



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

**LICENCIATURA EN QUÍMICA**

**TESIS**

**COMPOSICIÓN QUÍMICA Y EVALUACIÓN DE LAS  
PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE *PRUNELLA*  
*VULGARIS* L. NATIVA DEL ESTADO DE HIDALGO**

**Para obtener el título de Licenciada en Química**

**PRESENTA**

Leslie Torres Hernández

**DIRECTOR**

Dr. J. Jesús Martín Torres Valencia

**CODIRECTORA**

Dra. Reyna Zeferino Díaz

Mineral de la Reforma, Hidalgo., México, noviembre 2025



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo  
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería  
*School of Engineering and Basic Sciences*

Mineral de la Reforma, Hgo., a 21 de noviembre de 2025

Número de control: ICB1-D/2987/2025  
Asunto: Autorización de impresión.

**MTRA. OJUKY DEL ROCÍO ISLAS MALDONADO**  
**DIRECTORA DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR DE LA UAEH**

Con Título Quinto, Capítulo II, Capítulo V, Artículo 51 Fracción IX del Estatuto General de nuestra Institución, por este medio, le comunico que el Jurado asignado a la egresada de la Licenciatura en Química Leslie Torres Hernández, quien presenta el trabajo de titulación “**Composición química y evaluación de las propiedades biológicas de *Prunella vulgaris* L. nativa del estado de Hidalgo**”, ha decidido, después de revisar fundamento en lo dispuesto en el Título Tercero, Capítulo I, Artículo 18 Fracción IV; dicho trabajo en la reunión de sinodales, **autorizar la impresión del mismo**, una vez realizadas las correcciones acordadas.

A continuación, firman de conformidad los integrantes del Jurado:

**Presidente:** Dra. Susana Rojas Lima

**Secretario:** Dra. Raquel Cariño Cortés

**Vocal:** Dr. J. Jesús Martín Torres Valencia

**Suplente:** Dra. Reyna Zeferino Díaz

Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.



Mtro. Gabriel Vergara Rodríguez  
Director del ICB1

GVR/YCC

Atentamente  
“Amor, Orden y Progreso”  
Ciudad del Conocimiento, Carretera Pachuca-Tulancingo Km. 4.5 Colonia Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México. C.P. 42184  
Teléfono: 771 71 720 00 Ext. 40001  
dirección\_icbi@uaeh.edu.mx, vergarar@uaeh.edu.mx

“Amor, Orden y Progreso”

## **Dedicatoria**

A mi mamá,

Eres mi confidente, mi refugio y mi mejor aliada.

Gracias por tu amor incondicional.

Para Gabriel,

Aunque el tiempo que compartimos fue muy corto,

me gusta pensar que nos espera la eternidad.

Te extraño siempre.

A mi sobrino Roberto,

Tu sonrisa ilumina cada habitación y, por algunos instantes, también mi alma.

Eres la promesa de que siempre se puede volver a ser feliz.

## **Agradecimientos**

Con profunda estima, extiendo mi más sincero agradecimiento a todas las personas que, de alguna manera, hicieron posible la realización de esta tesis.

A mi padre, por haberme apoyado desde que nací. Labraste para mí un camino mucho más fácil que el tuyo y ese esfuerzo no lo doy por sentado. Gracias por tu amor.

A mi madre, por ser mi confidente, por todo el esfuerzo que has puesto para que no me falte nada y por siempre apoyar mis sueños. No me alcanzan las palabras para expresar lo mucho que significa para mí tenerte a mi lado.

A mi hermana y a mi cuñado, les agradezco por todo lo que han compartido conmigo. Su manera de lidiar con las adversidades es motivo de toda mi admiración. Valoro mucho los momentos que hemos compartido.

A mi sobrino Roberto, le agradezco su cariño y su ternura.

Le dedico un agradecimiento a mi tío Gabriel por haber sido la maravillosa persona que fue. Conocerte cambió mi vida de muchas maneras y aprecio profundamente todo lo que me enseñaste y los momentos que compartimos.

Además, quiero dedicar unas palabras y extender mis agradecimientos a todas las personas que participaron en la creación de este trabajo.

Al Dr. J. Jesús Martín, usted vio algo en mí, algo que ni yo misma he visto aún y siempre le estaré agradecida por ello. El ímpetu que caracteriza su manera de enseñar, su guía y sabiduría son motivo de admiración y han sido fundamentales en cada parte de este proyecto. El día que me invitó a colaborar con usted marcó un antes y un después en mi vida profesional.

A la Dra. Reyna, tenerla como asesora es una de las mejores sorpresas que la vida me ha dado. Su apoyo constante, sus valiosos aportes, su vasto conocimiento y su generosidad han sido invaluables en el desarrollo de este trabajo y del mío propio. Veo en usted una fuente de inspiración del tipo de científica y mentora en quien espero convertirme algún día.

A la Dra. Raquel le expreso un sincero agradecimiento por las enseñanzas que me ha transmitido. Su amabilidad, generosidad y el acompañamiento que nos brindó han sido piezas clave durante el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Lourdes, le agradezco sus valiosas contribuciones que han sido trascendentales para esta investigación. Sus conocimientos, profesionalismo y arduo trabajo enriquecieron esta tesis y expandieron mis horizontes intelectuales.

Finalmente, quiero agradecer a mis amigos del laboratorio 5, Oliver Espinoza y Patricia Damián. Me siento muy afortunada de haber coincidido con ustedes y aprecio mucho las vivencias que compartimos.

## **Reconocimientos**

Esta investigación tuvo lugar en el Área Académica de Química del Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo bajo la dirección del Dr. J. Jesús Martín Torres Valencia y la codirección de la Dra. Reyna Zeferino Díaz.

El estudio citotóxico se efectuó en colaboración con la Dra. Ma. de Lourdes Álvarez Arellano del Hospital Infantil de México Federico Gómez, Cd. de México.

La evaluación de las propiedades antioxidantes e hipoglucémicas se llevó a cabo bajo la supervisión de la Dra. Raquel Cariño Cortés del Área Académica de Medicina del Instituto de Ciencias de la Salud, de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

La identificación taxonómica del material vegetal fue realizada por el M. en C. Manuel González Ledesma en el Herbario del Área Académica de Biología de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Parte de los hallazgos de este estudio se presentaron en la XIX Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica, que se llevó a cabo del 26 al 30 de agosto de 2024, en la Facultad de Medicina, de la Universidad Autónoma de Nayarit. Con el título «Aislamiento y caracterización del ácido rosmarínico de *Prunella vulgaris* L. nativa del estado de Hidalgo».

Así mismo, otra parte de los resultados obtenidos se expuso con el título «Actividad hipoglucémica, triterpenos y polifenoles de *Prunella vulgaris* L. nativa del estado de Hidalgo», durante la XX Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales, Dr. Luis M. Peña Rodríguez, realizada del 21 al 24 de mayo de 2025 en Mérida, Yucatán, México.

Finalmente, otro fragmento de los datos experimentales de esta tesis se mostró en la en la XX Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica, que tuvo lugar en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco en la Ciudad de México del 20 al 24 de octubre de 2025. Encabezado por el título «Estudio químico y evaluación de las propiedades antioxidantes de *Prunella vulgaris* L.».

## Tabla de contenido

1	Introducción.....	1
2	Antecedentes.....	3
2.1	Plantas usadas en México y el estado de Hidalgo para el tratamiento del cáncer ...	3
2.2	Familia Lamiaceae.....	4
2.3	El género <i>Prunella</i> .....	4
2.4	<i>Prunella vulgaris</i> Lamiaceae .....	5
2.4.1	Metabolitos aislados .....	6
2.4.2	Propiedades biológicas .....	10
3	Generalidades .....	12
3.1	Cuantificación por RMN de $^1\text{H}$ (q-NMR) .....	12
3.2	Estrés oxidativo.....	13
3.2.1	Determinación de la capacidad antioxidante .....	13
3.3	Cáncer .....	16
3.3.1	Leucemia .....	16
3.3.1	Evaluación de la actividad citotóxica .....	17
3.4	Diabetes .....	18
3.4.1	Hiperglucemia .....	18
3.4.2	Enzimas $\alpha$ -glucosidasas.....	19
4	Justificación .....	22
5	Objetivos.....	24
5.1	Objetivo general.....	24
5.2	Objetivos específicos .....	24
6	Desarrollo experimental .....	25

6.1	Colecta e identificación taxonómica de <i>Prunella vulgaris</i> .....	25
6.2	Obtención de extractos.....	26
6.3	Obtención de particiones .....	26
6.4	Cuantificación por RMN de $^1\text{H}$ (q-RMN) .....	27
6.5	Separación cromatográfica e identificación.....	27
6.6	Evaluación de la actividad antioxidante del extracto MeOH, la partición AcOEt pH 3 y el ácido rosmarínico de <i>Prunella vulgaris</i> .....	28
6.6.1	Determinación antirradicalaria por ABTS•+.....	30
6.6.2	Determinación de la actividad antirradicalaria mediante DPPH•.....	31
6.6.3	Determinación antioxidante por reducción del ión férrico (FRAP) .....	31
6.7	Evaluación de las propiedades anticancerígenas del extracto MeOH de <i>P. vulgaris</i> L. .....	33
6.7.1	Evaluación de citotoxicidad en la línea celular REH .....	33
6.8	Actividad hipoglucemiante .....	33
7	Resultados y Discusión.....	37
7.1	Cuantificación por RMN de $^1\text{H}$ del ácido rosmarínico en los extractos .....	39
7.2	Estudio químico de las particiones .....	42
7.3	Cuantificación por RMN de $^1\text{H}$ del ácido rosmarínico en las particiones de AcOEt .....	45
7.4	Aislamiento, purificación e identificación de compuestos .....	48
7.4.1	Ácido rosmarínico .....	48
7.4.2	Mezcla de ácido ursólico y oleanólico .....	53
7.4.3	Ácido ursólico .....	55
7.4.4	Otros .....	57
7.5	Cuantificación absoluta por RMN de $^1\text{H}$ (q-RMN) del ácido rosmarínico .....	57

7.6	Evaluación de la capacidad antioxidante .....	60
7.6.1	ABTS•+ .....	60
7.6.2	DPPH•.....	62
7.6.3	FRAP .....	64
7.7	Estudio citotóxico .....	66
7.8	Actividad hipoglucemiente .....	67
7.8.1	Ensayo de inhibición de la enzima $\alpha$ -glucosidasa .....	67
8	Conclusiones.....	71
9	Bibliografía .....	72

## Símbolos y abreviaturas

$\alpha$	Alfa
$\lambda$	Longitud de onda
$[\alpha]_D^t$	Rotación específica de la luz polarizada
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\text{mM}$	Milimolar
$\mu\text{M}$	Micromolar
$\text{mg}$	Miligramos
$\mu\text{g}$	Microgramo
$\text{mL}$	Mililitros
$\text{nm}$	Nanómetros
$^{13}\text{C}$	Carbono 13
$^1\text{H}$	Protón
$\text{AcOEt}$	Acetato de etilo
CC	Cromatografía en Columna (Column Cromatography)
$d_6$	Hexadeuterado

DMSO	Dimetilsulfóxido
EtOH	Etanol
g	gramos
HSQC	Correlación cuántica heteronuclear (Heteronuclear Single Quantum Correlation)
IR	Infrarrojo
IC 50	Concentración inhibitoria 50
MeOH	Metanol
%	Porcentaje
p. f.	Punto de fusión
pH	Potencial de hidrógeno
ppm	Partes por millón
q-NMR	Cuantificación por Resonancia Magnética Nuclear
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
TCL	Cromatografía en Capa Fina (Thin Layer Chromatography)

## **1      Introducción**

Durante siglos, alrededor del mundo, los humanos han recurrido a conocimientos medicinales ancestrales para tratar sus enfermedades (OMS, 2025) y, hace cerca de 100 años las hierbas medicinales eran un remedio fundamental en el tratamiento de las mismas (Zhang, Onakpoya, Posadzki, & Eddouks, 2015). Actualmente, se estima que el 40% de los medicamentos modernos se basan en la naturaleza y el conocimiento tradicional (OMS, 2025), específicamente muchas de las moléculas activas más potentes de las plantas y sus derivados. Aproximadamente el 80% de la población mundial utiliza medicamentos a base de hierbas principalmente en la atención primaria de su salud (Zhang, Onakpoya, Posadzki, & Eddouks, 2015).

*Prunella vulgaris* L. (Lamiaceae) (Figura 1) es una planta que tiene uso medicinal y se encuentra distribuida en países asiáticos como Corea, Japón y China (Wang, y otros, 2019). En México, se ha registrado en los estados de México, Oaxaca, Durango, Guerrero, Hidalgo, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Querétaro, Sonora, Tlaxcala y Veracruz (CONABIO, 2009).



**Figura 1.** *Prunella vulgaris* L. (Lamiaceae) nativa del estado de Hidalgo.

Es una planta herbácea pequeña, que crece en zonas húmedas a una altura de entre 2 y 3 mil metros. Posee actividades biológicas diversas, entre las que destacan la antimicrobiana, anticáncer y antiinflamatoria (Wang, y otros, 2019). Los estudios químicos sobre la especie asiática han evidenciado la presencia de varios triterpenos, esteroles, flavonoides, cumarinas, fenilpropanoides y polisacáridos (Pan, Wang, & Chen, 2022). En Hidalgo se le conoce como hierba del cáncer, se emplea para las heridas internas, hernias, úlceras y cáncer (Pérez Escandón, Villavicencio Nieto, & Ramírez Aguirre, 2003) y, hasta donde sabemos, no cuenta con estudios químicos.

En el presente trabajo se describe el estudio químico y evaluación de las propiedades biológicas de *Prunella vulgaris* nativa de Hidalgo con la finalidad de contribuir al conocimiento de su composición química y a validar su uso tradicional.

## 2 Antecedentes

### 2.1 Plantas usadas en México y el estado de Hidalgo para el tratamiento del cáncer

En México se han registrado al menos 300 plantas que se usan de manera tradicional para combatir padecimientos relacionados con el cáncer (Alonso-Castro, y otros, 2011). En el estado de Hidalgo se tiene un registro de unas 460 especies medicinales, de las cuales al menos 12 se emplean para tratar este padecimiento (Pérez Escandón, Villavicencio Nieto, & Ramírez Aguirre, 2003). En la Tabla 1 se da un listado de las plantas que se usan directamente para el cáncer, entre ellas, *Prunella vulgaris*.

**Tabla 1.** Plantas medicinales del estado de Hidalgo que se emplean para el cáncer.

Familia	Especie (nombre común)	Afecciones tratadas	Estudio químico
Euphorbiaceae	<i>Jatropha dioica</i> Sessé ex Cerv. var. Dioica (sangre de drago)	Caída de pelo, amacizar la dentadura, cáncer.	No
Lamiaceae	<i>Prunella vulgaris</i> L. (hierba del cáncer)	Heridas internas, hernias, úlceras, cáncer.	No
Leguminosae	<i>Cassia fistula</i> L. (lluvia de oro)	Cáncer.	Sí
	<i>Cuphea aequipetala</i> Cav. (hierba del cáncer)	Úlceras, hernias, heridas, cáncer.	No
	<i>Cuphea lanceolata</i> Ait. (hierba del cáncer)	Úlceras, hernias, heridas, cáncer.	No
Lythraceae	<i>Cuphea procumbens</i> Ort. (hierba del cáncer)	Úlceras, hernias, heridas, cáncer.	No
	<i>Lythrum vulneraria</i> Schrank (hierba del cáncer)	Úlceras, hernias, heridas, cáncer.	No
Plumbaginaceae	<i>Plumbago pulchella</i> Boiss (pañete)	Lavados vaginales, flujo vaginal, cáncer de matriz.	Sí
Rubiaceae	<i>Hamelia patens</i> Jacq. (madura zapote)	Heridas, úlcera digestiva, inflamación de estómago, cáncer.	Sí

<b>Rutaceae</b>	<i>Decatropis bicolor</i> (Zucc.) Radlk. (aranthó)	Heridas, cáncer, hígado.	Sí
<b>Scrophulariaceae</b>	<i>Mimulus glabratus</i> HBK (herba del cáncer de agua)	Cáncer, heridas.	Sí
<b>Solanaceae</b>	<i>Solanum rostratum</i> Dun. (duraznillo)	Lavados vaginales, heridas, cáncer de matriz, tos.	No

Según una búsqueda reciente con el explorador científico SciFinder, siete de ellas permanecen sin estudiarse. En la mayoría de los casos de las especies investigadas los resultados han justificado su uso tradicional.

## 2.2 Familia Lamiaceae

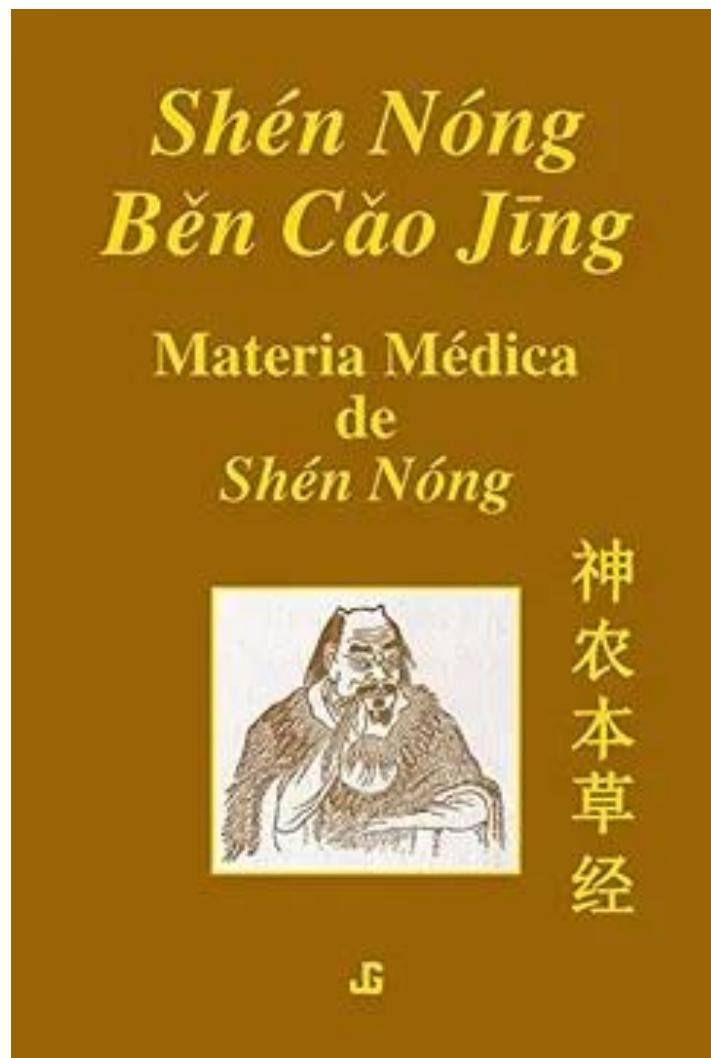
La familia Lamiaceae cuenta con alrededor de 7756 especies, siendo un 13.7 % medicinales. Las especies de esta familia contienen varios metabolitos secundarios, principalmente lignanos, flavonoides, iridoides, terpenoides no volátiles, glucósidos feniletanoides, ácidos cafeoilquínicos, los cuales le confieren diversas funciones biológicas (Karageçili & Gülcin, 2025). Tiene distribución en bosques de clima templado y es una de las familias con mayor riqueza de especies en México (Martínez-Gordillo, y otros, 2017).

## 2.3 El género *Prunella*

*Prunella* es un género de plantas herbáceas que pertenece a la familia Labiate (Lamiaceae) cuya distribución es amplia en regiones templadas en las montañas tropicales de Europa y particularmente de Asia. Los estudios farmacológicos sobre este género han revelado que posee funciones antivirales, antibacterianas, antiinflamatorias, inmunorreguladoras, antioxidantes, antitumorales, antihipertensivas e hipoglucémicas (Psotová, y otros, 2003). Los estudios químicos han evidenciado la presencia de compuestos activos relacionados con estas funciones, entre ellos triterpenoides, ácidos fenólicos, flavonoides y polisacáridos (Psotová, y otros, 2003).

## 2.4 *Prunella vulgaris* Lamiaceae

Esta especie es una planta herbácea perenne que crece en todas las regiones templadas del mundo (Zholdasbayev, Atazhanova, Musozoda, & Musozoda, 2023). Los primeros registros al respecto, se originaron en el “Clásico de la Materia Médica de Shen Nong” (Shén Nóng Běn Cǎo Jīng, 神农本草经) (dinastía Dong Han, 25-220 d. C.) (Figura 2) (Pan, Wang, & Chen, 2022).



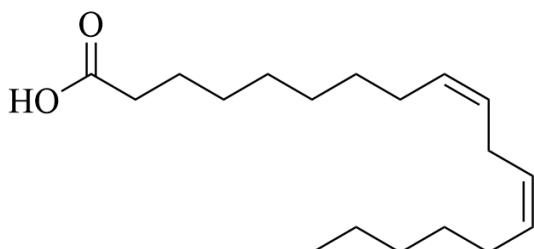
**Figura 2.** Clásico de la Materia Médica de Shen Nong.

## 2.4.1 Metabolitos aislados

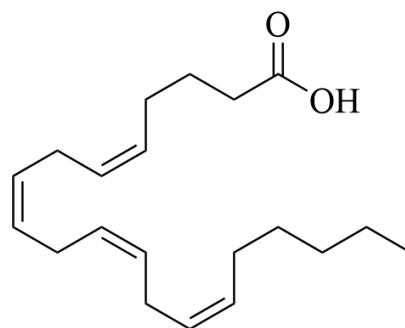
Diversos estudios han analizado la composición química de *Prunella vulgaris*, y se han aislado e identificado triterpenoides, esteroles, flavonoides, fenilpropanoides, aceites volátiles, ácidos orgánicos, polisacáridos, algunos oligoelementos y más de 250 compuestos (Pan, Wang, & Chen, 2022).

### 2.4.1.1 Ácidos orgánicos

Estos productos naturales se han encontrado en diferentes especies vegetales, principalmente en sus frutos, pero también en sus raíces y hojas. Se pueden clasificar en ácidos grasos y en ácidos orgánicos aromáticos. A continuación, se muestra la estructura de algunos compuestos que se han identificado en *Prunella vulgaris* L.



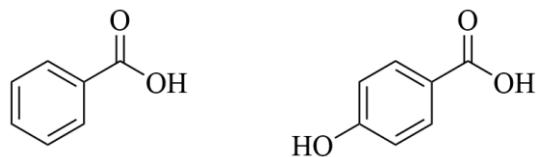
ácido linoleico



ácido araquistidónico

**Figura 3.** Ácidos grasos comunes en *P. vulgaris* L.

Los ácidos grasos son ácidos orgánicos frecuentes en esta planta (Figura 3), los cuales son esenciales para el cuerpo humano. Así mismo, se ha evidenciado la presencia de ácidos orgánicos aromáticos (Figura 4).

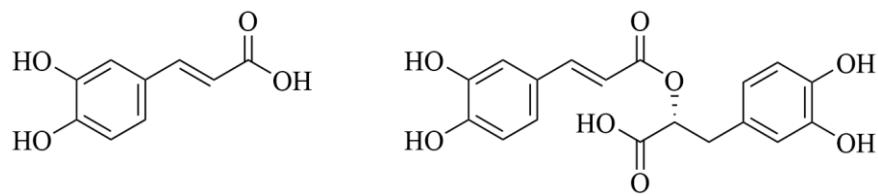


ácido benzoico      ácido *p*-hidroxibenzoico

**Figura 4.** Ácidos orgánicos aromáticos que se han identificado en *P. vulgaris* L.

#### 2.4.1.2 Fenilpropanoides

Son compuestos naturales que están formados por un anillo de benceno (fenil) que se encuentra conectado a tres átomos de carbono de cadena lineal. La hierba *P. vulgaris* es rica en fenilpropanoides, de entre los cuales destacan el ácido cafeico (**AC**) y el ácido rosmarínico (**AR**) (Figura 5) (Pan, Wang, & Chen, 2022).

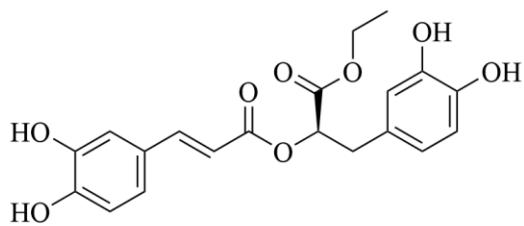


ácido cafeico (**AC**)

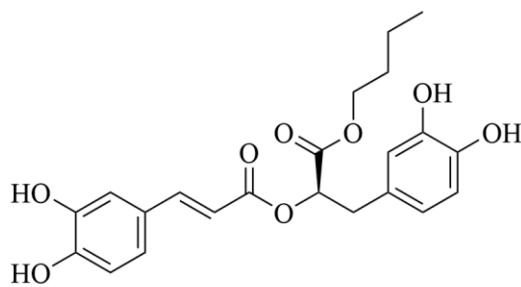
ácido rosmarínico (**AR**)

**Figura 5.** Principales fenilpropanoides aislados de *Prunella vulgaris* L.

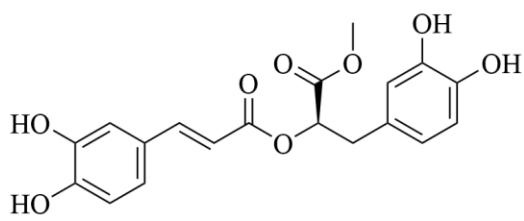
Algunos derivados de estos fenilpropanoides (Figura 6) también han sido aislados de esta planta. Cabe resaltar que el cafeato de etilo fue aislado por primera vez en el género a partir de esta especie (Pan, Wang, & Chen, 2022).



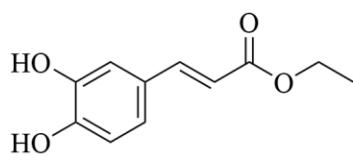
(a) rosmarinato de etilo



(b) rosmarinato de butilo



(c) rosmarinato de metilo



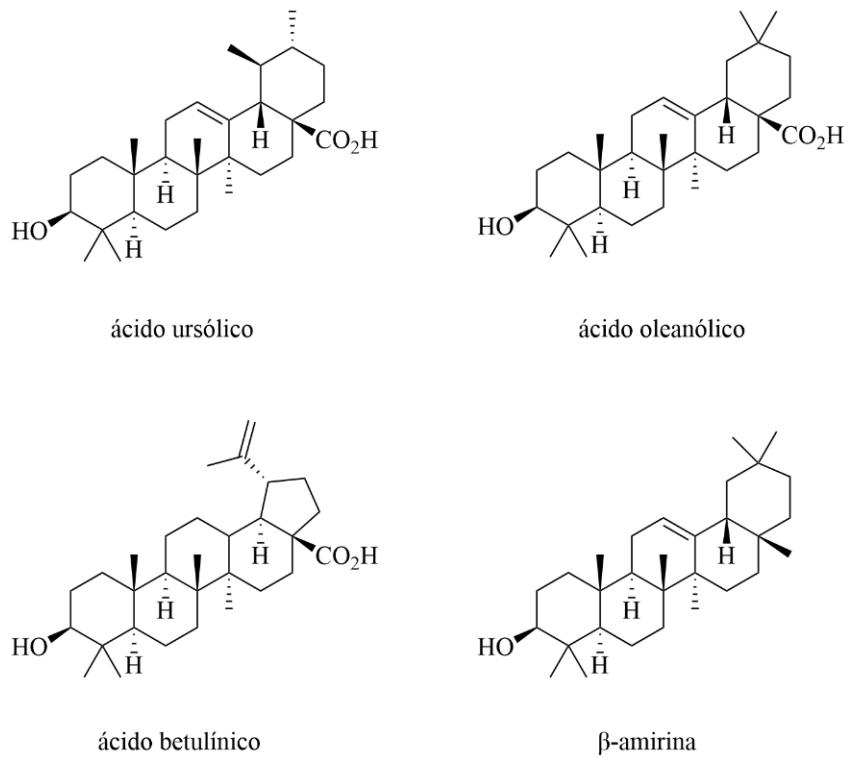
(d) cafeato de etilo

**Figura 6.** Derivados biosintéticos del ácido rosmarínico (a-c) y del ácido cafeico (d) aislados de *Prunella vulgaris*.

### 2.4.1.3 Triterpenoides

Los triterpenos son productos naturales que se componen de seis unidades de isopreno (Cano-Flores, 2013). Los triterpenoides son un grupo de triterpenos que existen en las plantas en su forma libre, como esteres o en forma de glicósidos (Pan, Wang, & Chen, 2022).

Los principales ingredientes activos de *P. vulgaris* resultan ser triterpenoides, siendo los de tipo ursano, oleanano y lupano los más comunes (Pan, Wang, & Chen, 2022) y, según autores (Cano-Flores, 2013) se asume que aquellos que incorporan esos esqueletos bases en su estructura, son los más importantes dentro de los triterpenos. En la Figura 7 se muestran algunos triterpenos que han sido aislados de esta planta. La  $\beta$ -amirina fue aislada por primera vez en el género a partir de esta especie (Pan, Wang, & Chen, 2022)



**Figura 7.** Triterpenos aislados de *P. vulgaris*.

Según autores (Zholdasbayev, Atazhanova, Musozoda, & Musozoda, 2023) los ácidos oleanólico y ursólico son dos de los triterpenos más comunes presentes en esta especie, y se ha demostrado que tienen propiedades antioxidantes, antialérgicas, antiinflamatorias y antitumorales.

#### 2.4.1.4 Polisacáridos

Los polisacáridos son carbohidratos complejos que están formados por más de 10 monosacáridos unidos por enlaces glucosídicos cuya distribución en la naturaleza es amplia. Hasta ahora se han aislado e identificado diferentes polisacáridos en *P. vulgaris* y numerosos estudios han confirmado sus propiedades antioxidantes y de eliminación de radicales libres, su actividad antiviral y antitumoral, entre otras (Pan, Wang, & Chen, 2022).

La prunelina, es un polisacárido sulfatado que fue aislado del extracto acuoso de *P. vulgaris* nativa de China, los autores (Tabba, Chang, & Smith, 1989), demostraron que posee actividad anti-VIH y que se encuentra compuesto de glucosa, galactosa, xilosa, ácido glucónico, ácido galactósico y galactosaamina.

Según (Pan, Wang, & Chen, 2022) otros polisacáridos que han sido aislados de esta especie son PP2 (ramnosa, arabinosa, manosa, glucosa, galactosa, entre otros), PVL-P1 (arabinosa, xilosa, manosa, glucosa y galactosa) y PSP-2B (arabinosa, galactosa y manosa, glucosa y ácidos urónicos), este último mostró actividad contra el virus del herpes simple.

## 2.4.2 Propiedades biológicas

La rica variedad de metabolitos secundarios que posee esta especie le confieren diferentes propiedades biológicas, incluyendo efectos antitumorales, antiinflamatorios, antibacterianos y antivirales, así como efectos hipoglucemiantes, antioxidantes, de eliminación de radicales libres, inmunorreguladores, antihipertensivos, hipolipemiantes, hepatoprotectores, sedantes e hipnóticos (Pan, Wang, & Chen, 2022).

### 2.4.2.1 Actividad antioxidante

Hay diferentes estudios que demuestran que esta planta posee una notable capacidad antioxidante *in vitro* (Pan, Wang, & Chen, 2022). Según (Zhang, He, & Hu, 2011) los flavonoides presentes en diferentes concentraciones del extracto etanólico mostraron una marcada actividad antioxidante y eran capaces de eliminar los radicales DPPH y OH.

Otras investigaciones (Feng, Jia, Zhu, Chen, & Shi, 2010) han demostrado que el extracto etanólico posee una potente actividad antioxidante *in vitro*, y también puede inhibir significativamente el crecimiento tumoral, siendo sus compuestos activos principales el ácido cafeico, el ácido rosmarínico, la rutina y la quercetina. De este modo, se puede inferir que los fenoles totales desempeñan un papel importante en la actividad antioxidante para la inhibición del crecimiento tumoral.

#### 2.4.2.2 Actividad antitumoral

Algunos de los primeros estudios se realizaron *in vitro* con líneas celulares Jurkat, donde se descubrió que esta planta podía inhibir el crecimiento de las células de linfoma T humano. Otros investigadores demostraron el efecto quimiopreventivo en el cáncer de pulmón del extracto etanólico al 60 % de *P. vulgaris*. Luego, se descubrió que el extracto de AcOEt suprimía el crecimiento de cancer gástrico *in vivo* e *in vitro*. Otros estudios demostraron que el extracto acuoso inhibía la invasión y migración de las células de carcinoma hepatocelular humano HepG2, Huh-7 y Hep3B (Pan, Wang, & Chen, 2022).

Cabe destacar que algunos de los ingredientes activos presentes en esta especie también han mostrado una actividad antitumoral significativa. Hay estudios que demuestran que el ácido rosmariníco inhibe la proliferación celular en líneas celulares de páncreas (PANC-1), próstata (PC-3), colon (HT-29), mama (MDAMB 436) y glioblastoma (T98G). Además, se comprobó que el ácido oleanólico de induce la apoptosis de células de adenocarcinoma de pulmón. Finalmente, hay evidencia experimental de que el aldehído protocatecuico y el ácido cafeico tienen efectos citotóxicos en células MCF-7 (Pan, Wang, & Chen, 2022).

#### 2.4.2.3 Actividad hipoglucemiantre

Hay investigaciones que demostraron que el extracto acuoso de PVL inhibe la expresión del ARNm de  $\alpha$ -glucosidasa, SGLT-1, GLUT-2 y  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  - ATPasa en células Caco-2, esto genera un retraso en la hidrólisis de carbohidratos e influye en la captación de glucosa, reduciendo los niveles de glucosa posprandiales en sangre (Pan, Wang, & Chen, 2022).

Otros estudios demostraron que el extracto acuoso suprimió la hiperglucemia y la disfunción vascular diabética en ratones alimentados con una dieta rica en grasas y carbohidratos (Pan, Wang, & Chen, 2022).

La actividad hipoglucemiantre de esta especie fue estudiada por (Raafat, Wurglies, & Schubert-Zsilavecz, 2016) donde los autores llevaron a cabo un fraccionamiento biodirigido, el cual demostró que su fracción más activa era rica en ácido cafeico la cual mostró inhibición de las enzimas hidrolizadoras de carbohidratos ( $\alpha$ -glucosidasa y  $\alpha$ -amilasa).

### 3 Generalidades

#### 3.1 Cuantificación por RMN de $^1\text{H}$ (q-NMR)

Constituye una determinación de la pureza relativa de un compuesto de interés (CO) presente en una muestra, esto implica el uso de una sustancia de pureza muy alta y conocida que se denomina calibrante interno (CI), luego ambas sustancias son pesadas en cantidades conocidas en un mismo tubo para finalmente obtener su espectro de RMN de  $^1\text{H}$ . Esta cuantificación tiene su fundamento en la integración de señales que se correlacionen con un equivalente conocido de protones correspondientes al CI y al CO, respectivamente (Pauli, y otros, 2014). El porcentaje relativo se determina luego de sustituir el valor de las integrales de dichas señales (o su medida cuantitativa) en la siguiente fórmula:

$$P [\%] = \frac{n_{CI} \cdot Int_{CO} \cdot PM_{CO} \cdot m_{CI}}{n_{CO} \cdot Int_{CI} \cdot PM_{CI} \cdot m_M} \cdot P_{CI}$$

Donde:

$m_{CI}$ : masa del calibrante interno

$m_M$ : masa de la muestra

$Int_{CI}$ : área (integral) de la señal de resonancia del CI utilizada para la cuantificación

$Int_{CO}$ : área (integral) de las señales de resonancia del CO utilizadas para la cuantificación

$n_{CI}$ : número de protones que contribuyen a  $Int_{CI}$

$n_{CO}$ : número de protones que contribuyen a  $Int_{CO}$

$PM_{CI}$ : peso molecular del calibrante interno

*PM<sub>CO</sub>*: peso molecular del compuesto objetivo

*P<sub>CI</sub>*: pureza del calibrante interno, como valor porcentual

### 3.2 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se da cuando hay un desequilibrio entre la generación de especies reactivas de oxígeno en forma de radicales libres (ROS) y los mecanismos naturales para desactivarlos (antioxidantes). Las ROS pueden causar daños a órganos y tejidos conduciendo a un envejecimiento prematuro, inflamación, varias enfermedades y en el extremo, a cáncer (INC, s.f.).

Los radicales libres son especies químicas que tienen uno o más electrones desapareados en su estructura, por esta razón son altamente reactivos y capaces de formar otros radicales libres en cadena. Pueden producir daño oxidativo en macromoléculas biológicas como el DNA, carbohidratos, proteínas o lípidos y participan en los mecanismos fisiopatológicos de muchas enfermedades, entre ellas el cáncer (Coronado H., Vega y León, Guitierrez T., Vázquez F., & Radilla V., 2015) y la diabetes (Burgos-Morón, y otros, 2019). Lo anterior se explica partiendo del hecho de que si los radicales libres afectan el DNA (ácido desoxirribonucleico) pueden ocurrir mutaciones que en su momento se transforman en células cancerosas (Coronado H., Vega y León, Guitierrez T., Vázquez F., & Radilla V., 2015).

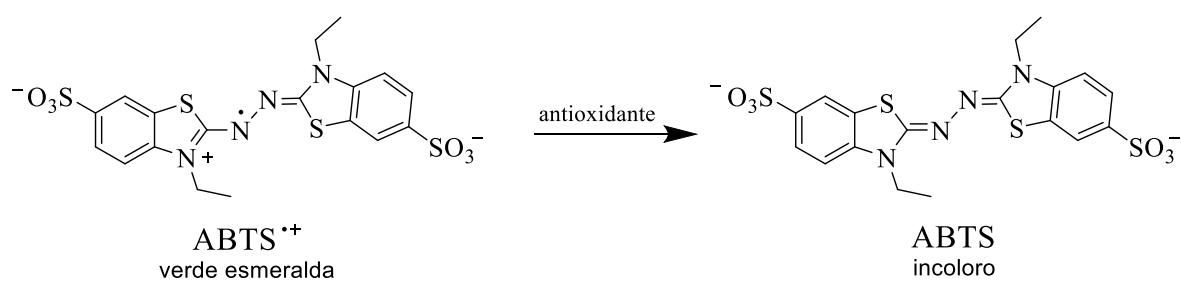
En el caso de la diabetes, aún hay diferentes aspectos de su fisiopatología que se desconocen. Sin embargo, se ha establecido que el estrés oxidativo desempeña un papel significativo en la aparición y el progreso de este padecimiento (Burgos-Morón, y otros, 2019).

#### 3.2.1 Determinación de la capacidad antioxidante

La evaluación de la actividad antioxidante se realiza con ensayos de captura de radicales libres por parte de extractos y compuestos puros. A continuación, se describen algunos de estos métodos.

### 3.2.1.1 Determinación antioxidante por ABTS<sup>•+</sup>.

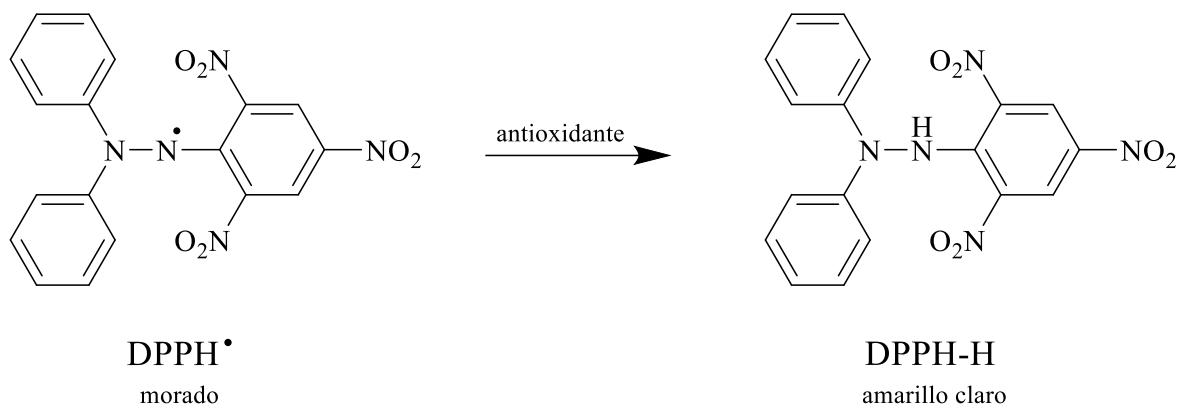
Este radical catiónico es un cromóforo verde esmeralda que absorbe a una longitud de onda de 754 nm, generalmente se obtiene al oxidar el ABTS (2,2'-azino-bis- (3-ethylbenzotiazolin-6-sulfonato de amonio). En este método se cuantifica la decoloración del radical debida a su reducción por la acción de sustancias antioxidantes (Figura 8) (Cruz-Cansino, y otros, 2023).



**Figura 8.** Fundamento del ensayo del radical catiónico ABTS.

### 3.2.1.2 Determinación antioxidante por DPPH<sup>•</sup>.

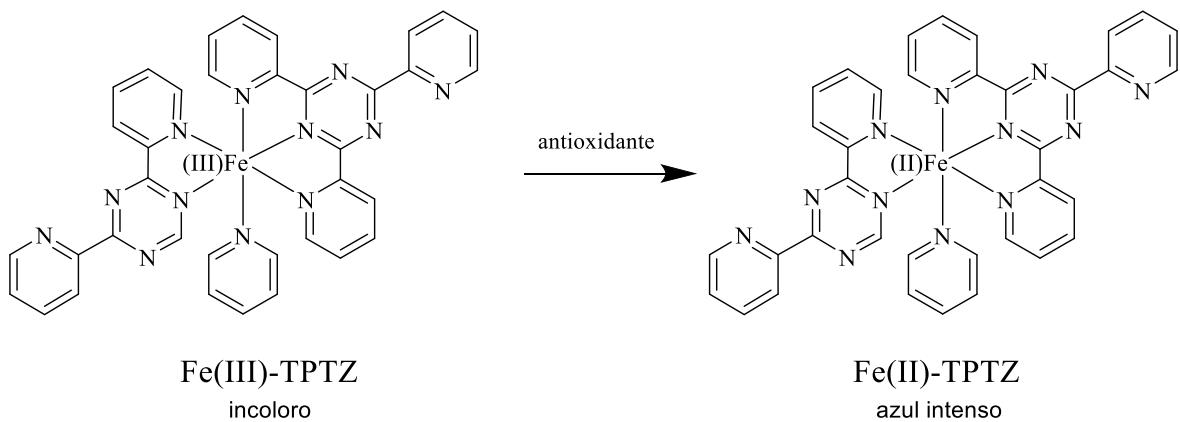
El 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH<sup>•</sup>) es una molécula radicalaria estable, que tiene un color morado intenso en disolución ( $\lambda=515$  nm). Este ensayo colorimétrico tiene su fundamento (Figura 9) en la capacidad de los antioxidantes para donar un átomo de hidrógeno o un electrón al radical, dicha reducción provoca un cambio de color (de violeta a amarillo pálido). Finalmente, se cuantifica la pérdida del color morado a 520 nm (Cruz-Cansino, y otros, 2023).



**Figura 9.** Ensayo antioxidante por DPPH<sup>•</sup>.

### 3.2.1.3 Determinación antioxidante por FRAP.

El complejo férrico-tripiridiltriazin (Fe<sup>3+</sup>-TPTZ) se forma por la interacción entre el Fe<sup>3+</sup> y la 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) y es incoloro, pero a un pH bajo se reduce a su forma ferrosa (Fe<sup>2+</sup>), desarrollando un color azul intenso, esta sustancia absorbe a 593 nm. Este es el fundamento de esta determinación (Figura 10) (Benítez-Estrada, y otros, 2020).



**Figura 10.** Ensayo antioxidante por reducción del ión férrico.

### 3.3 Cáncer

El cáncer se refiere a un crecimiento incontrolable de células malignas que van más allá de los límites normales y existen más de cien tipos distintos. Se pueden desarrollar en cualquier parte del cuerpo, inclusive en la sangre (leucemia) y las causas pueden ser diversas, desde la genética, factores ambientales, exposición a sustancias químicas, microorganismos patógenos y el estrés oxidativo (OMS, 2025).

#### 3.3.1 Leucemia

Leucemia es un término que se utiliza para hacer referencia a algunos tipos de cáncer que inician en la medula ósea, incidiendo directamente en la formación de células sanguíneas. Se clasifica según el tipo de células que afecte y se describe como aguda o crónica de acuerdo a su velocidad de progresión (American Cancer Society, 2024).

Existen diferentes tipos, siendo uno de ellos la **leucemia linfoblástica aguda**, esta patología tiene su origen en los linfocitos, específicamente en las células B y T, los cuales se reproducen de manera acelerada. Aunque es el cáncer más común en pediatría, también afecta a adultos. Esta enfermedad evoluciona aceleradamente y, de no ser tratada a tiempo es muy probable que resulte mortal (Mancero Rodríguez, Arellano Salinas, Santo Cepeda, & Rodríguez Revelo, 2020). Así mismo, la **leucemia mieloide aguda**, este término hace referencia a una proliferación anormal de células mieloides (producen glóbulos blancos, rojos y plaquetas) (American Cancer Society, 2024) que han perdido la capacidad para diferenciarse, las cuales infiltran la medula ósea, el resto de la sangre u otros tejidos (Leyto-Cruz, 2018). Por otro lado, la **leucemia monocítica**, un tipo de leucemia mieloide aguda que se produce cuando las células sanguíneas (monocitos) se transforman en células cancerosas anormales (Cleveland Clinic, 2024). Además, la **leucemia linfocítica crónica**, es un tipo de cáncer de la sangre y medula ósea, que se caracteriza por una producción excesiva de linfocitos, los cuales desplazan a las células sanguíneas normales. Los síntomas suelen presentarse de manera tardía (American Cancer Society, 2024). Finalmente, la **leucemia mieloide crónica**, es un tipo de leucemia se origina en células mieloides y aunque se mantienen a un crecimiento lento se puede convertir en una leucemia aguda (American Cancer Society, 2024). Otros tipos

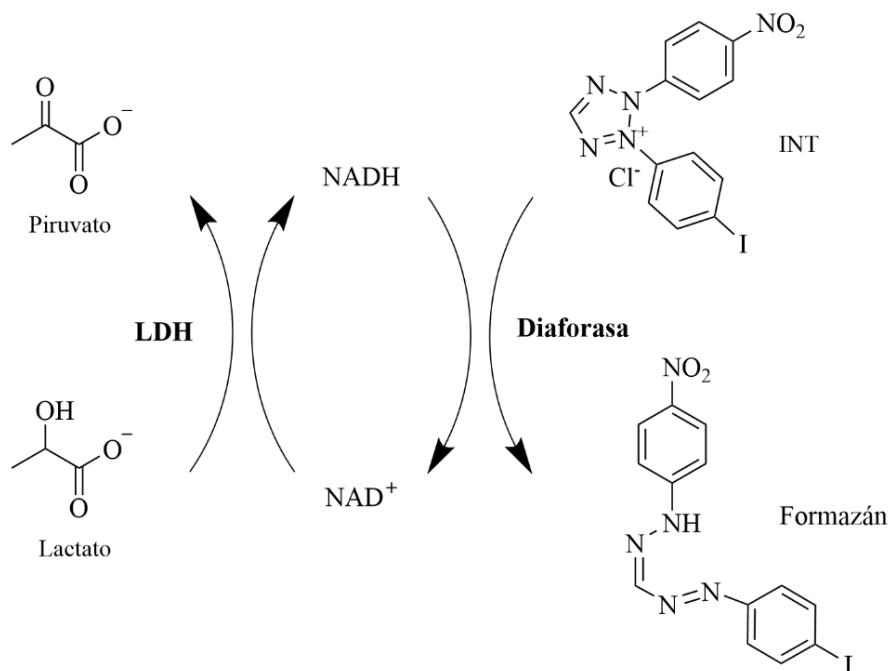
menos comunes de leucemias incluyen leucemia de células pilosas y la leucemia mielomonocítica.

### 3.3.1 Evaluación de la actividad citotóxica

La determinación de la actividad citotóxica de extractos y sustancias puras comprende una amplia variedad de pruebas que consisten en determinar la inhibición del crecimiento de células cancerosas *in vitro* mediante varios métodos, para los cuales se utilizan kits especializados.

#### 3.3.1.1 Detección de citotoxicidad (kit CytoTox 96)

Cuando una célula pierde la integridad de su membrana, libera lactato deshidrogenasa (LDH), una enzima citoplasmática estable. Se cuantifica su liberación en los sobrenadantes de cultivo mediante el uso del NADH generado en la conversión de lactato a piruvato por acción de la LDH, para reducir un segundo compuesto (la sal de tretreazolio INT) a una sal de formazán (color rojo) en una reacción acoplada (Figura 11) (Promega Corporation, 2025).



**Figura 11.** Reducción del INT a sal de formazán por acción de la enzima lactato deshidrogenasa y la diaforasa.

### 3.3.1.2 Línea celular REH

Es una línea celular humana que fue aislada a partir de la sangre periférica de un paciente con leucemia linfoblástica aguda (LLA). Se utiliza en investigaciones acerca del cáncer y de trastornos del sistema inmunitario (Leibinz Institute, 2025).

## 3.4 Diabetes

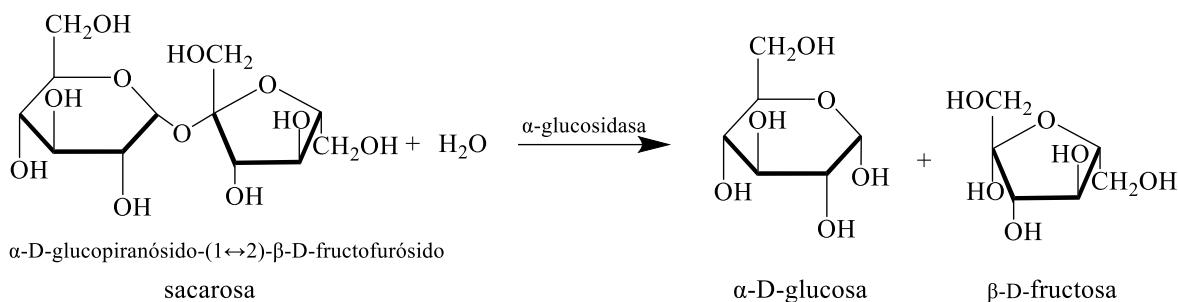
La diabetes es una enfermedad crónica que se presenta cuando el cuerpo no es capaz de regular la concentración de glucosa en sangre y, según la causa, se reconocen dos tipos principales, aunque no son los únicos (OMS, 2025). La **diabetes mellitus tipo 1** se caracteriza por la destrucción selectiva de las células  $\beta$  del páncreas, de ahí que se le denomine autoinmune (Burgos-Morón, y otros, 2019). Esta destrucción genera una producción deficiente de insulina (una hormona que regula la concentración de glucosa en la sangre), impidiendo así que la glucosa entre a las células y comience a acumularse en la sangre (OMS, 2025). Así mismo, la **diabetes mellitus tipo 2** es una enfermedad que incide directamente en el organismo impidiendo que utilice adecuadamente la insulina, aumentando la concentración de azúcar (OMS, 2025). Lo anterior puede derivarse de dos factores, siendo uno de ellos el aumento de la resistencia a la insulina o una disminución de la secreción de insulina por las células  $\beta$  (Burgos-Morón, y otros, 2019). Finalmente, la **diabetes gestacional** se desarrolla durante el embarazo y, quienes la padecen presentan niveles de azúcar en sangre superiores a los normales, pero más bajos que los establecidos para diagnosticar diabetes. Quienes padecen esta condición médica tienen mayores riesgos de sufrir complicaciones durante el parto y pueden presentar diabetes mellitus tipo 2 (OMS, 2025).

### 3.4.1 Hiperglucemia

De manera general, si la diabetes no se controla los pacientes presentan hiperglucemia, esta condición los expone a complicaciones vasculares y, eventualmente genera un daño grave en diversos órganos vitales (OMS, 2025). Cabe destacar que hay algunas enzimas imprescindibles en la descomposición de carbohidratos, entre ellas la  $\alpha$ -amilasa y la  $\alpha$ -glucosidasa.

### 3.4.2 Enzimas $\alpha$ -glucosidasas

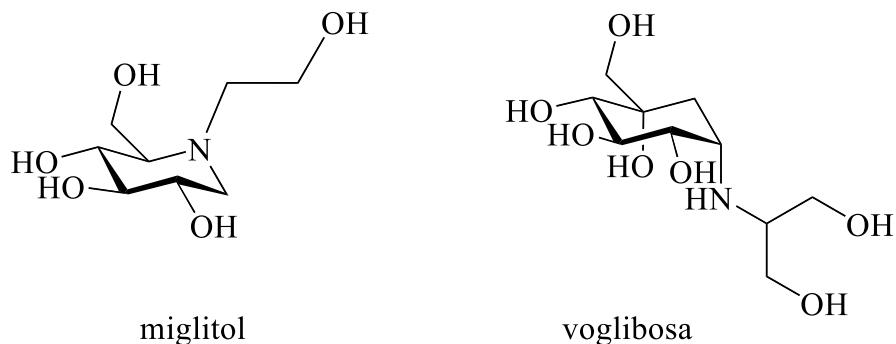
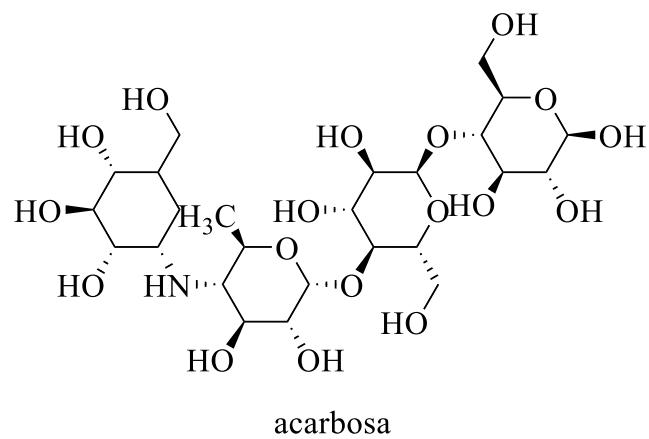
Hacen referencia a un grupo de enzimas  $\alpha$ -glucosidasa (glucoamilasa, la sacarasa, la maltasa y la isomaltasa) cuya función es catalizar la descomposición de almidones y disacáridos a glucosa mediante una reacción de hidrólisis (Figura 12). Se encuentran el diferentes tejidos y órganos, principalmente en el intestino delgado y desempeñan funciones críticas en el metabolismo celular y la digestión (Akmal, Patel, & Wadhwa, 2024).



**Figura 12.** Hidrólisis de la sacarosa por acción de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa.

#### 3.4.2.1 Inhibidores de la $\alpha$ -glucosidasa

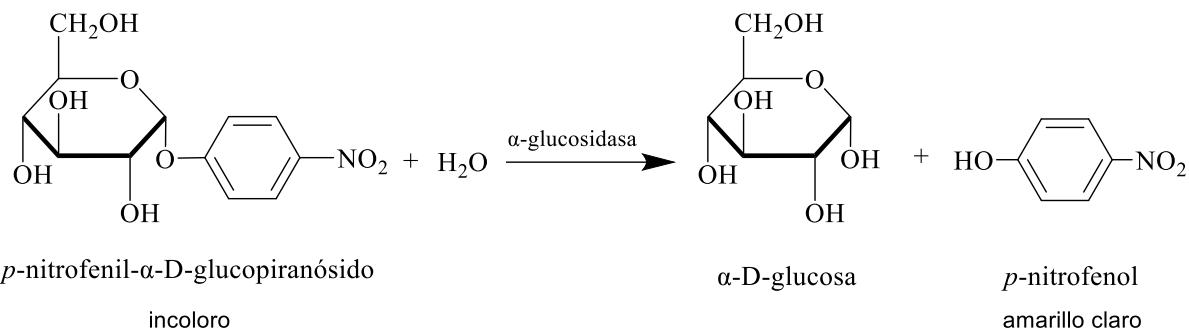
La inhibición de esta enzima retrasa la absorción de carbohidratos complejos, ayudando así a regular los niveles de glucosa posprandial. Es por ello que algunos inhibidores reversibles se utilizan como agentes terapéuticos en el manejo de la diabetes tipo 2 y son alternativas viables para pacientes no aptos para los medicamentos convencionales como la metformina. Entre los inhibidores principales de esta enzima tenemos la acarbosa, voglibosa y el miglitol (Figura 13) (Akmal, Patel, & Wadhwa, 2024).



**Figura 13.** Principales inhibidores de la  $\alpha$ -glucosidasa

#### 3.4.2.2 Ensayos de inhibición de la enzima $\alpha$ -glucosidasa

Aunque actualmente podemos encontrar diferentes metodologías en la literatura, la mayoría de las pruebas *in vitro* se basan en el mismo principio, la conversión de un derivado de glucosa (Figura 14) en un producto colorido (*p*-nitrofenol  $\lambda=405$  nm) que se puede cuantificar a cierta longitud de onda mediante la acción de la enzima.



**Figura 14.** Hidrólisis del p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranósido por acción de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa.

El propósito de estos ensayos es encontrar nuevos compuestos o extractos de plantas que puedan actuar como inhibidores, esto se logra al compararlos con estándares (como los que se describieron anteriormente), los cuales fungen como controles positivos.

## **4      Justificación**

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo. Tan sólo en el 2020 fue motivo de más de casi 10 millones de defunciones (OMS, Cáncer, 2025). En México algunos tumores malignos son la principal causa de muerte para determinados grupos de edad y de acuerdo con las estadísticas, en 2023, la leucemia fue el cáncer con la mayor prevalencia entre la población de 0 a 29 años (INEGI, 2025).

No existe cura para estos padecimientos y los tratamientos actuales a base de cirugía o quimioterapia son muy costosos y sus efectos colaterales ponen en riesgo la vida de los pacientes. Adicionalmente, algunos fármacos contra el cáncer resultan ineficaces debido a que las células malignas desarrollan resistencia a los mismos y a la toxicidad que pueden causar a las células sanas del organismo.

Por otro lado, en 2021, la diabetes y la nefropatía diabética ocasionaron más de dos millones de muertes en el mundo (OMS, 2025). Según las Estadísticas de Defunciones Registradas en México, en 2021, un 13 % fue por diabetes (140 729) (INEGI, 2022).

Además, en 2022, se confirmó que más de la mitad de las personas que padecen esta enfermedad no tomaban medicación alguna para contrarrestarla, principalmente en los países de ingreso mediano bajo. La hiperglucemia es una consecuencia común de la diabetes no controlada, la cual, eventualmente perjudica órganos y sistemas del organismo (OMS, 2025).

Con base en lo anterior, en este proyecto se propone la búsqueda de nuevos agentes bioactivos que sean efectivos para el tratamiento de la leucemia y la diabetes, teniendo como estrategia el estudio biológico y químico de *Prunella vulgaris* L. una de las plantas que se usan de manera tradicional para combatir el cáncer, padecimientos relacionados el mismo (Alonso-Castro, y otros, 2011) y la diabetes (Raafat, Wurglics, & Schubert-Zsilavecz, 2016).

Aunque la especie asiática *P. vulgaris* cuenta con estudios químicos y biológicos, poco se conoce sobre la especie nativa de Hidalgo. Es bien aceptado que una misma especie que crece

en zonas geográficas y condiciones climatológicas diferentes puede generar distintos metabolitos secundarios, por lo que es importante conocer si la especie nativa del estado de Hidalgo posee la misma composición química y propiedades biológicas reconocidas en la especie que crece en países asiáticos.

## **5      Objetivos**

### **5.1 Objetivo general**

Determinar la composición química y las propiedades biológicas de *Prunella vulgaris* L. (Lamiaceae) nativa del estado de Hidalgo, mediante el estudio químico de su extracto metanólico y pruebas biológicas *in vitro*, para conocer sus metabolitos principales y validar su uso tradicional.

### **5.2 Objetivos específicos**

- Aislar y caracterizar los principales metabolitos secundarios presentes en el extracto metanólico de la *Prunella vulgaris* L. nativa del estado de Hidalgo, mediante métodos cromatográficos y técnicas espectroscópicas, para conocer su composición química.
- Evaluar la actividad biológica del extracto metanólico, mediante un estudio *in vitro* de inhibición de células de leucemia, para determinar el potencial de la especie y sus metabolitos en el tratamiento del cáncer.
- Evaluar la actividad antioxidante del extracto metanólico y metabolitos secundarios aislados, mediante pruebas *in vitro* de captura de radicales libres, para establecer su potencial en el tratamiento del estrés oxidativo.
- Estudiar el efecto inhibidor del extracto metanólico así como de compuestos puros aislados sobre la enzima  $\alpha$ -glucosidasa, mediante pruebas *in vitro*, para determinar si la especie nativa de Hidalgo posee actividad hipoglucemiante y posible uso en el control de la diabetes.

## 6 Desarrollo experimental

### 6.1 Colecta e identificación taxonómica de *Prunella vulgaris*

La colecta de la especie se llevó a cabo en la localidad conocida como El Guajolote, municipio de Epazoyucan, Hidalgo, el 02 de noviembre de 2022. Un segundo lote del material vegetal se colectó el 06 de septiembre de 2024 en el mismo sitio. Un ejemplar se preparó y se llevó al Herbario del Área Académica de Biología, donde el M. en C. Manuel González Ledesma hizo su identificación taxonómica, y se dejó para su depósito (JM Torres-Valencia 173) (Figura 15). Finalmente se realizó otra colecta el 28 de junio de 2025 en la zona denominada Peñas Cargadas de Mineral del Monte, Hidalgo.



**Figura 15.** *Prunella vulgaris* en el punto de colecta.

## 6.2 Obtención de extractos

Para todos los lotes, la planta se dejó secar a la sombra durante 15 días y se separó la raíz de la parte aérea. Esta última parte se sometió a molienda mecánica y se extrajo con EtOH-H<sub>2</sub>O (7:3), MeOH y con H<sub>2</sub>O, empleando un equipo de ultrasonido SK2510HP (Shanghai Kudos Ultrasonic Instrument Co., ltd.) (60 °C, 60 minutos, 53 KHz, Potencia 75%). En la Tabla 2 se muestran los rendimientos obtenidos para cada lote.

**Tabla 2.** Rendimientos de los extractos

Lote	Disolvente	Peso del material vegetal (g)	Peso del extracto (g)	Rendimiento (%)
1	EtOH-H <sub>2</sub> O (7:3)	60.00	5.50	9.20
2	MeOH	150.70	20.60	13.67
	EtOH-H <sub>2</sub> O (7:3)	1.00	0.2865	28.65
3	MeOH	202.70	27.56	13.60
	H <sub>2</sub> O	1.00	0.2538	25.28

## 6.3 Obtención de particiones

El extracto MeOH (17.8 g) se disolvió en H<sub>2</sub>O destilada (1 L) y se obtuvieron las particiones de hexano y AcOEt . Posteriormente, la fase acuosa se llevó a pH 3.211 con HCl 10% en un baño de hielo y se extrajo nuevamente con AcOEt para obtener la partición AcOEt pH 3. El pH de la fase acuosa antes de acidificar fue de 6.114. Los rendimientos de las particiones se muestran en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Rendimientos de las particiones

Partición	Peso de la partición (g)	Rendimiento %
Hexano	2.2394	12.58
AcOEt sin acidificar	2.0033	11.25
AcOEt pH 3	6.1000	34.27
H <sub>2</sub> O	1.255	7.05

#### 6.4 Cuantificación por RMN de <sup>1</sup>H (q-RMN)

Diferentes muestras fueron analizadas por RMN de <sup>1</sup>H observando señales características del ácido rosmarínico (**AR**). Con la finalidad de conocer su porcentaje relativo se llevó a cabo una cuantificación siguiendo un procedimiento conocido (q-NMR) (Pauli, y otros, 2014), en el cual se utilizaron diferentes calibrantes internos (CI).

Las muestras y los calibrantes internos se pesaron en una balanza analítica (precisión de 0,1 mg), se añadió un volumen predeterminado (600 µL) del disolvente deuterado con la finalidad de alcanzar una altura constante en cada medición y se colocaron en tubos RMN estándar (5 mm). Los tubos se conservaron tapados hasta el momento del análisis para evitar la evaporación y la absorción de humedad. De manera general, todos los parámetros que contribuyeron a la cuantificación se documentaron, incluyendo el valor integral y rango [ppm].

#### 6.5 Separación cromatográfica e identificación

Las separaciones se llevaron a cabo por cromatografía en columna (CC) usando gel de sílice como fase estacionaria en columnas de vidrio de 5 cm de diámetro por 50 cm de altura. El monitoreo de las fracciones se llevó a cabo por TLC (placas de aluminio de gel de sílice 60

$F_{254}$ ). La identificación cualitativa se realizó con reveladores colorimétricos,  $FeCl_3$  para los compuestos fenólicos y  $Ce(SO_4)_2$  para los triterpenos.

Los análisis de RMN de  $^1H$  a 400 MHz,  $^{13}C$  a 100 MHz, las cuantificaciones por RMN ( $q$ -RMN) y el experimento en 2D (HSQC) se realizaron en un equipo Bruker de 400 MHz empleando disolventes deuterados ( $DMSO-d_6$ ,  $CDCl_3$  y  $D_2O$ ).

Las rotaciones ópticas fueron determinadas en  $MeOH$  y  $CHCl_3$  en un polarímetro Perkin Elmer 241, utilizando una lámpara de Na (589.3 nm).

Los espectros de IR fueron obtenidos en un espectrómetro infrarrojo por transformada de Fourier (FT-IR) Perkin Elmer SPECTRUM GX. Las muestras se aplicaron en líquido utilizando  $DMSO$  y  $CHCl_3$ .

Los puntos de fusión se determinaron en un equipo Electrothermsl modelo IA9000.

## **6.6 Evaluación de la actividad antioxidante del extracto MeOH, la partición AcOEt pH 3 y el ácido rosmarínico de *Prunella vulgaris***

La actividad antioxidante se evaluó mediante pruebas de captura de radicales libres conocidas.

**Muestras.** Se preparó una disolución de 1 mg/mL, para ello se pesó 1 mg de cada muestra en un matraz de aforo de 1 mL, el cual se enrasó con etanol. Posteriormente, se hicieron las diluciones en tubos Eppendorf, para obtener las concentraciones (1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 mg/mL).

**Trolox 3.9 mM ( $C_{14}H_{18}O_4$ ).** Después de pesar 10 mg del reactivo se trasvasaron a un matraz aforado de 10 mL, donde se les adicionaron gotas de  $MeOH$  hasta su completa disolución, se completó el volumen con agua desionizada (3875.5  $\mu M$ ). A partir de esta disolución se obtuvo una serie de soluciones de Trolox en etanol con concentraciones de 0 a 300  $\mu M$  (Tabla 4) que se utilizó como referencia en las pruebas de ABTS y DPPH.

**Tabla 4.** Curva de trolox.

Tubo	Concentración ( $\mu\text{M}$ )	$\mu\text{L}$ stock (3875.5 $\mu\text{M}$ )	$\mu\text{L}$ EtOH
1	0.0	0.0	1000.0
2	37.5	9.7	990.3
3	75.0	19.4	980.6
4	150.0	38.7	961.3
5	225.0	58.1	941.9
6	300.0	77.4	922.6

**Ácido ascórbico ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ).** Se pesaron 20 mg de vitamina C y se aforaron a 100 mL con EtOH, para obtener una disolución stock de 20 mg/dL (1124.2  $\mu\text{M}$ ). A partir de esta disolución se obtuvo una serie de soluciones de ácido ascórbico en etanol con concentraciones de 0 a 1124.2  $\mu\text{M}$  que se utilizó como referencia para las pruebas de ABTS y DPPH (Tabla 5).

**Tabla 5.** Curva de ácido ascórbico.

Tubo	Concentración ( $\mu\text{M}$ )	$\mu\text{L}$ stock (1124.2 $\mu\text{M}$ )	$\mu\text{L}$ EtOH
1	0.0	0.0	1000.0
2	140.5	125.0	750.0
3	281.1	250.0	500.0
4	562.1	500.0	250.0
5	843.2	750.0	125.0
6	1124.2	1000.0	0.0

### **6.6.1 Determinación antirradicalaria por ABTS<sup>•+</sup>.**

En esta prueba la capacidad antirradicalaria se evaluó con el radical Ácido 2,2'-azino-bis(3-etylbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS<sup>•+</sup>) siguiendo una metodología descrita (Cruz-Cansino, y otros, 2023). La preparación de disoluciones se describe abajo.

**ABTS 7 mM.** Se tomaron 38.4 mg de la sal amónica de cristales de ATBS y se les adicionaron 10 mL de H<sub>2</sub>O desionizada. La disolución se incubó durante 16 h a completa oscuridad y temperatura ambiente.

**Persulfato potásico 2.45 mM (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>).** Se pesaron 66.2 mg de K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub> y disolvieron en agua desionizada para obtener una solución aforada de 100 mL.

**Tampón fosfato 5 mM, pH 7.4 (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O).** Se preparó pesando 0.445 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O a los cuales se les adicionaron 490 mL de agua desionizada, hasta su completa disolución. Con ayuda de un potenciómetro se ajustó a pH 7.4 con una disolución de NaOH 1M (gota a gota). Finalmente se transvasó la solución ajustada a un matraz de aforo de 500 mL, donde se enrasó con agua destilada.

**Radical ABTS.** Se elaboró a partir de

- 10 mL de disolución ABTS 7 mM
- 10 mL de disolución de persulfato potásico 2.45 mM

Se mantuvo 12 h en completa oscuridad.

**Disolución de trabajo ABTS.** Se mezcló la disolución del radical ABTS con el tampón fosfato hasta que su absorbancia a 734 nm fue 0.70 ± 0.02 a 30°C. Lo anterior utilizando el tampón fosfato como blanco.

En diferentes tubos Eppendorf de 2 mL se adicionaron 20 µL de cada muestra a sus diferentes concentraciones y 980 µL de solución de trabajo ABTS. Se agitaron por vortex y se incubaron a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 754 nm en un espectrofotómetro (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA) a los 0 y 30 min. La actividad antioxidante

se expresó en micromoles de equivalentes de trolox ( $\mu\text{mol ET}/100 \text{ g ps}$ ) y ácido ascórbico ( $\mu\text{mol EAA}/100 \text{ g ps}$ ) por cada 100 g de peso seco.

#### **6.6.2 Determinación de la actividad antirradicalaria mediante DPPH•.**

La actividad antirradicalaria se cuantificó con el radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) siguiendo una metodología descrita (Cruz-Cansino, y otros, 2023), la cual se describe abajo.

**DPPH.** Se pesaron 7.4 mg del radical en un matraz volumétrico de 100 mL, el volumen se completó con etanol.

Para comenzar, se tomó una alícuota de 200  $\mu\text{L}$  de cada una de las muestras a sus diferentes concentraciones y se le añadieron 500  $\mu\text{L}$  de la disolución de DPPH. La reacción transcurrió en completa oscuridad a temperatura ambiente durante 1 h. Las lecturas de absorbancia se tomaron a 520 nm en un espectrofotómetro (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA). Finalmente, la actividad antioxidante se expresó en micromoles de equivalentes de Trolox ( $\mu\text{mol TE}/100 \text{ g}$ ) y ácido ascórbico ( $\mu\text{mol EAA}/100 \text{ g ps}$ ) por cada 100 g de peso seco.

#### **6.6.3 Determinación antioxidante por reducción del ión férrico (FRAP)**

Esta determinación se realizó de acuerdo al procedimiento descrito por (Benítez-Estrada, y otros, 2020) con algunas modificaciones. Se prepararon diferentes disoluciones.

**Amortiguador de acetato de sodio 0.3 M, pH 3.6 (CH<sub>3</sub>COONa).** Se pesaron 2.46 g de CH<sub>3</sub>COONa y disolvieron en agua desionizada, posteriormente se añadieron 16 mL de ácido acético glacial (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>) y se llevó al aforo con agua desionizada en un matraz de 100 mL.

**Ácido clorhídrico 40 mM (HCl).** Se midieron 145  $\mu\text{L}$  de HCl al 36% en 99.855 mL agua destilada.

**Cloruro férrico 20 mM (FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O).** En un matraz aforado de 5 mL se pesaron 27 mg de FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O. Se completó el volumen con agua destilada.

**Sulfato ferroso 1000  $\mu$ M ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ).** Se pesaron 27 mg de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  que se disolvieron en 100 mL de agua destilada.

**2,4,6-Tris(2-piridyl)-s-triazine o TPTZ 10  $\mu$ M ( $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{N}_6$ ).** Se tomaron 31.23 mg de TPTZ y se colocaron en un matraz aforado de 10 mL el cual fue aforado con HCl 40 mM.

**Disolución de trabajo FRAP.** Se preparó a partir del buffer  $\text{CH}_3\text{COONa}$  0.3 M, TPTZ y  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  20 mM en relación 10:1:1, es decir:

- 25 mL de Amortiguador de acetato de sodio 0.3 M, pH 3.6 ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ )
- 2.5 mL de disolución TPTZ 10 mM
- 2.5 mL de disolución Cloruro férrico 20 mM

Se calentó a 37 °C antes de su uso.

A partir de la disolución de sulfato ferroso 1000  $\mu$ M se prepararon diferentes concentraciones para la curva de calibrado (0, 100, 250, 500, 750, 1000  $\mu$ M), como se indica en la siguiente tabla:

**Tabla 6.** Curva de sulfato ferroso.

Tubo	$\mu\text{M}$ [ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ]	$\mu\text{L}$ stock (1000 $\mu\text{M}$ )	$\mu\text{L}$ $\text{H}_2\text{O}$ destilada
1	0.0	0.0	1000.0
2	100.0	100.0	900.0
3	250.0	250.0	750.0
4	500.0	500.0	500.0
5	750.0	750	250.0
6	1000.0	1000.0	0.0

En diferentes tubos Eppendorf de 2 mL se adicionaron 30  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada y 10  $\mu\text{L}$  de cada concentración de las muestras y 300  $\mu\text{L}$  de solución de trabajo FRAP, así mismo se

consideró el blanco de la reacción (40  $\mu$ L de agua destilada y 300  $\mu$ L de solución de trabajo FRAP). Se agitaron por vortex y se incubaron a 37 °C durante 10 min. En una placa de 96 pozos se agregaron 200  $\mu$ L de cada concentración por triplicado y se midió su absorbancia a 540 nm. Los resultados se expresaron como  $\mu$ mol EFe<sup>2+</sup>/ 100 g,

## **6.7 Evaluación de las propiedades anticancerígenas del extracto MeOH de *P. vulgaris* L.**

### **6.7.1 Evaluación de citotoxicidad en la línea celular REH**

Para esta prueba se empleó el kit CytoTox 96 (Promega) y se evaluó la citotoxicidad siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante (Promega Corporation, 2025).

Se sembraron las células (2x104 células/pozo) en placas de 96 pozos, después de 16-18 horas de incubación el medio fue remplazado por medio sin rojo fenol con el tratamiento correspondiente. Se incubaron las células durante 24 horas y se agregó el reactivo según las instrucciones del fabricante (Promega Corporation, 2025). Se hicieron lecturas a 490 nm en un lector de placa (EnSpire, PerkinElmer).

## **6.8 Actividad hipoglucemiantre**

La actividad hipoglucemiantre se evaluó en la inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa, de acuerdo a metodologías establecidas con algunas variaciones (Kwon, Vattem, & Shetty, 2006); (Kim, Jeong, Wang, Lee, & Rhee, 2005), para ello se usó acarbosa como control positivo. A continuación, se describe el protocolo de inhibición de dicha enzima (Tabla 7), el cual comenzó con la preparación de disoluciones.

**Hidróxido de sodio 1 M.** Se pesaron 400 mg de NaOH y se adicionaron en un matraz de aforo de 10 mL, donde se completó el volumen con agua destilada y se almacenó a 4°C.

**Tampón fosfato 100 Mm.** Se preparó pesando 345 mg de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  a los cuales se les adicionaron 20 mL de agua destilada, hasta su completa disolución. Con ayuda de un potenciómetro se ajustó a pH 6.8 con una disolución de NaOH 1M gota a gota. Finalmente se transvasó la disolución ajustada a un matraz de aforo de 25 mL, se enrasó con agua desionizada y se almacenó a 4°C.

**Disolución enzimática 0.1 U/mL.** Se tomaron 2 mg de enzima ( $\alpha$ -glucosidasa de *S. cerevisiae*) adquirida de Sigma Aldrich y se colocaron en un matraz aforado de 1 mL el cual fue enrasado con tampón fosfato. La disolución fue trasvasada a dos tubos Eppendorf de 1.5 mL y se mantuvo a -20°C hasta el momento de realizar el ensayo, para ello se descongeló un Eppendorf en hielo, se tomó una alícuota de 6.3  $\mu\text{L}$  con micropipeta y se colocó en un tubo falcon de 15 mL. Finalmente se agregaron 1993.7  $\mu\text{L}$  de tampón fosfato y se mantuvo a 4°C hasta la medición.

**p-nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranósido (pNPG) 5 mM.** Luego de pesar 15 mg de pNPG en un matraz de aforo de 10 mL protegido de la luz, este se llevó al aforo con la disolución tampón fosfato. La disolución se mantuvo protegida de la luz a 4°C hasta el momento de la medición.

**Solución de dimetilsulfóxido (DMSO) 11.5%.** Luego de medir 2.8 mL de DMSO puro en un matraz de aforo de 25 mL y enrasar con agua destilada se almacenó a 4°C. La solución de DMSO se preparó de este modo para no superar el 1% en el pocillo de reacción en la microplaca.

**Muestras.** Inicialmente se preparó una disolución madre de 5 mg/mL para que en el pocillo de reacción de la microplaca las concentraciones fueran del orden de los g/mL. Se pesaron 5 mg de cada muestra en un matraz de aforo de 1 mL y se aforaron con solución de DMSO 11.5% posteriormente se hicieron las diluciones en tubos Eppendorf donde se pipetearon los volúmenes necesarios para las concentraciones deseadas (5.00 mg/mL, 2.50 mg/mL, 1.25 mg/mL, 0.6250 mg/mL, 0.3125 mg/mL) y se completó el volumen con DMSO 11.5 %.

**Acarbosa.** Se pesaron 129.12 mg de acarbosa y aforaron con 10 mL de DMSO 11%.

**Tabla 7.** Protocolo del ensayo de inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa.

Volúmenes ( $\mu$ L)	CN	B	CP	CNEcp	M	CNEm
Tampón fosfato 100mM	120	150	120	150	120	150
Se hace por triplicado	360	450	360	450	360	450
DMSO 11.5%	20	20	-	-	-	-
x3	60	60	-	-	-	-
Muestra	-	-	-	-	20	20
x3	-	-	-	-	60	60
Acarbosa	-	-	20	20	-	-
x3	-	-	180	180	-	-
pNPG 5mM	60	60	60	60	60	60
x3	180	180	180	180	180	180
Incubar por 5 minutos a 37°C						
Solución enzimática (0.1 U/mL)	30	-	30	-	30	-
x3	90	-	90	-	90	-
Medir a 405 nm, Incubar por 30 minutos a 37°C y volver a medir a 405 nm						

Las muestras a distintas concentraciones se pre incubaron a 37 °C durante 5 minutos con el buffer de fosfatos 100 mM (pH 6.8) y pNPG 5 mM como sustrato. Posteriormente se adicionó la solución enzimática 0.1U/mL para iniciar la reacción y se incubó por 30 minutos a 37 °C.

Antes y después de la incubación, se registraron las lecturas de absorbancia a 405 nm y se compararon con acarbosa a distintas concentraciones utilizando un lector de placas (Power Wave XS UV-Biotek, software KC Junior, USA). La actividad inhibidora de la  $\alpha$ -glucosidasa se determinó al medir la liberación de *p*-nitrofenil proveniente del sustrato, se expresó como % de inhibición y se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$I \% = \left( \frac{(\Delta A_{CN} - \Delta A_B) - (\Delta A_M - \Delta A_{CNE})}{(\Delta A_{CN} - \Delta A_B)} \right) \times 100$$

Donde:

A: absorbancia

$\Delta$ : diferencia de las absorbancias entre los cero y treinta minutos

CN: control negativo

B: blanco

M: muestra

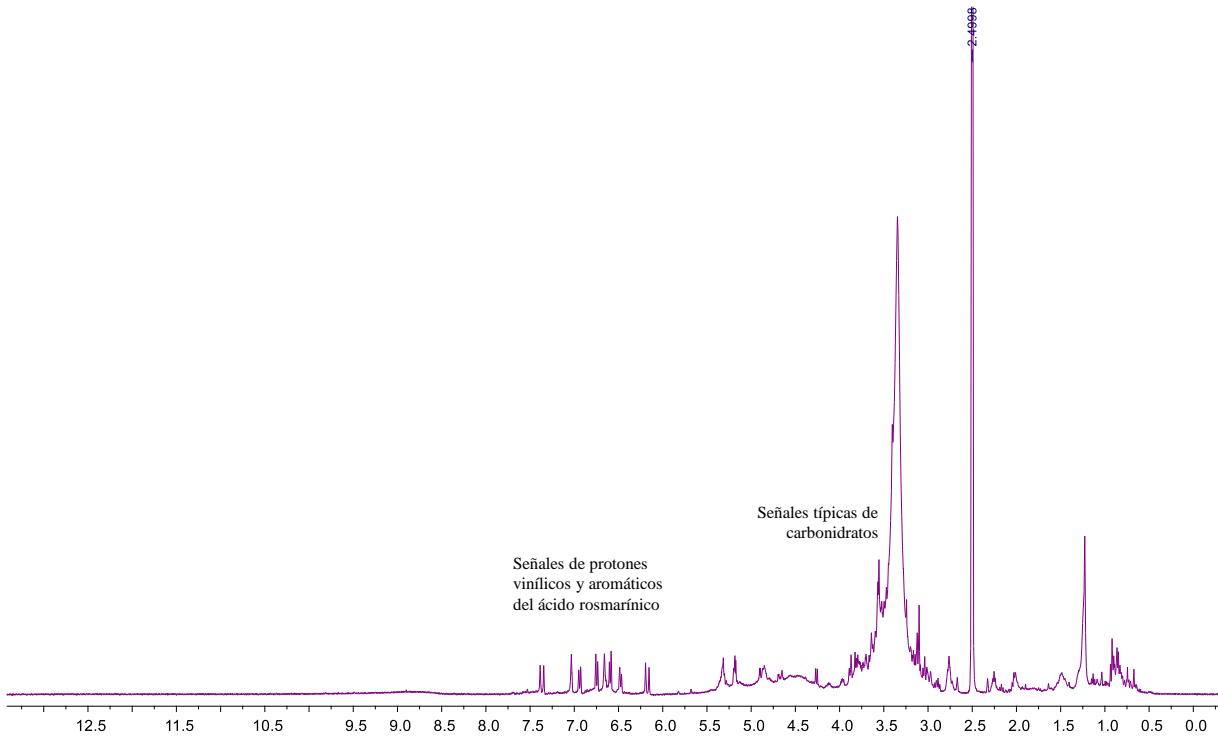
CNE: control negativo no enzimático

## 7 Resultados y Discusión

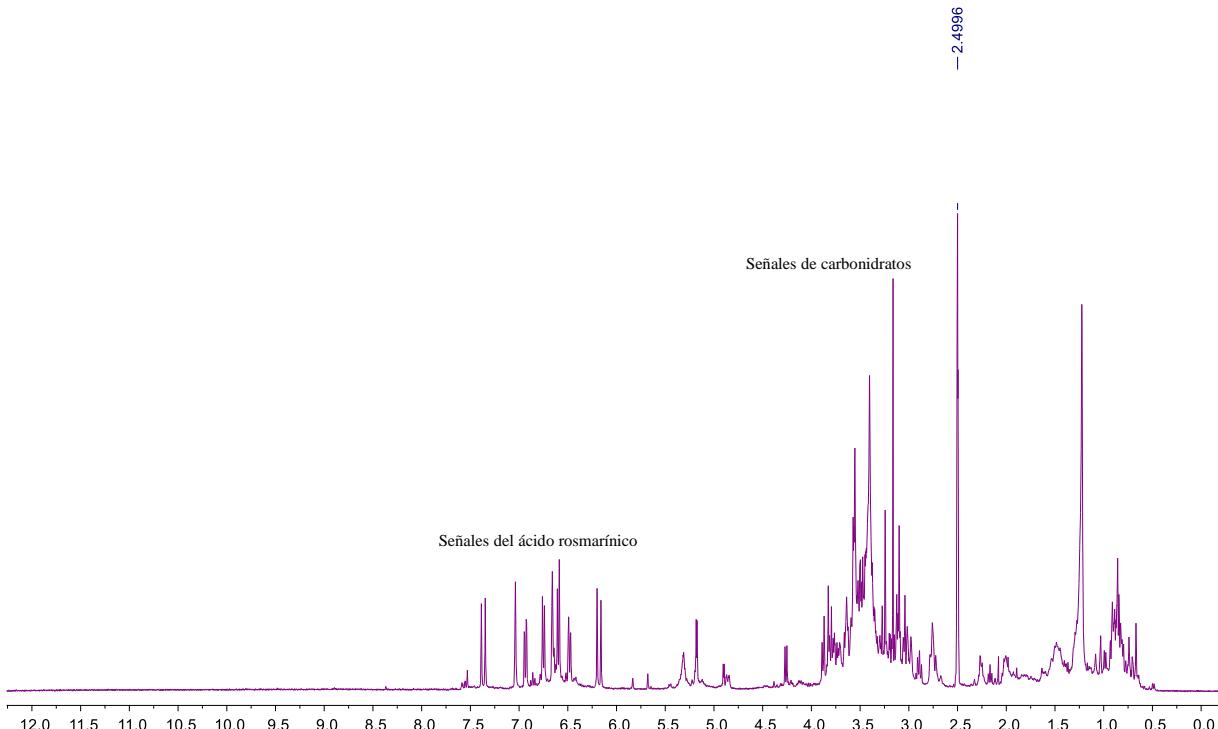
De la parte aérea de *Prunella vulgaris* se obtuvieron los extractos de EtOH-H<sub>2</sub>O (7:3) y MeOH, cuyo análisis por RMN de <sup>1</sup>H (Figuras 16-17) evidenció la presencia del ácido rosmarínico (**AR**), como su metabolito principal. También, se preparó el extracto H<sub>2</sub>O con la finalidad de observar si el **AR** se extrae con agua y en qué cantidad, sin embargo, no se identificó ninguna señal característica del compuesto.

El extracto EtOH-H<sub>2</sub>O se analizó por TLC utilizando FeCl<sub>3</sub> como revelador y dos de las bandas dieron positivo para fenoles. En su espectro de RMN (Figura 16) se identificaron señales características de protones aromáticos entre 6.25 y 7.25 ppm, así como señales vinílicas a 6.20 y 7.40 ppm. Luego de comparar esos desplazamientos con datos reportados en la literatura (Sicker, Zeller, Siehl, & Berger, 2019) se concluyó que pertenecían al **AR**. Además, entre 3.00 y 4.00 ppm se observaron señales típicas de carbohidratos.

El análisis por TLC del extracto metanólico también evidenció la presencia de dos compuestos fenólicos. Al estudiarlo por RMN (Figura 17) y comparar los desplazamientos obtenidos con reportados por otros autores (Sicker, Zeller, Siehl, & Berger, 2019) se determinó que el **AR** era su metabolito principal. Finalmente, entre 3.00 y 4.00 ppm se observaron señales de carbohidratos. Aunque la composición química de ambos extractos resultó ser la misma, se buscaba determinar cuál disolvente proveía una mejor extracción del **AR**.



**Figura 16.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) en  $\text{DMSO}-d_6$ , del extracto  $\text{EtOH}-\text{H}_2\text{O}$  (7:3).

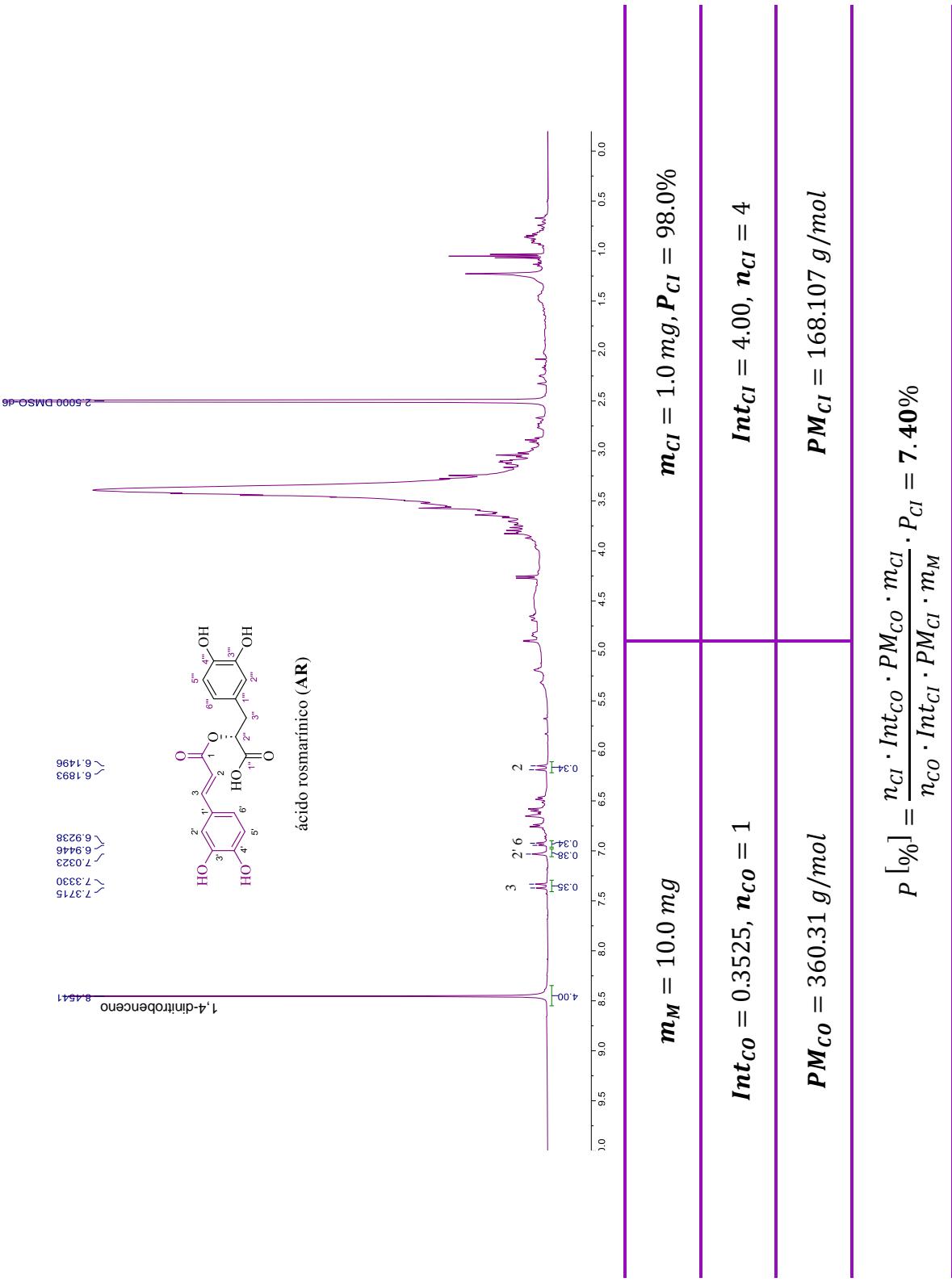


**Figura 17.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) en  $\text{DMSO}-d_6$ , del extracto  $\text{MeOH}$ .

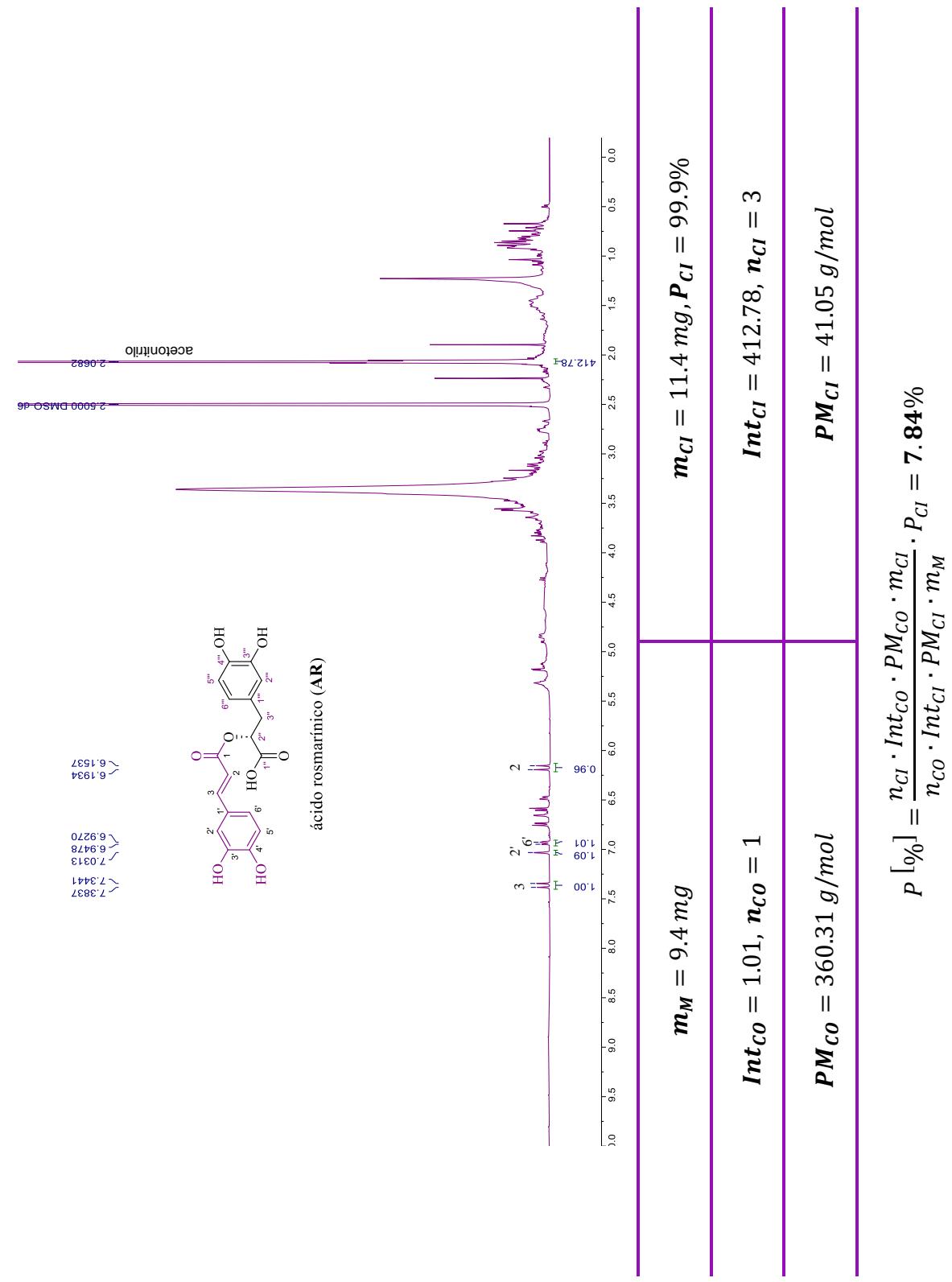
## **7.1 Cuantificación por RMN de $^1\text{H}$ del ácido rosmarínico en los extractos**

Se determinó que en el extracto MeOH el **AR** se encuentra en un porcentaje de 7.84%, mientras que en el extracto de EtOH-H<sub>2</sub>O (7:3) es alrededor de 7.40%. Se muestran los resultados obtenidos (Tablas 8-9). La cuantificación del **AR** en estos extractos mediante RMN de  $^1\text{H}$  (q-NMR) (Pauli, y otros, 2014) permitió conocer que este metabolito se extrajo mejor con metanol, por lo que se decidió continuar con el estudio químico de este extracto.

**Tabla 8.** Espectro de q-RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) en DMSO- $d_6$ , del AR en el extracto EtOH-H<sub>2</sub>O. (7:3).

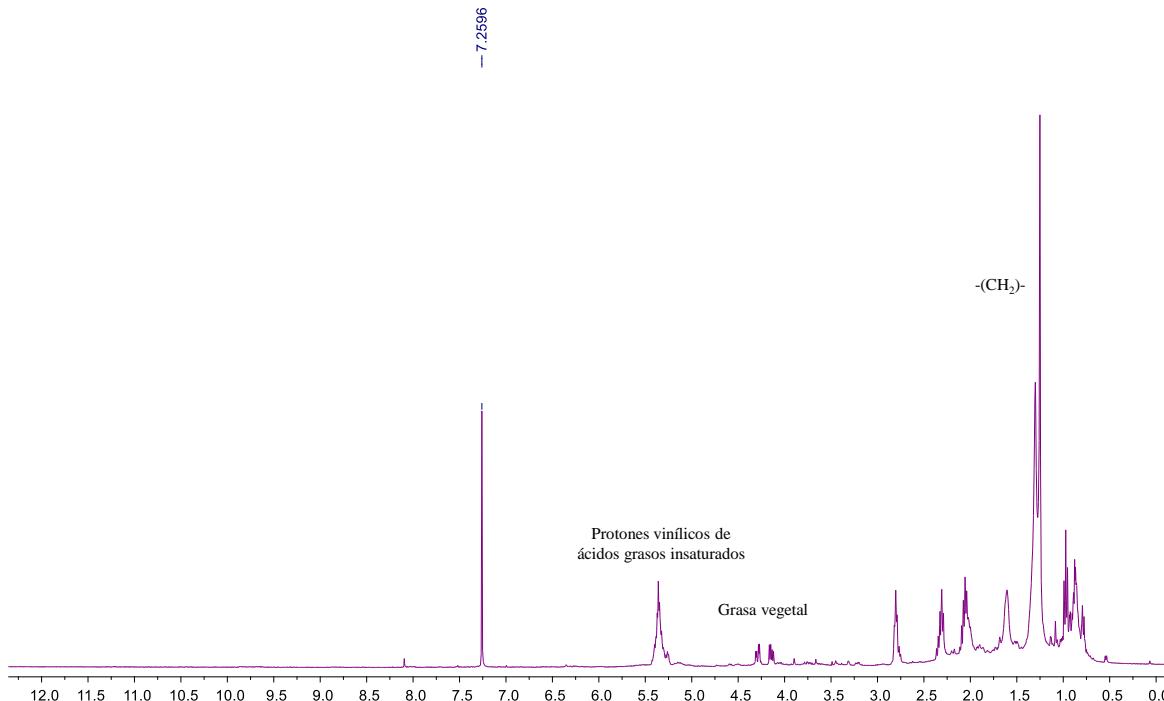


**Tabla 9.** Espectro de q-RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) en DMSO- $d_6$ , del extracto MeOH.



## 7.2 Estudio químico de las particiones

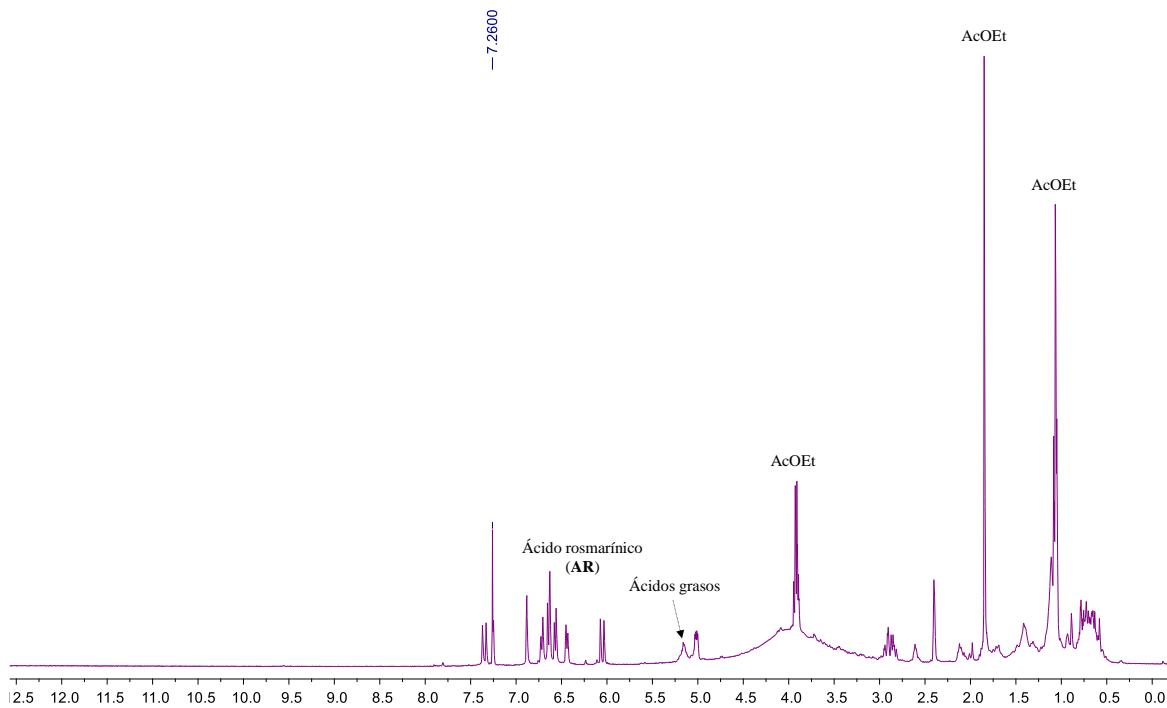
El extracto MeOH se disolvió en agua y se obtuvieron las particiones de hexano, AcOEt y AcOEt a pH 3, las cuales se analizaron por RMN de  $^1\text{H}$  (Figuras 18-21).



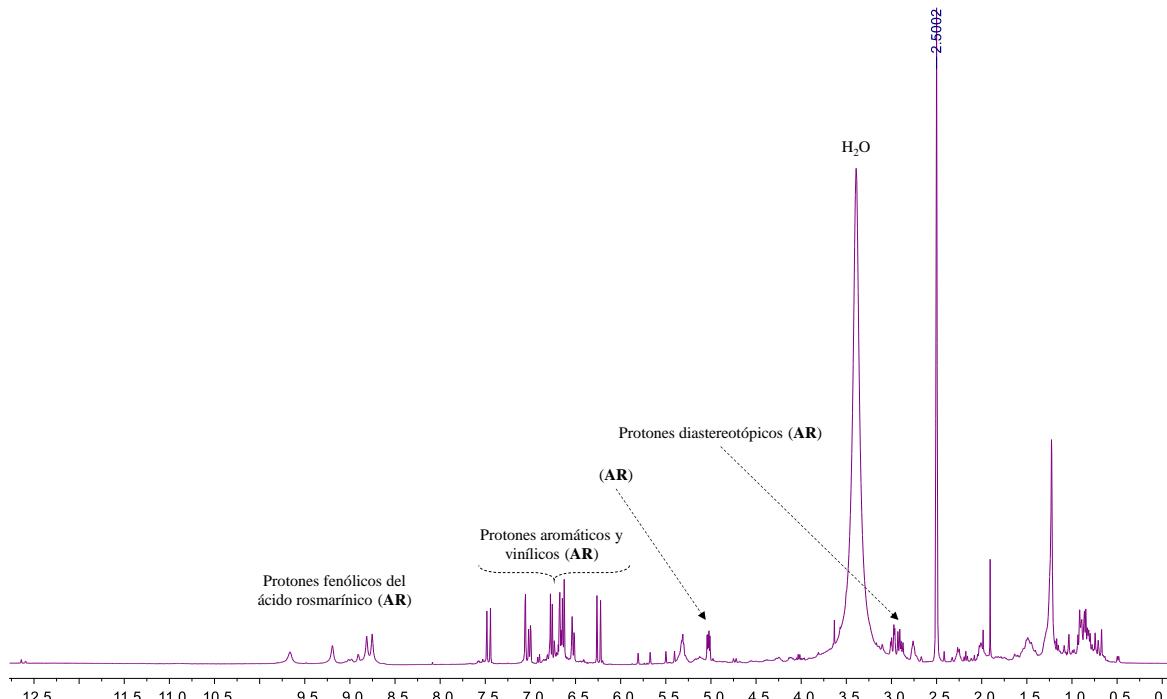
**Figura 18.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) en  $\text{CDCl}_3$ , de la partición de hexano.

En la partición de hexano (Figura 18) se observó una señal característica de protones vinílicos de ácidos grasos insaturados (5.50 ppm). Las señales entre 4.00 y 4.50 ppm corresponden a grasas vegetales. Alrededor de 1.30 ppm se identificó una señal característica del grupo metileno.

La partición de AcOEt pH 6 (Figura 19) mostró señales de los protones vinílicos y aromáticos del **AR** así como una señal simple alrededor de 5.25 ppm, un desplazamiento comúnmente asociado a protones de ácidos grasos.



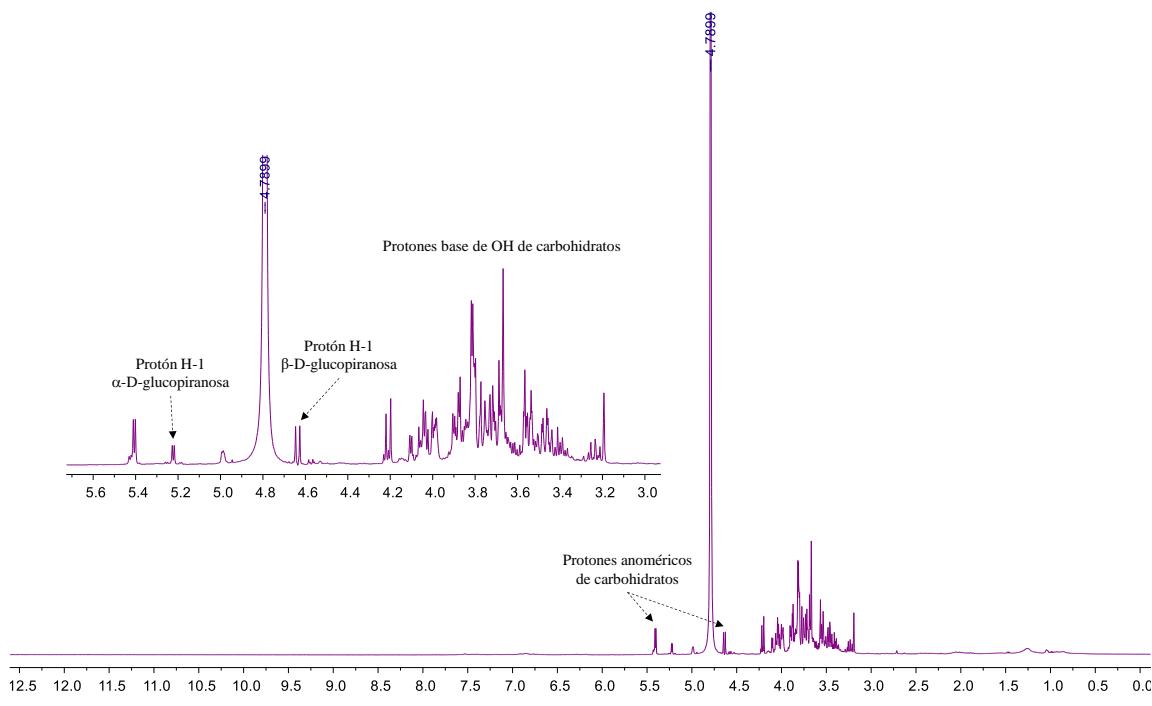
**Figura 19.** Espectro de  $^1\text{H}$  (400 MHz) en  $\text{DMSO}-d_6$ , de la partición de  $\text{AcOEt}$  pH 6 (obtenida antes de acidificar).



**Figura 20.** Espectro de  $^1\text{H}$  (400 MHz) en  $\text{DMSO}-d_6$ , de la partición de  $\text{AcOEt}$  pH 3 (obtenida después de acidificar).

En el espectro de RMN de la partición de AcOEt pH 3 (Figura 20), además de las señales identificadas en la partición de AcOEt pH 6, se observaron las señales de los protones fenólicos y diasterotopicos del AR.

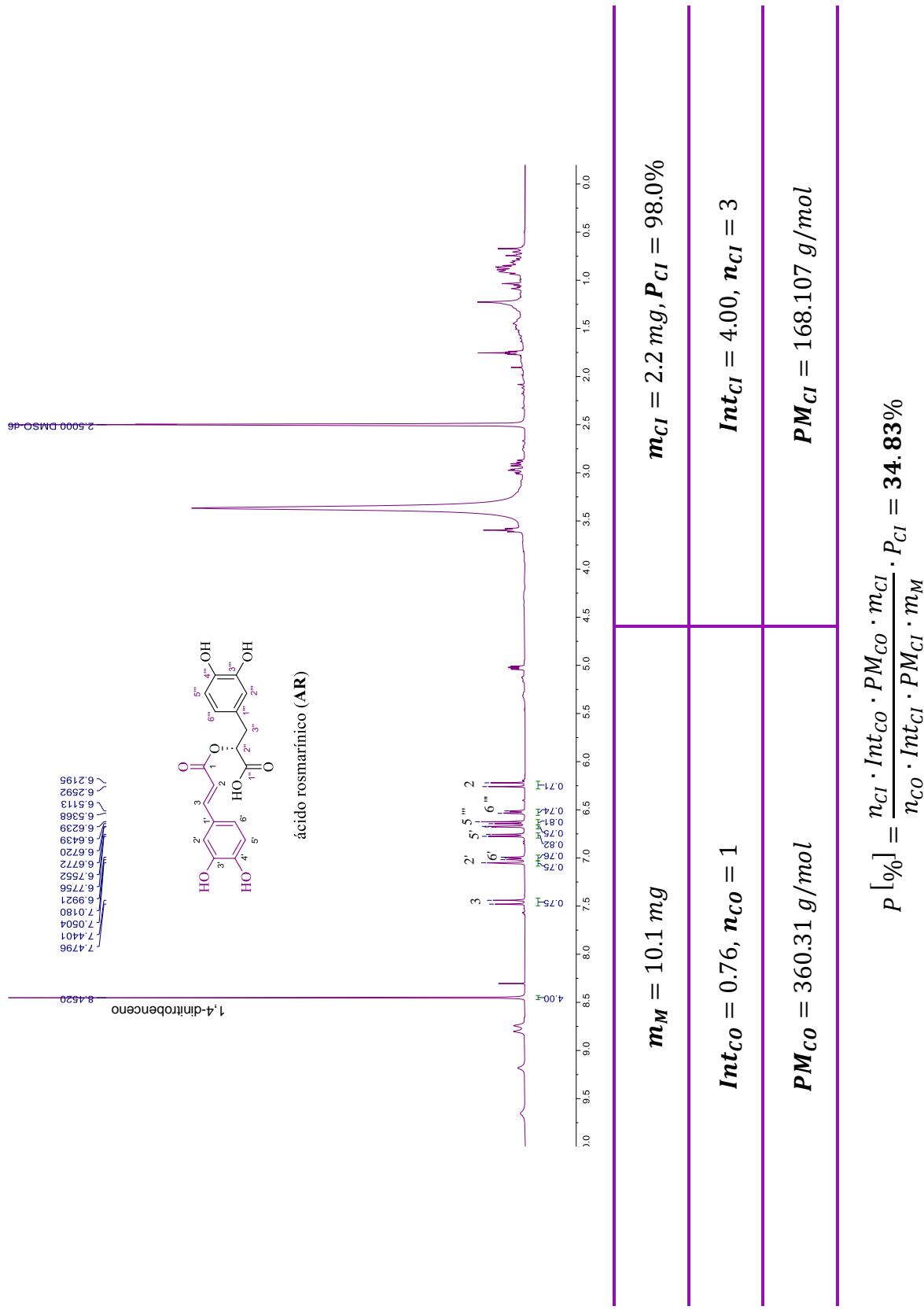
Finalmente, el espectro de la partición acuosa (Figura 21) evidenció la presencia de protones base de OH de carbohidratos (3.00-4.00 ppm) y señales de los protones H-1 de la  $\alpha$ - y  $\beta$ -D-glucopiranosa. Cabe resaltar que no es posible saber cual de los dos azúcares ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) es el que se encuentra de manera natural en la planta, pues al disolver el extracto MeOH en agua ocurrió una reacción de epimerización que dio lugar a un equilibrio entre los mismos. También es probable que ambos azúcares formen parte de la composición química de esta especie.



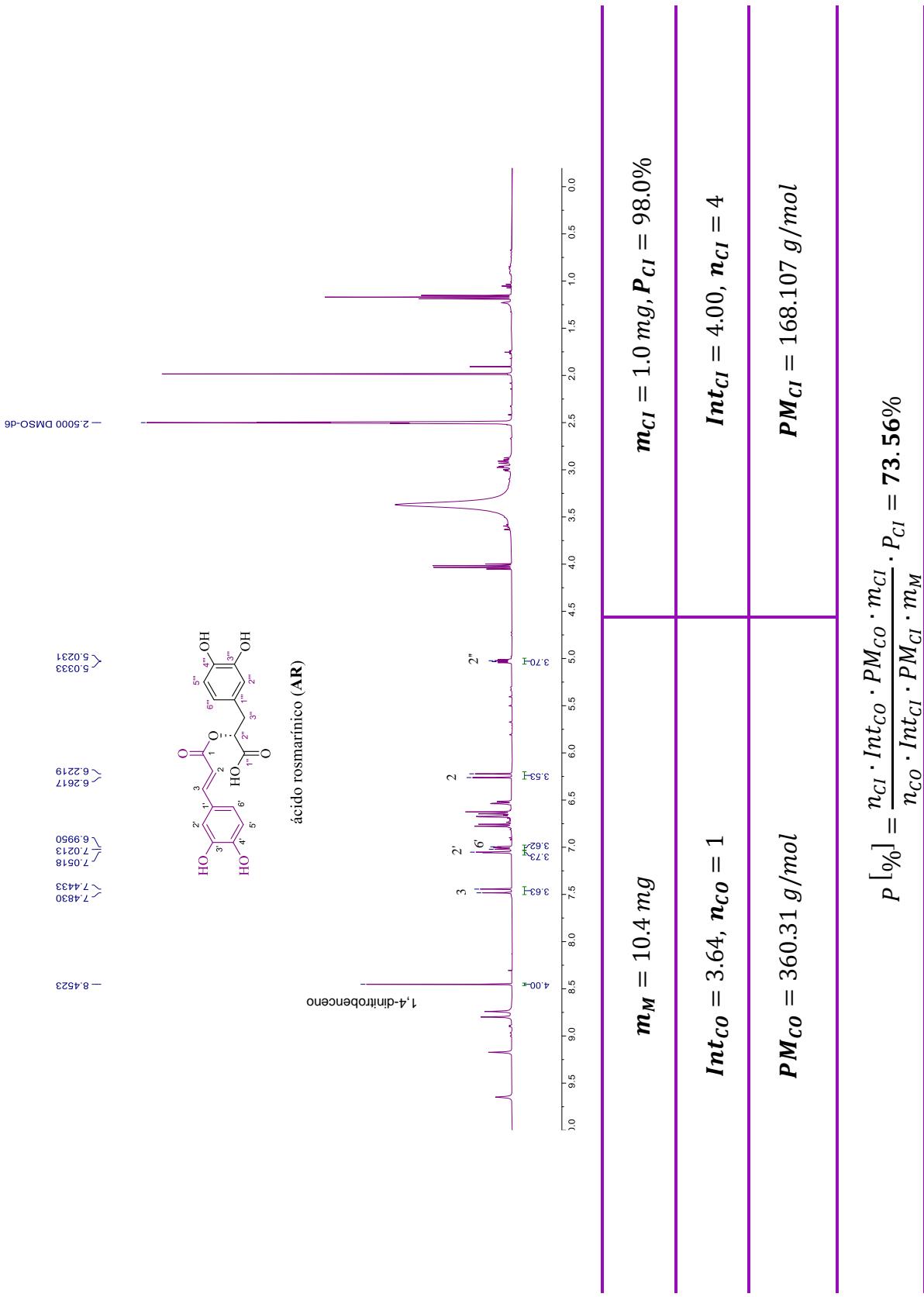
### **7.3 Cuantificación por RMN de $^1\text{H}$ del ácido rosmarínico en las particiones de AcOEt**

Según autores (Sicker, Zeller, Siehl, & Berger, 2019), la mayor cantidad de AR se encontraría contenida en fracciones de AcOEt extraídas a pH 3. Con el fin de corroborar lo anterior se realizó una cuantificación para las particiones de AcOEt (antes de acidificar y a pH 3.211) (Tabla 10 y Tabla 11). De este modo, se determinó que en la partición AcOEt su porcentaje relativo es del 34.83%, mientras que en la partición AcOEt pH 3 el compuesto se encuentra en un porcentaje aproximado de 73.56%.

**Tabla 10.** Espectro de q-RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) en DMSO- $d_6$ , de la partición de AcOEt pH 6 (antes de acidificar).



**Tabla 11.** Espectro de q-RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) en DMSO- $d_6$ , de la partición de AcOEt pH 3.



## 7.4 Aislamiento, purificación e identificación de compuestos

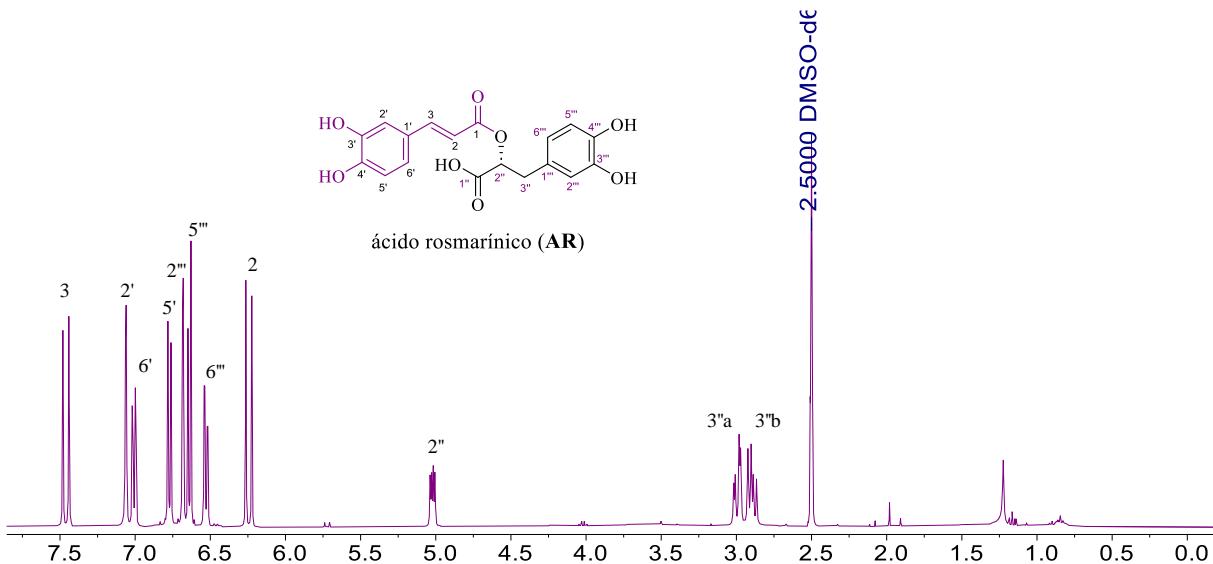
### 7.4.1 Ácido rosmarínico

Se tomaron 517.6 mg de la partición AcOEt pH 3 y se llevó a cabo su separación por CC. Para ello se empacó una columna cromatográfica de 3 cm de diámetro con 8" de gel de sílice (47.5 g) y se utilizaron mezclas de CHCl<sub>3</sub>-AcOEt-HCOOH como fase móvil (Tabla 12) para obtener un total de 60 eluatos de 20 mL cada uno. Su monitoreo por TLC evidenció que el AR se encontraba en la fracción B (eluatos 8-12), la cual se concentró a presión reducida en el rotavapor y se pesó (150.7 mg, 29.12 %).

**Tabla 12.** Fase móvil que se utilizó en la purificación del ácido rosmarínico.

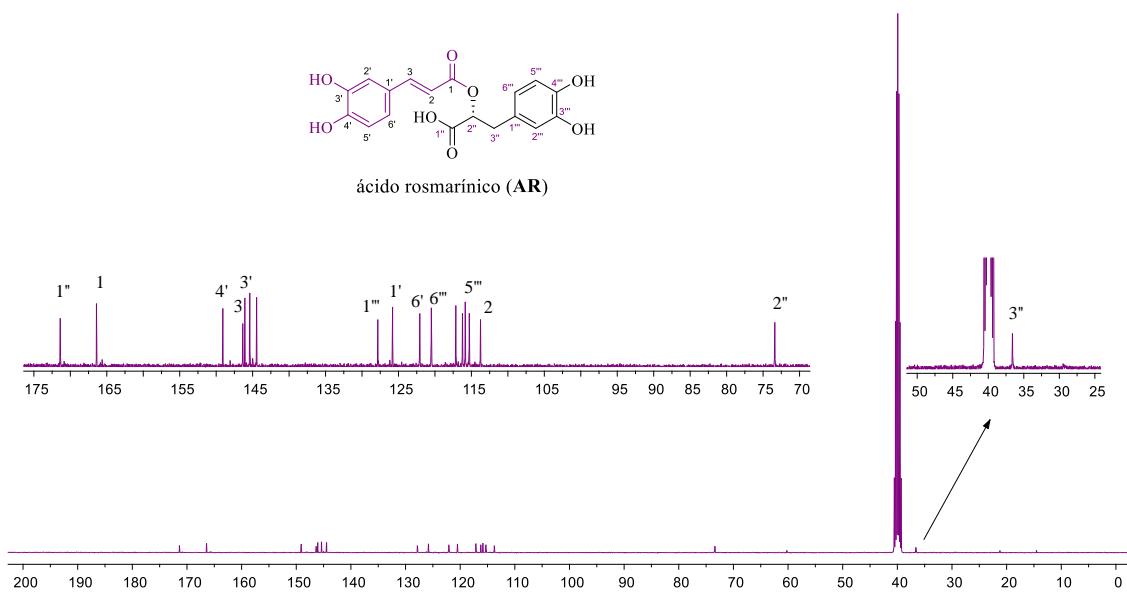
Disolvente	Proporción	mL
CHCl <sub>3</sub> -AcOEt-HCOOH	5:4:0.5	490
	5:4:0.6	150
	5:4:0.7	150
	5:4:0.8	150
	5:4:0.9	150
	5:4:1.0	50
Acetona	1	50
MeOH	1	50

Su espectro de RMN de <sup>1</sup>H (Figura 22) mostró señales a 7.50 y 6.25 ppm pertenecientes a los protones de la olefina trans (posiciones 3 y 2, respectivamente). Las señales entre 6.50 y 7.25 ppm corresponden a los protones aromáticos. En 3.00 y 2.90 ppm se encuentran las señales correspondientes a los protones de diasterotópicos (a y b, respectivamente) de la posición 3".

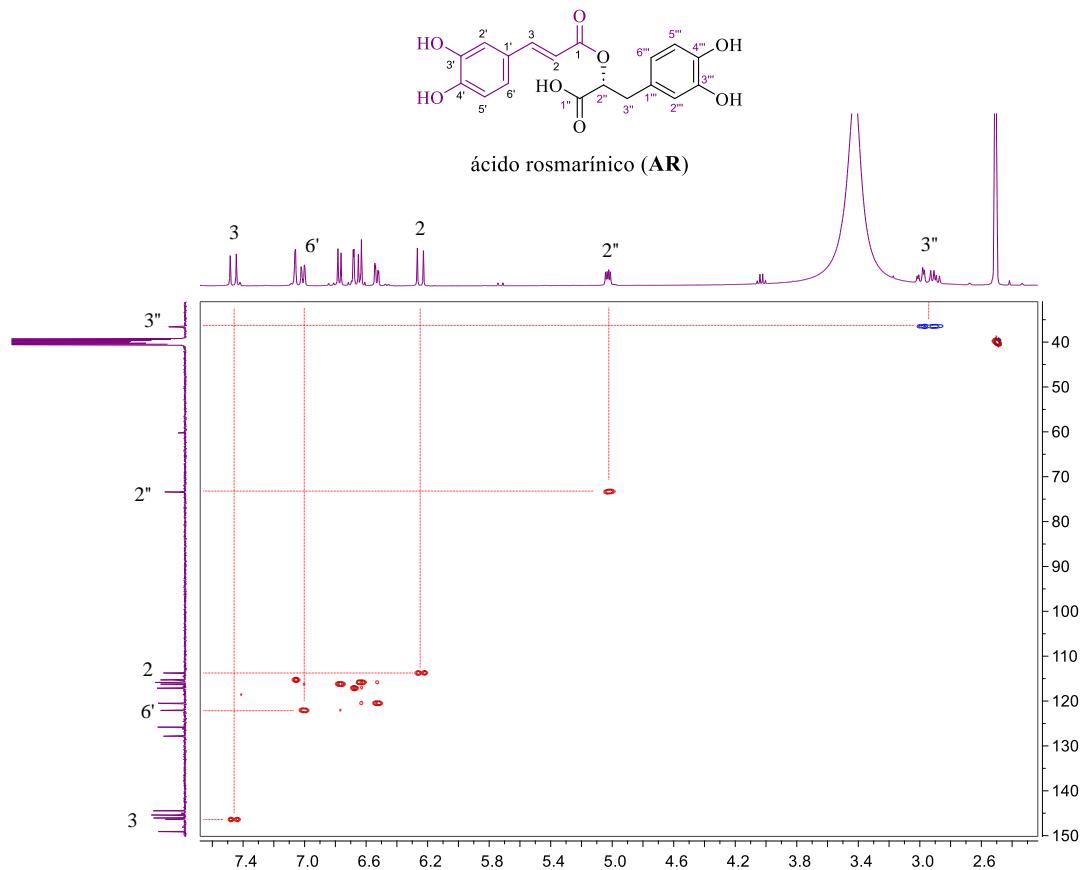


**Figura 22.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) en  $\text{DMSO}-d_6$ , del ácido rosmarínico aislado de *Prunella vulgaris* L.

El espectro de  $^{13}\text{C}$  (Figura 23) se observaron las 18 señales esperadas, de las cuales aquellas con desplazamientos de 170.98 y 166.01 ppm se asignaron a los carbonilos 1" y 1, respectivamente, mientras que las correspondientes a los carbonos vinílicos 2 y 3 se observaron en 113.35 y 145.95 ppm, correspondientemente. Asimismo, las señales de los carbonos alifáticos 2" y 3" tuvieron un desplazamiento de 72.99 y 36.19 ppm, en ese orden. El resto de las señales se asignó mediante el experimento HSQC (Figura 24) y por comparación con datos de la literatura (Sicker, Zeller, Siehl, & Berger, 2019).



**Figura 23.** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) en  $\text{DMSO}-d_6$ , del ácido rosmarínico aislado de *Prunella vulgaris L.*



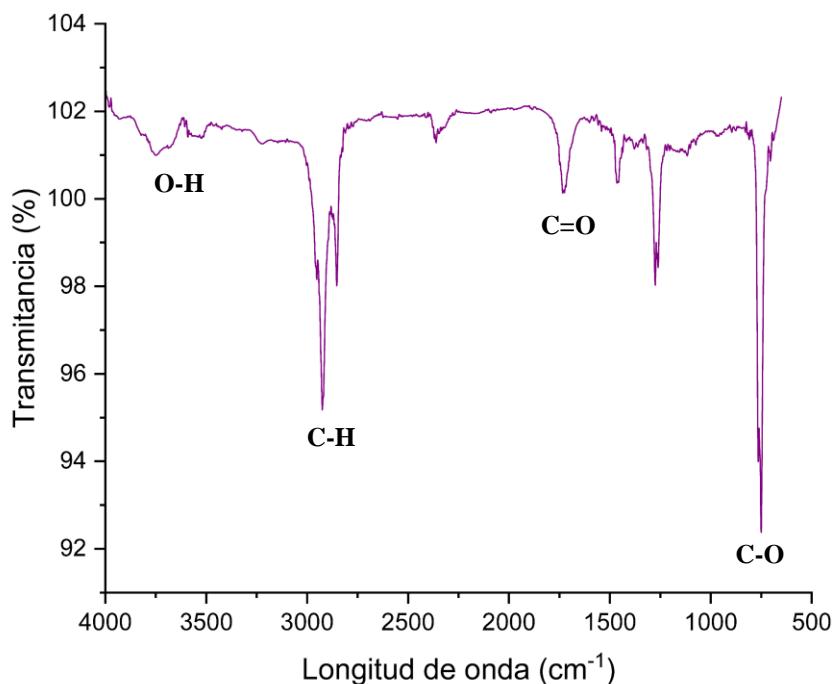
**Figura 24.** Espectro HSQC en  $\text{DMSO}-d_6$ , del ácido rosmarínico aislado de *Prunella vulgaris L.*

Como se mencionó arriba, los desplazamientos (en ppm) obtenidos se contrastaron con los reportados (Sicker, Zeller, Siehl, & Berger, 2019) (Tabla 13) para confirmar que este compuesto es ácido rosmarínico.

**Tabla 13.** Comparación de los datos de desplazamiento químico (en ppm) de  $^1\text{H}$ -RMN entre el ácido rosmarínico aislado de *P. vulgaris* L. y el reportado por (Sicker, Zeller, Siehl, & Berger, 2019).

$\delta$ en ppm, multiplicidad, ( $J$ en Hz)		Asignación
AR aislado de <i>Prunella vulgaris</i> L.	AR reportado	
7.46, d, (15.9)	7.47, d, (15.9)	3
7.00, dd, (8.2, 2.1)	7.00, dd, (8.1; 1.6)	6'
6.52, dd, (8.1, 1.9)	6.53, dd, (8.0; 1.6)	6"
6.67, d, (2.1)	6.69, d, (1.6)	2"
6.77, d, (8.2)	6.77, d, (8.1)	5'
6.63, d, (8.0)	6.65, d, (8.0)	5"
7.05, d, (2.1)	7.06, d (1.6)	2'
6.24, d, (15.9)	6.24, d, (15.9)	2
5.02, dd, (8.5, 4.2)	5.04, dd, (8.3, 4.2)	2"
2.99, dd, (14.4, 4.2)	2.99, dd, (-14.2, 4.2)	3"
2.89, dd, (14.39, 8.52)	2.91, dd, (-14.2, 8.3)	

El compuesto también se analizó por FT-IR en un rango de 4000 a 500  $\text{cm}^{-1}$ . En la figura 25 se muestra la asignación las bandas de vibración de los grupos funcionales característicos del ácido rosmarínico (AR). Se identificó la banda característica del grupo carbonilo alrededor de 1750  $\text{cm}^{-1}$ , mientras que la banda presente a 750 corresponde al enlace simple carbono-oxígeno.



**Figura 25.** Espectro de infrarrojo del ácido rosmarínico aislado de *Prunella vulgaris* L.

Se determinó el intervalo de fusión (168-180°C) del compuesto para su posterior comparación con aquel reportado en la literatura p.f. (171-175 °C) (Sicker, Zeller, Siehl, & Berger, 2019).

Además, se obtuvo la rotación óptica específica del AR purificado de *P. vulgaris* L.  $[\alpha]_D^{20^\circ C} = +83.4$  (*c* 0.98, MeOH) y del AR de Sigma Aldrich  $[\alpha]_D^{20^\circ C} = +81.3$  (*c* 1.01, MeOH) para contrastarlas con la que se encuentra reportada  $[\alpha]_D^{20^\circ C} = +78.0$  (MeOH) (Sicker, Zeller, Siehl, & Berger, 2019).

Finalmente, los desplazamientos (en ppm) obtenidos se contrastaron con los reportados en la bibliografía (Sicker, Zeller, Siehl, & Berger, 2019) (Tabla 13) para confirmar que este compuesto es ácido rosmarínico.

#### 7.4.2 Mezcla de ácido ursólico y oleanólico

Se tomaron 1.0020 g de la partición AcOEt pH 3 y se llevó a cabo una CC. Para ello se empacó la columna cromatográfica de 5 cm de diámetro con 8" de gel de sílice (90 g) y se usaron mezclas de CHCl<sub>3</sub>-AcOEt-HCOOH (5:4:0.5-5:4:1.0) de 300 mL cada una, como fase móvil para obtener un total de 87 eluatos de 20 mL. Su monitoreo por TLC condujo a un total de siete fracciones; A (eluatos 9-13), B (14-20), C (21-27), D (28-48), E (49-55), F (56-72) y E (73-87). La fracción A dio positivo para triterpenos con el revelador de Ce(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (123.2 mg, 12.30%). Este procedimiento se repitió para 5.4548 g de las particiones de AcOEt (pH 3 y pH 6) con rendimientos similares.

Las fracciones de las cromatografías descritas anteriormente que dieron positivo para triterpenos (500.5 mg, 9.18%) se analizaron por TLC y, al comparar el R<sub>f</sub> de un triterpeno que parecía ser el compuesto predominante de estas fracciones con una muestra auténtica de ácido oleanólico (**AO**), se confirmó su presencia en las mismas.

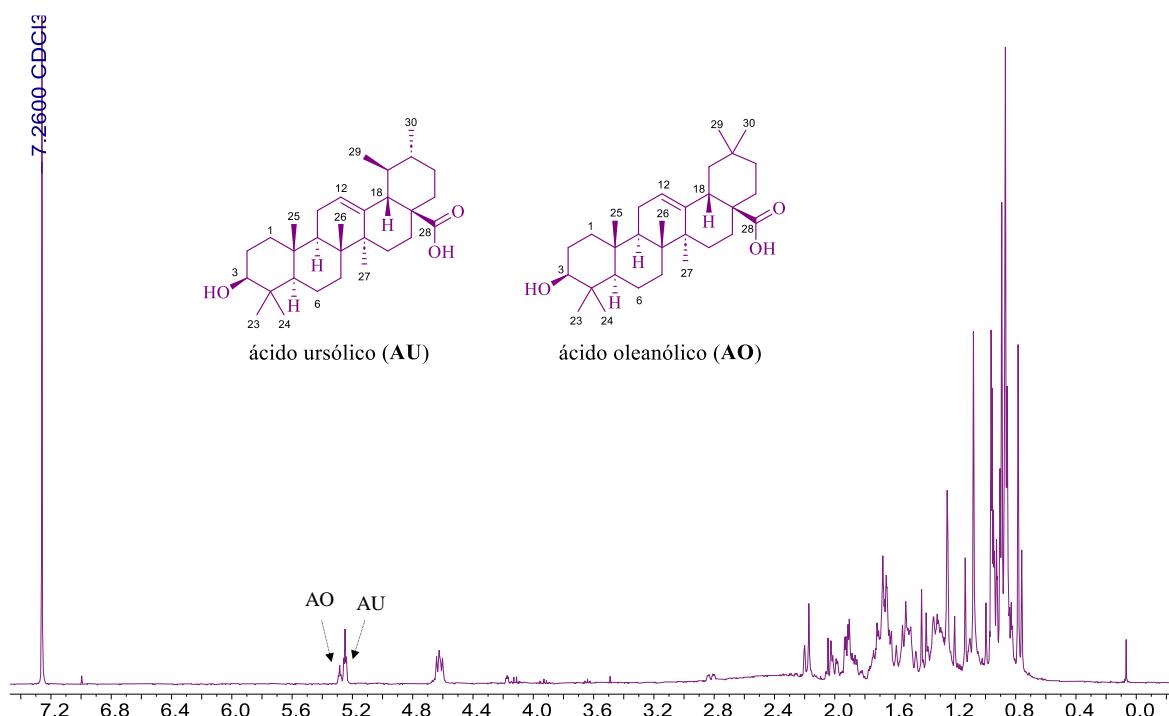
Para la separación cromatográfica (CC) de estas fracciones se aplicó en sólido una muestra de 500.50 mg, se utilizó gel de sílice (45 g) como fase estacionaria y gradientes de hexano-AcOEt como fase móvil (Tabla 14) en una columna cromatográfica de 3 cm de diámetro. A partir del estudio de los 115 eluatos por TLC, se obtuvieron 12 subfracciones, la mezcla de triterpenos se aisló en la subfracción G (eluatos 41-54) (26.1 mg, 5.22%).

**Tabla 14.** Fase móvil utilizada en el aislamiento de la mezcla de triterpenos.

Disolvente	Proporción	mL
Hexano-AcOEt	100:0	150
	85:15	100
	90:10	100
	80:20	100
	75:25	100
	70:30	200
	50:50	100

Acetona	1	50
MeOH	1	100

El espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de la subfracción Z (Figura 26) y su comparación con datos reportados en la bibliografía (Ludeña Huaman, Tupa Quispe, Huamán Quispe, Serrano Flores, & Robles Caycho, 2021) reveló que el AO se encontraba en mezcla con ácido ursólico (AU). Luego de integrar las señales características de cada uno, se determinó que se encuentran en proporción (30:70), respectivamente. Esa determinación se llevó a cabo luego de integrar sus señales distintivas.



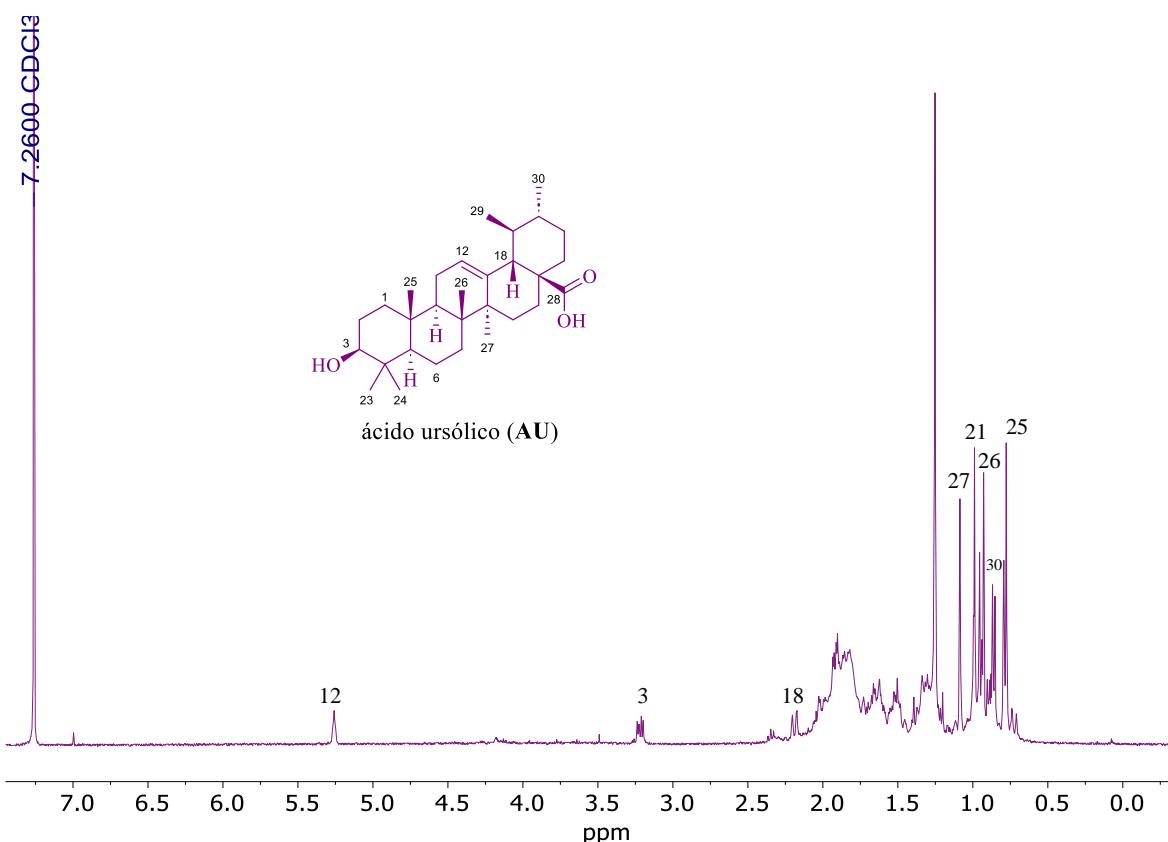
**Figura 26.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  en  $\text{CDCl}_3$ , de la mezcla de ácido oleanólico y ursólico aislada de *Prunella vulgaris* L.

Estos triterpenos son comunes en el género *Prunella* (Zholdasbayev, Atazhanova, Musozoda, & Musozoda, 2023). Según diversos estudios (Ryu, Lee, Lee, Kim, & Zee, 1992); (Cantrell, Franzblau, & Fischer, 2001); (Darshani, Sen Sarma, Srivastava, Baishya, & Kumar, 2022)

son frecuentes en varias especies medicinales y han demostrado actividad anticancerígena, antibacteriana y antiviral.

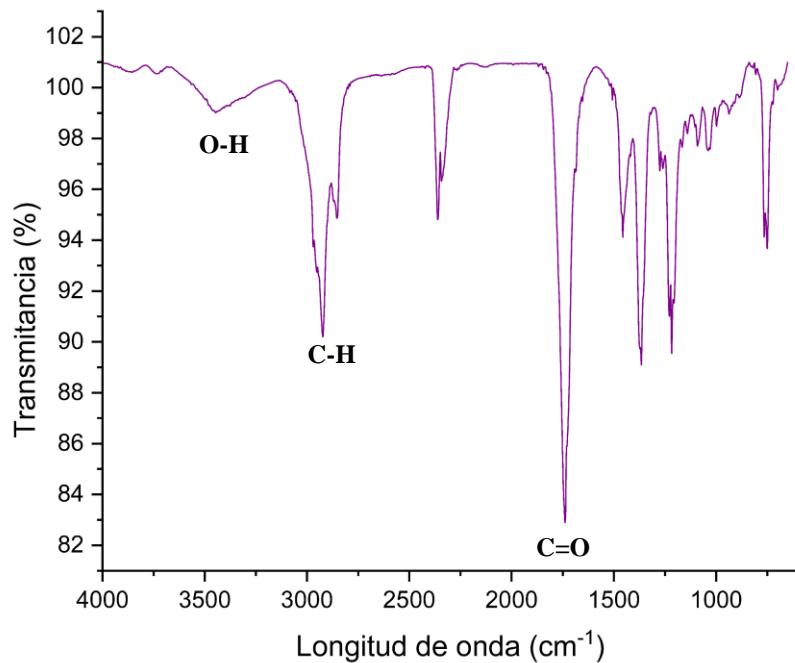
#### 7.4.3 Ácido ursólico

La mezcla de triterpenos se disolvió en MeOH y se mantuvo en refrigeración durante 72 h para dar lugar a un precipitado blanco, que se identificó como ácido ursólico (**AU**). A continuación, se describen las señales representativas del compuesto en su espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 27). Las señales simples entre 0.75 y 1.20 ppm corresponden a los protones de las posiciones 25, 26 y 27 respectivamente, mientras que las señales dobles (poner desplazamientos en ppm) se atribuyen a los protones de las posiciones 18 y 30. Finalmente, la señal doble de dobles a 3.20 ppm, para CH base de OH, se debe a protón de la posición 3 y la señal triple a 5.30 ppm pertenece al protón del enlace doble ubicado en la posición 12.



**Figura 27.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) en  $\text{CDCl}_3$ , del ácido ursólico purificado de *Prunella vulgaris* L.

El compuesto también se analizó por FT-IR en un rango de 4000 a 500 cm<sup>-1</sup>. La figura 28 muestra las bandas de vibración del ácido ursólico y sus grupos funcionales característicos, la interpretación y asignación se realizaron de acuerdo con los datos de la bibliografía (Busuioc, Costea, Dediu Botezatu, Furdiu, & Dinica, 2023).



**Figura 28.** Espectro de infrarrojo del ácido ursólico purificado de *Prunella vulgaris* L.

Se determinó el intervalo de fusión (200-210 °C) del compuesto para su posterior comparación con aquel reportado en la literatura p.f. (289-290 °C) (National Institutes of Health (NIH), s.f.).

Finalmente, su rotación óptica específica fue  $[\alpha]_D^{20^\circ\text{C}} = +30.5$  (*c* 0.07, CHCl<sub>3</sub>) y se equiparó con la que se encuentra reportada  $[\alpha]_D^{25^\circ\text{C}} = +62.3$  (*c* 1.15, CHCl<sub>3</sub>) por (National Institutes of Health (NIH), s.f.).

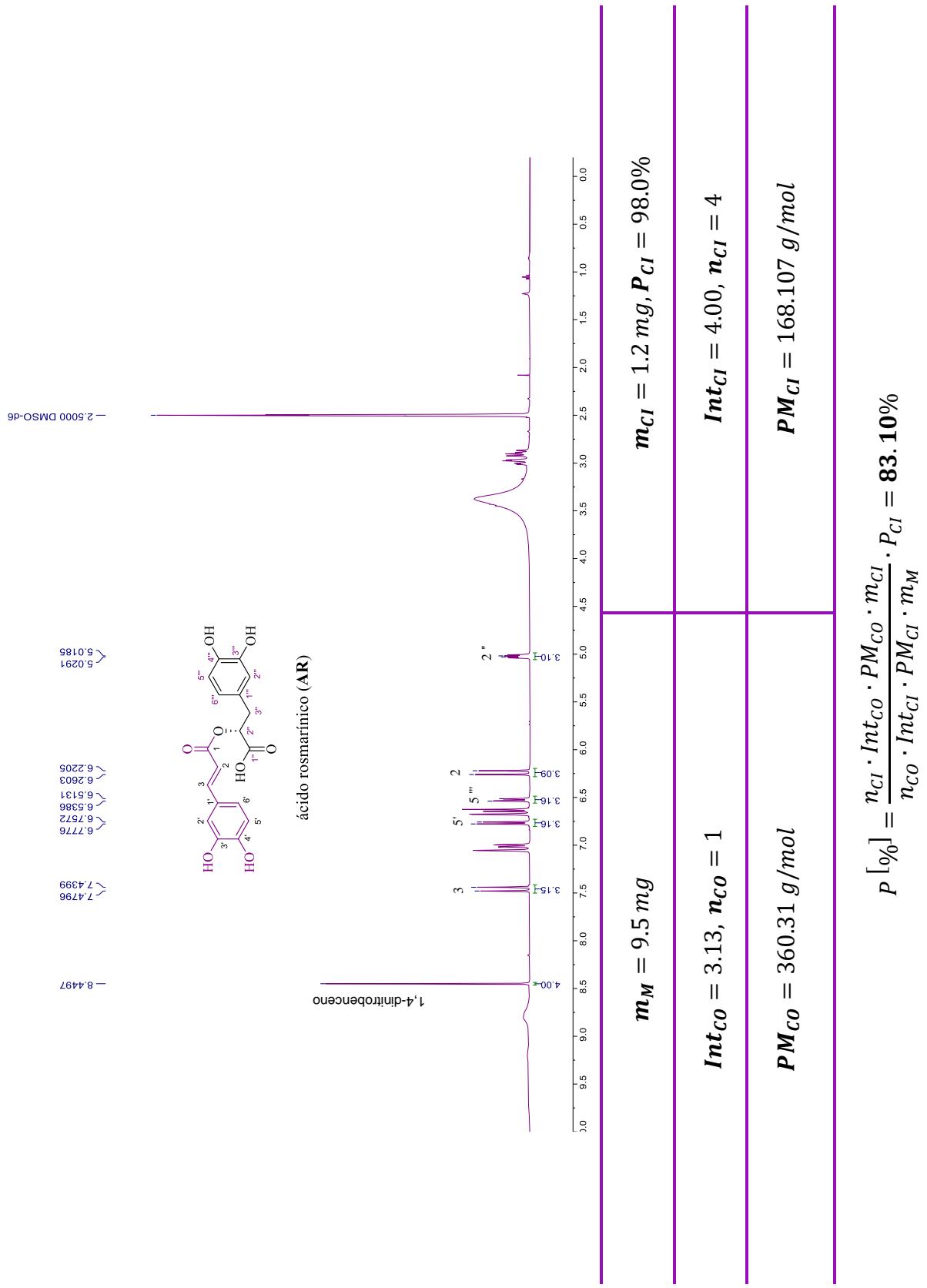
#### 7.4.4 Otros

En varias fracciones se observó la presencia en mezcla del **AR** otro compuesto fenólico relacionado estructuralmente, el cual está en proceso de elucidación.

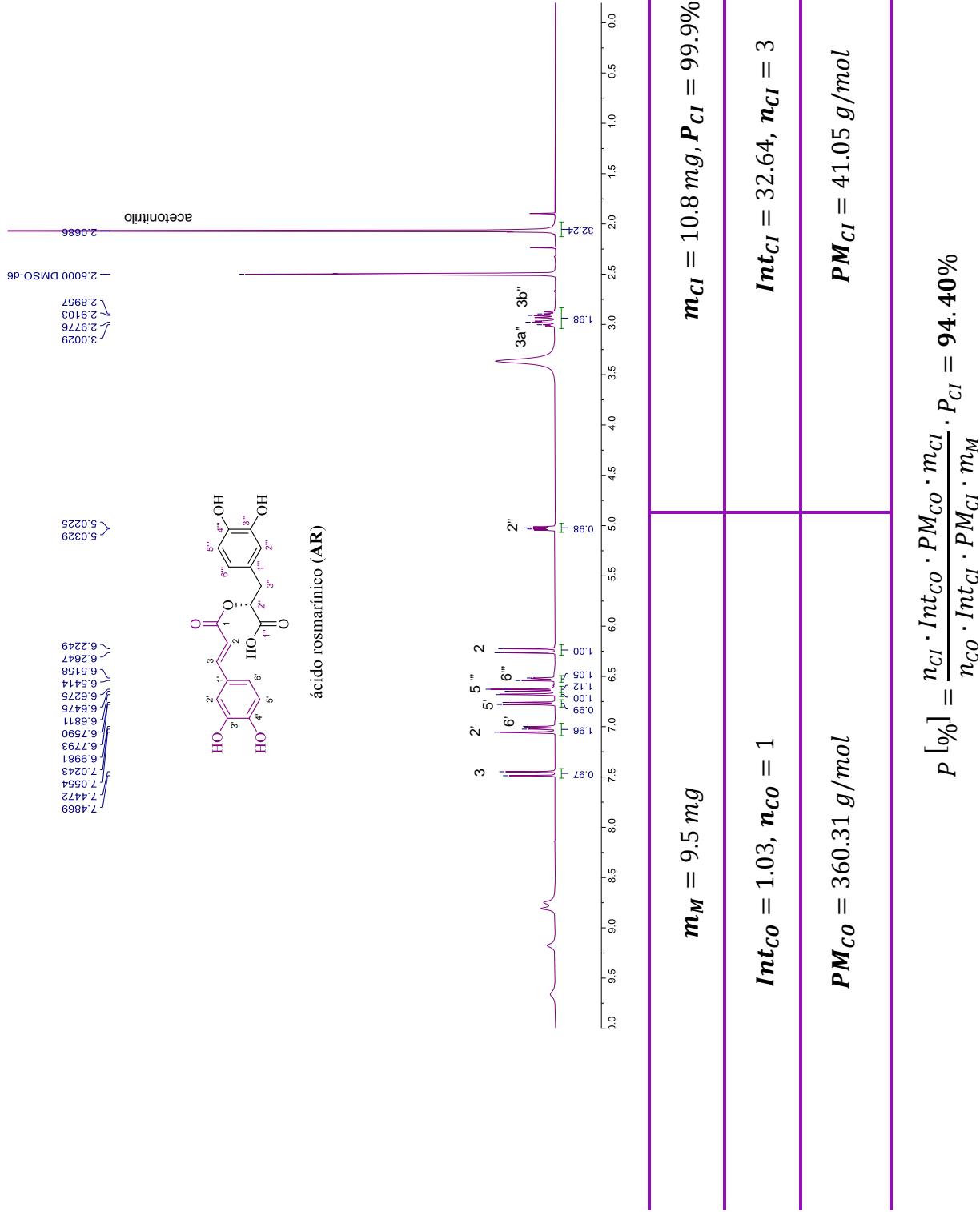
### 7.5 Cuantificación absoluta por RMN de <sup>1</sup>H (q-RMN) del ácido rosmarínico

Se determinó que pureza relativa del **AR** purificado de *P. vulgaris* L. (Tabla 15) es de 83.10% y, a modo de comparación, se determinó el porcentaje relativo del **AR** adquirido de Sigma Aldrich (94.40%) (Tabla 16). El valor reportado por el fabricante es de 96%.

**Tabla 15.** Espectro de q-RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) en DMSO- $d_6$ , del ácido rosmárico purificado de *Prunella vulgaris* L..



**Tabla 16.** Espectro de q-RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz) en DMSO- $d_6$ , del ácido rosmarínico obtenido de Sigma Aldrich.



## 7.6 Evaluación de la capacidad antioxidante

Se evaluó la capacidad antioxidante del extracto MeOH, la partición AcOEt pH 3 y el ácido rosmarínico de *P. vulgaris* mediante tres pruebas complementarias, las muestras mostraron importante actividad *in vitro* de captura de radicales libres, la cual es consistente con estudios previos (Sárosi & Bernáth, 2008).

Otros estudios reportados (Pan, Wang, & Chen, 2022) comprobaron que el extracto etanólico al 50 % de *P. vulgaris* presentaba una alta actividad antirradicalaria y antioxidante, el hallazgo principal de este estudio fue que el ácido rosmarínico, y no los flavonoides, es el componente principal y responsable de la actividad antioxidante demostrada por el extracto.

### 7.6.1 ABTS•+

Para evaluar la capacidad antioxidante de la especie en la neutralización y reducción del radical catiónico ABTS se interpolaron los datos obtenidos en las curvas de valoración de trolox (Figura 29) y ácido ascórbico (Figura 30). Los resultados se muestran a continuación (Tabla 17).

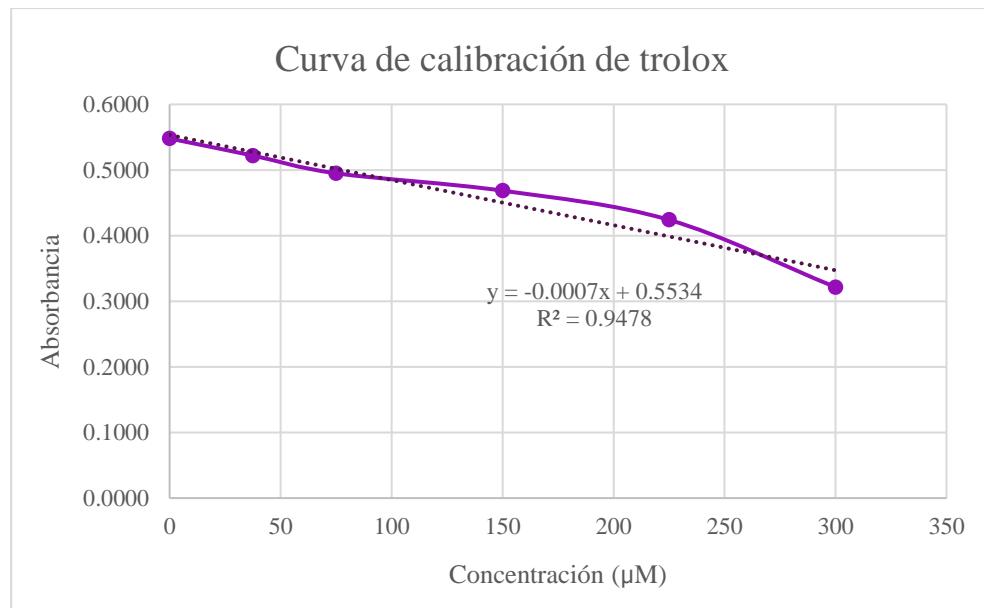


Figura 29. Curva de calibración de trolox para el ensayo ABTS•+.

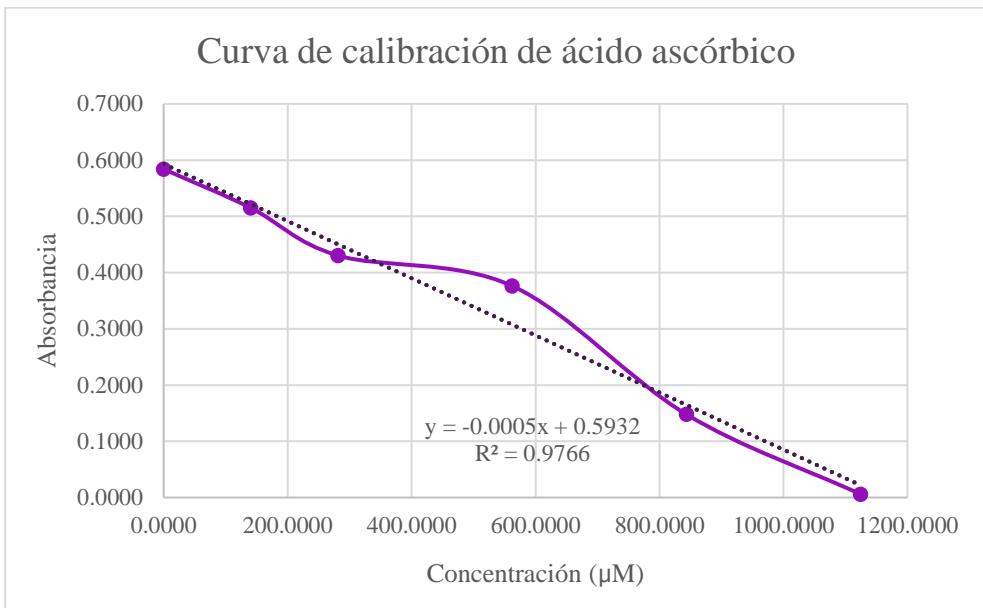


Figura 30. Curva de calibración de ácido ascórbico para el ensayo ABTS<sup>•+</sup>.

**Tabla 17.** Determinación de la capacidad antioxidante por el método ABTS<sup>•+</sup>.

Muestra	Concentración <sup>a</sup>	Absorbancia	$\mu\text{mol Eq T/g ps}$ <sup>b</sup>	$\mu\text{mol Eq AA/g ps}$ <sup>c</sup>
Extracto MeOH	1.0000	0.4777	$5.4095 \pm 0.1798$	$0.2020 \pm 0.0044$
	0.5000	0.5310	$3.9143 \pm 1.2122$	$0.2175 \pm 0.0368$
	0.2500	0.5567	-	$0.2555 \pm 0.0885$
	0.1250	0.5853	-	$0.1100 \pm 0.0491$
	0.0625	0.5783	-	$0.4159 \pm 0.3218$
Partición AcOEt pH 3	1.0000	0.0753	$34.1476 \pm 0.2182$	$0.9054 \pm 0.0053$
	0.5000	0.2860	$38.2000 \pm 1.7843$	$1.0741 \pm 0.0437$
	0.2500	0.4460	$30.6857 \pm 0.8571$	$1.0294 \pm 0.0210$
	0.1250	0.5027	$38.5143 \pm 7.2731$	$1.2662 \pm 0.4229$
	0.0625	0.5350	$21.0286 \pm 8.6284$	$1.6280 \pm 0.2112$
Ácido rosmarínico	1.0000	0.0097	$38.8381 \pm 1.0160$	$1.0202 \pm 0.0249$
	0.5000	0.1423	$58.7238 \pm 3.1472$	$1.5765 \pm 0.0770$
	0.2500	0.3580	$55.8286 \pm 1.7379$	$1.6448 \pm 0.0425$
	0.1250	0.4507	$49.0857 \pm 0.4041$	$1.9935 \pm 0.4078$
	0.0625	0.5197	$38.5524 \pm 2.6393$	$2.0569 \pm 0.0646$

<sup>a</sup> mg/mL<sup>b</sup> micromoles de equivalente de trolox por cada g de peso seco<sup>c</sup> micromoles de equivalente de ácido ascórbico por cada g de peso seco

### 7.6.2 DPPH<sup>•</sup>

Se evaluó la capacidad antioxidante de la especie en la reducción del radical libre DPPH al interpolar los datos obtenidos en las curvas de valoración de trolox (Figura 31) y ácido ascórbico (Figura 32). Los resultados se muestran abajo (Tabla 18).

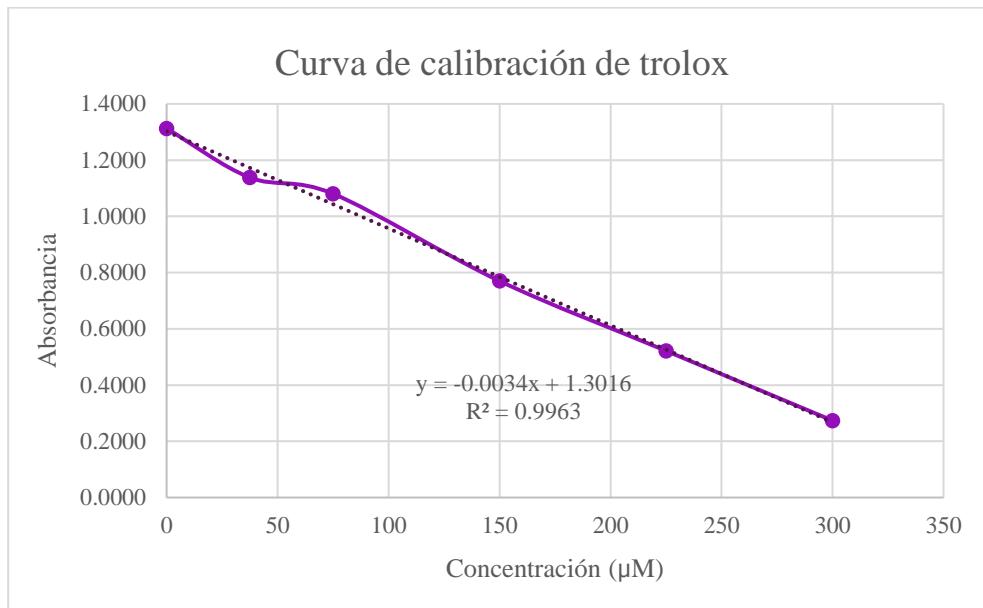


Figura 31. Curva de calibración de trolox para el ensayo DPPH•.

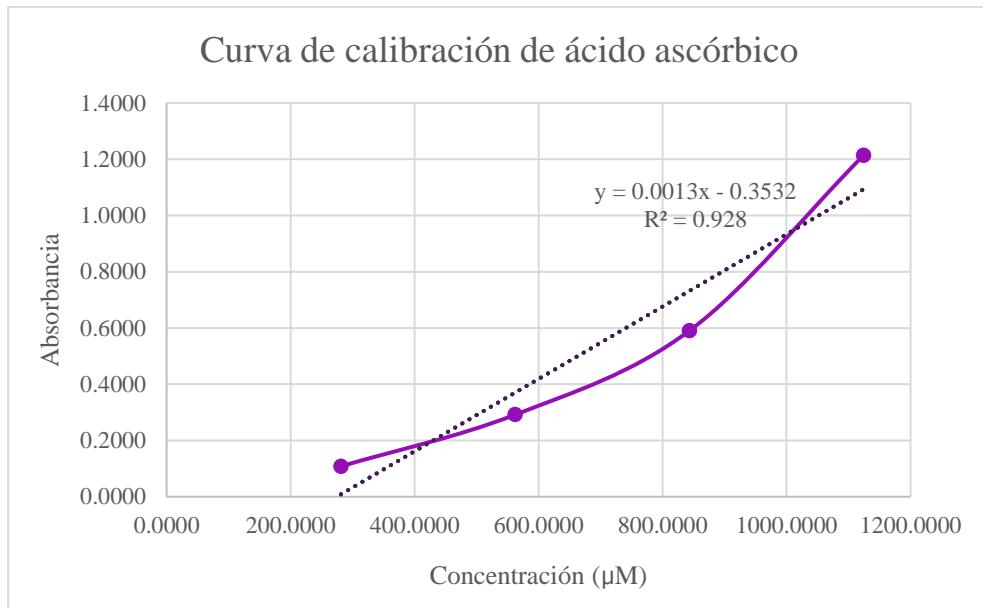


Figura 31. Curva de calibración de ácido ascórbico para el ensayo DPPH•.

**Tabla 18.** Determinación antirradicalaria por DPPH•.

Muestra	Concentración <sup>a</sup>	Absorbancia	$\mu\text{mol Eq T/g ps}$ <sup>b</sup>	$\mu\text{mol Eq AA/g ps}$ <sup>c</sup>
Extracto MeOH	1.0000	0.3580	$16.6518 \pm 0.5199$	$32.8246 \pm 1.3598$
	0.5000	0.4660	$29.4918 \pm 0.7978$	$75.6185 \pm 2.0866$
	0.2500	0.9133	-	$246.1292 \pm 2.0887$
	0.1250	1.2697	-	$626.1046 \pm 5.4828$
	0.0625	1.4907	-	$1361.6246 \pm 12.1416$
Partición AcOEt pH 3	1.0000	0.1213	$20.8282 \pm 0.2853$	$21.9015 \pm 0.7461$
	0.5000	0.1017	$42.3506 \pm 0.4945$	$41.9877 \pm 1.2934$
	0.2500	0.1143	$83.8071 \pm 1.1034$	$86.3138 \pm 2.8858$
	0.1250	0.2017	$155.2847 \pm 1.0966$	$204.8738 \pm 2.8680$
	0.0625	0.8053	$150.2400 \pm 5.3906$	$829.0708 \pm 14.0986$
Ácido rosmarínico	1.0000	0.1137	$20.9635 \pm 0.1542$	$21.5477 \pm 0.4032$
	0.5000	0.1270	$41.4565 \pm 0.7207$	$44.3262 \pm 1.8850$
	0.2500	0.1363	$82.2541 \pm 0.4075$	$90.3754 \pm 1.0659$
	0.1250	0.1413	$163.8024 \pm 3.2389$	$182.5969 \pm 8.4709$
	0.0625	0.2707	$291.0871 \pm 5.7335$	$460.7015 \pm 14.9952$

<sup>a</sup> mg/mL<sup>b</sup> micromoles de equivalente de trolox por cada gramo de peso seco<sup>c</sup> micromoles de equivalente de ácido ascórbico por cada gramo de peso seco

### 7.6.3 FRAP

Finalmente, se evaluó la capacidad antioxidante de esta planta en la reducción del ión férrico, para ello se interpolaron los datos obtenidos en la curva de valoración de sulfato ferroso (Figura 32). Los resultados se muestran abajo (Tabla 19).

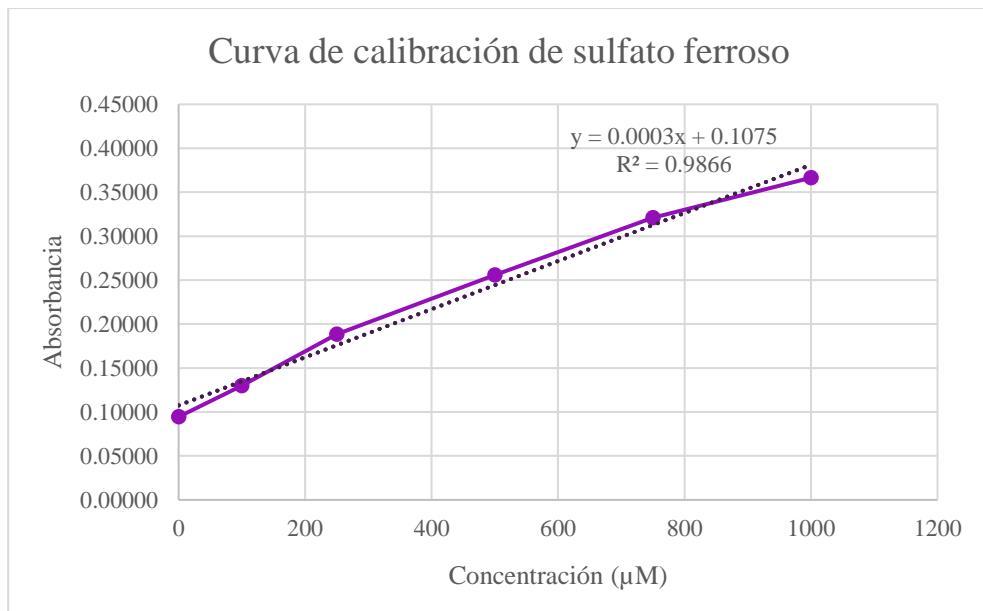


Figura 31. Curva de calibración de sulfato ferroso para el ensayo FRAP.

**Tabla19.** Determinación antioxidante por reducción del ión férrico (FRAP).

Muestra	Concentración <sup>a</sup>	Absorbancia	$\mu\text{mol Eq Fe (II)}/\text{g ps}^{\text{d}}$
Extracto MeOH	1.0000	0.7167	$0.0690 \pm 0.0064$
	0.5000	0.3917	$0.0644 \pm 0.0085$
	0.2500	0.2875	$0.0816 \pm 0.0112$
	0.1250	0.1742	$0.0604 \pm 0.0255$
	0.0625	0.1417	$0.0620 \pm 0.0195$
Partición AcOEt pH 3	1.0000	2.3275	$0.2516 \pm 0.0279$
	0.5000	1.8650	$0.3984 \pm 0.0266$
	0.2500	0.8708	$0.3460 \pm 0.0310$
	0.1250	0.9496	$0.7635 \pm 0.0863$
	0.0625	0.2788	$0.3105 \pm 0.0245$
Ácido rosmarínico	1.0000	2.7642	$0.3011 \pm 0.0058$
	0.5000	2.6479	$0.5758 \pm 0.0115$
	0.2500	2.3744	$1.0277 \pm 0.0662$
	0.1250	1.3142	$1.0940 \pm 0.1166$
	0.0625	0.4404	$0.6037 \pm 0.0242$

<sup>a</sup> mg/mL<sup>d</sup> micromoles de equivalente de Fe (II) por cada gramo de peso seco

## 7.7 Estudio citotóxico

Se realizó ensayo *in vitro* para evaluar la citotoxicidad del extracto metanólico de *Prunella vulgaris L.*, los resultados obtenidos se presentan a continuación (Tabla 20). En el ensayo se observó una disminución sobre la viabilidad de las células REH con concentraciones de 200, 300 y 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , esto después de un periodo de 48 h.

Los mecanismos de acción de este extracto no han sido elucidados, ya que este trabajo presenta el primer estudio de los efectos citotóxicos de esta especie sobre esta línea celular. Sin embargo, hay estudios que demuestran que el ácido rosmarínico inhibe la proliferación celular en líneas celulares de páncreas (PANC-1), próstata (PC-3), colon (HT-29), mama (MDAMB 436) y glioblastoma (T98G) y a partir de algunos otros se comprobó que el ácido

oleanólico de induce la apoptosis de células de adenocarcinoma de pulmón (Pan, Wang, & Chen, 2022).

**Tabla 20.** Ensayo de citotoxicidad del extracto metanólico en células REH (48 horas).

Muestra	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Células viables (%)
<b>S/Tx</b>	-	94.75
	50.0	94.05
	100.0	84.65
<b>Extracto MeOH</b>	200.0	42.43
	300.0	33.07
	500.0	41.30

## 7.8 Actividad hipoglucemiante

### 7.8.1 Ensayo de inhibición de la enzima $\alpha$ -glucosidasa

El extracto MeOH, la partición AcOEt pH 3 y el ácido rosmarínico de *Prunella vulgaris* L. mostraron importante actividad en la inhibición de la  $\alpha$ -glucosidasa *in vitro* (Tabla 21). Se usó acarbosa como control positivo.

Dado que no fue posible clacular la dosis inhibitoria 50 (IC 50) del extracto y la partición de AcOEt pH 3, se utilizó la curva de la acarbosa (Figura 32) para determinar su porcentaje de inhibición (I%) a una concentración de 5.00 mg/mL, el cual es 30.65 %.

El extracto MeOH mostró el mismo porcentaje de inhibición de que la acarbosa a 5.00 mg/mL cada uno, el cual fue de 30.65%. Sin embargo, la partición de AcOEt exhibió un 93.86% a esa misma concentración, es decir, 3.06 veces más eficaz que el extracto MeOH y el control positivo.

Estos resultados son congruentes con aquellos reportados previamente (Raafat, Wurglics, & Schubert-Zsilavecz, 2016), donde los autores llevaron a cabo un fraccionamiento bioguiado, el cual demostró que una fracción rica en ácido rosmarínico y ácido cafeico inhibió las enzimas hidrolizantes de carbohidratos ( $\alpha$ -glucosidasa y  $\alpha$ -amilasa). Además, dicha fracción redujo los niveles de glucosa en sangre y mejoró el estrés oxidativo *in vivo* de una manera más significativa que cantidades equivalentes de los compuestos puros o de la planta completa.

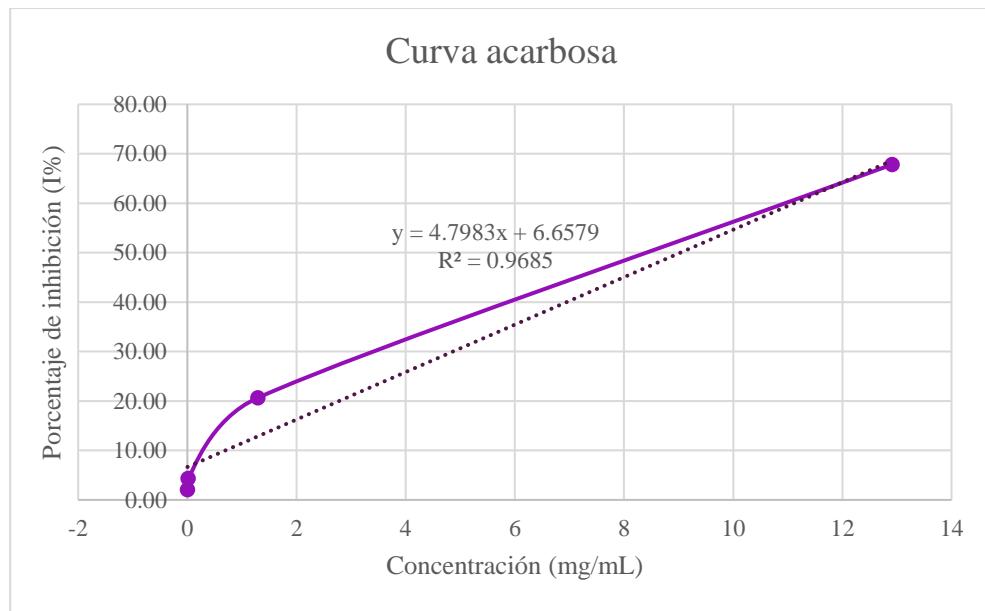
Otros estudios reportados (Pan, Wang, & Chen, 2022) concluyeron que esta especie podría prevenir la aterosclerosis diabética luego de efectuar experimentos donde el extracto acuoso eliminó la hiperglucemia y la disfunción vascular *in vivo*.

Luego de graficar las concentraciones de AR aislado de *P. vulgaris* utilizadas contra los I% se obtuvo su IC 50, la cual fue 4.99 veces menor que el de la acarbosa. Aunque su mecanismo de acción se desconoce, es evidente que posee una marcada actividad hipoglucémica.

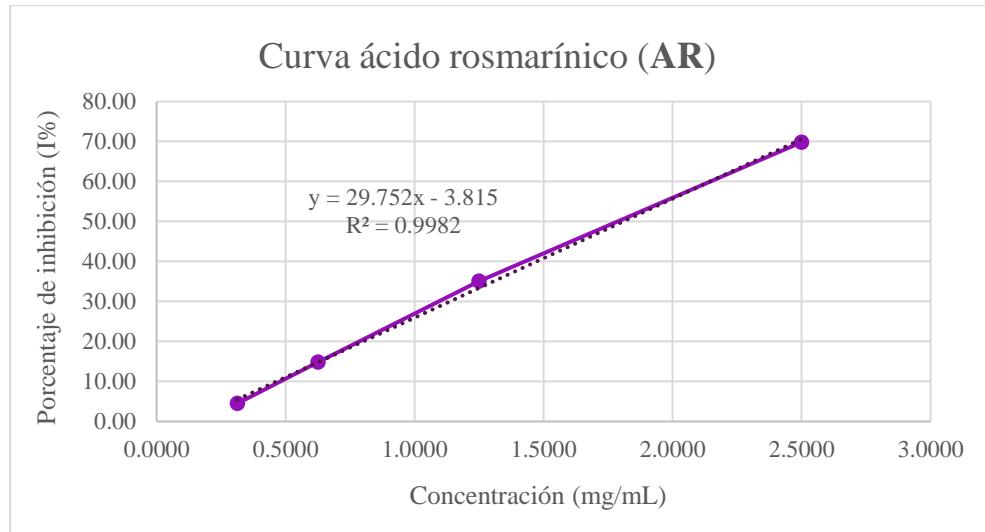
**Tabla 21.** Inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa.

Muestra	Concentración <sup>a</sup>	Inhibición (%)	IC 50
Acarbosa	12.9121	67.84 $\pm$ 1.26	
	1.2912	20.65 $\pm$ 2.47	9.0328
	0.0129	4.30 $\pm$ 1.07	
	0.0013	2.07 $\pm$ 0.71	
Extracto MeOH	5.0000	30.65 $\pm$ 2.86	
	2.5000	22.83 $\pm$ 3.53	
	1.2500	18.53 $\pm$ 2.45	-
	0.6250	7.23 $\pm$ 0.94	
	0.3125	8.55 $\pm$ 0.14	
Partición AcOEt pH 3	5.0000	93.86 $\pm$ 2.21	
	2.5000	86.05 $\pm$ 0.29	
	1.2500	80.24 $\pm$ 2.51	-
	0.6250	71.18 $\pm$ 1.68	
	0.3125	58.93 $\pm$ 2.54	
Ácido rosmarínico	5.0000	84.05 $\pm$ 0.47	
	2.5000	69.82 $\pm$ 1.69	
	1.2500	35.10 $\pm$ 3.93	1.8088
	0.6250	14.80 $\pm$ 0.39	
	0.3125	4.48 $\pm$ 1.73	

<sup>a</sup> mg/mL



**Figura 32.** Curva de la acarbosa



**Figura 33.** Curva del ácido rosmarínico

## 8 Conclusiones

- Se aisló y caracterizó el ácido rosmarínico de *Prunella vulgaris* L. nativa del estado de Hidalgo, el cual es el metabolito principal del extracto MeOH y de la partición de AcOEt pH 3.
- Se aisló y caracterizó el ácido ursólico de *Prunella vulgaris* L. nativa del estado de Hidalgo, un triterpeno común en el género *Prunella*.
- Se identificó la presencia del ácido oleanólico en mezcla con el ácido ursólico, ambos triterpenos son muy comunes en esta especie.
- Se determinó el porcentaje relativo del ácido rosmarínico utilizando un procedimiento conocido (q-NMR) en extractos, lo que permitió identificar el disolvente que extraía mejor este compuesto.
- Se determinó el porcentaje relativo del ácido rosmarínico utilizando un procedimiento conocido (q-NMR) en particiones de AcOEt extraídas a diferentes valores de pH, lo que permitió corroborar que este compuesto se extrae mejor a pH 3.
- Se determinó el porcentaje relativo de una muestra auténtica de ácido rosmarínico obtenido de Sigma Aldrich utilizando un procedimiento conocido (q-NMR), los resultados obtenidos coinciden con el porcentaje reportado en el marbete.
- Se evaluó por primera vez el efecto citotóxico de esta especie sobre la línea celular REH. Las concentraciones del extracto metanólico de 200, 300 y 400 µg/mL mostraron una marcada actividad citotóxica.
- La actividad *in vitro* de inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa del extracto MeOH, la partición AcOEt pH 3 y el ácido rosmarínico de *P. vulgaris* evidenció que esta especie puede ser útil en el tratamiento de la hiperglucemia.
- A partir del ensayo de inhibición de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa se calculó la dosis inhibitoria 50 del ácido rosmarínico, la cual resultó ser 4.99 veces menor que el control positivo utilizado (acarbosa).
- La potente actividad *in vitro* de captura de radicales libres demostrada por esta especie es evidencia de que puede ser útil en estrés oxidativo.
- Los resultados de este trabajo contribuyen al conocimiento de la composición química de esta planta y a validar su uso tradicional en el estado de Hidalgo.

## 9 Bibliografía

- Akmal, M., Patel, P., & Wadhwa, R. (28 de Febrero de 2024). *StatPearls Publishing [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. Recuperado el 2025, de Inhibidores de la alfa-glucosidasa.: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557848/>
- Alonso-Castro, A. J., Villarreal, M. L., Salazar-Olivo, L. A., Gomez-Sanchez, M., Dominguez, F., & Garcia-Carranca, A. (2011). Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(3), 945-972. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.11.055>
- American Cancer Society, I. (2024). *Leucemia*. doi:<https://hdl.handle.net/20.500.12724/18595>
- Benítez-Estrada, A., Villanueva-Sánchez, J., González-Rosendo, G., Alcántar-Rodríguez, V. E., Puga-Díaz, R., & Quintero-Gutiérrez, A. G. (2020). Determinación de la capacidad antioxidante total de alimentos y plasma humano por fotoquimioluminiscencia:Correlación con ensayos fluorométricos (ORAC)y espectrofotométricos (FRAP). *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 23, 1-9. doi:<https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2020.0.244>
- Burgos-Morón, E., Abad-Jiménez, Z., Martínez de Marañón, A., Iannantuoni, F., Escribano-López, I., López-Domènech, S., . . . Víctor, V. (2019). Relationship between Oxidative Stress, ER Stress, and Inflammation in Type 2 Diabetes: The Battle Continues. *Journal of Clinical Medicine*, 8(9), 1385. doi:10.3390/jcm8091385
- Busuioc, A., Costea, G., Dediu Botezatu, A., Furdiu, B., & Dinica, R. (2023). Cucumis metuliferus L. Fruits Extract with Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Antidiabetic

Properties as Source of Ursolic Acid. *separations*, 10(5), 274.  
doi:<https://doi.org/10.3390/separations10050274>

Cano-Flores, A. (2013). Biotransformación de triterpenos con diferentes microorganismos. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 44(2), 7-16. Recuperado el 2025, de [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1870-01952013000200002](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-01952013000200002)

Cantrell, C., Franzblau, S., & Fischer, N. (2001). Antimycobacterial plant terpenoids. *Planta Medica*, 685-694. doi:10.1055/s-2001-18365

Cleveland Clinic. (2024). *Leukemia*. Recuperado el 2025, de <https://my.clevelandclinic.org/health/diseases/acute-monocytic-leukemia-amol>

CONABIO. (23 de Julio de 2009). *Malezas de México, Ficha-Prunella vulgaris L.* Recuperado el 2025, de <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/lamiaceae/prunella-vulgaris/fichas/ficha.htm>

Coronado H., M., Vega y León, S., Guitierrez T., R., Vázquez F., M., & Radilla V., C. (2015). Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana. *Revista chilena de nutrición*, 42(2), 206-212. doi:<http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182015000200014>

Cruz-Cansino, N., Cariño-Cortés, R., Neria-de la Cruz, R., Sandoval-Gallegos, E., Sumaya-Martínez, M., Ramírez-Moreno, E., & Fernández-Martínez, E. (2023). Ultrasound with controlled temperature as an emerging technology for extraction of antioxidant compounds from by-products of mango (*Mangifera indica* L. var Ataulfo) juice. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 35(2), 162-169. doi:[10.9755/ejfa.2023.v35.i2.3013](https://doi.org/10.9755/ejfa.2023.v35.i2.3013)

Darshani, P., Sen Sarma, S., Srivastava, A., Baishya, R., & Kumar, D. (Marzo de 2022). Antiviral triterpenes: a review. *Phytochemistry Reviews*, 21, 1761–1842.

Feng, L., Jia, X., Zhu, M.-M., Chen, Y., & Shi, F. (2010). Antioxidant Activities of Total Phenols of *Prunella vulgaris* L. in Vitro and in Tumor-bearing Mice. *Molecules*, 15(12), 9145-9156. doi:<https://doi.org/10.3390/molecules15129145>

INC. (s.f.). Recuperado el 2025, de INC. (s.f.). Recuperado el 2025, de <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/estres-oxidativo>

INEGI. (Noviembre de 2022). Recuperado el 2025, de ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL DE LA DIABETES [https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2022/EAP\\_DIABETES2022.docx](https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2022/EAP_DIABETES2022.docx)

INEGI. (30 de Enero de 2025). Recuperado el 2025, de Estadísticas a propósito del Día Mundial contra el Cáncer [https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2025/EAP\\_DMvsCancer25.pdf](https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2025/EAP_DMvsCancer25.pdf)

José David Mejía-Reyes, K. E.-C. (2021). Capacidad antioxidante: conceptos, métodos decuantificación y su aplicación en la caracterización de frutos tropicales y productos derivados. *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*, 9(1), 9-33.

Karageçili, H., & Gülcin, İ. (2025). The Lamiaceae Family Plants Ethnobotanical Properties, Ethnopharmacological Uses, Phytochemical Studies and Their Utilization in Public or Current Clinical Practices: A Review. *Records of Natural Products*, 466-487. doi:<http://doi.org/10.25135/rnp.529.2505.3521>

Kim, Y.-M., Jeong, Y.-K., Wang, M.-H., Lee, W.-Y., & Rhee, H.-I. (2005). Inhibitory effect of pine extract on -glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. *Elsevier Inc, Nutrition*, 21, 756 –761. doi:[10.1016/j.nut.2004.10.014](https://doi.org/10.1016/j.nut.2004.10.014)

Kwon, Y.-I., Vattem, D., & Shetty, K. (2006). Evaluation of clonal herbs of Lamiaceae species for management of diabetes and hypertension. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 15(1), 107-118.

Leibniz Institute. (2025). Recuperado el 2025, de REH:  
<https://www.dsmz.de/collection/catalogue/details/culture/ACC-22>

Leyto-Cruz, F. (2018). Leucemia mieloide aguda. *Revista de Hematología*, 24. Obtenido de  
<https://revistadehematologia.org.mx/article/leucemia-mieloide-aguda/>

Ludeña Huaman, M., Tupa Quispe, A., Huamán Quispe, R., Serrano Flores, C., & Robles Caycho, J. (2021). A simple method to obtain ursolic acid. *Results in Chemistry*, 1. doi:<https://doi.org/10.1016/j.rechem.2021.100144>.

Mancero Rodríguez, M. J., Arellano Salinas, K., Santo Cepeda, K., & Rodríguez Revelo, M. (2020). Leucemia linfoblástica aguda diagnostico. *Revista Científica Mundo de la Investigación y el Conocimiento*, 53-63. doi:[https://doi.org/10.26820/recimundo/4.\(2\).mayo.2020.53-63](https://doi.org/10.26820/recimundo/4.(2).mayo.2020.53-63)

Martínez-Gordillo, M., Bedolla-García, B., Cornejo-Tenorio, G., Fragoso-Martínez, I., García-Peña, M., González-Gallegos, J. G., . . . Zamudio, S. (2017). Lamiaceae de México. *Botanical Sciences*, 95(4), 780-806. doi:<https://doi.org/10.17129/botsci.1871>

National Institutes of Health (NIH). (s.f.). *PubChem (+)-Ursolic Acid*. Recuperado el 2025, de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ursolic-Acid>

OMS. (10 de Agosto de 2025). Obtenido de Traditional medicine has a long history of contributing to conventional medicine <https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/traditional-medicine-has-a-long-history-of-contributing-to-conventional-medicine-and-continues-to-hold-promise>

OMS. (2025). Recuperado el 2025, de Diabetes <https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/diabetes>

OMS. (2025). *Cáncer*. Obtenido de <https://www.who.int/es/news-room/factsheets/detail/cancer>

OMS. (2025). *Cáncer*. Recuperado el 2025, de [https://www.who.int/es/health-topics/cancer#tab=tab\\_1](https://www.who.int/es/health-topics/cancer#tab=tab_1)

Pan, J., Wang, H., & Chen, Y. (2022). *Prunella vulgaris L.* – Una revisión de su etnofarmacología, fitoquímica, control de calidad y efectos farmacológicos. *Frontiers in Pharmacology*. doi:<https://doi.org/10.3389/fphar.2022.903171>

Pauli, G., Chen, S.-N., Simmler, C., Lankin, D., Gödecke, T., Jaki, B., . . . Napolitano, J. (2014). Importance of Purity Evaluation and the Potential of Quantitative  $^1\text{H}$  NMR as a Purity Assay. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(22), 9220-9231. doi:[10.1021/jm500734a](https://doi.org/10.1021/jm500734a)

Pérez Escandón, B. E., Villavicencio Nieto, M. Á., & Ramírez Aguirre, A. (2003). *Lista de las plantas útiles del estado de Hidalgo*. Pachuca, Hidalgo, México: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Centro de Investigaciones Biológicas.

Promega Corporation. (Agosto de 2025). *CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay*. Recuperado el 2025, de [https://worldwide.promega.com/es-es/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/cytotox-96-non\\_radioactive-cytotoxicity-assay/?tabset0=1](https://worldwide.promega.com/es-es/products/cell-health-assays/cell-viability-and-cytotoxicity-assays/cytotox-96-non_radioactive-cytotoxicity-assay/?tabset0=1)

Psotová, J., Kolár, M., Sousek, J., Svagera, Z., Vicar, J., & Ulrichová, J. (2003). Actividades biológicas del extracto de *Prunella vulgaris*. *Phytotherapy Research*, 17(9), 1082-1087. doi:<https://doi.org/10.1002/ptr.1324>

Raafat, K., Wurglits, M., & Schubert-Zsilavecz, M. (Diciembre de 2016). *Prunella vulgaris L.* active components and their hypoglycemic and antinociceptive effects in alloxan-induced diabetic mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 1008-1018. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.09.095>

Ryu, S., Lee, C.-K., Lee, C., Kim, H. S., & Zee, O. (Septiembre de 1992). Antiviral triterpenes from *Prunella vulgaris*. *Archives of Pharmacal Research*, 15, 242-245. doi:<https://doi.org/10.1007/BF02974063>

Sárosi, S., & Bernáth, J. (2008). *Acta alimento*, 37(2), 293–300.

Sicker, D., Zeller, K.-K., Siehl, H.-U., & Berger, S. (2019). *Natural Products. Isolation, Structure Elucidation, History*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.

Tabba, H., Chang, R., & Smith, K. (1989). Isolation, purification, and partial characterization of prunellin, an anti-HIV component from aqueous extracts of *Prunella vulgaris*. *Antiviral Research*, 11(5-6), 263-274. doi:[https://doi.org/10.1016/0166-3542\(89\)90036-3](https://doi.org/10.1016/0166-3542(89)90036-3)

Wang, S., Wang, S., Dai, Y., Ma, M., Rahman, K., Nian, H., & Zhang, H. (2019). *Prunella vulgaris: A Comprehensive Review of Chemical Constituents, Pharmacological Effects and Clinical Applications*. *Current Pharmaceutical Design*, 25(3), 359–369. doi:10.2174/1381612825666190313121608.

Wasaporn Chanput, V. P. (2015). *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models*. Springer.

Zhang, G., He, L., & Hu, M. (2011). Optimized ultrasonic-assisted extraction of flavonoids from *Prunella vulgaris* L. and evaluation of antioxidant activities in vitro. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 12(1), 18-25. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2010.12.003>

Zhang, J., Onakpoya, I. J., Posadzki, P., & Eddouks, M. (2015). The safety of herbal medicine: from prejudice to evidence. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*. doi:<https://doi.org/10.1155/2015/316706>

Zholdasbayev, M., Atazhanova, G., Musozoda, S., & Musozoda, E. (2023). *Prunella vulgaris* L.: An Updated Overview of Botany, Chemical Composition, Extraction Methods, and Biological Activities. *Pharmaceuticals*, 16(8), 1106. doi:<https://doi.org/10.3390/ph16081106>