

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO-  
BIOLÓGICAS

**Estudio químico y evaluación de la actividad  
vasorrelajante de los extractos diclorometánico y  
metanólico de las partes aéreas de la planta medicinal *Dracocephalum  
moldavica* L.**

TESIS

Que como parte de los requisitos obtener el grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS

Presenta:

Q.F.B. YAOTZIN CRUZ CRUZ

DIRIGIDO POR:

Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH

SINODALES

Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH

PRESIDENTE

Dr. MIGUEL ANGEL RAMOS LÓPEZ

SECRETARIO

Dr. RUBEN ANTONIO ROMO MANCILLAS

VOCAL

Dr. ALEJANDRO GARCÍA ARREDONDO

VOCAL

M. en C. ELOY RODRÍGUEZ DE LEÓN

SUPLENTE

Centro Universitario, Querétaro Qro.  
Agosto de 2019  
México

## RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares constituyen la principal causa de muerte en México y a nivel mundial. En general, estas enfermedades son incurables y solamente pueden ser controladas mediante el uso de diversos fármacos, los cuales son costosos, haciéndolos inasequibles para la mayoría de los pacientes, y presentan efectos adversos considerables como hipotensión, bradicardia, hipocalcemia e hiperuricemia, por lo cual una gran proporción de pacientes recurre a las plantas medicinales. Una de éstas, adaptada a las condiciones geográficas de México, es *Dracocephalum moldavica* L. (Lamiaceae), la cual, además de otros usos, se emplea para controlar la hipertensión. Los pacientes la obtienen comúnmente en mercados de plantas medicinales. Los objetivos del presente estudio fueron evaluar la actividad vasorrelajante de los extractos diclorometánico y metanólico obtenidos a partir de las partes aéreas de una muestra de *D. moldavica*, mediante el ensayo de aorta aislada de rata, y realizar el estudio fitoquímico de sus metabolitos secundarios. Los resultados de la evaluación farmacológica indicaron que ambos extractos, el diclorometánico ( $CE_{50} = 68.43 \pm 1.2 \mu\text{g/mL}$ ) y el metanólico ( $CE_{50} = 56.16 \pm 1.1 \mu\text{g/mL}$ ), relajan la aorta de una manera dependiente de la concentración. Ambos extractos presentaron una potencia similar a la de la acetilcolina ( $CE_{50} = 46.37 \pm 1.1 \mu\text{g/mL}$ ), la cual se utilizó como control positivo. El estudio químico del extracto metanólico libre de taninos y clorofilas, por su parte, permitió la identificación mediante RMN de tres compuestos: el flavonoide tilianina como uno de los mayoritarios, así como 2 ácidos triperpénicos minoritarios, el ursólico y el oléanico, todos con actividad vasodilatadora previamente reportada. Éstos y otros compuestos fueron purificados utilizando cromatografías en columna (CC) y capa fina (CCF). El registro de los espectros de RMN de otros compuestos mayoritarios aislados se encuentra en proceso, con lo cual se espera enriquecer el panel de posibles marcadores químicos para el extracto polar (metanólico) que den un sustento científico al uso tradicional de esta especie para tratar la hipertensión.

**Palabras clave:** *Dracocephalum moldavica*, hipertensión, tilianina, ácido ursólico, ácido oleanólico

## ABSTRACT

Cardiovascular diseases are nowadays the main cause of deaths in Mexico and worldwide. In general, these diseases are incurable and can only be controlled by the available drugs. However, besides many adverse effects (hypotension, bradycardia, hypokalemia and hyperuricemia) they have, the current treatments are expensive, and then unaffordable for most of the patients, so that a large proportion of sufferers' resorts to medicinal plants. One of these, adapted to the geographical conditions of Mexico, is dragonhead [*Dracocephalum moldavica* L. (Lamiaceae)], which, among other uses, is employed to control high blood pressure. Patients commonly acquire it from popular medicinal plant markets. The aim of the present study was to assess the vasorelaxant activities of dichloromethane and methanol extracts obtained from the aerial parts of a commercial sample of this plant, and to chemically characterize some of its vasorelaxant secondary metabolites. The vasorelaxant effects were tested on rings of isolated rat aorta. It was found that both extracts relax the tissue in a concentration-dependent manner, with the  $EC_{50} = 68.43 \pm 1.2 \mu\text{g/mL}$  and  $56.16 \pm 1.1 \mu\text{g/mL}$ , respectively. Both extracts showed a similar potency than that of acetylcholine ( $EC_{50} = 46.37 \pm 1.1 \mu\text{g/mL}$ ), which was used as positive control. The chemical study of the tannins and chlorophylls-free methanol extract led to the identification of three compounds: the flavonone tilianin as one of the major compounds and two minor triterpenic acids, ursolic and oleanolic acids, all with previously reported vasodilator activity. These and other compounds were purified using open column (CC) and thin-layer (TLC) chromatographies. The structures of the three compounds were established based on extensive studies of their NMR spectra. In addition, NMR spectra recording of other purified major compounds is underway. It is hoped to enrich the panel of the possible chemical markers for the polar (methanol) extract to have a more consistent scientific basis for the traditional use of this species to treat hypertension.

Keywords: *Dracocephalum moldavica*, hypertension, tilianine, ursolic acid, oleanolic acid

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de manutención otorgada durante mis estudios de maestría.

Al Posgrado en Ciencias Químico-Biológicas por permitirme el ingreso y el desarrollo de esta investigación.

Al Fondo de Proyectos Especiales de Rectoría 2019 (FOPER-2019-01112) para el financiamiento para realizar los análisis de este proyecto.

A M en C. Eloy Rodríguez de León por su ayuda para el registro de los espectros de RMN y su interpretación para la elucidación estructural.

A mi asesor el Dr. Moustapha Bah por su apoyo para la realización de este proyecto y su paciencia hacia mi persona.

A mis sinodales y profesores por sus aportaciones a la realización de este trabajo.

A mi familia por su apoyo incondicional para llevar a término este proyecto.

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Productos naturales para la salud	3
2.2. Género <i>Dracocephalum</i>	3
2.3. Características botánicas de <i>Dracocephalum moldavica</i>	3
2.4. Distribución geográfica de <i>Dracocephalum moldavica</i>	5
2.5. Usos tradicionales de <i>Dracocephalum moldavica</i>	5
2.6. Efectos farmacológicos comprobados de <i>Dracocephalum</i> spp.	7
2.7. Perfil químico de <i>Dracocephalum</i> spp.	8
2.8. Metodología general de estudios fitoquímicos	10
2.8.1. Técnicas de extracción	10
2.8.2. Análisis fitoquímico	12
2.8.3. Técnicas de separación y purificación	13
2.8.4. Técnicas de elucidación estructural	14
2.9. Importancia de las enfermedades cardiovasculares	15
2.9.1. Definición de hipertensión	16
2.9.2. Tratamientos de la hipertensión	17
2.9.3. Situación de las enfermedades cardiovasculares en México	20
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. HIPÓTESIS	22
5. OBJETIVOS	23
5.1. General	23
5.2. Específicos	23
6. METODOLOGÍA	24

6.1.	Recolección del material vegetal	24
6.2.	Preparación de los extractos de <i>Dracocephalum moldavica</i>	24
6.3.	Fraccionamiento preliminar del extracto metanólico de <i>Dracocephalum moldavica</i>	24
6.4.	Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta del extracto metanólico libre de grasas y taninos	25
6.5.	Preparación del agente revelador sulfato cérico amoniacal	25
6.6.	Identificación de los compuestos aislados	26
6.7.	Ensayos farmacológicos	26
6.7.1	Análisis estadístico en los ensayos farmacológicos	27
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
7.1.	Rendimientos de los extractos obtenidos	28
7.2.	Fraccionamiento y purificación	28
7.3.	DMF-2-Y	28
7.3.1.	Procesamiento de DMF-2-Y	28
7.4.	DMF-4-Y	31
7.4.1.	Procesamiento de DMF-4-Y	31
7.4.2.	Elucidación estructural del compuesto DMF-4-Y	32
7.5.	DMF-3-Y-4	35
7.5.1.	Estudio químico de la muestra DMF-3-Y	35
7.5.2.	Elucidación estructural del compuesto DMF-3-Y-4	37
7.6.	DMF-6-Y	41
7.6.1.	Tratamiento de la fracción agrupada DMF-6-Y	41
7.6.2.	Análisis preliminar de los espectros de RMN de DMF-6-Y	42
7.7.	DMF-7-Y(S)	42
7.7.1.	Procesamiento de la fracción DMF-7-Y	42
7.7.2.	Elucidación estructural del compuesto DMF-7-Y(S)	43

7.8.	Evaluación de la actividad vasorrelajante de los extractos	46
8.	CONCLUSIONES	48
9.	PERSPECTIVAS	48
10	REFERENCIAS	49
11	ANEXO	58

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Fotografía de <i>Dracocephalum moldavica</i> .	4
2	Estructuras de algunos compuestos selectos identificados en <i>D. moldavica</i> .	11
3	Cromatograma en capa fina de la fracción DMF-2-Y.	30
4	Cromatograma bidimensional de la fracción DMF-2-Y.	30
5	Cromatogramas en capa fina analítica de la fracción DMF-4-Y [(A): unidimensional, (B): bidimensional].	32
6	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ del compuesto DMF-4-Y identificado como ácido ursólico.	33
7	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ modalidad DEPT del compuesto DMF-4-Y, el cual fue identificado como ácido ursólico.	33
8	Cromatograma en capa fina analítica de la fracción DMF-3-Y.	35
9	Cromatograma en capa fina preparativa de la fracción DMF-3-Y.	36
10	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ del compuesto DMF-3-Y-4 identificado como ácido oleanólico.	38
11	Región de campo alto (metilos singuletes) del espectro de RMN de $^1\text{H}$ del compuesto DMF-3-Y-4, identificado como ácido oleanólico.	38
12	Región de campo alto (metilos singuletes) del espectro DEPT $135^\circ$ del compuesto DMF-3-Y-4.	39
13	Cromatograma en capa fina analítica de la fracción DMF-6-Y.	41
14	Cromatograma en capa fina analítica bidimensional de la fracción DMF-6-Y.	42
15	Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ del compuesto DMF-7-Y(S) identificado como tilianina.	43
16	Estructuras de los 3 compuestos identificados en el EMLGT.	45
17	Curvas concentración-respuesta de los extractos y de la acetilcolina, utilizada como control positivo.	46

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Información taxonómica de <i>Dracocephalum moldavica</i> .	4
2	Algunos de los compuestos identificados en los aceites esenciales de <i>D. moldavica</i> .	9
3	Compuestos identificados en extractos hidroalcohólicos de <i>D. moldavica</i> .	9
4	Compuestos identificados en extractos acuosos de <i>D. moldavica</i> .	10
5	Fracciones obtenidas de la CC del EMLGT.	29
6	Constantes espectroscópicas de DMF-4-Y (500 MHz, en DMSO-d <sub>6</sub> ).	34
7	Rendimiento de las fracciones obtenidas por CCF preparativa de la fracción DMF-3-Y.	36
8	Constantes espectroscópicas de DMF-3-Y-4 (500 MHz, en CDCl <sub>3</sub> ).	39
9	Constantes espectroscópicas de DMF-7-Y(S) (500 MHz, en C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N).	44

## GLOSARIO DE TÉRMINOS

$^{13}\text{C}$ -RMN: Resonancia Magnética Nuclear de  $^{13}\text{C}$ .

$^1\text{H}$ -RMN: Resonancia Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$ .

ACh: Acetilcolina.

AcOEt: Acetato de etilo.

MeOH: Metanol.

DCM: Diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ).

CC: Cromatografía en Columna.

CCF: Cromatografía en Capa Fina.

CCFP: Cromatografía en capa fina preparativa.

CCR: Curva Concentración-Respuesta.

DEPT: en inglés: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer.

HMBC: en inglés: Heteronuclear Multiple Bound Correlation.

HPLC: Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (del inglés: High Performance Liquid Chromatography).

HSQC: del inglés: Heteronuclear Simple-Quantum Coherence.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

## 1. INTRODUCCIÓN

Durante siglos, los productos naturales han sido un apoyo muy grande a la supervivencia del ser humano, pues han servido como fuente de alimentos y remedios a gran variedad de padecimientos. En las últimas décadas, se han vuelto a retomar esos productos como fuentes de compuestos con actividad biológica que pueden convertirse en nuevos medicamentos o servir como fuente de inspiración para el desarrollo de éstos ante el problema del creciente aumento de las enfermedades crónico-degenerativas y las limitaciones de la síntesis total de fármacos (Newman y Cragg, 2016).

Un grupo de importancia dentro de las enfermedades crónico-degenerativas es el de los padecimientos cardiovasculares, que representan un problema grave en países en los cuales los ingresos económicos de la población son bajos o medios, como es el caso de México donde son la primera causa de muerte (INEGI, 2017).

En México, el uso de la medicina tradicional para el tratamiento de diferentes padecimientos, incluidos los cardiovasculares, como un apoyo a la medicina moderna, está muy arraigado, debido a su riqueza botánica y cultural. Además, nuestro país ha permitido el crecimiento de especies foráneas que se han ido introduciendo dentro de la medicina tradicional mexicana, como lo es el caso del llamado toronjil extranjero, chino o azul [*Dracocephalum moldavica* L. (Lamiaceae)] que ha sido utilizado principalmente junto con los toronjiles mexicanos (*Agastache* spp.) en padecimientos del sistema nervioso central, así como para tratar tos, picaduras de alacrán e hipertensión (Loredo-Medina y col., 2002). Sin embargo, en México, la investigación de *D. moldavica* se ha limitado principalmente a la evaluación de su efecto sobre el sistema nervioso central, aunque de manera preliminar, se ha determinado el efecto vasodilatador del extracto acuoso en el modelo de aorta aislada de rata en el cual demostró su potencial como fuente de compuestos vasorrelajantes (Ibarra-Alvarado y col., 2010). El presente proyecto se enfocó en la investigación del efecto vasorrelajante de los extractos metanólico, libre de grasas y taninos, y del diclorometánico de *D.*

*moldavica* en el modelo de aorta aislada de rata, así como caracterizar químicamente los compuestos relacionados con este efecto.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Productos naturales para la salud

Los productos naturales han sido utilizados durante siglos, como remedios (Kuo y col., 2009) y en las últimas décadas han sido fuente de una gran cantidad de compuestos con actividad biológica (Çitoğlu y Acikara, 2012).

El potencial de los productos naturales es muy grande y sólo una pequeña proporción de ellos ha sido investigada de manera científica. En países europeos, se han integrado al sistema de salud los fitomedicamentos, aunque sus componentes químicos y sus mecanismos de acción no sean completamente conocidos (Keskin y col., 2012) y entre esos productos comerciales, destacan los relacionados con el sistema cardiovascular (Edwards y col., 2012). De manera adicional, se ha suplementado la dieta con fitoquímicos como una forma de prevención de la enfermedad, aunque en la mayor parte de los casos, sin el desarrollo de protocolos para su análisis químico (Calgiani y col., 2013).

### 2.2. Género *Dracocephalum*

Alrededor del mundo, el género *Dracocephalum* se distribuye en América, Europa y Asia (Jäntschi y Bolboacă, 2013). El género *Dracocephalum* pertenece a la familia Lamiaceae y cuenta con 70 especies; de ellas se ha investigado principalmente el aceite esencial. La más investigada es *D. moldavica* originaria de Siberia y Asia Central (Weremczuk-Jeżyna y col., 2013). En Europa, es una especie cultivada, mientras que en China se usa junto con *Dracocephalum tanguticum* Maxim (Kakasy y col., 2006; Selenge y col., 2014; Li y col., 2016). Recientemente, se ha prestado más atención al género por sus diversos efectos biológicos (Selenge y col., 2014).

### 2.3. Características botánicas de *Dracocephalum moldavica*

*Dracocephalum moldavica* (Cuadro 1) es una planta herbácea, anual, que alcanza 25-75 cm de altura (Maham y col., 2013). El tallo es recto y se divide en

4. Las hojas son opuestas, largas, de forma ovalada y con tallos cortos. Las flores

son de color azul-violeta en pedículos cortos (Figura 1) (Nikitina y col., 2008). Su clasificación taxonómica se indica en el Cuadro 1.



Figura 1. Fotografía de *Dracocephalum moldavica* (Sudenius, 2012).

Cuadro 1. Información taxonómica de *Dracocephalum moldavica* (Tropicos, 2019).

Clase	Equisetopsida
Subclase	Mongoliidae
Superorden	Asteranae
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Género	Dracocephalum
Especie	<i>Dracocephalum moldavica</i> L

#### 2.4. Distribución geográfica de *Dracocephalum moldavica*

*Dracocephalum moldavica* es una especie nativa de Asia, que se ha adaptado bien a las condiciones de México (López-Rubalcava y Estrada-Camarena, 2016). Se reporta que se encuentra en el ejido El Rosario en el municipio de Ocampo en Michoacán, en la Reserva de la Biosfera de la Mariposa Monarca (Loredo-Medina y col., 2002).

*Dracocephalum moldavica* es conocida en otros países como cabeza de dragón y bálsamo de dragón y, en México, como toronjil azul o extranjero (López-Rubalcava y Estrada-Camarena, 2016). Se ha reportado que las características farmacológicas de la planta son afectadas por factores genéticos y ecológicos (Golparvar y col., 2016; Li y col., 2016).

En 2006, *D. moldavica* fue introducida en Egipto y debido a su potencial como fuente de compuestos con actividad biológica, se buscó la forma de mejorar las condiciones de espaciamiento y nutrientes para que la planta mejorara los rendimientos de metabolitos secundarios en el aceite esencial (Hussein y col., 2006).

#### 2.5. Usos tradicionales de *Dracocephalum moldavica*

Algunas especies de este género son usadas en la medicina tradicional de diversos países como analgésicos, también en el tratamiento de enfermedades renales, dolor de dientes, resfriado, angina, enfermedades cardiovasculares, migraña, neuralgia, digestivo, carminativo, digestivo, antiemético (Tajabadi y col., 2017; Miraldi y col., 2001).

*Dracocephalum moldavica*, en particular es usada en el tratamiento de padecimientos cardiovasculares, atribuyéndose su actividad benéfica principalmente a la presencia del ácido rosmarínico, éster dimérico del ácido caféico, el cual reduce el estado cardiopatológico y la presión sanguínea (Karthik

y col., 2011) y protege contra el infarto agudo al miocardio (Najafi y col., 2008, Javidanpour y col., 2017). Por esta razón, se ha tratado de controlar las condiciones de su crecimiento para poder suministrar este dímero del ácido caféico a diferentes industrias (Weremczuk-Jeżyna y col., 2013).

En México, algunas veces, la especie es usada en combinación con otras plantas, en diversas preparaciones. Por ejemplo, en conjunto con *Agastache mexicana xolocotziana* y *Agastache mexicana mexicana*, se prepara una infusión conocida como “Los tres toronjiles”, la cual es usada como agente sedativo y tranquilizante, sin ser ansiolítico, en lo que popularmente se conoce como “nervios” (Loredo-Medina y col., 2002; Guzmán-Gutiérrez y col., 2014; Heinrich y col., 2014; López-Rubalcava y Estrada-Camarena, 2016).

“Los tres toronjiles” no es la única combinación en la que se usa *D. moldavica*; pues existe una infusión preparada con canela (*Cinammonum* sp.), flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*), tila (*Tentstroemina* spp.), azahar (*Citrus* spp.) e hinojo (*Foeniculum vulgare*) que se usa para el alivio de desórdenes nerviosos (Martínez-Vázquez y col., 2012).

En la medicina tradicional mexicana, *D. moldavica* además de su uso en desórdenes del sistema nervioso central, también se ha usado en casos de desmayos, enfermedades catarrales, curación de heridas, en el tratamiento de “aire”, dolor de cabeza, dolor de estómago, “espanto” o “susto”, mareos, picaduras de escorpión, hipertensión, pulmonía y tos (Loredo-Medina y col., 2002; López-Rubalcava y Estrada-Camarena, 2016).

*Dracocephalum moldavica* es una de las 92 especies reportadas por Guzmán-Gutiérrez y colaboradores (2014) para el tratamiento del “susto” en la medicina tradicional y que representan entre 2.74 y 2.96% del total de plantas medicinales en México.

Debido a su alto contenido de compuestos fenólicos, se creó un “snack”, al que se adicionaron durante su preparación hojas de *D. moldavica*, haciéndolo un alimento funcional rico en fibra y con potencial antioxidante (Wójtowicz y col., 2017).

## 2.6. Efectos farmacológicos comprobados de *Dracocephalum* spp.

Se ha comprobado experimentalmente su actividad antirreumática, antitumoral, antimutagénica, antioxidante, antiséptica, estimulante (Golparvar y col., 2016), inmunomoduladora, antihipóxica, antimicrobiana (Li y col., 2016), tripanocida y cardioprotectora (Jäntschi y Bolboacă, 2013). Se ha reportado que el extracto hidroalcohólico tiene actividad adaptogénica y neurotrópica (Nikitina y col., 2008). También se ha probado en modelo de corazón aislado de rata, su efecto cardioprotector contra daños por isquemia y reperfusión (Najafi y col., 2008), mientras que, en modelos de rata de isquemia, la fracción rica en compuestos fenólicos ha demostrado ser eficaz como cardioprotector en estos episodios y como posible remedio para tratar enfermedades coronarias (Zeng y col., 2010, Jiang y col., 2014).

Los extractos hidrometanólicos ricos en polifenoles de *D. moldavica* europea (Rumania) mostraron actividad protectora contra genotoxicidad inducida por bleomicina y varía su actividad antioxidante al comparar con extractos de *D. moldavica* que crece en otros lugares como Rusia y Asia Oriental (Aprostosaie y col., 2016). De manera adicional, en ratones, los extractos hexánico e hidrometanólico mostraron un efecto similar al fármaco imipramina en el tratamiento de depresión (Jiménez-Zúñiga y col., 2016).

En modelos de rata, el extracto hidroetanólico de *D. moldavica* por su parte, mostró protección contra la enfermedad de montaña crónica, al lograr disminuir la presión arterial (Maimaitiyiming y col., 2014).

El aceite esencial de *D. moldavica* tiene actividad insecticida contra *Sitophilus zeamais* y *Tribolium castaneum* (Chu y col., 2011), mientras que los extractos ricos en flavonoides exhiben actividad antiinflamatoria en células musculares vasculares lisas (Xing y col., 2013).

En México, se comprobó la actividad vasodilatadora del extracto acuoso de esta especie en aorta aislada de rata. En dicho estudio, también se determinó la presencia de algunos compuestos fenólicos en el extracto acuoso obtenido de la maceración de las partes aéreas (Ibarra-Alvarado y col., 2010).

## 2.7. Perfil químico de *Dracocephalum* spp.

Los estudios fitoquímicos de especies del género *Dracocephalum* fueron enfocados en un principio principalmente en componentes volátiles y su actividad antioxidante (Dastmalchi y col., 2007).

Sin embargo, dichos estudios se han ampliado y hasta el año 2017, se habían reportado 246 compuestos de diferente naturaleza, tales como flavonoides, terpenoides, esteroides, glicósidos y componentes volátiles. Debido a su composición química compleja y el sinergismo que causan sus metabolitos secundarios, es necesario el desarrollo de procedimientos analíticos para definir cantidades óptimas para uso medicinal (Li y col., 2016, Tajabadi y col., 2017), pues la calidad de la planta como medicamento depende de su contenido químico que varía de acuerdo con su ubicación geográfica y la temporada de recolección (Li y col., 2016).

De diferentes extractos de *D. moldavica*, se han identificado una gran variedad de compuestos (Cuadros 2-4).

Cuadro 2. Algunos de los compuestos identificados en los aceites esenciales de *D. moldavica*.

Compuestos	Referencias
Acetofenona, $\delta$ -terpineol, 4-terpineol, <i>cis</i> -carveol, $\alpha$ -pineno, carvona, , germacreno-D, óxido de cariofileno, $\delta$ -terpineol, sabineno	Chu y col., 2011
Mirceno, limoneno, $\alpha$ -terpineno, <i>p</i> -cimeno, óxido de linalool, linalool, <i>cis</i> -crisantenol	Golparvar y col., 2016
Linalool, geraniol, geranial, timol, <i>p</i> -cimeno, acetato de nerilo, <i>E</i> -citral, 1,8-cineol,	Tajabadi y col., 2017

Cuadro 3. Compuestos identificados en extractos hidroalcohólicos de *D. moldavica*.

Compuestos	Referencia
Kaempferol, quercetina, esculetina, diosmetina, acacetina, apigenina, santaflavona, luteolina, cirsimaritina, salvigenina, agastacósido, ácido rosmarínico, 7-O- $\beta$ -D-glucopiranosil acacetina, 7-O-neohesperidosil diosmetina, 7-O-neohesperosil acacetina, 7-O-neohesperosil-luteolina, 7-O- $\beta$ -D-glucuronil-luteolina, 7-O- $\beta$ -D-glucuronil-apigenina, 7-O- $\beta$ -D-glucuronil diosmetina, 7-O- $\beta$ -D-glucuronil acacetina	Yang y col., 2014a

Cuadro 4. Compuestos identificados en extractos acuosos de *D. moldavica*.

Compuestos	Referencias
7-O-β-(6''-O-malonil)- acatenina, 7-O-β-(6''-O-malonil)- apigenina	Li y col., 2016
(-)-rabdosina, (+)-rabdosina, ácido rosmarínico, ácido metilrosmarínico, (+)-rabdosinato de sodio, rosmarinato de sodio, (+)-danshensu	Zhang y col., 2017
7-O-β-D-(6''-O-malonil)-glucosil acacetina, 7-O-(6''acetil)-glucosil acacetina, 7-O-β-D-(6''-O-malonil)-glucosil luteolina, 7-O-β-D-glucuronil 3'-metoxiacacetina, 7-O-β-(6''-O-malonil)-glucosil apigenina, 7-β-O-glucosil diosmetina, 6-malonil-arbutina, diosmetina, 8-hidroxi-salvigenina	Martínez-Vázquez y col., 2012
Salvigenina, gardenina A	López-Rubalcava y Estrada-Camarena, 2016

En *Dracocephalum tanguticum*, se han reportado glicósidos de espermidina, los dracotanósidos A-D (Li y col., 2016). En *Dracocephalum rupestre*, se han aislado 16 flavoalcaloides llamados dracocefina, cuyas estructuras químicas consisten en la conjugación de una flavona y una pirrolidin-2-ona (Khadem y Marles, 2012). En la Figura 2, se representan estructuras selectas de los compuestos identificados en *Dracocephalum moldavica*.

## 2.8. Metodología general de estudios fitoquímicos

### 2.8.1. Técnicas de extracción

La extracción es la liberación de los productos naturales deseados del material crudo que puede usarse en estudios farmacológicos o hacer pruebas

preliminares de los compuestos presentes. La elección de un método de extracción depende de la naturaleza del material, de los compuestos, así como del propósito con que se hace (Zhang y col., 2018 Brusotti y col.; 2014, Sticher, 2008).

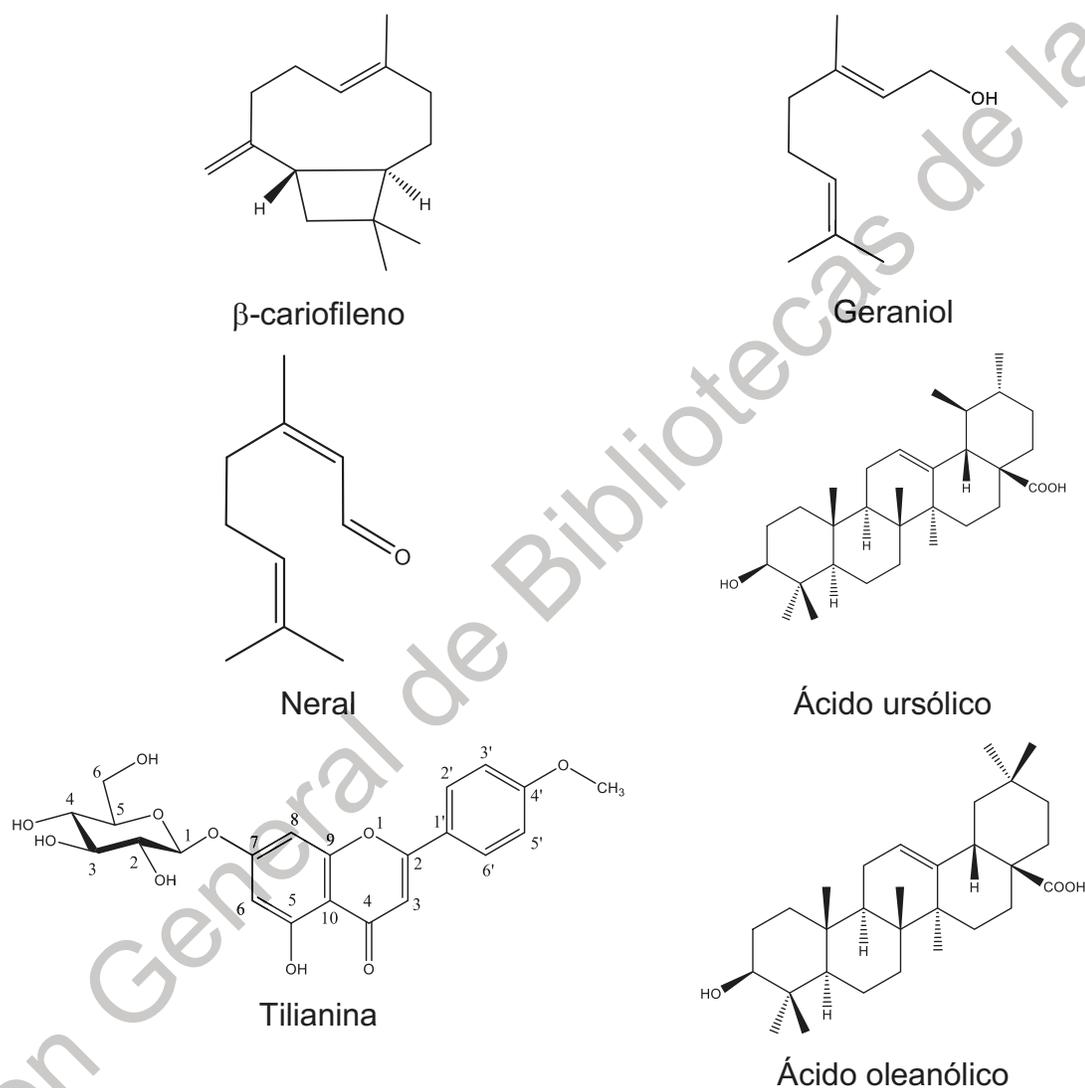


Figura 2. Estructuras de algunos compuestos selectos identificados EN *D. moldavica*.

La mayoría de los procesos de extracción son del tipo sólido-líquido, en el que se usa un solvente que se difunde dentro de las células, solubiliza los

metabolitos y los difunde en el exterior de la célula. Generalmente, se utilizan como solventes hidrocarburos clorados, ésteres y alcoholes de bajo peso molecular e incluso agua. Sin embargo, con el propósito de evitar contaminación por hongo, o acción de enzimas, se acostumbra a eliminar el agua del material de estudio (proceso conocido como desecación), previo a la extracción con disolventes orgánicos. Posteriormente, el material vegetal seco se extrae utilizando diferentes métodos: maceración, extracción con solvente asistida con ultrasonido, percolación, Soxhlet, destilación por reflujo o arrastre con vapor y extracción ácido-base (Zhang y col., 2018; Brusotti y col.; 2014).

Otra manera de extracción es usando fluido supercrítico, que desplaza a los compuestos orgánicos, siendo más inocuo al ambiente y sus propiedades pueden ser variadas en función de la temperatura o la presión, pero este método requiere de equipos especiales para ello (Brusotti y col.; 2014).

#### 2.8.2. Análisis fitoquímico

En los últimos años, la investigación de productos naturales ha ganado impulso por los desarrollos alcanzados en las técnicas de separación, así como en las espectroscópicas, los ensayos *in vitro* ultrasensibles y el cribado de alto rendimiento [*High Throughput Screening* (HTS)] (Sarker y Nahar, 2012).

En cuanto a los análisis de pre-aislamiento de los extractos crudos de diferentes matrices, aislamiento, detección en línea, derreplicación, estudios de quimiotaxonomía y biosíntesis, huella digital química, control de calidad de productos herbales y estudios metabolómicos, estas determinaciones se han vuelto más sencillas con el desarrollo de técnicas modernas sofisticadas acopladas, como cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), cromatografía de líquidos con detectores de arreglo de diodos (PDA: en inglés, Photo Diode Array), espectroscopia infrarroja con Transformada de Fourier (IR-TF), Resonancia Magnética Nuclear (RMN), cromatografía de líquidos (LC: en inglés, Liquid Chromatography) acoplada a resonancia magnética nuclear

acoplada a espectrometría de masas (MS: en inglés, Mass Spectrometry) y electroforesis capilar acoplada a espectrometría de masas (Altemimi y col., 2017).

Junto con las técnicas de separación, aislamiento y elucidación estructural, ha habido una evolución en la estrategia de la investigación de productos naturales y estas últimas se dividen en dos:

a) Las viejas estrategias: predominantemente enfocadas en compuestos mayoritarios, sin importar la actividad, principalmente de plantas superiores, seguido de los ensayos biológicos, el estudio quimiotaxonómico y la selección en base a la información etnofarmacológica o uso tradicional (Sarker y Nahar, 2012).

b) La estrategia moderna está guiada por los bioensayos *in vivo*, para identificación y aislamiento de los compuestos líderes de la fuente natural, la producción de librerías para evitar la derreplicación, la producción de compuestos activos en tejidos usando células manipuladas genéticamente y química combinatoria natural, la introducción de técnicas usadas en metabolómica identificando sus huellas digitales químicas, el uso de organismos diversos y la búsqueda por uso tradicional y aleatorio (Sarker y Nahar, 2012).

### 2.8.3. Técnicas de separación y purificación

Como en la extracción, hay que considerar un grupo de características de la naturaleza de los metabolitos para poder aislar los de interés en la fracción cruda; tales serían la solubilidad, propiedades ácido-base, carga, estabilidad y tamaño molecular. La mayoría de las separaciones por cromatografía son en estado líquido-sólido en forma planar y por columna (Sarker y Nahar, 2012).

La forma más usada de separar y aislar es la cromatografía en sus modalidades clásicas y modernas como la cromatografía flash, cromatografía en columna abierta, cromatografía en capa fina, cromatografía en capa fina preparativa (CCFP), cromatografía de intercambio iónico, cromatografía en

columna seca, cromatografía en capa fina de alta resolución, cromatografía multi flash, cromatografía de líquidos de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography, por sus siglas en inglés HPLC), cromatografía de líquidos usando vacío, cromatografía en fase sólida, cromatografía de fluido supercrítico, destilación molecular y las modalidades acopladas: HPLC-PDA, LC-MS, LC-MS-NMR (Zhang y col., 2018; Sarker y Nahar, 2012; Brusotti y col., 2014, Sticher, 2008).

#### 2.8.4. Técnicas de elucidación estructural

Una vez aislado un compuesto de la fuente natural, es necesaria la identificación de la estructura; este es un proceso que consume una gran cantidad de tiempo y es considerado un cuello de botella en la investigación de productos naturales. La forma más segura de elucidación es con el uso de métodos espectroscópicos y en algunos casos con la ayuda de la inteligencia artificial (Sarker y Nahar, 2012).

Los métodos espectroscópicos más usados son:

- a) Espectroscopia infrarroja, la cual da información sobre los grupos funcionales presentes en la molécula,
- b) Espectrometría de masas, que proporciona la masa molecular, fórmula molecular y patrón de fragmentación, siendo las formas de ionización más usadas, el impacto electrónico, electrospray, ionización química, bombardeo rápido atómico y la desorción de matriz asistida con láser.
- c) Sin embargo, la espectroscopía que proporciona un panorama más completo sobre la estructura de un compuesto orgánico es la resonancia magnética nuclear, la cual provee información sobre el número y tipo de carbonos e hidrógenos en la molécula, así como sus relaciones. Ésta se divide en dos: la NMR unidimensional y la bidimensional.

d) Para compuestos cristalinos, la cristalografía de rayos X proporciona la estructura cristalina de la molécula.

e) Dada la frecuencia de la presencia de numerosos centros quirales en los metabolitos secundarios, la polarimetría proporciona información acerca de la estereoquímica de dichos centros (Ingle y col., 2017; Sarker y Nahar, 2012).

## 2.9. Importancia de las enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares son un conjunto de trastornos que involucran al corazón y los vasos sanguíneos, que afectan principalmente a los países de bajos y medianos ingresos. A nivel mundial, esas enfermedades representan 31% de las muertes totales anuales, o sea 17.7 millones de muertes (WHO, 2017a).

La urbanización, la industrialización y la globalización que acompañan la transición económica traen consigo cambios en los modos de vida que propician las enfermedades cardíacas, como el consumo de tabaco, dieta no saludable, inactividad física y consumo excesivo de alcohol (WHO, 2017b).

La atención clínica de las enfermedades cardiovasculares es costosa y prolongada. Estos costos directos desvían los escasos recursos de las familias y las sociedades hacia la atención médica. Estas enfermedades afectan a las personas en plena madurez, por lo que desbaratan el futuro de las familias que dependen de ellas y socavan el desarrollo de las naciones al privarlas de valiosos recursos humanos en sus años más productivos. En los países desarrollados, los grupos socioeconómicos más bajos registran una mayor prevalencia de factores de riesgo, una incidencia más alta de enfermedades y una mortalidad mayor. En los países en desarrollo, a medida que la epidemia de las enfermedades cardiovasculares se vaya asentando, la carga se desplazará hacia los grupos socioeconómicos más desfavorecidos (WHO, 2017c).

Por medio de la iniciativa *Global Hearts*, la Organización Mundial de la Salud (OMS), planea la disminución de estas enfermedades por medio del fortalecimiento del manejo de enfermedades cardiovasculares en el cuidado primario de la salud. Después de esta iniciativa, siguió una segunda, llamada *Resolve to Save Lives*, que regenera el ímpetu de los esfuerzos de la anterior (WHO, 2017a; WHO, 2017b).

### 2.9.1. Definición de hipertensión

Se define que un paciente padece de hipertensión crónica, cuando la presión arterial media es más alta de un intervalo aceptado como normal (Hall, 2011) y depende de la edad y población. En el caso de México, lo dictamina el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), el cual lo publica en la guía “Consenso de Hipertensión Arterial Sistémica en México”. En esta guía, se considera que un paciente es hipertenso, cuando su presión sistólica es mayor a 140 mm Hg y la diastólica mayor a 90 mm Hg (Rosas-Peralta y col., 2016).

La hipertensión es más frecuente conforme avanza la edad, pues con el envejecimiento hay mayor acumulación de lípidos en las fibras de elastina de las arterias, lo cual facilita el depósito de calcio en ellas. Además de aumentar el grosor de la capa media arterial, hay hiperplasia e hipertrofia de las células musculares lisas que generan un aumento de la síntesis de colágeno y actividad de elastasas, con la consecuente destrucción de la elastina, aumentando la rigidez de las arterias que termina aumentando la presión sistólica y disminuyendo la presión diastólica (IMSS, 2017).

Hay numerosos factores relacionados con el desarrollo de hipertensión arterial, algunos modificables como la obesidad, dieta, actividad física, comorbilidades y otros no modificables como la edad, el historial familiar y el grupo poblacional (IMSS, 2017).

## 2.9.2. Tratamientos de la hipertensión

Para tratar esta condición y mantener la presión arterial media dentro de los parámetros normales, se hace uso de varios grupos de medicamentos, que se administran dependiendo de la condición del paciente (Rosas-Peralta y col., 2016; Melin, 2015).

### a) Diuréticos

Son el grupo de medicamentos de primera elección para el tratamiento de la hipertensión arterial sistémica cuyo mecanismo se basa en la disminución del volumen sanguíneo. Son baratos, seguros y efectivos para prevenir falla cardíaca, infarto al miocardio y ataque al corazón. Se debe hacer monitoreo de las concentraciones de electrolitos para evitar su desbalance. Ejemplos de este grupo son la furosemida, hidroclorotiazida y amilorida (Rosas-Peralta y col., 2016; Melin, 2015)

### b) Betabloqueadores

Este grupo de medicamentos es usado para el tratamiento de la hipertensión, mediante la disminución del flujo cardíaco y bloqueando los receptores  $\beta$ . Son la opción para pacientes con enfermedad cardíaca concomitante o falla cardíaca. Reducen la presión sanguínea al disminuir el gasto cardíaco. Pueden disminuir el flujo desde el sistema nervioso central e inhiben la liberación de renina desde los riñones, disminuyendo la formación de angiotensina II (AT-2) y la secreción de aldosterona. Tiene como efectos adversos hipotensión, bradicardia, fatiga, insomnio, disfunción sexual, aletargamiento y alteraciones del metabolismo de lípidos. Algunos medicamentos pertenecientes a este grupo son el metoprolol y propranolol (Rosas-Peralta y col., 2016; Melin, 2015).

### c) Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina

Los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) son usados en pacientes con condición resistente a fármacos. Los inhibidores de la ECA reducen la presión sanguínea por medio de la reducción de la resistencia vascular periférica sin incrementar el gasto cardíaco, la frecuencia cardíaca o la

contractibilidad mediante el bloqueo de la ECA, que es una enzima que escinde la angiotensina I en angiotensina II, la cual es un potente vasoconstrictor. Los efectos secundarios de inhibidores de la ECA son tos seca, hipercalemia, hipotensión y angioedema. Ejemplos de este grupo de medicamentos son el captopril y el enalapril (Rosas-Peralta y col., 2016; Melin, 2015).

d) Antagonistas de los receptores de angiotensina I

El efecto farmacológico de los bloqueadores del receptor de angiotensina 1 (AT<sub>1</sub>) es similar a la de los inhibidores de la ECA. Esos fármacos disminuyen la activación del receptor AT<sub>1</sub> por parte de la angiotensina II. Son usados en pacientes con enfermedades crónicas concomitantes. Los efectos secundarios son iguales a los de los inhibidores de la ECA, además de que este grupo es teratogénico. En este grupo de medicamentos está el losartán y el irbesartan (Rosas-Peralta y col., 2016; Melin, 2015).

e) Bloqueadores del canal de calcio

Este grupo de medicamentos es usado en pacientes con diabetes o angina. El calcio juega un papel importante en la contracción muscular y el mantenimiento del tono muscular, así que los bloqueadores de canal de calcio impiden el flujo de calcio al interior de las células musculares mediante su unión a los canales de calcio tipo L, causando la relajación. Los efectos adversos incluyen mareo, enrojecimiento, dolor de cabeza, hipotensión y edema periférico. Dentro de este grupo se encuentran el verapamilo, el diltiazem y el nifedipilo (Rosas-Peralta y col., 2016; Melin, 2015).

f) Alfabloqueadores

Los alfabloqueadores disminuyen la presión arterial periférica, debido a que relajan el músculo liso venoso y arterial por medio del bloqueo competitivo de los

receptores adrenérgicos  $\alpha_1$ . Son usados en pacientes con hipertensión arterial refractaria, no como medicamentos de primera línea. Los efectos secundarios incluyen la retención de sal y agua. Este grupo incluye a la prazosina y la doxazosina (Rosas-Peralta y col., 2016; Melin, 2015).

g) Alfabetabloqueadores

Son medicamentos que causan vasodilatación periférica, que aprovechan el bloqueo de los receptores beta en el corazón. Gozan de buena eficacia, pero son usados sólo en ciertos casos como la hipertensión gestacional y casos de emergencia. Este grupo incluye al labetalol y al carvedilol (Rosas-Peralta y col., 2016; Melin, 2015).

h) Vasodilatadores directos

Son un grupo de medicamentos que relajan directamente al músculo liso como la hidralazina y el minoxidil. Producen efecto reflejo en el corazón que causa aumento de contractibilidad cardíaca, frecuencia cardíaca y consumo de oxígeno. Los efectos secundarios incluyen dolor de cabeza, taquicardia, náuseas, sudoración y arritmia. Dichos efectos pueden ser bloqueados con el uso de diuréticos y  $\beta$ -bloqueadores (Rosas-Peralta y col., 2016; Melin, 2015).

i) Inhibidores directos del sistema nervioso

Estos agentes terapéuticos como la clonidina tienen efecto al inhibir los centros vasomotores simpáticos, disminuyendo el flujo simpático a la periferia y con ello la resistencia vascular periférica y la presión sanguínea, pero sus efectos secundarios y la existencia de fármacos de mejor eficacia limita su uso para casos muy específicos (Rosas-Peralta y col., 2016; Melin, 2015).

#### j) Bloqueadores de renina

Los bloqueadores de la renina inhiben directamente a la renina por lo que actúan de forma temprana en el sistema renina-angiotensina-aldosterona, de manera similar a los inhibidores de la ECA o los bloqueadores del receptor AT<sub>1</sub>. Su efectividad es similar a estos dos grupos. Los efectos secundarios reportados son diarrea, tos, angioedema; están contraindicados en el embarazo. El único medicamento aprobado de este grupo es el aliskiren (Rosas-Peralta y col., 2016; Melin, 2015).

#### 2.9.3. Situación de las enfermedades cardiovasculares en México

Con la modificación de la pirámide poblacional en México, debido al incremento de población envejecida, la disminución de la natalidad y las políticas de salud, se espera que para 2030, uno de cada 6 habitantes sea mayor de 60 años, multiplicando la prevalencia de enfermedades crónico-degenerativas. Se estima que para 2050, 20% de la población mundial será mayor de 80 años y con ello ocurrirá un incremento lineal de la hipertensión arterial (IMSS, 2017): Esto representa según la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) una futura crisis de salud pública (IMCO, 2018).

En la Encuesta Nacional de Salud realizada en 2016, la prevalencia de la hipertensión arterial en México era de 25.5%, de los cuales 40.0% desconocían que la padecían y sólo el 58.7% de estos últimos mantiene el control sobre esta condición (Shamah-Levy y col., 2017). Además, en reportes de la OCDE, México es el segundo país con mayor gasto de bolsillo en salud, lo que con la presencia de enfermedades crónico-degenerativas dentro de una familia la puede condicionar a caer en la pobreza además del recorte en el presupuesto para Salud Pública (IMCO, 2018).

En 2015, en México se registraron 655 mil defunciones, con las siguientes principales causas: a) enfermedades del sistema circulatorio: 25.5%, b) enfermedades endócrinas, nutricionales y metabólicas: 17.5%, y c) tumores

malignos: 13%. Dentro de estas agrupaciones, hay una diversidad de enfermedades que, de manera segregada, dan un mayor contexto del cuadro epidemiológico por el cual fallece la población. Considerando el desglose, las primeras causas de muerte son diabetes mellitus (15%), enfermedades isquémicas del corazón (13.4%), de hígado (5.4%), cerebrovasculares (5.2%), crónicas de las vías respiratorias inferiores (4%), hipertensivas (3.5%) y las agresiones (3.2%) que en conjunto representan casi la mitad (49.7%) de los decesos totales (INEGI, 2017).

En mujeres de 30 a 44 años, las enfermedades isquémicas del corazón representan la tercera causa de muerte (5%) y en mujeres de 45 a 59 años se empieza a presentar una disfunción gradual en el sistema corporal que se agudiza con la edad y las hace llegar a un patrón epidemiológico parecido al de los adultos mayores. En hombres de 30 a 59 años, las enfermedades isquémicas del corazón constituyen la tercera causa de muerte (12.1%). En la población de 60 años y más, las enfermedades isquémicas son la principal causa de muerte (17.9%) en hombres, y en las mujeres, la segunda (16.6%) (INEGI, 2017).

### 3. JUSTIFICACIÓN

México está dentro de los países de mayor diversidad biológica y cuenta con una amplia cantidad de organismos usados en la medicina tradicional (Sarukhán y col., 2009), muchos de ellos sin investigación que compruebe su efectividad y composición. Incluso se han adaptado especies no nativas que se han integrado en la medicina tradicional como es *Dracocephalum moldavica* L., especie vegetal originaria de Asia. Sin embargo, la información sobre ella es limitada y no aparece en la base de datos sobre la medicina tradicional mexicana de la UNAM (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana), más que como mención junto con las plantas a las que se asocia para su uso tradicional (*Agastache* spp.), además de que no se encuentra documentada su distribución en México. Como suele ocurrir, la diferencia en su composición química es dependiente de las condiciones en las que crece, principalmente la geografía, y las condiciones climáticas y del suelo asociadas. Dado su uso en la medicina tradicional como antihipertensivo (Loredo-Medina y col., 2002) y teniendo en cuenta la preponderancia de las enfermedades cardiovasculares en nuestro país (25% de todas las defunciones en 2015) según las más recientes estadísticas publicadas por el INEGI en 2017, aunado al costo económico para el paciente y el estado, así como la repercusión que tienen sobre el desarrollo del país y atendiendo a la recomendación de la Organización Mundial de la Salud, resulta importante explorar su perfil químico y su potencial vasorrelajante, con la finalidad de contribuir a la resolución de estos problemas, utilizando un recurso disponible en los mercados populares y accesible para cualquier ciudadano.

### 4. HIPÓTESIS

Los extractos obtenidos con diclorometano y metanol a partir de las partes aéreas de una muestra comercial representativa de *Dracocephalum moldavica* contienen compuestos vasorrelajantes que soportan su uso tradicional.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1. General

Determinar el efecto vasorrelajante de los extractos diclorometánico y metanólico de *D. moldavica* y caracterizar químicamente sus principales metabolitos secundarios con ese efecto.

### 5.2. Específicos

- Obtener extractos diclorometánico y metanólico de las partes aéreas de *D. moldavica*.
- Determinar la actividad vasorrelajante de los extractos obtenidos sobre el tono del músculo liso de la aorta aislada de rata.
- Obtener constituyentes purificados a partir del extracto polar.
- Establecer la estructura química de los metabolitos aislados mediante resonancia magnética nuclear en sus modalidades  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT, COSY, HSQC y HMBC.
- Determinar la actividad vasodilatadora de los compuestos caracterizados y no evaluados en estudios anteriores.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1. Recolección del material vegetal

Las partes aéreas de *Dracocephalum moldavica* se obtuvieron del mercado Sonora ubicado en la Ciudad de México, el 22 de octubre de 2017. La adquisición y la autenticación del material vegetal fueron realizadas por la Dra. Mahinda Martínez, investigadora de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro. Una muestra de referencia (Martínez 9458, *voucher* QMEX 786) fue depositada en el herbario “Dr. Jerzy Rzedowski” de dicha Facultad.

### 6.2. Preparación de los extractos de *Dracocephalum moldavica*

Las partes aéreas de *D. moldavica* (tallos, hojas, flores y corteza) se sometieron a un proceso de secado en una estufa a 40°C durante 2 días. El material vegetal seco (674 g) se molió hasta homogeneidad usando un molino manual. La muestra se sometió a maceración para extraer sus compuestos, usando sucesivamente, y de manera independiente, hexano (3.5 L), diclorometano (1.4 L), durante 7 días cada uno, y metanol (1.75 L) durante 14 días. Los extractos se llevaron a sequedad bajo presión reducida, usando un evaporador rotatorio marca BÜCHI, modelo B-480 a una temperatura que no pasara de los 40°C.

### 6.3. Fraccionamiento preliminar del extracto metanólico de *Dracocephalum moldavica*

El extracto metanólico se sometió a un fraccionamiento previo a la realización de la cromatografía en columna abierta para eliminar las clorofilas y los taninos, mediante procesos de extracción líquido-líquido. Esta operación se llevó a cabo para facilitar la purificación de compuestos (Sarker y Nahar, 2012).

Primero, se hizo extracción líquido-líquido del extracto metanólico disuelto en MeOH, utilizando éter de petróleo para eliminar de la muestra las clorofilas, grasas

y ceras. La muestra se llevó a sequedad usando un evaporador rotatorio como se describió en el párrafo anterior (Sarker y Nahar, 2012).

Para la eliminación de los taninos, la muestra se disolvió en AcOEt y se extrajo con una solución acuosa de cloruro de sodio al 1% en agua (m/V). La porción soluble en AcOEt se llevó a sequedad usando un evaporador rotatorio (Sarker y Nahar, 2012).

#### 6.4. Fraccionamiento por cromatografía en columna abierta del extracto metanólico libre de grasas y taninos

La cromatografía se desarrolló en una columna de vidrio de 5 cm de diámetro y 60 cm de altura, la cual se empacó de forma manual con 375 g de gel de sílice (Fluka, tamaño de partícula: 63-200  $\mu\text{m}$ , adquirido de Sigma-Aldrich) suspendida en DCM, utilizando la técnica de empaque húmedo. En la columna, se cargaron 5.4158 g del extracto metanólico libre de clorofilas y taninos (EMLGT) previamente adsorbidos en la fase estacionaria (Sarker y Nahar, 2012).

Los análisis mediante cromatografía en capa fina (CCF) a nivel analítico se llevaron a cabo sobre cromatofolios (TLC Silica Gel 60 F<sub>254</sub>, 20 x 20 cm, 200  $\mu\text{m}$  adquiridos de Sigma-Aldrich). Se hicieron escalamiento a nivel preparativo en cromatoplasmas (Uniplate Silica Gel GF, 20 x 20 cm, 500  $\mu\text{m}$ , adquiridas de Analtech) para la purificación de los constituyentes individuales. Los perfiles cromatográficos en ambos niveles se visualizaron usando una lámpara UV con gabinete modelo UVGL-25, a longitudes de onda de 254 nm y 365 nm. Además, se utilizó un revelador de sulfato de cerio amoniacal (IV) seguido de calentamiento a 80 °C (Rico-Chavez, 2016; Hernández-Pérez. 2014) en el caso de las CCF.

#### 6.5. Preparación del agente revelador sulfato cérico amoniacal

A 300 g de hielo, se adicionaron lentamente y con agitación, 12 g de sulfato cérico amoniacal (IV)  $[(\text{NH}_4)_4\text{Ce}(\text{SO}_4)_4]$  (Sigma-Aldrich) y 22.5 mL de ácido sulfúrico

concentrado, hasta que se formara una solución homogénea, la cual se usó directamente para revelar las placas (Rico-Chávez, 2016).

#### 6.6. Identificación de los compuestos aislados

Para la determinación de la estructura de los compuestos aislados, se utilizó Resonancia Magnética Nuclear (NMR) en sus diferentes modalidades:  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (CORrelated SpectroscopY),  $^{13}\text{C}$ , HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence), HMBC (Heteronuclear Multiple Bound Coherence) y DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer). Los espectros se registraron en un espectrómetro Bruker Avance III HD de 500 MHz, ubicado en la Universidad de Guanajuato, utilizando tetrametilsilicio (TMS) como estándar interno.

#### 6.7. Ensayos farmacológicos

Se utilizaron ratas Wistar macho de 250 a 300 g de peso, las cuales fueron adquiridas del Bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM, campus Juriquilla.

Se sacrificaron por decapitación, siguiendo la NOM-062-ZOO-1999 apartado 9.5.3.3. Enseguida, se removió la aorta, la cual se limpió y se colocó en solución fisiológica de Krebs-Heinseleit [pH 7.4; NaCl 126.8 mM, KCl 5.9 mM,  $\text{CaCl}_2$  2.5mM,  $\text{MgSO}_4$  1.2mM,  $\text{NaHCO}_3$  30 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  1.2mM, D-glucosa 5 mM (J. T. Baker)]. Se removió el tejido adiposo y conectivo y se cortó en anillos de 4-5 mm.

Los anillos se colocaron en cámaras de incubación con solución de Krebs-Heinseleit a  $37^\circ\text{C}$  y burbujeo constante de una mezcla de 95%  $\text{O}_2$  y 5%  $\text{CO}_2$ . Se estabilizaron a una tensión de 1.5 g, sensibilizando con KCl (100 mM). Recuperada la tensión basal, los anillos se contrajeron con fenilefrina (1  $\mu\text{M}$ ). Para comprobar la viabilidad del tejido y como control positivo, se usó acetilcolina a diferentes concentraciones. Los cambios de la tensión isométrica fueron registrados por medio

de transductores de fuerza Grass modelo FT03 acoplado a un polígrafo Grass de 6 canales Modelo 7-8P (Hernández-Pérez, 2014).

Para aplicar los extractos en la aorta aislada de rata, primero éstos se disolvieron en DMSO y luego se diluyeron en agua destilada. La concentración final de DMSO por cámara fue menor a 0.02% V/V. Las concentraciones finales de los extractos fueron  $3.16 \times 10^{-3}$ , 0.01,  $3.16 \times 10^{-2}$ , 0.1, 0.316, 1, 3.16, 10, 31.6, 100, 316.2 y 1000  $\mu\text{g/mL}$  (Hernández-Pérez, 2014).

#### 6.7.1. Análisis estadístico en los ensayos farmacológicos

El EMLGT se evaluó por duplicado y el diclorometánico por triplicado. Se determinó su promedio y desviación estándar y se construyeron las curvas de concentración-respuesta (CCR).

Los resultados se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA), seguido de prueba de Tukey para evaluar la diferencia significativa entre las medias con la ayuda del programa PRISMA 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) (Hernández-Pérez, 2014).

## 7.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1. Rendimientos de los extractos obtenidos

Se obtuvieron 3.7464 g de extracto diclorometánico y 21.3325 g de extracto metanólico a partir de 374 g de material vegetal. Después de quitar las clorofilas, grasas y los taninos del extracto metanólico, se obtuvieron 5.4158 g de EMLGT.

### 7.2.- Fraccionamiento y purificación

Después del procesamiento del EMLGT de *D. moldavica* mediante la cromatografía en columna abierta (CC), se obtuvieron 140 fracciones que fueron concentradas y agrupadas en 7 fracciones (DMF-1-Y a DMF-7-Y) de acuerdo a la similitud de sus perfiles en CCF. Todas las CCF analíticas fueron visualizadas con lámpara UV-visible y luego reveladas con sulfato cérico amoniacal. Los sistemas de elución empleados y los rendimientos obtenidos en esta CC se indican en el Cuadro 5.

Para el análisis de las fracciones obtenidas, se usó CCF, la cual permitió en algunos casos encontrar sistemas de fase móvil para la obtención de compuestos puros, utilizando la CCF preparativa.

### 7.3. DMF-2-Y

#### 7.3.1. Procesamiento de DMF-2-Y

El análisis unidimensional de DMF-2-Y mediante CCF mostró una sola mancha (Figura 3), sugiriendo pureza.

Cuadro 5. Fracciones obtenidas de la CC del EMLGT.

Fracciones recolectadas	Sistemas de elución	Fracciones reunidas	Peso (mg)	Clave asignada
1-22	DCM:AcOEt (100:0)	1-17	8.6	DMF-1-Y
23-34	DCM:AcOEt (95:5)	18-25	40.3	DMF-2-Y
35-41	DCM:AcOEt (90:10)	26-38	261.3	a) DMF-3-Y (soluble en DCM) b) DMF-4-Y (insoluble en DCM)
42-58	DCM:AcOEt (80:20)	39-79	335.9	a) DMF-5-Y (soluble en AcOEt) b) DMF-6-Y (insoluble en AcOEt)
59-68	DCM:AcOEt (70:30)	80-106	835.6	a) DMF-7-Y (soluble en MeOH) b) DMF-7-Y(S) 2(insoluble en MeOH)
69-79	DCM:AcOEt (50:50)	107-122	2,359.1	a) DMF-8-Y (soluble en MeOH) b) DMF-9-Y (insoluble en MeOH)
80-102	AcOEt:MeOH (100:0)	131-140	136.7	DMF-10-Y
103-111	AcOEt:MeOH (70:30)	–	–	–
112-123	AcOEt:MeOH: (50:50)	–	–	–
124-130	AcOEt:MeOH (30:70)	–	–	–
131-140	MeOH:AcOEt (100:0)	–	–	–

Mediante el uso de CCF bidimensional (CCF-2D) (Figura 4), se comprobó que la pureza de DMF-2-Y era suficiente para registrar sus espectros de RMN.

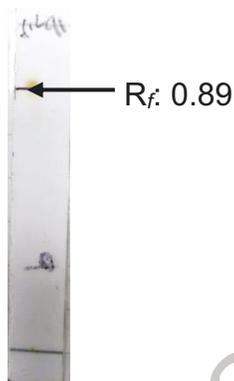


Figura 3. Cromatograma en capa fina de la fracción DMF-2-Y. Sistema de elución: DCM-AcOEt (9:1). R<sub>f</sub>: 0.89.



Figura 4. Cromatograma bidimensional de la fracción DMF-2-Y. Sistema de elución: DCM-AcOEt (1:0).

El análisis de los espectros de DMF-2-Y (ver punto 11 ANEXO, Figuras A1–A5) permitió identificarlo como el ftalato de bis(2-etilhexilo), debido a la presencia de algunas señales características, entre las cuales destacan las del carbonilo en 167.8, así como tres señales de carbonos aromáticos en 132.4, 130.9

y 128.8, cuyas intensidades relativas fueron respectivamente en 1:2:2, además de una señal de intensidad doble para un metileno oxigenado en  $\delta_C = 68.1$ , cuyo  $\delta_H$  se situó en 4.22. También se identificaron 7 señales adicionales para carbonos alifáticos en campo alto. Se estableció la ramificación por el grupo etilo en la posición 2 del hexilo a través de la interacción del metileno en  $\delta_H = 4.22$  con el único metileno alifático en  $\delta_C = 38.7$  en su espectro HMBC. Sin embargo, debido a que los ftalatos suelen contaminar muestras, no se podría asegurar que este ftalato sea un constituyente genuino de *D. moldavica*.

#### 7.4. DMF-4-Y

##### 7.4.1. Procesamiento de DMF-4-Y

En la fracción DMF-3-Y precipitó un sólido de color blanco, que se denominó como DMF-4-Y, el cual se separó mediante lavados sucesivos usando DCM, quedando al final 15 mg. El análisis del polvo mediante CCF (exhibió una sola mancha, sugiriendo pureza Figura 5A).

Para tener un mejor panorama de la homogeneidad de la muestra DMF-4-Y, se realizó una CCF-2D, en la que se observó pureza suficiente (Figura 5B) para el registro de sus espectros de RMN.



Figura 5. Cromatogramas en capa fina analítica de la fracción DMF-4-Y [(A): unidimensional, (B): bidimensional]. Sistema de elución: MeOH-AcOEt (1:1).

#### 7.4.2. Elucidación estructural del compuesto DMF-4-Y

El compuesto denominado DMF-4-Y presentó más de 30 señales en su espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , indicando la presencia de impurezas. Sin embargo, en el espectro se distinguen 2 señales intensas de carbonos vinílicos ( $\delta = 124.80$  y  $138.41$ ), 1 de carbono oxigenado ( $\delta = 77.06$ ) y un carbonilo en  $\delta = 178.52$  característico de un ácido carboxílico (Figura 6). También se contabilizaron 7 metilos y 9 metilenos (Figura 7). Esos datos experimentales (Cuadro 6) coinciden con los descritos para el ácido ursólico (Figura 16) Espectros completos anexo A13 a A20 (Goretti y col., 2008; Yang y col., 2014b).

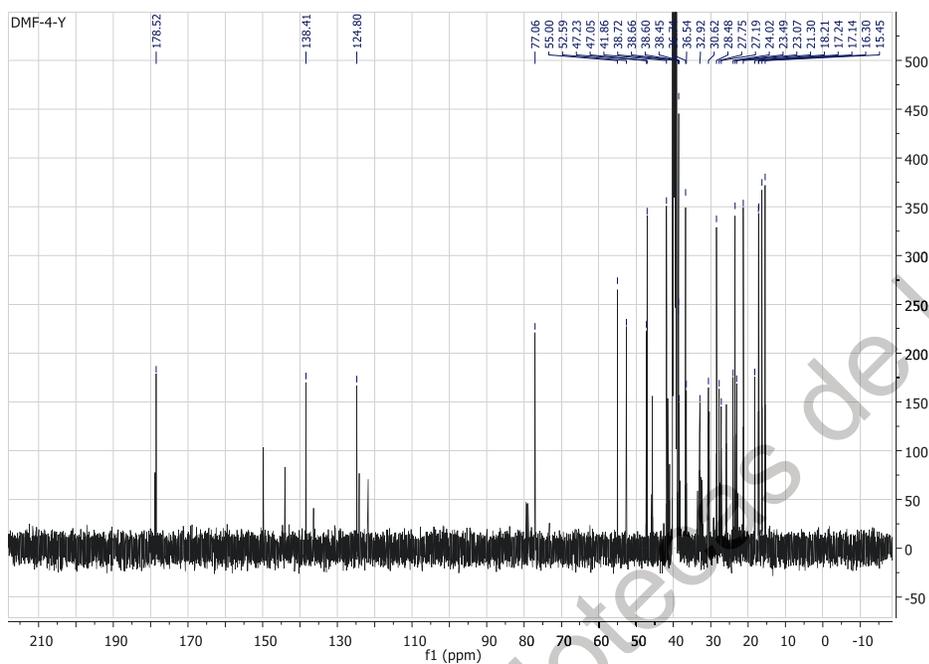


Figura 6. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del compuesto DMF-4-Y identificado como ácido ursólico ( $\text{DMSO-}d_6$ ).

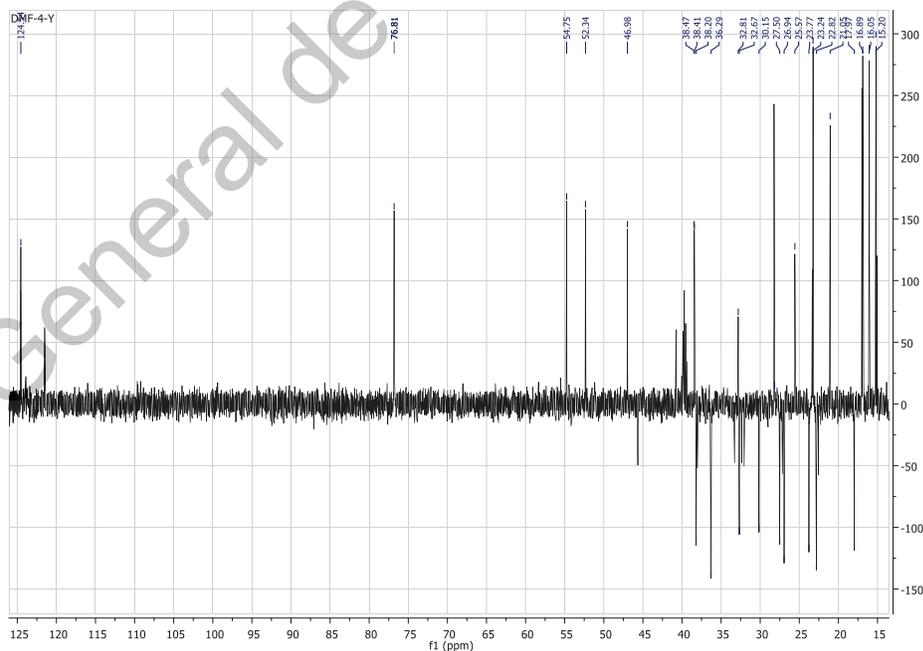


Figura 7. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  modalidad DEPT del compuesto DMF-4-Y, el cual fue identificado como ácido ursólico ( $\text{DMSO-}d_6$ ).

Cuadro 6. Constantes espectroscópicas de DMF-4-Y (500 MHz, en DMSO- $d_6$ ).

Posición	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	$J$ (Hz)
1	38.45	1.50	m	
2	27.19	1.44	m	
3	77.06	2.98	m	
4	38.60		-	
5	55.00	0.65	s	
6	18.21	1.27, 1.47	m, m	
7	30.62	1.27	m	
8	38.98	-	-	
9	47.23	1.44	m	
10	36.74	-	-	
11	23.49	1.83	m	
12	124.80	5.11	s	
13	138.41	-	-	
14	41.82	-	-	
15	32.92	1.26, 1.43	m, m	
16	23.07	1.83, 1.46	m, m	
17	47.05	-	-	
18	52.59	2.09	d	11.3
19	38.66	1.30	m	
20	38.72	1.50, 0.90	m, s	
21	27.75	1.78, 0.99	m,m	
22	36.54	1.53	m	
23	28.48	0.88	s	
24	17.14	0.73	s	
25	16.30	0.66	s	

Cuadro 6. Constantes espectroscópicas de DMF-4-Y (500 MHz, en DMSO- $d_6$ )  
(continuación).

26	15.18	0.85	s	
27	23.49	1.02	s	
28	178.52	-	-	
29	17.24	0.80	s	
30	21.30	0.90	s	

## 7.5. DMF-3-Y-4

### 7.5.1. Estudio químico de la muestra DMF-3-Y

En la CCF (Figura 8) de la parte soluble en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  de DMF-3-Y, se observó una mezcla de mayor complejidad, cuyos componentes individuales podían fácilmente separarse, haciendo un escalamiento a nivel preparativo.

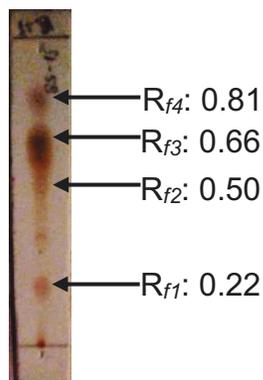


Figura 8. Cromatograma en capa fina analítica de la fracción DMF-3-Y. Sistema de elución: DCM-AcOEt (85:15),  $R_{f1}$ : 0.22,  $R_{f2}$ : 0.50,  $R_{f3}$ : 0.66,  $R_{f4}$ : 0.81.

Usando las condiciones óptimas encontradas en la CCF analítica de la muestra DMF-3-Y, se procedió a la separación de sus componentes por medio de CCF preparativa (Figura 9).

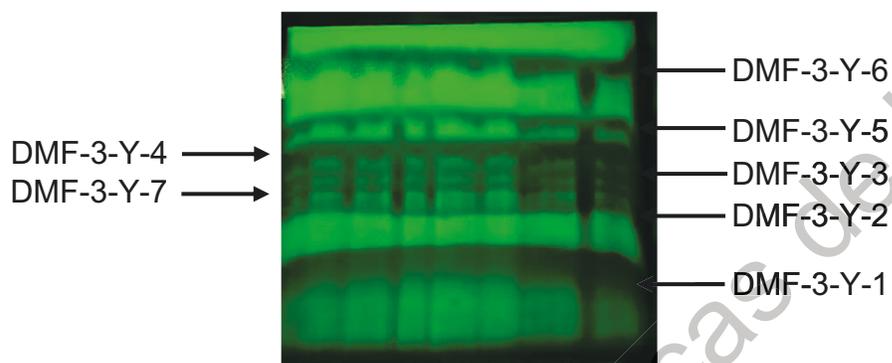


Figura 9. Cromatograma en capa fina preparativa de la fracción DMF-3-Y.

Revelador: Luz UV. Longitud de onda: 254 nm. Sistema de elución: DCM-AcOEt (85:15).

De esta placa, se rasparon 7 bandas, cuyos rendimientos se indican en el Cuadro 7.

Cuadro 7. Rendimiento de las fracciones obtenidas por CCF preparativa de la fracción DMF-3-Y.

Clave de fracción	Rendimiento
DMF-3-Y-1	9.3 mg
DMF-3-Y-2	4.4 mg
DMF-3-Y-3	6.6 mg
<b>DMF-3-Y-4</b>	<b>4.5 mg</b>
DMF-3-Y-5	8.7 mg
DMF-3-Y-6	9.3 mg
DMF-3-Y-7	6.7 mg

Las CCF analíticas de las fracciones recuperadas no mostraron una pureza suficiente para el registro de los espectros de RMN, excepto para DMF-3-Y-4.

#### 7.5.2. Elucidación estructural del compuesto DMF-3-Y-4

El compuesto denominado DMF-3-Y-4 presentó 29 señales en su espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 10). A pesar de presentar algunas impurezas, en el espectro se distinguen 2 señales de carbonos vinílicos ( $\delta = 122.67$  y  $143.56$ ) para el mayoritario y 1 de carbono oxigenado ( $\delta = 79.05$ ). Además, se contabilizaron 7 metilos en  $\delta$  entre 0.76 y 1.13, todos como singuletes en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 11) y 10 metilenos en el espectro DEPT  $135^\circ$  (Figura 12), evidencias que sugieren un esqueleto de oleanano. Finalmente, se estableció la presencia de un carbonilo de manera indirecta a través de la señal característica de C-17 que suele aparecer alrededor de 47 ppm, en este caso en  $\delta = 46.51$  (Figura 10). Aunque no se observó un carbonilo ni a través del HMBC, esas evidencias espectrales son suficientes para admitir que dicho compuesto es el ácido oleanólico. Los desplazamientos químicos de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$ , las multiplicidades y las constantes de acoplamiento determinadas se indican en el Cuadro 8. Los espectros completos se pueden observar en el anexo A7 a A12.

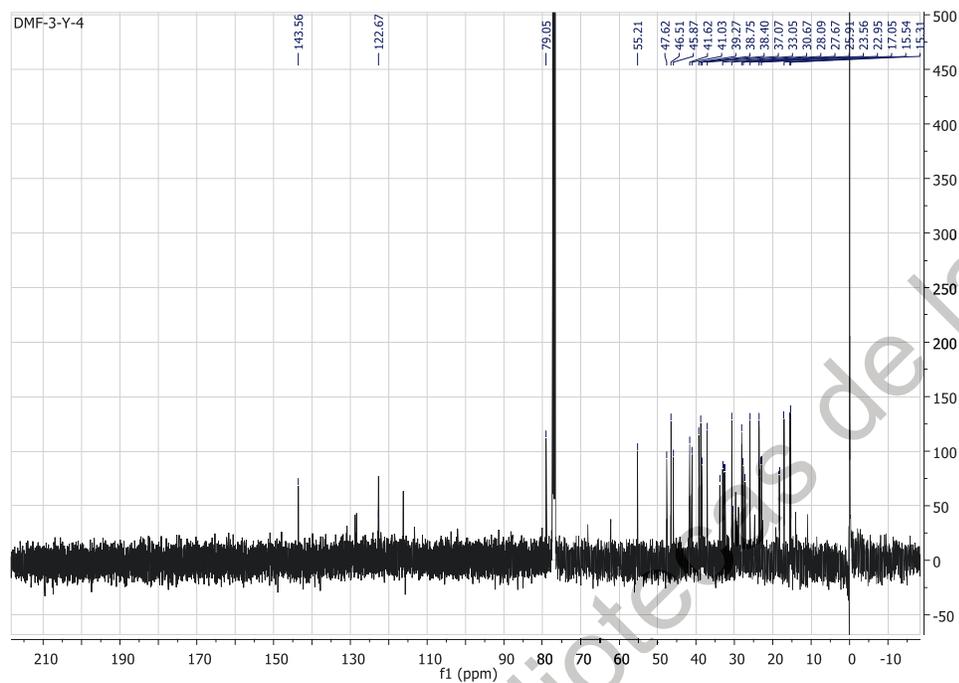


Figura 10. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del compuesto DMF-3-Y-4 identificado como ácido oleanólico ( $\text{CDCl}_3$ ).

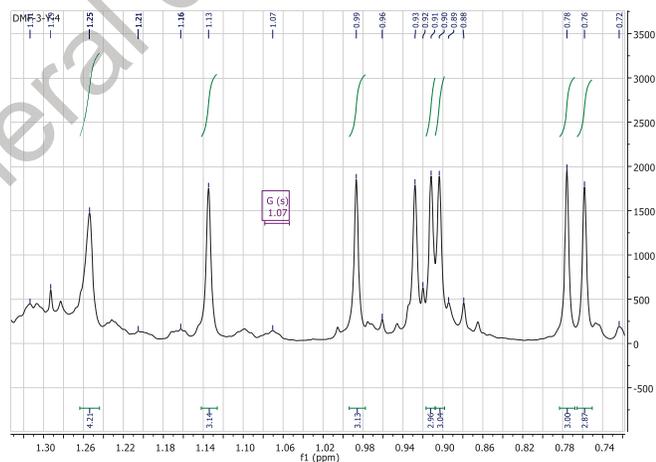


Figura 11. Región de campo alto (metilos singuletes) del espectro de RMN de  $^1\text{H}$  del compuesto DMF-3-Y-4, identificado como ácido oleanólico ( $\text{CDCl}_3$ ).

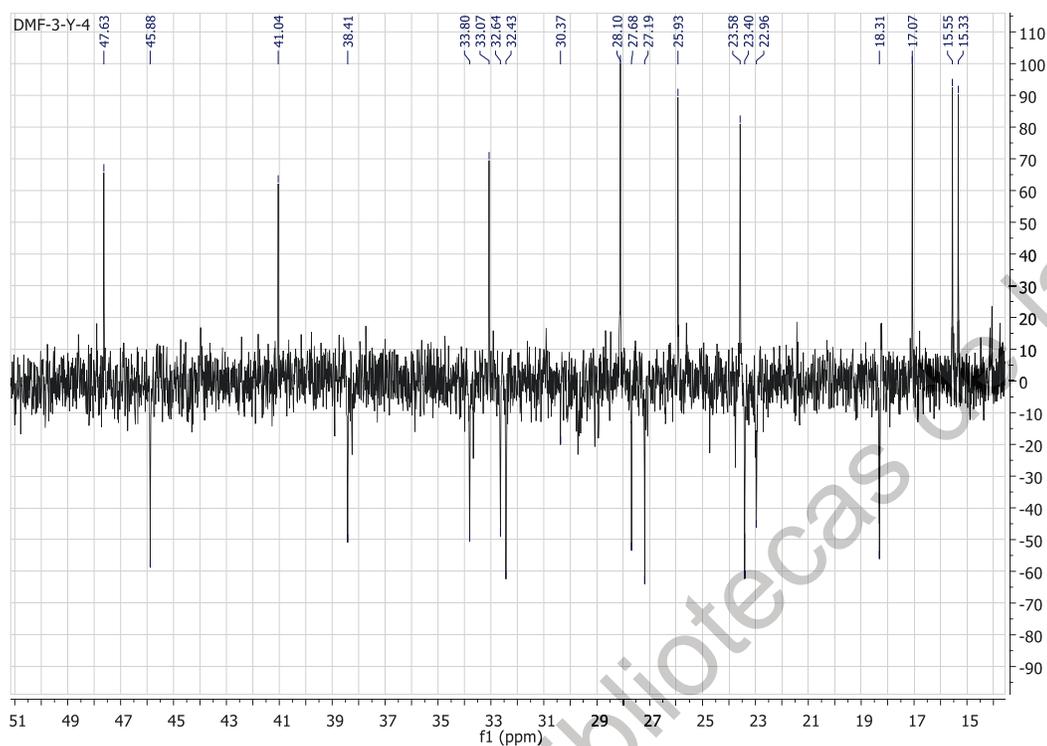


Figura 12. Región de campo alto (metilos singuletes) del espectro DEPT 135° del compuesto DMF-3-Y-4 identificado como ácido oleanólico (CDCl<sub>3</sub>).

Cuadro 8. Constantes espectroscópicas de DMF-3-Y-4 (500 MHz, en CDCl<sub>3</sub>).

Posición	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm)	Multiplicidad	$J$ (Hz)
1	38.40	0.96, 1.60	m,m	
2	27.17	1.60	m	
3	79.05	3.22	dd	11.2, 4.3
4	39.27	-	-	
5	55.21	0.72	da	11.8
6	18.30	1.38, 1.54	m, m	
7	32.63	1.43, 1.30	m, m	

Cuadro 8. Constantes espectroscópicas de DMF-3-Y-4 (500 MHz, en CDCl<sub>3</sub>)  
(continuación).

8	37.70	-	-	
9	47.62	1.53	m	
10	38.75	-	-	
11	22.95	1.99, 1.60	m, d	4.0
12	122.67	5.28	t	3.5
13	143.56	-	-	
14	41.62	-	-	
15	27.67	1.07, 1.71	s, d	4.5
16	23.56	1.88	d	3.2
17	46.51	-	-	
18	41.03	2.82	dd	13.9, 4.3
19	45.87	1.16, 1.62	m, m	
20	30.67	-	-	
21	33.79	1.35, 1.21	m,m	
22	32.42	1.77, 1.57	m, m	
23	28.09	0.99	s	
24	15.54	0.78	s	
25	15.31	0.91	s	
26	17.05	0.76	s	
27	25.91	1.13	s	
28	-	-	-	
29	32.63	0.90	s	
30	23.39	0.93	s	

Esos datos espectroscópicos coinciden con los reportados en la literatura para el ácido oleanólico (Figura 16) (Martins y col., 2013; Ayatollahi y col., 2010).

## 7.6. DMF-6-Y

### 7.6.1. Tratamiento de la fracción agrupada DMF-6-Y

De esta fracción, precipitó un sólido de color blanco, al que se asignó la clave DMF-6-Y. Para la purificación de este sólido se hicieron lavados sucesivos con AcOEt, obteniendo al final 20 mg. Su CCF unidimensional reveló una sola mancha (Figura 13), indicando pureza. Para comprobarlo, se recurrió a la CCF-2D (Figura 14), observándose suficiente homogeneidad para el registro de sus espectros de RMN.

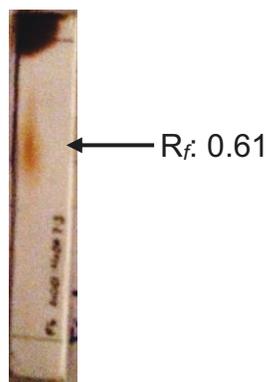


Figura 13. Cromatograma en capa fina analítica de la fracción DMF-6-Y. Sistema de elución: AcOEt-MeOH (7:3).  $R_f$ : 0.61.

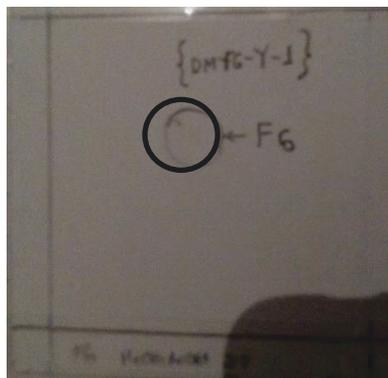


Figura 14. Cromatograma en capa fina analítica bidimensional de la fracción DMF-6-Y. Sistema de elución: AcOEt-MeOH (7:3).

#### 7.6.2. Análisis preliminar de los espectros de RMN de DMF-6-Y

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de esta muestra, se observan en total unas 12 señales, entre ellas un carbonilo en 168.01 ppm, dos carbonos vinílicos monohidrogenados en 129.28 y 131.49 ppm, un hidroximetileno en 68.17 ppm, otros 4 metilenos, un metino en 39.05 ppm y 3 metilos en 17.49, 14.18 y 11.10 ppm (ver ANEXO, figuras A22-A26). Sin embargo, con esos datos, todavía no se dispone de una propuesta concreta de estructura.

#### 7.7. DMF-7-Y(S)

##### 7.7.1. Procesamiento de la fracción DMF-7-Y

La fracción DMF-7-Y proveniente de la CC del EMLGT (ver Cuadro 5) tuvo un precipitado blanco, que se nombró DMF-7-Y(S), el cual proporcionó un rendimiento total de 85.5 mg después de varios lavados con MeOH. De este polvo blanco, se pesaron 23 mg para el registro de los espectros de RMN.

### 7.7.2 Elucidación estructural del compuesto DMF-7-Y(S)

A diferencia de los dos compuestos anteriores, el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  de éste presentó un total de 19 señales (Figura 15), 10 de las cuales se encuentran en la región característica de aromáticos. También se aprecia la presencia de una hexosa a través de las señales de los metinos de dicha unidad entre  $\delta$  70 entre 80, su carbono anomérico (Glu-1) en  $\delta = 101.71$  y su hidroximetileno en  $\delta = 62.29$ . También se detectó un singulete en  $\delta = 3.72$  en el espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (ver ANEXO A27), cuyo carbono se situó en 55.48, lo cual corresponde a un metoxilo. La hexosa se identificó como glucosa. Sin embargo, a través del espectro HMBC, se detectó una señal oculta por debajo de la de la piridina en  $\delta = 123.63$  (ver ANEXO A32), la cual resultó ser un carbono cuaternario, que fue asignado al C-1' de una flavanona, la cual fue identificada como la tilianina (7-O- $\beta$ -D-glucopiranosil acetina). Los espectros completos se pueden observar en el anexo A27 a A32.

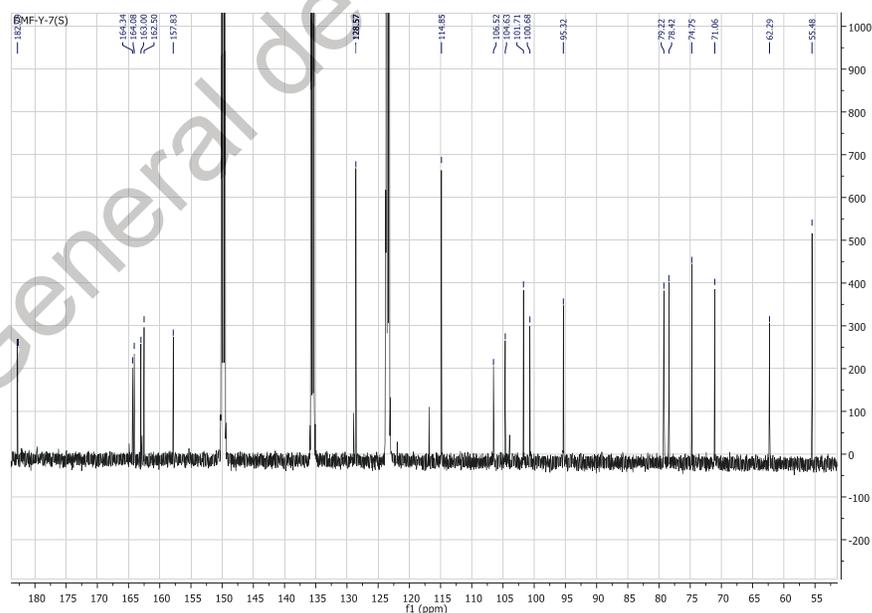


Figura 15. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  del compuesto DMF-7-Y(S) identificado como tilianina ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ).

La estructura establecida en base a esas evidencias (Cuadro 9) coincidió con la de la tilianina (7-O-β-D-glucopiranosil acetina) (Figura 16), cuyos datos de RMN ya están reportados en la literatura (Cao y col., 2017). Vale mencionar que este compuesto forma parte de los mayoritarios presentes en el EMLGT.

Cuadro 9. Constantes espectroscópicas de DMF-7-Y(S) (500 MHz, en C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N).

Posición	δ <sup>13</sup> C (ppm)	δ <sup>1</sup> H (ppm)	Multiplicidad	J (Hz)
1	-	-	-	
2	164.34	-	-	
3	104.63	6.93	s	
4	182.79	-	-	
5	162.5	-	-	
6	100.68	6.86	s	
7	164.08	-	-	
8	95.32	7.10	s	
9	157.83	-	-	
10	106.52	-	-	
1'	123.63	-	-	
2', 6'	114.85	7.05	d	8.2
3', 5'	128.57	7.89	d	8.0
4'	163	-	-	
Glu-1	101.71	5.85	d	7.4
Glu-2	74.75	4.37	m*	
Glu-3	79.22	4.22	m*	
Glu-4	71.06	4.36	m*	
Glu-5	78.42	4.40	m*	
Glu-6	62.29	4.57, 4.42	d, m*	12.0
O-CH <sub>3</sub>	55.48	3.72	s	

\*Señales sobrepuestas

La Figura 16 recoge las estructuras de los 3 compuestos caracterizados en el EMLGT.

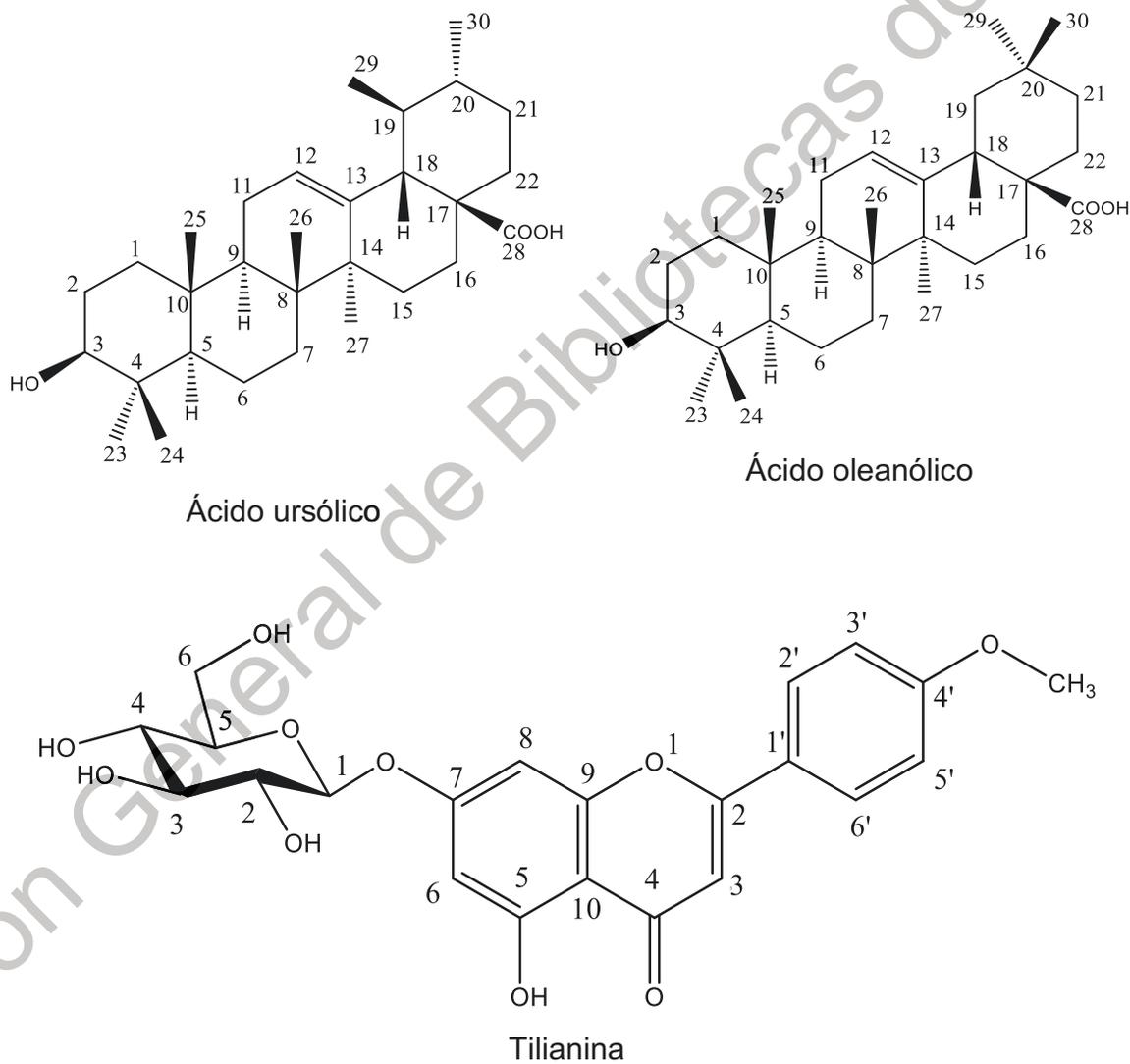


Figura 16. Estructuras de los 3 compuestos identificados en el EMLGT.

## 7.8. Evaluación de la actividad vasorrelajante de los extractos

Los experimentos realizados con el ensayo de aorta aislada de rata indicaron que los extractos de diclorometánico ( $CE_{50} = 68.43 \pm 1.2 \mu\text{g/mL}$ ) y EMLGT ( $CE_{50} = 56.16 \pm 1.1 \mu\text{g/mL}$ ) relajan los anillos de aorta precontraída con fenilefrina de una manera dependiente de la concentración (Figura 17). Ambos extractos presentaron una potencia similar a la de la acetilcolina ( $CE_{50} = 46.37 \pm 1.1 \mu\text{g/mL}$ ), la cual se utilizó como control positivo. En la presente investigación, se abordó primero el extracto metanólico para estudios químicos, debido a que, de manera tradicional, se usan extractos polares (acuosos o hidroalcohólicos) con la finalidad de comprobar el efecto que se les atribuye a esas preparaciones tradicionales (López-Rubalcava y Estrada-Camarena, 2016; Martínez-Vázquez y col., 2012).

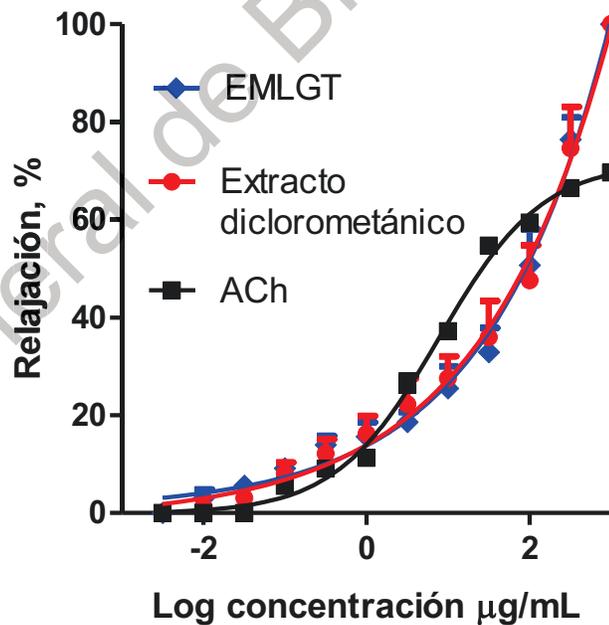


Figura 17. Curvas concentración-respuesta de los extractos y de la acetilcolina, utilizada como control positivo.

Sin embargo, hasta la fecha, sólo se han identificado plenamente 3 de los constituyentes del EMLGT (Extracto Metanólico Libre de Taninos y Clorofilas). Puede afirmarse que los compuestos caracterizados, cuyas actividades vasodilatadoras y mecanismos de acción han sido ampliamente estudiados con anterioridad (Rodríguez-Rodríguez y col., 2004 y 2008; Hernández-Abreau y col., 2009; Aguirre-Crespo y col., 2005 y 2006; Madlala y col., 2016; Woźniak, y col., 2015; Ríos y col., 2012), contribuyen a la actividad vasodilatadora de las partes aéreas de *Dracocephalum moldavica*.

## 8. CONCLUSIONES

Los dos extractos, el metanólico libre de grasas y taninos y el diclorometánico preparados a partir de esta muestra comercial de *D. moldavica* ejercen efecto vasodilatador sobre los anillos de aorta de rata.

Los compuestos identificados en el presente trabajo presentan efecto vasodilatador ya descrito con anterioridad.

Los avances obtenidos aportan datos que pueden contribuir a justificar, al menos en parte, el uso tradicional de esta especie vegetal para tratar la hipertensión arterial.

## 9. PERSPECTIVAS

Elucidar las estructuras de los demás compuestos mayoritarios purificados una vez completados los registros de sus espectros de RMN.

Determinar la actividad vasorrelajante de los metabolitos identificados y que resulten sin antecedentes de evaluación farmacológica en este modelo biológico.

## 10.-REFERENCIAS

- Aguirre-Crespo** F, Castillo-España P, Villalobos-Molina R, López-Guerrero JJ; Estrada-Soto S. Vasorelaxant effect of Mexican medicinal plants on isolated rat aorta. *Pharm Biol.* **2005**; 43(6): 540-546.
- Aguirre-Crespo** F, Vergara-Galicia J, Villalobos-Molina R, López-Guerrero JJ; Navarrete-Vázquez G, Estrada-Soto S. Ursolic acid mediates the vasorelaxant activity of *Lepechinia caulescens* via NO release in isolated rat thoracic aorta. *Life Sci.* **2006**; 79: 1062-1068.
- Altamimi** A, Lakhssassi N, Baharlouei A, Watson DG, Lightfoot DA. Phytochemicals: Extraction, isolation and identification of bioactive compounds from plant extracts. *Plants.* **2017**; 6, 42: 1-23.
- Aprostosoae** AC, Mihai CT, Vochita G, Rotinberg P, Trifan A, Luca SV, Petreus T, Gille E, Miron A. Antigenotoxic and antioxidant activities of a polyphenolic extract from European *Dracocephalum moldavica* L. *Ind Crop Prod.* **2016**; 79: 248-257.
- Ayatollahi** AM, Ghanadian M, Afsharypour S, Abdella OM, Mirzai M, Askari G. Pentacyclic triterpenes in *Eurobia microciada* with their T-cell proliferative activity. *Iran J Pharm Res.* **2011**; 10 (2): 287-294.
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana.** [Monografía en internet] [Consultado el 12 de febrero de 2018]. Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php>.
- Brusotti** G, Cesari I, Dentamaro A, Caccialanza G, Massolini. Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis on the ethnopharmacological approach. *J Pharmaceut Biomed.* **2014**; 87:218-228.
- Calgiani** A, Malavasi G, Pelle G, Maseglia A, Tognolini M, Bruni R. A simple GC-MS method for the screening of betulinic, corosolic, maslinic, oleanolic and ursolic acid contents in commercial botanicals used as food supplement ingredients. *Food Chem.* **2013**; 136:735-741.

- Cao** P, Xie P, Wang X, Wang J, Kang W. Chemical constituents and coagulation activity of *Agastache rugosa*. BMC Complement Altern Med. **2017**; 17:93.
- Chu** SS, Liu SL, Liu QZ, Liu LZ, Du SS. Composition and toxicity of Chinese *Dracocephalum moldavica* (Labiatae) essential oil against two grain storage insects. J Med Plants Res. **2011**; 5(21): 5262-5267.
- Çitoğlu** GS, Acikara OB. Column chromatography for triterpenoids and flavonoids. Chromatography and its applications [Monografía en internet]. **2012**. [Consultado 2018 febrero 12]. Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/chromatography-and-its-applications/column-chromatography-for-terpenoids-and-flavonoids>
- Dastmalchi** K, Dorman HJD, Laakso, Hiltunen R. Chemical composition and antioxidative activity of Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extracts. LWT; **2007**; 40: 1655-1663.
- Edwards** JE, Brown PN, Talent N, Dickinson TA, Shipley PR. A review of the chemistry of the genus *Crataegus*. Phytochemistry. **2012**; 79: 5-26.
- Golparvar** AR, Hadipanh A, Gheisari MM, Khaliliazar R. Chemical constituents of essential oil of *Dracocephalum moldavica* L. and *Dracocephalum kotschi* Boiss. from Iran. Acta Agric Slov. **2016**; 17-1: 25-31.
- Goretti** M, Silva V, Viera IGP, MEndes FNP, Albuquerque IL; dosSantos RN, Silva FO, Morai SM. Variation of ursolic acid content in eight *Ocimum* species from northeastern Brazil. Molecules. **2008**; 13: 2482-2487.
- Guzmán-Gutiérrez** SL, Reyes-Chilpa R, Bonilla-Jaime H. Medicinal plants fo the treatment of “nervios”, anxiety and depression in Mexican Traditional Medicine. Rev Bras Farmacogn. **2014**; 24: 591-608.
- Hall** EJ. Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology. 12° edición. Estados Unidos de América. Saunders Elsevier, **2011**: 218
- Heinrich** M, Haller BF, Leonti M. A perspective on natural products research and ethnopharmacology in Mexico: The eagle and the serpent on the prickly pear cactus. J Nat Prod. **2014**; 77: 678-689.

- Hernández-Abreau** O, Castillo-España P, León-Rivera I, Ibarra-Barajas M, Villalobos-Molina R, González-Christen J, Vergara-Galicia J, Estrada-Soto S. Antihypertensive and vasorelaxant effects of tilianin isolated from *Agastache mexicana* are mediated by NO/cGMP pathway and potassium channel opening. *Biochem Pharmacol.* **2009**; 78(1): 54-61.
- Hernández-Pérez** A. Actividad vasorrelajante en aorta aislada de rata y constituyentes triterpénicos de extractos de *Crataegus gracilior* Phipps (Rosaceae). Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Querétaro. **2014**.
- Hussein** MS, El-Sherbeny SE, Khalil MY, Naguib NY, Aly SM. Growth characters and chemical constituents of *Dracocephalum moldavica* L. plants in relation to compost fertilizer and planting distance. *Sci Hortic-Amsterdam.* **2006**; 108: 322-331.
- Ibarra-Alvarado** C, Rojas A, Mendoza S, Bah M, Gutiérrez DM, Hernández-Sandoval L, Martínez M. Vasoactive and antioxidant activities of plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of cardiovascular diseases. *Pharm Biol.* **2010**; 48(7): 732-739.
- Ingle** KP, Deshmuk AG, Padole DA, Dudhare MS, Moharil MP, Khelurkar VC. Phytochemicals: Extraction methods, identification and detection of bioactive compounds from plant extracts. *J Pharmacogn Phytochem.* **2017**; 6(1): 32-36
- IMCO (Instituto mexicano para la Competitividad)**. Pequeños pasos para transformar el sistema de salud. [monografía en internet] **2018** [consultado el 2 de junio de 2019] disponible en: [https://imco.org.mx/temas/pequenos-pasos-transformar-al-sistema-salud/#\\_ftn3](https://imco.org.mx/temas/pequenos-pasos-transformar-al-sistema-salud/#_ftn3).
- IMSS**. Diagnóstico y tratamiento de hipertensión arterial en el adulto mayor. Guía de evidencias y recomendaciones. Guía clínica. **2017**.
- INEGI** (Instituto Nacional de Geografía y Estadística). "Estadísticas a Próposito del día de muertos" (2 de noviembre). 30 de octubre de **2017**: 1-11.
- Jäntschi** L, Bolboacă SD. Rarefaction on natural compound extracts diversity among genus. *J Comput Sci.* **2014**; 5: 363-367.

- Javidanpour** S, Dianat M, Badavi M, Mard SA. The cardioprotective effect of rosmarinic acid on acute myocardial infarction and genes involved in Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *Free Radic Res.* **2017**; 51: 911–923.
- Jiang** J, Yuan X, Wang T, Chen H, Zhao H, Yan X, Wang Z, Sun X, Zheng Q. Antioxidative and cardioprotective effects of total flavonoids extracted from *Dracocephalum moldavica* L. against acute ischemia/reperfusion-induced myocardial injury in isolated rat heart. *Cardiovasc Toxicol.* **2014**; 14: 74-82.
- Jiménez-Zúñiga** MI, Hurtado-Mariles AJ, Gómez-y-Gómez YM. Evaluación del efecto inductor del sueño del extracto metanólico de *Dracocephalum moldavica*. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional. **2016**.
- Kakasy** A, Füzfai Z, Kursinszki L, Molnár-Perl I, Lemberkovics E. Analysis of non-volatile constituents in *Dracocephalum* species by HPLC and GC-MS. *Chromatographia.* **2006**; 63: S17-S22.
- Karthik** D, Viswanathan P, Anuradha CV. Administration of rosmarinic acid reduces cardiopathology and blood pressure through inhibition of p22phox NADPH oxidase in fructose-fed hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* **2011**; 58(5):514-21.
- Keskin** N, Mammadov R, Ili P. The effects of *Crataegus aronia* var. dentata Browicz extract on biochemical in apoptosis in partially hepactomized liver in rats. *Bosn J Basic Med Sci.* **2012**; 12(3):177-181.
- Khadem** S, Marles RJ. Chromone and flavonoid alkaloids: occurrence and bioactivity. *Molecules.* **2012**; 17: 191-206.
- Kuo** RY, Qian K, Morris-Natschke SL, Lee HK. Plant derived triterpenoids and analogues as antitumor and anti-HIV agents. *Nat Prod Rep* **2009**; 26:1321-1344.
- Li** Q, Liu Y, Han L, Liu W; Fong F, Zhang J, Xie N. Chemical constituents and quality control of two *Dracocephalum* species based on high-performance liquid chromatographic fingerprints coupled with tandem mass spectrometry and chemometrics. *J Sep Sci.* **2016**; 00:1-15.

- López-Rubalcava C, Estrada-Camarena E.** Mexican medicinal plants with anxiolytic or antidepressant activity: Focus on preclinical research. *J Ethnopharmacol.* **2016**; 186 (20): 377-391.
- Loredo-Medina OL, Rodríguez-Chávez JM, Ramos-Espinoza MG.** Aprovechamiento de recursos vegetales en una localidad de la reserva de la biosfera Mariposa Monarca, Michoacán, México. *Etnobiología.* **2002**; 2(1): 32-60.
- Madlala HP, Metzinger T, van-Heerden FR, Musabayane CT, Mubagwa K, Dessy C.** Vascular Endothelium-Dependent and Independent Actions of oleanolic acid and Its synthetic oleanane derivatives as possible mechanisms for hypotensive effects. *PLOS ONE.* **2016**; 11(1): 1-16.
- Maham M, Akbari H, Delazar A.** Chemical composition and antinociceptive effect of the essential oil of *Dracocephalum moldavica*. *Pharm Sci.* **2013**; 18(4): 187-192.
- Maimaitiyiming D, Hu G, Aikemu A, Hui SW, Zhang X.** The treatment of Uygur medicine *Dracocephalum moldavica* L. on chronic mountain sickness rat model. *Phcog Mag.* **2014**; 10(40): 477-454.
- Martínez-Vázquez M, Estrada-Reyes R, Martínez-Laurrabaquio A, López-Rubalcava C, Heinze G.** Neuropharmacological study of *Dracocephalum moldavica* L. (Lamiaceae) in mice: Sedative effect and chemical analysis of an aqueous extract. *J Ethnopharmacol.* **2012**; 141: 908-917.
- Martins D, Carrion LL, Fernandes-Ramos D, Salomé KS, Almeida-daSilva PE, Barison A, Nunez CV.** Triterpenes and the Antimycobacterial Activity of *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae). *Biomed Res Int.* **2013**; 2013: 1-7.
- Melin K.** Antihypertensives en: Lippincott's illustrated reviews: pharmacology. 6<sup>o</sup> edición. China. Kluwer Wolters. **2015**: 225-240.
- Miraldi E, Ferri S, Mostaghimi V.** Botanical drugs and preparations in the traditional medicine of West Azerbaijan (Iran). *J Ethnopharmacol.* **2001**; 75: 77-87.

- Najafi M**, Ghasemian E, Fathiazad F, Garjani A. Effects of total extract of *Dracocephalum moldavica* on ischemia/reperfusion induced arrhythmias and size in the isolated rat heart. Iran J Basic Med Sci. **2008**; 11(4): 229-235.
- Newman DJ**, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to **2014**. J Nat Prod. 2016; 79: 629-661.
- Nikitina AS**, Popova OI, Ushakova IS, Chumakova VV, Ivanova LI. Studies of the essential oil of *Dracocephalum moldavica* cultivated on the Stavropol region. Pharm Chem J. **2008**; 42 (4): 35-39.
- Rico-Chávez AK**. Caracterización química de una fracción vasorrelajante del extracto metanólico foliar de *Crataegus gracilior* Phipps (Rosaceae). Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Querétaro. **2016**.
- Ríos MY**, López-Martínez S, López-Vallejo F, Medina-Franco JL, Villalobos-Molina R, Ibarra-Barajas M, Navarrete-Vazquez G, Hidalgo-Figueroa S, Hernández-Abreu O, Estrada-Soto S. Vasorelaxant activity of some structurally related triterpenic acids from *Phoradendron reichenbachianum* (Viscaceae) mainly by NO production: *ex vivo* and *in silico* studies. Fitoterapia. **2012**; 83: 1023-1029.
- Rodríguez-Rodríguez R**, Herrera MD, Perona JS, Ruíz-Gutiérrez V. Potential vasorelaxant effects of oleanolic acid and erythrodiol, two terpenoids contained in 'orujo' olive oil, on rat aorta. Br J Nutr. **2004**; 92: 635-642.
- Rodríguez-Rodríguez R**, Stankevicius E, Herrera MD, Østergaard L, Anderssen MR, Ruíz-Gutiérrez V, Simonsen U. Oleanolic acid induces relaxation and calcium-independent release of endothelium-derived nitric oxide. Br J Pharmacol. **2008**; 155: 535-546.
- Rosas-Peralta M**, Palomo-Piñón S, Borrayo-Sánchez G, Madrid-Miller A, Almeida-Gutiérrez E, Galván-Oseguera H, Magaña-Serrano JA, Saturno-Chiu G, Ramírez-Arias E, Santos-Martínez E, Díaz-Díaz E, Salgado-Pastor SJ, Morales-Mora G, Medina-Concebida LE, Mejía-Rodríguez O, Pérez-Ruiz CE, Chapa-Mejía LR, Álvarez-Aguilar C, Pérez-Rodríguez G, Castro-Martínez MG, López-Bárcena J, Paniagua-Sierra R. Consenso de hipertensión arterial sistémica en México. Rev Med Inst Mex Seguro Soc. **2016**; S4 supl1: S6-51.

- Sarker SD, Nahar L.** Natural Products Isolation. 3° edición. Humana Press: United Kingdom, **2012**: 1-155, 255-341.
- Sarukhán J, Koleff P, Carabias J, Soberón J, Dirzo R, Llorente-Bousquets J, Halffter G, González R, March I, Mohar A, Anta S, De-LaMaza J.** Capital natural de México. Síntesis. Conocimiento actual, evaluación y perspectivas de sustentabilidad. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. **2009**.
- Selenge E, Murata T, Tanaka S, Sasaki K, Batkhuu J, Yoshizaki F.** Monoterpene glycosides and phenylpropanoids, and acacetin glycosides from *Dracocephalum foetidum*. *Phytochemistry*. **2014**; 101: 91-100.
- Shamah-Levy T, Ruiz-Matus C, Rivera-Dommarco J, Kuri-Morales P, Cuevas-Nasu L, Jiménez-Corona ME, Romero-Martínez M, Méndez-Gómez-Humarán I, Gaona-Pineda EB, Gómez-Acosta LM, Hernández-Ávila M.** Encuesta Nacional de Salud y Nutrición de Medio Camino 2016. Resultados Nacionales. 1° edición. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública, **2017**: 26-27, 52-56.
- Sticher O.** Natural Products isolation. *Nat Prod Rep*. **2008**; 25:517-554.
- Sudenius J.** Photo of the entire plant of Dragon's Head (*Dracocephalum moldavica*) posted by Jonna Sudenius. [monografía de internet] **2012** [consultado: 10 de noviembre de 2017] disponible en: <https://garden.org/plants/photo/72226/>
- Tajabadi F, Khalighi-Sigaroodi F, Rezazadeh S.** Improving Gas Chromatography-Mass Spectrometry analysis of essential oils by multivariate curve resolution: Full identification of co-eluting compounds of *Dracocephalum moldavica* L. *Chromatographia*. **2017**; 80(8): 1277-1286.
- Tropicos.org.** Missouri Botanical Garden. [monografía en internet] **2019** [consultado 2019 Julio 21]. Disponible en: <https://www.tropicos.org/Name/17601443>.
- Weremczuk-Jeżyna I, Grzegorzczak-Karolak I, Frydrych B, Królicka A, Wysokińska H.** Hairy roots of *Dracocephalum moldavica*: rosmarinic acid content and antioxidant potential. *Acta Physiol Plant* **2013**; 35: 2095-2103.

- WHO** World Health Organization. Cardiovascular diseases [monografía en internet] **2017a** [consultado 2017 noviembre 10]. Disponible en: [http://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/en/](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/).
- WHO** (World Health Organization). World Heart Day. [monografía en internet] **2017b** [consultado el 10 de noviembre de 2017]. Disponible en: [https://www.who.int/cardiovascular\\_diseases/world-heart-day-2017/en/](https://www.who.int/cardiovascular_diseases/world-heart-day-2017/en/).
- WHO** (World Health Organization). World Heart Day. [monografía en internet] **2017c** [consultado el 10 de noviembre de 2017]. Disponible en: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))
- Wójtowicz** J, Skalicka-Woźniak K. Application of Moldavian dragonhead (*Dracocephalum moldavica* L.) leaves addition as a functional component of valuable corn snacks. *J Food Sci Technol.* **2017**; 54 (10): 3218-3229.
- Woźniak** L, Skapska S, Marszalek K. Ursolic Acid--A Pentacyclic Triterpenoid with a Wide Spectrum of Pharmacological Activities. *Molecules.* **2015**; 20(11): 20614-20641.
- Xing** B, Peng K, Cao W, Lian X, Wang Q, Wang X. Effects of total flavonoids from *Dracocephalum moldavica* on proliferation, migration, and adhesion molecule expression of rat vascular smooth muscle cells induced by TNF- $\alpha$ . *Pharm Biol.* **2013**; 51(1): 74-83.
- Yang** LN, Xing JG, He CH, Wu T. The phenolic compounds from *Dracocephalum moldavica* L. *Biochem Syst Ecol.* **2014a**; 54: 19-22.
- Yang** HP, Que S, Shi YP, Ban LT: Triterpenoids from *Gentiana veitchiorium*. *J Chem Pharm Res.* **2014b**; 6(7): 1984-1990.
- Zeng** Q, Jin HZ, Qin JJ, Fu JJ, Ha XJ, Liu JH, Yan L, Chan M, Zhang WD. Chemical constituents of the plants from the genus *Dracocephalum*. *Chem Biodivers.* **2010**; 7: 1911-1929.
- Zhang** JL, Yan RJ, Yu N, Zhang X, Chen DJ, Wu T, Xin JG. A new caffeic acid tetramer from the *Dracocephalum moldavica* L. *Nat Prod Res.* **2017**; 0(0): 1-4.

**Zhang** QL, Lin LG, Ye WC. Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chin Med.* **2018**; 13:20: 1-20.

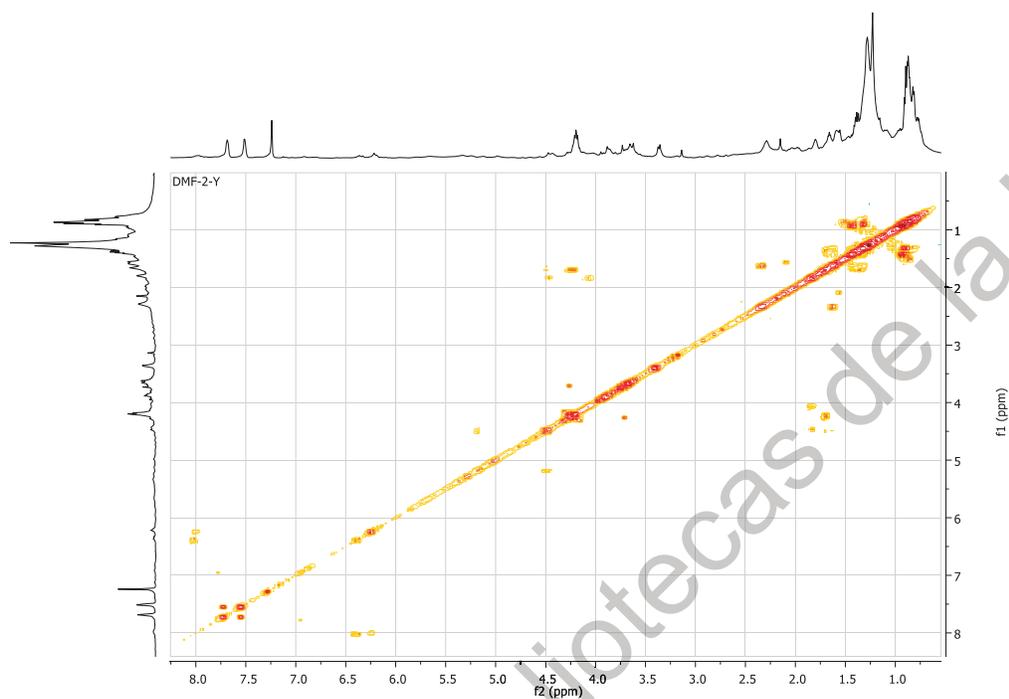
Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

## 11. ANEXO

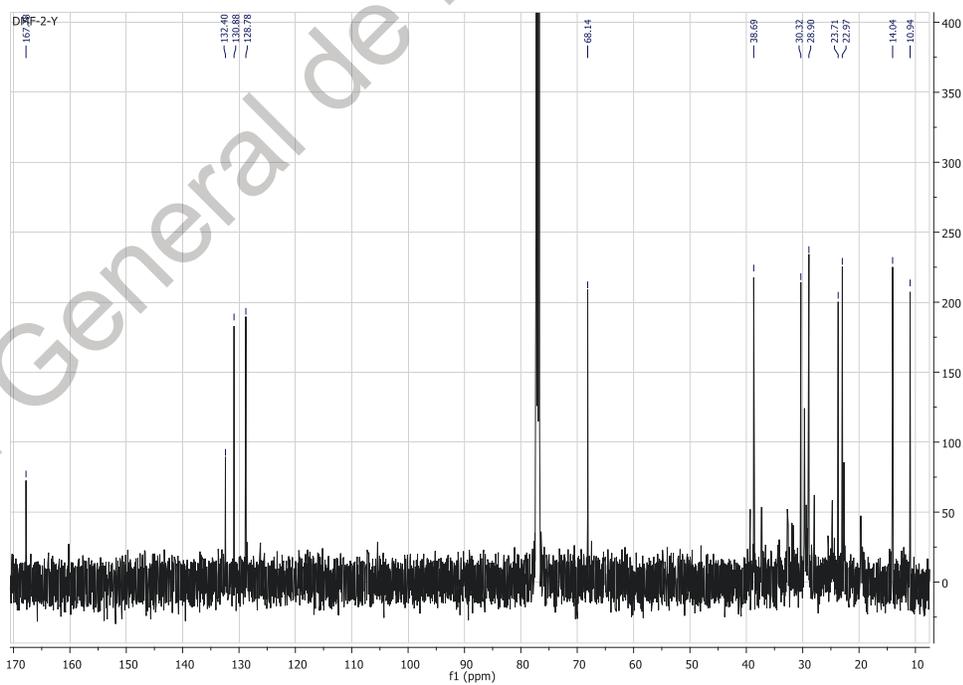
Espectros de resonancia magnética nuclear selectos de los compuestos DMF-2-Y ( $\text{CDCl}_3$ ), DMF-3-Y-4 ( $\text{CDCl}_3$ ), DMF-4-Y ( $\text{DMSO-d}_6$ ) y DMF-7-Y(S) ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) (500 MHz, TMS).

Figura	Página
A1 RMN $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY del compuesto DMF-2-Y.	60
A2 Espectro de $^{13}\text{C}$ completo de DMF-2-Y.	60
A3 DEPT del compuesto DMF-2-Y.	61
A4 HSQC del compuesto DMF-2-Y.	61
A5 Ampliación del espectro HSQC del compuesto DMF-2-Y.	62
A6 HMBC del compuesto DMF-2-Y.	62
A7 Espectro de $^1\text{H}$ completo de DMF-3-Y-4.	63
A8 RMN $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY del compuesto DMF-3-Y-4.	63
A9 Espectro de $^{13}\text{C}$ completo de DMF-3-Y-4.	64
A10 DEPT del compuesto DMF-3-Y-4.	64
A11 HSQC del compuesto DMF-3-Y-4.	65
A12 Ampliación del espectro HSQC del compuesto DMF-3-Y-4.	65
A13 HMBC del compuesto DMF-3-Y-4.	66
A14 Espectro de $^1\text{H}$ completo de DMF-4-Y.	66
A15 RMN $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY del compuesto DMF-4-Y.	67
A16 Espectro de $^{13}\text{C}$ completo de DMF-4-Y.	67
A17 Ampliación del espectro de $^{13}\text{C}$ de DMF-4-Y.	68
A18 DEPT del compuesto DMF-4-Y.	68
A19 HSQC del compuesto DMF-4-Y.	69
A20 HMBC del compuesto DMF-4-Y.	69

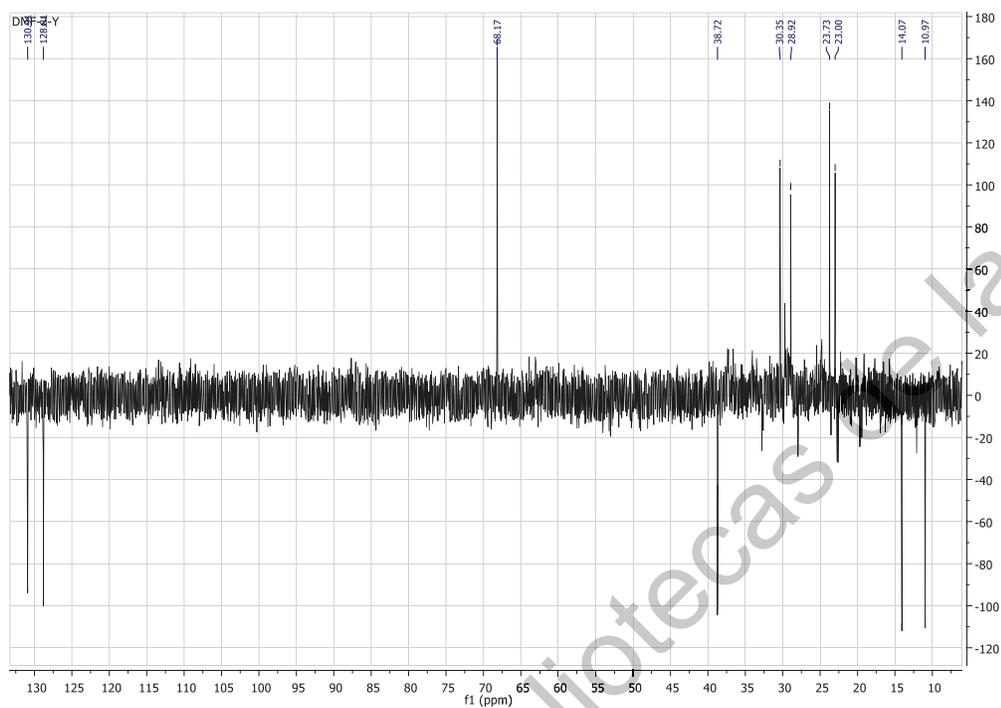
A21	Espectro de $^1\text{H}$ completo de DMF-6-Y.	70
A22	RMN $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY del compuesto DMF-6-Y.	70
A23	Espectro de $^{13}\text{C}$ completo de DMF-6-Y.	71
A24	DEPT del compuesto DMF-6-Y.	71
A25	HSQC del compuesto DMF-6-Y.	72
A26	HMBC del compuesto DMF-6-Y.	72
A27	Espectro de $^1\text{H}$ completo de DMF-7-Y(S).	73
A28	RMN $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY del compuesto DMF-7-Y(S).	73
A29	Espectro de $^{13}\text{C}$ completo de DMF-7-Y(S).	74
A30	DEPT del compuesto DMF-7-Y(S).	74
A31	HSQC del compuesto DMF-7-Y(S).	75
A32	HMBC del compuesto DMF-7-Y(S).	75



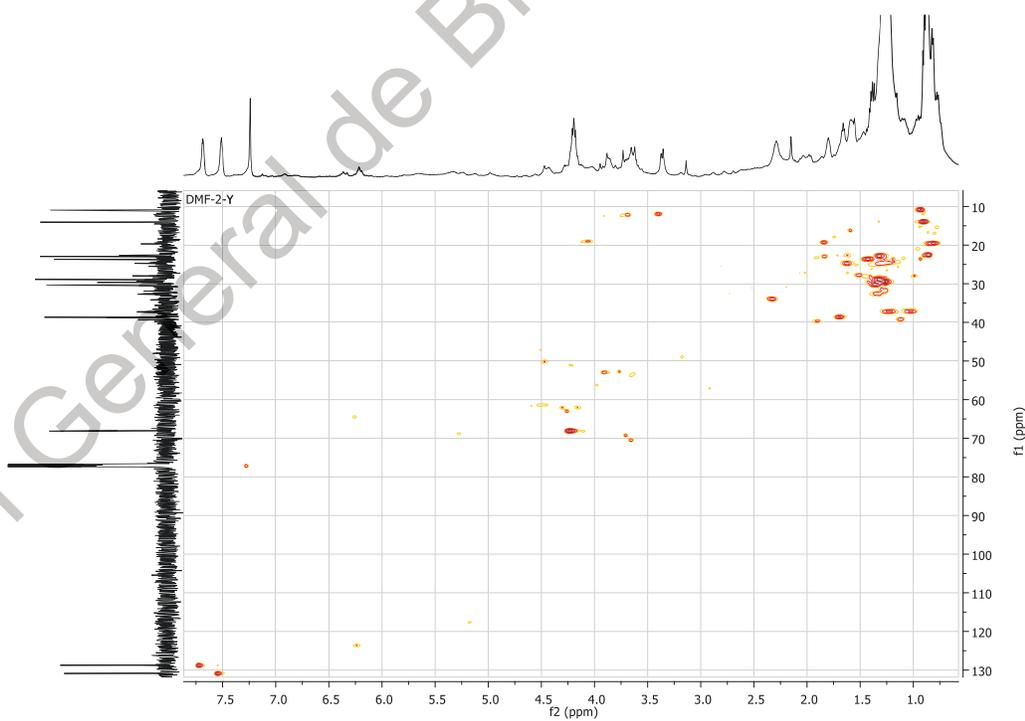
A1. RMN  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY del compuesto DMF-2-Y.



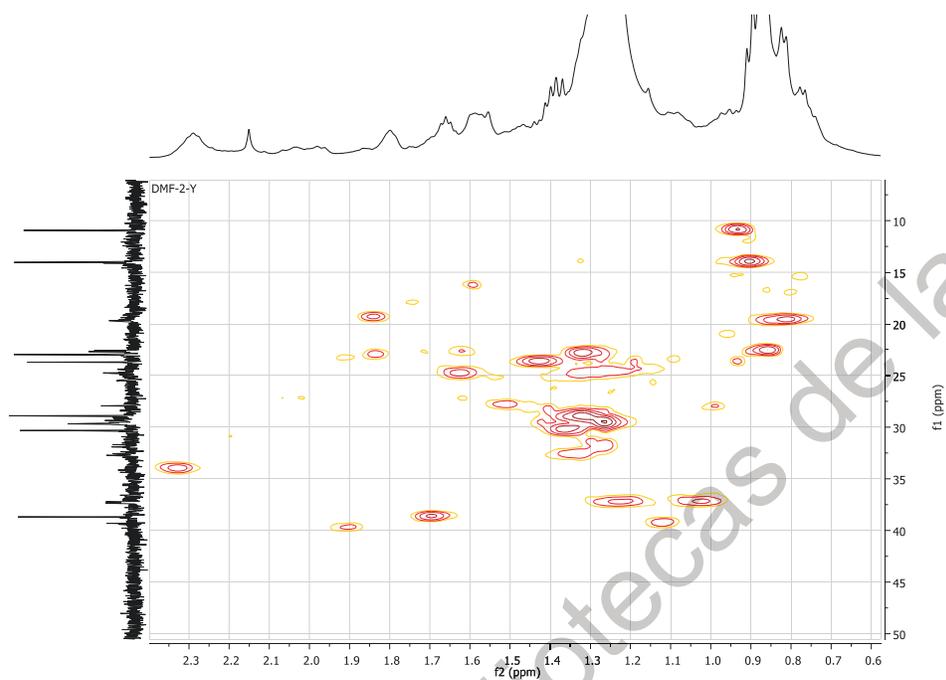
A2. Espectro de  $^{13}\text{C}$  completo de DMF-2-Y.



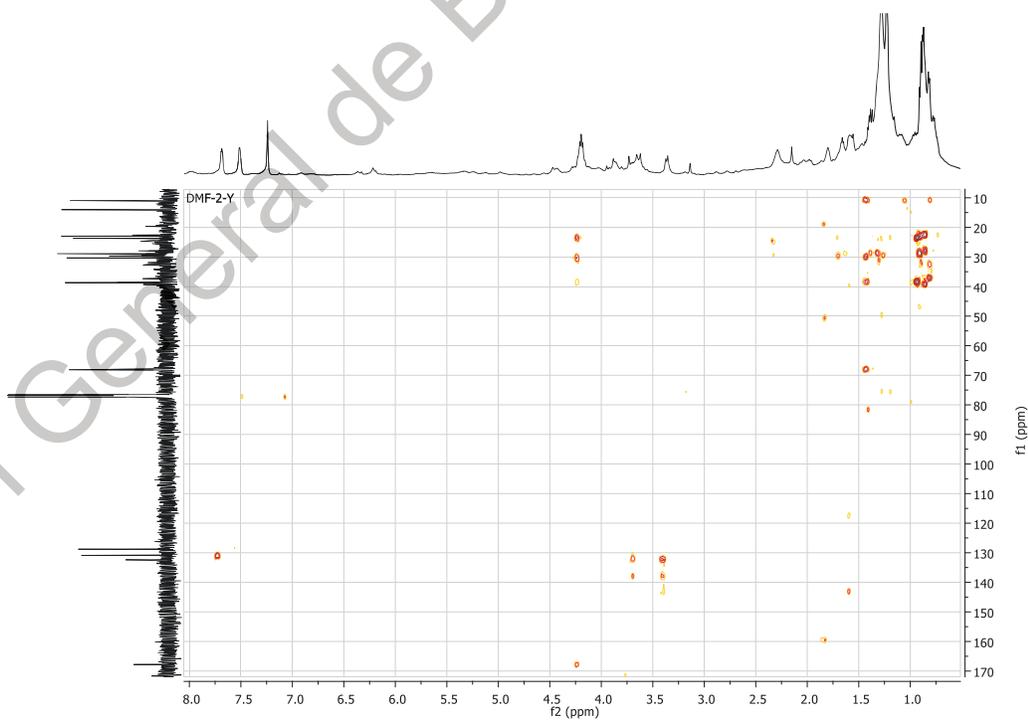
A3. DEPT del compuesto DMF-2-Y.



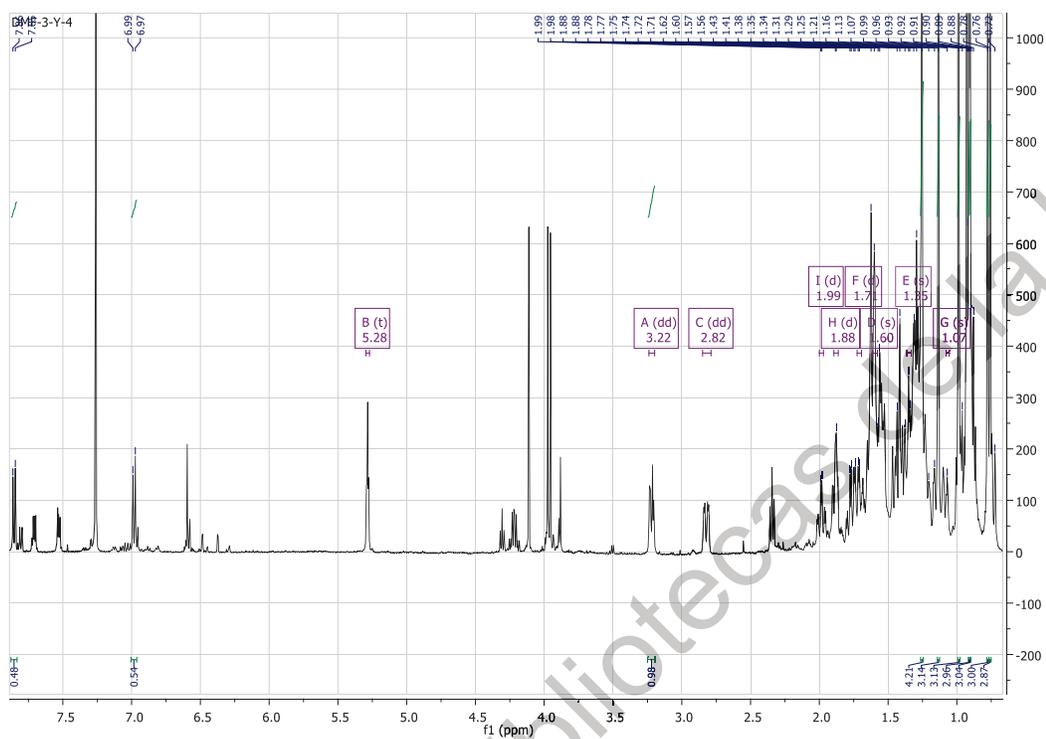
A4. HSQC del compuesto DMF-2-Y.



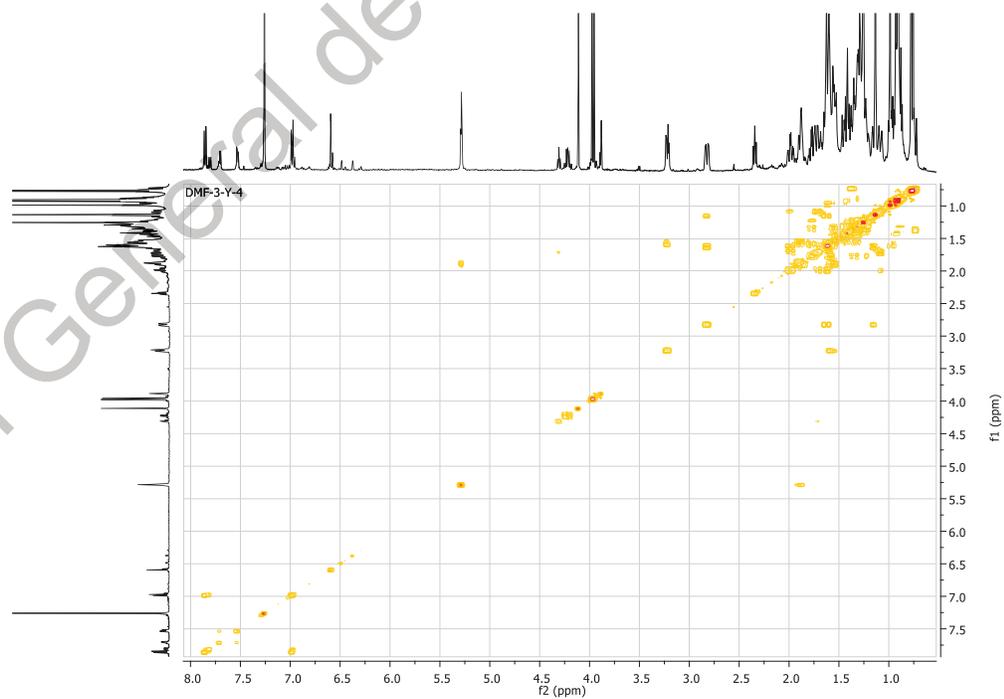
A5. Ampliación del espectro HSQC del compuesto DMF-2-Y.



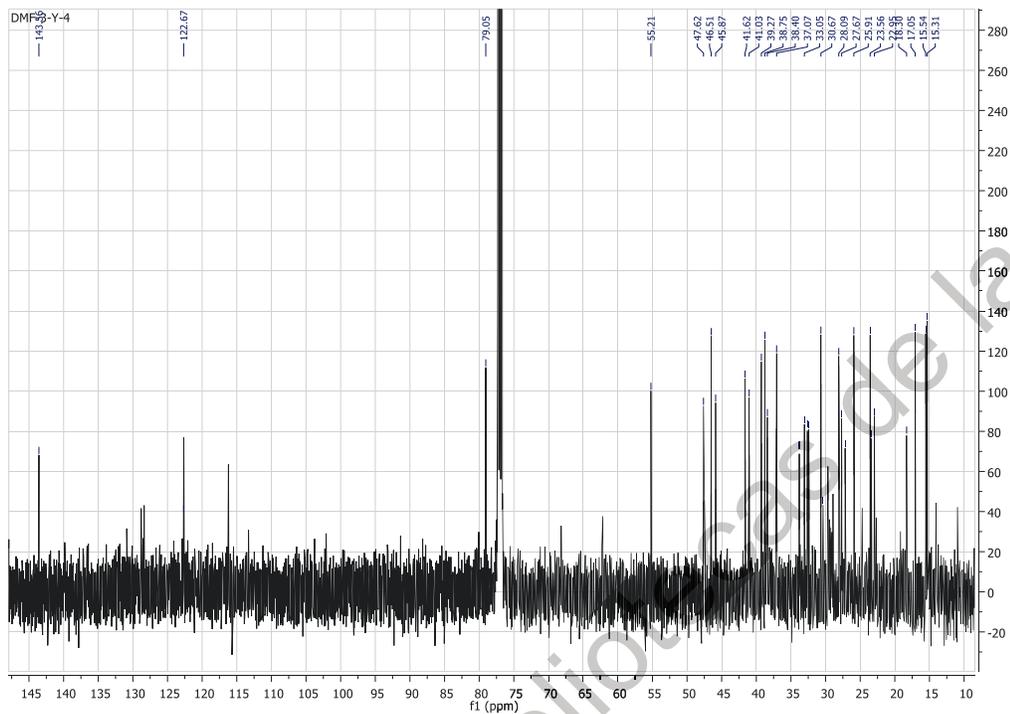
A6. HMBC del compuesto DMF-2-Y.



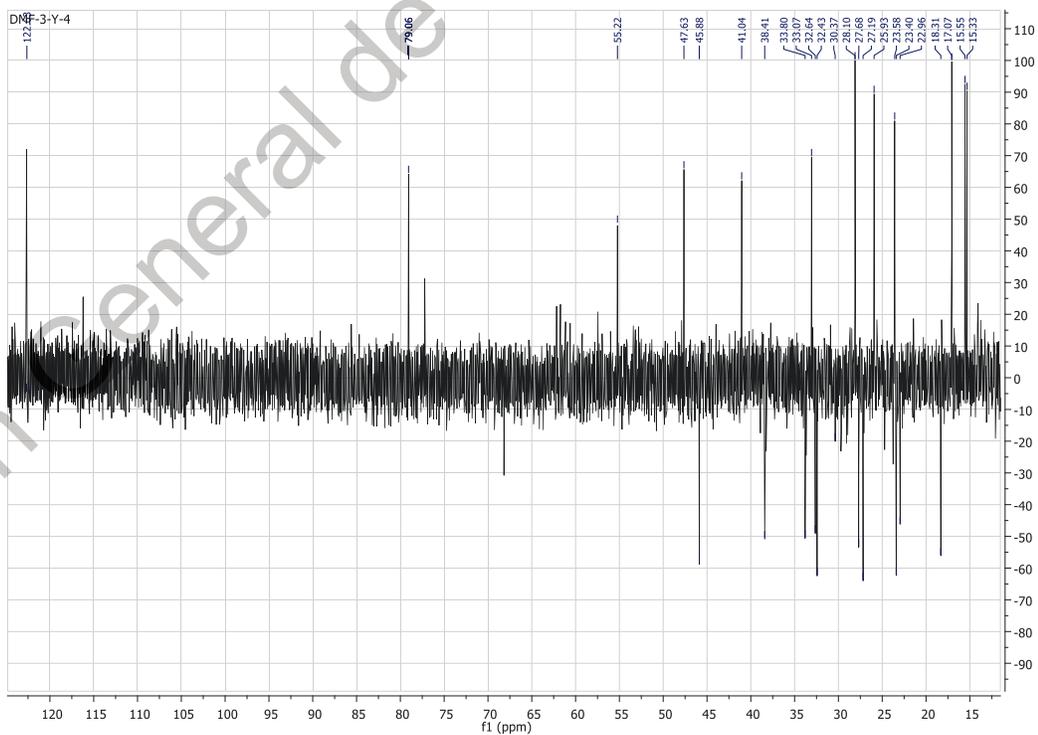
A7. Espectro de  $^1\text{H}$  completo de DMF-3-Y-4.



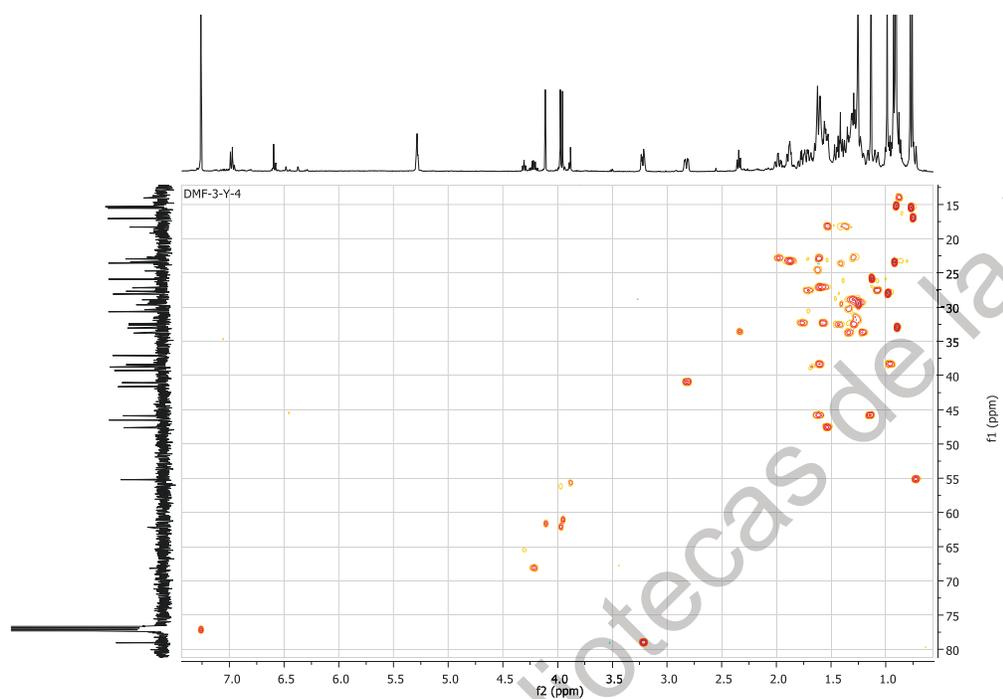
A8. RMN  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY del compuesto DFM-3-Y-4.



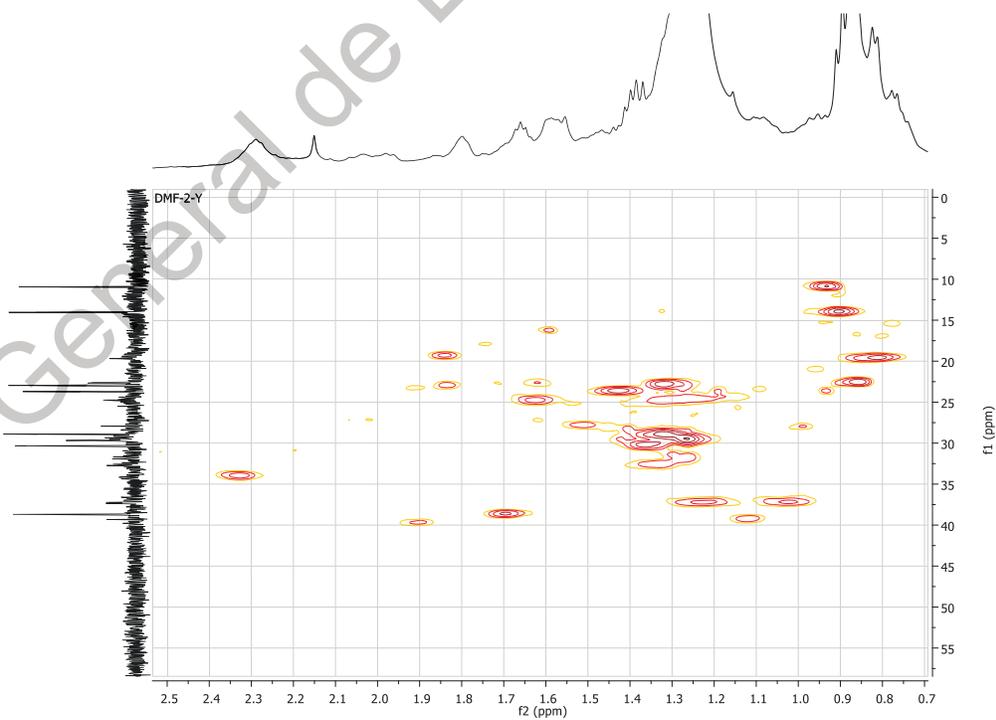
A9. Espectro de  $^{13}\text{C}$  completo de DMF-3Y-4.



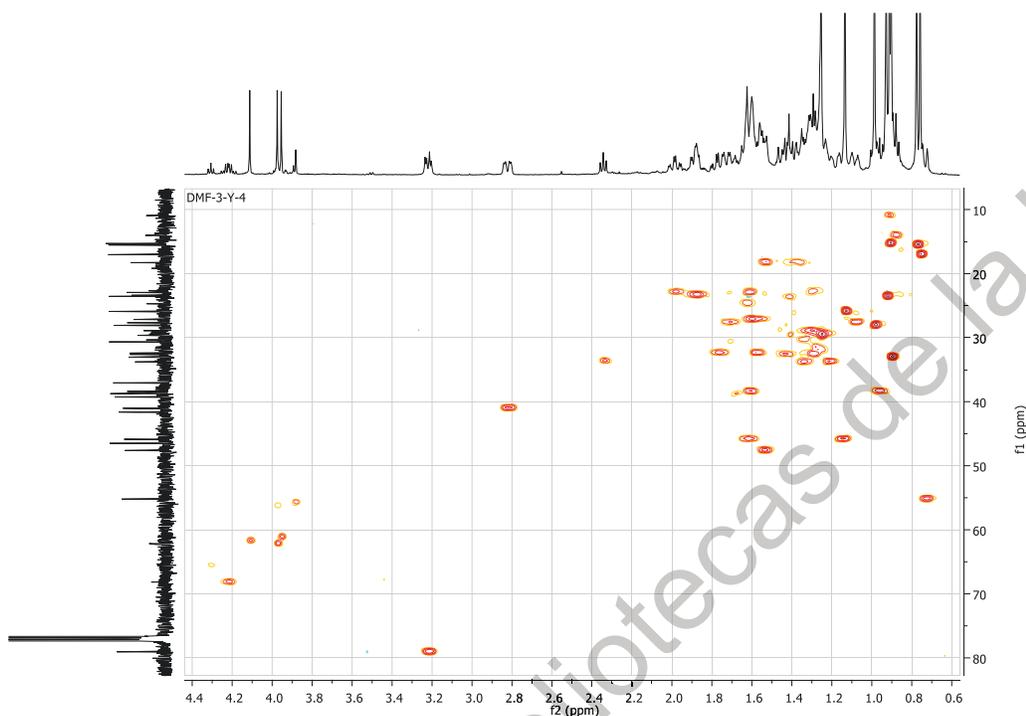
A10. DEPT del compuesto DMF-3-Y-4.



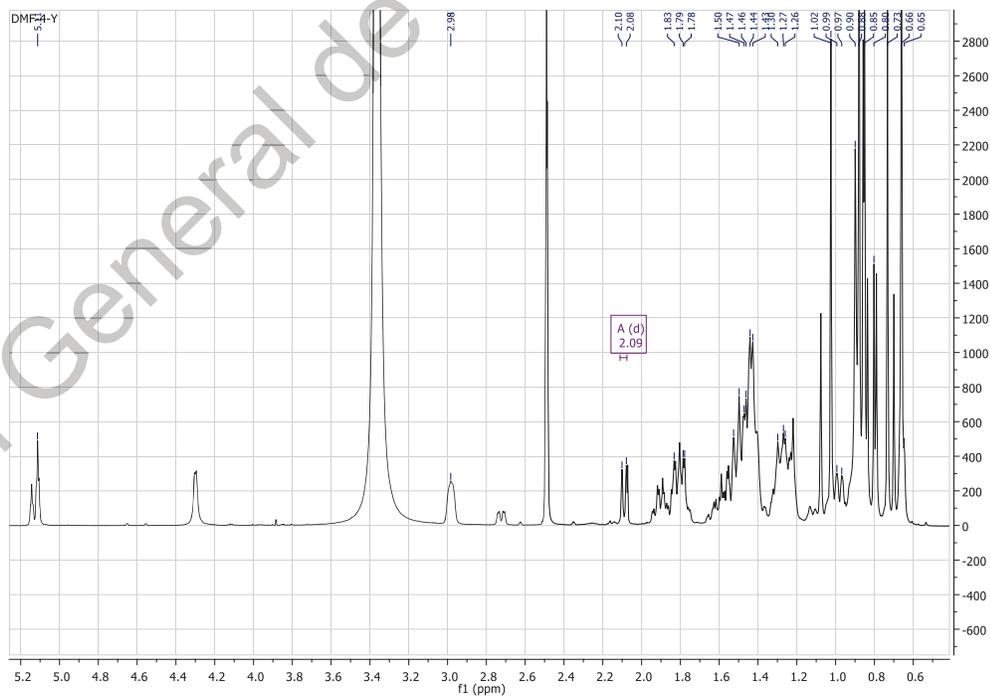
A11. HSQC del compuesto DMF-3-Y-4.



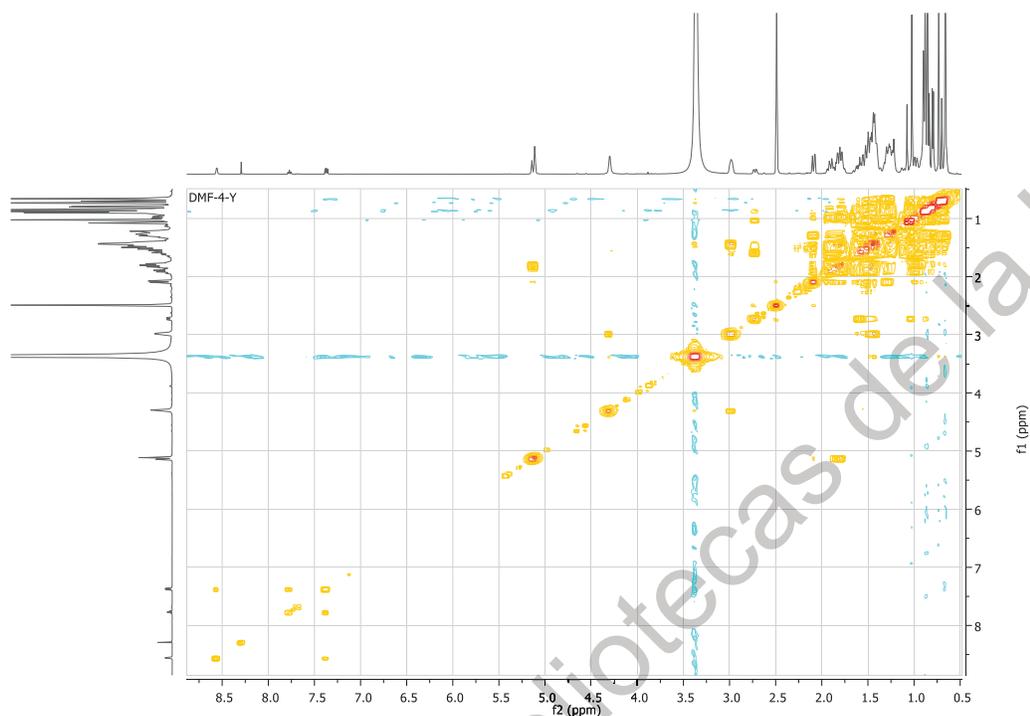
A12. Ampliación del espectro HSQC del compuesto DMF-3-Y-4.



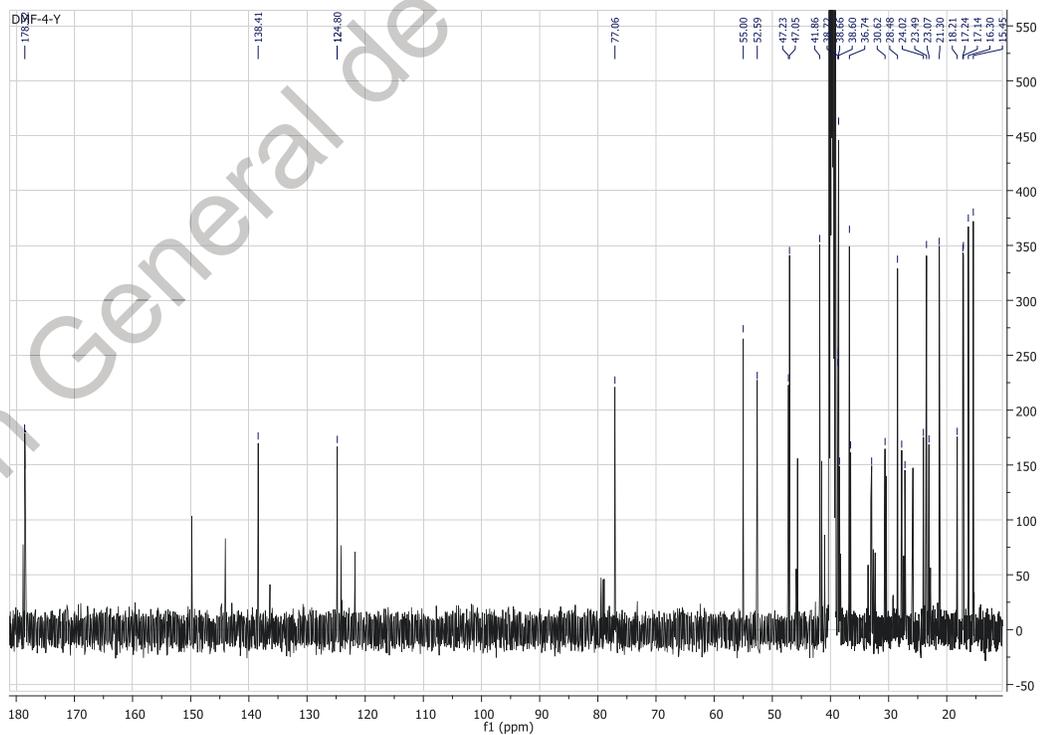
A13. HMBC del compuesto DMF-3-Y-4.



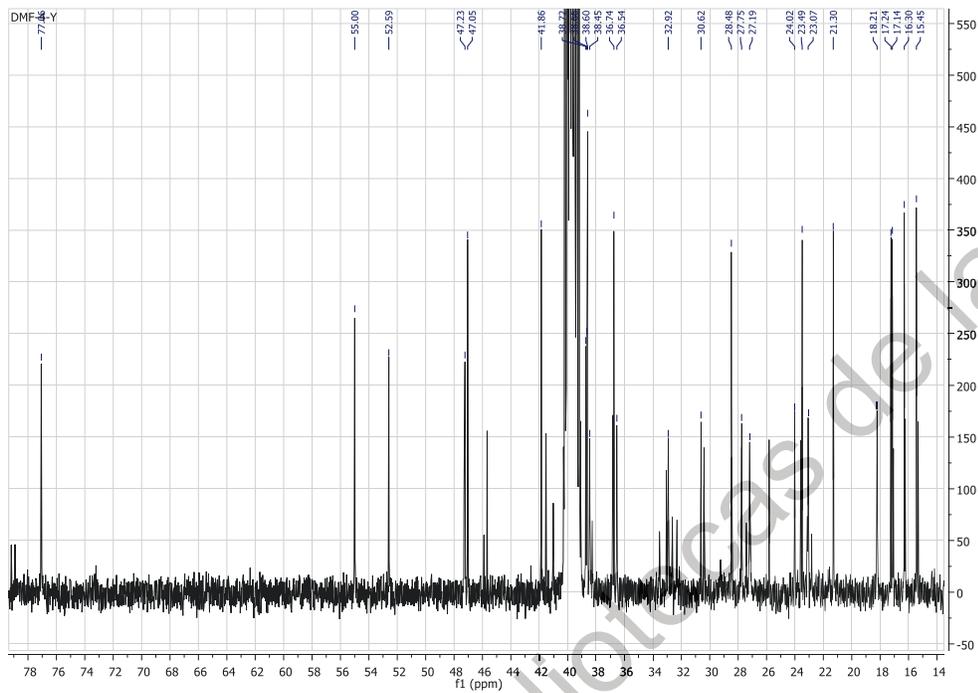
A14. Espectro de  $^1\text{H}$  completo de DMF-4-Y.



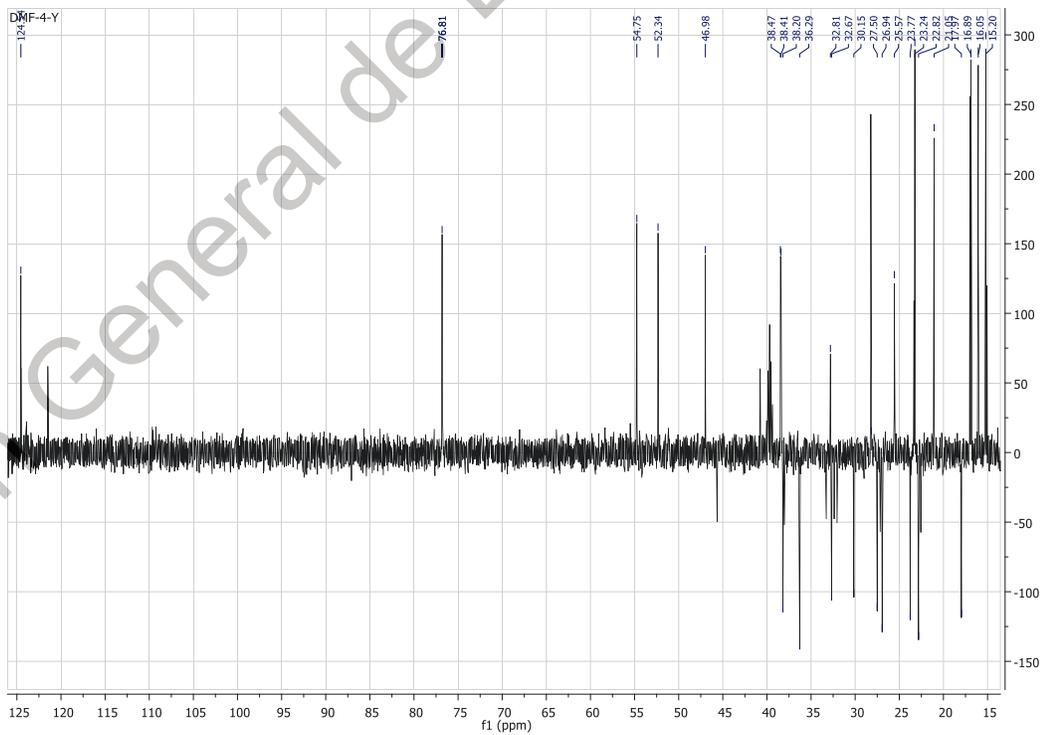
A15. RMN  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY del compuesto DMF-4-Y.



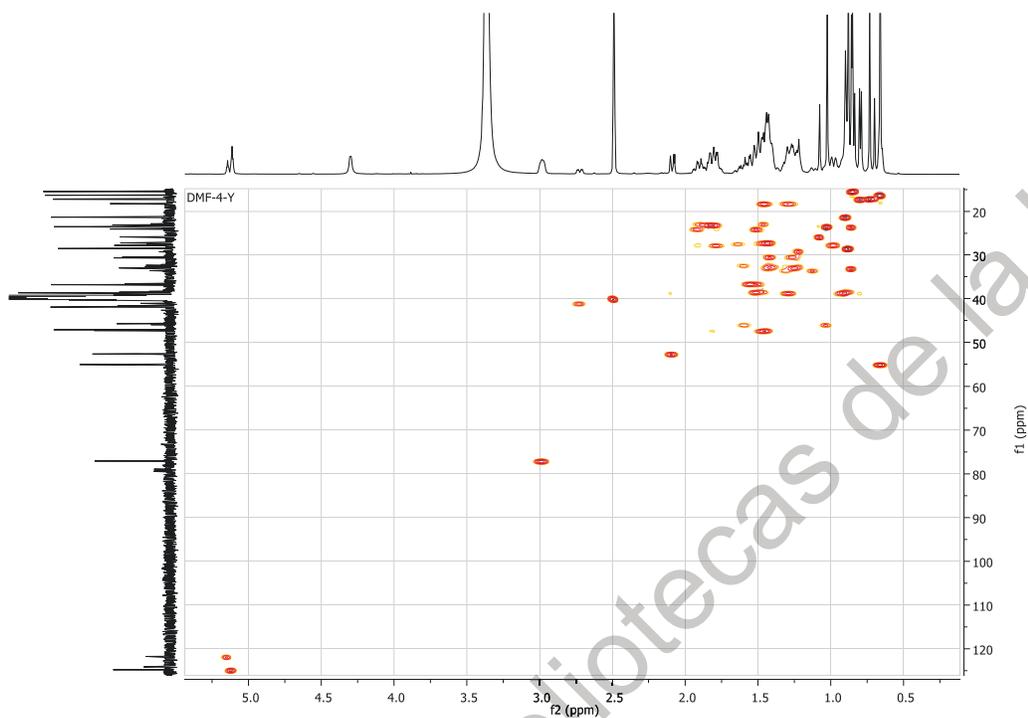
A16. Espectro de  $^{13}\text{C}$  completo de DMF-4-Y.



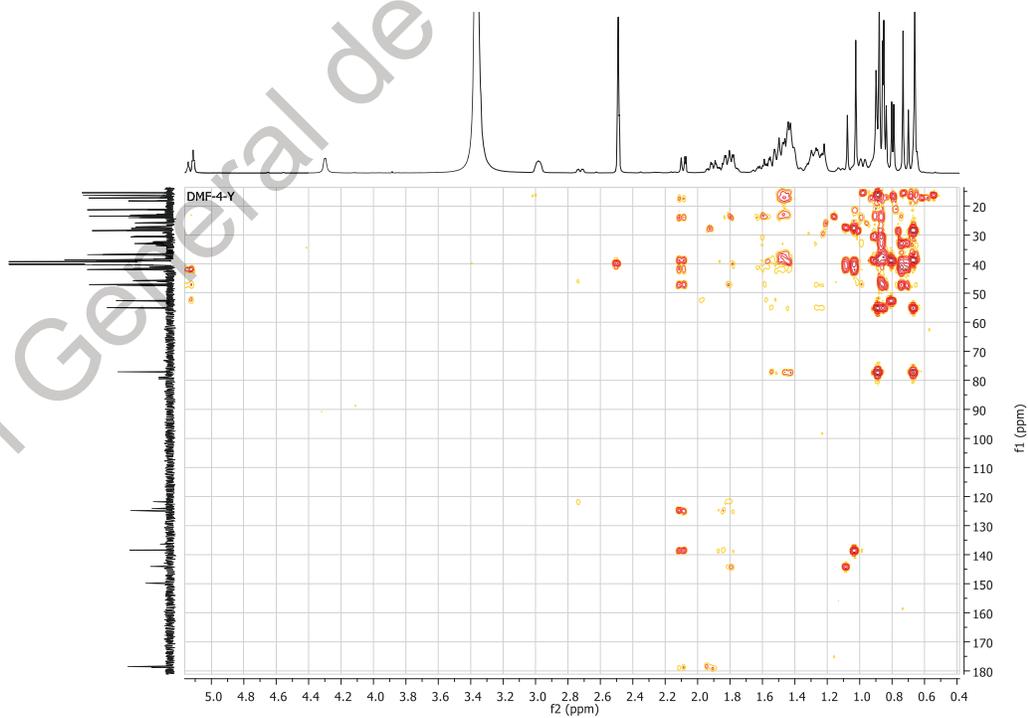
A17. Ampliación del espectro de  $^{13}\text{C}$  de DMF-4-Y.



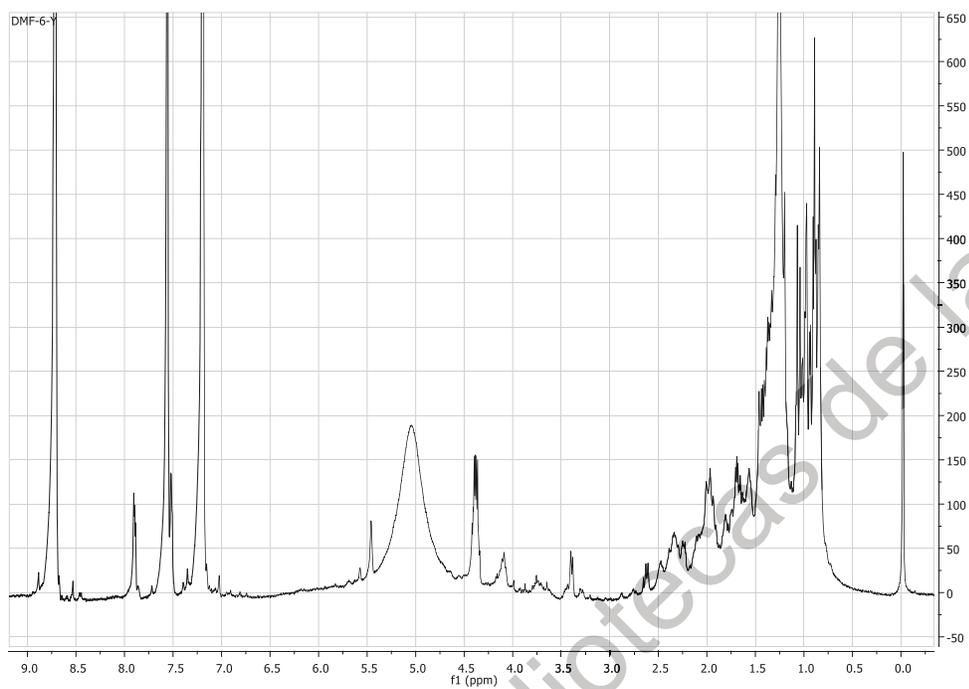
A18. DEPT del compuesto DMF-4-Y.



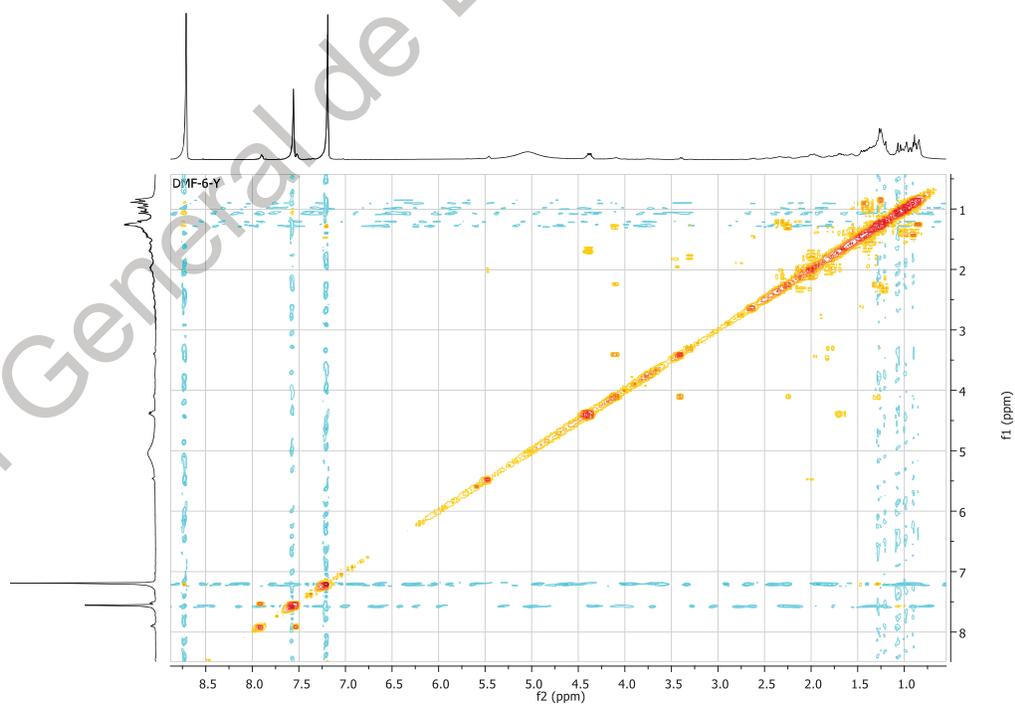
A19. HSQC del compuesto DMF-4-Y.



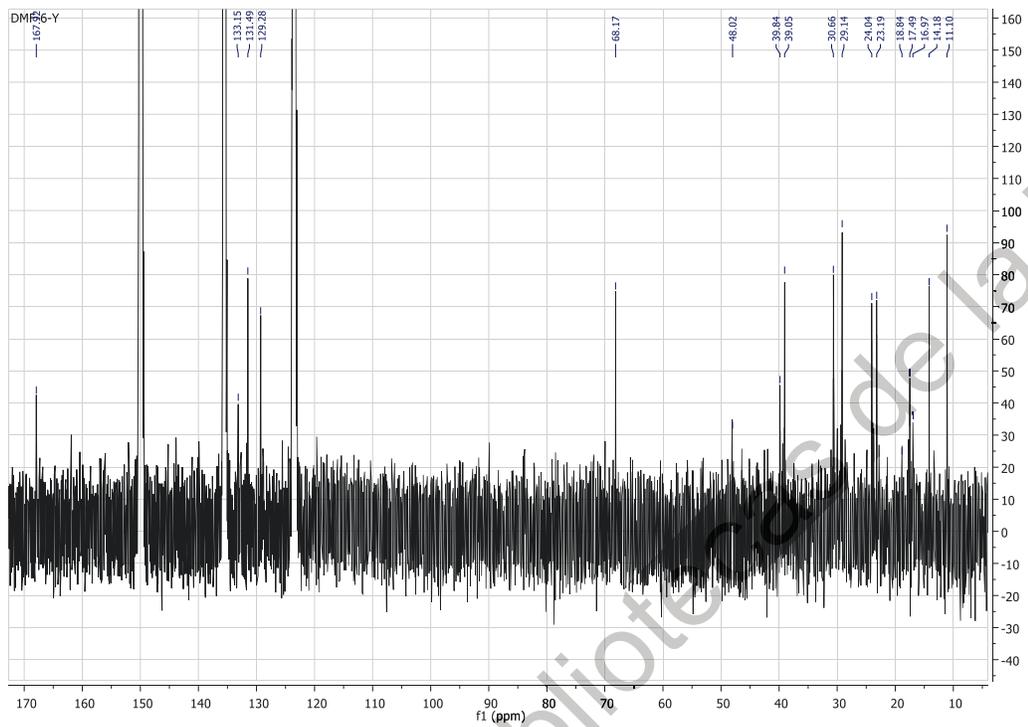
A20. HMBC del compuesto DMF-4-Y.



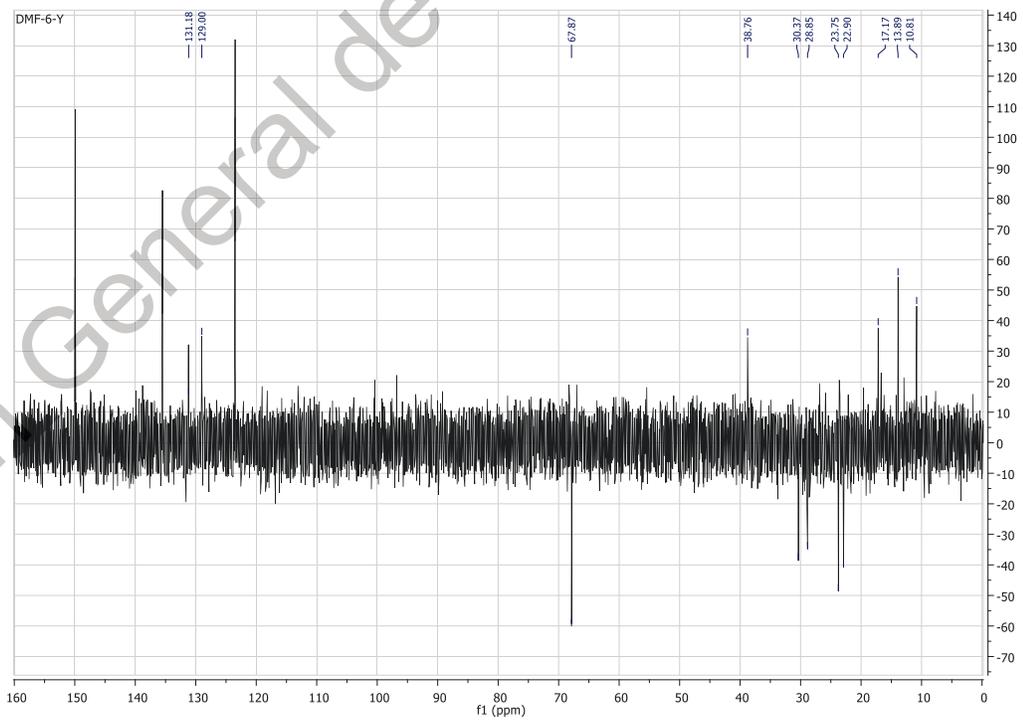
A21. Espectro de  $^1\text{H}$  completo de DMF-6-Y.



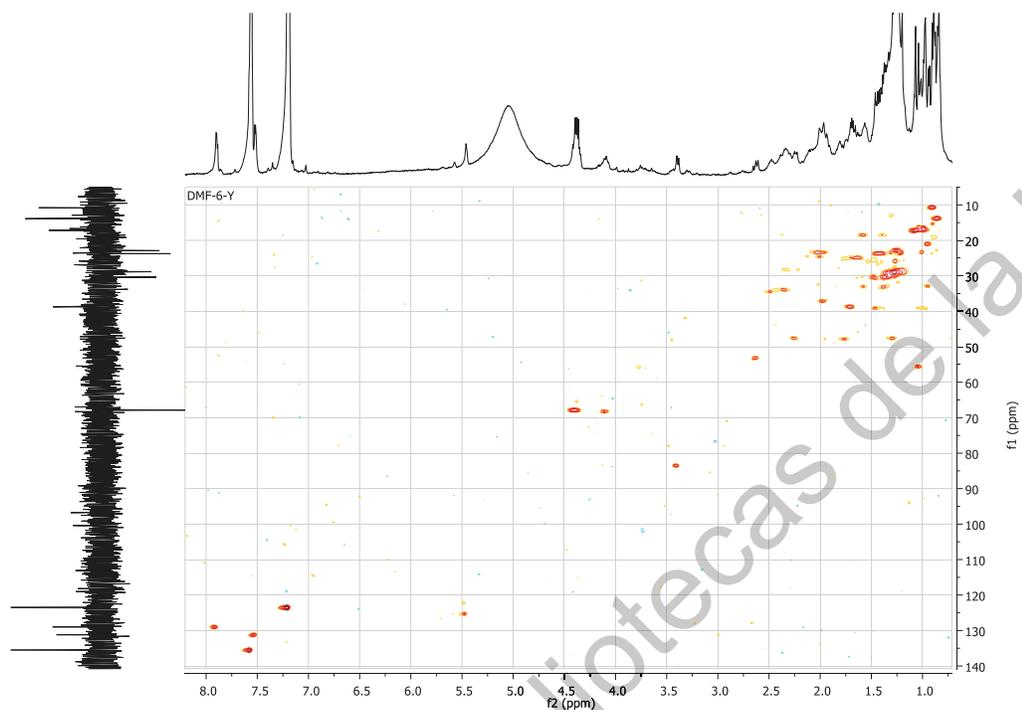
A22. RMN  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY del compuesto DMF-6-Y.



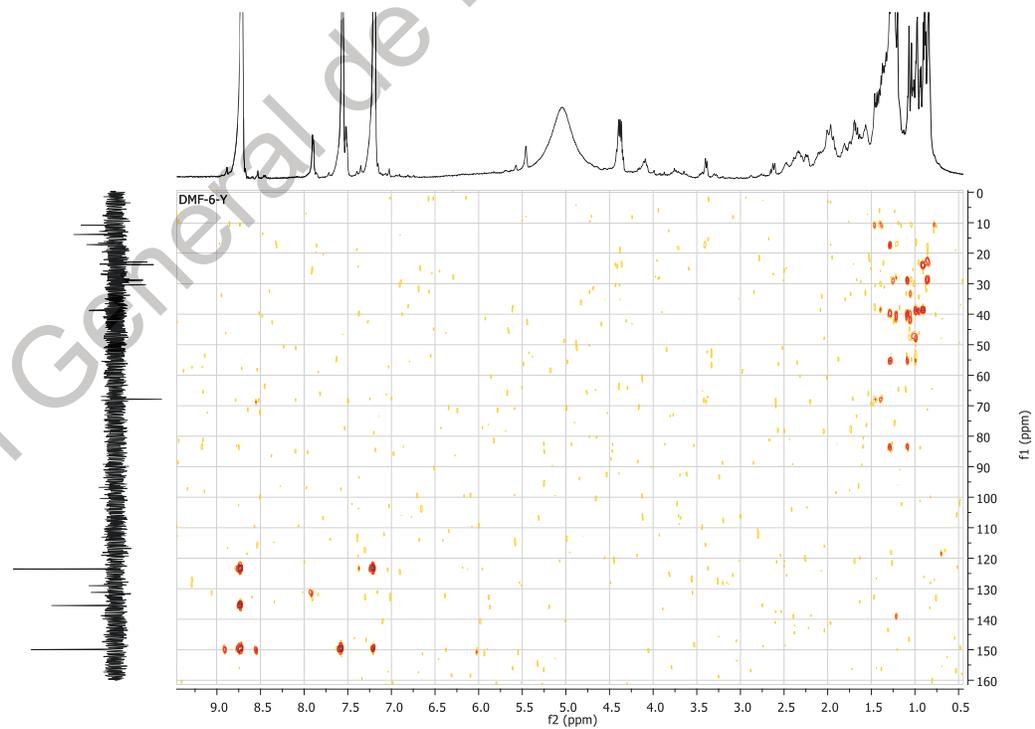
A23. Espectro de  $^{13}\text{C}$  completo de DMF-6-Y.



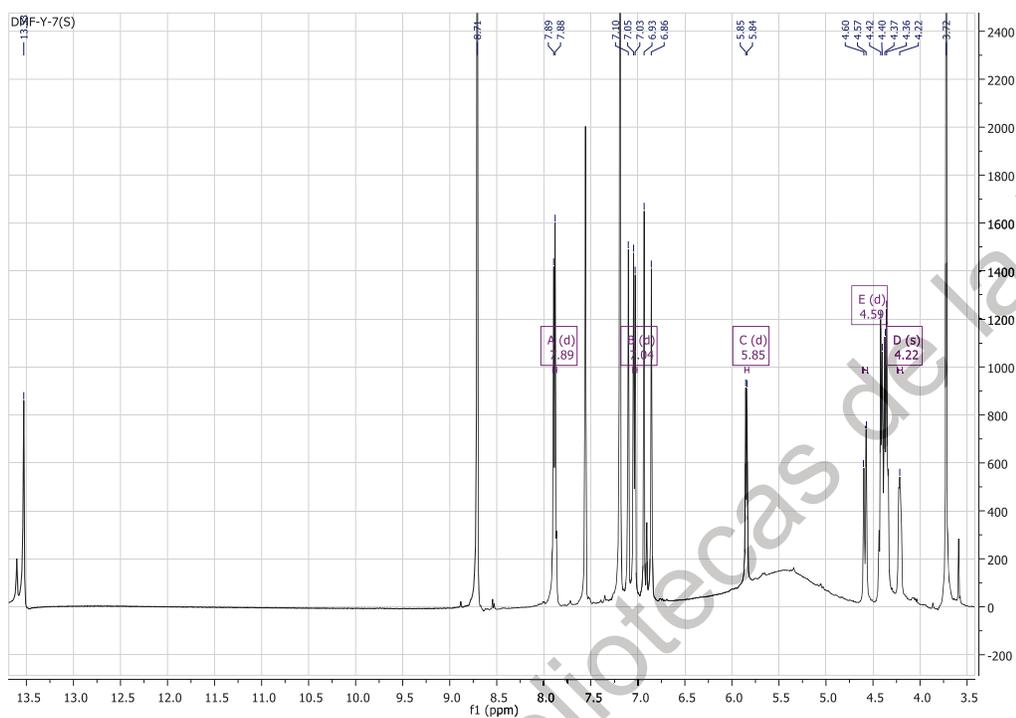
A24. DEPT del compuesto DMF-6-Y.



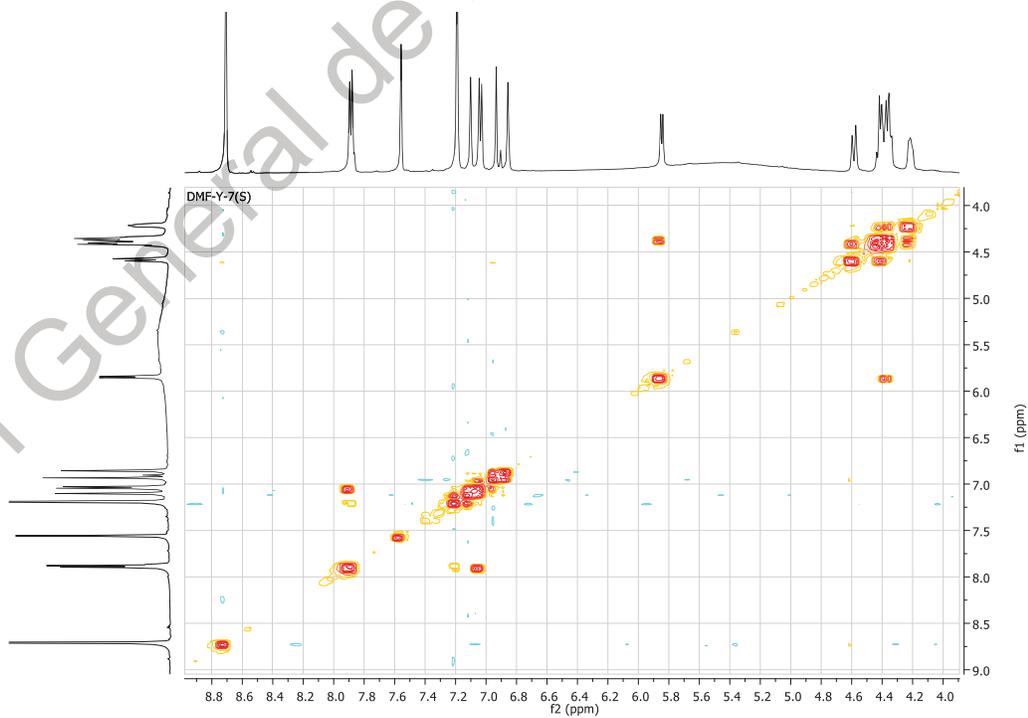
A25. HSQC del compuesto DMF-6-Y.



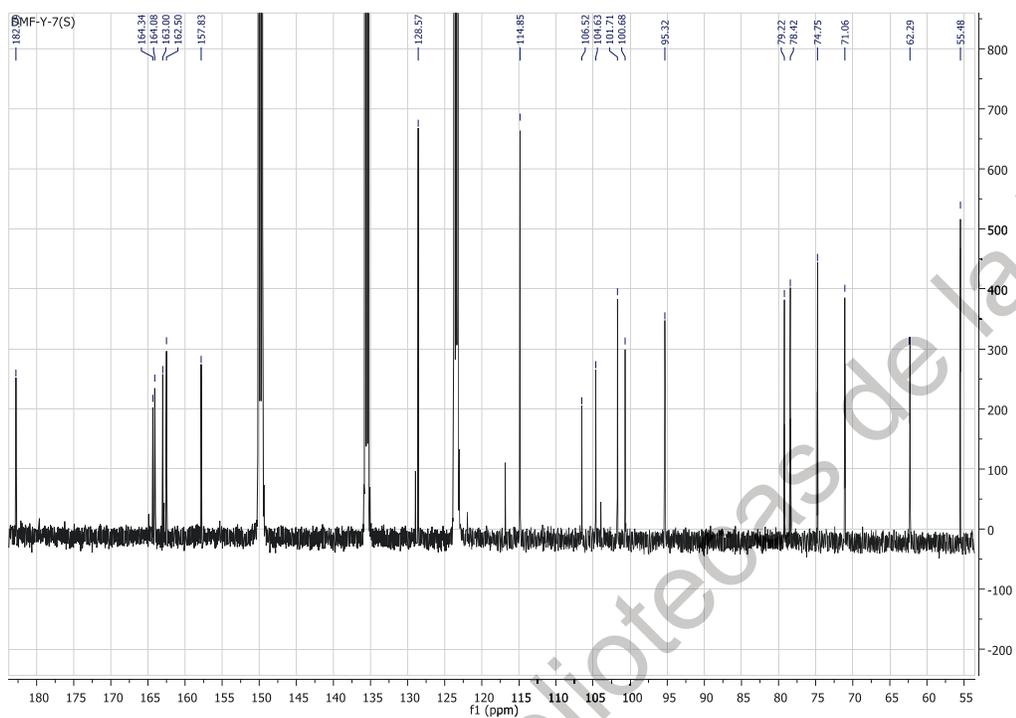
A26. HMBC del compuesto DMF-6-Y.



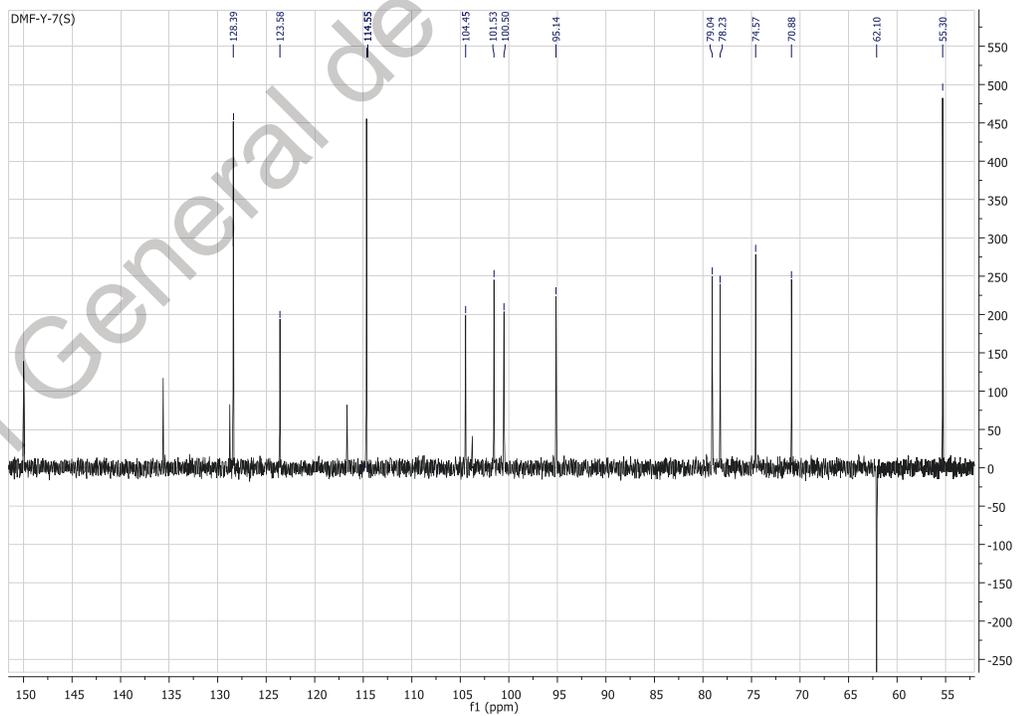
A27. Espectro de  $^1\text{H}$  completo de DMF-7-Y(S).



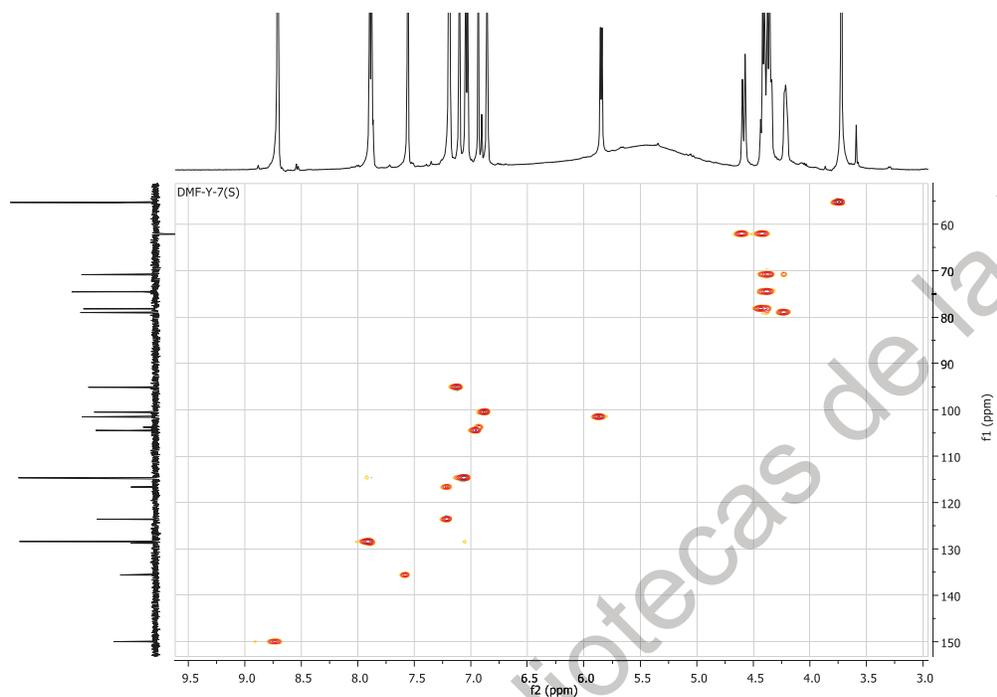
A28. RMN  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY del compuesto DMF-7-Y(S).



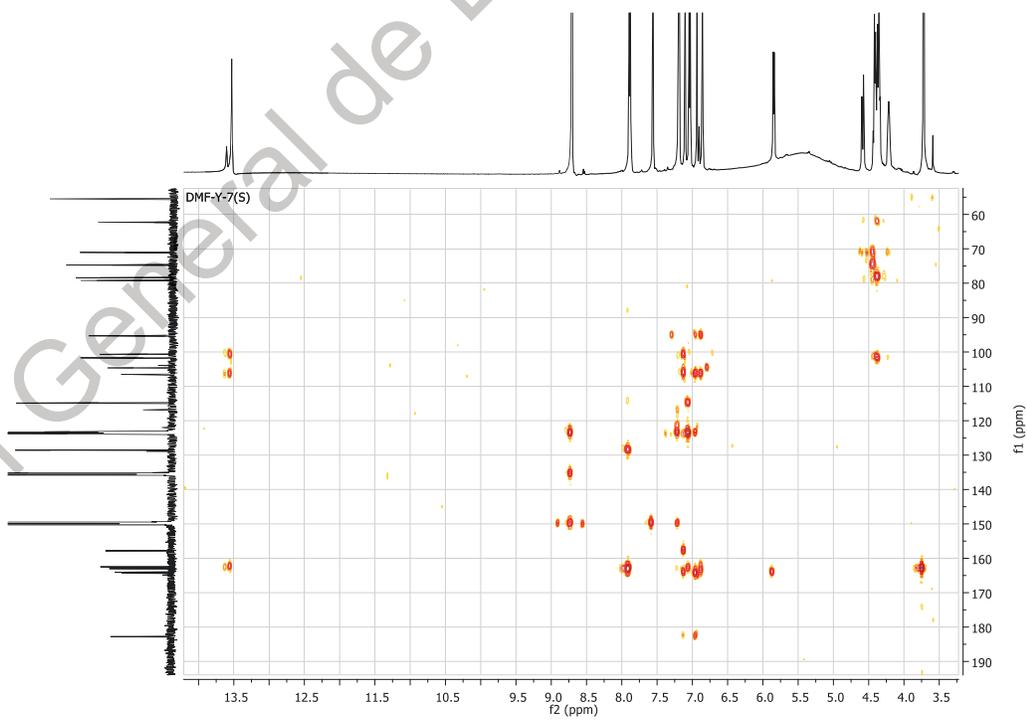
A29. Espectro de  $^{13}\text{C}$  completo de DMF-7-Y(S).



A30. DEPT del compuesto DMF-7-Y(S).



A31. HSQC del compuesto DMF-7-Y(S).



A32. HMBC del compuesto DMF-7-Y(S).