT IN-218616.

A mi director de tesis

Dr. Guillermo Avila Acevedo.

A los miembros del comité tutor

Dr. Ricardo Reyes Chilpa

Dra. Ana María García Bores

Agradecimientos a título personal

A los revisores de este trabajo:

Dra. Claudia Tzasna Hernández Delgado

Dra. Patricia Guevara Fefer

Dra. Gabriela Bárcenas Morales

Dr. Ignacio Peñalosa Castro.

Por la ayuda y asesoría brindada durante la realización de este proyecto.

Al Dr. Francisco Javier Pérez López y al M en C. Luis Velasco Ibarra del Instituto de Química, UNAM.

A la Dra. Adriana Montserrat Espinosa González. FES Iztacala, UNAM.

A la Dra. Rocío Serrano Parrales. FES Iztacala, UNAM.

A la Dirección de Ecología del municipio de Acámbaro Guanajuato.

Dedicatorias

- Este trabajo va dedicado con mucho cariño a mi familia, mis padres **German y Virginia** y mis hermanos **Diana y Jesús**, por todo el apoyo cariño y soporte brindado a lo largo de los años, gracias por impulsarme a seguir adelante.
- Dedico de manera especial este trabajo a mi amiga **Dra. Adriana Montserrat Espinosa González**, a quien agradezco todos estos años de amistad y la invaluable ayuda que me ha brindado en diferentes momentos de la vida y lo largo de estos años , espero poder contar muchos años más con tu valiosa amistad.
- A mis amigos **Talita Legaspi e Ismael Vanegas**, por haber emprendido esta aventura juntos a pesar de los pesares conseguimos perseverar y triunfar.
- A los profesores y académicos de los laboratorios de **Fitoquímica y Farmacognosia**, **Doctores, Guillermo Avila Acevedo, Ana María García Bores, Rocío Serrano Parrales y Claudia Tzasna Hernández Delgado** por todos los consejos apoyo y conocimiento brindado.
- A mis estimados compañeros de los laboratorios de fitoquímica y farmacognosia, **Ariane, Gelos, Estrella, Israel, Ivonne, Kevin, Morgan, Sayra y Valeria**, gracias por sus porras, la confianza y amistad depositada en mí en estos años, un gusto trabajar con ustedes.

Por último con todo mi amor para Eréndira por darme la oportunidad de unir nuestros caminos y permitirme robarle una sonrisa a su corazón cada mañana.

“La única manera de descubrir los límites de lo posible es aventurarse un poco más allá de dichos límites, en lo imposible”.

Arthur C. Clarke

Índice general.

	Página
Resumen.	1
Abstract	3
1. Introducción.	5
2. Antecedentes.	7
Metabolitos secundarios de origen vegetal.	7
• Terpenos.	8
• Alcaloides.	9
• Compuestos fenólicos.	10
• Acetogeninas.	11
• Estudios de actividad biológica con especies del género <i>Hyptis</i> .	11
• <i>Hyptis mociniana</i> .	13
3. Justificación.	15
4. Hipótesis.	16
5. Objetivos.	16
6. Estrategia metodológica.	17
Etapa 1. Obtención y caracterización de aceites esenciales y extractos.	19
• Recolecta de material vegetal.	19
• Obtención de extractos.	19
• Análisis químico preliminar de <i>H. mociniana</i> .	20
Etapa 2. Identificación y aislamiento de compuestos en aceites esenciales y extractos.	22
• Aceites esenciales y extractos hexánicos.	22
• Extracto de dicloro metano.	22
• Extractos metanólicos.	24
Etapa 3. Pruebas de actividad biológica.	26
• Evaluación de la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales y extractos de <i>H. mociniana</i>	26
• Actividad antioxidante de los extractos metanólicos de <i>H. mociniana</i>	26
• Evaluación de la actividad fotoprotectora del extracto M1	28
7. Resultados y Discusión	30
8. Conclusiones	78
9. Bibliografía consultada	79
10. Anexos	87

Índice de tablas

Tabla 1	Estudios de actividad biológica con especies del género <i>Hyptis</i>	12
Tabla 2	Información taxonómica de <i>H. mociniana</i>	14
Tabla 3	Extractos obtenidos de la parte aérea de <i>H. mociniana</i>	20
Tabla 4	Pruebas coloridas	21
Tabla 5	Fracciones obtenidas del extracto D1	23
Tabla 6	Fraccionamiento con solventes de diferente polaridad del extracto M1 de <i>H. mociniana</i>	24
Tabla 7	Fraccionamiento de por cromatografía en columna abierta de la partición PM1	25
Tabla 8	Cepas utilizadas para la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de <i>H. mociniana</i>	26
Tabla 9	Datos de herbario de <i>H. mociniana</i> Benth	30
Tabla 10	Rendimiento de los aceites esenciales de <i>H. mociniana</i>	31
Tabla 11	Peso seco del material vegetal de las diferentes colectas de <i>H. mociniana</i>	32
Tabla 12	Rendimientos de los extractos de la parte aérea de <i>H. mociniana</i>	32
Tabla 13	Familias de compuestos presentes en <i>H. mociniana</i> Benth	33
Tabla 14	Compuestos presentes en los aceites esencial colecta de junio y octubre	35
Tabla 15	Índice de Kovats para el compuesto derivado del patchoulenol	40
Tabla 16	Señales de ¹ H correspondientes al derivado del alcohol patchulínico	41
Tabla 17	Señales de C ¹³ del alcohol patchulínico	43
Tabla 18	Compuestos presentes en los extractos hexánicos de <i>H. mociniana</i>	46
Tabla 19	Abundancia de los principales compuestos presentes en los extractos hexánicos	46
Tabla 20	Fracciones con mayor rendimiento obtenidas del extracto D1	48
Tabla 21	Señales del espectro IR del precipitado 1	53
Tabla 22	Porcentaje de abundancia de los iones detectados por espectroscopía de energía dispersiva	54
Tabla 23	Fraccionamiento con solventes de diferente polaridad del extracto M1 de <i>H. mociniana</i>	55
Tabla 24	Fraccionamiento de la partición PM1 del extracto M1 de <i>H. mociniana</i>	56
Tabla 25	Principales constituyentes de las fracciones aisladas del extracto de la partición M1	57
Tabla 26	Constituyentes que detectados en la fracción 2 partición PM1	58
Tabla 27	Constituyentes que detectados en la fracción 3 partición PM1	59
Tabla 28	Comparación de los pesos moleculares de algunos de los constituyentes de las fracciones 1 y 3 de la fracción S4	59
Tabla 29	Principales constituyentes de los extractos metanólicos de <i>H. mociniana</i>	61
Tabla 31	Señales obtenidas del espectro de RMN ¹ H del extracto M1	64
Tabla 32	Señales del espectro de RMN ¹ H de la partición de diclorometano del extracto M1	66
Tabla 33	Actividad antimicrobiana sobre bacterias y hongos levaduriformes. AJ y AO (Aceites esenciales), (H1, H2 y H3) extractos hexánicos, (D1, D2 y D3, extractos de diclorometano, M1, M2 y M3 extractos metanólicos	69
Tabla 34	Evaluación cuantitativa de los aceites esenciales de <i>H. mociniana</i> (Octubre 2015) (CMI capacidad mínima inhibitoria CBM capacidad bactericida media)	71
Tabla 35	Picos máximos de absorción de los extractos metanólicos de <i>H. mociniana</i>	75

Índice de figuras

Figura 1	Principales factores de estrés biótico y abiótico que afectan a las plantas	7
Figura 2	Ejemplos de terpenos	9
Figura 3	Ejemplos de alcaloides	10
Figura 4	Ejemplos de compuestos fenólicos	10
Figura 5	Ejemplo de acetogenina	11
Figura 6	<i>H. mociniana</i> Benth, zona de colecta	14
Figura 7	Estrategia metodológica	18
Figura 8	Ubicación de la zona de colecta	19
Figura 9	Reducción del radical DPPH	27
Figura 10	Experimento de fotoprotección sobre un modelo bacteriano	29
Figura 11	<i>H. mociniana</i> Benth, (ejemplar de herbario)	30
Figura 12	Variación de los compuestos mayoritarios en los aceites esenciales de <i>H. mociniana</i> entre el mes de Junio y Octubre del 2015	37
Figura 13	Variación de los compuestos con menor concentración en los aceites esenciales de <i>H. mociniana</i>	38
Figura 14	Espectro de masas del compuesto derivado del alcohol patchoulinico	39
Figura 15	Espectro de masas del alcohol patchoulinico	39
Figura 16	Perfil cromatográfico del extracto A2	40
Figura 17	Espectro de RMN ¹ H del compuesto derivado del Alcohol patchulínico	42
Figura 18	Espectro de RNM ¹³ C de Alcohol patchoulínico	45
Figura 19	Variación de los compuestos presentes en los extractos hexánicos de <i>H. mociniana</i>	47
Figura 20	Espectro de masas del compuesto 5-hidroxi-7',4'-dimetoxiflavona	51
Figura 21	Revelado con sulfato cérico de la fracción 6 y el precipitado 1	52
Figura 22	Espectro de IR del precipitado obtenido de la fracción 6	53
Figura 23	Espectro de energía dispersiva del precipitado 1. Fracción 6 precipitado D1	54
Figura 24	Patrón cromatografico de la partición metanólica, del extracto M1	56
Figura 25	Espectro de RMN ¹ H del extracto M1 de <i>H. mociniana</i>	65
Figura 26	Espectro de ¹ H de la partición de diclorometano del extracto M1 de <i>H. mociniana</i>	67
Figura 27	Diferencias en la capacidad antioxidante media de los extractos metanólicos de <i>H. mociniana</i>	73
Figura 28	Gráfica del experimento de fotoprotección sobre un modelo bacteriano	76

Abreviaturas utilizadas.

AcOEt	Acetato de etilo
ATCC	American Type Culture Collection
CA₅₀	Capacidad antioxidante media
CBM	Concentración bactericida mínima
Cc	Cromatografía en columna
Ccf	Cromatografía en capa fina
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CBM	Capacidad bactericida media
CP	Cromatografía preparativa
DM	Diclorometano
EDDx	Espectrometría de energía dispersiva
FDA	<i>U. S Food and Droug and Administration</i> , (Administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos de América)
HPLC-DAD	<i>High performance liquid chormatography</i> , Cromatografía de líquidos de alta resolución con arreglo de diodos.
HPLC-EM	<i>High performance liquid chormatography</i> , Cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas
HR	<i>Hypersensitive response</i> (Respuesta hipersensible)
IK	Indice de Kovatz
IR	Infrarrojo
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
MHz	Megahertz
mL	Mililitros
m/z	Relación carga masa
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia magnética nuclear
RPN	Revelador de productos naturales
RUV	Radiación ultravioleta
SAR	<i>Systemic acquired response</i> (Respuesta sistémica adquirida)
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta
λ	Longitud de onda
μl	Microlitros

Resumen.

El metabolismo secundario es un proceso que consiste en la síntesis de una gran diversidad de compuestos químicos de bajo peso molecular en respuesta a diferentes tipos de estrés tanto biótico como abiótico. Las principales familias de metabolitos secundarios de origen vegetal abarcan cuatro grupos principales que son: terpenos, alcaloides, fenilpropanoides y las acetogeninas, dichos compuestos provienen de diferentes rutas metabólicas y presentan diversas funciones dentro de la planta, ya que ayudan a contrarrestar los efectos de diversos factores de estrés, de tipo biótico como: ataque de patógenos, parásitos, herbívoros, competencia con otras especies vegetales y de tipo abiótico: exceso de radiación UV, estrés oxidativo. Un grupo vegetal conocido por producir una gran diversidad de compuestos derivados del metabolismo secundario es la familia Lamiaceae, la cual ocupa el séptimo lugar en cantidad de especies en México, a su vez uno de los géneros con mayor diversidad de especies en nuestro país es *Hyptis*, que agrupa cerca de 32 especies de amplia distribución nacional. La mayoría de las especies de este género se concentran en la región centro de México, en particular en las zonas templadas montañosas del Eje Neovolcánico, aunque también se pueden encontrar en zonas semiáridas.

Por tal motivo el objetivo principal de este estudio fue realizar la caracterización fitoquímica y la evaluación de la actividad antimicrobiana, antioxidante y fotoprotectora de la parte aérea de *Hyptis mociniana* (Benth). Para lo cual se realizaron un total de 4 colectas comprendidas entre los meses de enero de 2015 a octubre de 2016, dos de ellas se utilizaron para la obtención de aceites esenciales mientras que las tres restantes se utilizaron para obtener extractos de polaridad ascendente. Existen diferencias en el porcentaje de rendimiento las cuales son dependientes de la época de colecta, siendo los extractos obtenidos en el mes de enero de 2015 los que presentan los mayores rendimientos. El aceite esencial obtenido en el mes de octubre de 2015 fue el que presentó el mayor porcentaje de rendimiento respecto al de junio del mismo año. Las pruebas de identificación de las principales familias de metabolitos secundarios revelaron que

H. mociniana presenta compuestos como monoterpenos, esteroides, glucósidos, flavonoides y triterpenos.

La segunda etapa de este trabajo consistió en el análisis químico y de variación en la producción de compuestos en diferentes épocas de colecta, los resultados obtenidos, revelan que las mezclas que conforman los aceites esenciales y extractos hexánicos están compuestas en su mayoría por sesquiterpenos y los monoterpenos α , β pineno y canfeno (aceites esenciales). Además de que los compuestos como el alcohol patchulínico y el cariofileno, son los metabolitos con mayor concentración en todas las colectas analizadas de los aceites esenciales y extractos hexánicos respectivamente. En cuanto a los extractos de mediana polaridad los análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, espectroscopía infrarroja y espectrometría de energía dispersiva, mostraron la presencia de sesquiterpenos, (cariofileno y el espatulenol) y la flavona metoxilada (5-hidroxi-7',4'- dimetoxiflavona), además de una alta concentración de carbonatos. Por otra parte, los extractos metanólicos de *H. mociniana*, están compuestos por compuestos como flavonoides, ácidos hidroxicinámicos y esteroides. Los análisis realizados a los extractos de todas las colectas mostraron que la mayor acumulación de compuestos se presenta durante el final de la época de lluvias y el comienzo de la época de estiaje.

La tercer etapa de este trabajo consistió en evaluar la capacidad antimicrobiana, antioxidante y fotoprotectora de los extractos de *H. mociniana*. Los resultados obtenidos revelan que los aceites esenciales o extractos volátiles de *H. mociniana* presentaron actividad sobre 2 cepas de bacterias Gram positiva y una Gram negativa. Mientras que la capacidad de reducción del radical DPPH se presentó extractos metanólicos. Las cuales obtuvieron valores de CA₅₀ de 15.13 ppm, 10.71 ppm y 29. 9 ppm. Por último, los resultados de la evaluación de la capacidad fotoprotectora del extracto metanólico de la colecta de octubre de 2015 un sobre modelo bacteriano, mostraron que estos protegen a las poblaciones bacterianas hasta por 60 minutos de exposición a la luz UV, lo cual se relaciona con la gran cantidad de compuestos capaces de absorber la RUV en las longitudes de onda correspondientes a la RUV-B y RUV-A.

Abstract

The secondary metabolism is a process that consists in the synthesis of a great diversity of low molecular weight chemical compounds in response to different types of stress, both biotic and abiotic. The main families of secondary metabolites of plant origin include four main groups that are: terpenes, alkaloids, phenylpropanoids and acetogenins, these compounds come from different metabolic pathways and present various functions within the plant, as they help to counteract the effects of various stress factors, biotic type such as: attack of pathogens, parasites, herbivores, competition with other plant species and abiotic type: excess UV radiation, oxidative stress. A plant group known to produce a large variety of compounds derived from secondary metabolism is the family Lamiaceae, which ranks seventh in number of species in Mexico, in turn one of the genera with the greatest diversity of species in our country is *Hyptis*, which groups about 32 species of wide national distribution. Most species of this genus are concentrated in the central region of Mexico, particularly in the mountainous temperate zones of Trans-Mexican Volcanic Belt, although they can also be found in semi-arid zones.

For this reason, the main objective of this study was to carry out the phytochemical characterization and the evaluation of the antimicrobial, antioxidant and photoprotective activity of the aerial part of *Hyptis mociniana* (Benth). For which a total of 4 collections were carried out between the months of January 2015 and October 2016, two of them were used to obtain essential oils while the three remaining were used to obtain extracts of ascending polarity. There are differences in the percentage of yield which are dependent on the time of collection, with the extracts obtained in January 2015 showing the highest yields. The essential oil obtained in the month of October 2015 was the one that presented the highest percentage of performance compared to June of the same year. The identification tests of the main families of secondary metabolites revealed that *H. mociniana* presents compounds such as monoterpenes, steroids, glycosides, flavonoids and triterpenes.

The second stage of this work consisted of chemical analysis and variation in the production of compounds at different times of collection, the results obtained,

reveal that the mixtures that make up the essential oils and hexanic extracts are composed mostly of sesquiterpenes and the monoterpenes α , β pinene and camphene (essential oils). In addition, compounds such as patchouli alcohol and caryophyllene are the metabolites with the highest concentration in all the collections analyzed of the essential oils and hexanic extracts, respectively. Regarding medium polarity extracts, gas chromatography analysis coupled to mass spectrometry, infrared spectroscopy and energy dispersive spectrometry showed the presence of sesquiterpenes, (caryophyllene and spatulenol) and methoxylated flavone (5-hydroxy-7, 4'- dimethoxyflavone), in addition to a high concentration of carbonates. On the other hand, the methanolic extracts of *H. mociniana* are composed of compounds such as flavonoids, hydroxycinnamic acids and steroids. The analyzes carried out on the extracts of all the collections showed that the greatest accumulation of compounds occurs during the end of the rainy season and the beginning of the dry season

The third stage of this work consisted in evaluating the antimicrobial, antioxidant and photoprotective capacity of *H. mociniana* extracts. The obtained results reveal that the essential oils or volatile extracts of *H. mociniana* presented activity on 2 strains of Gram positive bacteria and one Gram negative. While the reduction capacity of the DPPH radical was methanolic extracts. Which obtained values of CA50 of 15.13 ppm, 10.71 ppm and 29.9 ppm. Finally, the results of the evaluation of the photoprotective capacity of the methanolic extract of the October 2015 collection on a bacterial model showed that they protect bacterial populations up to 60 minutes of exposure to UV light, which is related to with the large number of compounds capable of absorbing the UVR at wavelengths corresponding to UVR-B and UVR-A.

1. Introducción.

El metabolismo secundario es un proceso que consiste en la síntesis de una gran diversidad de compuestos químicos de bajo peso molecular, como respuesta a diferentes condiciones de estrés biótico entre las que encontramos infecciones por bacterias y hongos fitopatógenos, herbívoros e incluso la competencia con otras especies vegetales; y condiciones de estrés abiótico, entre las que están, contaminantes, la exposición a la radiación UV, así como altas y bajas temperaturas (Davey, 2003). Aunado a lo anterior, los compuestos derivados del metabolismo secundario, presentan otras funciones en las plantas entre las que se encuentran: las de atracción de polinizadores y/o dispersores de semillas, ya sea brindando color y aroma llamativos (flavonoides y monoterpenos), además de ser quimio atrayentes de microorganismos formadores de micorrizas (Camarena, 2012), incluso presentan funciones estructurales ya que compuestos como los lignanos constituyen a las ligninas que forman parte de la pared celular de las plantas (Figuereido et al., 2018).

Debido a lo anterior, los metabolitos secundarios son una ventaja adaptativa interviniendo en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente (Valares, 2011).

México es uno de los 17 países con mayor biodiversidad del mundo, hasta la fecha se han reportado más de 22,259 especies de plantas vasculares lo que representa cerca del 8.7 % de las especies a nivel mundial, lo cual ubica a México como el quinto país con la mayor riqueza del mundo (Villaseñor y Ortiz, 2014). A pesar de la elevada biodiversidad presente en nuestro país, aún existe un gran desconocimiento de muchos de los procesos que permiten a estas especies su adaptación y distribución en diferentes condiciones de relieve y clima

Un caso particular lo representan los organismos del género *Hyptis* del cual se han reportado al menos 35 especies en nuestro país, lo que representa una amplia distribución en nuestro territorio, encontrándose tanto en zonas semiáridas como en zonas templadas. Se distribuyen principalmente en las partes tropicales del sur y a lo largo de los litorales del Pacífico y el Golfo de México. Algunas especies son

usadas como alimentos (semillas), para obtener aceites esenciales e incluso en la medicina tradicional del noreste y zona sur de nuestro país. Algunos estudios mencionan que estos organismos producen una importante variedad de compuestos derivados del metabolismo secundario. Sin embargo, estos están centrados en unas pocas especies del género, un ejemplo de ello es *Hyptis mociniana* Benth especie nativa de amplia distribución que se puede encontrar desde la zona sur del estado de Chihuahua hasta Costa Rica (Stanley y Williams 1973).

2. Antecedentes.

Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular sintetizados bajo diversos factores de estrés (Figura 1). Pueden ser almacenados en formas inactivas y posteriormente ser activados mediante acción enzimática. Estos compuestos se concentran en estructuras como las vacuolas y paredes celulares vegetales (Hammond et al., 2000).

Los metabolitos secundarios pueden clasificarse de acuerdo a su estructura base y los grupos funcionales presentes en ellos, aunque la clasificación más utilizada se basa en su ruta biosintética. Los compuestos derivados del metabolismo secundario se pueden dividir en cuatro grupos principales: terpenos, alcaloides, fenólicos/fenilpropanoides y acetogeninas, los cuales se describen a continuación.

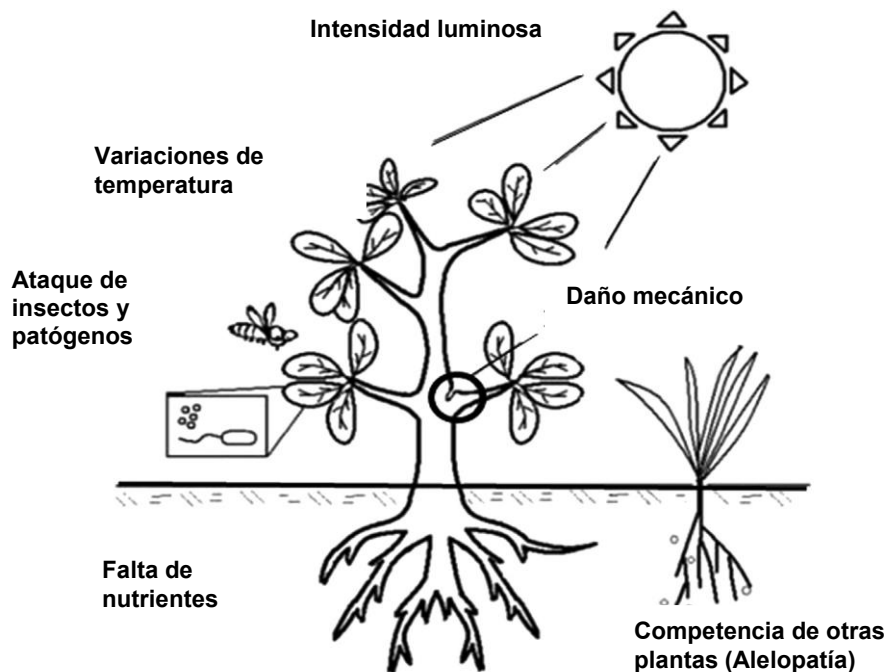


Figura 1. Principales factores de estrés biótico y abiótico que afectan a las plantas (tomado de De Albuquerque *et al.*, 2011).

Terpenos.

Los terpenos o terpenoides son uno de los grupos con mayor variedad estructural de los metabolitos secundarios identificados en plantas. El nombre terpenos deriva del hecho de que los primeros compuestos identificados fueron aislados de la turpétina (terpetin en alemán). Todos los terpenos derivan de la fusión repetitiva de unidades de 5 carbonos denominadas unidades de isopreno (Croteau et al., 2000). La clasificación de los terpenos se basa en la unión de unidades de isopreno (Banthorpe, 1991) así podemos encontrar los siguientes tipos de terpenos.

a) Monoterpenos (C10): Son los principales constituyentes de los aceites esenciales, algunos de estos compuestos son fuente importante de obtención de herbicidas; un ejemplo de ello es el 1-8 cineol, compuesto que reduce el crecimiento de las zonas meristemáticas (Duke, 1987). Además, de su actividad antimicrobiana (Timol y Carvacrol) (Marchese et al., 2016). Constituyen alrededor del 5% del peso seco de la planta, estos compuestos tienen una gran importancia industrial ya que se emplean en la obtención de saborizantes y esencias (Bicas et al., 2011; Carrol et al., 2016).

b) Sesquiterpenos (C15): Son compuestos que presentan 15 átomos de carbono en su estructura, es común encontrarlos en los aceites esenciales junto a los monoterpenos. Muchos de estos compuestos presentan actividad como antibióticos, agentes antialimentarios y alelopáticos (Fraga, 1991).

c) Diterpenos (C-20): Formados por cuatro unidades de isopreno, es un grupo de compuestos formados por ciclación del geranil-geraniol. Entre las actividades biológicas reportadas, figura la actividad reguladora del crecimiento vegetal, además de presentar actividades de interés como antitumorales, antiinflamatorios y neurotóxicos (Romo de Vivar, 1985; Shuai et al., 2017).

d) Triterpenos (C-30): Metabolitos que contienen en su estructura 30 átomos de carbono o 6 unidades de isopreno. Es una de las clases de terpenos de las que se han reportado mayor número de estructuras; en este grupo se incluyen a las fitohormonas conocidas como brasinoesteroides y componentes de membrana

como los fitoesteroles, también se ha reportado que tiene actividad como disuasorios de la alimentación, acción como fitoalexinas, forman parte de las ceras y resinas de algunos grupos vegetales. (Harborne, 1991).

e) Tetraterpenos (C-40) y politerpenos (C_n): Los tetraterpenos en su mayoría son conocidos como pigmentos accesorios auxiliares del proceso fotosintético. En el caso de los politerpenos estos metabolitos están conformados por más de 40 átomos de carbono en su estructura base (Figura 2), forman parte de algunas resinas como es el caso del hule y la gutapercha (Romo de Vivar, 1985; Fink, 2005).



Figura 2. Ejemplos de terpenos 1. Monoterpenos (C-10), 2. Sesquiterpenos (C-15), 3 Diterpenos, (C-20). (Tomado de web book NIST, 2018).

Alcaloides.

Los alcaloides presentan nitrógeno en su estructura, el origen del nombre de este grupo se debe a la naturaleza alcalina de estos compuestos (Figura 3). Los alcaloides a diferencia de terpenos y fenólicos, son compuestos que se encuentran sólo en algunos grupos vegetales que incluyen a las familias Asteraceae, Apocynaceae, Boraginaceae Fabaceae y Solanaceae (Haig, 2008). Los alcaloides presentan un papel clave en la defensa de las plantas principalmente contra herbívoros, microorganismos, hongos y en algunos casos presentan funciones alelopáticas. Un gran número de alcaloides pirrolizídicos han sido evaluados por su capacidad hepatotóxica (Quinn et al., 2014).



Figura 3. Ejemplos de alcaloides 1. Senecionina, 2. Nicotina (Webbook NIST, 2018).

Compuestos Fenólicos.

Las plantas producen una gran variedad de compuestos, los cuales presentan al menos un grupo fenol en su estructura, estos reciben la clasificación de compuestos fenólicos. Son sustancias heterogéneas que sobrepasan las 10,000 estructuras, algunos de ellos son solubles en solventes orgánicos, otros en agua, mientras que los de mayor peso son polímeros insolubles en los solventes antes mencionados. (Croteau et al; 2000). Estos compuestos tienen una gran variedad de funciones en la planta, muchos de ellos participan en la defensa contra herbívoros y patógenos, como bacterias y hongos. También presentan función de protección mecánica, algunos son atractores de polinizadores, absorben radiación ultravioleta B y reducen el crecimiento de otras plantas competidoras, (alelopatía) (Lincoln y Taiz., 2010). Entre los principales sub-grupos de compuestos fenólicos se encuentran los flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos, cumarinas, lignanos y taninos (Xu et al; 2017) (Figura 4).

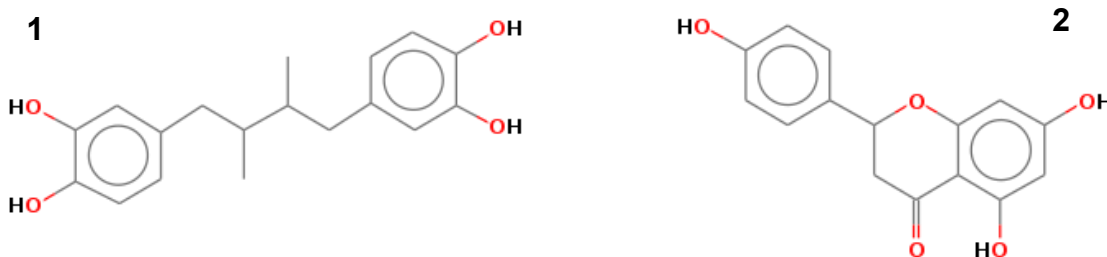


Figura 4. Ejemplos de compuestos fenólicos 1. Ácido norhidroguaiaurético (lignano), 2 Naringenina (flavanona) (Webbook NIST, 2018).

Acetogeninas.

Estos compuestos consisten en una cadena alifática, habitualmente presentan de 32 a 34 átomos de carbono y poseen una γ -lactona insaturada o saturada en uno de sus extremos. Generalmente tienen grupos hidroxilos, cetonas, epóxidos, anillos tetrahidrifuranos o tetarhidropiranos, dobles y triples enlaces (Luna, 2009) (Figura 5).

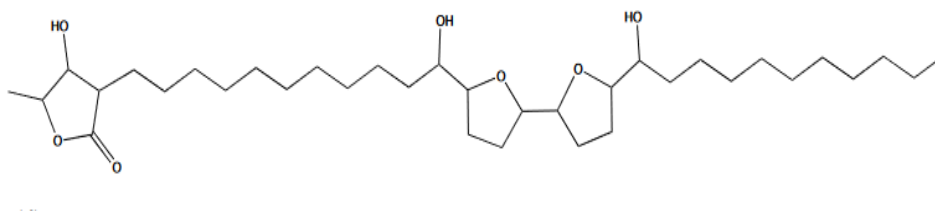


Figura 5. Ejemplo de acetogenina. Itrabina (Alessandrello et al., 2017).

Estudios de actividad biológica y fitoquímica con especies del género *Hyptis*.

En la tabla 1 se presentan algunos de los estudios realizados con especies del género *Hyptis*, así como los compuestos identificados en ellas, los cuales derivan principalmente de la ruta biosintética del ácido shiquímico y del ácido mevalónico.

Tabla 1. Estudios químicos realizados a especies del género *Hyptis*.

Autor	Especie	Estudios	Compuestos identificados
Almtorp et al., 1991	<i>H. capitata</i>	Caracterización química de la especie <i>H. capitata</i>	Lignanos y α -pironas
Taiwo et al., 1999	<i>H. suaveolens</i>	Evaluación de la actividad antiulcerogénica de aceites esenciales	Sabineno, óxido de cariofileno, α -cariofileno
Bhushan et al., 2011	<i>H. suaveolens</i>	Actividad hipoglucemiante	No indentificados
De Lima et al., 2013	<i>H. fruticosa</i>	Evaluación de la capacidad antioceptiva y antioxidante de los extractos hidroetanólicos	Flavonas, taninos y saponinas
Feitosa-Alcantara et al., 2013	<i>H. pectinata</i>	Quimiotaxonómia de la especie <i>H. pectinata</i>	β -pineno, limoneno, α copaeno, Óxido de cariofileno
Tsai-Lee, 2014	<i>H. rhomboides</i>	Neolígnanos con actividad inhibitoria de la xantina oxidadasa	hiprhombinas A–C, epihiprhombina B hiprhombina B metil ester
C. de O. costa et al., 2014	<i>H. macrostachys</i>	Actividad espasmolítica	Hyptenólido
Orendain, 2016	<i>H. verticilata</i>	Evaluación de la actividad citotóxica de los extractos obtenidos de la parte aérea de <i>H. verticiliata</i>	Lignanos, podofilotoxina, β -peltaina, yateína
Bezerra et al., 2017	<i>H. suaveolens</i>	Estudio químico y evaluación toxicológica sobre <i>Artemia salina</i> y <i>Drosophila melanogaster</i>	α -Tujeno α -Pineno, Sabineno β -Pineno

***Hyptis mociniana* (Benth).**

Descripción botánica.

Nombres comunes: Verbena montés.

Arbusto delgado de hasta 3 m de altura, erecto, frecuentemente con ramas recurvadas, cubierto de tricomas. Las hojas son opuestas, pecioladas, ovadas de hasta 8 cm de largo, puntiagudas, con base redondeada ligeramente truncada, el margen con dientes irregulares, cubiertas de abundantes pelillos. La inflorescencia presenta pequeñas flores dispuestas en numerosos grupos muy densos, separados unos de otros a lo largo de la parte terminal de la rama; a veces presenta un par de hojas reducidas acompañando cada grupo de flores estas presentan cáliz tubular cubierto de abundantes pelillos, hacia el ápice se dividen en 5 dientes en forma de espinas con pelos en los márgenes, la corola de color blanco es un tubo que se divide hacia el ápice en 5 lóbulos redondeados y cortos, presenta 4 estambres. Los frutos son pequeñas nuececillas sin pelos, con la superficie rugosa, cubiertas con cáliz persistente. La principal zona de distribución en México abarca los estados de Chihuahua, Chiapas, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Veracruz y Zacatecas (Stanley y Williams, 1973) (Figura 6).

Usos. Se utiliza en la meseta central del estado de Chiapas en comunidades Tzotziles y Tzeltales para aliviar hinchazones y edemas (Domínguez, 2002).



Figura 6. *Hyptis mociniana* Benth, Cerro del Toro, Acámbaro Guanajuato, Octubre 2017.

Ubicación taxonómica.

En la tabla 2 se presenta la información taxonómica de la especie *H. mociniana* (Benth).

Tabla 2. Información taxonómica de *H. mociniana*.

Reino	Plantae
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Género	<i>Hyptis</i>
Epíteto específico	<i>mociniana</i>
Nombre científico	<i>Hyptis mociniana</i> (Benth)
Autor del nombre	(Benth) Epling

3. Justificación.

Existe una gran diversidad de especies de la familia Lamiaceae en nuestro país, sin embargo todavía hay grandes rezagos en cuanto al estudio de la fitoquímica de estas especies. Dentro de esta familia varios géneros son conocidos por su importancia económica al ser productores de aceites esenciales (*Lavandula*, *Pogostemon* y *Salvia*), saborizantes y condimentos (*Mentha* y *Thymus*) y por su importancia en la medicina tradicional (*Prunella* e *Hyptis*), todo ello derivado de la producción de metabolitos secundarios. Sin embargo, aún no existe una cantidad suficiente de estudios centrados en la química y la actividad biológica de estas especies en México. Ejemplo de esto lo tenemos en la especie *Hyptis mociniana* de amplia distribución en el centro de México, ésta especie crece en gran variabilidad de condiciones bióticas y abióticas a las cuales puede adaptarse. Debido a esto y ante el hecho de que los organismos de la familia Lamiaceae producen una gran cantidad de compuestos los cuales abarcan las principales familias de metabolitos secundarios, *H. mociniana* representa un sujeto de estudio de gran interés, por medio del cual podremos aumentar nuestro entendimiento sobre la fitoquímica de esta especie y en general de las especies de la familia Lamiaceae que existen en nuestro país.

Por último, con base al conocimiento obtenido y a los antecedentes existentes sobre las aplicaciones de estos compuestos, se pretende determinar si esta especie también posee el potencial para su utilización como fuente de compuestos con actividad antimicrobiana, antioxidantes y fotoprotectores.

Pregunta científica.

¿Presentará la especie *H. mociniana* una amplia diversidad en la producción de metabolitos secundarios?

4. Hipótesis.

Debido a la cercanía taxonómica y morfológica de *H. mociniana* con otras especies de la familia Lamiaceae, esta especie también producirá una gran diversidad de metabolitos secundarios con actividades biológicas como antimicrobianos, antioxidantes y fotoprotectores.

5. Objetivo general.

Estudiar la fitoquímica de la especie *H. mociniana* y evaluar la capacidad antimicrobiana de sus aceites esenciales, así como la habilidad antioxidante y fotoprotectora de los extractos de media y alta polaridad obtenidos de su parte aérea.

4.1. Objetivos particulares.

- Obtener los aceites esenciales de la parte aérea de *H. mociniana* colectada en dos épocas del año.
- Obtener los extractos de baja, media y alta polaridad de la parte aérea de *H. mociniana* en diferentes épocas del año.
- Evaluar las diferencias en composición y concentración de los compuestos presentes en aceites esenciales y extractos orgánicos, dependiendo de la época de colecta.
- Realizar la separación de los compuestos que conforman a los extractos obtenidos mediante técnicas cromatográficas.
- Determinar la variación temporal de los principales metabolitos de *H. mociniana*.
- Realizar la caracterización fitoquímica de aceites esenciales y extractos por medio de técnicas espectroscópicas y espectrométricas.
- Evaluar la capacidad antimicrobiana de los aceites esenciales y los extractos orgánicos sobre modelos bacterianos y fúngicos.
- Evaluar la capacidad antioxidante *in vitro* de los extractos metanólicos de *H. mociniana*.
- Evaluar la capacidad fotoprotectora del extracto que sea cromóforo a la RUV en un modelo bacteriano de *Escherichia coli*.

6. Estrategia metodológica

Con el fin de cumplir con los objetivos establecidos para este proyecto se siguió la estrategia metodológica que se describe a continuación, y se ilustra de manera resumida en la figura 7.

***Hyptis mociniana* (Benth)** (Parte aérea).

Etapas 1. Obtención y caracterización fitoquímica de los extractos.

- Colecta del material vegetal.
- Depósito, identificación y registro del material vegetal en el herbario.
- Obtención de extractos volátiles (aceites esenciales).
- Obtención de extractos por polaridad ascendente.
- Identificación de los principales grupos de compuestos presentes en los aceites esenciales y extractos orgánicos.

Etapas 2. Aislamiento e identificación de compuestos en los extractos.

- Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de aceites esenciales y hexánicos.
- Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta de los extractos de mediana y alta polaridad.
- Cromatografía de líquidos de alta resolución de los extractos de media y alta polaridad.
- Aislamiento y purificación de compuestos (cromatografía preparativa).
- Análisis espectroscópico de los compuestos aislados.
- Análisis de la variación de compuestos en aceites esenciales y extractos con respecto al mes de recolecta.

Etapas 3. Evaluación de la actividad antimicrobiana, antioxidante y fotoprotectora de los extractos obtenidos de la parte aérea de *H. mociniana*.

- Evaluación de la capacidad antimicrobiana de los aceites esenciales.
- Evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos de alta polaridad
- Evaluación de la capacidad fotoprotectora de los extractos de alta polaridad.

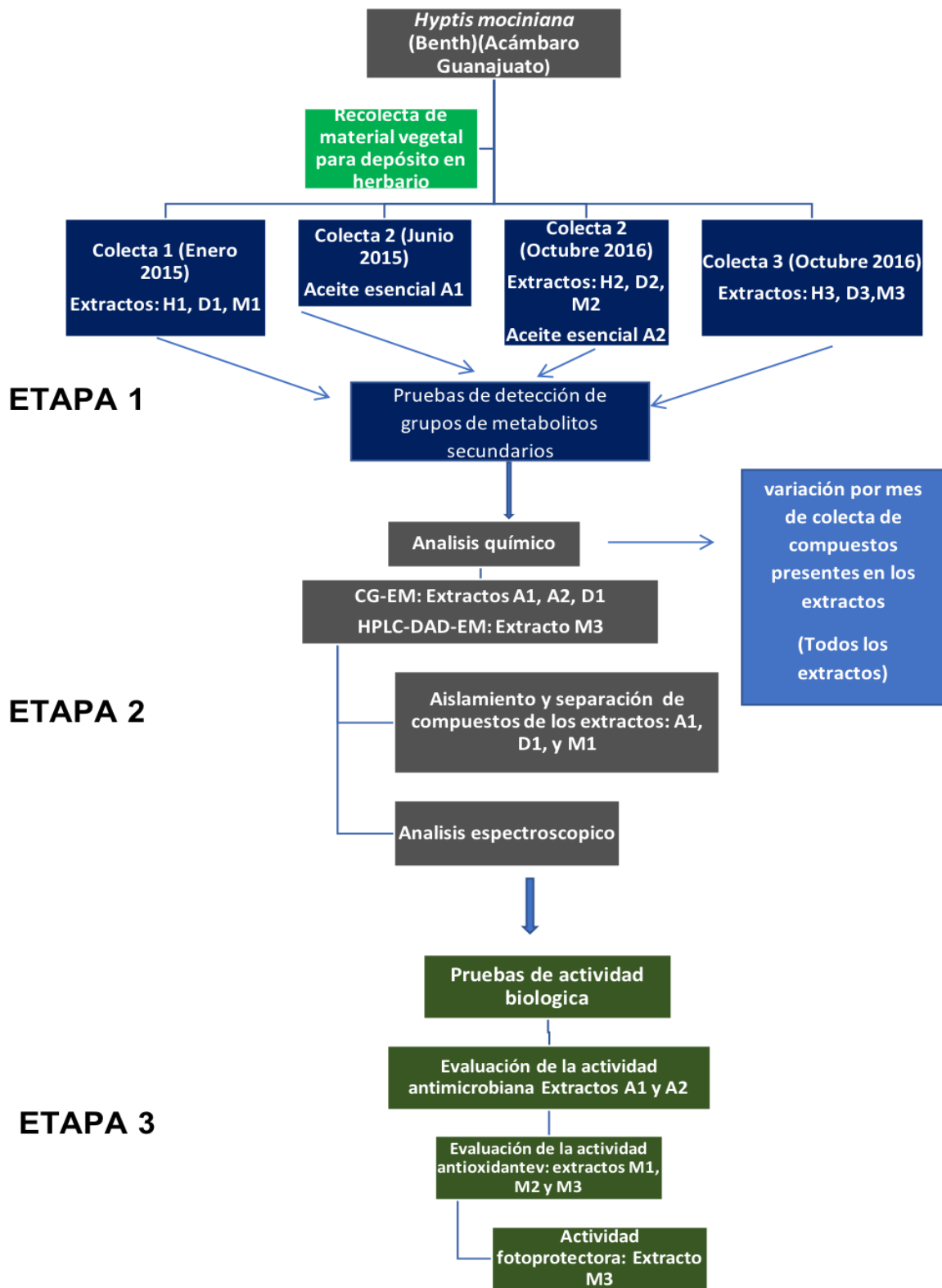


Figura 7. Esquema general de la estrategia metodológica.

Etapas 1. Obtención y caracterización de aceites esenciales y extractos.

Recolecta del material vegetal.

La primera etapa de este trabajo consistió en la colecta del material vegetal, con este fin se realizaron un total de 4 colectas en el cerro Del Toro, ubicado en la zona metropolitana del municipio de Acámbaro, Guanajuato. La zona de colecta se ubica en las coordenadas. N 20° 01' 35" y W 100° 24' 37" a una altura de 2000 msnm (Figura 8). Las colectas se realizaron en los meses de enero, julio y octubre de 2015 y una más en el mes de octubre de 2016. El material de las colectas correspondientes a junio y octubre de 2015 se utilizó para obtener aceites esenciales, mientras que el resto del material colectado con excepción del obtenido en junio de 2015 se utilizó para obtener extractos con solventes de polaridad ascendente. Por último, también se colectó un ejemplar para la identificación y depósito en el herbario IZTA de la FES-Iztacala de la UNAM.



Figura 8. Ubicación de la zona de colecta. Municipio de Acámbaro Guanajuato (amarillo). (Enciclopedia de los municipios de México, 2018).

Obtención de aceites esenciales.

El material obtenido en la colecta de junio y octubre de 2015 fue utilizado para la obtención de aceites esenciales. En cada colecta se obtuvieron 1380 g de material vegetal, el cual se trasladó inmediatamente al laboratorio para comenzar con la extracción por medio de arrastre de vapor o hidrodestilación con un equipo Clevenger, donde se sometió el material fresco a extracción por un periodo de 120

minutos. Posteriormente, el aceite obtenido se almacenó a -10°C para evitar su evaporación, protegido de la exposición a la luz para mantener la integridad de los compuestos.

Obtención de extractos por polaridad ascendente.

El material colectado para la obtención de extractos (colectas 1, 3 y 4), fue de un 1 kg por colecta, se trasladó al laboratorio para secarlo a la sombra. La parte aérea de *H. mociniana* se maceró con solventes de polaridad ascendente, utilizando hexano, diclorometano y metanol. Posteriormente, se procedió a la recuperación de los sólidos por medio de destilación a presión reducida. Este proceso se repitió un total de 4 veces por cada macerado. Con el fin de identificar de manera más sencilla cada extracto en la tabla 3 se enlista la nomenclatura con la cual se identificará a cada uno en este documento.

Tabla 3. Extractos obtenidos de la parte aérea de *H. mociniana*.

Extracto	Número de colecta	Fecha de colecta	Clave
Aceite esencial	1	Junio 2015	A1
Aceite esencial	2	Octubre 2015	A2
Hexánico	1	Enero 2015	H1
Hexánico	2	Octubre 2015	H2
Hexánico	3	Octubre 2016	H3
Diclorometano	1	Enero 2015	D1
Diclorometano	2	Octubre 2015	D2
Diclorometano	3	Octubre 2016	D3
Metanólico	1	Enero 2015	M1
Metanólico	2	Octubre 2015	M2
Metanólico	3	Octubre 2016	M3

Análisis químico preliminar de los extractos de la parte aérea de *H. mociniana*.

Una vez finalizada la obtención de aceites esenciales y extractos de polaridad ascendente se sometieron a pruebas colorimétricas de identificación de los principales grupos de metabolitos secundarios; los métodos empleados consistieron en reacciones coloridas y revelado de cromatografías de capa fina

con agentes cromógenos específicos para cada grupo de compuestos, tal como se enlista en la tabla 4.

Tabla 4. Pruebas colorimétricas para determinar los principales grupos de compuestos en los extractos de *H. mociniana* (Wagner, 1996).

Grupo de metabolitos	Revelador/ agente cromógeno	Método
Monoterpenos	Vainillina	Revelado de cromatografía de capa fina
Esteroides	Lieberman-Buchard	Revelado de cromatografía de capa fina
Saponinas	Prueba de espuma	Prueba de espuma
Alcaloides	Mayer/Dragendorff	Reacción colorida
Glucósidos	Molish	Reacción colorida
Fenólicos	Cloruro férrico	Reacción colorida
Flavonoides	Revelador de Productos Naturales (2 aminietildifenilborinato)	Revelado de cromatografía de capa fina

Etapas 2. Identificación y aislamiento de compuestos en aceites esenciales y extractos.

Aceites esenciales y extractos hexánicos.

La identificación de compuestos en los aceites esenciales y extractos hexánicos de todas las colectas se realizó por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, las condiciones del análisis se describen en el anexo número 1.

Extracto de diclorometano colecta 1 (D1).

Fraccionamiento del extracto.

El extracto D1 fue sometido a un fraccionamiento por cromatografía en columna abierta, en la tabla 5 se enlistan las fracciones obtenidas. A partir de este fraccionamiento fue posible aislar un precipitado, al cual se le denominó precipitado 1 a partir de la fracción 6. Este tuvo un rendimiento de 773 mg y fue sometido a pruebas coloridas para los principales metabolitos secundarios, se determinaron sus principales constantes fisicoquímicas. Posteriormente se analizó por medio de técnicas espectroscópicas (Espectroscopia infrarroja) y espectrométricas (Espectrometría de energía dispersiva) para conocer su composición química. Considerando que las fracciones 3A-3F, y 4A-4D presentaron altos porcentajes de rendimiento y dadas sus características de polaridad estas fueron sometidas a análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Por último la fracción 7E fue analizada por cromatografía de líquidos con arreglo de diodos (HPLC-DAD) (Anexo 2).

Tabla 5: Fracciones obtenidas del extracto D1. * presencia de precipitados.

Fracción	Alícuotas	Sistema de eluyentes	Rendimiento mg
0	A,B,C	Hexano 100%	113
1	1,2	Hexano 100%	4
1A	3,4	Hexano 100%	4
1B	5,6	Hexano 100%	5
1C	7	Hexano 100%	1
1D	8-10	Hexano/Diclorometano 80:20	4
2	11	Hexano/Diclorometano 80:20	7
2A	12-14	Hexano/Diclorometano 80:20	1
2B	15	Hexano/Diclorometano 80:20	1
2C	16-17	Hexano/Diclorometano 80:20	72
2D	18-19	Hexano/Diclorometano 80:20	13
2E	20-21	Hexano/Diclorometano 80:20	23
3A	22-27	Hexano/Diclorometano 70:30	50
3B	28-31	Hexano/Diclorometano 70:30	7
3C	32-35	Hexano/Diclorometano 70:30	3
3D	36-40	Hexano/Diclorometano 70:30	28
3F	41	Hexano/Diclorometano 70:30	46
3G	42-44	Hexano/Diclorometano 70:30	45
4A	45-52	Hexano/Diclorometano 70:30	50
4B	53-60	Hexano/Diclorometano 60:40	50
4C	61-67	Hexano/Diclorometano 60:40	29
4D	68-70	Hexano/Diclorometano 60:40	54
4E	71-78	Hexano/Diclorometano 60:40	16
5	79-83	Diclorometano 100	62
5A	84-86	Diclorometano 100	11
5B	87-89	Diclorometano 100	34
5C	90-92	Diclorometano 100	4
6	116	Diclorometano/Acetato de Etilo 9:1	773*
6A	117-140	Diclorometano/Acetato de Etilo 9:1	153
6B	141-168	Diclorometano/Acetato de Etilo 9:1	173
7	169-173	Diclorometano/Acetato de Etilo 9:1	79
7A	174-180	Diclorometano/Acetato de Etilo 9:1	121
7B	181-196	Diclorometano/Acetato de Etilo 9:1	75
7C	197-211	Diclorometano/Acetato de Etilo 9:1	84
7D	212-223	Diclorometano/Acetato de Etilo 1:1	145
7E	224-241	Acetato 100	234
7F	242-251	Acetato de Etilo/Metanol 9:1	654
8	252—258	Acetato de Etilo/Metanol 8:2	26
8A	259-270	Acetato de Etilo/Metanol 6:4	28
8B	271-277	Acetato de Etilo/Metanol 5:5	37
8C	278-287	Metanol	3345
8E	288	Metanol:agua	23
8F	289	Agua	100

Extractos de alta polaridad.

Extracto M1.

Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta.

Debido a la presencia de compuestos de distinta polaridad del extracto metanólico de *H. mociniana*, se obtuvieron particiones con diferentes solventes, se utilizó, hexano, diclorometano, metanol y agua, para posteriormente realizar fraccionamiento de la partición metanólica en una columna abierta, con el fin de separar los compuestos mayoritarios presentes en ella. En la tabla 6 se enlistan las particiones obtenidas del extracto metanólico, así como su rendimiento.

Tabla 6. Fraccionamiento con solventes de diferente polaridad del extracto M1 de *H. mociniana*, particiones obtenidas a partir de 15 g de extracto.

Partición	Rendimiento (g)
Hexano	0.2
Diclorometano	1.5
Metanol (PM1)	11.5
Agua	3.66

Debido a que la partición PM1 presentó el mayor porcentaje de rendimiento se eligió para su posterior fraccionamiento por cromatografía en columna abierta. En la tabla 7 se presenta el fraccionamiento general de esta partición.

Tabla 7. Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta de la partición PM1.

Fracción	Alícuotas	Sistema de eluyentes	Rendimiento
1	1-7	Acetona 100%	900mg
2	8-11	Acetona 100%	140
3	12-15	Acetona 100%	8
4	16-22	Acetona 100%	190
5	23-29	Acetona/Metanol 9:1	100
6	30-40	Acetona/Metanol 85:15	86
7	41-44	Acetona/Metanol 85:15	69
8	45-47	Acetona/Metanol 85:15	80
9	48-51	Acetona/Metanol 85:15	95
10	52-72	Acetona/Metanol 85:15	600
11	73-91	Acetona/Metanol 8:2	400
12	92-106	Acetona/Metanol 75:25	310
13	107-119	Acetona/Metanol 7:3	86
14	120-134	Acetona/Metanol 65:35	89
15	135-145	Acetona/Metanol 6:4	110
16	146-149	Acetona/Metanol 1:1	75
17	150	Metanol 100%	63
18	151-158	Metanol 100%	110
19	159-169	Metanol 100%	87
20	170	Metanol/agua 9:1	98
21	171	Metanol/agua 8:2	90
22	172	Metanol/agua 7:3	55
23	173	Metanol/agua 6:4	62
24	174	Metanol/agua 1:1	80
25	175	Agua 100%	75

Etapa 3. Pruebas de actividad biológica.

Evaluación de la actividad antimicrobiana.

La evaluación antimicrobiana de todos los extractos de la parte aérea de *H. mociniana* se llevó a cabo empleando cuatro cepas de bacterias, dos de ellas Gram positivas y 2 Gram negativas, dos cepas de hongos levaduriformes y dos de hongos miceliados. Se realizaron pruebas cualitativas por el método de Kirby-Bauer para el caso de las bacterias y levaduras; mientras que la prueba de inhibición del crecimiento radial se utilizó para hongos filamentosos y determinar que especies eran susceptibles a los extractos de *H. mociniana* (tabla 8).

Tabla 8. Cepas utilizadas para la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de *H. mociniana*.

Bacterias	Tipo de bacteria
<i>Escherichia coli</i> 82MR	Gram negativa
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC10240	Gram positiva
<i>Staphylococcus aureus</i> 23MR	Gram positiva
<i>Vibrio cholerae</i> ATCC 39540	Gram negativa
Hongos	Tipo de hongo
<i>Candida albicans</i> 17MR	Levaduriformes
<i>Candida glabrata</i>	Levaduriforme
<i>Aspergillus niger</i>	Filamentoso
<i>Fusarium moniliforme</i>	Filamentoso

Posteriormente para los extractos activos se realizó una evaluación cuantitativa, que consistió en determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración bactericida mínima (CBM), para ello se utilizó el método de dilución en agar descrito en el anexo 3 (Koneman et al., 1985).

Evaluación de la capacidad antioxidante.

La evaluación de la capacidad antioxidante de los extractos metanólicos de *H. mociniana* se determinó por medio del método de reducción del radical 2,2-difenil-

1-picril-hidrácilo (DPPH) al 0.2 %. Este radical presenta un máximo de absorción de 517 nm cuando es reducido por sustancias antioxidantes y la coloración presenta un viraje a color amarillo (Figura 9).

Para la determinación de la capacidad antioxidante media (CA₅₀) de los extractos metanólicos de las 3 colectas se obtuvo el porcentaje de decoloración del radical DPPH, empleándose como sustancia de referencia, quercetina, y como blanco metanol. Se evaluaron los tres extractos metanólicos a diferentes concentraciones (2.5, 5, 10, 20, 30, 40, 80, 160 y 320 ppm). Los resultados muestran el promedio y desviación estándar de 8 repeticiones por medición. Se realizó un ANOVA simple para determinar las diferencias significativas en la capacidad antioxidante media de cada uno de los extractos.

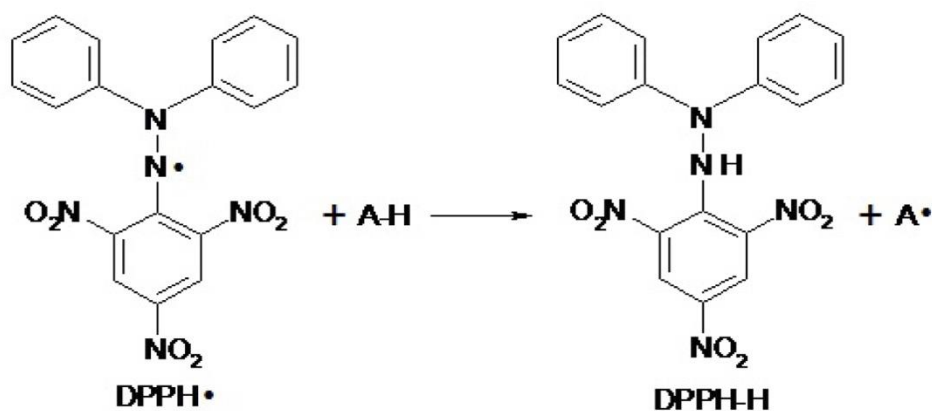


Figura 9. Reducción del radical DPPH (Oliveira, g.l.s 2015).

Los resultados se reportaron en porcentaje de reducción del DPPH. El cual se calculó con la siguiente formula

$$\% \text{ de reducción } (C-E/C)*100$$

Donde

C= Absorbancia del control de DPPH; E= Absorbancia del experimental (DPPH+ compuesto problema).

Evaluación de la actividad fotoprotectora del extracto M1 de *H. mociniana* sobre un modelo bacteriano.

Los máximos de absorción en la región UV-A y UV-B de los extractos de alta polaridad fueron determinados mediante análisis espectrofotométrico. Posteriormente se eligió el extracto M1 debido a que este presentó el mayor rendimiento y presentó absorción en la región de la UV-B.

El modelo utilizado para evaluar la actividad fotoprotectora de los extractos metanólicos de *H. mociniana* fue el propuesto por Avila et al., 2005. El cual consiste en exponer suspensiones bacterianas a la RUV con y sin protección para determinar y comparar la constante de mortalidad (K) que se obtiene a partir de las curvas de supervivencia.

El microorganismo utilizado en este trabajo fue la bacteria *Escherichia coli* ATCC 25922, se preparó un inóculo en caldo infusión cerebro corazón durante 24 horas a 37°C. Posteriormente se midió la densidad óptica a 550 nm y se ajustó a 0.2, después se centrifugó a 3500 rpm durante 10 minutos y la pastilla de bacterias se resuspendió en 100 mL de solución salina esteril. Finalmente, la suspensión bacteriana se colocó en cubetas de cuarzo estériles para ser irradiadas (Figura 10).

Los extractos, así como el control positivo fueron colocados en cubetas de cuarzo a una concentración de 2.0 mg/mL, usando metanol grado HPLC como solvente y como control negativo. El control positivo fue el filtro solar comercial etil-hexil-p-metoxicinamato (Parsol®).

Las cubetas con los controles y el extracto M1 se colocaron a 15 cm de una lámpara de luz UV-B, para ser irradiadas a diferentes tiempos:

- a) Sin protección. 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0 y 6.0 minutos.
- b) M1 y Parsol: 15, 30, 45, 60, 75, 90 minutos.

En cada periodo de tiempo se tomaron muestras de 100 µL de cada uno de las unidades experimentales, para posteriormente realizar el conteo de microorganismos sobrevivientes por medio de la técnica de dilución.

Los resultados obtenidos se expresaron graficando el logaritmo de sobrevivientes con relación al tiempo de irradiación para el cálculo de la pendiente, que es la constante de mortalidad.

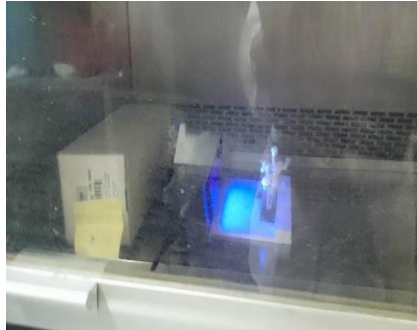


Figura 10. Experimento de fotoprotección sobre un modelo bacteriano.

7. Resultados y discusión.

Etapa 1. Colectas, extracción y caracterización química preliminar.

Datos de herbario de *H. mociniana*.

La determinación del material vegetal colectado en el municipio de Acámbaro, Guanajuato fue realizada por la M. en C. Patricia Jácquez Ríos, en el herbario IZTA de la FES-Iztacala. Los datos y el ejemplar de herbario se muestran en la tabla 9 y la figura 11 respectivamente y correspondieron a la especie *Hyptis mociniana* (Benth).

Tabla 9. Datos de herbario de *Hyptis mociniana* Benth.

Nombre científico	<i>Hyptis mociniana</i> (Benth)
Familia	LAMIACEAE
Nombre común	No disponible
No de Registro	2390 IZTA

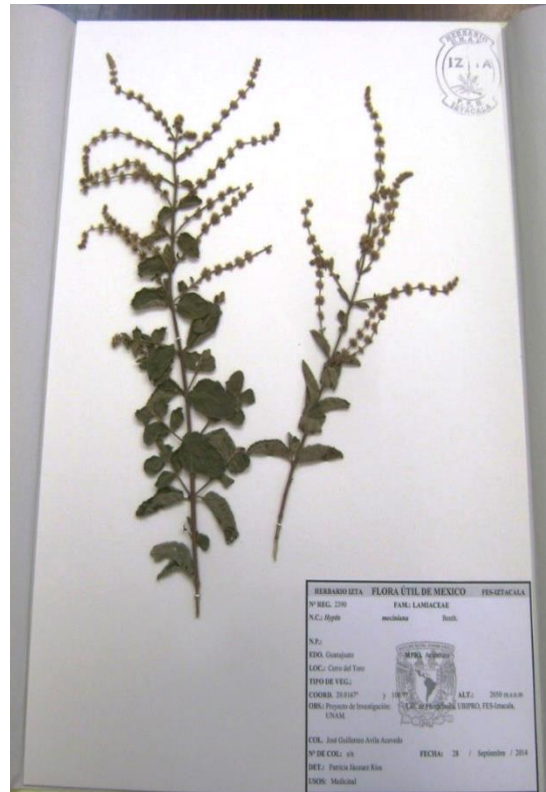


Figura 11. *Hyptis mociniana* Benth, (ejemplar de herbario).

Rendimiento de los aceites esenciales.

A partir de 1380 g de parte aérea fresca de las colectas 2 y 3 se obtuvieron los aceites esenciales. Los valores de rendimiento se muestra en la tabla 10. Ambos extractos presentaron una ligera coloración amarillenta.

En la tabla 10 se enlistan los principales parámetros de masa, densidad y rendimiento de cada uno de los aceites. El mayor porcentaje de rendimiento obtenido fue el del extracto A2 ya que este es 3.03 veces mayor con respecto al aceite A1. También se presentaron diferencias en cuanto a la densidad de cada una de las muestras siendo el aceite A1 el que presentó mayor densidad con respecto al extracto A2.

Tabla 10. Rendimiento de los aceites esenciales de *H. mociniana*.

Extracto	Masa (g)	Volumen (mL)	Densidad (g/cm³)	Rendimiento (%)
A1	1.39	1.65	0.84	0.10
A2	3.39	5.0	0.67	0.24

En cuanto al rendimiento de los aceites esenciales el mayor porcentaje lo presentó el extracto A2, esto podría relacionarse con la época de floración y el final de la época de lluvia. Como se sabe, la acumulación de reservas de compuestos de defensa en la planta es un fenómeno derivado del proceso conocido como respuesta sistémica adquirida o SAR por sus siglas en inglés, en el cual la planta al ser depredada o ser afectada por microorganismos patógenos produce una gran variedad de compuestos químicos para evitar la entrada de estos (Fu et al., 2013).

Rendimiento de los extractos obtenidos por maceración en frío.

El material vegetal seco de *H. mociniana* colectado para la obtención de los extractos con solventes orgánicos se muestra en la tabla 11.

Tabla 11. Peso seco del material vegetal de las diferentes colectas de *H. mociniana*.

Colecta	Número de colecta	Peso del material vegetal (g) (peso seco)
Enero 2015	1	600
Octubre 2015	3	500
Octubre 2016	4	700

Se obtuvieron un total de nueve extractos cuyo rendimiento se muestra en la tabla 12.

Tabla 12. Rendimientos de los extractos de la parte aérea de *H. mociniana*.

Extracto	Colecta/clave	Peso(g)	Rendimiento (%)
Hexánico	H1	7.00 g	0.63
	H2	3.20 g	0.64
	H3	5.50 g	0.55
Diclorometano	D1	14.00 g	1.40
	D2	2.34 g	0.47
	D3	8.00 g	0.80
Metanol	M1	28.87g	2.87
	M2	5.66 g	1.13
	M3	17.90 g	1.79

Como se puede observar en la tabla 12 los extractos con los mayores rendimientos fueron los obtenidos del material colectado en enero de 2015 (H1, D1 y M1). En general los extractos metanólicos fueron los que presentaron el mayor porcentaje de rendimiento, seguidos por los de diclorometano y por último los hexánicos. Estos resultados pueden atribuirse a las diferentes condiciones de estrés a las que la planta está sometida a lo largo del año. Es posible que en el mes de enero la planta tienda a acumular gran cantidad de compuestos necesarios para las respuestas de defensa a factores de estrés durante la época

de sequía, tal como se ha observado en especies del género como *Hyptis carpinifolia* (Stone, et al., 2016)

La acumulación de una gran cantidad de compuestos en la planta representa una gran ventaja para el organismo, ya que la síntesis de metabolitos secundarios implica un elevado gasto de energía. Se sabe que la producción de algunas fitoalexinas en particular derivados de fenilpropanoides requiere de al menos 2.6 g de CO₂ por gramo de compuesto (Gulmon y Money, 1986). Por lo cual es posible que *H. mociniana* tienda a acumular compuestos durante la época de lluvia, y de esta manera utilizar los recursos energéticos disponibles para el mantenimiento de la homeostasis de la planta durante la época de estiaje.

Pruebas de detección de metabolitos secundarios

En la tabla 13 se enlistan las principales familias de compuestos detectados en los extractos volátiles y extractos orgánicos. Los resultados obtenidos en la última fase de la etapa 1 muestran que la parte aérea de *H. mociniana* presenta la mayoría de las familias de metabolitos secundarios como terpenos, esteroides y compuestos fenólicos.

Tabla 13. Familias de compuestos presentes en *H. mociniana* Benth.

Grupo de metabolitos	Prueba	Resultado	Extracto
Monoterpenos	Vainillina	+	A1, A2, H1, H2, H3, D1, D2, D3
Esteroides	Lieberman-Buchard	+	D1, D2 Y D3 M1, M2 y M3
Alcaloides	Mayer	-	
Alcaloides	Dragendorff	+	M1, M2, y M3
Saponinas	Espuma	-	M1, M2, y M3
Glucósidos	Molish	+	M1, M2, y M3
Fenólicos	Cloruro férrico	+	M1, M2, y M3
Flavonoides	RPN	+	D1, D2, D3 M1, M2 y M3
+prueba positiva /- prueba negativa			

La detección de terpenos, triterpenos, fenilpropanoides, flavonoides y glucósidos en los extractos de *H. mociniana* coincide con lo reportado para otras especies del género y la familia Lamiaceae. Esta complejidad en la producción de diversos grupos de compuestos proporciona a la planta gran ventaja sobre otras especies de la zona y le permite hacer frente a gran número de factores bióticos y abióticos (Pereira dos Santos et al., 2018).

Etapa 2. Análisis químico de los extractos de *H. mociniana*.

Aceites esenciales.

El análisis por CG-EM mostró que la composición química de los aceites esenciales de *H. mociniana* esta conformada en su mayoría por compuestos de tipo sesquiterpeno. Para el caso del aceite A1 se identificaron un total de 18 compuestos de los cuales 2 son monoterpenos y 16 sesquiterpenos (Tabla 14). En cuanto al extracto A2 se identificaron 16 compuestos, de los cuales 3 son monoterpenos y 13 sesquiterpenos. En ambos casos el compuesto más abundante fue el sesquiterpeno denominado alcohol patchoulínico con una abundancia de 32.6 % de concentración en el mes de junio (A1) y 31.5 % para el mes de octubre (A2).

Tabla 14. Compuestos presentes en los aceites esenciales. Colecta de junio: A1; colecta de octubre: A2; Índice de Kovatz: IK, lit; Índice de Kovatz experimental: IK exp.

Compuesto	Tipo de compuesto	% de abundancia A1	% de abundancia A2	IK (exp)	IK (Lit)
Alcohol patchoulínico	Sesquiterpeno	32.67	31.5	1553	1659
β -Cariofileno	Sesquiterpeno	12.33	13.13	1413	1415
D-Germacreno	Sesquiterpeno	11.1	10.43	1473	1477
α -Pínenos	Monoterpeno	7.33	16.71	932	933
Rosifoliol	Sesquiterpeno	6.01	2.61	1613	1611
β -Chamigreno	Sesquiterpeno	4.81		1410	1473
Elemol	Sesquiterpeno	3.54		1545	1537
α -Humuleno	Sesquiterpeno	3.42	2.61	1450	1449
Óxido de cariofileno	Sesquiterpeno	3.36	3.41	1585	1581
β -Pínenos	Monoterpeno	3.22	6.11	979	978
β -Eudesmadieno	Sesquiterpeno	2.84	3.82	1482	1485
δ -Cadineno	Sesquiterpeno	2.14	1.32	1525	1525
Ylangeno	Sesquiterpeno	0.71	-	1343	1373
β -Bourboneno	Sesquiterpeno	0.69	0.97	1389	1386
β -Elemeno	Sesquiterpeno	0.64	-	1411	1407
Epóxido de Humuleno II	Sesquiterpeno	0.52	-	1546	1577
τ -Elemeno	Sesquiterpeno	-	5.37	1491	1494
α -Cubebeno	Sesquiterpeno	-	0.60	1349	1351
Helminto-germacreno	Sesquiterpeno	-	0.49	1392	1392
δ -Camfeno	Monoterpeno		0.33	967	968

Como se puede observar en la tabla 10 existen diferencias en la densidad de los aceites esenciales, siendo el A1 el que mayor valor presentó; esto se debe a que los compuestos que conforman dicho aceite tienen pesos mayores a los de los compuestos presentes en el aceite A2.

Con respecto a la composición de los aceites esenciales, ambas muestras presentan una mayor proporción de sesquiterpenos, lo cual es común en las especies del género *Hyptis* (Leite et al., 2013). De éstos el de mayor abundancia en ambas colectas fue el alcohol patchoulínico, siendo este el primer reporte de este compuesto para la especie *H. mociniana* y el género *Hyptis*. El alto porcentaje en la abundancia de este terpeno bicíclico hidroxilado puede relacionarse con su función como repelente, ya que Zhu y colaboradores en 2003 reportan su efecto repelente sobre termitas y Chakrapani en 2013 lo prueba en algunas especies de dípteros.

Los compuestos cariofileno, D-germacreno, junto con el α -pineno presentan actividad como inhibidores de la germinación de semillas, atractores de depredadores de insectos herbívoros y repelentes de insectos (Mamjunatha et al., 1998). En cuanto a la presencia de compuestos con actividad disuasoria de la alimentación *H. mociniana* presenta producción de D-germacreno, este sesquiterpeno actúa como feromona de atracción sobre diversos artrópodos depredadores, en concreto arácnidos, los cuales son depredadores naturales de insectos herbívoros (Mamjunatha et al., 1998). Lo cual fue corroborado de manera visual en el sitio de colecta al observar a individuos del género *Peuceetia* sobre las plantas de la zona.

Por último, es importante resaltar el aumento en la síntesis de compuestos como α y β pineno en el extracto A2. Este hecho puede atribuirse a que durante el final de la época de lluvias *H. mociniana* presenta un aumento en la formación de nuevas estructuras, como hojas y semillas. Los patrones de producción y acumulación de compuestos además de variar de acuerdo a la exposición de factores ambientales, también cambian de acuerdo al estado de desarrollo de la planta. Está reportado que cierto tipo de metabolitos se acumulan en grandes cantidades después de la exposición de la planta a una infección, lo cual activa la respuesta hipersensible siendo este el primer mecanismo de respuesta de defensa (Taiz y Zeiger, 2006). En cuanto a la presencia de monoterpenos en *H. mociniana* es notable que sólo se hayan identificado 3 de estos compuestos; dos de ellos en concentraciones altas (α y β pineno) y uno más con baja concentración (canfeno) este último sólo

se detectó en el mes de octubre. La presencia de α y β pineno en ambas colectas, así como el aumento en su concentración en el mes de octubre puede relacionarse con su actividad como antimicrobianos y agentes alelopáticos (Singh et al., 2006), debido a que en esta época del año se observa un aumento en la cantidad de hojas y flores de *H. mociniana* susceptibles al ataque por microorganismos. Por último, la diferencia en los compuestos presentes sólo en alguno de los meses de colecta puede atribuirse a que éstos son sintetizados en respuesta a factores específicos que pudieran estar afectando a la planta, lo cual se confirma con el hecho de que la mayoría de éstos presentan concentraciones menores al 1% (Figuras 12 y 13), esto es un indicativo de que pueden ser sintetizados como parte de la respuesta hipersensible de la planta (HR), proceso en el que se producen compuestos durante un corto periodo de tiempo el cual va de horas a días en la planta (Matic et al., 2016).

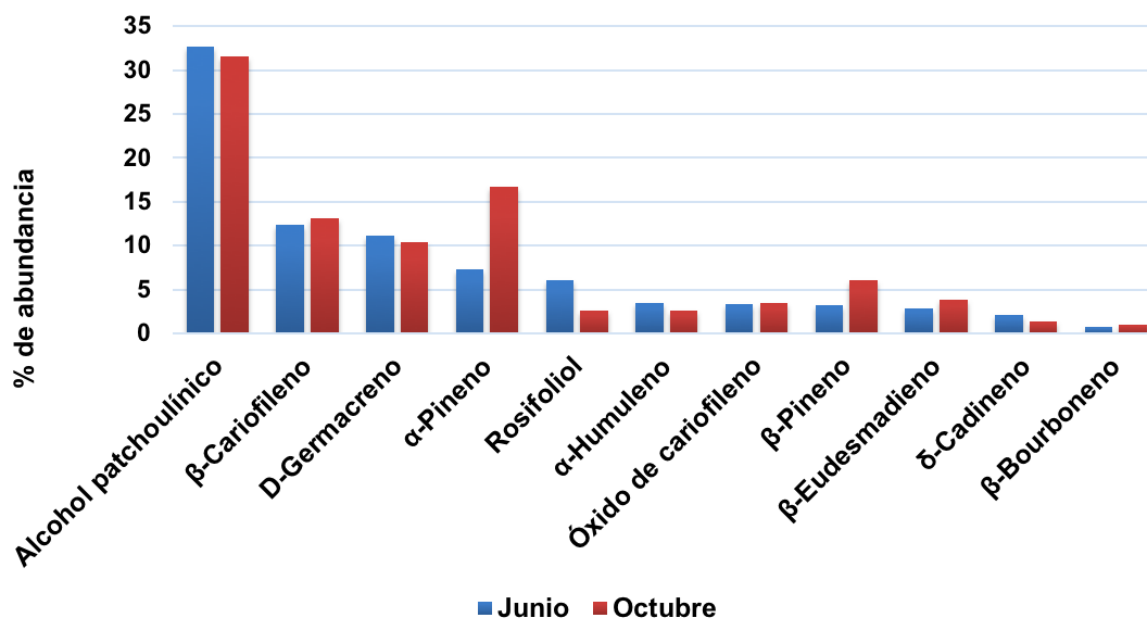


Figura 12. Variación de los compuestos mayoritarios en los aceites esenciales de *H. mociniana* entre el mes de junio (A1) y octubre (A2) del 2015.

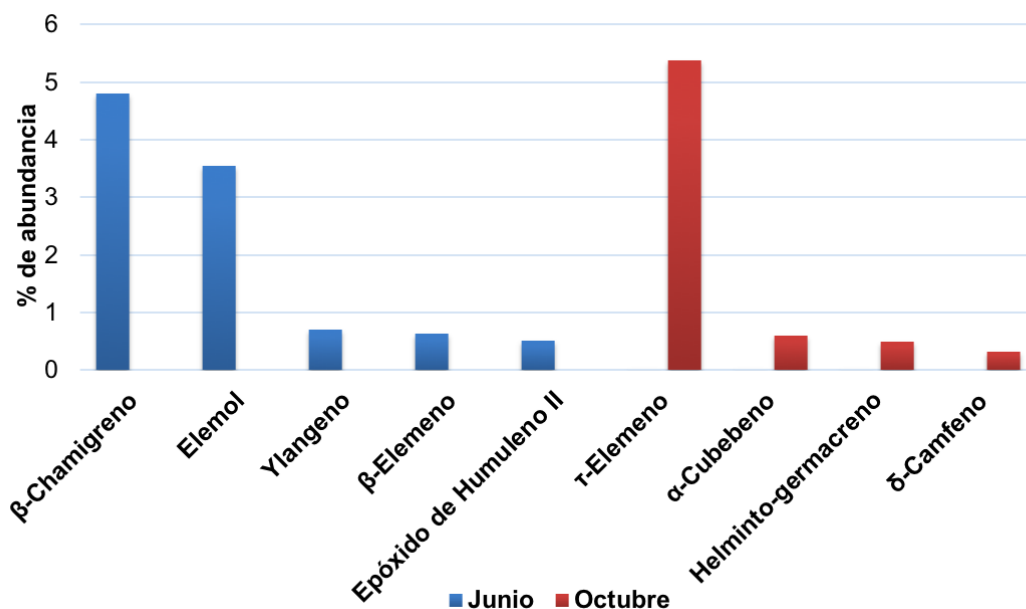


Figura 13. Variación de los compuestos con menor concentración en los aceites esenciales de *H. mociniana*.

En las plantas de la familia Lamiaceae a la que pertenece *H. mociniana* los tricomas glandulares son el sitio primario de síntesis de compuestos volátiles, estas estructuras exudan una gran cantidad de compuestos, formando una capa continua sobre la superficie de la planta que puede regular las interacciones con la microbiota que habita la filosfera y la antosfera (Guilani et al., 2017).

Aislamiento del compuesto principal de aceite esencial A2.

Debido a que el patrón de fragmentación del alcohol patchulínico (con tiempo de retención de 16.6 min, picos base 207 y el ion molecular en 222 m/z) difería de la referencia de la biblioteca NIST (Figura 14 y Tabla 16) y valores como el índice de Kovatz (Webbook NIST, 2016) se procedió a aislar este compuesto del extracto A2 con el fin de analizarlo en RMN de protones y carbono 13 para determinar su estructura.

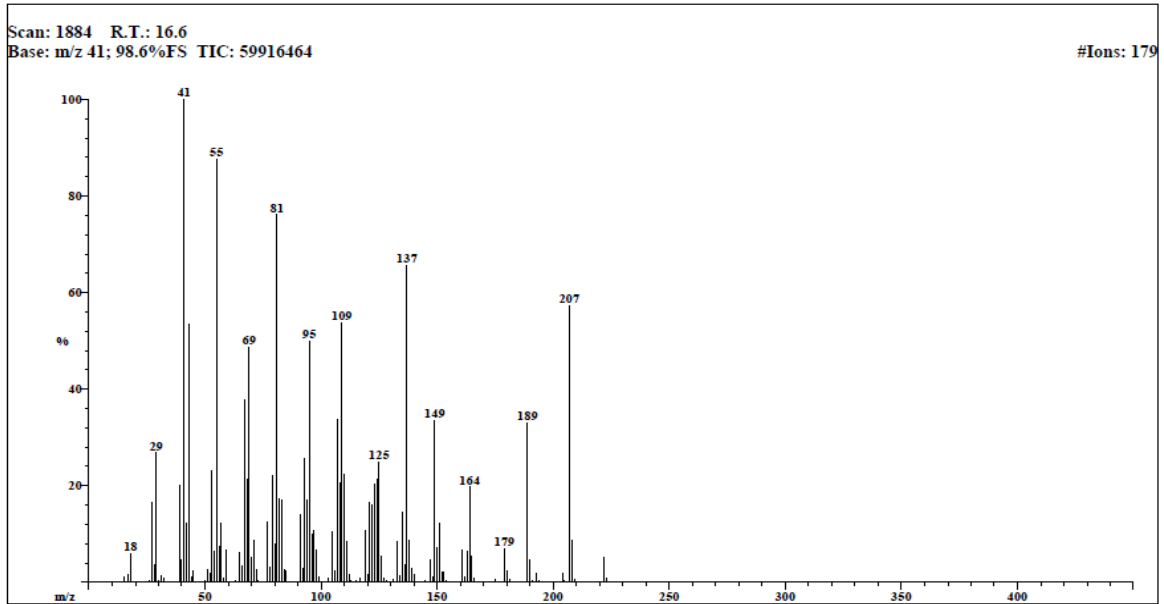


Figura 14. Espectro de masas del alcohol patchoulínico.

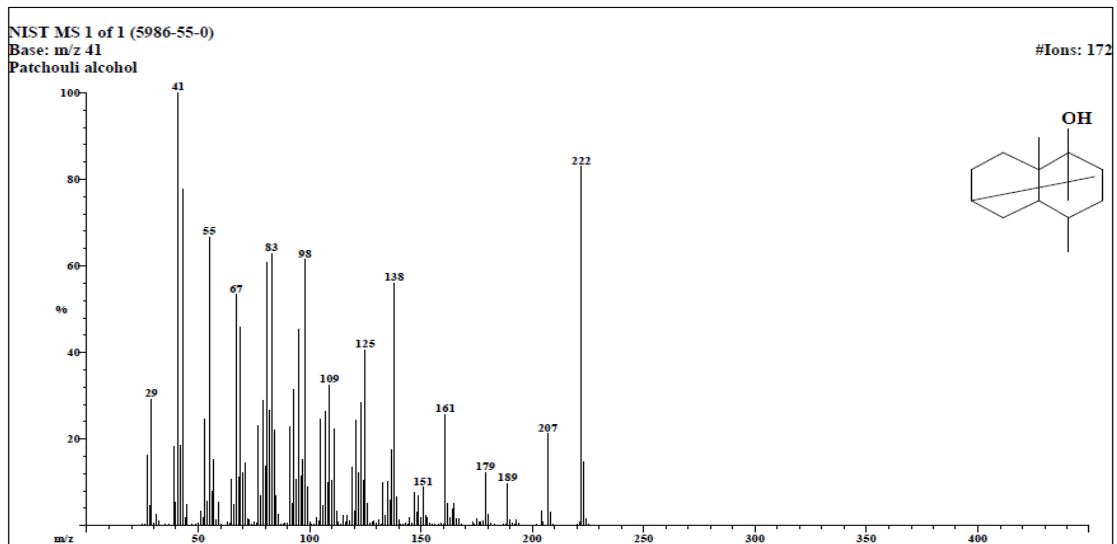


Figura 15. Espectro de masas del alcohol patchoulínico, tomado de: Webbook NIST, 2018.

Tabla 15: Índice de Kovats para el alcohol patchoulínico.

Parámetro	Valor experimental	WebbookNIST
Masa molecular	222	222
Índice de Kovatz	1553	1659

El alcohol patchoulínico fue detectado a partir de la alícuota número 18 y se observó la presencia del mismo hasta la 36 (Figura 15). Se obtuvieron un total de 40 mg del compuesto a temperatura ambiente cual es un liquido incoloro al que se le determinó su espectro de resonancia magnetica nuclear de H¹ y C¹³.

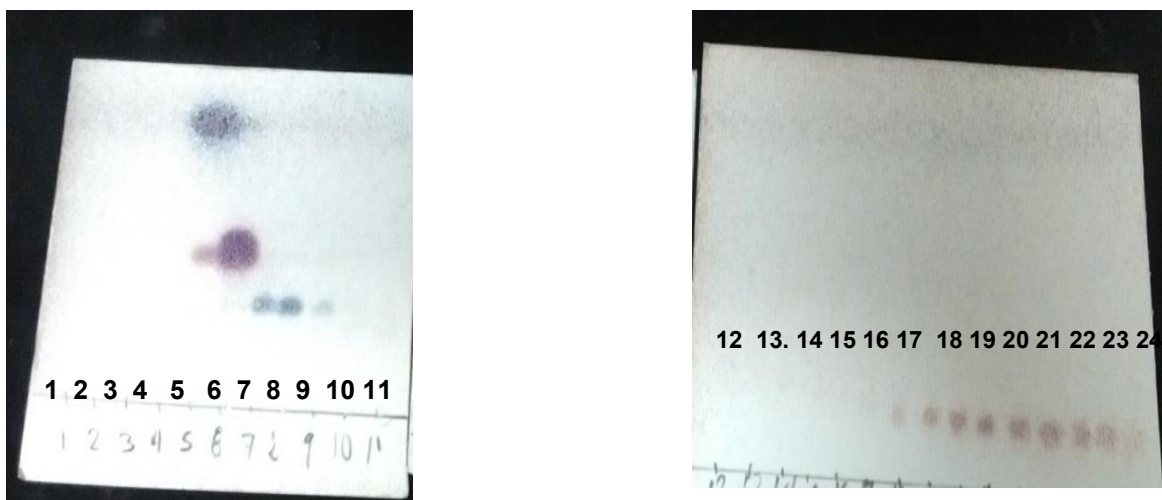


Figura 16. Perfil cromatográfico del extracto A2. Las bandas 18-24 corresponden al compuesto alcohol patchoulínico.

Analisis espectroscópico.

Resonancia magnetica de protones H¹.

El análisis del espectro de RMN-H¹ del compuesto aislado permitió observar diversas señales correspondientes a más de un compuesto. Sin embargo, se pudieron identificar las señales características del alcohol patchoulínico, las cuales se enlistan en la tabla 16 y la figura 17.

Tabla 16. Señales correspondientes al alcohol patchulínico ^1H .

^1H reportado (Berger y Sicker, 2009)	<i>H. mociniana</i>
1.45	1.45
1.20	1.19
1.72, 1.49, dd, J=5.75, 12.75	1.72, 1.49
1.85, 1.06	1.8, 1.06
1.48, 1.38	1.49, 1.38
1.97	1.97
1.07	1.06
1.50, 1.29	1.49
1.87, 1.26	1.26
1.09	1.06
0.85	0.85
0.80	0.80

Aunque en el espectro de resonancia se pudieron identificar otras señales de protones, la similitud en las señales así como el espectro de masas obtenido, permiten confirmar la presencia de alcohol patchulínico en el aceite del extracto A2. Este compuesto además de otros de estructura similar son los compuestos mayoritarios de los aceites esenciales de *H. mociniana*.

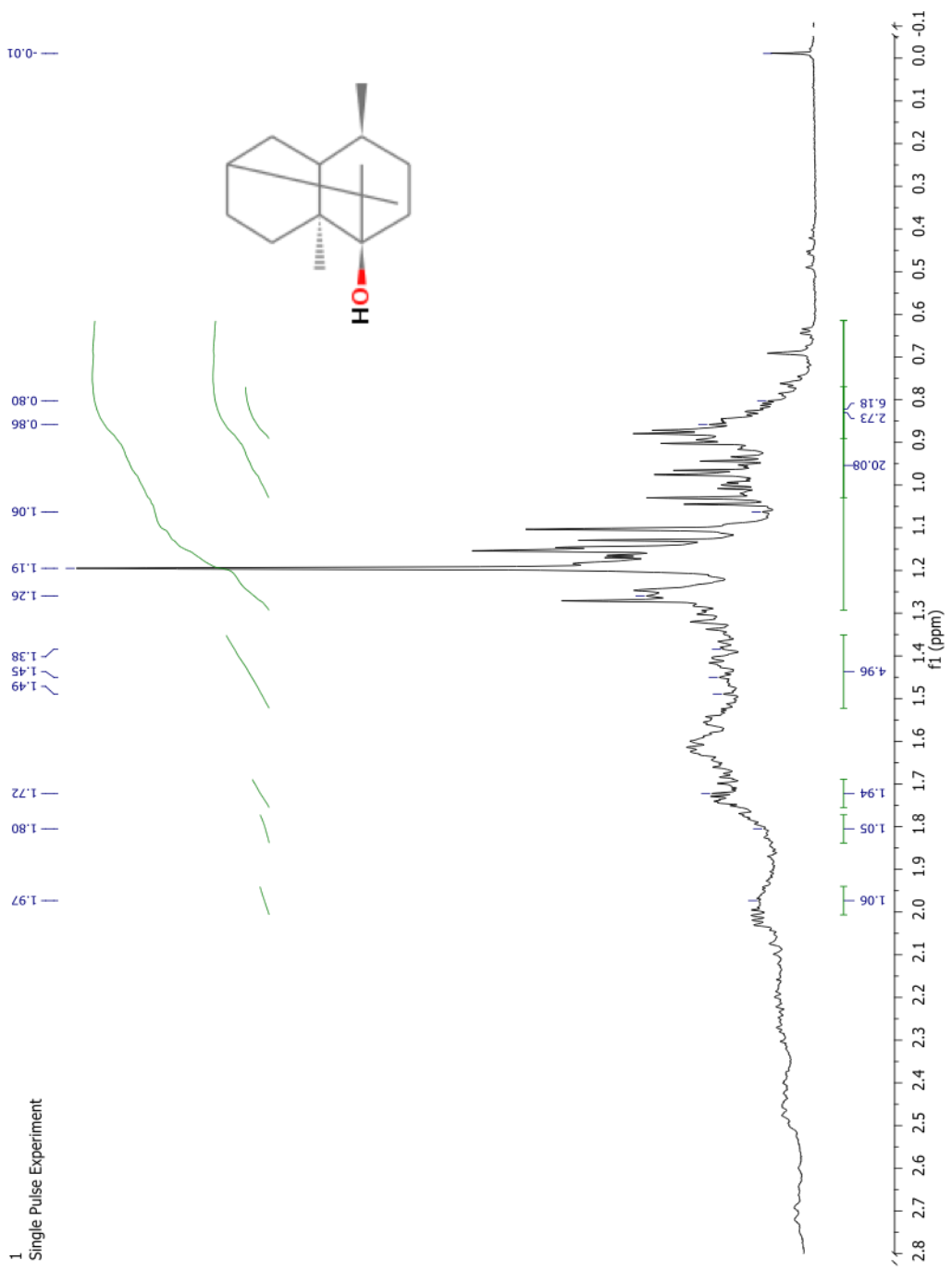


Figura.17. Espectro de RMN- ^1H del alcohol patchoulnico.

En el espectro de resonancia de C¹³ también hubo evidencia de que la muestra no se encontraba pura, sin embargo la revisión de las señales con base a lo reportado en la literatura permitieron identificar las señales características del alcohol patchoulínico en la muestra analizada (Tabla17) (Figura18).

Tabla 17. Señales de C¹³ del alcohol patchoulínico.

C¹³ literatura (Berger, Sicker, 2009)	<i>H.mociniana</i>	Tipo de carbono
75.7	74.19	C _q
43.8	44.23	CH
40.2	40.84	C _q
39.2	39.62	CH
37.7	37.09	C _q
32.7	32.13	CH ₂
28.9	28.74	CH ₂
28.6	28.53	CH ₂
28.2	28.01	CH
26.9	26.93	CH ₃
24.6	24.84	CH ₂
24.4	24.83	CH ₂
24.3	24.01	CH ₃
20.7	20.78	CH ₃
18.6	17.84	CH ₃

Trabajos anteriores centrados en el aislamiento del alcohol patchoulínico mencionan que la purificación de este compuesto presenta diversas complicaciones, debido a que en las fracciones en donde este compuesto es arrastrado, se ha reportado que existe la presencia de otros sesquiterpenos de estructura similar como la pachulenona, el norapachoulenol, nortetrapachoulenol,

β -patchouleno, α -guajeno, α -bulneseno. Todos estos compuestos presentan similitudes estructurales con el alcohol patchoulínico, con índices de retención similares debido a esto se complica su purificación, por lo que se requieren análisis de masas y RMN para confirmar su identidad (Berger y Sicker, 2009).

Por último, la importancia del alcohol patchoulínico para *H. mociniana* radica en que la elevada concentración de este compuesto sirve para hacer frente al ataque de algunos insectos. Zhu y colaboradores en 2003 reportaron que el alcohol patchoulínico es tóxico para la especie de termita *Coptotermes formosanus* provocando daño estructural en tejidos; además, presenta efecto repelente sobre estos insectos.

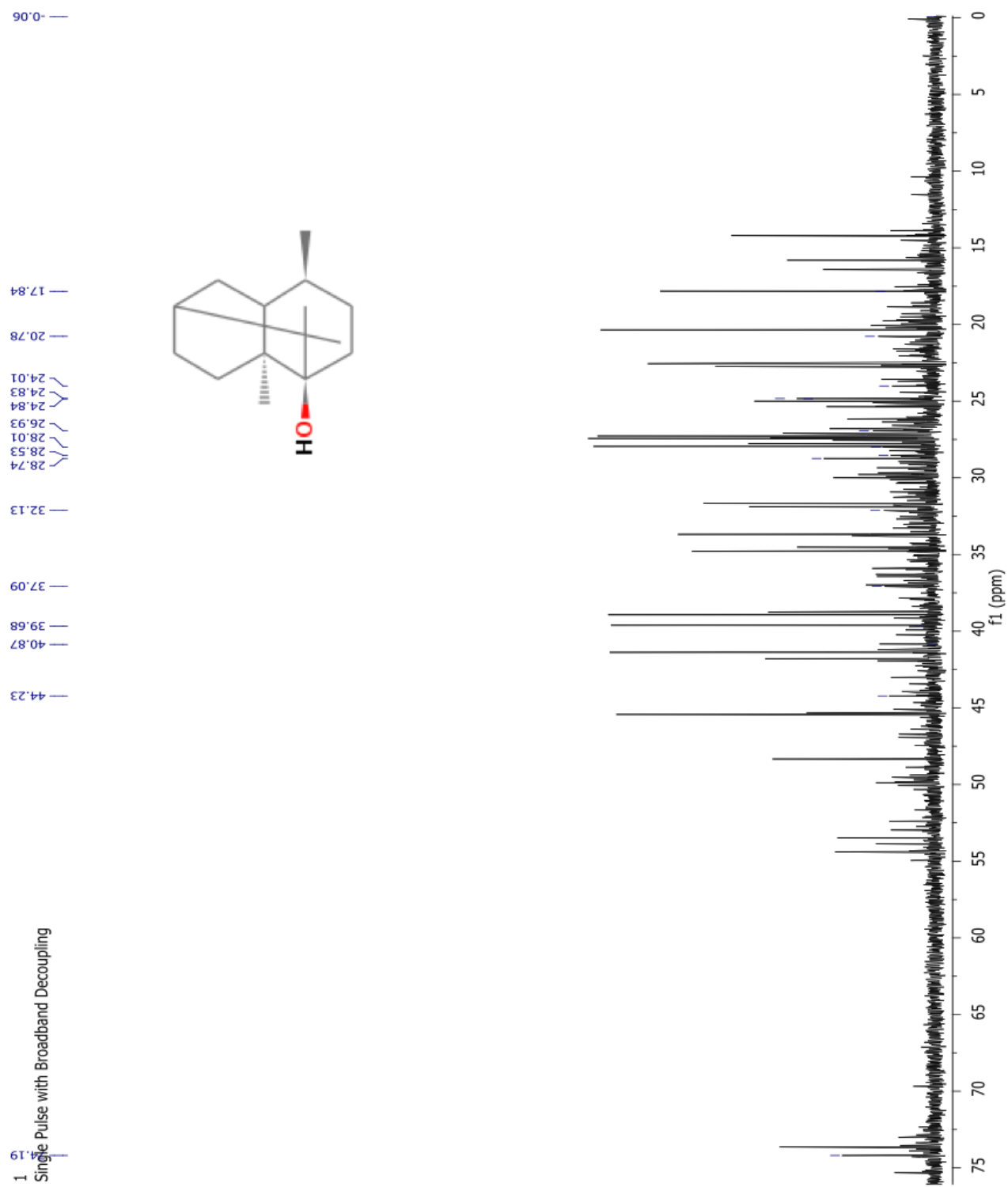


Figura 18. Espectro de RNM C¹³ del alcohol patchoulínico.

Análisis químico de los extractos hexánicos de la parte aérea de *H. mociniana*.

El análisis por CG-EM de los extractos hexánicos de la parte aérea de *H. mociniana* reveló que existen diferencias en cuanto al número de compuestos mayoritarios en cada uno de los extractos obtenidos (Tabla 18).

Tabla 18. Compuestos presentes en los extractos hexánicos de *H. mociniana*.

Extracto	Número de compuestos	Tipo de compuestos
H1	7	Sesquiterpenos
H2	8	Sesquiterpenos
H3	9	Sesquiterpenos

En cuanto al tipo de compuestos se puede observar que en todos los casos son sesquiterpenos, siendo el cariofileno el de mayor abundancia en las tres colectas (Tabla 19).

Tabla 19. Porcentaje de abundancia de los principales compuestos presentes en los tres extractos hexánicos de *H. mociniana*.

Compuesto	% de abundancia		
	H1	H2	H3
Cariofileno	11.68	8.61	12.05
D-germacreno	11.02	7.7	10.46
α -cariofileno	2.71	2.79	2.02
copaeno	1.41	1.46	2.93
isoleveno	0.82	-	-
β -bourboneno	0.73	-	-
α -cubeneno	0.18	-	-
β -elemeno	1.42	-	-
α -selineno	-	4.16	3.58
isocariofileno	-	3.79	-
espátulenol	-	3.39	1.51
α -amorfenol	-	0.53	-
aromadendreno	-	-	0.6
α -cadineno	-	-	0.44
δ -selineno	-	-	0.21

De acuerdo a lo que se observa en la figura 19 existen variaciones en la diversidad de síntesis de sesquiterpenos de *H. mociniana* en las tres épocas de colecta, aunque se puede apreciar que los 4 compuestos mayoritarios se presentan en las tres épocas de colecta, teniendo variaciones considerables en su concentración, sobre todo en octubre de 2015 (Figura 19).

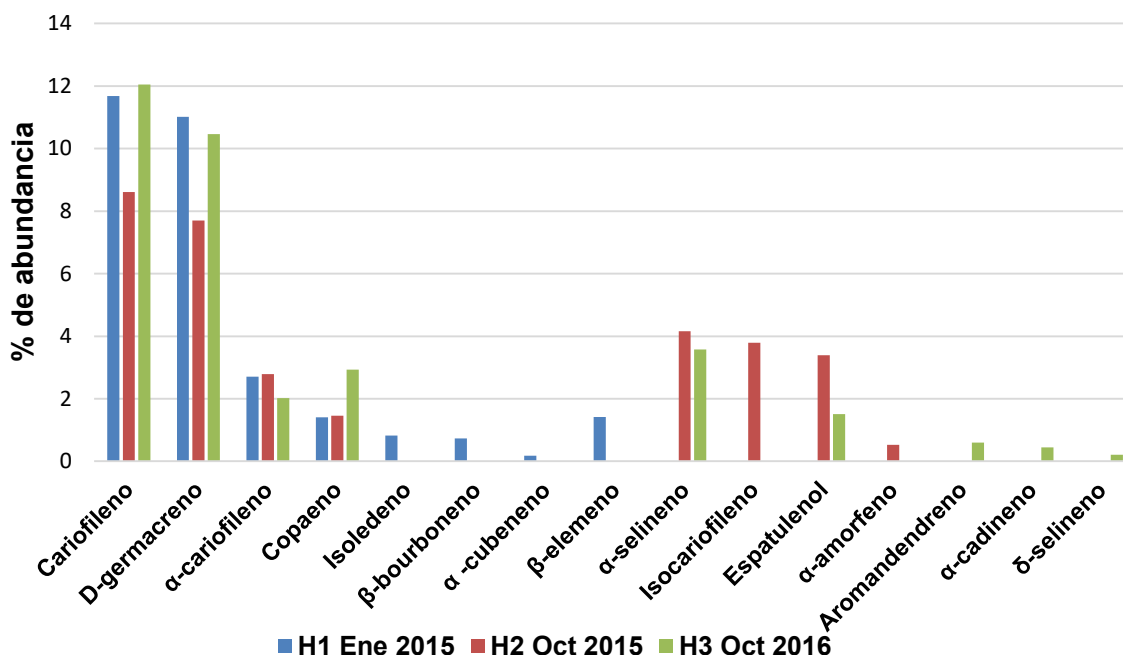


Figura 19. Variación de los compuestos presentes en los extractos hexánicos de *H. mociniana*

La diversidad de los compuestos detectados en los extractos hexánicos puede ser un indicativo de que los sesquiterpenos identificados para *H. mociniana* son producidos con el fin de evitar la herbivoría y la germinación de semillas de plantas competidoras. Como se mencionó antes, el cariofileno, el α-cariofileno y el copaeno presentan actividad alelopática, mientras que el D-germacreno es un compuesto con actividad repelente de insectos (Røstelien et al., 2000). También se puede observar que *H. mociniana* sintetiza uno o varios isómeros de los compuestos mayoritarios, ejemplo de esto es el cariofileno del cual se identificaron además α-cariofileno e isocariofileno, α, β y δ selineno. La síntesis de éstos

metabolitos es de manera diferencial, pues mientras el α -selineno se produjo sólo en la época de lluvias de 2015, los otros dos isómeros se detectaron tan solo en la temporada de lluvias de 2016 (Tabla 19).

Analisis químico del extracto de diclorometano D1.

El fraccionamiento del extracto D1 permitió obtener un total de 289 alícuotas que se agruparon en 44 fracciones con base a su patrón cromatográfico en placa fina. Las fracciones con mayor rendimiento, se analizaron mediante CG-EM, HPLC-DAD, IR y EEDx (Tabla 20). Cabe mencionar que de la fracción 6 se obtuvo un precipitado, su análisis se describirá posteriormente.

Tabla 20. Fracciones con mayor rendimiento obtenidas del extracto D1 de *H. mociniana*.

Fracción	Alícuotas	Sistema de eluyentes	Rendimiento (mg)	Análisis
3A	22-27	7:3AcOEt	50	CG-EM
3B	28-31	7:3 AcOEt	7	
3F	41	7:3 AcOet	46	
4A	46-52	6:4 Hexano/ AcOEt	50	CG-EM
4B	52-60	6:4 AcOEt	50	CG-EM,IR
4C	61-67	6:4 AcOEt	29	CG-EM
4D	67-70	6:4 AcOEt	54	CG-EM
6	116*	9:1 AcOEt	773	IR, EEDx
7E	224-241	100 AcOEt	234	HPLC-DAD
*Presencia de precipitado				

CG-EM.

Los resultados obtenidos mediante el análisis por CG-EM a las fracciones de menor polaridad del extracto DM1 indican la presencia de compuestos como: sesquiterpenos y flavonas los cuales se describen a continuación.

Sesquiterpenos.

a) Espatulenol.

Este sesquiterpeno hidroxilado fue identificado en la fracción 3B del extracto D1 con un porcentaje de abundancia de 0.23 %. Los resultados obtenidos por CG-EM permiten corroborar la presencia de este compuesto en todas las épocas de colecta. Este resultado complementa lo obtenido en el análisis de CG-EM de los aceites esenciales y extractos hexánicos, donde también se identificó. En la figura 29 del anexo 4 se puede observar el espectro de masas obtenido mostrando el ion molecular (m/z 220) y su patrón de fragmentación.

b) Óxido de cariofileno.

Este sesquiterpeno fue detectado en la fracción 4C del extracto D1, se puede observar el espectro de masas de este compuesto en donde se identifica el pico correspondiente al ion molecular (m/z 220) (Anexo 4, figura 30). También se presentó en los aceites esenciales y extractos hexánicos de la planta. El cariofileno es un compuesto que se ha reportado en otras especies como *H. suaveolens* (Andrade et al., 2017) e *H. maritunii* (Caldas et al., 2011). Estudios previos le atribuyen propiedades antioxidantes y antiulcerogénicas. Como se mencionó con anterioridad existe la posibilidad de que el óxido de cariofileno actúe como agente alelopático, inhibiendo la germinación de semillas de otras plantas que podrían representar competencia por los recursos disponibles en la zona de colecta (Fischer, 1991).

Fitoesteroles.

γ -sitosterol.

El γ -sitosterol fue identificado en la fracción 4C del extracto D1, con un porcentaje de abundancia de 33.09% (Tabla 20). Esta abundancia puede deberse a que esta sustancia forma parte de las membranas celulares de las plantas. En el anexo 4 figura 31 se puede observar el patrón de fragmentación de este compuesto.

Estigmasterol.

Otro de los esteroides que se identificaron en el extracto D1 fue el estigmasterol, este compuesto se presentó con una abundancia del 15.09 % en la fracción 4F. En la figura 32 del anexo 4 se reporta su patrón de fragmentación, se puede observar el pico metaestable (m/z) 55 y el ion molecular (m/z) 412.

La elevada concentración de fitoesteroides en las fracciones 4C y 4D, se puede deber a que estos compuestos forman parte de los lípidos de membrana celular, de manera análoga al colesterol en animales. Muchos estudios mencionan que existen acumulaciones de hasta 1 μg de fitoesterol por cada mg de proteína en muestras vegetales. Algunos otros organelos como las mitocondrias y los cloroplastos también presentan concentraciones altas de estos compuestos, aunque son bajas en comparación con la membrana plasmática. Además, de lo mencionado anteriormente se ha reportado que estas sustancias funcionan como reguladores del crecimiento; así la ausencia de estos compuestos puede derivar en el retraso del crecimiento de las plantas (Goad, 1991).

Por último, cabe mencionar que se han reportado diversas actividades de interés terapéutico para los fitoesteroides. En el caso del estigmasterol, presenta actividad anticancerígena, y antiinflamatoria (Antwi et al., 2017). Gabay et al., 2010 demostraron que el estigmasterol disminuye los efectos de la artritis a través de la inhibición de la expresión y supresión de la liberación de la prostaglandina E2 PGF2. En el caso del γ -sitosterol se ha reportado que presenta propiedades antidiabéticas. Incluso un estudio de docking molecular ha mostrado que es un buen ligando de algunas proteínas relacionadas con la diabetes, tales como glucosinasas, fructosa 1,6 fosfatasa y citocromo P450 (Balamurugan et al., 2012).

Flavonas.

El análisis por CG-EM permitió identificar en las fracciones 4C y 4D la 5-hidroxi-7', 4'-dimetoxiflavona, con una abundancia de 15.28 y 20.72 % respectivamente. En la figura 20 se muestra el espectro de masas de este compuesto.

Abundance

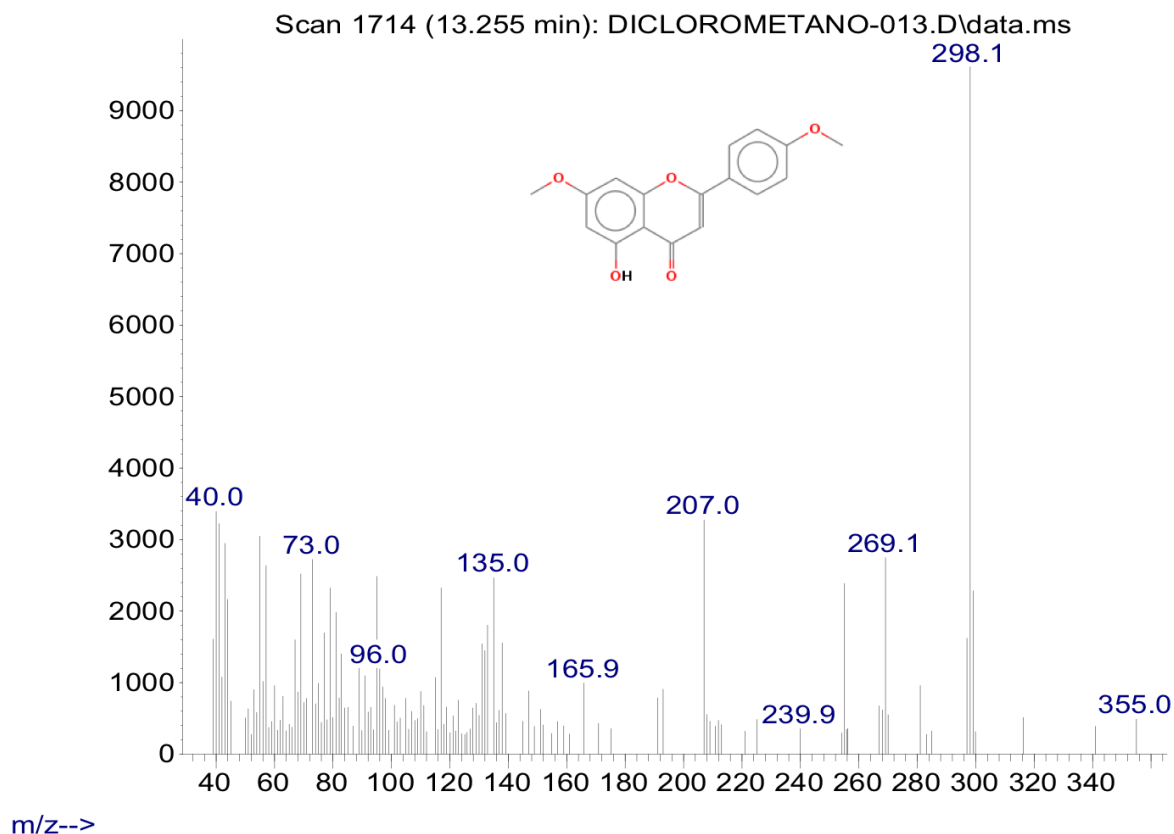


Figura 20. Espectro de masas de la 5-hidroxi-7', 4'- dimetoxiflavona.

El espectro de masas obtenido para esta flavona coincide con lo reportado en la base de datos de NIST y por Flores en 2016 para el mismo compuesto de *H. pectinata*. Este es el primer reporte de la 5-hidroxi-7', 4'-dimetoxiflavona para la especie *H. mociniana*. Esta flavona, debido a su estructura presenta actividad antioxidante y actividad fotoprotectora frente a la RUV (Afaq y Katiyar, 2011). *H. mociniana* se encuentra expuesta durante la mayor parte del día a la radiación

solar por lo tanto es necesaria la síntesis de compuestos que puedan aminorar los efectos de esta radiación sobre la planta, proporcionando protección contra el estrés lumínico. Este compuesto ha sido reportado con anterioridad en otras especies de la familia Lamiaceae tales como *Salvia* (Habibi et al.,2011) e *H. pectinata* (Flores, 2016).

Fracción 6: Precipitado 1.

Espectroscopía IR.

El precipitado obtenido de la fracción 6 del extracto D1 fue un polvo de color blanco ligeramente amarillento, presentó un punto de fusión superior a los 300°C y es soluble en mezclas de diclorometano/metanol 1:1. Los resultados obtenidos en las distintas pruebas coloridas utilizadas dieron resultados negativos, con excepción al revelado con sulfato cérico, en donde se pudieron observar dos bandas de coloración rosa (Figura 21), por lo cual el precipitado fue sometido a un análisis por espectroscopia IR con el fin de obtener información sobre los grupos funcionales que conforman su estructura. En la figura 21 y la tabla 21 su muestra el espectro obtenido y las señales asignadas a los grupos funcionales presentes en este analito.

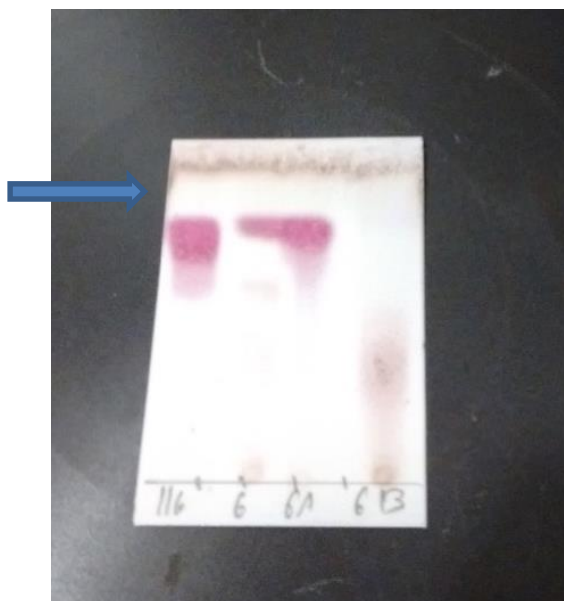


Figura 21. Revelado con sulfato cérico de la fracción 6 y el precipitado 1.

Tabla 21. Señales del espectro IR del precipitado 1.

Señal cm^{-1}	Grupo funcional
1602	C=O
1357	C-O

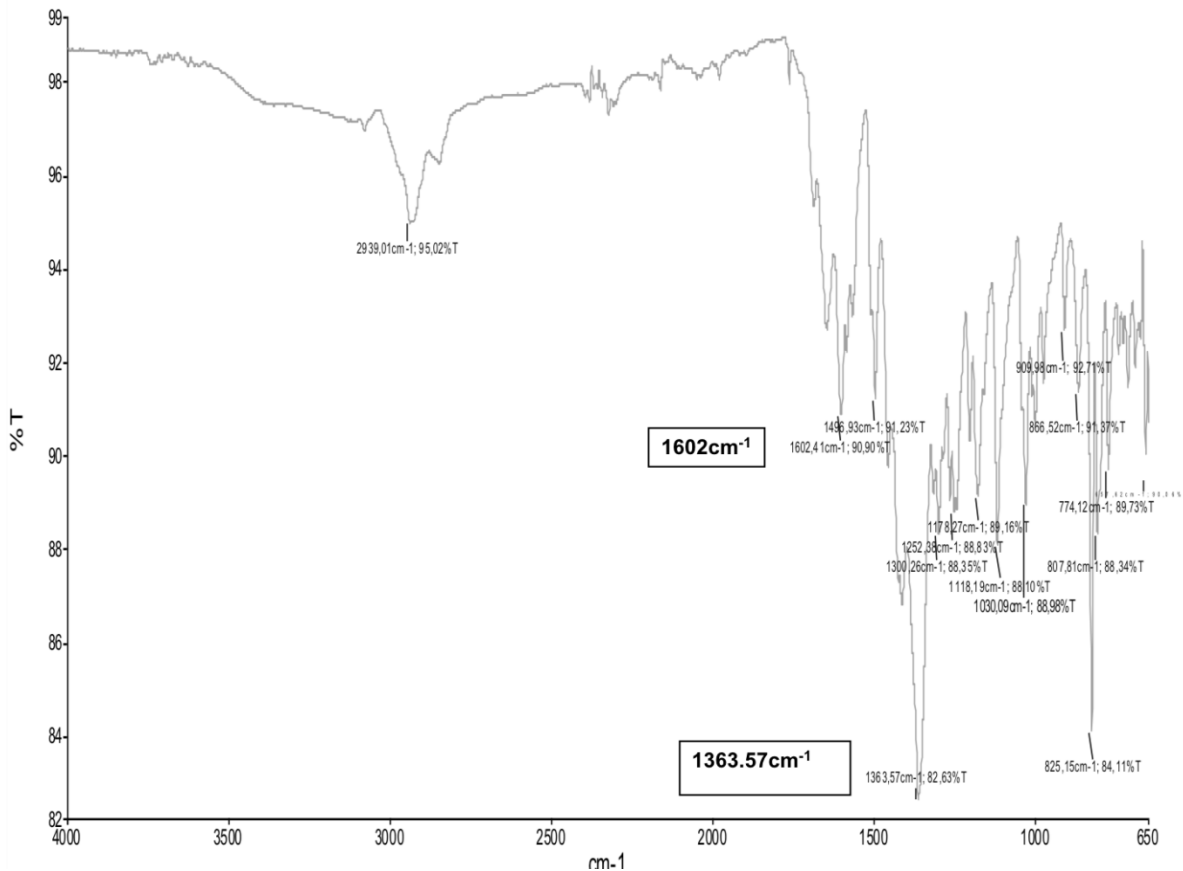


Figura 22. Espectro de IR del precipitado obtenido de la fracción 6.

Espectrometría de energía dispersiva EDDx del precipitado 1 fracción 6.

Debido a que el punto de fusión del precipitado 1 fue mayor a 300°C y además no presentó señales de C-H en espectro de IR (figura 22), se dedujo que era un compuesto con características propias de una sal; por este motivo se sometió a espectrometría por energía dispersiva (EDDx), los resultados obtenidos se muestran en las tabla 22 y la figura 23.

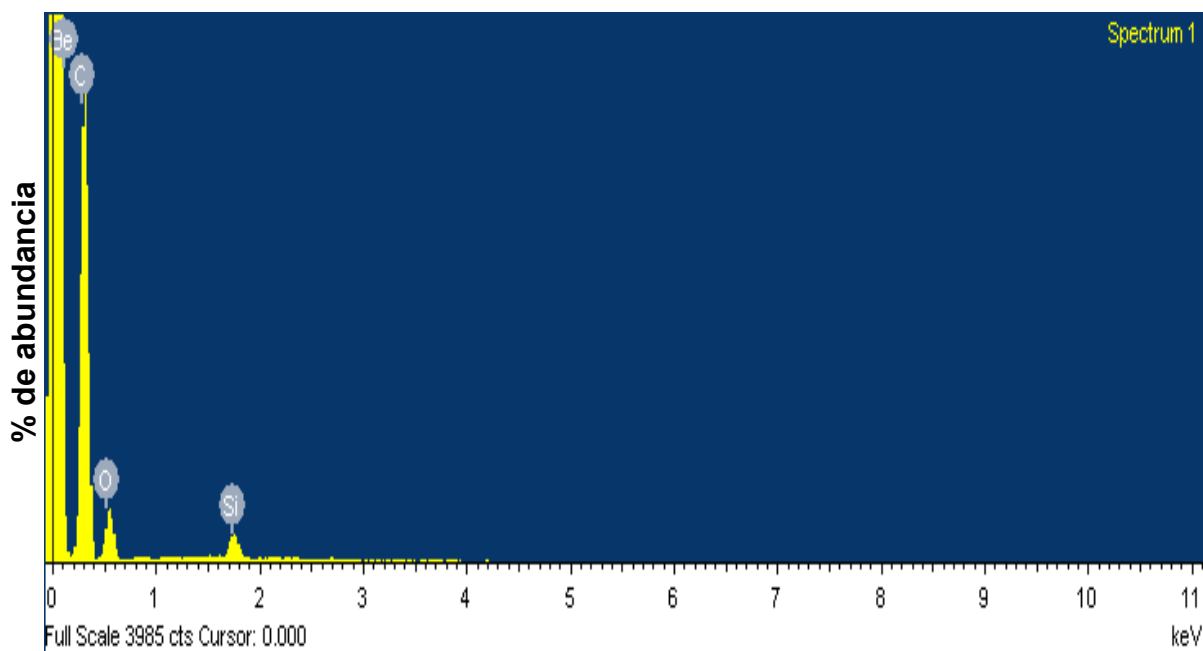


Figura. 23. Espectro de energía dispersiva del precipitado, fracción 6 extracto D1.

Tabla 22: Porcentaje de los iones que constituyen al precipitado 1, fracción 6.
Señales del espectro EDDx.

Elemento	Porcentaje de abundancia
C	26.83
O	72.38

El precipitado 1 está compuesto por Carbono-Oxígeno y una proporción menor de silicio-oxígeno esto corresponde a sales de carbonato. Lo anterior puede indicar que *H. mociniana* es una especie que acumula grandes cantidades de carbonatos en su parte aérea, ya que este precipitado tuvo un rendimiento de 720 mg correspondiente al 10 % del extracto. También fue detectado en las fracciones consecutivas, por lo tanto el rendimiento podría ser superior de lo que se pudo aislar de la fracción 6. Aunque existe un reporte previo de caracterización química de extracto clorofórmico de *H. mociniana* (Leal, 2014), la presencia de carbonatos en el extracto de D1 es algo que se reporta por primera vez en esta especie.

Las plantas disponen de diversos mecanismos de absorción de iones o metales del suelo a través de la raíz, sobretodo en vegetales adaptados a entornos donde hay grandes acumulaciones de estos compuestos, con lo cual contribuyen a regular los niveles de pH del suelo. Esto puede relacionarse con lo mencionado por Sharma et al., 2017 sobre los efectos producidos por la especie *H. suaveolens* sobre la flora nativa de India. La invasión de estos organismos provoca cambios en la conductividad y pH del suelo de las zonas que coloniza, lo cual tiene efectos en la abundancia de las especies que se distribuyen en determinadas regiones. Otros trabajos mencionan que la presencia de carbonatos en las plantas obedece a una estrategia de incorporación de carbono y oxígeno para potenciar la producción de azúcares, complementando la absorción de estos elementos en el ciclo de Calvin, lo anterior propicia un rápido desarrollo en estas especies, lo cual es característicos de malezas ruderales lo que posibilita su éxito en el establecimiento en nuevos ambientes o nichos (Stolwij y Thimann, 1957).

Caracterización química del extracto M1

Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta

Debido a la presencia de compuestos de distinta polaridad del extracto metanólico de *H. mociniana* se obtuvieron particiones con diferentes solventes, para poder realizar el fraccionamiento de la partición metanólica en una columna abierta para de separar los compuestos mayoritarios presentes en ella. En la tabla 23 se enlistan las particiones obtenidas del extracto metanólico así como su rendimiento.

Tabla 23. Fraccionamiento con solventes de diferente polaridad del extracto M1 de *H. mociniana*. Particiones obtenidas a partir de 15 g de extracto.

Partición	Rendimiento
Hexano	200 mg
Diclorometano	1.5 g
Metanol (PM1)	11.5 g
Agua	3.6 g

Fraccionamiento de la partición PM1

Una vez obtenidas las particiones de diferente polaridad del extracto M1 se eligió la partición metanólica, ya que presentó el mayor rendimiento y diversidad de constituyentes en un análisis previo por cromatografía en capa fina. El fraccionamiento mediante cromatografía de PM1 permitió obtener un total de 172 alícuotas, que a su vez se agruparon en 7 fracciones de acuerdo al patrón exhibido en el análisis de cromatografía en capa fina (Figura 24). En la tabla 25 se enlistan las fracciones con su porcentaje de rendimiento.

Tabla 24 Fraccionamiento por columna abierta de la partición metanólica del extracto M1 de *H. mociniana*.

Fracción	Fracciones agrupadas	Sistema de eluyentes	Rendimiento (g)
S1	1	Acetona 100%	1.13
S2	2-5	Acetona/Metanol 9:1	0.52
S3	6,7	Acetona/ Metanol 9:1	0.100
S4	8-11	Acetona/ Metanol 85:15	1.020
S5	12-14	Acetona/ Metanol 6:4	0.860
S6	15-19	Metanol 100%	0.340
S7	20	Agua 100%	1.3

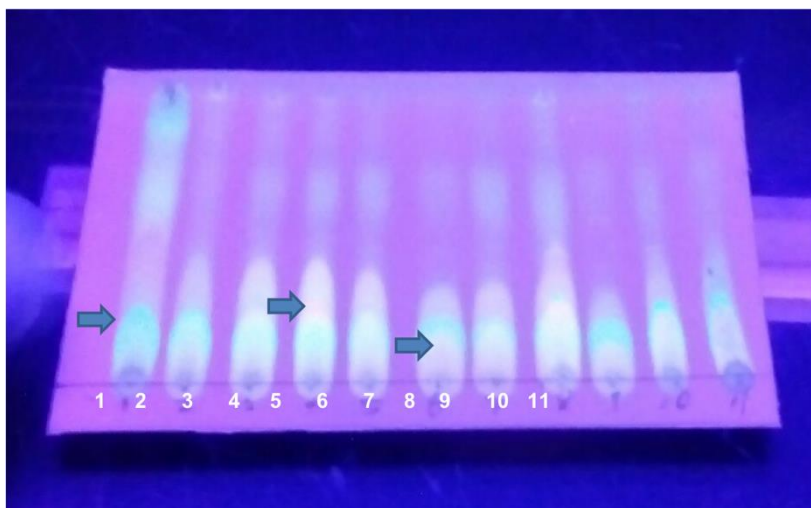


Figura 24. Patrón cromatográfico de la partición metanólica del extracto M1 (Fracciones de mayor abundancia). Presencia de ácidos hidroxicinámicos: bandas azules, flavonoides: bandas color naranja. Revelado con revelador de productos naturales (Wagner, 1996).

Debido a la similitud exhibida en la cromatografía de capa fina de las fracciones de menor polaridad, se decidió agruparlas para analizarlas por HPLC/EM (Figura 24).

Cromatografía de líquidos de alta resolución con arreglo de diodos (HPLC-DAD). Fracciones S1 y S4.

El análisis por HPLC-DAD de las fracciones S1 y S4 que fueron las que presentaron el mayor rendimiento de la partición metanólica del extracto M1 reveló que presentan un total de 11 y 5 constituyentes respectivamente. El barrido en la región UV proporcionó información sobre las características de los compuestos que las conforman, debido a que estos se excitan en longitudes de onda correspondientes a las regiones que van de los 252 nm hasta los 360 nm. El patrón de absorción en el espectro UV es característico de flavonoides, debido a que tienen dos anillos aromáticos en su estructura, los cuales tienen un pico máximo de absorción entre los 240 a los 285 nm, y está presente en todos los tipos de flavonoides. El segundo máximo de absorción se presenta en el rango de los 300 nm a los 550 nm y deriva del patrón de sustitución y la conjugación del anillo C. Los sustituyentes simples como los grupos metilo, metoxilo y grupos hidroxilo no disociados solo generan cambios menores en los máximos de absorción (Waksmundzka et al, 2011) (Markham, 1991) (Tabla 25).

Tabla 25. Principales constituyentes de las fracciones aisladas del extracto de la partición M1.

No de constituyente	Fracción S1	Abundancia %	λ de absorción	No de constituyente	Fracción S4	Abundancia %	λ de absorción
1	2.407	17.622	252,330	1	2.43	24.019	284,334
2	2.579	8.343	286,236	2	3.204	49.092	286,332
3	2.695	4.475	290,330	3	4.13	14.975	250,338
4	2.918	0.09	288,320	4	5.237	1.4	268,346
5	3.333	22.274	288,332	5	5.635	6.2	270,350
6	3.484	26.09	290,360				
7	3.831	6.511	282,332				
8	4.544	3.713	290,328				
9	5.708	8.796	290,310				
10	6.214	1.579	268,290				
11	8.664	0.508	268,340				

Cromatografía en placa preparativa de la fracción S4.

Con el fin de aislar e identificar los compuestos presentes en la fracción S4, ésta se separó en placas preparativas. Un total de 4 bandas se sometieron a un análisis de HPLC-EM, de las cuales las más abundantes fueron la 2 (26 mg) y 3 (15 mg). Dicho análisis mostró que ambas son mezclas. La banda 2 tiene al menos 7 constituyentes mientras que en la banda 3 se detectaron 5 (Tabla 26).

El análisis por HPLC-EM aplicado a las bandas 2 y 3 mostró que ambas son mezclas de compuestos (Tabla 27 y 28). La banda número 2 de la cromatografía presentó el mayor número de constituyentes de las dos analizadas, con un total de 7. En la tabla 27 se presentan los constituyentes que se encontraron en esta banda 2, los cuales presentaron índices de retención muy similares, que se pueden observar de manera notoria entre los constituyentes 1-2; 3-4 y 5-6.

Tabla 26. Constituyentes detectados en la banda 2. (*) Estándar de Orientina.

Constituyente	Tiempo de retención	Ion molecular (m/z)	Abundancia
1	2.42	315.05	13831.56
2	5.94	387.14	15039.61
3	16.43	609.12	18856.3
4	18.025	679.34	553.43
5	26.94	679.34	107145.09
6	27.58	525.21	44726.42
7	37.79	481.23	96367.06
Estándar (Orientina)	15.02	447.07	367.09*

En cuanto a la banda 3, el análisis por HPLC-EM mostró que contiene 5 constituyentes y que sus índices de retención son muy similares entre ellos (Tabla 27).

Tabla 27. Constituyentes detectados en la banda 3. (*) Estándar de Orientina.

Constituyente	Tiempo de retención	Ion molecular(m/z)	Abundancia
1	34.89	265.13	192662.5
2	35.14	297.13	324953.9
3	36.09	311.15	1226257
4	37.10	325.16	1254889
5	38.06	339.18	825486.4
Estándar (Orientina)	18.19	447.07	1582.96*

Resumen del fraccionamiento de la partición PM1.

El fraccionamiento de la partición PM1 del extracto M1 mostró que esta es una mezcla compleja conformada por un gran número de constituyentes, como se pudo observar en el análisis por HPLC-DAD y HPLC-MS. Los índices de retención obtenidos en este último análisis, los valores de absorbancias en el espectro UV y los pesos moleculares mostrados, indican que *H. mociniana* produce diversos compuestos de tipo flavonoide y sus derivados. En la tabla 28 se pueden comparar algunos de estos parámetros con flavonoides de referencia.

Tabla 28. Comparación de los pesos moleculares de algunos de los constituyentes de las bandas 2 y 3, de la fracción S4 de la PM1. * datos obtenidos de Webbook NIST. 2018, **datos obtenidos de PubChem, 2018.

Constituyente	Banda	Masa molecular	Compuesto de referencia	Masa molecular
1	3	265.13	Apigenina	270.24*
2	3	297.13	Fisetina	286.239**
3	2	315.05	Miricetina	318.23**
4	2	679.34	Rutina	664.5*

Como se puede observar en la tabla 28 los pesos moleculares de los constituyentes que se encuentran en el rango de 270 a 320 m/z son característicos de flavonas simples, mientras que pesos moleculares mayores a 400 m/z corresponden a compuestos glicosilados que pueden presentar uno o dos azúcares en su estructura (Rutina), por lo cual la polaridad y abundancia de estos compuestos dificultarían la separación de los mismos por medio de técnicas como la cromatografía en columna abierta y/o preparativa.

Análisis de la variación de compuestos en los extractos metanólicos.

El análisis por HPLC-DAD permitió detectar los diferentes constituyentes que conforman a los extractos de *H. mociniana*. Sin embargo, a diferencia de lo observado con los aceites esenciales y extractos hexánicos no existen diferencias en cuanto a la producción de compuestos, y se detectaron 8 en los extractos M1 y M2, mientras que en el M3 son 7 (Tabla 29).

Tabla 29. Principales constituyentes de los extractos metanólicos de *H. mociniana*.

Constituyente	M1 Tiempo de retención	λ_{max}	%Abundancia
1	2.41	284,328	27.18
2	3.29	252,290,334	60.13
3	5.57	202,230,290	3.93
4	6.14	202,270,326	4.78
5	8.5	204,288,326	2.47
6	12.95	206,254	0.712
7	15.79	254,338	0.56
8	18.12	206,254	0.214
Constituyente	M2	λ_{max}	%Abundancia
1	2.40	288,336	27.67
2	3.3	252,336	22.76
3	3.49	254 288 334	39.05
4	5.70	288,314	5.03
5	6.67	210,324	3.36
6	13.22	228	0.089
7	16.037	20,216	0.284
8	18.42	220,284	0.1
Constituyente	M3	λ_{max}	%Abundancia
1	2.4	282,332	14.56
2	2.56	286,330	8.9
3	3.25	254,336	40.5
4	3.45	284,332	29.05
5	4.56	292,334	5.57
6	5.75	288,314	0.35
7	6.679	286,338	1.04

Aunque no se logró identificar ningún compuesto conocido mediante este análisis, es evidente que los compuestos mayoritarios de los extractos metanólicos son los que presentan el tiempo de retención correspondiente a 3.29, 3.3 y 3.25 minutos respectivamente (Tabla 29). La similitud en el tiempo de retención de estos constituyentes indicaría que posiblemente se trate del mismo compuesto en los 3 casos. El constituyente que presenta el porcentaje de retención con valores de 2.41, 2.40 minutos presenta valores similares en los extractos M1 y M2 pero aumenta su concentración en el extracto M3. Otra de las variaciones que se pueden observar es con respecto a los compuestos 2 y 3 de los extractos M2 y M3, que presentan un alto porcentaje de concentración y solo se encuentran durante la época de lluvia.

Por otra parte, los componentes de los extractos absorben en el rango que va de los 250 nm a los 338 nm lo que confirmaría la presencia de flavonoides como compuestos mayoritarios en los extractos metanólicos de *H. mociniana*.

Los picos máximos de absorción de los distintos constituyentes que componen a los extractos metanólicos de *H. mociniana* son similares a las que presentan compuestos de tipo flavonoide. La detección de flavonoides en alimentos se hace en un rango de UV-VIS-con HPLC- DAD. Como ya se mencionó todos los flavonoides presentan dos picos de absorción característicos, el primero es de 240-280 nm y corresponde al anillo A, el segundo máximo se ubica en el rango de los 300-380 nm correspondiendo al anillo B (Stefova, et al; 2003). Los sustituyentes simples como metilos y metoxilos generan cambios menores en la absorción máxima.

Como se puede observar en la tabla 29 los extractos M1 y M2 presentan compuestos con absorbancias menores a 285 nm, lo cual sería un indicativo de la presencia de compuestos derivados del ácido hidroxicinámico. Como se vio con anterioridad la composición química del extracto M1 presenta en su mayoría compuestos de tipo flavonoide, y una elevada concentración de al menos dos de ellos (constituyente 1 λ 284, 328 nm y el constituyente 2 λ , 252, 290, 334 nm) los que serían los metabolitos constitutivos sintetizados por *H. mociniana*.

Diversos grupos de polifenoles brindan protección contra la UV-B. Sin embargo, los flavonoides son de los grupos más importantes debido a sus características estructurales. El estrés por radiación UV-B en plantas deriva en una gran cantidad de daños, que pueden provocar disminución del crecimiento de planta por qué la absorción de CO₂ en tejidos maduros, además de la baja en la eficiencia de la enzima RUBISCO (Baker et al., 1997). Otros de los daños relacionados con la actividad fotosintética por exposición a la UV-B es la degradación de pigmentos fotosintéticos en especial los carotenoides (Hoffmann et al., 2015).

La UV-B provoca estrés oxidativo y produce daños directos al DNA, lo que deriva en la formación de fotoproductos conocidos como dímeros de pirimidina ciclobutano (6-4) y fotoproductos de pirimidona; ambos inducen lesiones mutagénicas, las cuales son altamente estables debido que se forman enlaces covalentes (Taylor, 1997). Además de lo anterior, los flavonoides presentan diversas funciones en las plantas: funcionan como agentes antimicrobianos, disuasorios de la alimentación, pueden interactuar con enzimas y proteínas interfiriendo en diversos procesos celulares, lo cual deriva en afectaciones al desarrollo y crecimiento de microorganismos y animales (Harborne y Grayer, 1991). También influyen en el transporte de auxinas lo cual es un mecanismo de regulación de estas hormonas de crecimiento (Taiz, Zeiger, 2015).

Análisis por RMN¹H del extracto M1 y su partición de diclorometano.

Con el fin de confirmar la presencia de flavonoides como compuestos mayoritarios en *H. mociniana*, los extractos metanólicos se sometieron a un análisis por resonancia magnética de protones. En la figura 25 se puede observar el espectro de resonancia de protones obtenido del extracto M1. En el anexo 5 se encuentran los espectros de los extractos M2 y M3 (Figura 33 y 34).

Extracto M1

El espectro de RMN ¹H, del extracto M1 muestra que este presenta señales en campos altos, entre 6.24 y 7.04 ppm correspondientes a los protones de los anillos A y B. En 3.65 y 3.82 ppm se pueden observar señales de OCH₃ (Tabla 31). Los desplazamientos observados confirman la presencia de flavonoides como

compuestos mayoritarios en los extractos metanólicos de *H. mociniana*. Cabe mencionar que estos son similares a los reportados por Williams y Harborne (1994) para la flavona apigenina.

Tabla 31. Señales obtenidas del espectro de RMN ¹H del extracto M1.

Desplazamiento ppm	Interpretación
6.75-7.04	Protones anillos A y B
3.65-3.82	OCH
7.51	OH

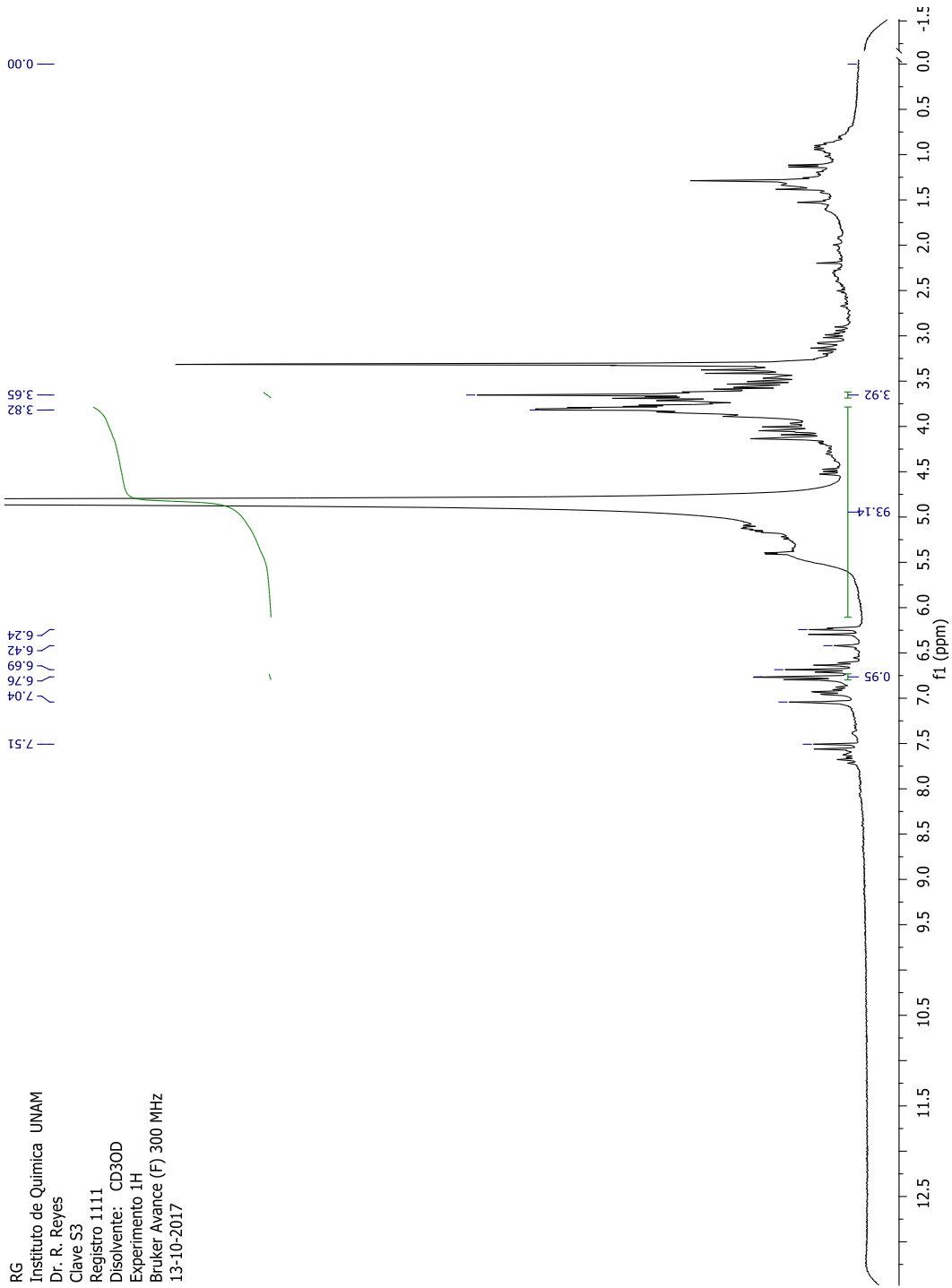


Figura 25. Espectro de RMN ^1H del extracto M1 de *H. mociniana*.

Partición PDM del extracto M1

La partición PDM del extracto M1 también se analizó por medio de RMN ^1H . El espectro revela que entre 1.25 y 1.30 ppm se identificaron desplazamientos característicos de los protones de metilos, así mismo es posible observar señales de grupos OH entre 3.70 y 3.89 ppm y en 5.53 ppm una señal característica de doble ligadura en anillo base, lo que confirmaría la presencia de compuestos de tipo triterpeno (Figura 26). Las señales obtenidas se compararon con las reportadas por Conoolly y Hill en 1991 para diferentes tipos de triterpenos.

Tabla 32. Señales del espectro de RMN ^1H de la petición de diclorometano del extracto M1.

Desplazamiento (ppm)	Interpretación
1.25-1.30	CH ₃
3.70-3.89	OH
5.53	Doble ligadura

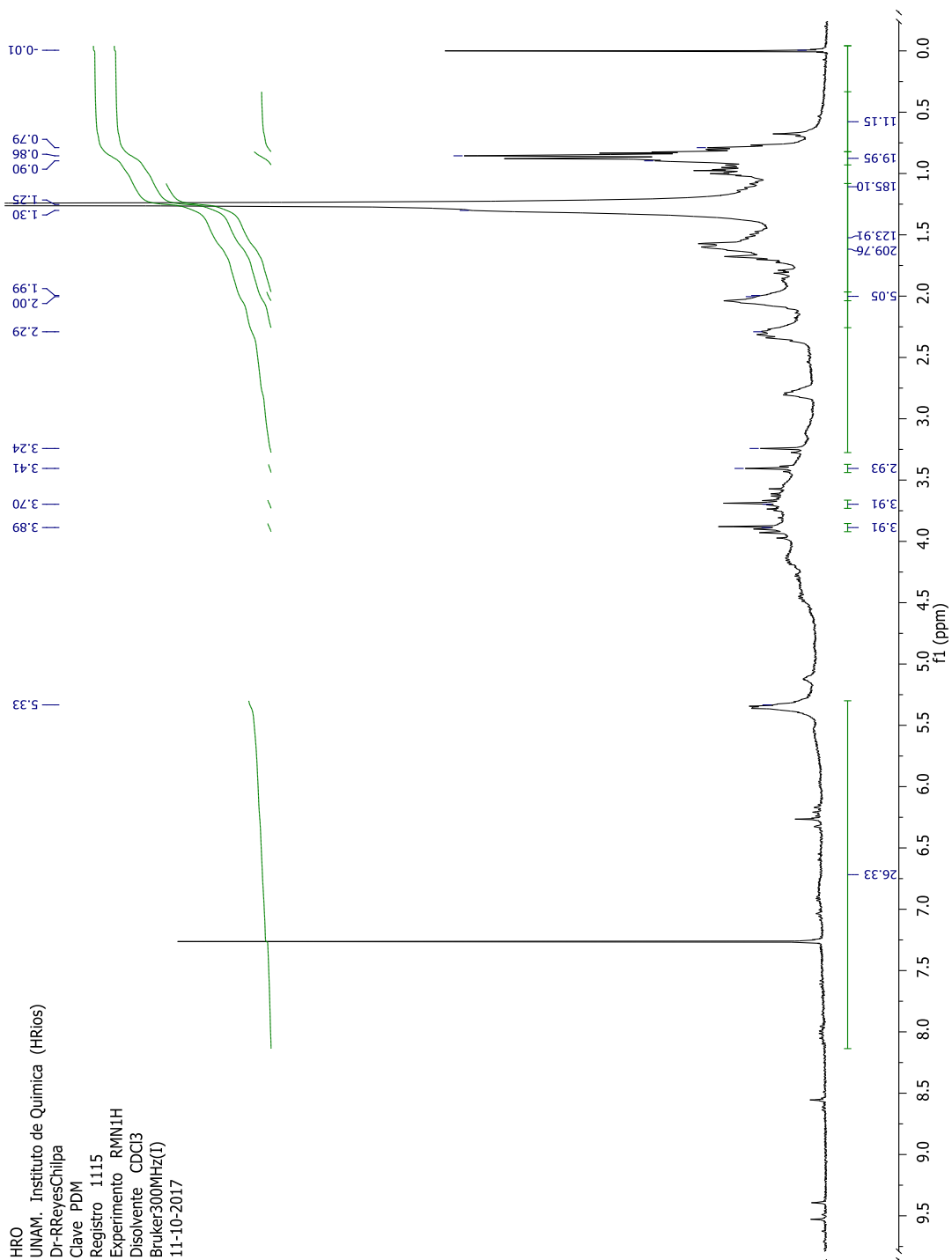


Figura 26. Espectro de ^1H de la partici3n de diclorometano del extracto M1 de *H. mociniana*.

El análisis de la PDM1 comprueba la presencia de triterpenos en el extracto metanólico M1. Estos resultados indican que la composición química de *H. mociniana* es compleja, debido a la diversidad de componentes que pueden interactuar entre sí.

La presencia de triterpenos en los extractos de alta polaridad se puede explicar debido a que los compuestos de mayor polaridad actúan como solventes de éstos, dado que existen interacciones de puente de hidrogeno entre los grupos OH de los compuestos fenólicos y de los triterpenos, ya que en algunos casos compuestos de este tipo pueden presentar hasta dos de estos sustituyentes en su estructura.

Tabla 33. Actividad antimicrobiana de los aceites esenciales A1 y A2 de *H. mociniana*.

Cepa/Extracto	Control positivo (cloranfenicol)	A1	A2
Gram +			
<i>S. aureus</i> 23MR	23.83±1.94	7.6±1.96	15.83±1.6
<i>M. luteus</i> ATCC 10240	19.5±1.37	12.8±1.94	18.3±1.47
Gram-			
<i>E. coli</i>	19.66±1.21	-	-
<i>V. cholerae</i> ATCC36540	28.3±2.58	6.3±0.51	8.5±1.37
Hongos levaduriformes	Control positivo (nistatina)		
<i>C. albicans</i> 17MR	6.6±1.21	-	-
<i>C. glabrata</i>	6.3±1.54	-	-

Los resultados obtenidos en los experimentos de evaluación cualitativa de actividad antibacteriana mostraron que los aceites esenciales de *H. mociniana* presentan actividad sólo en bacterias, mientras que con los hongos levaduriformes y filamentosos, no hubo efecto antifúngico. Como se observa en la tabla 33 los halos de inhibición que se obtuvieron en la prueba de difusión en agar presentan diferencias entre las dos épocas de colecta, siendo de mayor diámetro el obtenido en el mes de octubre de 2015, con respecto a los del A1 . Estas diferencias en la actividad de los aceites se pueden atribuir a una mayor concentración de los compuestos α y β pineno identificados en la segunda etapa de este trabajo, los cuales se sabe presentan actividad antimicrobiana (Da Silva *et al.*, 2017) y

sesquiterpenos como el alcohol patchoulínico del cual se ha reportado actividad sobre bacterias Gram negativa (Chakrapani et al., 2013).

Hongos filamentosos

La ausencia de actividad de todos los extractos de las tres polaridades de *H. mociniana* sobre las cepas de hongos filamentosos, podría relacionarse con dos fenómenos diferentes. Uno de ellos es la resistencia a los compuestos derivados del metabolismo secundario de cada una de la cepas utilizadas en este estudio; tanto *Aspergillus niger* como *Fusarium moniliforme* son especies que se encuentran de manera habitual colonizando diferentes tipos de plantas. A diferencia de las condiciones utilizadas en este estudio, en su medio la respuesta de las plantas para evitar la invasión de estos organismos no depende solamente de los metabolitos secundarios, estos compuestos son parte de dos complejos sistemas conocidos como respuesta hipersensible (HR) y respuesta sistémica adquirida (SAR), que son mecanismos por medio de lo cuales la planta sintetiza y libera una gran variedad de compuestos implicados en la defensa celular, entre los cuales se pueden mencionar: especies reactivas de oxígeno (ERO) y enzimas como proteasas, quitinasas y glucanasas que atacan las paredes celulares de estos patógenos. Además de engrosar sus respectivas paredes celulares, con el fin de evitar la penetración de estos agentes microbianos en las células vegetales, que en conjunto con los metabolitos secundarios brindan protección a la planta sobre los patógenos (De Wit, 2015).

El experimento de inhibición del crecimiento radial en hongos mostró que a una concentración de 5 μ L (3 y 8 mg) los aceites esenciales de las dos temporadas de colecta no tuvieron efecto inhibitor del crecimiento de la cepa de *A. niger*. Pessoa y colaboradores en 2010 menciona que los aceites esenciales la especie *H. suaveolens* presentaron capacidad fungicida media a una concentración de 80 mg, sobre cepas de *A. fumigatus* y *A. parasiticus*. Otros trabajos indican que la presencia de estos hongos permite una mayor absorción de fosforo en las plantas a través de raíz (Awasthi et al., 2011) e incluso Pereira da Silva y colaboradores reporta en 2017 que la especie *A. terreus* es un hongo endófito de la especie *H.*

suaveolens, este mismo autor estudia la producción de compuestos con actividad antiparasitaria y con capacidad antioxidante por parte del hongo. Los hongos endófitos no provocan síntomas visibles en su hospedero sin embargo, son capaces de aumentar o de modificar la producción de compuestos de defensa del mismo, lo que propiciaría un incremento en la resistencia de ambos a las condiciones de estrés (Sánchez et al., 2013). Por lo tanto, es posible que para el caso particular de *H. mociniana*, estos hongos establezcan relaciones simbióticas que conlleven al intercambio de nutrientes entre ellos y la planta, que le permitan hacer frente de manera más eficiente a las condiciones de estrés de la zona donde esta crece.

Evaluación cuantitativa

Los aceites esenciales fueron los que presentaron actividad frente a algunas de las cepas utilizadas en la prueba de dilución en agar; en particular el aceite A2. Por lo tanto se procedió a evaluar de manera cuantitativa la actividad antimicrobiana de este aceite, Los resultados se presentan en la tabla 34.

Tabla 34. Evaluación cuantitativa de los aceites esenciales de *H. mociniana* (A2).
(CMI: concentración mínima inhibitoria, CBM: capacidad bactericida media).

Cepa	CMI mg/mL	CBM mg/mL
<i>S aureus</i> 23MR	3.37	6.7
<i>M. luteus</i> ATCC 10240	ND	ND
<i>V. cholerae</i> ATCC 36540	ND	ND

Como se puede observar en la tabla 34 lo valores para CMI y CBM obtenidas contra *M. luteus* y *V. cholerae* son superiores a los 10.5 mg, ya que esta fue la concentración más alta utilizada en este estudio. Mientras que en el caso de *S. aureus* el aceite A2, presentó valores para la CMI de 3.37 mg y para la CBM de 6.7 mg. Este comportamiento se puede atribuir a características estructurales y bioquímicas de cada una de las cepas -ya que- aunque los monoterpenos suelen

tener actividad antimicrobiana sobre bacterias Gram positivas, principalmente sobre estructuras como la pared celular, en el caso de *M. luteus* pertenece a una familia que se caracteriza por ser de tipo saprofita y cosmopolita, colonizan una gran variedad de ambientes y se puede encontrar en el suelo, sobre la piel de mamíferos, en alimentos en conserva o refrigeración y un amplio gradiente de temperaturas (Núñez, 2014). Todo lo expuesto anteriormente, hace de *M. luteus* una especie altamente adaptable, por lo cual es probable que presente mecanismos que le permitan resistir la acción de los compuestos derivados del metabolismo secundario.

En el caso de *V. cholerae*, esta especie al ser de tipo Gram negativa presenta diferencias substanciales en la estructura de su pared celular, la cual es el blanco típico de compuestos de tipo terpeno, ya que disponen de dos membranas plasmáticas separadas por el espacio periplasmático dentro del cual se encuentra la capa de péptido glucano (Alberts et al., 2004). El caso más representativo en este estudio es el de la cepa de *S. aureus* 23MR, ya que aunque la CMI y la CBM obtenidas con el aceite esencial de *H. mociniana* presentaron valores relativamente altos es de notar que esta cepa es multiresistente, lo cual deriva en la presencia de mecanismos que le permiten a la cepa inactivar la acción de los diversos antibióticos que pudiesen tener efecto sobre ella. Sin embargo, el aceite A2 de *H. mociniana* si presentó efecto inhibitorio del crecimiento de esta cepa, además de efecto bactericida. Una de las causas a las que se puede atribuir este resultado es que esta cepa no ha sido expuesta a compuestos derivados del metabolismo secundario, por lo cual no presenta los procesos que le permitan activar los mecanismos de resistencia a estos compuestos.

Por último, las diferencias mostradas en la actividad antimicrobiana entre el experimento cualitativo y cuantitativo se pueden atribuir a las características fisicoquímicas de los compuestos presentes en los aceites esenciales. Debido a su alta volatilidad, estos difunden en una mayor área en el agar. Además, de que los aceites esenciales actúan sobre las cepas, las cuales se encuentran en la superficie del agar a diferencia de la prueba de dilución en caldo, ya que las diferencias de polaridad entre este y los aceites esenciales, dificultan que se

disuelvan de manera uniforme. Además de que las bacterias tienden a precipitar al fondo de tubo donde se han inoculado.

Actividad antioxidante de los extractos metanólicos de *H. mociniana*.

La evaluación de la actividad antioxidante de los extractos metanólicos de *H. mociniana* mostró que el extracto M2 fue el que presentó mayor capacidad de reducción del radical DPPH, con una CA_{50} de 10.71 ± 1.5 ppm seguido del extracto M1 con un valor de CA_{50} 15.13 ± 1.74 ppm y por último el extracto M3 con una CA_{50} 29.06 ± 2.69 ppm (Figura 27). Los valores de los tres extractos confirman que son buenos antioxidantes según los estándares de la FDA, la cual que menciona que una buena capacidad antioxidante debe tener valores de CA_{50} menor a 200 ppm (Gardziella et al., 2000)

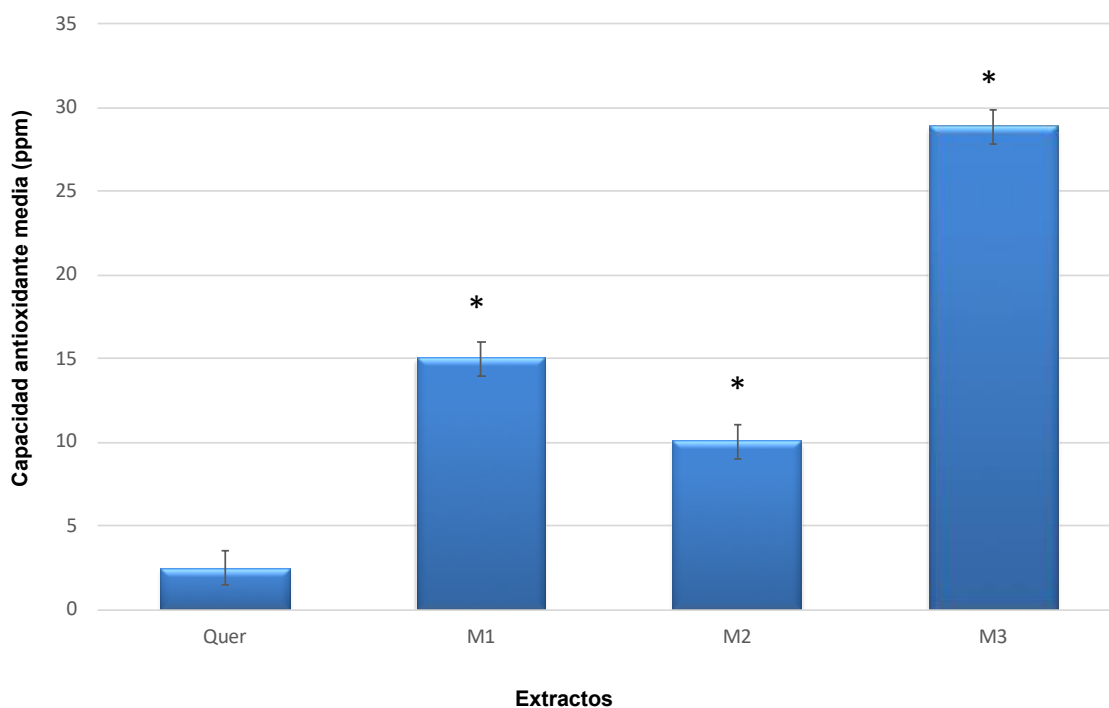


Figura 27. Capacidad antioxidante media de los extractos metanólicos de *H. mociniana*. Quer: Quercetina, M1: extracto metanólico de enero del 2015, M2: extracto metanólico de octubre del 2015 y M3: extracto metanólico de octubre del 2016.

Como se observa en la figura 27 existen diferencias significativas ($p < 0.05$) en cuanto a la capacidad de reducción del radical DPPH que presentan los extractos metanólicos de *H. mociniana*. Claramente el extracto con la mayor capacidad antioxidante fue el extracto M2, el cual corresponde al final de la época seca, durante ésta, *H. mociniana* se encuentra expuesta a condiciones de estrés mayores que durante la época de lluvias. También es importante destacar que ésta mayor capacidad antioxidante se correlaciona con la cantidad mayoritaria de flavonoides detectados en este trabajo. Este comportamiento ha sido observado en otras especies del género *Hyptis*. Pereira dos Santos y colaboradores reportaron en 2018, que la especie *H. radicans* también presenta una mayor capacidad antioxidante durante la estación seca.

La actividad antioxidante de los flavonoides se relaciona directamente con su estructura, en concreto con la presencia de grupos hidroxilo en el anillo B (Ángel-Gonzales et al., 1999), En cuanto a los ácidos fenólicos su efectividad antioxidante está relacionada con la capacidad de liberar de forma homolítica hidrogeno de sus grupos hidroxilo, y formar radicales estables por resonancia o hiperconjugación (Pereira Dos Santos et al., 2018). Por último cabe señalar que otro modo de acción de los flavonoides y compuestos fenólicos se relaciona con su capacidad de actuar como agentes quelantes de metales, principalmente iones de hierro y cobre y de esta manera inhibir la reacción de Fenton (Harborne y Williams, 2000) con lo cual proporcionarían de manera adicional indirecta protección antioxidante extra.

Evaluación de la actividad fotoprotectora del extracto M1.

Determinación de los máximos de absorción en la RUV de los extractos M1, M2 y M3.

Los extractos metanólicos de las tres colectas, fueron sometidos a un análisis espectrofotométrico para determinar su espectro de absorción en la región UV. Los resultados mostraron que los tres extractos absorben en las regiones del UV-B y UV-A (Tabla 35, Anexo 6).

Tabla 35. Picos máximos de absorción de los extractos metanólicos de *H. mociniana*.

Extracto	λ max (nm)	Región UV
M1	380-325	UV-A
	285	UV-B
M2	380-325	UV-A
	285	UV-B
M3	380-325	UV-A
	285	UV-B

Debido al rendimiento así como los resultados anteriores, se seleccionó al extracto M1 para evaluar su capacidad fotoprotectora sobre un modelo bacteriano, tomando en cuenta que presenta flavonoides, como, la 5-7 dimetilapigenina.

Experimento de fotoprotección con modelo bacteriano.

Los resultados obtenidos en el experimento de fotoprotección usando *E. coli* ATCC 25922, mostraron que las poblaciones bacterianas en el grupo sin protección sobreviven hasta los 2 minutos de exposición a la UV-B, con una constante de mortalidad de 3.322 (Figura 29). Se ha reportado que la UV-B afecta de forma directa al material genético así los mecanismos enzimáticos de reparación del DNA (Goosen y Moolenaar, 2008).

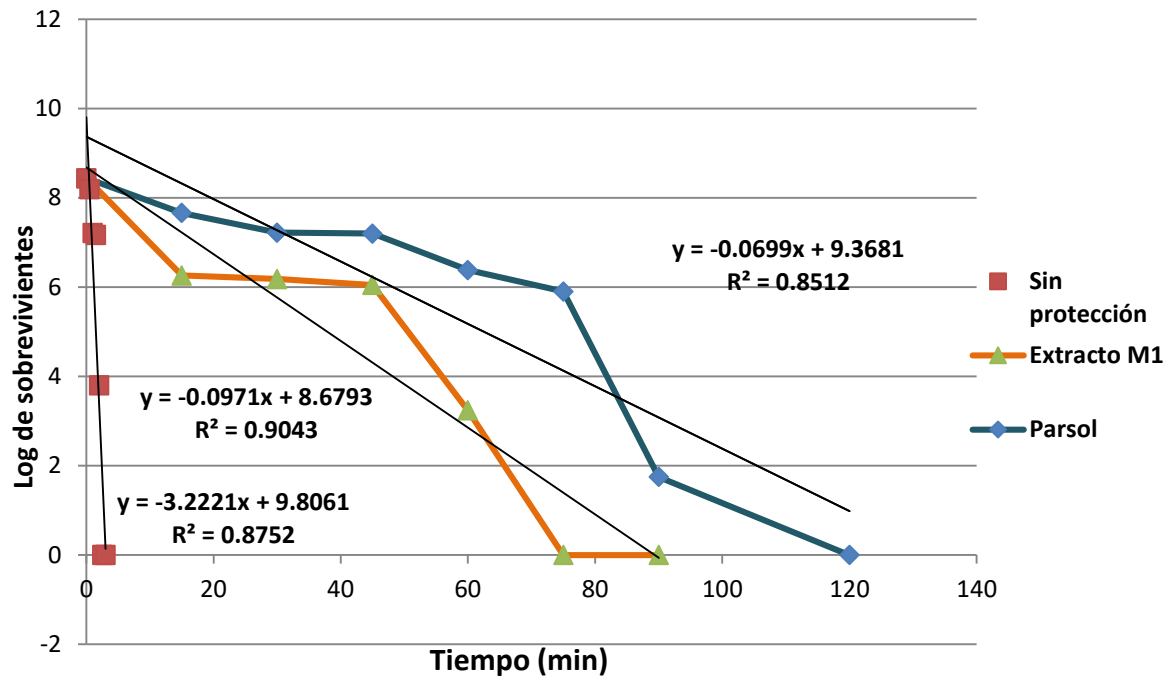


Figura 28. Actividad fotoprotectora del extracto metanólico sobre un modelo bacteriano. a) grupo sin protección, control negativo, b) Grupo con protección extracto M1 c) Grupo con protección compuesto de referencia (Parsol) (control positivo).

El extracto M1 proporcionó protección a las poblaciones bacterianas durante 60 minutos. El valor para constante de mortalidad en este grupo fue de 0.0971 lo cual indica que se trata una curva de supervivencia de tipo multiimpacto debido a que la población bacteriana sufre varios daños durante el tiempo que fueron expuestas a la UV-B (Figura 28). Por último, las poblaciones del grupo control positivo (Parsol) sobrevivieron hasta los 90 minutos con una constante de mortalidad de 0.0699.

La UV-B produce diversos daños en las células bacterianas. Esos comprenden alteraciones directas al DNA, entre las que se encuentran la formación de dímeros de primidina-pirimidona (6-4), lo cual deriva en la inhibición del proceso de

replicación del DNA y de transcripción del RNA esto último tiene como consecuencia la muerte celular. Otro tipo de daños directos al DNA por la UV-B involucra la saturación del enlace 5, 6 de las pirimidinas, produciendo daños a las bases citosina y timina (Goosen y Moolenaar., 2008).

Además de lo anterior, la UV-B induce el proceso de fotosensibilización. Proceso que forma radicales libres por la excitación de diferentes componentes celulares, substrayendo un electrón o un átomo de hidrogeno, con lo cual se inicia el proceso de oxidación en cadena. Otro mecanismo comprende la transferencia de un electrón al oxígeno, derivando en la formación de oxígeno singulete del cual se pueden originar otras especies reactivas como el radical superóxido (Santos et al., 2012).

Las células bacterianas disponen de sistemas de reparación del DNA, entre los que se incluyen enzimas como las fotoliasas y *uvr*; además de sistemas antioxidantes como catalasas, superóxido-dismutasas y glutatión peroxidasas (Truglio et al., 2006). La exposición directa a la UV-B contribuye a la pérdida de eficacia y con el paso del tiempo, inactivación de estos sistemas. En nuestros experimentos sin protección, se observó la acumulación de estos daños, la cual rebasó la capacidad de reparación de las poblaciones bacterianas (Figura 28). Mientras que en la población bacteriana protegida con el extracto M1, el tiempo en el cual las poblaciones se mantuvieron con vida fue 30 veces mayor al del grupo sin protección. Aunque el control, (Parsol) protegió durante 90 minutos, se trata de un compuesto puro, al contrario del extracto, el cual es una mezcla compleja y por lo tanto el o los compuestos que proporcionan el efecto de pantalla, son menos en proporción al Parsol.

En conclusión, el efecto fotoprotector del extracto M1 se debe a la presencia de moléculas de tipo polifenol (flavonoide).

8. Conclusiones

- *H. mociniana* presenta diferencias en el porcentaje de rendimiento de sus extractos, lo cual se relaciona directamente con el mes de recolecta.
- Los aceites esenciales de *H. mociniana* son mezclas complejas en las que se identificaron 18 sesquiterpenos y 3 monoterpenos.
- El compuesto mayoritario presente en los aceites esenciales es el alcohol patchoulínico, (32.05 % de abundancia), siendo este el primer reporte para una especie del género *Hyptis*.
- Los extractos hexánicos de *H. mociniana* están compuestos sólo de sesquiterpenos, siendo el cariofileno el compuesto mayoritario.
- El análisis químico del extracto DM1 de la parte aérea de *H. mociniana*, permitió la identificación de 2 sesquiterpenos y 3 fitoesteroles.
- Se identificó la presencia del compuesto 5-hidroxi-7', 4'-dimetoxiflavona en el extracto DM1 de la parte aérea de *H. mociniana*.
- *H. mociniana* acumuló carbonatos, con un rendimiento de 700 mg equivalentes al 10% del peso total del extracto.
- Los extractos metanólicos de *H. mociniana* están compuestos por ácidos hidroxicinámicos y flavonoides.
- Existe una menor variación en cuanto a la producción de compuestos en los extractos metanólicos de *H. mociniana*, con respecto a los de otras polaridades.
- El análisis RMN de protones permitió corroborar la presencia de derivados de la apigenina en los tres extractos metanólicos de *H. mociniana*. Además de triterpenos en la partición metanólica del extracto M1.
- Los aceites esenciales de *H. mociniana* presentan actividad bacteriostática hacia *M. luteus* y *V. cholerae* y bactericida hacia *S. aureus*.
- Los extractos metanólicos de *H. mociniana* presentaron una alta actividad antioxidante.
- El extracto M1 presentó capacidad fotoprotectora y por lo tanto tiene potencial como sustancia fotoprotectora.

9. Bibliografía consultada

- Afaq, F; Katiyar, S. K. 2011. Polyphenols: Skin photoprotection and inhibition of photocarcinogenesis. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 11(14) 1200.
- Alberts, B; Johnson, A; Lewis, J; Raff, M; Roberts, K; Walter, P. 2004. *Biología molecular de la célula*. Ediciones Omega. Barcelona España. pp.1427.
- Alessandrello, M. J; Parellada, A. E; Juárez. T; M.S. Neske. A. Vullo D. I. Ferrero. M.A. 2017. Polycyclic aromatic hydrocarbons removal by immobilized bacterial cells using annonaceous acetogenins for biofilm formation stimulation on polyurethane foam. *Journal of Environmental Chemical Engineering*; 5; 1; 11.
- Almtorp, T. G; Hazell, C. A; Torssell, B. G. K. 1991. A lignan and pyrone and other constituents from *Hyptis capitata*. *Phytochemistry*. 30. 8.
- Andrade, T.A. Freitas, T.S. Araújo, F.O. Menezes, P.P. Dória, G.A.A. Rabelo, A.S. Quintans-Júnior, L.J. Santos, M.R. V. Bezerra, D.P. Serafini, M.R. Menezes, I.R.A. Nunes, P.S. Araújo, A.A., Costa, M. S. Campina, F. F., Santos, A.T.L. Silva, A.R.P. Coutinho, H.D.M. 2017. Physico-chemical characterization and antibacterial activity of inclusion complexes of *Hyptis martiusii* (Benth) essential oil in β -cyclodextrin. *Biomedicine & Pharmacotherapy*: 89: 201–207.
- Ángel, M.H., González, E.A.P., 1999. Plantas que contienen polifenoles antioxidantes dentro del estilo de vida. *Rev. Cuba. Investigación. Biomedica*. 18: 12–14.
- Antwi, O. A David D. Obiri, Newman Osafo, Arnold D. Forkuo, Leslie B. Essel. 2012. Stigmasterol inhibits lipopolysaccharide-induced innate immune responses in murine models. *International Immuno Pharmacology* 53: 105–113.
- Avila-A, J. G; Castañeda, C.M.C; Benítez, F.J.C; Duran, D.A. Barroso. V.R; Muñoz, L.J. L.; Martínez C. A; Romo de Vivar. A. 2005. Photoprotective activity of *Buddleja scordioides*. *Fitoterapia*. 76: 301-309.
- Awasthi, R. Tewari, R, Nayyar, H. 2011. Synergy between plants and p-solubilizing microbes in soils: effects on growth and physiology of crops. *International research Journal of Microbiology*. (12): 484-503.
- Balamurugan R. Stalin, A. Ignacimuthu. S. 2012. Molecular docking of sitosterol with some targets related to diabetes. *European Journal of Medicinal Chemistry* 47 38-43.

- Banthorpe, V. D. 1991. Classification of Terpenoids and General Procedures for their Characterisation. Charlwood, B. V & Banthorpe, D. V. (Eds). Academic Press. San Diego California. Estados Unidos de America. pp. 3.
- Berger. S; Sicker. D. 2009. Classics in Spectroscopy Isolation and structure of natural products. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 421-423.
- Bezerra, J.W.A.; Costa, A. R; da Silva, M.A.P; Rocha, M. I; Boligon, A.A; da Rocha, J.B.T; Barros, L. M; Kmdem, J. P; 2017. Chemical composition and toxicological evaluation of *Hyptis suaveolens* (L.) Poiteau (LAMIACEAE) in *Drosophila melanogaste* and *Artemia salina*. South African Journal of Botany 113, 437-442.
- Bhushan, M. S, Verma, A. Mujerkee, A. Vijayakumar, M. 2011. Anti-hyperglycemic activity of leaves extract of *Hyptis suaveolens* L. Poit in streptozotocin induced diabetic rats. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 689-693.
- Bicas, J.L; Neri-Numa, I.A., Ruiz, A.L; De Carvalho, J.E; Pastore, G.M. 2011. Evaluation of the antioxidant and antiproliferative potential of bioflavors. Food Chem. Toxicol.49 (7): 1610–1615.
- Caldas, G.F. do Amaral, Costa, I. M.; da Silva, J. B. da Nóbrega, R.F, Rodrigues F.F. da Costa J.G, Wanderley, A.G. 2011. Antiulcerogenic activity of the essential oil of *Hyptis martiusii* Benth. (Lamiaceae). J Ethnopharmacol. 1; 137(1): 886-892.
- Camarena, G. G. 2012. Interacción planta-hongos micorrízicos arbusculares. Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del Ambiente, 18 (3): 409-412.
- Carroll, A.L., Desai, S.H., Atsumi, S., 2016. Microbial production of scent and flavor compounds. Current Opinion in Biotechnology 3: 8-15.
- Chakrapani, p, Venkatesh, K. Chandrasekharsingh, B, Arunjyothi .B, Premkumar, Amareshwari. P, A. Roja R.2013. Phytochemical, pharmacological importance of patchouli (*Pogostemon cablin* (blanco) benth) an aromatic medicinal plant. int. j. Pharm. Sci. Rev. Res. 21 (2): 7-15.
- Costa, V. C de O; A, Tavares, F, J; Silva, B. S; Duarte, C.M; Agra, M de F; Jose M; Barbosa-Filho, J. M; L.L. de Souza, I; da Silva, B. A; Marcelo S. S. 2014. Hyptenolide, a new α -pyrone with spasmolytic activity from *Hyptis macrostachys*. Phytochemistry Letters. 8. (1). 32–37.
- Croteau, R. Kutchan, T. Lewis, N. 2000. B. B; Grissem, W; Jones, L. R; (Eds). Biochemistry & Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologist, Rockville, Maryland, Estados Unidos de America.1286-1289.

- Da Silva, I.P; Brissow, E, KellnerFilho, L.C; Senabio, J, de Siqueira, K.A, Vandresen, Filho, S, Damasceno, J.L; Mendes, S.A, Tavares, D.C, Magalhães, L.G, Junior, P.A, Januário, A.H, Soares, M.A. 2017. Bioactive compounds of *Aspergillus terreus*, an endophytic fungus from *Hyptis suaveolens* (L.) poit. World j Microbial Biotechnol 33:62.
- De Albuquerque, M. B; Cavalcanti; Dos Santos, C. R; Lima, L. M; Melo Filho, de A. P; Nogueira. C. M. J. R; Da Cãmara. G. A. C; Ramos. A de R. 2011. Allelopathy, an alternative tool to improve cropping systems. A Review. Agronomy of Sustainable Development. 379-395.
- De Lima, A. C; Paixão, M.S; Melo, M; de Santana, M.T; Damascena, N.P; Dias, A.S; Porto, Y.C; Fernandes, X.A; Santos, C. C; Lima, C. A; Quintans, J. L. J; Dos S Estevam, C; Araújo, B. S. 2013. Orofacial antinociceptive effect and antioxidant properties of the hydroethanol extract of *Hyptis fruticosa* almz ex benth. Journal of ethnopharmacology.146.192-197.
- De Wit, M, G, J. P. 2015. Plant pathogenic fungi and oomycetes. Principles of plant-microbe interactions. Lutenberg b editor. Springer international publishing Switzerland. pp 79.
- Diniz L.R, Vieira C.F, Santos E.C, Lima G.C, Aragão K.K, Vasconcelos RP, Araújo P.C, Vasconcelos Y de A, Oliveira A.C, Oliveira H.D, Portella V.G, Coelho-de-Souza A.N.2013. Gastroprotective effects of the essential oil of *Hyptis crenata* Pohl ex Benth on gastric ulcer models. Journal of Ethnopharmacol. On gastric ulcermodels. Journal of ethno pharmacology 149. 694–700.
- Dominguez, V. G, Castro, R. E. A. 2002. Usos medicinales de la familia Labiatae en Chiapas, México. Etnobiología 2: 19-31.
- Duke. S. O. 1987. Abs. Papers Am. Chem. Soc. 194. AGRO 104.
- Stahl, E; Bellow, P, Huber, S; Schlaeppli, K; Vallat-M, A; Mauch, F; Zeier, J. 2016 regulatory and functional aspects of indolic metabolism in plant systemic acquired resistance. Mol Plant. 2016 May 2; 9(5): 662-681.
- Feitosa-Alcantara, R. B; Bacci, L; Blank, A. F; Alves, Silva, P.B; Silva. I. M de A; Soares, C. A; Sampaio, T. S; Nogueira, P. C de L.; Arrigoni-Blank, M de F. 2017. Essential Oils of *Hyptis pectinata* Chemotypes: Isolation, Binary Mixtures and Acute Toxicity on Leaf-Cutting Ants. Molecules 2017, 22(4), 621 1-13.

- Figueredo, P; Lintinen, K.; Hirvonen, T. J; Kostianen, A. M.2018. Properties and chemical modificaciones of lignina: Forwards lignin-based nanomaterials for biomedical applications. *Progress in Materials Science* 93. 233–269.
- Fink, J. K; 2013 *Reactive Polymers Fundamentals and Applications. A Concise Guide to Industrial Polymers. A volume in Plastics Design Library 2005, Pages 447–469.*
- Fischer, H. N. 1991. Plant terpenoids as allelopathic agents. *Ecological chemistry and biotechnology of plant terpenoids.* Harborne. J. B, Barberan, F.A. (Eds). Clarendon Press, Oxford. Nueva York, Estados Unidos de America. 377-398.
- Flores, Suárez I. D. 2016. Aislamiento mediante cromatografía de líquidos de los constituyentes de la especie *Hyptis pectinata*. Tesis de Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México. pp, 30.
- Fraga. M. B. 1991. Classification of Terpenoids and General Procedures for their Characterisation. Charlwood, B. V & Banthorpe, D. V. (Eds). Academic Press. San Diego California. Estados Unidos de América. pp 145.
- Gabay. O; Sanchez , C; Salvat, C; Chevy, F; Breton, M; Nourissat, G; Wolf, C; Jaques, C; Berenbaum, F. 2010. Stigmasterol: a phytosterol with potential anti-osteoarthritic properties. *Osteoarthritis and Cartilage*.18, 106e116.
- Gardziella, A., L. A., Pilato y Knop. 2000. *Phenolic Resins.* 2da. Edición. Springer-Verlag Berlín Heidelberg. Alemania. 560.
- Giuliani, C; Ascrizzi. C; Tani, C; Bottoni, B; Bini, M. B; Guido, F; Gelsomina F. 2017. *Salvia uliginosa* Benth.: Glandular trichomes as bio-factories of volatiles and essential oil. *Flora* 233.
- Goad. L. J. 1991 Inhibition of phytosterol biosynthesis and consequences for plant growth. *Ecological chemistry and biochemistry of plant terpenoids.* Harbone J.B Barber, A. N F.A T editors. Cladendon press. Oxford Reino Unido. pp. 211.
- Goad. L. J. 1991. 1991 Phyosterols. *Method in plant Biochemistry Volume 7 Terpenpids.* Charlwood B.V y Banthorpeeditorees. Academic Press, San diego California Estados Unidos de America. pp 383
- Goosen, N, Mooleenaar. 2007. Repair of UV damage in bacteria. *DNA repair* 7 353–379.
- Gulmon, S. L; Mooney, H.A; 1986. In on the Economy of plant form and function. (T.J. Girmish, ed). Cambridge University Press. 681-698.

- Habibi Z., Cheraghi Z., Ghasemi S., Yousefi M. (2012) A new highlyhydroxylated diterpene from *Salvia Atropatana* Bunge. *Natural Product Research* 26:20,
- Haig, T. (2008). Allelochemicals in plants. allelopathy in sustainable agriculture and forestry. Editors: Zeng, RenSen, Mallik, Azim U., Luo, Shiming (Eds.) Springer. 63-104.
- Hammond. K. B; Jones. J D. G. Buchanan, B. B; Grisse, W; Jones L. R (Eds). *Biochemistry & molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland Estados Unidos de America. pp.1411
- Harborne, B. J; Grayer, J. R. 1991, *Flavonoids and insects*.1991.The Flavonoids Advances in research since 1986. Harborne, B ed. Londres Reino Unido.Chapman y Hall. pp. 589.
- Hoffmann, a. M. Noga, G. Hunsche, M. 2015. High blue light improves acclimation and photosynthetic recovery of pepper plants exposed to UV stress. *Environmental and Experimental Botany* 109. 254–263.
- Fair J. D; Kormos, C. M. Flash Column Chromatograms Estimated from Thin-Layer Chromatography Data, *J. Chromatogr., A* 2008, 1211.
- Kenneth V. 1957. On the Uptake of Carbon Dioxide and Bicarbonate by Roots, and Its Influence on Growth. *Plant Physiol.* 1957 Nov; 32 (6): 513–520.
- Koneman, E. W. Allen, S. D, Dowell, V. R. Sommers, H.M. 1985. *Diagnostico microbiológico*. Ed panamericana. México. pp.386-393.
- Leal. J. L. 2014. Aislamiento de compuestos bioactivos a partir de *Hyptis spicigera*. Tesis que para obtener el título de Licenciatura en Química Farmacéutico Biológica, Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 25-29.
- Lincoln Taiz, Eduardo Zeiger, Ian Max Møller, Angus Murphy. 2010. *Plant physiology and development*. Sixth edition. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., Publishers. pp 490.
- Luna, C. M. L. 2009. Actividad de las acetogeninas rolliniastatina-2 y la herradura sobre bacterias y el complejo I bacteriano. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 29.
- Manjunatha, M. Pickett, J. A. Wadhams, L. J, Nazzi, F. 1998 Response of western flower thrips, *Frankliniella occidentalis* and its predator *Amblyseius cucumeris* to chrysanthemum volatiles in olfactometer and greenhouse trials.*insect sci. applic.* vol. 18, no. 2.

- Marchese, A; Erdogan, O. I; Daglia, M; Barbieri, R; Di Lorezno, A; Fazel, N. S; Gortzi, O; Izadi, M; Mohammad, N. S. 2016 Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literatura. Food Chemistry. 210. 402–414.
- Martínez-G, M; Fragoso-M, I; García-P, M. Del R; Montiel, O. 2013. Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo. Revista Mexicana de Biodiversidad 84: 30-86.
- Martínez-M, E. Sosa, E. J. E; Alvarez, F. 2014. El estudio de la biodiversidad en México: ¿una ruta con dirección? Revista Mexicana de Biodiversidad, Supl. 85: S1-S9.
- Matic, S; Pegoraro, M, Noris, E. 2016. The C2 protein of tomato yellow leafcurl Sardinia virus acts as a pathogenicity determinant and a 16-amino acid domain is responsible inducing a hypersensitive response in plants. Virus Research 215 12–19.
- Nuñez. M. 2014. *Micrococcus*. Encyclopedia of food microbiology, volume 2. pp 330.
- Orendain, A. 2016. Monitoreo de la actividad citotóxica de los extractos obtenidos de las partes aéreas de la planta *Hyptis verticillata*. Tesis de Licenciatura en Química Farmacéutico Biológica. Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 53-60.
- Pereira dos Santos, K; Sedano-P, M. D; Sala-C, W. R; Ortega, S, J L. B; Silva-S, C. L; Furlan, M. C. 2018. Biological activity of *Hyptis* acq. (Lamiaceae) is determined by the environment. Industrial Crops & Products, 112. 706-715.
- Pessoa M. C. A, Lima, E de O, Wanderley, P. A, Carmo, E. S, Leite de Souza., E. 2010. Chemical composition and antifungal activity of *Hyptis suaveolens* (L.) poit leaves essential oil against *Aspergillus* species. Brazilian Journal of Microbiology 41: 28-33
- Quinn, J. C., Kessell, A., & Weston, I. a. (2014). Secondary plant products causing photosensitization in grazing herbivores: their structure, activity and regulation. International Journal of Molecular Sciences, 15(1), 1441-1465.
- Romo de Vivar, A. 1985. Productos naturales de la flora mexicana. Limusa. México. pp. 59-70.
- Røstelién, T; Borg-Karlson, A. K, Fäldt, J. J. U; Mustaparta, H.2000. The plant sesquiterpene germacrene D specifically activates a major type of antennal

receptor neuron of the tobacco budworm moth *Heliothis virescens*. Chem Senses. Apr; 25(2):141-8

- Sánchez. F. R. E, Sánchez, O, B. L, Sandoval, E. M. K. Y, Benítez, U. A, Guillén, B. A, Méndez, G- M. C, Rubalcava. M. L. 2013. Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. revista especializada en ciencias químico-biológicas, 16(2):132-146, 2013.
- Santos, A. I. Newton C.M. Gomes, H. I, Almeida, Correia, A. A. Cunha. A 2012. Contribution of reactive oxygen species to UV-B-induced damage in bacteria. Journal of Photochemistry and Photobiology b: biology 117 (2012) 40–46.
- Sharma, A. Batish, R, D. Singh, H. P. Jaryan. V. 2017. The Impact of invasive *Hyptis Suaveolens* on the floristic composition of the periurban ecosystems of Chandigarh, Northwestern India. Flora. 233 (2017) 156–162. pp 153.
- Standley, P. C; Williams, L. O; 1973. Flora of Guatemala. Fieldiana botany 24.
- Stefova, M; Stafilov, T; Kulevanova, S. 2003. HPLC Analysis of Flavonoids. Encyclopedia of Chromatography 2004 Update Supplemen. pp. 183.
- Signh P. H; Batish, R. D; Kaur, S; Arora, K; Kohli, R. 2006. α -Pinene Inhibits Growth and Induces Oxidative Stress in Roots. Annals of Botany 98: 1261–1269
- Stone, de S; Tatiana, S. F; Leonardo, L. B; Heleno, D. F; Leonice M.F. T; Pedro, H. F; Maria, H. R; José, R. P. 2016. Chemical composition and seasonal variability of the essential oils of leaves and morphological analysis of *Hyptis carpinifolia*, Revista Brasileira de Farmacognosia 26 (2016) 688–693.
- Taiwo, A. O; Ekundayo. O; Adeniyi. A. B. 1999. Antimicrobial activity of the essential oil of *Hyptis suaveolens* leaves. Fitoterapia 70. 440-442.
- Taylor. 1997. Plants and UV-B : responses to environmental change / edited by P. J. Lumsden.
- Trivellini. A; Lucchesini, M; Maggini, R; Mosadegh, H; Villamarin, S, S, T; Vernierini, P; Mensuali-S, A; Pardossi, A. 2016. Industrial Crops and Products 83.241–254
- Truglio, J. J; Croteau, J. D; van Houten, B; Kisker, C. .2006 Prokaryotic nucleotide exsion repair, the UvrABC system, Chem. Rev. 10 (2006) 233–252.
- Tsai, S-F; Sheng Lee, Shoei 2014. Neolignans as xanthine oxidase inhibitors from *Hyptis romboides* Neolignans as xanthine oxidase inhibitors. Phytochemistry 101. 121–127.

- Valares, M. C. 2011. Variación del metabolismo secundario en plantas debida al genotipo y al ambiente. Memoria que presenta la licenciada Dña. Cristina Valares Masa para optar al Grado de Doctora en Ciencias por la Universidad de Extremadura, España. pp 15.
- Villaseñor J. L. Ortiz. E. 2014. Biodiversidad de las plantas con flores (division Magnoliphyta en Mexico. Revista Mexicana de Biodiversidad, Supl. 85: S134-S142
- Wagner H. 1996. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas / Hildebert Wagner, Sabine Bladt ; with 184 colored photographs by Veronika Rickl. Pp. 344-350.
- Wakmundzka-H, M; Oniszczyk, H; Mieczyslaw, H; Oniszczyk, T. 2011. High performance liquid chromatography in phytochemical analysis. Editores Wakmundzka, H y Sherma J, CRC Press, Boca Raton, Nueva York Estados Unidos de América. pp 548.
- Webbook NIST. 2018. National Institute of standards and Technology. Departamento de comercio de los Estados Unidos de América..<https://www.nist.gov/>.
- Williams, C.A. Harborne. B. J. 1994. The Flavonoids. Advances in research since 1986. Eds. Harborne. J. B. Champan & Hall. Reino Unido. pp 441-473.
- Xu, C. C. Wang. B, Pu, Y.Q, Tao. J, S. Zhang, T. 2017. Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. Chinese Journal of Natural Medicines. 15 (10): 0721-0731.
- Zheng Qing Fu and Xinnian Dong. 2013 Systemic Acquired Resistance: Turning Local Infection into Global Defense. Annu. Rev. Plant Biol. 2013. 64:839–63.
- Zhou, Z-S; Tang, P-C; Ke, C-Q; Yao, S; Lin, G; Yang, Y. 2017. Three New dimeric diterpenes from *Rhododendron molle*. Chinese Chemical Letters, 28. 1205-1209.
- Zhu, B. C. R; Henderson, G; Yu, Y; Laine, R. A. 2003. Toxicity and Repellency of Patchouli Oil and Patchouli Alcohol against Formosan Subterranean Termites *Coptotermes formosanus* Shiraki (Isoptera: Rhinotermitidae). J. Agric. Food Chem. 51, 4585-4588.

10. Anexos

Anexo 1

Técnicas cromatográficas.

Cromatografía en columna Flash (extracto A2).

La muestra del extracto A2 fue separada por cromatografía flash de acuerdo a la técnica descrita por Fair y Kormos en 2008. Se utilizó sílica gel con un tamaño de partícula de 40-63 μm (230-400 mesh). 60 Å. Se utilizó una mezcla de Hexano/Acetato de etilo 9:1. Se aislaron 4 fracciones principales de las cuales la fracción 4 debido a su pureza fue analizada por resonancia magnética de protones y carbono 13.

Fraccionamiento en cromatografía en columna abierta.

El extracto D1 de la parte aérea de *H. mociniana* presentó el mayor porcentaje de rendimiento por lo tanto fue incluido en celita para fraccionarlo en cromatografía de columna abierta (ca) utilizando gel de sílice F₂₅₄ con tamaño de partícula de 0.063-0.200 mm, Merk malla 70-230 ASTM. La fase móvil consistió en mezclas de polaridad ascendente, con proporciones variables de Hexano-Diclorometano, Diclorometano-Acetato de Etilo y Acetato de Etilo-Metanol. Para la fracción metanólica del extracto M1 esta se eluyó con mezclas de polaridad ascendente de Acetona-Metanol y Metanol-Agua. En ambos casos se recolectaron alícuotas de 150 mL, que posteriormente fueron concentradas a presión reducida para luego analizarlas con cromatografía en capa fina (ccf) y de esta manera formar las fracciones con su comportamiento en ccf.

Cromatografía en placa preparativa (cp).

Las fracciones con mayor rendimiento obtenidas del extracto M1 fueron sometidas a separación por medio de placas preparativas de 20 x 20 cm con base de gel de sílice de 2mm e indicador UV₂₅₄. Se colocó un total de 100 mg de la fracción en cada una de las placas, se desarrollaron con una fase móvil compuesta por una mezcla de 75:25 de Acetona y Metanol. Una vez obtenida la separación de los compuestos en bandas individuales estas se separaron de manera manual para

ser disueltas en metanol. Posteriormente se filtraron con el fin de separar la silica gel, y por último se destilaron a presión reducida para obtener los sólidos totales.

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

El análisis por CG-EM de los extractos de las tres colectas obtenidas así como las fracciones de menor polaridad del extracto D1 fueron analizadas en un cromatógrafo Agilent Technologies, modelo 6850, se utilizó una columna HP5MS (Agilent technologies de 30 m de largo, 0.25 mm de diámetro y película de 0.25 μm), acoplado a un espectrómetro de masas (Agilent Technologies modelo HP 5MS). El tipo de inyección fue manual o Split. Se inyectó 1 μL de cada muestra. El gradiente de temperatura abarcó un rango de los 70°C a 230°C. La fase móvil utilizada fue helio (He). El flujo inicial de la columna fue de 1 mL/min, con una presión de 64.85 Kpa y una velocidad lineal de 30 cm/s. El tiempo total de análisis fue de 20 minutos. El rango de masas detectado fue de 35 m/z. Las muestras se ionizaron por impacto electrónico (70 eV), la temperatura alcanzada en la fuente de ionización fue de 230°C y en el cuádrupolo de 150°C. La identificación de los compuestos se llevó a cabo por medio de la base de datos de la biblioteca NIST, VERSIÓN 8.0.

Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC-DAD).

Con el fin de analizar los extractos de alta polaridad al igual que las fracciones de la partición metanólica del extracto M1, estas se sometieron a un análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución. Se utilizó un equipo Hewlett Packard, modelo 1100 con bomba cuaternaria y detector de arreglo de diodos. La columna utilizada fue Allosphere ODS-1 de 180 mm de largo por 46 mm de diámetro, con un tamaño de partícula de 5 μm . La temperatura del horno fue de 23°C con un flujo constante de 1mL por minuto durante 30 minutos y fase móvil conformada por Agua/ Metanol/ Acetonitrilo (50:25:25).

Anexo 2

Técnicas espectroscópicas.

Espectroscopia infrarroja.

El precipitado 1 fue analizado mediante espectroscopía de infrarrojo para obtener información sobre los grupos funcionales mayoritarios que lo conforman. El análisis se realizó en un equipo Perkin Elmer (FT-IR) modelo Frontier FT-IR/NIR con detector MIR TGS, Fuente MIR, Divisor de haz OptKBr equipado con accesorio de cristal de diamante a una resolución 4 cm⁻¹ y 8 escaneos con velocidad de barrido de 0.2.

Espectrometría de energía dispersiva (EDS).

Con el fin de analizar la composición química del precipitado 1 este fue sometido a un análisis por espectroscopía de energía dispersiva en un microscopio electrónico de barrido JEOL modelo JSM-6380LV, acoplado con un accesorio de energía dispersiva INCA-sight Oxford instruments.

Resonancia magnética nuclear.

Una muestra de 40 mg de la fracción 4 obtenida del aceite esencial de octubre de 2015, y los tres extractos metanólicos fueron sometidos a un análisis de RMN. para el caso del aceite esencial este análisis se realizó para elucidar la estructura del alcohol patchouilínico y para los extractos metanólicos con el fin de obtener información de los compuesto mayoritarios, con base en las señales exhibidas en este análisis. Los espectros se obtuvieron en un equipo Bruker-Avance y se operaron con una radiofrecuencia de 300 MHz. Los espectros se obtuvieron utilizando como solvente diclorometano (aceites esenciales) y metanol deuterado. Los desplazamientos químicos se expresan en ppm con respecto a una sustancia patrón utilizando en este caso tetrametilsilano (TMS) como referencia.

Anexo 3: Pruebas de actividad biológica.

Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos de *H. mociniana*.

1. Microorganismos utilizados

Los microorganismos fueron proporcionados por el laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la FES-Iztacala. Se utilizaron cuatro cepas de bacterias: 2 Gram positivas y 2 Gram negativas; 2 cepas de hongos levaduriformes y 2 cepas de hongos filamentosos, los cuales se mencionan a continuación.

a) Bacterias Gram positivas.

Staphylococcus aureus 23MR y *Micrococcus luteus* ATCC10240a.

b) Bacterias Gram negativas

Escherichiacoli, 82MR y *Vibrio cholerae* ATCC 39540.

c) Hongos Levaduriformes.

Candida albicans 17MR y *Candida glabrata*(caso clínico).

d) Hongos Miceliados.

Aspergillus niger y *Fusarium moniliforme*.

Evaluación cualitativa

Bacterias

La evaluación de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales y los extractos de las tres polaridades se realizó por medio de la prueba de dilución en agar de Kirby Bauer (Koneman,1991), los sensidiscos se impregnaron con 10 μ L (2mg) de cada uno de los extractos y 3 μ L para el caso de los aceites esenciales como control positivo de utilizó cloranfenicol y como control positivo discos impregnados con el solvente con el que se obtuvo cada extracto en el caso de los aceites esenciales de utilizo hexano como control negativo.

Hongos levaduriformes.

La evaluación cualitativa de la actividad antifúngica se realizó por medio de la técnica de dilución en agar reemplazando en este caso el medio Muller-Hinton (MH) por agar papa dextrosa (PDA) y el control positivo por nistatina (30µg/mL).

Hongos miceliados (Inhibición del crecimiento radial).

Por último la evaluación cualitativa de actividad antifúngica se realizó por medio del método de inhibición de crecimiento radial, en la cual se inoculó por punción 1mm de micelio en cajas con agar PDA, se colocaron discos impregnados con 2mg de cada uno de los extractos y los aceites esenciales y como control positivo de utilización ketoconazol con una concentración de (60 µg/mL).

Evaluación cuantitativa.

Método de dilución en agar.

Para estos bioensayos se valoraron diferentes concentraciones del aceite esencial con actividad antibacteriana, las cuales se agregaron de caldo Muller-Hinton

El inóculo consiste en una suspensión bacteriana con una concentración de $1-5 \times 10^8$ bacterias por mL. Se toma el inóculo con la ayuda de un hisopo estéril, el cual se coloca con ayuda de una micro pipeta, posteriormente se expande por el agar con ayuda de un asa de vidrio.

Las placas se incuban a 37°C durante 24 horas. La interpretación de resultados se realiza considerando como CBM la concentración en la que ya no se observa crecimiento bacteriano y como CMI la concentración que antecede a la CBM y que aun presenta crecimiento bacteriano, aunque en menor proporción, comparado con el grupo control

Anexo 4

Espectros de masas de los compuestos identificados en el extracto DM1

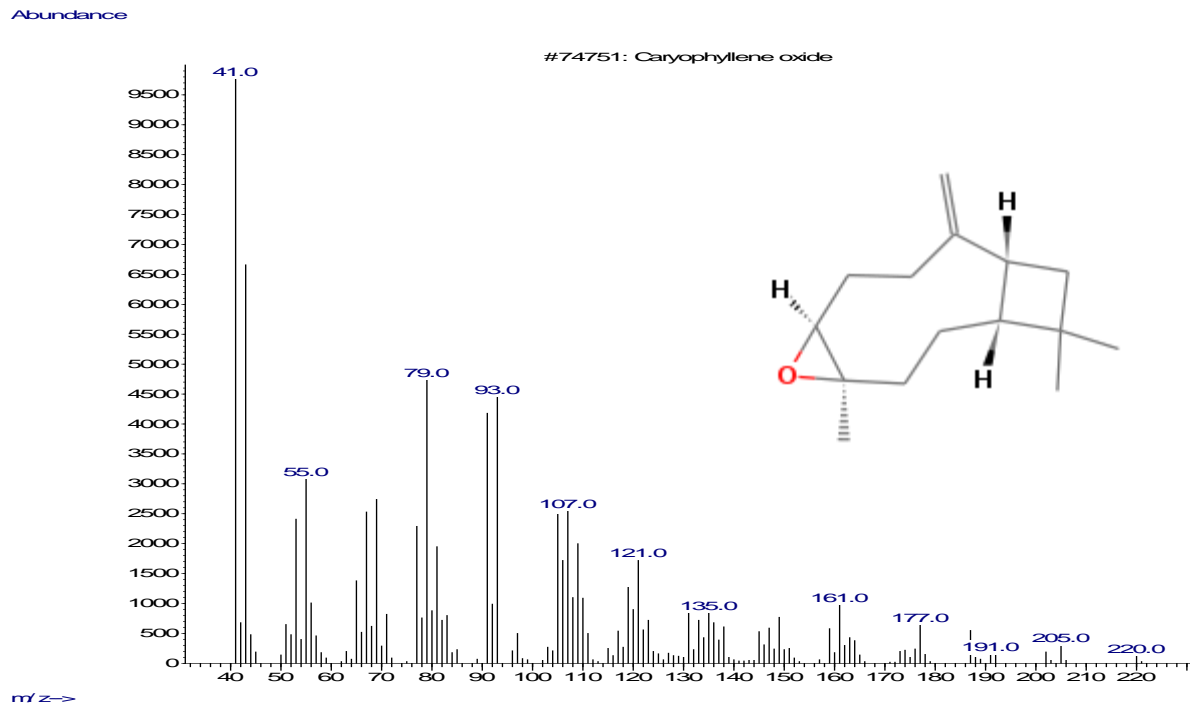


Figura 30. Espectro de masas del sesquiterpeno óxido de cariofileno. Estructura tomada de Webbook NIST 2018

Abundance

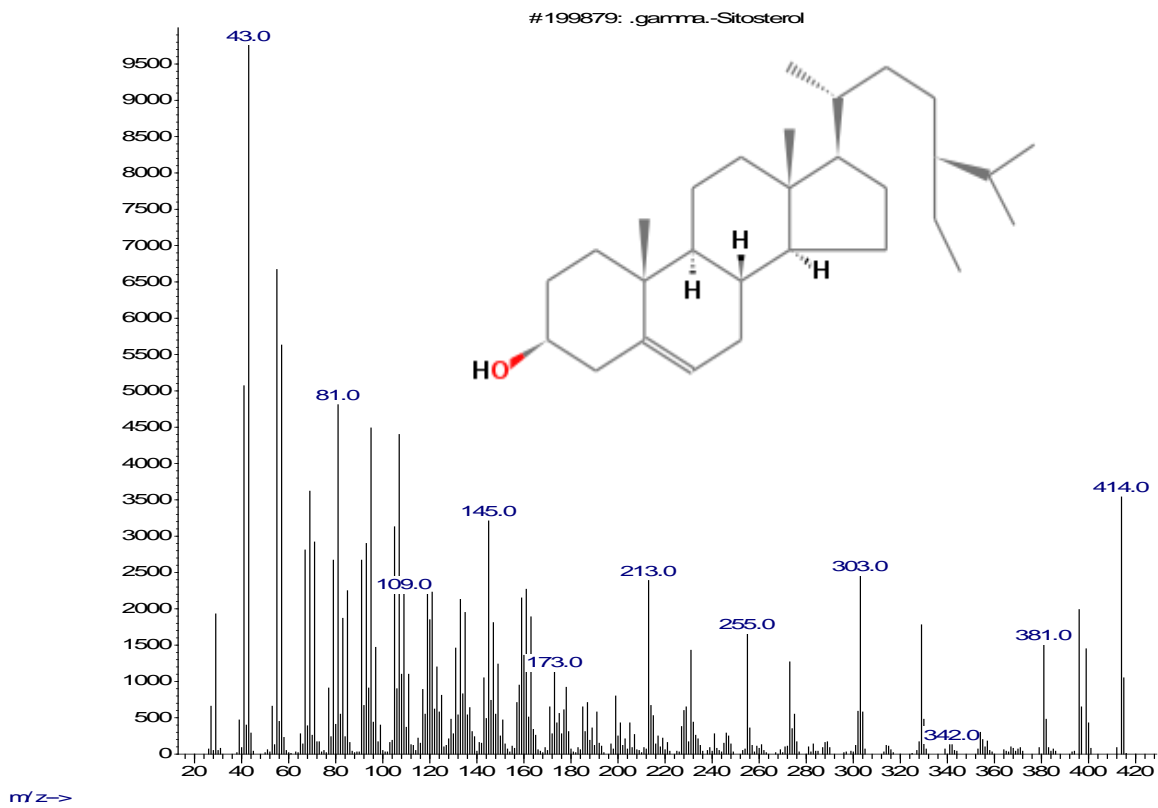


Figura 31. Espectro de masas del γ -sitosterol, fracción 4C del extracto de *H. mociniana*. Estructura tomada de Webbook NIST 2018

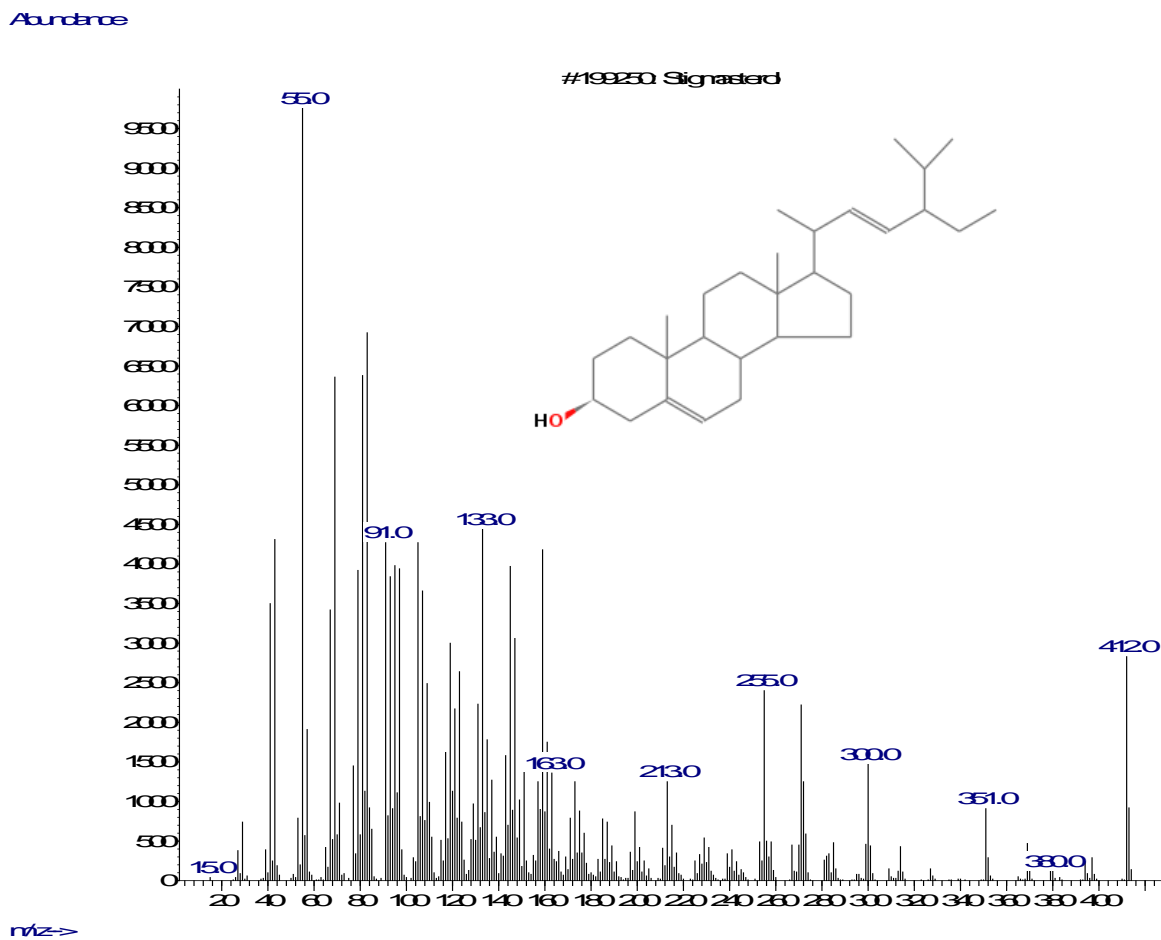


Figura 32. Patrón de fragmentación del compuesto estigmasterol detectado en el extracto D1 de *H. mociniana*, estructura tomada de Webbook Nist 2018.

Anexo 5

Espectros de H^1 de los extractos metanólicos de *H mociniana*

Extracto M2

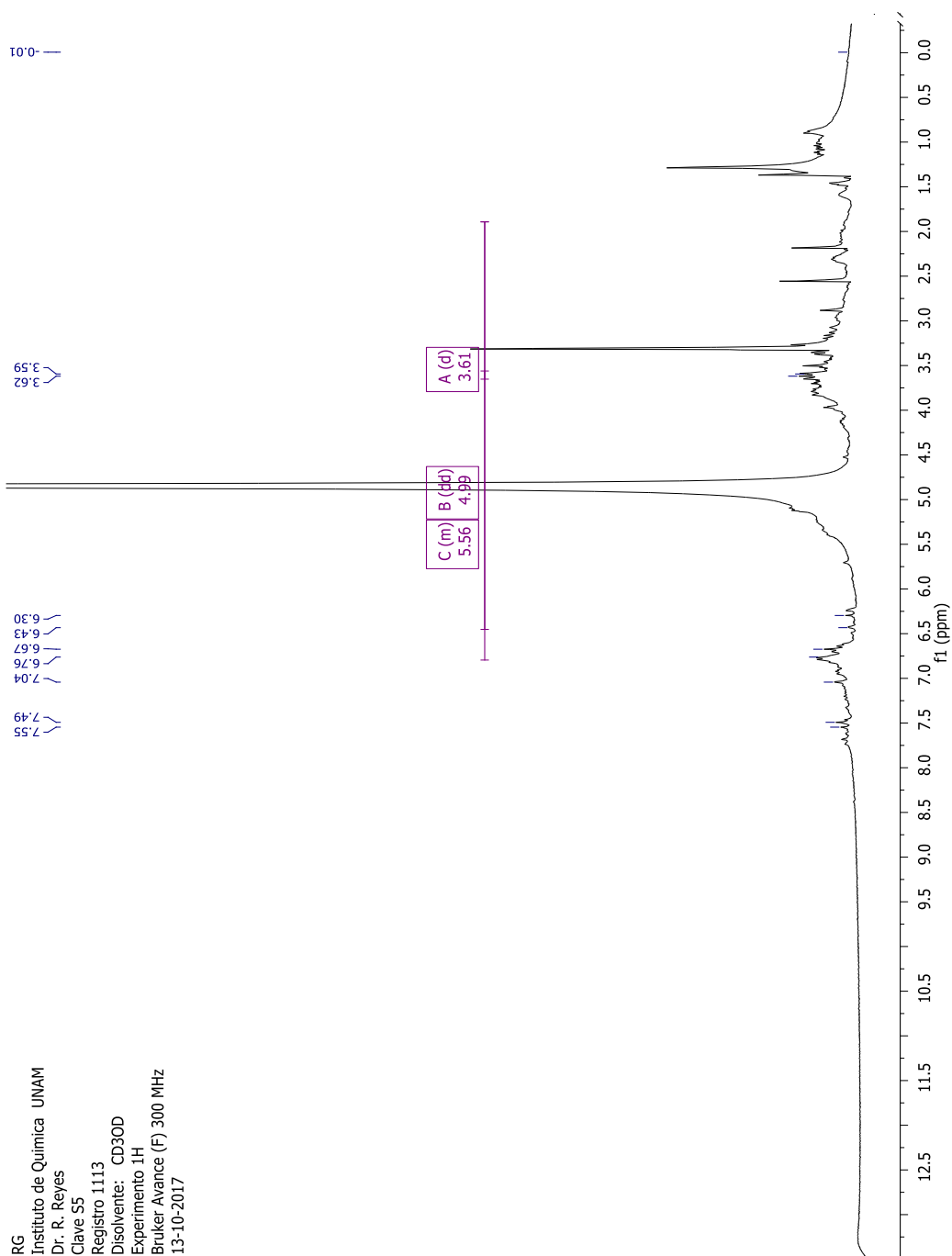


Figura 33. Espectro de RMN 1 H del extracto M2 de *H. mociniana*.

Señales de RMN H del extracto M2

Desplazamiento ppm	Interpretación
6.30-6.75	C-C
3.59-3.62	OCH
7.49-7.55	OH

Señales de RMN H del extracto M3.

Desplazamiento ppm	Interpretación
6.23-6.77	C-C
3.20-3.65	OCH
7.05-7.60	OH

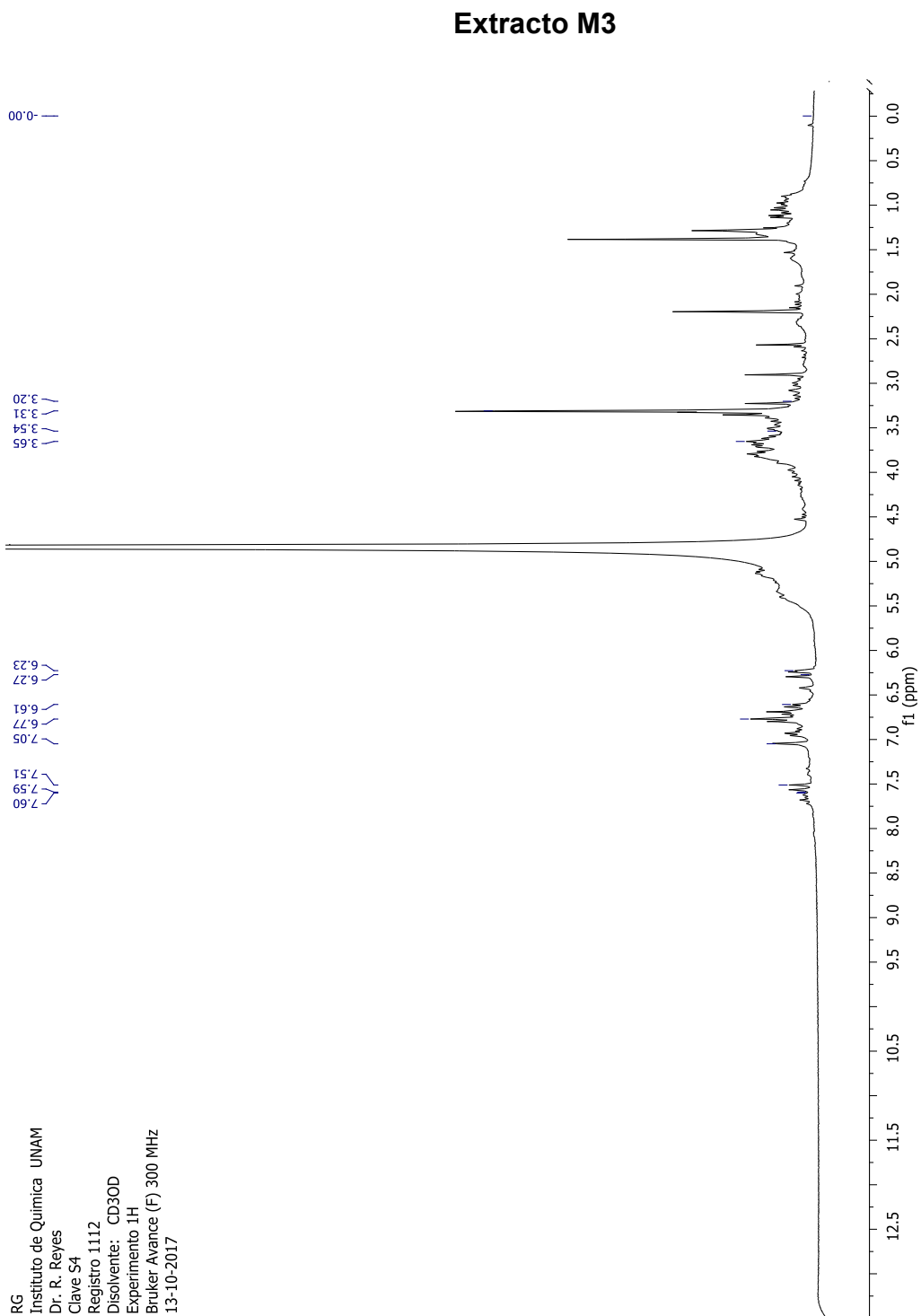
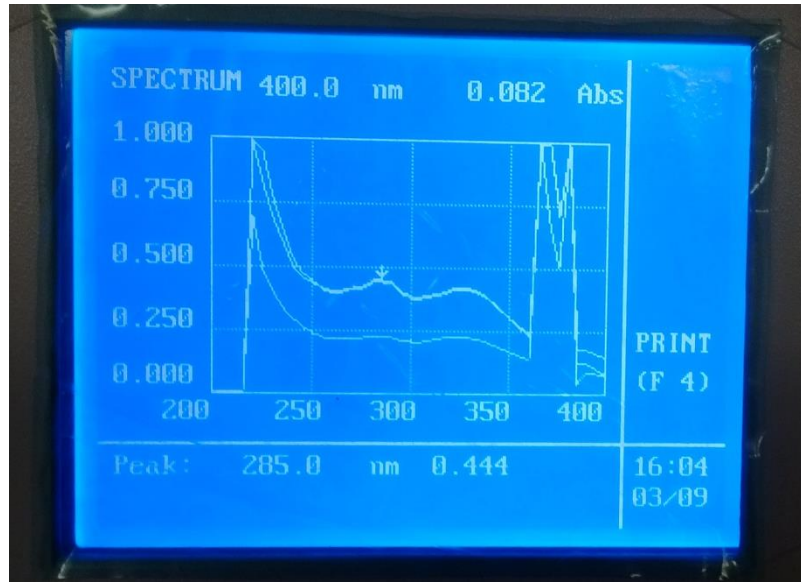


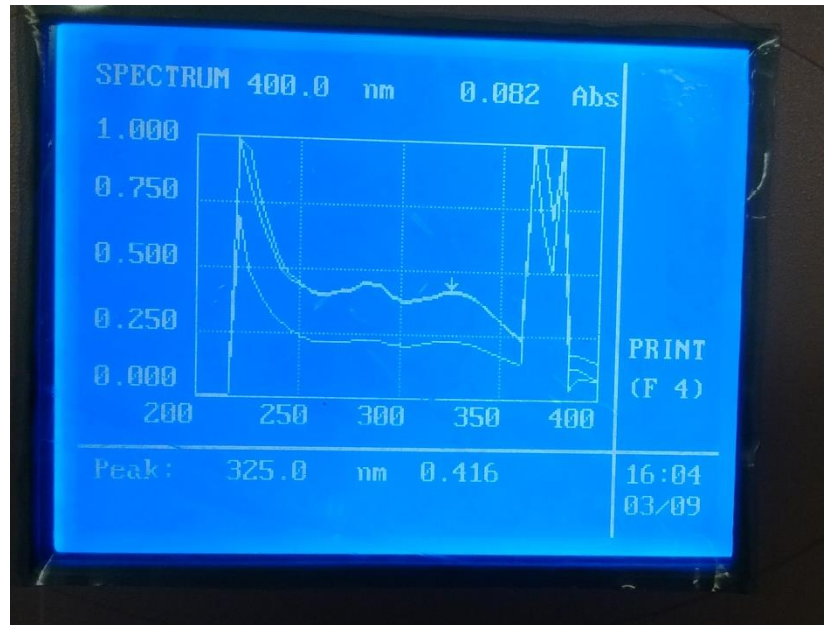
Figura 34. Espectro de RMN¹H del extracto M3 de *H. mociniana*.

Anexo 6

Barridos espectrofotométrico de los extractos metanólicos de *H. mociniana*



Pico de absorción 285nm de los extractos metanólicos de *H. mociniana*



Pico de absorción 325nm de los extractos metanólicos de *H. mociniana*

Anexo 7.

Actividad antioxidante (Reducción del radical DPPH).

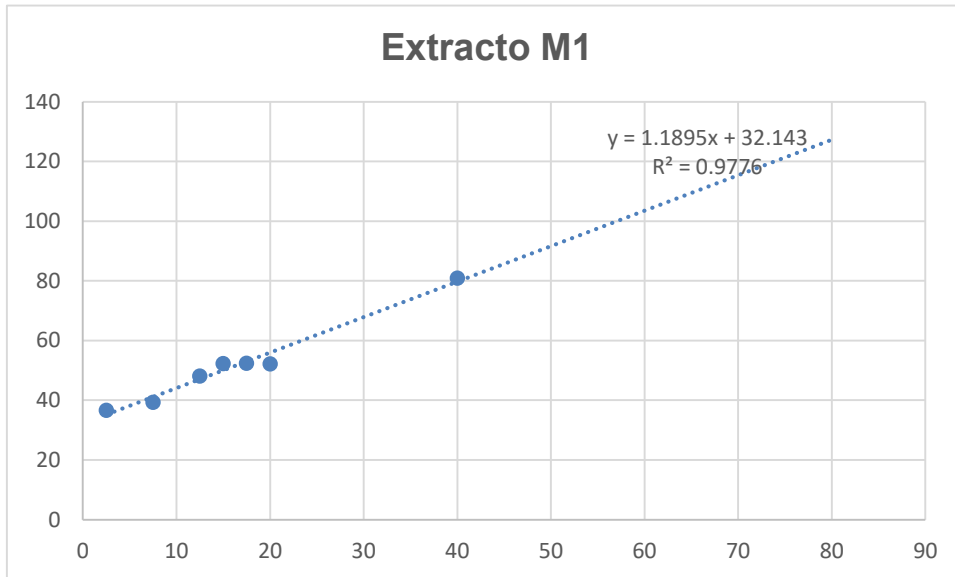


Figura 35. Capacidad antioxidante del extracto M1.

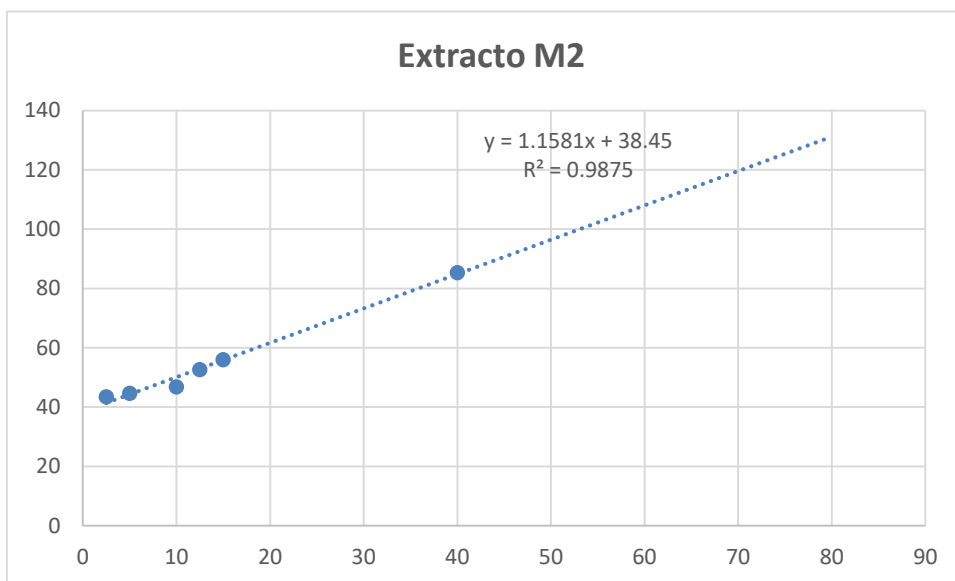


Figura 36. Capacidad antioxidante del extracto M2.

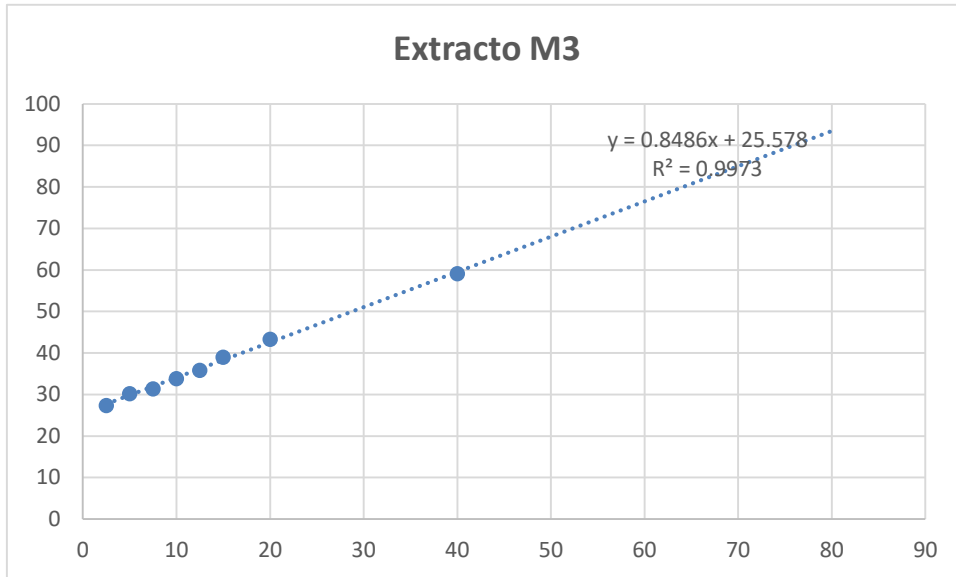


Figura 37. Capacidad antioxidante del extracto M3.