



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

ESTUDIO QUÍMICO Y EVALUACIÓN ANTIMICROBIANA DE *Salvia rupicola*.

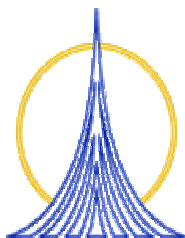
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ESTELA PATLANI SANTIAGO

DIRECTOR DR. CARLOS L. A. CÉSPEDES ACUÑA





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A mi Padre:

*Por haberme apoyado incondicionalmente durante todos mis estudios
y por guiarme con sus consejos sabios para ser grande como ser humano.*

A mi Madre:

*Por haber estado siempre en los momentos difíciles, por brindarme su fortaleza y
enseñarme que la paciencia es la mejor arma para conseguir lo que se anhela.*

A mi hermano José:

*Por darme el ejemplo de no caer ante situaciones difíciles y enseñarme que no
todas las cosas se toman en serio, que existe otra alternativa.*

A la memoria de mi hermano Juan Carlos.

A mi hermana Mari:

*Por darme el ejemplo maravilloso de bondad y saber que siempre
cuento con su apoyo.*

A mi hermana Ana:

*Por estar siempre conmigo, apoyarme, guiarme y ser el ejemplo de superación.
Por que tú y yo sabemos que esto es parte de culminación de los grandes
esfuerzos de mis padres y con esto se cumple una meta de nuestra vida.*

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme todo, para llegar hasta este momento de mi vida y ser siempre la fuerza que le da sentido a mi vida.

Al Dr. Carlos L.A. Céspedes, por su apoyo incondicional, para la realización de este trabajo y por brindarme su amistad y confianza.

A mis compañeros de laboratorio (Mariana, Camilo y Rodrigo), por haberme aceptado e integrado como su compañera y por haber compartido conmigo su sabiduría y amistad.

Al los profesores del laboratorio de Fittoquímica de la UBIPRO de FES Iztacala, por su enseñanza, apoyo y asesoría, en la determinación de las pruebas biológicas y en especial a la Dra. Margarita y Dra. Desasne por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

Al Dr. Baldomero por su tiempo, ayuda e interés dado al trabajo.

Al Instituto de Química por abrirme las puertas a la investigación y brindarme las facilidades para la realización de este trabajo, con su personal y equipo.

A mis profesores de la FES Zaragoza, por todos sus conocimientos compartidos para ser parte de mi formación académica profesional.

A mis amigos sinceros de la FES Zaragoza, por confiar en mí y compartir momentos maravillosos de mi vida.

A DGAPA por el apoyo económico de la beca otorgada para la realización de esta tesis.

A todas las personas que de alguna u otra forma participaron en el desarrollo de este trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN	I
ÍNDICE	II
ÍNDICE DE ESPECTROS	IV
LISTA DE ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA	V
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1. Generalidades del género Salvia	3
2.1.1 Aspectos botánicos	3
2.1.2 Aspectos etnobotánicos	6
2.1.3 Aspectos químicos.	8
2.1.4 Aspectos farmacológicos	26
2.2. Triterpenos	28
2.3. Métodos para la determinación antimicrobiana	32
2.3.1. Método de difusión	33
2.3.2. Método de dilución	33
2.3.3. Métodos bioautográficos	34
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	36
4. OBJETIVOS	37
4.1. Objetivo general	37
4.2. Objetivos particulares	37
5. HIPÓTESIS	38
6. DISEÑO DE EXPERIMENTACIÓN	39
7. METODOLOGÍA	40
7.1. Materiales	40
7.1.1. Material vegetal	40
7.1.2. Reactivos y disolventes	41
7.1.3. Equipo	41
7.2. Estudio químico	42
7.2.1. Preparación de extractos crudos	42
7.2.2. Fraccionamiento, aislamiento y purificación de compuestos puros	43

7.3. Actividad antimicrobiana	48
7.3.1. Determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos y compuestos puros, mediante el método de difusión (Kirby-Bauer)	48
7.3.2. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	50
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
8.1. Estudio químico	51
8.1.1. Determinación estructural del β -sitosterol	51
8.1.2. Determinación estructural del Ácido oleanólico	51
8.1.3. Determinación estructural del 3 β ,20,28-trihidroxilupano	54
8.2. Actividad antimicrobiana	56
8.2.1. Determinación de actividad antimicrobiana de extractos	56
8.2.2. Determinación antibacteriana de los compuestos puros	57
8.2.3. Determinación antibacteriana de las fracciones TD-9	59
8.2.4. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del 3 β ,20,28-trihidroxilupano	61
9. CONCLUSIONES	64
10. REFERENCIAS	65
11. ANEXO (ESPECTROS)	73

ÍNDICE DE ESPECTROS

Espectro No. 1	Espectro de IR del ácido oleanólico	74
Espectro No. 2	Espectro de RMN ¹ H del ácido oleanólico	75
Espectro No. 3	Espectro de RMN ¹³ C del ácido oleanólico	76
Espectro No. 4	Espectro de IR de 3β,20,28-trihidroxilupano	77
Espectro No. 5	Espectro de Masas (IE) 3β,20,28-trihidroxilupano	78
Espectro No. 6	Espectro de RMN ¹ H de 3β,20,28-trihidroxilupano	79
Espectro No. 7	Espectro de RMN ¹³ C de 3β,20,28-trihidroxilupano	80

LISTA DE ABREVIATURAS

AcOEt	acetato de etilo
CCA	cromatografía en columna abierta
CCF	cromatografía en capa fina
CDCl ₃	cloroformo deuterado
CMI	concentración mínima inhibitoria
CP	cromatografía en papel
CH ₂ Cl ₂	diclorometano
DMSO	dimetilsulfóxido
FPP	pirofosfato de farnesilo
G ⁺	gram positiva
G ⁻	gram negativa
IR	infrarrojo
IE	impacto electrónico
Me ₂ CO	acetona
MeOH	metanol
MR	multiresistente
RMN ¹³ C	resonancia magnética nuclear de carbono
RMN ¹ H	resonancia magnética nuclear de hidrógeno

SIMBOLOGÍA

μL	microlitro
°C	grados centígrados
cm	centímetros
cm ⁻¹	centímetro a la menos uno
g	gramos
Kg	kilogramo
m.o	microorganismo
m/z	relación masa/carga
MHz	megahertz
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
n-Hex	hexano
OH	grupo hidroxilo
pf	punto de fusión
ppm	partes por millón

RESUMEN

Diversas plantas del género *Salvia* han sido estudiadas desde el punto de vista químico; sin embargo son pocos los estudios biológicos que se le han realizado y sólo en algunos casos se conocen los compuestos que presentan actividad antimicrobiana.

En el presente trabajo se realizó un estudio químico de *Salvia rupicola*, que permitió aislar e identificar compuestos con actividad antimicrobiana.

Los extractos de: 1)CH₂Cl₂ de tallos; 2)CH₂Cl₂ de hojas; 3)MeOH de tallos; 4)MeOH de hojas y, 5)MeOH de flores no mostraron actividad antimicrobiana (antibacteriana y antifúngica), al ser evaluados por el método de difusión en agar de Kirby-Bauer. Sin embargo se sabe que algunos diterpenos aislados de extractos no polares, han presentado actividad antimicrobiana, por lo que fueron fraccionados los cuatro primeros extractos y posteriormente separados los compuestos mayoritarios. Del extracto CH₂Cl₂ de tallos, se aislaron y caracterizaron tres compuestos ya informados y conocidos como β-sitosterol, ácido oleanólico y el 3β,20,28-trihidroxilupano; que fue aislado también del extracto CH₂Cl₂ de las hojas.

A los tres compuestos aislados se les determinó la actividad antibacteriana frente a bacterias G⁺ y G⁻ a 1000 ppm, y se obtuvo que el 3β,20,28-trihidroxilupano mostró actividad significativa y específica frente a *Vibrio cholerae* (G⁻), por lo que se realizó una prueba adicional de las fracciones cercanas al compuesto sobre cuatro cepas diferentes de *Vibrio cholerae*.

Al compuesto activo se le determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), la cual fue de 62.5 ppm, utilizando la microtécnica de dilución en caldo.

1. INTRODUCCION

El empleo de las plantas con fines curativos es una práctica que se ha utilizado desde tiempos inmemoriales. Durante mucho tiempo los remedios naturales y sobre todo las plantas medicinales, fueron el principal e incluso el único recurso de que disponían los médicos. Muchas de las especies vegetales utilizadas por sus virtudes curativas entre los antiguos egipcios, griegos y romanos pasaron a formar parte de la terapia medieval, que más tarde se vio enriquecida por los aportes del Nuevo Mundo. Dichas plantas medicinales y los remedios que entonces se utilizaban se siguen usando hoy en día.

Se estima que, mundialmente más de la mitad de la población hace uso de remedios tradicionales para la atención de algún problema de salud (Lara y Márquez, 1996). Esta tendencia es mayor en los países subdesarrollados; sin embargo, en forma extraordinaria, actualmente en los países industrializados cada vez se están empleando más las plantas medicinales, quizás como consecuencia de la alta incidencia de problemas iatrogénicos ocasionados por medicamentos sintéticos, que como se sabe suelen producir múltiples efectos indeseables. En la última década, en estos países industrializados, el 25 % de los medicamentos prescritos fueron derivados de plantas superiores (Hamburger y Host, 1991).

Actualmente, en México la medicina tradicional es una práctica muy común y las plantas medicinales representan la herramienta terapéutica más importante para la atención de diversas enfermedades. Eso hace necesario estudiar estas plantas desde un punto de vista científico para validar su uso y para tratar de establecer las relaciones entre la estructura química de sus componentes con la actividad biológica y terapéutica de las plantas (Dimayuga y Keer-García, 1991).

Históricamente, muchas de las sustancias bioactivas han sido productos naturales, y la prueba está en que los productos naturales continúan ofreciendo un ilimitado suministro de fármacos útiles en el tratamiento de diversas enfermedades, entre las que se incluyen las infecciosas. Se estima que hay más de 250,000 especies de plantas superiores en nuestro planeta y que únicamente del 5-15% han sido investigadas por su valor terapéutico por lo que la gran mayoría permanece aún sin investigar (Cutler y Cutler, 2000). Hasta ahora sólo un pequeño número de constituyentes químicos aislados de plantas han sido explorados por sus efectos biológicos (Fabricant y Farnsworth, 2001).

La investigación de plantas medicinales puede realizarse de forma fitoquímica convencional o en forma biodirigida. La primera implica el aislamiento del mayor número de compuestos y luego evaluar su actividad biológica, sin embargo, los compuestos obtenidos de este modo pueden o no actividad de la planta o extracto crudo, de tal forma que esta actividad contribuye al estudio de las plantas medicinales, aunque no siempre se cumple con el objetivo de aislar compuestos con actividad biológica.

El presente proyecto tiene como finalidad realizar el estudio químico y determinar la actividad antimicrobiana de los extractos crudos y compuestos mayoritarios de *Salvia rupícola*, frente a diferentes microorganismos, donde destacan bacterias patógenas y hongos fitopatógenos.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. GENERALIDADES DEL GÉNERO *Salvia*.

2.1.1. Aspectos Botánicos

Las plantas del género *Salvia*, pertenecen a la familia Lamiaceae (Labiatae), constituida a nivel mundial por 224 géneros y 4000 especies (Rzedowski, 1985). En México esta familia se conforma de 27 géneros y alrededor de 512 especies, de las cuales; el género *Salvia* es el más abundante y diversificado en el país, teniendo alrededor de 312 especies, de las cuales el 88% son endémicas. (Esquivel *et al.*, 1995)

Este género, se encuentra ampliamente distribuída a nivel mundial en una gran variedad de climas, terrenos y altitudes, especialmente abundantes en la región mediterránea y hacia el este en Asia Central. En el continente americano es posible encontrar una gran variedad de especies del género *Salvia* en áreas secundarias de concentración en el Norte de los Andes y tierras brasileñas; sin embargo, la mayor diversidad de este género se localiza en México, desde la Sierra Madre Occidental pasando por la altiplanicie Mexicana.

Mundialmente, el género *Salvia* es muy extenso, con aproximadamente 900 especies; por lo que en 1836 Bentham las organizó dentro de 4 subgéneros: *Salvia*, *Sclarea*, *Leonia* y *Calosphace*. El subgénero *Calosphace* al ser uno de los más grandes con alrededor de 550 especies, fueron divididas por sus características morfológicas (Epling, 1939) en 105 secciones, entre las que se encuentran la sección *Scorodonia*,

constituida por 12 especies (García, 1987), cuya distribución en México se observa en la figura 1.

Figura 1. Estados de la República Mexicana donde se localizan especies del género *Salvia*, sección *Scorodonia*.



A. *S. aequedistans*

B. *S. breviflora*

K. *S. keertlii*

M. *S. melissodora*

O. *S. occidua*

Pa. *S. pannosa*

P. *S. paupercula*

Ra. *S. ramosa*

Re. *S. reducta*

R. *S. rupicola*

T. *S. tepicensis*

V. *S. variana*

Las plantas de esta sección, aún no han sido estudiadas en su totalidad, por lo que resulta interesante conocer el tipo de compuestos relacionados entre las distintas especies, y además contribuye al conocimiento de este género.

Salvia rupícola (subgénero *Calosphace*, sección *Scorodonia*), es una planta aromática, anual o perenne, crece en forma arbustiva y/o herbáceas (Figura 2), es dicotiledónea, gamopétala¹, del orden de la tubiflorales² y filo de las contortales-tubiflorales. El tallo es cuadrangular, las hojas son simples opuestas y decusadas³, sin estípulas⁴ principalmente pecioladas⁵, las flores en cimas bíparas⁶ a menudo contraídas en verticilastos⁷, cáliz, gamosépalo⁸, corola labiada, estambres didínamos⁹. Los tallos y hojas han sido caracterizados por la presencia de pelos globulares conteniendo aceites volátiles característicos (a menudo terpenoides) que emiten fragancias aromáticas (Trease-Evans, 1991).



Figura 2. *Salvia rupicola*.

- ¹ gamopétalas. Corola de pétalos que pudiendo hallarse separados, están unidos y soldados en una pieza
² tubiflorales. Corola tubular y flores tetracíclicas
³ decusadas. Hojas opuestas y colocadas de manera que forman cruz con las de los nudos inferior y superior
⁴ estípulas. Cada uno de los apéndices laminares, que más de 2 forman la base foliar (hojas)
⁵ pecioladas. Hoja provista de peciolo (pezón o rabillio que une la lámina de la hoja a la base foliar o al tallo)
⁶ cima bípara. Ramificaciones, inflorescencias, cuyas ramas nacen acopladas
⁷ verticilastos. Conjunto de flores de algunas labiadas que por tratarse de cimas muy contraídas y enfrentadas, parecen constituir un verticilo
⁸. gamosépalo. De sépalos concrecentes, soldados entre sí
⁹ didínamos. Se alude a los estambres, de los cuales hay 2 que tienen más empuje y alcanzan mayor longitud.

2.1.2. Aspectos Etnobotánicos

Muchas especies de este género, han despertado un gran interés por la frecuencia en que son utilizadas en la medicina tradicional alrededor del mundo. Las raíces de varias especies del género, son usadas comunmente, por poseer una gran variedad de remedios.

De manera general, los miembros de esta familia son utilizados como medios culinarios, medicinales, ornamentales, antirepelentes y como fuentes de esencias.

En la Medicina tradicional China, *Salvia miltiorrhiza* es usada en hemorragias, desordenes menstruales, abortos e hinchazones (Gisho, 1988). Mientras que en Jordania, *Salvia syriaca* se utiliza para los tónicos, espasmos y en casos de gonorrea. (Mahasneh y El-Oqlah, 1999). *S. lavandulifolia* es utilizada en el tratamiento de complicaciones gastrointestinales (bloqueo epigástrico, impedimento digestivo, flatulencias, irritaciones intestinales, entre otras).

Tres especies: *S. officinalis*, *S. lavandulaefolia* y *S. sclarea*, se utilizan para el lavado bucal e higiene oral. Además, *S. sclarea* y *S. lavandulaefolia* se utilizan para el lavado de heridas leves y como hemostático, antipirético, citotóxico, antidisentérico, contra la alopecia, tos, tosferina y para afecciones de la vesícula (Márquez *et al.*, 1999).

En Alemania las hojas de *Salvia officinalis* se utilizan oralmente para problemas gastrointestinales y para la sudoración excesiva. Tópicamente es colocada en las membranas mucosas de boca y garganta para

disminuir la inflamación (Brunetton, 1999). Es así, que a esta, se le ha acreditado una gran lista de usos medicinales: espasmolítica, antiséptica, astringente. (Tepe *et al.*, 2003)

En México, algunos miembros de este género, han sido utilizados con fines ornamentales, para la preparación de bebidas refrescantes (agua de chía) como son las semillas de *Salvia hispánica* y *S. tiliaefolia*, (Esquivel, 1998). Algunas tienen un uso muy difundido en la medicina tradicional, como es el caso de *S. microphylla*, *S. elegans*, y *S. fulgens* "mirto rojo", que es usado por grupos étnicos para la digestión de los alimentos, cólicos y diarrea (Benítez, 1986) y se le ha atribuido propiedades antisépticas y antihelmínticas. También se sabe que *Salvia divinorum* tiene propiedades alucinógenas y es usada por indígenas mazatecos de Oaxaca en sus ritos de divinación (Hofmann, 2003).

Salvia ruícola fue colectada cerca del Km 23 a orillas de la carretera federal entre Pachuca e Ixmiquilpan en el Estado de Hidalgo y no existen datos en la literatura sobre algún estudio científico ó actividad biológica realizada a esta especie, aunque en las regiones donde crece, es utilizada por los pobladores de la región para evitar infección de las heridas.

2.1.3. Aspectos Químicos

La mayoría de las especies del género *Salvia* han sido estudiadas desde el punto de vista fitoquímico, y se han encontrado un gran número de productos, con los que han podido establecer un perfil químico interesante de este género.

De las partes aéreas de estas plantas se han encontrado esteroides, flavonoides, triterpenos y compuestos fenólicos. Así también se han aislado un gran número de diterpenos de los grupos labdano, clerodano, abietano y pimarano que son utilizados como marcadores taxonómicos a diferentes niveles. (Esquivel *et al.*, 1996)

La composición química de los aceites esenciales de algunas *Salvias* estudiadas, están constituidos por compuestos fenólicos y monoterpénicos como el α -pireno, eucaliptol, alcanfor, camfeno, borneol, entre otros. (Tepe *et al.*, 2003)

De las flores rojas y azules de *Salvia* se han encontrado en abundancia las antocianinas maloniladas, aunque aún no ha sido demostrado la presencia de protoantocianidinas (taninos condensados). Las raíces y partes aéreas han resultado ser una rica fuente de polifenoles polares, flavonoides y ácidos fenólicos. (Lu y Yeap, 2002)

En la tabla 1 se indican los compuestos químicos aislados de distintas especies de *Salvia*, y posteriormente se muestran las estructuras de algunos de ellos, clasificados en grupos de: monoterpenos, diterpenos, triterpenos, esteroides y flavonoides.

Tabla 1. Constituyentes químicos de algunas especies de *Salvia*.

ESPECIE	PARTES ESTUDIADAS	TIPOS DE COMPUESTOS	REFERENCIA
<i>S. albocaerulea</i> (México)	P. aéreas (metanol)	sugiol (6) 15-hidroxi-7-oxo-abieta-8,11,13-trieno	Rojas <i>et al.</i> , 1992
<i>S. aethiopsis</i> (España)	Raíces (acetona)	aetiopinona (37) derivados semisintéticos de aetiopinona (38a y 38b)	Hernández <i>et al.</i> , 1995
<i>S. amplexicaulis</i>	Raíces (acetona)	sugiol (6) ferruginol (7) 7-oxoabieta-9,12,14-trieno (12) horminona (32) 7-acetilhorminona (33) ácido oleanólico (120) ácido ursólico (121) β -sitosterol (134) estigma-4-en-3-ona (136) estigmasterol (137) ácido acetiloleanólico α -amirina salvigenina	Kolak <i>et al.</i> , 2001
<i>S. aspera</i> (México)	Raíces (acetona)	6-epi-dimetilesquirolina D Sugiol (6) taxodiona (26) dimetilsalvicanol (40) salviasperanol (41) 5,6-dihidro-6 α -hidroxisalviasperanol (42)	Esquivel <i>et al.</i> , 1995
<i>S. ballotaeflora</i> (México)	P. aéreas (acetona)	conacitona (35) anastomosina	Esquivel <i>et al.</i> , 1996
<i>S. bicolor</i> (España)	Raíces (acetona)	20(S),24(R)-epoxi-dammar-12,25-diol-3-ona (124) 12-metoxi-11,7-dihidroxi-dehidroabietano (11)	Valverde <i>et al.</i> , 1985
<i>S. blepharochlaena</i>	Raíces	ferruginol (7) ácido metil ester O-metilpisiferico (20) horminona (32) 7-acetil-horminona (33) blefain ácido pisiferico ácido O-metilpisiferico multicaolin multioroquinona dimetilmultioroquinona	Ulubelen <i>et al.</i> , 2001
<i>S. breviflora</i> (México)	P. aéreas (AcOEt)	brevifloralactona (86) acetato de brevifloralactona (101) 3,4-13,14-tetrahidrobrevifloralactona (102) ácido oleanólico (120) ácido ursólico (121)	Cuevas <i>et al.</i> , 1987
<i>S. caespitosa</i>	Raíces	ferruginol (7) ácido β -hidroxiisopimarico (46) ácido sandracopimarico (47) ácido isopimarico (51) isopimaradienal	Ulubelen <i>et al.</i> , 2001a
<i>S. canariensis</i>	Flores	ácido dimetoxi-abieta-6,8,11,13-tetraen-20-oico	González <i>et al.</i> , 1989

(España)	(acetona) Raíces P. aéreas (acetona)	ácido 11-acetoxicarnosoico (22) ácido 6-oxo-7 β -hidroxycarnosoico ácido 6-oxo-7 α -hidroxycarnosoico rosmaquinona (29) canariquinona 7-etoxirosmanol 7-metoxirosmanol rosmanol arucatriol salvicanol galdosol 12-metil ester -deoxocarnosol 6 α -hidroxidimetilcriptojaponol	
<i>S. cardiophylla</i> (Paraguay)	P. aéreas (acetona)	salviol (9) cardiofilidina (104) ácido oleanólico (120) ácido ursólico (121) 2 α -hidroxisugiol 5-hidroxi-6,7,3',4'-tetrametoxiflavona 5,7-hidroxi-6,3',4'-trimetoxiflavona β -amirina	González <i>et al.</i> , 1988
<i>S. ceratophylla</i> (Turquía)		ferruginol (7) candidisiol (36) aetiopinona (37) 6 β -hidroxi-8,15-primaradien-1-ona ácido 3-oxo-8,11,13-abietatrien-20 oico salvipisona	Ulubelen, 2003
<i>S. coccinea</i> (México)	P. aéreas (acetona)	salviacoccinea (92) 15,16-epoxi-10-hidroxi-neo-cleroda-2,7,13(16),14-tetraen-17,12R:18,19-diolido (linearolactona) (97)	Savona <i>et al.</i> , 1982
<i>S. deserta</i> (España)	P. aéreas (acetona)	ácido oleanólico (120) ácido ursólico (121) 1 β ,11 α -dihidroxiolean-18-en-3-ona (125) lup-20(29)-ene-1 β ,3 β -diol (126) 1 β ,11 α -dihroxilup-20(29)-en-3-ona (127) 11 α ,20-dihroxilupan-3-ona (128) 1 β ,11 α -20-trihroxilupan-3-ona (129) ácido 2 α ,3 β -dihidroxiolean-12-en-28-oico	Savona <i>et al.</i> , 1987
<i>S. divinorum</i> (México)	Hojas (cloroformo)	salvinorina (65) divinorina A (66a) divinorina B (66b)	Ortega <i>et al.</i> , 1982 Valdes III <i>et al.</i> , 1984
<i>S. farinacea</i> (México)	P. aéreas (acetona)	salviforina (103)	Savona <i>et al.</i> , 1983
<i>S. fulgens</i> (México)	P. aéreas (acetona)	salvifaricina (106) salvigenolida (110) ácido sandaracopimarico (47) β -sitosterol (134)	Esquivel <i>et al.</i> , 1985 Esquivel <i>et al.</i> , 1987
<i>S. gesneraeflora</i> (México)		salviacoccinea (92)	Rodríguez-Hahn <i>et al.</i> , 1995
<i>S. hypargeia</i>	Raíces	hipargenina A (15) hipargenina B (16) hipargenina C (17) hipargenina D (18) hipargenina E (19) hipargenina F (23)	Ulubelen, 1988
<i>S. karwinskii</i> (México)		1(10)-dehidrosalviarina (90)	Esquivel <i>et al.</i> , 1996
<i>S. Kerlii</i> (México)	P. aéreas (acetona)	ácido kerlinico (62) 7-acetoxi-12(R)-hidroxi-neoclerodano,3,13(14)-diene-	García, 1987 Esquivel <i>et al.</i> , 1985

		18,19:15,16-diolido kerlinolida (71) 8,12(R)-epoxineo-cleroda-3,13(14)-dieno-18,19:15,16- diolido Kerlina (84)	
<i>S. languidula</i> (México)	P. aéreas (acetona)	salvilanguidulina A (112) salvilanguidulina B (113) Salvilanguidulina C (114) Salvilanguidulina D (115) languidulina (116)	Cardenas <i>et al.</i> , 1988 Cardenas <i>et al.</i> , 1992
<i>S. lanigera</i> (Egipto)	Raíces Arabia S. (Petroleo)	[10,12-dihidroxi-9(10 → 20)-abeo-8,11,13- abietatrieno] (lanigerol) (10) ácido 12-metoxicarnosoico (21) ácido oleanólico (120) ácido ursólico (121) 13β→28 lactona-3β-hidroxioleanano	Hassan <i>et al.</i> , 1987 Abdalla <i>et al.</i> , 1995
<i>S. lavandulaefolia</i> (España)	Raíces (acetona) P. aéreas	7α-etoxiroyleanona (56) 7α-etoxi-12-O-metil-royleanona (57) 7α-acetoxiroyleanona (58) royleanona (59) ácido ursólico (121) inuroyleanol aldehido-O-acetiloleanolico galdosol 6,7-dehidroroyleanona	Michavila <i>et al.</i> , 1985
<i>S. lavanduloides</i> (México)	P. aéreas (acetona y metanol)	salviandulina A (107) salviandulina B (108) salviandulina C (109)	Ortega <i>et al.</i> , 1991 Maldonado <i>et al.</i> , 1992
<i>S. lasiantha</i> (México)	P. aéreas (acetona)	lasiantina (64) ácido oleanólico (120) β-sitosterol (134)	Sánchez <i>et al.</i> , 1987
<i>S. lineata</i> (México)	P. aéreas (acetona)	linearifolina (67) linearolactona (97) β-sitosterol (134) ácido oleanólico (120) 6,7-dimetoxi-5,3,4-trihidroxi-flavona (cirsiliol) (140) 5,4-dihidro-6,7-dimetoxiflavona (6-metoxigenkwanina)	Esquivel <i>et al.</i> , 1986 a
<i>S. madrensis</i> (México)	P. aéreas (acetona)	salvimadrensin (93) salvimadrensinona (94) salvimadrensinol (96)	Rodriguez Hahn <i>et al.</i> 1994
<i>S. melissodora</i> (México)	P. aéreas (acetona y AcOEt)	maitenoquinona (43) dilactona (69) portulida C (70) 7α-acetoxi-2β-hidroxi-ent-clerodan-3,13-dien- 18,19:16,15-diolido (73) 7β-hidroxi-ent-clerodan-3,13-die-18,19:16,15-diolido (74) 7α-hidroxi-ent-clerodan-3,13-dien-18,19:16,15- diolido(75) 7α-acetoxi-ent-clerodan-3,13-dien-18,19:16,15- diolido(76) 2β-7α-dihidroxi-ent-clerodan-3,13-dien-18,19:16,15- diolido (77) 2β-acetoxi-7α-hidroxi-ent-clerodan-3,13-dien-	Esquivel <i>et al.</i> , 1988 a

		18,19:16,15-diolido (78) 7-ceto-ent-clerodan-3,13-dien-18,19:16,15-diolido (79) 2 β -acetoxi-ent-clerodan-3,13-dien-18,19:16,15-diolido (80) 7 β -18,19-trihidroxi-ent-clerodan-3,13-dien-18,19:16,15-diolido (82) 2 β -acetoxi-7-ceto-ent-clerodan-3,13-dien-18,19:16,15-diolido (81) brevifloralactona (86) ácido oleanólico (120) ácido ursólico (121) β -sitosterol (134) ácido melisodorico	
<i>S. microphylla</i> (México)	P. aéreas (acetona)	ácido sandaracopimarico (47) ácido 7 α -hidroxisandaracopimarico (48) 14 α -hidroxisopimarico (49) 8(14),15-sandaracopimaradien-7 α ,18-diol ácido 7 α -acetoxiisopimara-8(14),15-diene-18-oico(50) ácido ursolico (121) β -sitosterol (134)	Esquivel <i>et al.</i> , 1987
<i>S. miltiorrhiza</i> (China)	Raíces (etanol)	salviolona (28) norvasalvioxida miltipolona (39) dihidotanshinona (52) cryptotanshinona (53) tanshinona I (54) tanshinona II (55)	Gisho <i>et al.</i> , 1988 Ulubelen y Topcu, 1992
<i>S. multicaulis</i> (Turquía)	Raíces (acetona)	3-oxo-12-metoxi-14—hidroxiabieta-8,11,13-trieno (13) 6-oxo-12-peroxiabieta-8,11,13-trieno (14) 7-acetilhorminona (33) β -sitosterol (134) estigmast-4-en-3-ona (136) brassicasterona (138) lupeon 3 α -acetilamirina 3 α -acetil-eritrodol hopanona ferruginol ferruginol-18-al 6-oxoferruginol criptanol widelactona	Ulubelen <i>et al.</i> , 1998 Tepe <i>et al.</i> , 2004.
<i>S. nicolsoniana</i> (México)	P. aéreas (acetona)	ácido oleanólico (120) ácido ursolico (121) ácido 3 α ,24-dihidroxi-olean-12-en-28-oico (122) ácido 3 α ,24-dihidroxi-olean-12-en-28-dioico (123) ácido betulínico ácido 3 <i>epi</i> -ursolico β -sitosterol (134) 3 β -glucosido de sitosterol	Pereda-Miranda, 1986
<i>S. officinalis</i>	Hojas (diclorometano)	rel-(5S,6S,7S,10R,12R,13R)-7-hidroxiapiana-8,14-dien-11,18-dion-(22,6)-olido rel-(5S,6S,7R,10R,12S,13R)-7-hidroxiapiana-8,14-dien-11,16-dion-(22,6)-olido rel-(5S,6S,7S,10R,12R,13S)-7-hidroxiapiana-8,14-dien-11,16-dion-(22,6)-olido salvigenina lupeol	Miura <i>et al.</i> , 2001

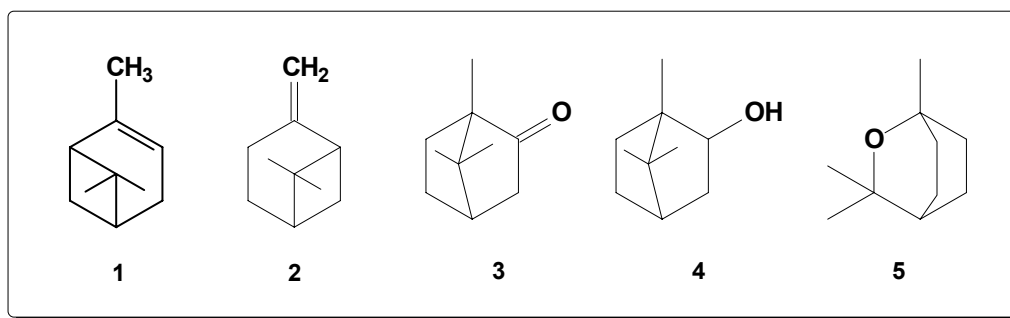
		<p> carnosol rosmadial rosmanol epirosmanol isorosmanol columbaridiona miltirona ácido carnosico ácido 12-O-metilcarnosico β-sitosterol (134) estigmasterol (135) </p>	
<i>S. oaxacana</i> (México)		<p> sugiol (6) taxodiona (26) taxodona (27) </p>	Esquivel <i>et al.</i> , 1996
<i>S. palaestina</i>	Hojas (Benceno)	<p> ácido vergatico ácido ursólico (121) ácido crataególico lupano-3β,-11α,20-triol 3β-glucosidositosterol cirsimaritina (139) esclareol </p>	Ulubelen <i>et al.</i> , 1985 Ulubelen y Topcu, 1992
<i>S. plebeia</i> (Pakistan)	P. aéreas (acetona)	<p> salviacoccinea (92) 15,16-diepoxi-10β-hidroxi-neo-cleroda-7,13(16),14- trieno (epoxisalviacoccinea) (95) </p>	García, <i>et al.</i> , 1986
<i>S. przewalskii</i> (Japón)	Raíces (Etanol)	<p> ácido oleanólico (120) ácido przewanoico A (130) ácido przewanoico B (131) </p>	Ning <i>et al.</i> , 1988
<i>S. puberula</i> (México)	P. aéreas (acetona)	<p> puberulina (119) Isopuberulina benzonorcadieno benzocicloheptatrieno </p>	Rodríguez <i>et al.</i> , 1988 Rodríguez-Hahn <i>et al.</i> , 1988
<i>S. pubescens</i> (México)	P. aéreas (acetona)	<p> nemorona (30) desacetilnemorona (31) conacitona (35) 3β-hidroxi-dimetilcriptojaponal (44) 19[4\rightarrow3] abeo-O-demetilcriptojaponal (45) 7α-acetoxiroyleanona (58) ácido oleanólico (120) </p>	Galicia <i>et al.</i> , 1988
<i>S. ramosa</i> (México)	P. aéreas (acetona)	<p> jaceosidina cirsiliol (140) cirsineol salviarina (87) 1(10)-dehidrosalviarina (90) 6β,10β-hidroxisalviarina (91) </p>	Rodríguez-Hahn <i>et al.</i> , 1995
<i>S. reptans</i> (México)	P. aéreas (acetona)	<p> 1α,2α-epoxi-3,4α-dihidrolinearolactona (85) salvireptanolida (111) diosmetina β-sitosterol (134) ácido oleanólico (120) ácido ursólico (121) </p>	Esquivel <i>et al.</i> , 1991
<i>S. rhyacophila</i> (México)	P. aéreas (acetona)	<p> dehidrokerlina (72) salviarina (87) 6β-hidroxi-7,8-dihidrobachatricoetina (89) 6β-hidroxi-salviarina (91) riacofilina (105) </p>	Fernández <i>et al.</i> , 1991

<i>S. rubescens</i> (Venezuela)		1-10-dehidrosalviarina	Rodriguez-Hahn <i>et al.</i> , 1995
<i>S. semiatrata</i> (México)	P.aéreas (acetona)	semiatrina (68)	Esquivel <i>et al.</i> , 1986
<i>S. sousae</i> (México)	P. aéreas (acetona)	dilactona (69) 1,2-dihidro-6 α ,7 α -epoxilinearifolina (85) 2 α -hidroxi-7-epi-8 β ,17-dihidrolanguidulina (117) ácido oleanólico (120) cirsiliol (140) eupatorina (142)	Esquivel <i>et al.</i> , 1988
<i>S. splendens</i> (Brasil)	Hojas y Flores (acetona)	esplendina (88) salviarina (87) ácido ursólico (121)	Savona <i>et al.</i> , 1979
<i>S. syriaca</i> (Turquía)		ferruginol (7) ácido ursólico (121) ácido oleanólico (120) β -sitosterol (134) 3 β -hidroxiestigmast-5-en-7-ona (135) salvigenina 4-dehidrosalvilimbinal viridona candidisiol salvisirianona	Ulubelen, 2003
<i>S. tenoriana</i> (México)	P.aéreas (acetona)	3 β -20,28-trihidroxilupano (132) ácido 3 β ,20 dihidroxilupanoico (133) ácido oleanólico (120) pilloina (141) eupatorina (142)	Rodriguez, 1996
<i>S. tiliaefolia</i> (México)	Raíces y P. aéreas (acetona)	ferruginol (7) tilifolidiona (82) salvifolina (83) isosalvipuberulina (98) tilifodiólido (100)	Javier <i>et al.</i> , 1994 Rodriguez Hahn <i>et al.</i> , 1990
<i>S. tomentosa</i> (Turquía)	P. aéreas (Hexano y Diclorometano)	α -pineno (1) β -pineno (2) alcanfor (3) borneol (4) 1-8-cineol (eucaliptol) (5)	Tepe <i>et al.</i> , 2003
<i>S. urolepis</i> (México)	P.aéreas (acetona)	2 α -hidroxi-7-epi-8 β ,17-dihidrolanguidulano (salvisousólido) (118) Ácido oleanólico (120) Ácido ursólico (121) β -sitosterol (134) eupatorina (142) (6,7,4,trimetoxi-5,5-dihidroxi)flavona 5,6,3-trihidroxi-7,4-dimetoxiflavona	Sánchez <i>et al.</i> , 1995
<i>S. viridis</i>	Raíces	ferruginol (7) 1- oxoferruginol (8) aetiopinona (37) salviviridinol viridinol microstegiol	Ulubelen, 2003

MONOTERPENOS

La mayoría de los reportes indican que el 1,8-cineol (eucaliptol) y borneol, son los principales constituyentes característicos de los aceites esenciales de *Salvia*, obtenidos de hojas, raíces y corteza.

La composición química de los aceites esenciales de *S. cryptantha* y *S. multicaulis*, en su mayoría son α -pineno(1), 1-8-cineol (5), alcanfor (3), camfeno, borneol (4) (Tepe et al, 2004). Mientras que *S. tomentosa* tiene en su mayoría α -pineno (1), β -pineno (2), alcanfor (3), borneol (4), y 1-8 cineol (5) (Tepe et al, 2003).

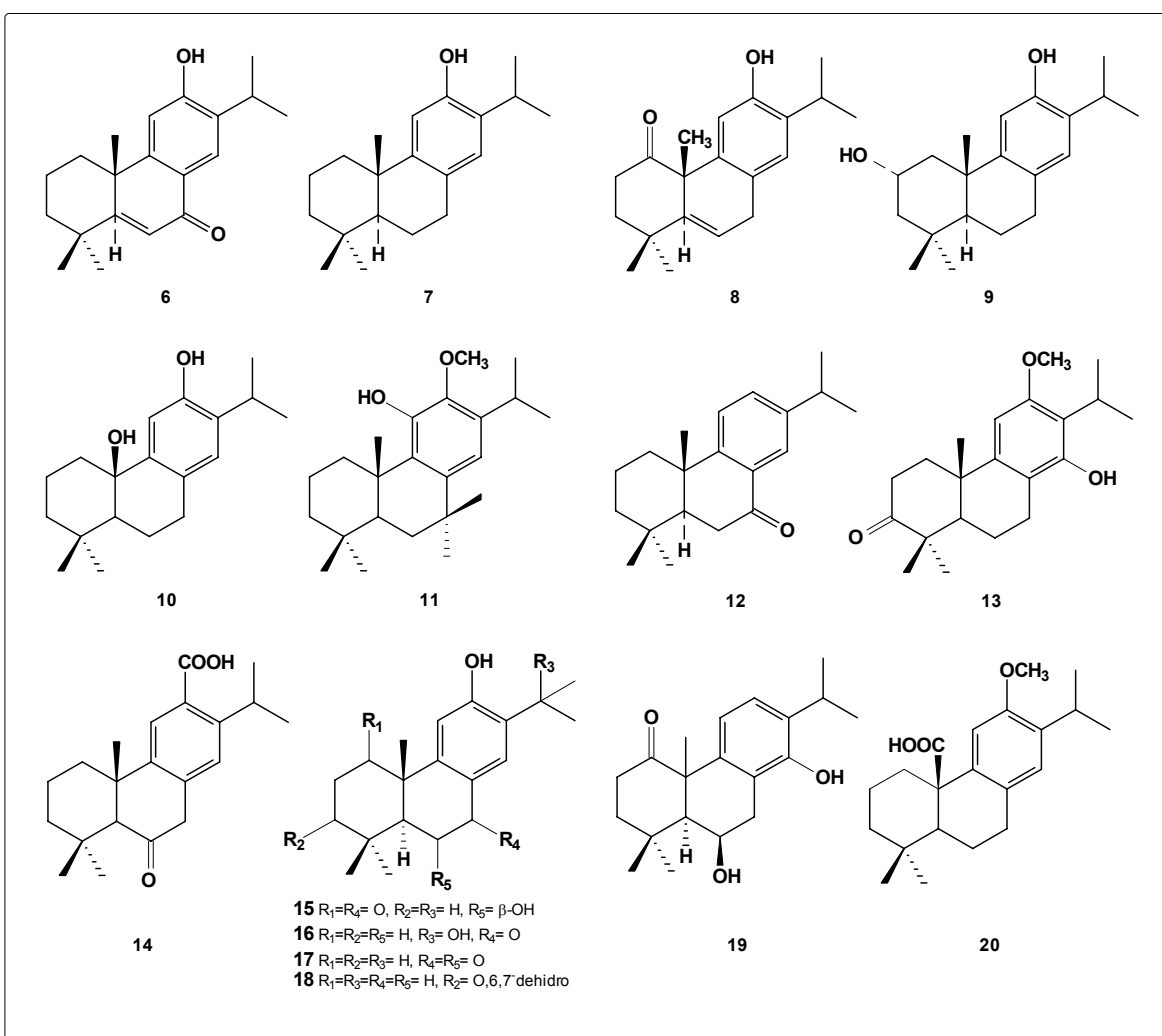


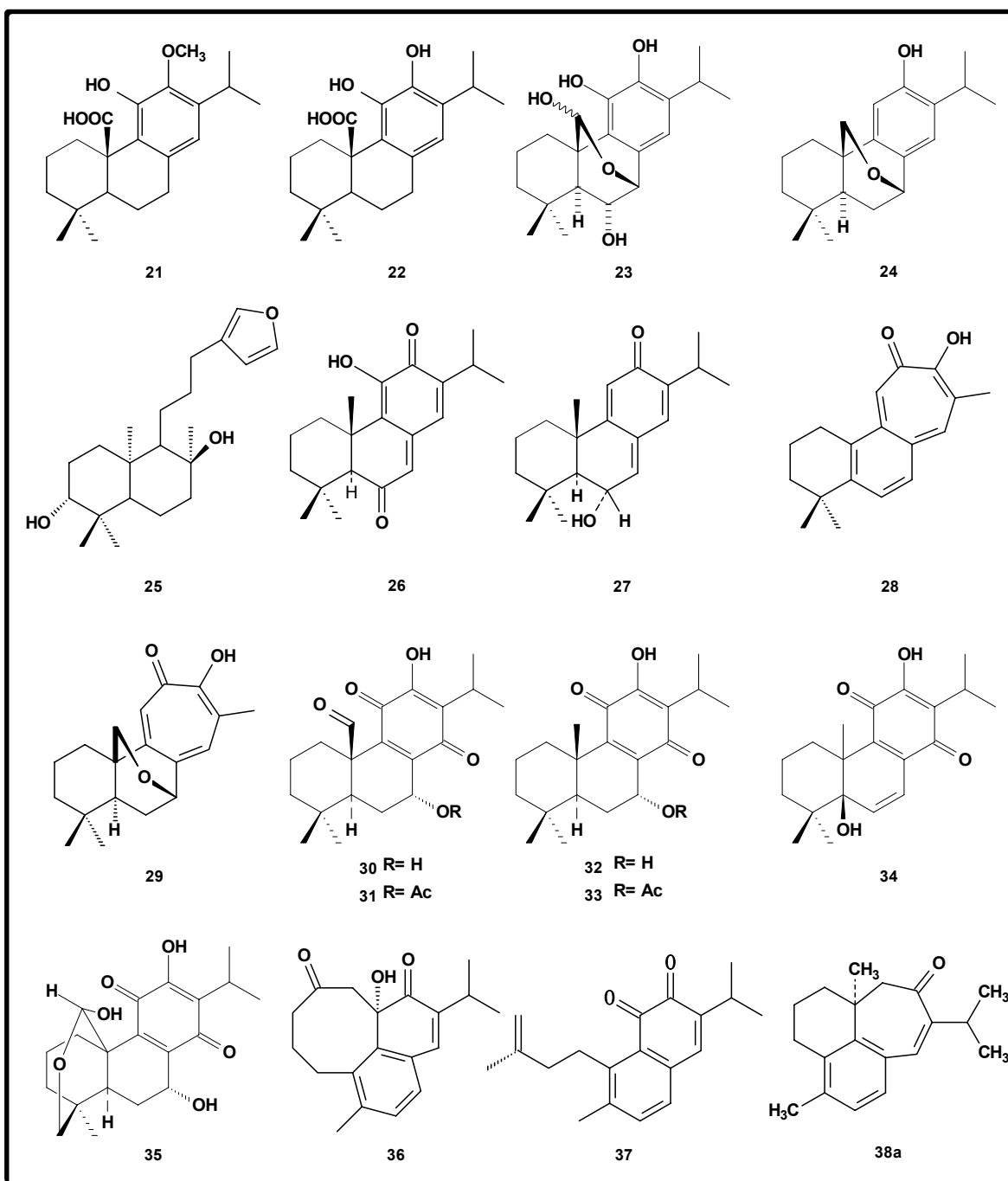
DITERPENOS

Las especies Mexicanas de *Salvia*, son en su mayoría del subgénero *Calosphace* y se ha encontrado que contienen diterpenos con esqueleto tipo neo-clerodano (Rodriguez-Hahn et al.,1995). Mientras que en las especies Europeas y Asiáticas del subgénero *Salvia* y *Sclarea*, se han aislado diterpenos con esqueleto del tipo abietano y labdano (Ulubelen y Topcu, 1998), es por eso, que este tipo de compuestos han sido utilizados como marcadores taxonomicos para establecer la relación entre especies, considerando así el contenido de diterpenos, la distribución geográfica y la clasificación botánica.

DITERPENOS TIPO ABIETANO

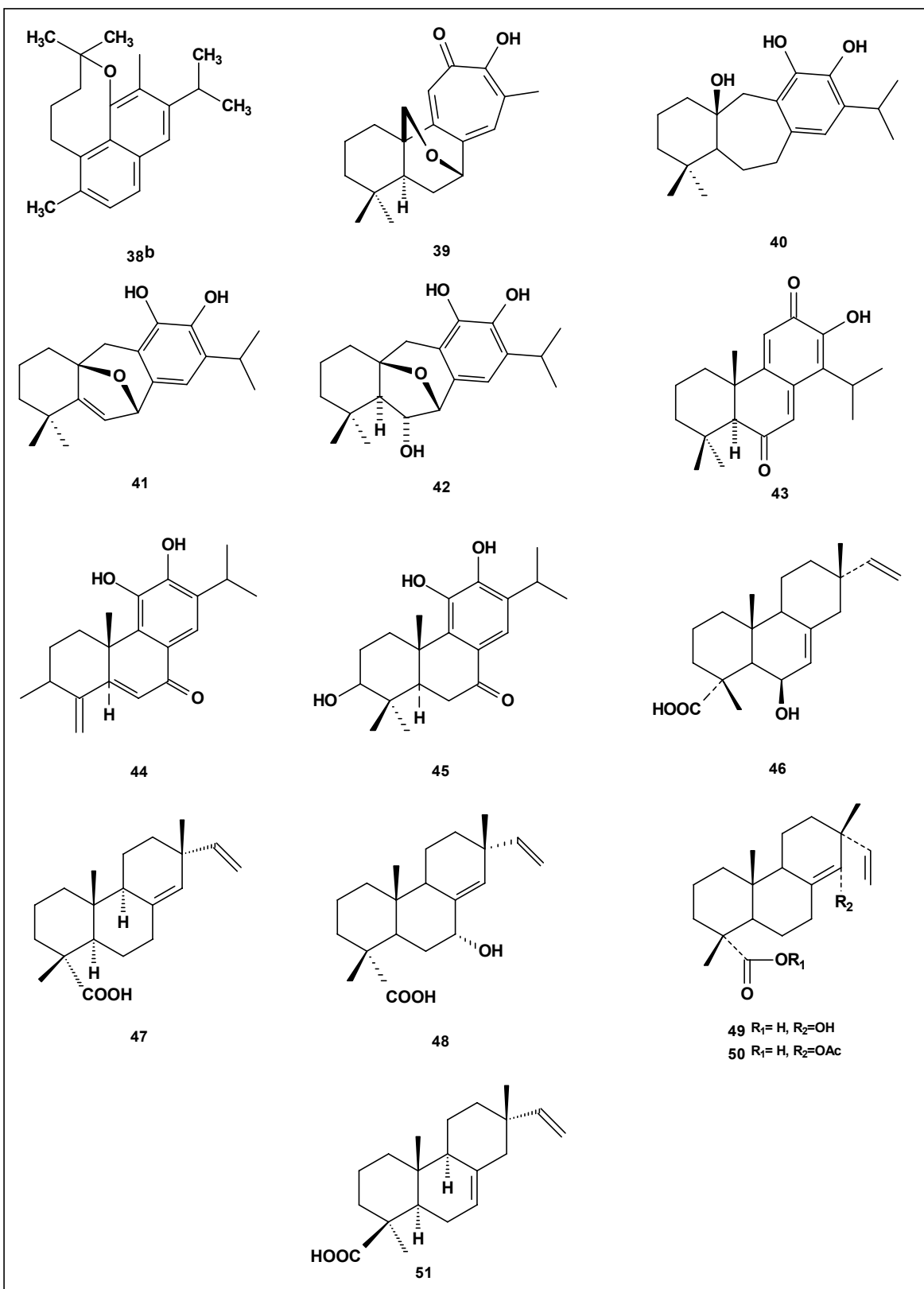
Los diterpenos como sugiol (6), ferruginol (7), 1-oxoferruginol (8), salviol (9) y lanigerol (10), son encontrados con mayor frecuencia en este género. Sin embargo existen compuestos con esqueleto tipo quinona como taxodiona (26), nemorona (30), horminona (33) aislados de *Salvia amplexicaulis*.





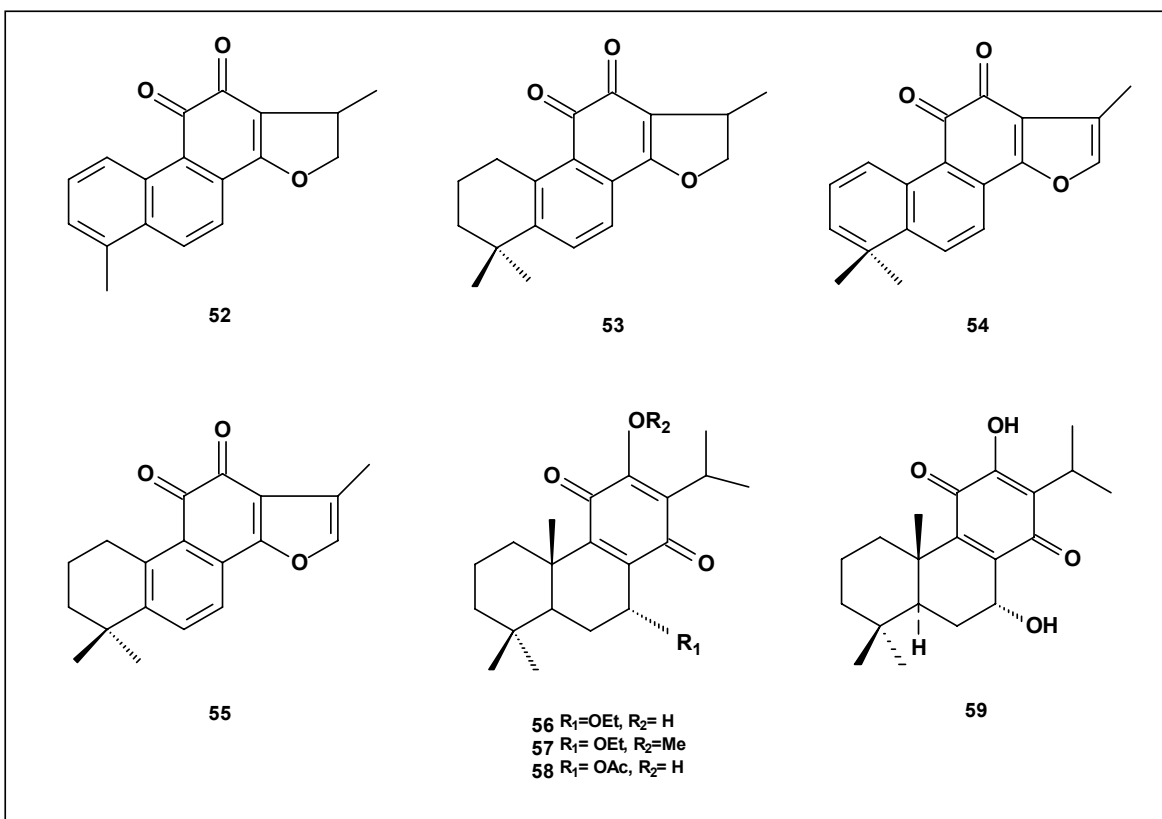
TIPO ISOPIMARANO

De *S. caespitosa* (especie de Turkia), se han aislado el ác. β -hidroxiisopimarico (46), ác. sandaracopimarico (47) y el ác. isopimarico (51), que tienen el tipo de esqueleto de isopimarano.



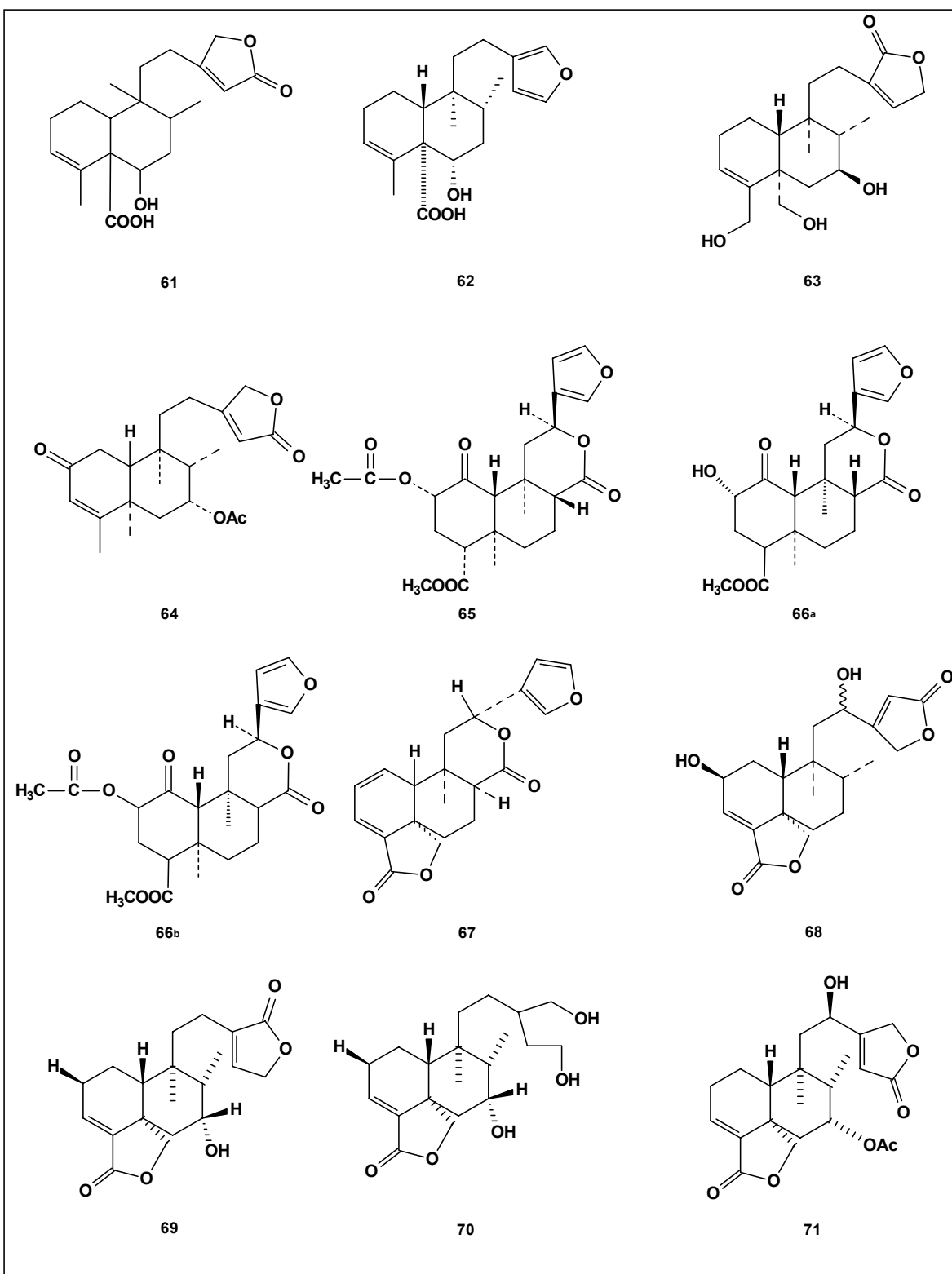
DITERPENOS TIPO TANSHINONA

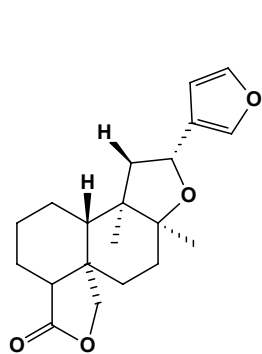
Los compuestos dihidrotanshinona (52), criptotanshinona (53), tanshinona I (54) y tanshinona II (55), fueron aislados de la especie China llamada *Salvia miltiorrhiza*.



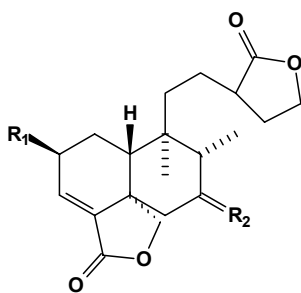
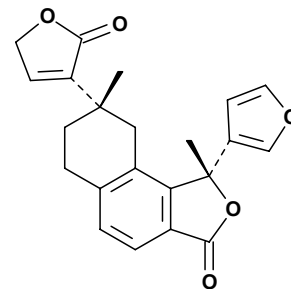
DITERPENOS TIPO NEO-CLERODANOS

El ác. Kerlinico (62), lasiantina (64), salvinorina (65), divinorina B (66b), salviarina (87), dilactona (69), son algunos ejemplos de diterpenos tipo neo-clerodano y han sido aislados de diversas especies.

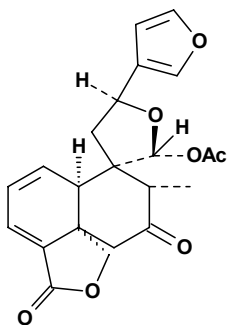




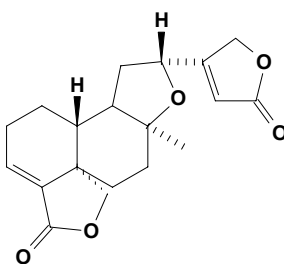
72

73 R₁= OH, R₂= α -OAc, β -H74 R₁= H, R₂= β -OH, α -H75 R₁= H, R₂= β -H, α -OH76 R₁= H, R₂= β -H, α -OAc77 R₁= , R₂= β -H, α -OAc78 R₁= OH, R₂= b-H, α -OH79 R₁= H, R₂= OH80 R₁= OAc, R₂= H81 R₁= OAc, R₂= OH

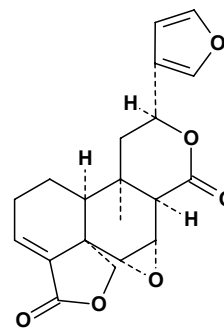
82



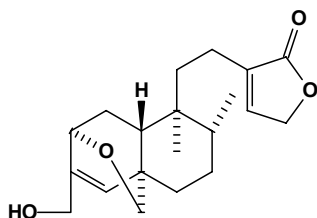
83



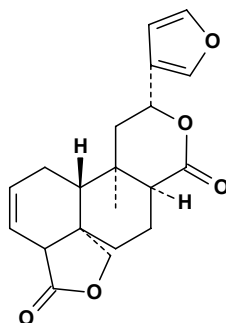
84



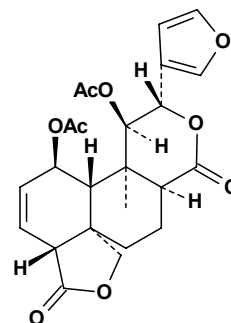
85



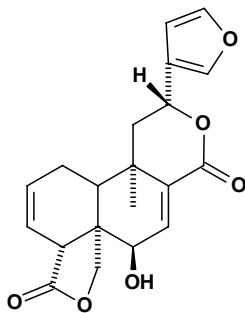
86



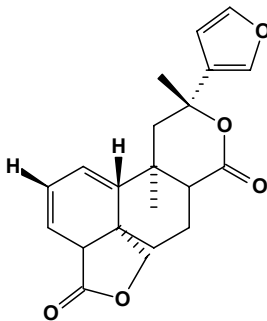
87



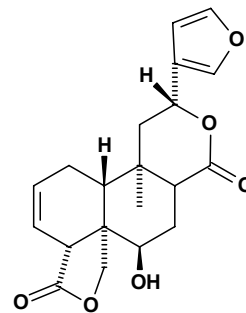
88



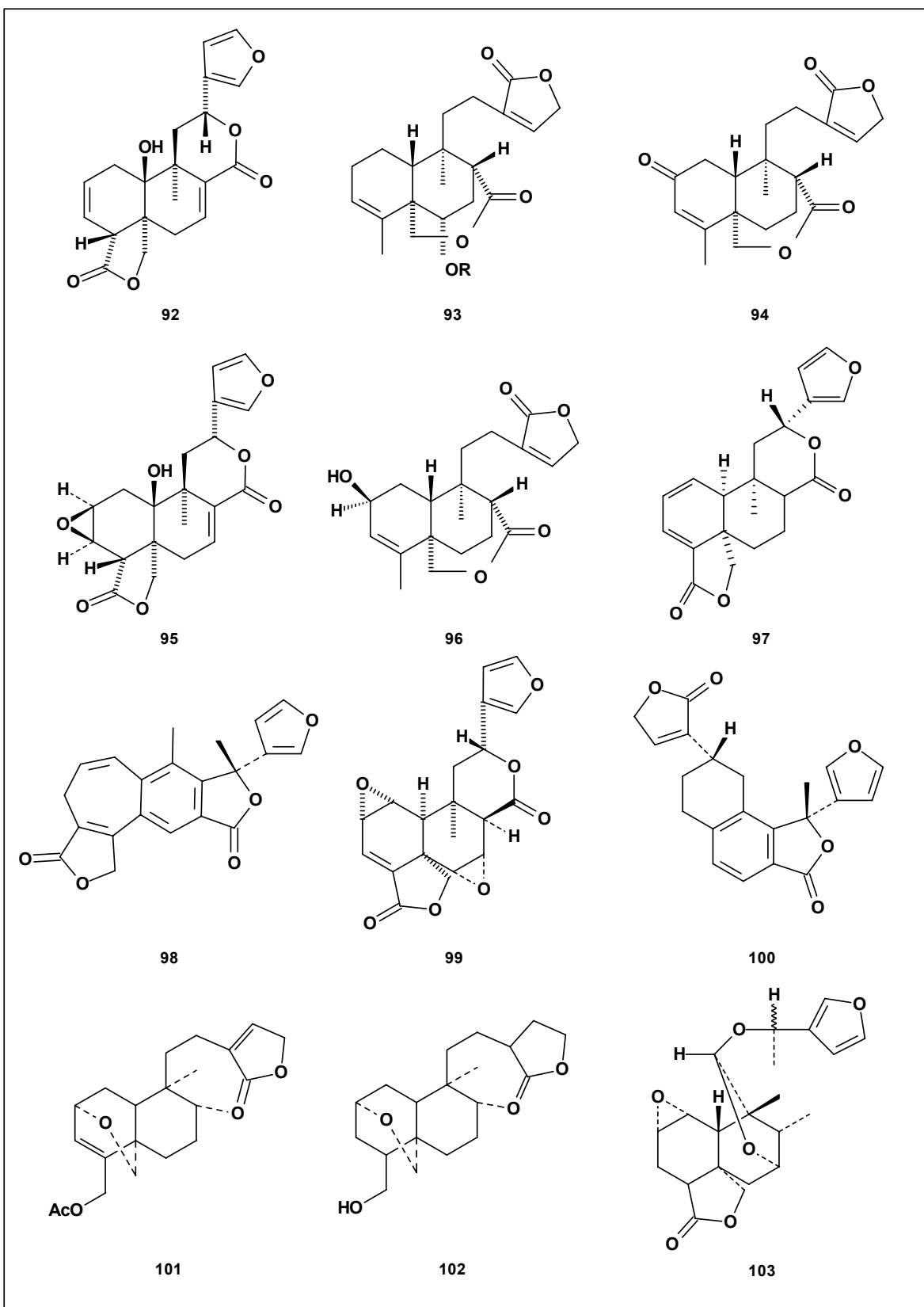
89

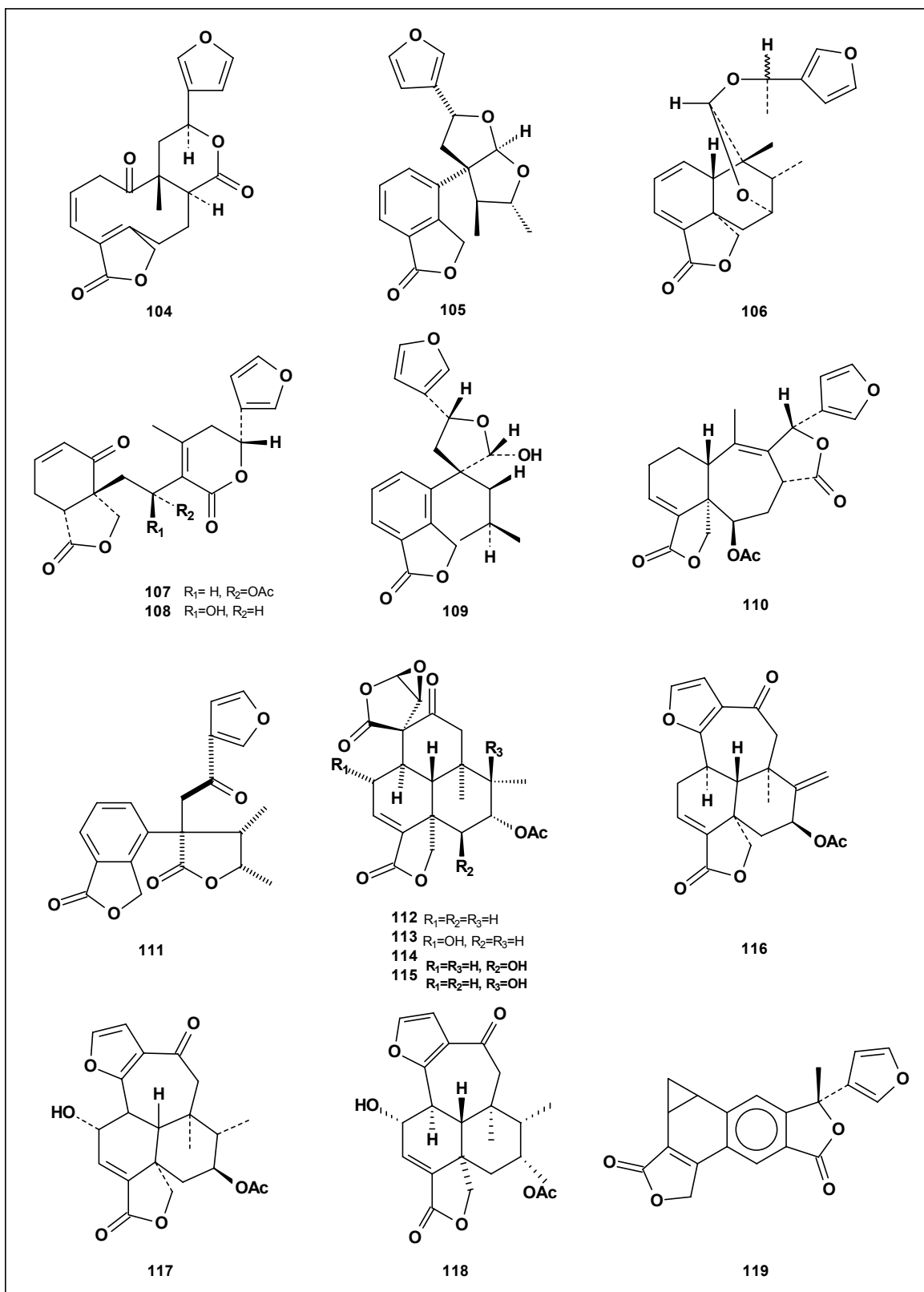


90



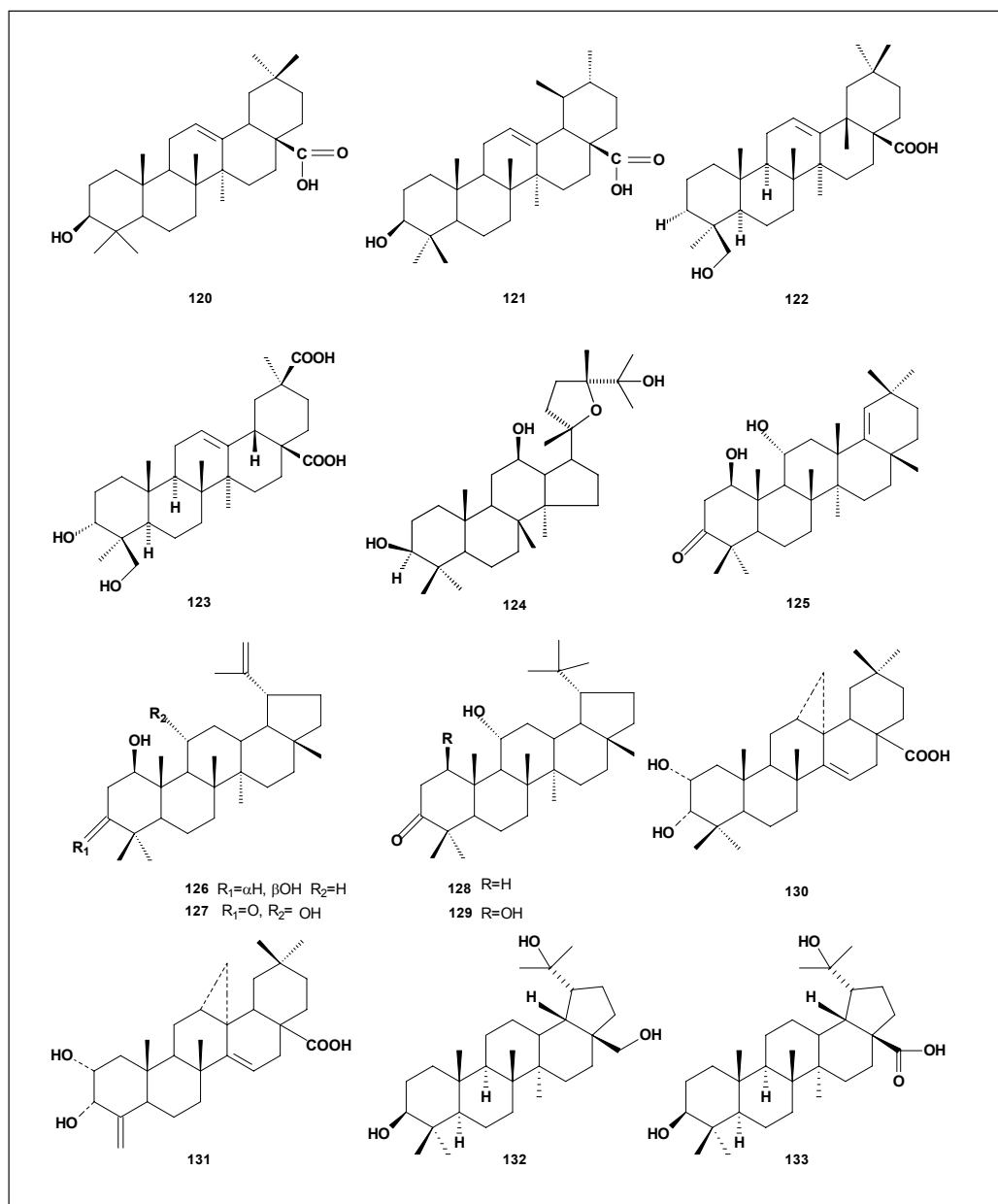
91





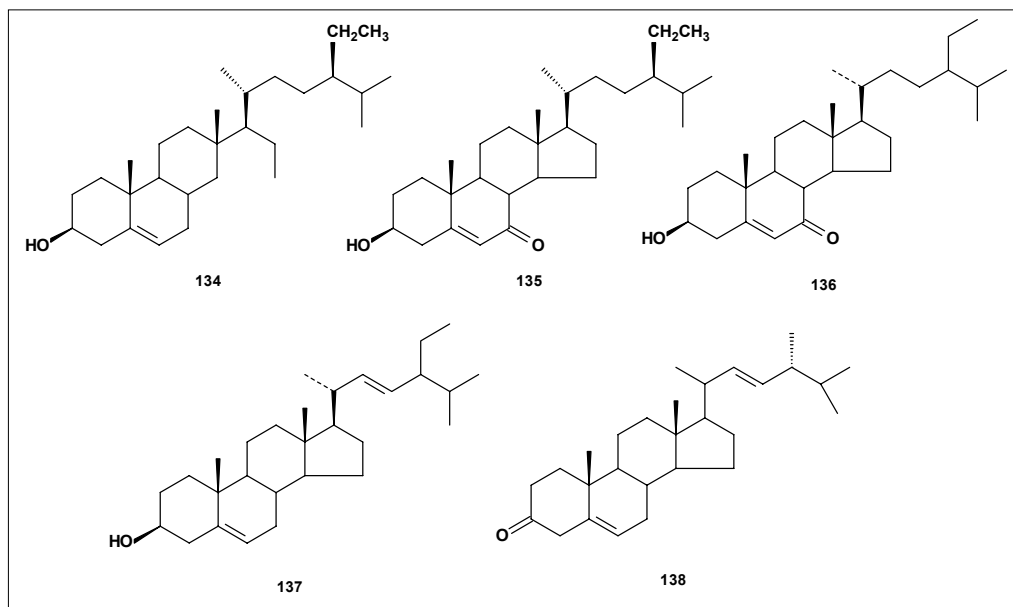
TRITERPENOS

En las especies mexicanas se han aislado compuestos triterpénicos con esqueletos tipo oleanano, ursano, dammarano y lupano. Entre los que se encuentran el Ácido Oleanólico (120) y el Ácido Ursólico (121), que están presentes comúnmente en este género.



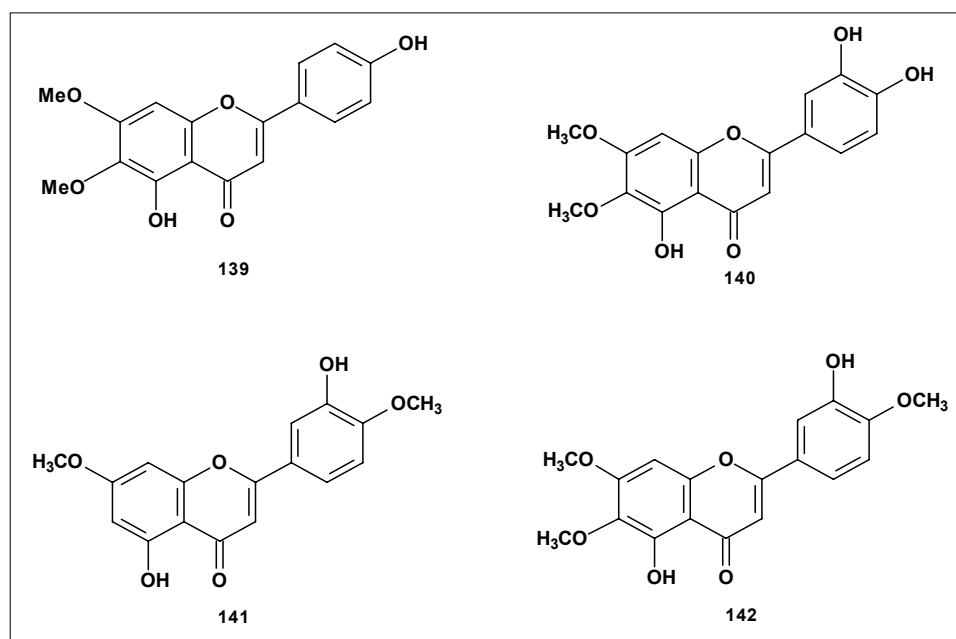
ESTEROLES

Los esteroides como β -sitosterol (134) y estigmasterol (137), son los compuestos abundantes en este género.



FLAVONOIDES

Estos compuestos están presentes en las partes aéreas y las más abundantes son flavonas como cirsiolol (140) y eupatorina (142).



2.1.4. Aspectos Farmacológicos

Diversas especies de *Salvia*, han sido utilizadas alrededor del mundo en la medicina tradicional, al atribuirles propiedades antioxidante (Tepe *et al.*, 2004), antidiabética, citotóxica (Ulubelen y Topcu, 1992), analgésica, antiinflamatoria, antipirética, hematológica (Hernández *et al.*, 1995), antibacteriana (Ulubelen, 2003, Abdalla, 1995) entre otras; pero son pocos los estudios que permiten validar su uso tradicional.

Varios miembros de este género al ser resistentes al ataque de insectos, hervíboros y hongos, han desarrollado un sistema de defensa contra estos depredadores, produciendo así compuestos con propiedades insecticida, alelopática y antifúngica. De los cuales se tienen estudios que han evaluado la actividad antialimentaria (Esquivel *et al.*, 2000) y tripanocida (Esquivel *et al.*, 1996).

Los estudios enfocados a la actividad antimicrobiana de plantas del género *Salvia*, han sido reconocidos desde hace muchos años, sin embargo son pocos los estudios que se tienen al respecto. La mayoría de los estudios realizados se evalúan los extractos y posteriormente se aíslan los compuestos puros presentes en estos. En pocas ocasiones se aíslan los compuestos puros de un extracto no activo, tomando en consideración el efecto sinérgico de los compuestos químicos con cada uno de los constituyentes menores.

A continuación se mencionan los estudios informados de la actividad antimicrobiana en algunas especies de *Salvia* alrededor del mundo:

- ❖ De *S. albocaerula* y *S. nicolsoniana*, se evaluaron extractos metanólicos, que no tuvieron actividad. De este se aislaron los diterpenos sugiol y 15-hidroxi-7-oxo-abieta-8,11,13-trieno mostrando actividad frente a *S. aureus* y *B. subtilis*. El triterpeno llamado ácido 3 α -hidroximasticadienoico fue activo para *S. aureus*. (Rojas *et al.*, 1992)
- ❖ Del extracto cloroformico de las raíces de *S. lanigera* se aisló un diterpeno tipo icetexano llamado lanigerol, que mostró actividad frente a *B. subtilis*, *S. aureus* y *M. luteus*. (Abdalla *et al.*, 1995)
- ❖ De *S. syriaca*, fueron evaluados los extractos EtOH, Eter, butanólico, hexánico, metanólico y acuoso, de los cuales en todos hubo actividad antimicrobiana a excepción del hexánico y metanólico. Los extractos fueron activos frente a *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. aureus*, *B. cereus* y en algunos para hongos (Mahasneh y El-Oqlah, 1999).
- ❖ De 4 especies de *Salvia* (*viridis*, *ceratophylla*, *caespitosa* y *blepharochlaena*), fueron obtenidos los compuestos puros y se probó la actividad antimicrobiana. Siete compuestos diterpénicos de tipo abietano e isopimarano, mostraron actividad significativa frente a bacterias Gram (+) y Gram (-) (Ulubelen, 2003).
- ❖ Los aceites esenciales de *S. multicaulis* y *S. cryptantha* mostraron actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram (+) y Gram (-), mientras que para los extractos no polares no hubo actividad (Tepe *et al.*, 2003).

De extractos activos se han aislado varios diterpenos de tipo abietano, pero aún se conoce poco de la relación entre la presencia de estos metabolitos y la actividad de los extractos. Existen informes (Laila - Moujir, 1993) que expanden el estudio de los diferentes tipos de diterpenos con los ensayos de la relación estructura-actividad. Hasta ahora la actividad antibacteriana y antiviral que poseen algunas plantas de estas especies se atribuye a la composición química de sus aceites esenciales (Janssen *et al*, 1987), constituidos principalmente por compuestos fenólicos y monoterpénicos.

2.2. TRITERPENOS

Los compuestos triterpénicos son comunes en las especies de *Salvia*. Los triterpenos aislados recientemente pertenecen principalmente a los esqueletos del tipo oleanano, ursano, lupano. También se han encontrado abundantemente algunos esteroides (Silva *et al*, 1992).

Los triterpenos (C_{30}) se biosintetizan a partir del pirofosfato de farnesilo, que experimentan una copulación reductora catalizada enzimáticamente, en la que dos grupos farnesilo se unen "cola a cola" originándose el "escualeno" que es el más importante de los triterpenos, conociéndose así como precursor biosintético de los esteroides.

Estas moléculas se pueden oxidar y ciclar originando diversos tipos de compuestos policíclicos, como los triterpenos tetracíclicos y pentacíclicos y por la eliminación de metilos se obtienen los esteroides (Figura 3)

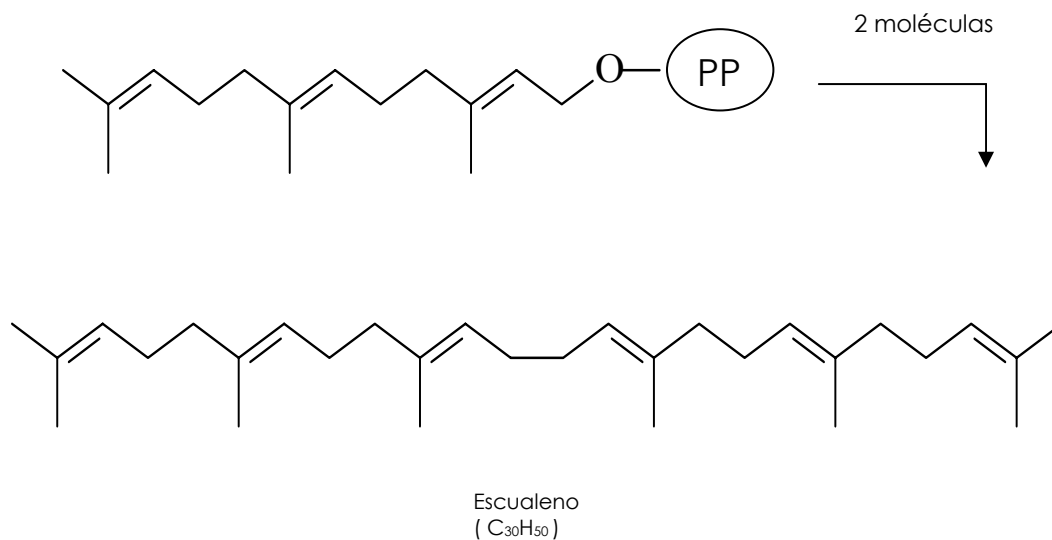


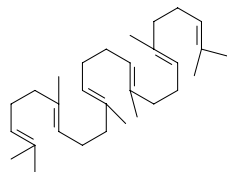
Figura 3. Formación del escualeno a partir de dos FPP

La clasificación de los triterpenos se basó en los esqueletos carbonados conocidos e identificados de triterpenos naturales y de acuerdo a este criterio se divide en acíclicos, tetracíclicos y pentacíclicos (Gros *et al.*, 1985).

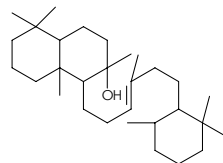
En la figura 4, se presentan algunos ejemplos representativos de los diferentes esqueletos hidrocarbonados encontrados dentro de cada serie.

La química y la distribución de estos compuestos ha sido ampliamente estudiada (Overtón, 1979). Dentro del grupo de los acíclicos, el escualeno fue el primero que se aisló, y luego se caracterizaron derivados oxigenados del mismo. A este mismo grupo pertenece la ambreína aislada de *Ambergris spp.*

Acíclicos:

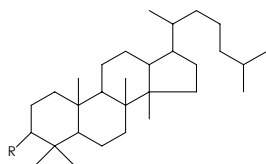


Escualeno



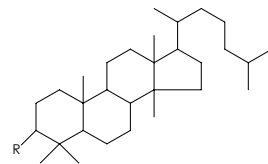
Ambreína

Tetracíclicos:



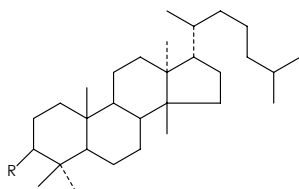
Damarano R= H

Damaradienol R= OH



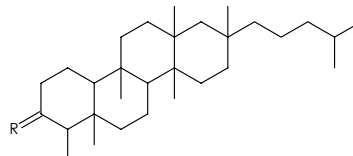
Lanostano R= H

Lanosterol R= OH



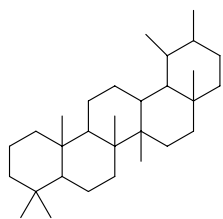
Eufano R= H

Eufol R= OH

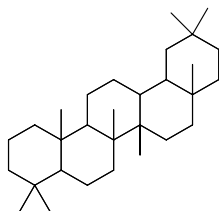
Shionana R= H₂

Shionona R= O

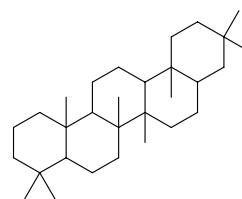
Pentacíclicos:



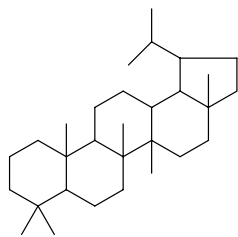
Ursano



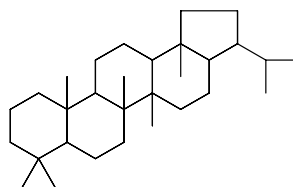
Oleanano



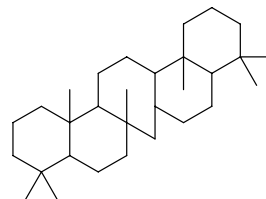
Sticnano



Lupano



Hopano



Serratano

Figura 4. Esqueletos carbonados y algunos ejemplos de Triterpenos

Los triterpenos tetracíclicos están formados por cuatro anillos condensados, tres ciclohexanos y un ciclopentano, cuya estructura básica se observa en la figura 5 y se denomina ciclopentano perhidro fenantreno.

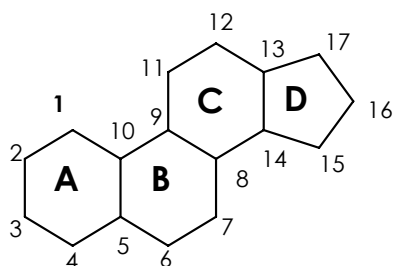


Figura 5. Estructura básica de los triterpenos tetracíclicos

Los triterpenos pentacíclicos son compuestos constituidos por un esqueleto base de treinta carbonos (C_{30}) originados desde el escualeno. Se encuentran en estado libre, como ésteres y/o glicósidos. En los triterpenos pentacíclicos es posible distinguir dos sistemas de anillos, como se ilustra en la figura 6.

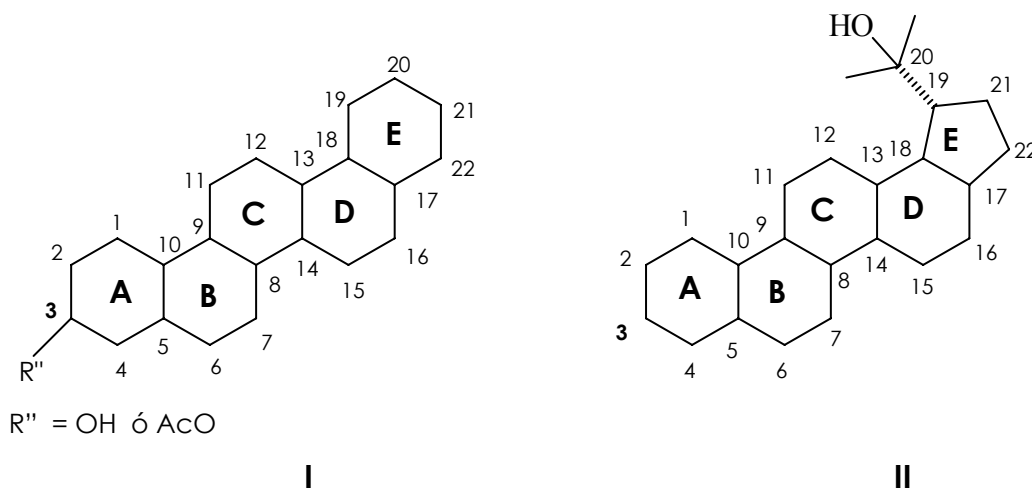


Figura 6. Sistemas de anillos de los triterpenos pentacíclicos.

Los triterpenos del tipo I, se encuentran ampliamente distribuidos en los vegetales, especialmente en las dicotiledóneas. La posición C₃ del anillo A, se encuentra generalmente sustituida por un grupo hidroxilo o acetilo.

El tipo II se encuentra en bacterias, helechos, líquenes y plantas superiores. Este esqueleto básico presenta generalmente una cadena isopropílica en el átomo de carbono 19 ó 21.

2.3. MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN ANTIMICROBIANA

La investigación de la actividad antimicrobiana de plantas medicinales ha encontrado algunos problemas debido a la variedad de criterios, técnicas empleadas y propiedades lipofílicas de algunas muestras. La insolubilidad de aceites esenciales y extractos no polares en agua, tiene una gran dificultad para usarse en medios acuosos en el estudio de la actividad antimicrobiana (Ríos *et al.*, 1988).

Los métodos han sido clasificados dentro de tres grupos (difusión, dilución y métodos bioautográficos), existe un gran número de factores que pueden influir en los resultados: el método de extracción, volúmen de inoculación, composición del medio de cultivo, pH y temperatura de incubación. Todos estos factores experimentales pueden modificar la inhibición del crecimiento del microorganismo *in vitro* (Janssen *et al.*, 1987).

2.3.1. **Métodos de Difusión**

Una técnica que no requiere dispersión homogénea en agua, es el método de difusión en agar en discos. Es sencilla, rápida, económica y reproducible (en condiciones estándares). El disco contiene la muestra que va a ser probada a concentraciones específicas, y se coloca con todo cuidado sobre la placa de cultivo en agar, inoculada en el cultivo de la bacteria. Se incuba la placa toda la noche y se observa a la mañana siguiente la aparición de una zona de inhibición del crecimiento, alrededor del disco que contiene la muestra al cual fue susceptible el microorganismo, mientras que las bacterias resistentes crecerán hacia la periferia del disco (Sidney, 1983). Este método fue originalmente diseñado para controlar la cantidad de sustancias antibióticas en extractos crudos. A fin de reducir el límite de detección, el sistema inoculado puede mantenerse a una temperatura baja antes de la incubación, la cual favorece la difusión a través del medio de cultivo y esto incrementa el diámetro de inhibición (Ríos *et al.*, 1988).

2.3.2. **Métodos de Dilución**

La técnica de dilución es aquella que requiere una dispersión homogénea de la muestra en agua. Es utilizada para determinar principalmente, el valor de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de un extracto, aceite esencial o sustancias puras. Estos han sido utilizados en los "screening" preeliminares de actividad antimicrobiana.

En el método de dilución, se inoculan a un cultivo de bacterias en estudio, cantidades específicas del compuesto, preparado en

concentración decreciente en caldo o agar por la técnica de dilución seriada. Se determina la susceptibilidad del microorganismo, después de un periodo de incubación adecuado, por la observación macroscópica de la presencia o ausencia de crecimiento en las distintas concentraciones del agente antimicrobiano. Cuando no hay crecimiento, el medio permanece claro y la muestra es activa; mientras que se considera inactiva cuando este aparece turbio indicando crecimiento. El grado de inhibición está relacionado con la turbidez del medio y es medida por espectrofotometría (Ríos *et al.*, 1988, Sidney, 1983).

La ventaja de este método es que es simple, rápida y tiene la posibilidad de utilizarse en el estudio antimicrobiano de muestras solubles e insolubles en agua como son los aceites esenciales.

2.3.3. Métodos Bioautográficos.

La bioautografía es el método de detección más importante para compuestos antimicrobianos nuevos y no identificados. Este se basa en los efectos biológicos (antibacterial, antiprotozoario, antitumoral, etc.) de las sustancias bajo estudio. En comparación con la Cromatografía en papel (CP) y Cromatografía en Capa Fina (CCF) este resuelve grandes problemas y es la más rápida de las dos técnicas. El típico procedimiento de bioautografía se basa en la llamada técnica de difusión en agar, en donde los compuestos antimicrobianos son transferidos de la CCF a una placa de agar inoculado con el microorganismo. Las zonas de inhibición son visualizadas por reacciones, que detectan la actividad de la enzima deshidrogenasa. (Begit y Kline, 1972). La bioautografía puede ser clasificada dentro de tres variantes como se describen a continuación:

A. Bioautografía de contacto.

Se basa en la difusión de compuestos separados por CP ó CCF desde el papel o cromatoplas. Estas son colocadas en la superficie de las cajas con agar nutritivo inoculando los microorganismos que son sensibles a los antibióticos ya analizados. Después de 15-30 min, el papel o cromatoplasca es removida. En ambos casos, el antibiótico se difunde dentro de la placa de agar e inhibe el crecimiento de los microorganismos probados. Las placas son incubadas a una temperatura apropiada hasta que los microorganismos en crecimiento son visibles, formando una película fina en la superficie. Las zonas de inhibición son claramente visibles y pueden ser más vistosas antes de tiempo utilizando indicadores con actividad de la deshidrogenasa.

B. Bioautografía Directa. Una suspensión de microorganismos en medio líquido es rociado en una cromatoplasca desarrollada después de eliminar el solvente. Esta es incubada. Con este método no hay difusión y los problemas del método de contacto son eliminados.

C. Bioautografía de Inmersión. En este método la cromatoplasca debe ser incluida en el medio. La placa desarrollada es cubierta con agar fundido. El agar solidificado es inoculado con el microorganismo y las placas son colocadas en el congelador a 4°C. Después de 4 h, las placas son inoculadas e incubadas.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Debido a la aparición del fenómeno denominado "iatrogénesis", han surgido muchas cepas de agentes patógenos resistentes a los medicamentos actuales, lo que ha conducido a la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos de origen natural. Estudios actuales, muestran la conveniencia de insistir en la búsqueda de nuevas sustancias de origen natural (botánico) con actividad antibiótica que no generen resistencia.

Hoy en día las infecciones bacterianas y fúngicas, son problemas prioritarios de salud pública nacional e internacional, por lo que la búsqueda de nuevas fuentes de extractos y/o compuestos puede contribuir y coadyuvar en esta problemática.

Es así, que se propone estudiar la actividad antimicrobiana y antifúngica de extractos y compuestos aislados de *Salvia rupícola*.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

Realizar el estudio químico y la evaluación antimicrobiana de las partes aéreas de *Salvia rupicola*, con la finalidad de determinar los compuestos responsables de la actividad antimicrobiana.

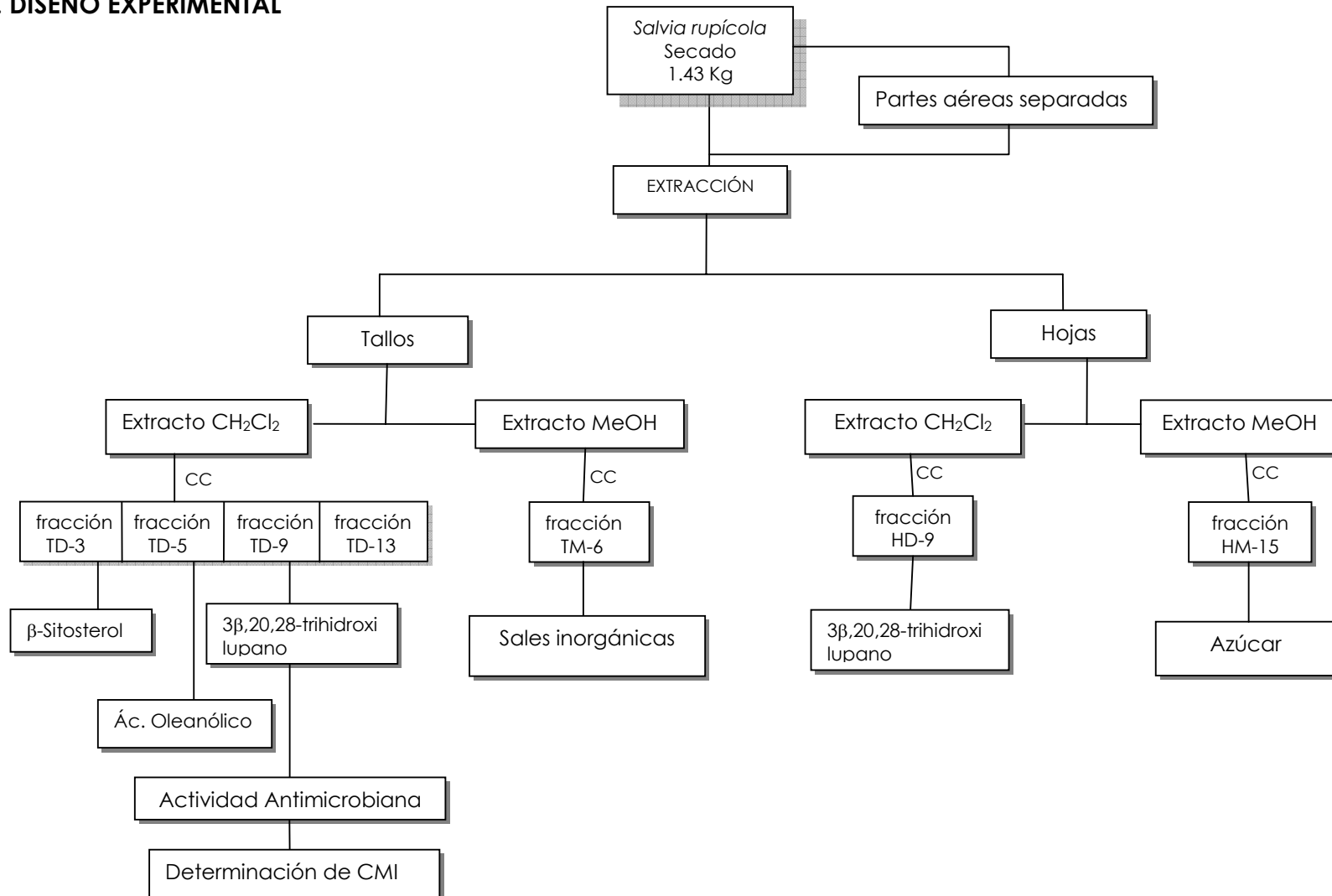
4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Preparar los extractos crudos de las partes aéreas de *Salvia rupicola* con diferentes solventes: η -Hex, CH_2Cl_2 , Me_2CO y MeOH.
2. Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos crudos, usando el método de difusión en disco de Kirby-Bauer.
3. Análisis químico de los extractos en diclorometano y metanol de las partes aéreas (hojas y tallos).
4. Aislar, purificar y caracterizar, los compuestos mayoritarios puros presentes en los extractos analizados.
5. Evaluar la actividad antimicrobiana de los compuestos mayoritarios puros por el método de Kirby-Bauer.
6. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los compuestos que presenten actividad antimicrobiana mediante la microtécnica de dilución en caldo.

5. HIPÓTESIS:

Salvia rupícola es una planta endémica de México y se ha observado que se encuentra intacta frente a otras que viven en el mismo hábitat, es decir, no es atacada por microorganismos e insectos dañinos. Además al ser utilizada por los campesinos para evitar la infección de pequeñas heridas, se espera aislar, purificar y caracterizar los compuestos químicos responsables de la actividad antimicrobiana.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL



7. METODOLOGIA

7.1 MATERIALES

7.1.1 **Material Vegetal**

El material utilizado en este estudio fue recolectado en el kilómetro 23 de la carretera Federal entre Pachuca e Ixmiquilpan, en el municipio de Ixmiquilpan, Hgo. Su identificación botánica fue realizada comparando la muestra con la especie del vaucher C 2874 en el Herbario Nacional MEXU del Instituto de Biología UNAM en Ciudad Universitaria por el Botánico Francisco Ramos.

7.1.2. **Material**

- ❖ Columna cromatográfica (diferentes capacidades)
- ❖ Placas de aluminio recubierta con gel de sílice
- ❖ Matraz balón (100, 250 mL)
- ❖ Matraz erlenmeyer (50, 100, 250 mL)
- ❖ Pipetas pasteur
- ❖ Pipeta graduada 10 mL
- ❖ Probetas graduadas (100, 1000mL)
- ❖ Viales de vidrio
- ❖ Cajas petri de 30 mL
- ❖ Pissetas
- ❖ Tubos de ensayo con tapón roscable
- ❖ Mechero
- ❖ Asa bacteriológica
- ❖ Discos de papel filtro
- ❖ Hisópos de algodón
- ❖ Placas de ELISA estériles
- ❖ Micropipetas (1,5,10,100µL)

7.1.2. Reactivos y disolventes

- ❖ Silica gel grado 60
- ❖ η-Hexano
- ❖ Acetato de etilo
- ❖ Acetona
- ❖ Metanol
- ❖ Diclorometano (CH_2Cl_2)
- ❖ Sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4)
- ❖ Cloruro de tetrazolio 0.08%
- ❖ β-sitosterol (estándar)
- ❖ Cloramfenicol
- ❖ Ketoconazol
- ❖ Sulfato cérico $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$

7.1.3. Equipo

- ❖ Balanza analítica y granataria
- ❖ Baño de calentamiento
- ❖ Parilla de calentamiento
- ❖ Recirculador
- ❖ Autoclave
- ❖ Estufa eléctrica
- ❖ Refrigerador
- ❖ Campana de flujo laminar
- ❖ Rotavapor Büchi RE 111
- ❖ Lámpara de Luz Ultravioleta Spectroline Mod CX-20 (254 y 365nm)
- ❖ Aparato de Fisher-Jones
- ❖ Espectrofotómetro de Infrarrojo FT-IF Pekin-Elmer 200
- ❖ Espectrofotómetro Spectronic modelo génesis 5 para obtener el registro del espectro de barrido en el U.V. de 200-400 nm

- ❖ Equipo de Resonancia Magnética Nuclear de protones Varian XL-300 GS a 200 MHz
- ❖ Espectrómetro de Masas modelo Hewlett Packard 5890 serie II

7.2. ESTUDIO QUÍMICO

7.2.1. Preparación de los Extractos crudos

El material vegetal seco a temperatura ambiente y molido, se sometió al proceso de macerado para su extracción, utilizando distintos disolventes en un orden de polaridad ascendente, por un período de 3 días como se indica en el Diagrama 1.

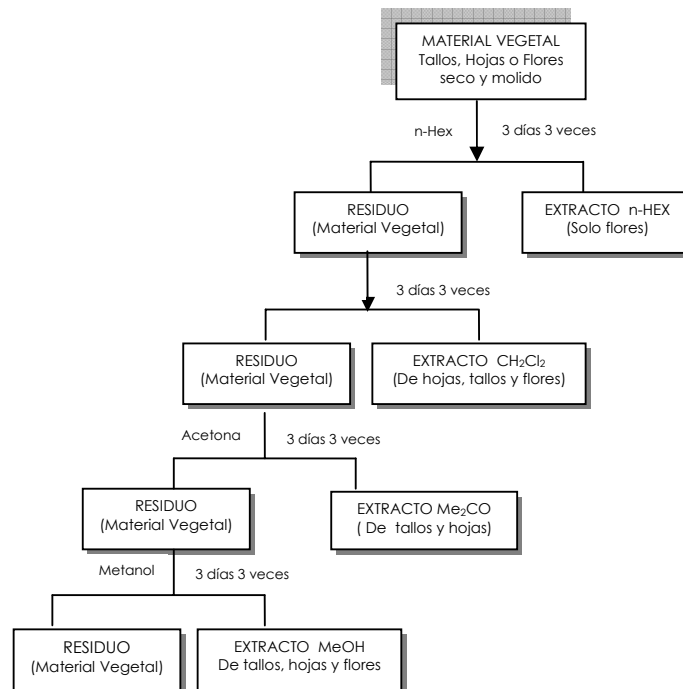


Diagrama 1. Obtención de extractos crudos de *Salvia rupícola*.

Una vez que se tuvo el macerado de tallos, hojas y flores con cada disolvente, se redujó el volumen de éste, evaporándolo mediante destilación a presión reducida en un rotavapor, y se obtuvieron los extractos indicados en la tabla 2.

Tabla 2. Extractos obtenidos de *Salvia rupicola*.

DISOLVENTE	HOJAS SECAS (185 g)	TALLOS SECOS (1 216 g)	FLORES SECAS (29 g)
HEXANO	NR	NR	1.4 g
DICLOROMETANO	14 g	30 g	1.2 g
ACETONA	3 g	9.3 g	NR
METANOL	24 g	58 g	2.4 g

NR: No se realizó

7.2.2. Fraccionamiento y Aislamiento de Compuestos Puros

El fraccionamiento primario se realizó únicamente a los cuatro extractos crudos de mayor cantidad, los cuales fuerón:

- ❖ Extracto CH₂Cl₂ de tallos
- ❖ Extracto MeOH de tallos
- ❖ Extracto CH₂Cl₂ de hojas
- ❖ Extracto MeOH de hojas

Se utilizó la cromatografía en columna para el fraccionamiento de los extractos, utilizando el gel de sílice como fase estacionaria, y diversos sistemas de elución (mezclas de solventes) como fase móvil.

Para el análisis cromatográfico cualitativo en capa fina, se emplearon placas de aluminio (sílica gel 60 F₂₅₄. Merck) con un espesor de 0.25 mm con indicador de fluorescencia. Para revelar los cromatogramas se utilizó el sulfato cérico (agente cromógeno) y la lámpara de luz U.V.

❖ EXTRACTO DICLOROMETÁNICO DE TALLOS.

30 g del extracto CH₂Cl₂ de tallos se fraccionaron en una columna cromatográfica, utilizando como adsorbente 300 g de silica gel. El proceso de elución se inició con hexano al 100%, y fue aumentando la polaridad en proporción del 10%, con acetato de etilo, hasta terminar con metanol al 100%. Se colectaron 178 fracciones de 250 mL cada una. Cada fracción se analizó por CCF y se juntan todas aquellas por similitud cromatográfica, lo cual originó 14 fracciones indicadas en la tabla 3, de donde se aisló el β-sitosterol de la fracción TD-3; de TD-5 el Ácido Oleanólico y de TD-9 el 3β,20,28-trihidroxilupano.

Tabla 3. Agrupamiento de fracciones obtenidas del extracto CH₂Cl₂ de tallos.

FRACCIONES REUNIDAS	CLAVE	COMPUESTOS AISLADOS
1-12	TD-1	
13-22	TD-2	
23-31	TD-3	β-sitosterol
32-41	TD-4	
42-51	TD-5	ácido oleanólico
52-67	TD-6	
68-81	TD-7	
82-89	TD-8	
90-101	TD-9	3β,20,28-trihidroxilupano
102-109	TD-10	
110-125	TD-11	
126-139	TD-12	
140-143	TD-13	
144-178	TD-14	

❖ EXTRACTO METANÓLICO DE TALLOS.

58 g de extracto MeOH de tallos se fraccionaron en una columna cromatográfica utilizando como adsorbente 350 g de silica gel. El proceso de elución se realizó con hexano, mezclas de hexano-acetato de etilo, y acetato de etilo-metanol en diferentes proporciones. Se colectaron 76 fracciones de 250 mL cada una. Cada fracción se analizó por CCF y se reunieron todas aquellas por similitud cromatográfica, lo cual originó 10 fracciones, indicadas en la tabla 4. De la fracción TM-6 se aisló un compuesto que sólo fue posible determinar que es inorgánico debido a que en el IR, no se logran observar bandas de absorción en la región de los enlaces C-H y C-C.

Tabla 4. Agrupamiento de fracciones obtenidas del extracto MeOH de tallos.

FRACCIONES REUNIDAS	CLAVE	COMPUESTOS AISLADOS
1-8	TM-1	
9-11	TM-2	
12-17	TM-3	
18-29	TM-4	
30-36	TM-5	
37-47	TM-6	Compuesto inorgánico
48-52	TM-7	
53-59	TM-8	
60-72	TM-9	
73-76	TM-10	

❖ EXTRACTO DICLOROMETÁNICO DE HOJAS.

14 g de extracto CH_2Cl_2 de hojas se fraccionaron en una columna cromatográfica, utilizando como adsorbente 130 g de silica gel. El proceso de elución se realizó con hexano al 100 % y se continuó con mezclas de hexano-acetato de etilo y acetato de etilo-metanol en proporción al 20% y se terminó con metanol al 100%. Se colectaron 51 fracciones de 150 mL cada una. Cada fracción se analizó por CCF y se juntan todas aquellas por similitud cromatográfica, lo cual origina 17 fracciones indicadas en la Tabla 5. De la fracción HD-9 se aisló nuevamente el 3 β ,20,28-trihidroxilupano y de la fracción HD-15 se obtienen sales inorgánicas.

Tabla 5. Agrupamiento de fracciones de extracto hojas en diclorometano

FRACCIONES REUNIDAS	CLAVE	COMPUESTOS AISLADOS
1-3	HD-1	
4 - 7	HD-2	
8 - 13	HD-3	
14 - 15	HD-4	
16 - 17	HD-5	
18 - 20	HD-6	
21 - 24	HD-7	
25 - 26	HD-8	
27	HD-9	3 β ,20,28-trihidroxilupano
28	HD-10	
29	HD-11	
30 - 32	HD-12	
33 - 37	HD-13	
38 -42	HD-14	
43 - 45	HD-15	Sales inorgánicas
46 - 50	HD-16	
51	HD-17	

❖ EXTRACTO METANÓLICO DE HOJAS.

24 g de extracto MeOH de las hojas se fraccionaron en una columna cromatográfica, utilizando como adsorbente 250 g de sílica gel. El proceso de elución se efectúa con hexano, hexano-acetato de etilo en diferentes proporciones y acetato de etilo-metanol. Se colectaron 182 fracciones de 250 mL cada una. Cada una de las fracciones se analizó por cromatografía en capa fina y se juntan todas aquellas por similitud cromatográfica, lo cual origina 18 fracciones indicadas en la Tabla 6. De la fracción HM-15 se obtiene un azúcar.

Tabla 6. Agrupamiento de fracciones de extracto hojas en metanol

FRACCIONES REUNIDAS	CLAVE	COMPUESTOS AISLADOS
1-3	HM-1	
4-5	HM-2	
6-18	HM-3	
19- 30	HM-4	
31 - 37	HM-5	
38 -49	HM-6	
50 - 54	HM-7	
55 - 60	HM-8	
61 - 64	HM-9	
65 -68	HM-10	
69 - 82	HM-11	
83 - 89	HM-12	
90 - 121	HM-13	
122 – 140	HM-14	
141-149	HM-15	Ázúcar
150 - 168	HM-16	
169 - 181	HM-17	
182	HM-18	

7.3 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

7.3.1. **Determinación de la Actividad Antimicrobiana de Extractos y/o Compuestos puros, mediante el Método de Difusión.**

Método de difusión en Agar o de Kirby-Bauer (Barry y Thornsberry, 1987; Vanden Berghe y Vlietinck, 1991).

Este método se utilizó para valorar cualitativamente la actividad antimicrobiana de extractos, fracciones (que son producto de separaciones cromatográficas) y compuestos puros.

Microorganismos utilizados

Bacterias Gram (-): *Escherichia coli* ATCC 25922, *Escherichia coli* MR, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella typhi* ATCC 19430, *Shigella boydii* ATCC 8700, *Vibrio cholerae* INDRE 206 (aislada de agua contaminada), *Vibrio cholerae* CDC-UV12 (El Tor), *Vibrio cholerae* No 01, *Vibrio cholerae* (caso clínico).

Bacterias Gram (+): *Staphylococcus aureus* MR (multiresistente), *Sarcina lutea*, *Staphylococcus epidermidis* y *Bacillus subtilis*.

Hongos : *Fusarium sporotrichum*, *Trichophyton menthagrophytes*, *Aspergillus niger*.

Levadura: *Candida albicans*.

Medios de Cultivo:

Se utilizó Caldo y Agar de Muller-Hinton (BIOXON) para las bacterias, medio Czapek-dox para hongos y Caldo Saboraud para *Candida albicans*. Estos se prepararon de acuerdo a las indicaciones de la casa comercial y se esterilizaron en autoclave a 121°C y 15 lb/cm² durante 15 min.

Preparación del Inóculo:

Para bacterias se prepara un inóculo de 24 h a partir de cepas puras. Se realizó una suspensión del cultivo anterior en 10mL de Caldo Mueller-Hinton estéril por incubación a 37°C por 12 h. Una vez transcurrido el tiempo se ajustó la turbidez del crecimiento bacteriano al equivalente estándar no. 0.5 de Mac Farland, concentración equivalente a tener 1.5×10^8 células bacterianas/mL.

Para el caso de hongos se toma el inóculo directamente de la caja petri, donde se encuentra el hongo, tratando de tomar los más jóvenes para ser colocado por picadura, en las cajas que contienen ya los sensidiscos.

Testigos Positivos: Para bacterias se emplea 30 µg de Cloranfenicol y para hongos se utiliza 56 µg de Ketoconazol que son impregnados en los discos.

Testigos Negativos: Se emplea 30µL de MeOH impregnado en discos, dejando evaporar durante 12 h.

Técnica:

En discos de papel filtro de 5 mm de diámetro se aplica la concentración de compuesto a evaluar, dejando secar totalmente el disolvente utilizado para la disolución del compuesto. Estos se colocan en cajas con agar Mueller-Hinton de 5-6 mm de grosor para discos de contenido elevado. Se aplica con hisopos de algodón; inóculos cuidadosamente estandarizados, del microorganismo con quien se va a enfrentar el compuesto, para que den un crecimiento masivo. Se coloca en la estufa a 36°C y después de 24 h se miden los diámetros de zona de inhibición. Todas las pruebas se realizan por duplicado y los resultados indicados son el promedio de estas determinaciones.

7.3.2. **Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) mediante la Microtécnica de dilución en caldo (Koneman, 1996).**

En la microtécnica de dilución en caldo, la susceptibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos se determinó en una serie de microtubos moldeados en una placa plástica (placas de Elisa). La microplaca se preparó colocando 50 μ L de caldo Mueller-Hinton con las concentraciones de 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81, 3.90 y 1.95 μ g/mL del compuesto a probar disuelto en la mínima cantidad de metanol.

Técnica:

Se prepara una suspensión bacteriana con una asa de siembra estéril tocando las superficies convexas de 4 ó 5 colonias del microorganismo a ensayar. Se sumerge el asa en 10 mL de caldo de Mueller-Hinton, se enjuaga bien el líquido para descargar todo el material y luego se retira el asa de siembra. Se incuba el tubo de cultivo a 36°C durante aproximadamente 24 horas, o hasta que la turbidez del medio sea equivalente al estándar no 0.5 de MacFarland. Esto equivale a una concentración de aproximadamente 1.5×10^8 bacterias/mL, de esta suspensión se toman 0.1 mL y se le adicionan a 99.9 mL de solución salina al 0.9 % obteniéndose así una concentración de 10^5 bacterias/mL. Cada pozo de la placa se inocula con 50 μ L de esta suspensión bacteriana.

Una vez inoculada la placa se tapa para evitar la desecación y se incuba por 24 h a 37 °C, pasado este tiempo se le añaden 50 μ L de una solución de cloruro de tetrazolio al 0.08 % a cada pozo, se incuba por 30 min a 37°C. En los pozos donde se desarrolla el organismo, el colorante es reducido a formazan con una coloración púrpura-rojiza, produciendo un botón en el fondo del pozo. Donde no hay desarrollo del microorganismo, la solución permanecerá clara.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

8.1. ESTUDIO QUÍMICO.

8.1.1. Caracterización de compuestos aislados

β-SITOSTEROL

Este compuesto fue aislado del extracto CH_2Cl_2 de tallos, de las fracciones TD-3 (23-31) eluidas con hexano/AcOEt (1:9). Son agujas blancas con punto de fusión de $110^\circ\text{-}115^\circ\text{C}$. solubles en hexano y AcOEt, el cual fue comparado en una CCF con una muestra estándar de β -sitosterol, resultando tener un R_f igual por lo que se identificó como β -sitosterol (Figura 7).

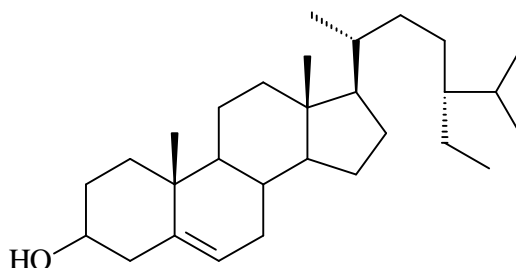


Figura 7. β -Sitosterol

ÁCIDO OLEANÓLICO

Este compuesto fue aislado del extracto CH_2Cl_2 de tallos, una vez realizada la purificación de 1.78 g de las fracciones con clave TD-5 (42-51), se obtienen 23 subfracciones, las cuales fueron tomadas nuevamente para una purificación mediante cromatografía en columna de las subfracciones (9-10) de estas con un peso de 500 mg y se obtienen 56 subfracciones, precipitándose 22 mg de un fino polvo blanco apareciendo desde las fracciones 14 a la 53 en el sistema de elución hexano-AcOEt (2:8). Su punto de fusión es de 236°C , y es soluble en hexano.

En el Espectro 1 de IR se observan bandas de absorción en 3429 cm^{-1} característico del grupo OH y 1695 cm^{-1} correspondiente para un grupo carbonilo que pertenece a un ácido (COOH).

Por espectroscopía de masas, se determinó su ión molecular, correspondiente a una fórmula molecular $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ y un PM= 456.

En el Espectro 2 de RMN ^1H , a 200 MHz, se observan siete singuletes (de δ 1.23 a 0.66) que integran para 21 protones y que corresponden a 7 metilos, se observa también una señal doble de dobles en 3.0 ppm, a la cual se le asigna el protón geminal de un alcohol, que por el valor de la constante de acoplamiento, debe encontrarse en posición ecuatorial. También se observa un triplete a 5.15 ppm característico de un protón vinílico.

En el Espectro 3 de RMN ^{13}C , a 200 MHz se observa una señal a 76.8 ppm que corresponde a la posición del Carbono 3 en donde se encuentra el grupo OH. En 178.5 ppm se encuentra un carbono característico de un grupo carbonilo perteneciente a un ácido carboxílico asignable en ^{13}C a la posición 28. Además las señales en 121.5 y 143.8 ppm corresponden a las posiciones C_{12} y C_{13} en donde se encuentra la doble ligadura.

Comparando con datos previamente informados en la literatura y observados en la tabla 7 se concluye que se trata del Ácido Oleanólico (Figura 8), un triterpeno aislado de diversas plantas y comúnmente encontrado en especies de Salvia.

Tabla 7. Datos de ^{13}C NMR del Ácido Oleanólico

NO. CARBONOS	ÁCIDO OLEANÓLICO	
	^{13}C -NMR 200 MHz CDCl_3	^{13}C -NMR 600 MHz Piridina Werner et al, 2003
1	38.05	39.4
2	26.96	28.1
3	76.84	78.4
4	38.20	39.5
5	54.80	56.3
6	18.03	19.0
7	33.33	33.5
8	39.20	40.0
9	47.09	48.5
10	36.62	37.6
11	22.62	23.8
12	121.53	122.5
13	143.81	145.3
14	41.05	42.4
15	27.21	28.5
16	22.93	23.8
17	45.47	47.0
18	40.82	42.4
19	45.69	47.0
20	30.42	31.3
21	32.43	34.5
22	32.13	33.5
23	28.25	29.0
24	16.06	16.5
25	15.13	15.6
26	16.88	17.5
27	25.62	26.4
28	178.56	180.5
29	32.86	33.5
30	23.39	23.8

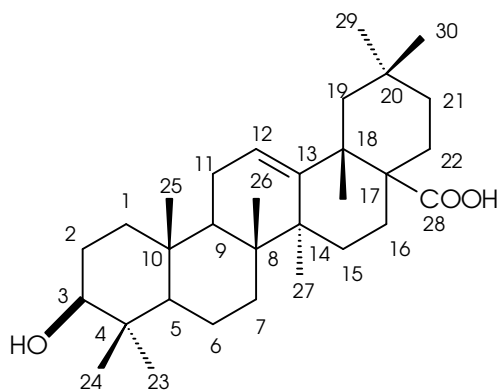


Figura 8. Ácido Oleanólico

3 β ,20,28-TRIHIDROXILUPANO

De las fracciones TD-9 (94-95) del extracto CH₂Cl₂ de tallos, que se eluyeron en hexano-AcOEt (25:75) se aislaron 0.85g de un compuesto blanco cristalino con punto de fusión de 130°C, soluble en CH₂Cl₂ y AcOEt caliente.

En el Espectro 4 de IR se observan bandas de absorción en 3425 y 1030 cm⁻¹ características de OH, en 2941, 2962cm⁻¹ para C-H y en 1382 cm⁻¹ para metilos y metilenos.

Por espectroscopía de masas se determinó un ión molecular de m/z 460, señal no observada en el Espectro 5, sin embargo se observa una en m/z 441, lo que indica la pérdida de una molécula de H₂O, así también se observan los fragmentos [M⁺ - H₂O] m/z 425, [M⁺ - H₂O] m/z 407, la especie iónica de m/z 218 y su forma deshidratada de m/z 189, lo que confirma la presencia del núcleo básico triterpénico.

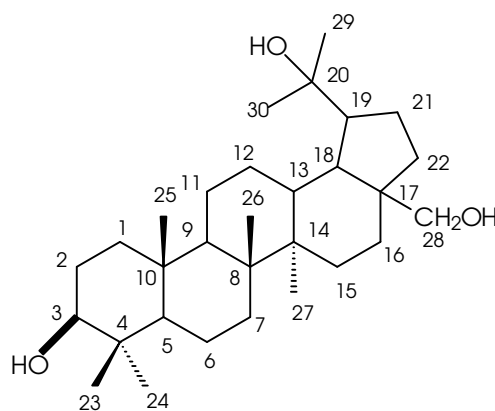
En el Espectro 6 de RMN ¹H , a 200 MHz se observan singuletes en 0.77, 0.81, 0.96, 0.96, 0.98, 1.18 y 1.19 ppm, que integran para veintiún protones y se asignan a siete grupos metilo, además se observa una señal doble de dobles en 3.25 ppm, asignable al protón geminal del alcohol ecuatorial.

En el Espectro 7 de RMN ¹³C, a 200 MHz, se observan señales a 77.8, 72.4 y 60.0 ppm, asignables a los carbonos, C₃, C₂₀ y C₂₈ respectivamente.

Al comparar nuestros datos con los informados en la literatura (Tabla 8), se confirma que se trata del triterpeno de la Figura 9 denominado 3 β ,20,28-trihidroxilupano, aislado de especies de *Relhania* (Tsichritzis y Jakupovic, 1990), *Betula* (Fuchino et al, 1996), y de *Salvia tenoriana* (Rodriguez, 1996).

Tabla 8. Datos de ^{13}C NMR del 3 β ,20,28-trihidroxilupano

NO.CARBONOS	3 β ,20,28-TRIHIDROXILUPANO	
	^{13}C -NMR 200 MHz CDCl_3 +DMSO	^{13}C -NMR 300 MHz CDCl_3 (Rodríguez,1996)
1	39.540	39.202
2	27.296	28.529
3	77.868	77.431
4	38.420	39.540
5	54.987	54.733
6	17.509	17.211
7	34.321	34.834
8	41.1	40.555
9	49.433	49.167
10	40.8	37.848
11	23.563	23.239
12	28.919	26.991
13	37.189	36.926
14	43.2	42.954
15	35.095	32.712
16	32.925	34.065
17	43.8	43.538
18	47.810	47.506
19	53.1	51.074
20	72.43	71.896
21	27.918	27.084
22	27.296	27.514
23	28.291	28.037
24	15.415	15.827
25	16.113	15.181
26	18.707	18.441
27	14.823	14.566
28	61.056	60.516
29	24.519	24.377
30	30.907	30.651

**Figura 9.** 3 β ,20,28-trihidroxilupano

8.2 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

8.2.1 Determinación de la Actividad Antimicrobiana de Extractos.

Una vez obtenidos los extractos crudos, se evaluó la actividad antimicrobiana, mediante la técnica de difusión en agar, empleando dos bacterias gram (+) y tres bacterias gram (-). Los sensidiscos para estos ensayos fueron impregnados con 2 mg de cada extracto respectivamente. Los resultados se exhiben en la tabla 9, observandose que ningún extracto muestra actividad antimicrobiana a esta concentración contra los organismos de prueba.

Tabla 9. Actividad bactericida de los extractos crudos de *Salvia rupícola*

Partes aéreas	Extracto	Bacterias Gram (+)			Bacterias Gram (-)	
		<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. typhi</i>	<i>V. cholerae</i>
Tallos	Diclorometano	—	—	—	—	—
	Acetona	—	—	—	—	—
	Metanol	ND	ND	ND	ND	ND
Hojas	Diclorometano	—	—	—	—	—
	Acetona	—	—	—	—	—
	Metanol	ND	ND	ND	ND	ND
Flores	Metanol	—	—	—	—	—
	Hexano	ND	ND	ND	ND	ND
	Diclorometano	ND	ND	ND	ND	ND
	Estándar Cloramfenicol 30 µg	25 mm	18.7 mm	18.3 mm	27 mm	24.3 mm

ND: No determinada (-) no hubo inhibición (+) inhibición

Los cinco extractos probados contra bacterias fueron utilizados para evaluar la actividad antifúngica frente a cinco cepas de hongos, a una concentración de 2 mg por disco. La tabla 10 muestra que no hubo actividad antifúngica de dichos extractos, contra los hongos fitopatógenos probados.

Tabla 10. Actividad antifúngica de los extractos crudos de *Salvia rupícola*

Partes aéreas	Extracto	<i>A. niger</i>	<i>C. albicans</i>	<i>T. menthagrophytes</i>	<i>F. sporotrichum Cepa 1</i>	<i>F. sporotrichum .Cepa 2</i>
Tallos	Diclorometano	—	—	—	—	—
	Acetona	—	—	—	—	—
	Metanol	ND	ND	ND	ND	ND
Hojas	Diclorometano	—	—	—	—	—
	Acetona	—	—	—	—	—
	Metanol	ND	ND	ND	ND	ND
Flores	Metanol	—	—	—	—	—
	Hexano	ND	ND	ND	ND	ND
	Diclorometano	ND	ND	ND	ND	ND
Standard Ketoconazol 56 µg		+	+	+	+	+

ND: No determinada (-) no hubo inhibición (+) inhibición

8.2.2. Determinación de la Actividad Antibacteriana de los Compuestos puros.

Una vez aislados y purificados los compuestos mayoritarios, se evaluó la actividad antibacteriana, con el método de difusión en agar (indicado anteriormente), frente a *S. aureus* G⁺ y *V. cholerae* No 01 G⁻,

con el propósito de conocer el tipo de bacterias que muestra sensibilidad frente a los compuestos puros. Se preparó para la prueba concentraciones de 500 mg/mL de cada compuesto y fueron impregnados 10 μ L en cada uno en los discos, obteniendo una dosis de 500 μ g de cada compuesto puro. Se utilizó como control negativo discos impregnados con MeOH y como control positivo discos con 6 μ L (equivalente a 30 μ g) de Cloramfenicol. Los resultados mostrados en la tabla 11, nos indican que el 3 β ,20,28-trihidroxilupano fue el único que presento actividad frente a la bacteria gram (-) *Vibrio cholerae* No 01.

Tabla 11. Actividad antibacteriana de los compuestos mayoritarios de *Salvia rupicola*

Compuesto (500 μ g)	Bacteria Gram (+) <i>S. aureus</i>	Bacterias Gram (-) <i>V. cholerae</i>
β -sitosterol	--	--
Ácido oleanólico	--	--
3 β ,20,28- trihidroxilupano	--	9.2 mm
Control positivo Cloramfenicol (30 μ g)	18.7 mm	24.3 mm
Control negativo MeOH (30 μ L)	--	--

Los halos de inhibición indicados en mm son el promedio de 3 repeticiones

Al observar que el 3 β ,20,28-trihidroxilupano inhibió a la cepa de gram (-), fueron probados nuevamente los tres compuestos puros frente a seis bacterias (cuatro gram (-) y dos cepas gram (+), bajo las mismas condiciones de experimentación, aumentando sólo la concentración a 1000 μ g/mL. En la tabla 12 se observa nuevamente que el 3 β ,20,28-trihidroxilupano inhibió solo a *Vibrio cholerae*, aumentando también el halo de inhibición (esto debido al aumento de la concentración del compuesto). Los demás compuestos no mostrarón actividad frente a las diferentes cepas bacterianas.

Tabla 12. Actividad antibacteriana de los compuestos puros, aumentando la concentración a 1000µg,

Compuestos (1000 µg)	gram (+)		gram (-)				
	Sl	Se	Vno1	Ec	St	Sb	Ye
β-sitosterol	—	—	—	—	—	—	—
Ácido oleanólico	—	—	—	—	—	—	—
3β,20,28-trihidroxi- lupano	—	—	14	—	—	—	—
Control positivo	22.7	19.7	11	18.3	27	25	15.7
Control negativo	—	—	—	—	—	—	—

(Sl) *S. lutea*, (Se) *S. epidermidis*, (Vno1) *V. cholerae no01*, (Ec) *E. coli*, (St) *S. typhi*, (Sb) *S. boydi*, (Ye) *Y. enterocolitica*. Control positivo (Cloramfenicol 30 µg), Control negativo (MeOH 30µL), (-) no hubo inhibición

8.2.3. Determinación Antibacteriana de las fracciones TD-9

Debido a que el 3β,20,28-trihidroxi-*lupano* se obtuvo de la fracción 94-95 de TD-9, y en ésta se incluyen cinco fracciones muy similares de acuerdo a la CCF; fueron evaluadas las fracciones más próximas de donde se obtiene el compuesto para comprobar si existe variación del compuesto en cada fracción, ó si se trata únicamente del compuesto puro, por lo que eligieron cuatro fracciones anteriores y tres posteriores del aislamiento de éste.

Las fracciones utilizadas para esta determinación se indican en el tabla 13 y los microorganismos utilizados corresponden a cuatro cepas diferentes de de *Vibrio cholerae*.

Tabla 13. Fracciones utilizadas de TD-9

CLAVE DE FRACCIONES	NO. DE LAS FRACCIONES
A	86 – 87
B	88 – 89
C	90 – 91
D	92 – 93
3 β ,20,28-trihidroxiupano	94 – 95
E	96 – 97
F	98 – 99
G	100-101

La evaluación de las fracciones de TD-9, se realizó también mediante la técnica de difusión en agar; por tratarse de fracciones, se impregnan los sensidiscos de 1000 μ g de cada una de estas, solubilizándolo con 20 μ L de MeOH respectivamente. Se prueban con cuatro cepas diferentes de *V. cholerae*: No 01, aislada de agua, caso clínico y la tor. Se utiliza como control positivo el cloramfenicol y como negativo el MeOH. En la tabla 14 se observa que las fracciones D y E, al ser las más cercanas al compuesto activo, muestran una actividad parecida frente a las cuatro cepas de *Vibrio cholerae* analizadas, y que es aún mayor la actividad de la fracción D que el compuesto activo.

Tabla 14 . Actividad del 3 β ,20,28-trihidroxilupano y fracciones similares probadas en cuatro cepas de *Vibrio cholerae*

Compuesto Y/o fracciones (1000 μ g)	<i>Vibrio cholerae</i>			
	Cepa 1 No O1	Cepa 2 agua	Cepa 3 c. clínico	Cepa 4 tor
3 β ,20,28-trihidroxilupano	19 mm	9 mm	7 mm	13 mm
A	—	7 mm	—	—
B	—	—	—	—
C	—	—	—	—
D	17 mm	17 mm	21 mm	9 mm
E	19 mm	7 mm	7 mm	13 mm
F	—	—	—	—
G	—	—	—	—
Control positivo	24,3 mm	24,3 mm	19,3 mm	22,7 mm
Control negativo	—	—	—	—

(-) no hubo inhibición

8.2.4. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 3 β ,20,28-trihidroxilupano.

La CMI del compuesto activo fue determinada mediante la microtécnica de dilución en caldo. Se utilizaron diez concentraciones del compuesto, indicadas en la tabla 15, que van de 1.95 a 1000 μ g/mL, y que están representadas en las placas de ELISA con números. Las placas fueron inoculadas con una suspensión de m.o a una densidad de 10⁵ bacterias/mL. Los valores de CMI fueron tomados después de 24 h incubadas a 37°C, observando completamente la inhibición del crecimiento de la bacteria. Fue utilizado el cloramfenicol como testigo positivo, mientras que el solvente fue usado como testigo negativo. Cada experimento fue realizado por triplicado y está representado con las letras colocadas verticalmente en las placas.

Tabla 15. Concentraciones utilizadas para la determinación de la CMI ($\mu\text{g/mL}$)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1000	500	250	125	62.5	31.25	15.625	7.8125	3.9062	med + bac + sol	med + bac	med + sol

El cambio de coloración de incoloro a violeta, observado en las placas de la figura 10 y 11, indican el desarrollo del m.o (violeta), hasta una cierta concentración, mientras que la parte incolora es en donde ya no existe vitalidad.

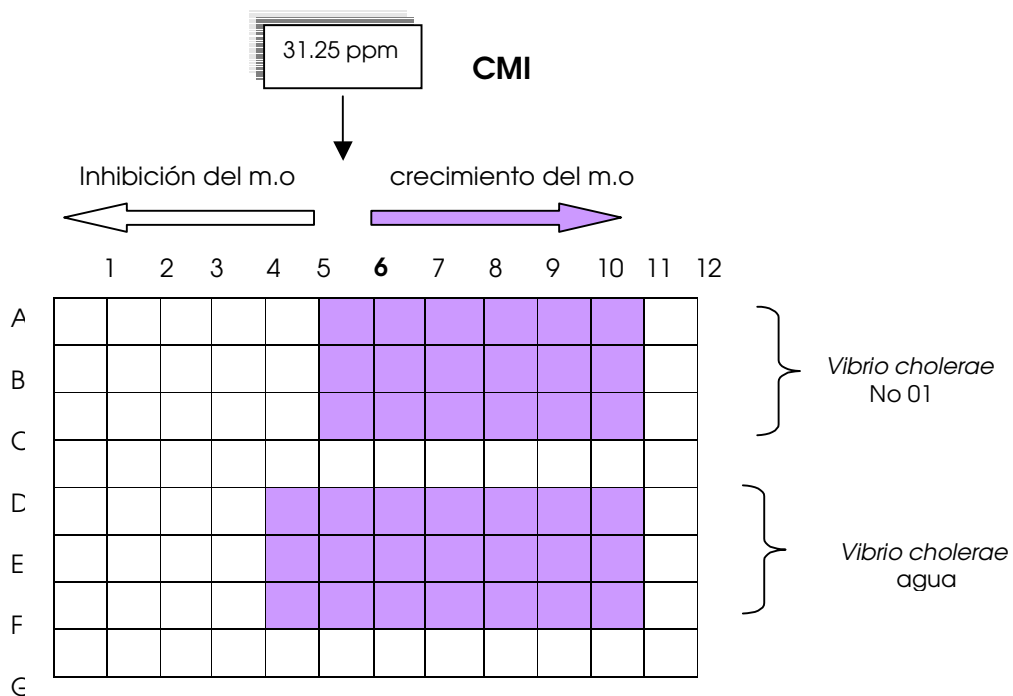


Figura 10. Determinación de la CMI del β ,20,28-trihidroxiilupano en placas de ELISA

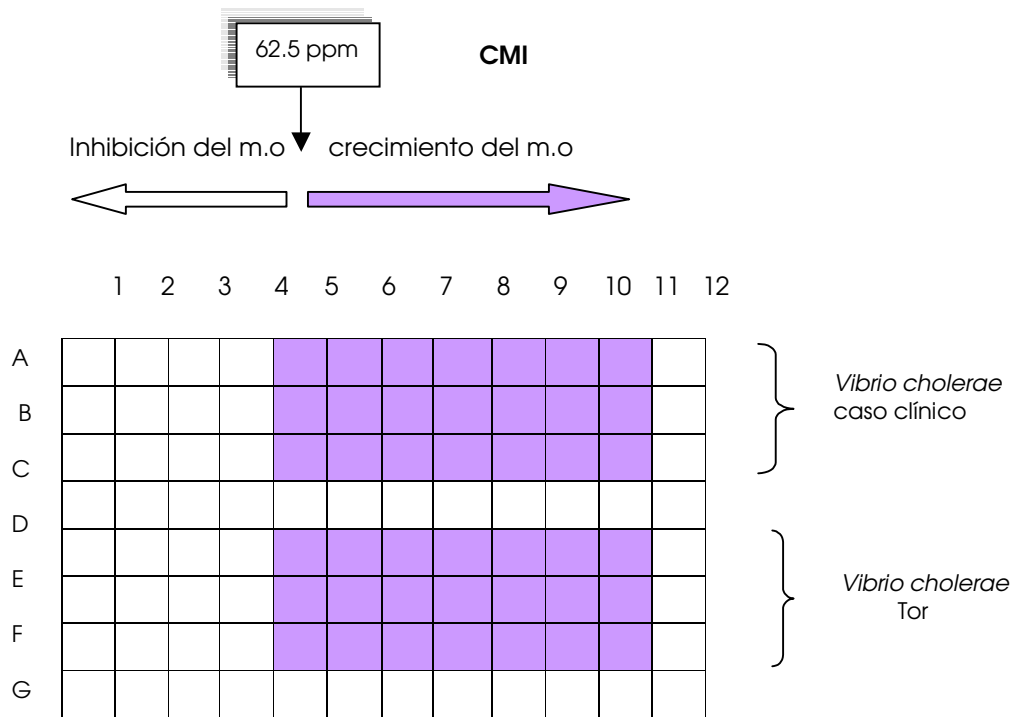


Figura 11. Determinación de la CMI del $\beta,20,28$ -trihidroxilupano en placas de ELISA

En la tabla 16, se indican los valores de CMI para las cuatro cepas de *Vibrio cholerae* del $3\beta,20,28$ -trihidroxilupano.

Tabla 16. Concentración Mínima Inhibitoria de las cuatro cepas de *Vibrio cholerae*.

CEPA	V.CHOLERAEE NO O1	V.CHOLERAEE AGUA	V.CHOLERAEE CASO CLÍNICO	V.CHOLERAEE TOR
MIC Concentración (ppm)	31.35	62.5	62.5	62.5

9. CONCLUSIONES

De los resultados del presente trabajo realizado a *Salvia rupicola* se concluye lo siguiente:

1. Se aislaron tres compuestos de tipo triterpénico del extracto CH_2Cl_2 de tallos identificados como β -sitosterol, Ácido oleanólico y $3\beta,20,28$ -trihidroxilupano ya aislado de diferentes géneros y diversas familias.
2. El compuesto mayoritario presente en *Salvia rupicola* fue el $3\beta,20,28$ -trihidroxilupano presente en el extracto CH_2Cl_2 de tallos y CH_2Cl_2 de hojas.
3. De este estudio químico fueron aislados también compuestos inorgánicos como sales y un azúcar, de los extractos polares.
4. La evaluación antimicrobiana realizada a cinco extractos crudos demostró que éstos como tales no muestran actividad antibacteriana ni antifúngica.
5. El compuesto puro $3\beta,20,28$ -trihidroxilupano fue el único activo contra las cuatro cepas de *Vibrio cholerae*.
6. Se determinó una CMI de 62.5 ppm para el $3\beta,20,28$ -trihidroxilupano al ser probado contra *Vibrio cholerae* agua, *Vibrio cholerae* c. clínico y *Vibrio cholerae* tor, mientras que para *Vibrio cholerae* No. 01 la CMI fue de 31.25 ppm.

10. REFERENCIAS

- Abdalla M.E.**, Abdelk., Sabri N y Stermiz F.R. (1995). Lanigerol: A new Antimicrobial Ictetexane Diterpene from *Salvia lanigera*. *Planta Médica*. 61: 559-560.
- Barry A.L.** y Thornsberry C. (1987). Pruebas de susceptibilidad: Técnicas para pruebas de difusión. Lennette, E.H. Manual de microbiología clínica clínica. 4ª. Edición. Edit. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina, pp. 561-574.
- Begit W.J.** y Kline R.M. (1972). The use of tetrazolium salt in biotographic procedures. *Journal of Chromatography*. 64; 182-183.
- Benítez, G.** (1986). "Arboles y Flores del Ajusco". Instituto de Ecología, M.H.N, México D.F.
- Bruneton J.** (1999). "Pharmacognosy Phytochemistry Medicinal Plants". 2a Edición. U.S.A: Londres Edit. tee dos. pp. 540-543.
- Cárdenas J.**, Esquivel B., Toscano R.A., Rodríguez-Hahn L. (1988). Languiduline, a diterpenoid with an unusual structure from *Salvia languidula*. *Heterocycles*: 27, 1809-1812.
- Cárdenas J.**, Pavón., Esquivel B., Toscano A., Rodríguez H.L. (1992). Salvilanguidulines, four new diterpenoids isolated from *Salvia languidula* with an unusual epoxy spiro g-lactone. *Tetrahedron Letters*: 33, 581-584.
- Cuevas G.**, Collera O., García F., Cárdenas J., Maldonado E., Ortega A. (1987). Diterpenes from *Salvia breviflora*. *Phytochemistry* 26: 2019-2021.
- Cutler J.S.**, Cutler H.G. (2000). "Biologically active natural products: pharmaceuticals." Washington, D.C: CRS Press Boca Raton London New York, pp. 95 – 107.
- Dimayuga, R.E.**, Keer-García, S. (1991). Antimicrobial Screening of Medicinal Plants from Baja California Sur, México. *Journal of Ethnopharmacology*. 31: 181-192 .
- Epling C.** (1939). A revision of *Salvia* subgenus Calosphace. *Repert. Nov. Regni. Veg. Beih*: 110, pp. 1-383.

Esquivel B., Cárdenas J., Toscano R.A., Soriano-García M., Rodríguez-Hahn L. (1985). Structure of salvigenolide, a novel diterpenoids with a rearranged neo-clerodane skeleton from *Salvia fulgens*. *Tetrahedron* 41: 3213-3217.

Esquivel B., Méndez A., Ortega S., Toscano R.A., y Ramamoorthy T.P. (1985a). Neo-clerodane-type diterpenoids from *Salvia keerlii*. *Phytochemistry* 24: 1769-1772.

Esquivel B., Hernández M., Ramamoorthy T.P., Cárdenas J., Rodríguez-Hahn L. (1986). Semiatriin, a neo-clerodane diterpenoid from *Salvia semiatratha*. *Phytochemistry* 25: 1484-1486.

Esquivel B., Cárdenas J., Ramamoorthy T.P., Rodríguez-Hahn L. (1986a). Clerodane diterpenoids of *Salvia lineata*. *Phytochemistry* 25: 2381-2384.

Esquivel B., Cárdenas J., Rodríguez-Hahn L., y Ramamoorthy T.P. (1987). The diterpenoid constituents of *Salvia fulgens* and *Salvia microphylla*. *Journal of Natural Products* 50: 738-740.

Esquivel B., Ochoa J., Cárdenas J., Ramamoorthy T.P., Rodríguez-Hahn L. (1988). Clerodane-type diterpenoids from *Salvia sousae*. *Phytochemistry* 27: 483-486.

Esquivel B., Vallejo A., Gaviño R., Cárdenas J., Sánchez A.A., Ramamoorthy T.P., Rodríguez-Hahn L. (1988a). Clerodane diterpenoids from *Salvia melissodora*. *Phytochemistry* 27: 2903-2905.

Esquivel B., Cárdenas J., Sánchez A.A., Ramamoorthy T.P., Toscano R.A., Rodríguez-Hahn L. (1991). Clerodane and seco-clerodane diterpenoids from *Salvia reptans*. *Phytochemistry* 30: 2335-2338.

Esquivel B., Flores M., Hernández-Ortega S., Toscano R.A., y Ramamoorthy T.P. (1995). Abietane and icetexane diterpenoids from the roots of *Salvia aspera*. *Phytochemistry* 39: 139-143.

Esquivel B., Calderón J.S., Sánchez A.A., Ramamoorthy T.P., Flores E.A y Domínguez R.M. (1996). Recent Advances in Phytochemistry an Biological activity of Mexican Labiatae. *Rev. Latinoamer. Quím.* 24/2, pp. 44-64.

Esquivel R.B. (1998). Estudio quimiotaxonómico de la sección fulgentes del Genero *Salvia*. UNAM. Instituto de Química, D.F. Tesis de Maestría.

Esquivel B., Sánchez A.A., y Aranda E. (2000). Natural Products of Agrochemical Interest from Mexican Labiatae. En: *Phytochemicals and Phytopharmaceutical*. (Fereidoon Shahidi y Chi-Tanhlto). Pp. 371-385.

Fabricant D.S. y Farnsworth N.R. (2001). The value plant used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspective* 2 (1): 69-75.

Fernández M.C., Esquivel B., Cárdenas J., Sánchez A.A., Toscano R.A., Rodríguez-Hahn L. (1991). Clerodane and aromatic seco-clerodane diterpenoids from *Salvia rhyacophila*. *Tetrahedron*: 47, 7199-7208.

Fuchino H., Satoh T. y Tanaka N. (1996). Chemical Evaluation of Betula Species in Japan III. Constituentes of *Betula maximowicziana*. *Chem. Pharm. Bull*, 44: 1748-1753.

Galicia M.A., Esquivel B., Sánchez A.A., Cárdenas J., Ramamoorthy y Rodríguez-Hahn. (1988). Abietane diterpenoids from *Salvia pubescens*. *Phytochemistry*, 27: 217-219.

García-Alvarez M.C., Hasan M., Michavila A., Fernández G.F., Rodríguez B. (1986). Epoxysalviacocin, a neo-clerodane diterpenoid from *Salvia plebeia*. *Phytochemistry*. 25: 272-274.

García Yllescas Adriana. (1987) Constituyentes Terpénicos de *Salvia Kerlii* Benth. Tesis de Licenciatura. México D.F. ENEP Zaragoza. UNAM .

Gisho H. (1988). Isolation of an antidermatophytic substance from the roots of *Salvia miltiorrhiza*. *Chem. Pharm. Bull.* 36 : 408-411.

González A.G., Herrera J.R., Luis J.G., Ravelo A.G., Ferro E.A. (1988). Terpenes and flavones of *Salvia cardiophylla*. *Phytochemistry*: 27, 1540-1541.

González G. A., Abad T., Jiménez A.I., Ravelo G.A., Zahira J.G. y Moujir. (1989). A First study of antibacterial activity of diterpenes isolated from some *Salvia* species (Lamiacea). *Biochemical Systematics and Ecology*: 17, (4), 293-296.

Gros G, E., Pomilio B.A., Seldes M.A. y Burton G. (1985). " Introducción al estudio de los Productos Naturales". Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Buenos Aires, Argentina , pp.25-30, 94-96.

Hamburger M. , Hostettmann K. (1991). Bioactivity in Plants: The link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*. 30: 12, 3864-3874.

- Hassan M.G.**, Ghulam A y Deep M.S.H. (1987). Terpenoids from *Salvia lanigera*. *Phytochemistry*, 26: 1091-1093.
- Hernández P.M.**, Rabanal R.M., De la Torre M. y Rodríguez B. (1995). Analgesic, Anti-Inflammatory, Antipyretic and Haematological Effects of Aethiopinone, an O-Naphthoquinone Diterpenoid from *Salvia aethiopsis* Roots and two Hemisynthetic Derivatives. *Planta Medica* 61: 505-509.
- Hofmann, A.** (2003). "In search of the Magic Plant "Ska Maria Pastora" in the Mazatec Country". *Salvia divinorum*, Vol.1. 6-7.
- Janssen M.**, Scheffer J.J.C. y Svendsen A.B. (1987). Antibacterial activity of essential oils: a 1976-1986 literature review. Aspects of the test methods. *Planta Médica*. 395-398.
- Javier G.L.**, Quiñones W., Echeverri F. (1994). Tilifolidione, a cycloheptanenaphthoquinone-type diterpenoid of abietanic origin from the roots of *Salvia tiliaefolia*. *Phytochemistry* , 36: 115-117.
- Kolak U.S.**, Ari S., Birman H., Hasancebe S., Ulubelen A., (2001). Cardioactive diterpenoids from the roots of *Salvia amplexicaulis*. *Planta médica*. 67: 761-763.
- Koneman W. E.** "Diagnóstico microbiológico. Texto y atlas de color". México: Médica panamericana, 1996: 565-617.
- Laila M. et al.** (1993). Structure-Antimicrobial activity relation ships of abietane diterpenes from *Salvia* species. *Phytochemistry*, 34: 1993-1995.
- Lara O. F.**, y Márquez A. C. "Plantas Medicinales de México, Composición, Usos y Actividad Biológica". Vol. I. Ed. UNAM, DGP, C.U., México D.F. 1996.
- Lu Y.**, Yeap F.L. (2001). Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry*, 75: 197-202.
- Lu Y.**, Yeap F.L. (2002). Polyphenolics of *Salvia*—a review, *Phytochemistr*, 59: 117-140
- Mahasneh A.M.** y El-Oqlah A.A. (1999). Antimicrobial activity of extracts of herbal plants used in the traditional medicine of Jordan. *Journal of Ethnopharmacology*, 64: 271-276.

- Maldonado E.**, Cárdenas J., Salazar B., Toscano R.A., Ortega A., Jankoski C.K., Aumelas A., Van Calsteren M.R. (1992). Salviandulina C, a 5,6-secoclerodane diterpenoid from *Salvia lavanduloides*. *Phytochemistry* 31: 217-220.
- Márquez C.**, Lara F., Esquivel B., Mata R. (1999). "Plantas Medicinales de México, Composición, Usos y Actividad Biológica". Vol II. Ed. UNAM.
- Michavila A.**, Fernández-Gadea y Rodríguez B. (1985). Abietane diterpenoids from the root of *Salvia lavandulaefolia*, *Phytochemistry* 25: 266-268.
- Miura K.**, Kikuzaki H., Nakatani N. (2001). Apianane terpenoids from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry*, 58: 1171-1175.
- Ning W.**, Masatake N., Hou-Wei L. (1988). Triterpenoids from *Salvia przewalskii*. *Phytochemistry*, 27: 299-301.
- Ortega A.**, Blount J.F. y Manchand P.S. (1982). Salvinorin, a new trans-neoclerodane diterpene from *Salvia divinorum* (Labiatae). *J. Chem. Soc. Perkin. Trans: I*, 2505-2508.
- Ortega A.**, Cárdenas J., Toscano A., Maldonado E., Aumelas A., Van Calsteren M.R., Jankowski C. (1991). Salviandulines A and B. Two secoclerodane diterpenoids from *Salvia lavanduloides*. *Phytochemistry*, 30: 3357-3360.
- Overton K. H.** (1979). Terpenoids and Steroids. *The Chemical society, Londres*. Vol. 9, pag. 5.
- Pereda-Miranda R.** (1986). New Triterpenoids from *Salvia nicolsoniana*. *Journal of Natural Products*, 49: 225-230.
- Ríos J.L.**, Recio M.C. y Villar A. (1988). Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*, 23: 127-149.
- Rodríguez-Hahn L.**, Esquivel B., Sánchez A.A., Cárdenas J., Soriano G. M., Toscano R.A. (1988). Puberulin and isopuberulin, benzonorcaradiene and benzocycloheptatriene diterpenoid of clerodanic origin from *Salvia puberula*. *J. Org. Chem*: 53, 3933-3936.

Rodríguez-Hahn L., Oreilly., Esquivel B., Maldonado E., Ortega A., Cárdenas J., Toscano R.A. (1990). Tilifodiolide, tetraline-type diterpenoid of clerodanic origin from *Salvia tiliaefolia*. *J. Org. Chem.*: 55, 3522-3525.

Rodríguez-Hahn L., Alvarado G., Cárdenas J., Esquivel B., Gaviño R. (1994). Neo-clerodane diterpenoids from *Salvia madrensis*. *Phytochemistry*: 35, 447-450.

Rodríguez-Hahn L., Esquivel B y Cárdenas J. (1995). Neoclerodane diterpenoids from american *Salvia* species. En: *Recent advances in phytochemistry of Medicinal Plants*: 29 (Arnason, Mata y Romeo), Plenum press New York and London. pp. 311-332.

Rodríguez Santos M. (1996). Estudio Fitoquímico de *Salvia tenoriana* RAMAMOORTHY. Tesis de Licenciatura. México. Escuela de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma de Oaxaca. pp. 55.

Rojas A., Hernández L., Pereda-Miranda R., y Mata R. (1992). Screening for antimicrobial activity of crude drug extracts and pure natural products from Mexican medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 35: 275-283.

Rzedowski J. y Rzedowski G. "Flora fanerogámica del Valle de México". Vol. 2. México: ENCB, IPN, 1985: 290-,298-300, 304-305.

Sánchez A.A., Esquivel B., Pera A., Cárdenas J., Soriano-García M., Toscano A., Rodríguez-Hahn L. (1987). Lasianthin, a neo-clerodane diterpenoid from *Salvia lasiantha*. *Phytochemistry* 26: 479-482.

Sánchez A.A., Esquivel B., Ramammorthy T.P y Rodríguez-Hahn (1995). Clerodane diterpenoids from *Salvia urolepis*. *Phytochemistry*, 38 : 171-174.

Savona G., Paternostro M.P., Piozzi F., Hanson J.R., Hitchcock P.B., Thomas S.A. (1978). Salviarin, a new diterpenoid from *Salvia splendens*. *J. Chem. Soc. Pekin Trans*, 1: 643-646.

Savona G., Paternostro M.P., Piozzi F., Hanson J.R. (1979). Splendidin, a new trans-clerodane from *Salvia splendens*. *J. Chem. Soc. Pekin Trans*, 1: 533-534.

Savona G., Bruno M., Paternostro M.P., Marco J.L., Rodríguez B. (1982). Salviacocchin, a neo-clerodane diterpenoid from *Salvia coccinea*. *Phytochemistry*. 21: 2563-2566.

- Savona G.**, Raffa D., Bruno M., Rodríguez B. (1983). Salvifarin and salvifaricin, neo-clerodane diterpenoids from *Salvia farinacea*. *Phytochemistry*, 22: 784-786.
- Savona G.**, Bruno M, Rodríguez B y Marco J.L. (1987). Triterpenoids from *Salvia deserta*. *Phytochemistry*, 26: 3305-3308.
- Sidney M.**, Finegold. (1983). "Diagnóstico microbiológico". Edit. Médica Panamericana, 6ta. Edición. Argentina. Pp. 513-523.
- Silva M.**, et al (1992). "Química de los Triterpenos". Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Concepción, Chile. Pp. 346.
- Tepe B.**, Daferera D., Sokmen A., Sokmen M., Polissiou M. (2003). Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). *Food Chemistry* 1: 1-8.
- Tepe B.**, Donmez E., Unlu M., Candan F., Daferera D., Vardar-Unlu G., Polissiou M., Sokmen A. (2004).Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha*(Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). *Food Chemistry*, .84: 519-525.
- Trease-Evans** W. (1991). "Farmacognosia" 13ª. Edición. México: Interamericana Mc Graw-Hill. 1991: 728-730.
- Tsichriteis F.** y Jakupovic (1990). Diterpenes and other constituents from *Relhania* species. *Phytochemistry*, 29: 3173-3187.
- Ulubelen A.**, Miski M., Johansson Lee E., Mabry T.J., Matli S.A. (1985). Terpenoids from *Salvia palaestina*. *Phytochemistry*. 24: 1386-1387.
- Ulubelen A.** (1988). Diterpenoids from the roots of *Salvia hypargeia*. *Journal of Natural Products*, 51: 1178-1183.
- Ulubelen A.** y Topcu G. (1992). Diterpenoids from *Salvia* species and their pharmacological activities. En: "Advances in Natural Product Chemistry". (Atta-ur-Rahman), Switzerland. Harwood academic publisher : 363-381, 659-718.
- Ulubelen A.**, Tan Nur, Sanmez U y Topcu G. (1998). Diterpenoids and triterpenoids from *Salvia multicaulis*. *Phytochemistry*, 47: 899-901.

Ulubelen A. y Topcu G. (1998). Chemical and biological investigations of *Salvia* species Growing in Turkey. En: *Studies in Natural Products Chemistry*. (Atta-ur-Rahman). "Advances in Natural Product Chemistry". Harwood academic publisher. Vol. 20, 659-719.

Ulubelen A., Oksuz S., Topcu G. Goren A.C., Voelter W. (2001). Antibacterial diterpenes from the roots of *Salvia blepharochlaena*. *Journal of Natural Products*. 164: 549-551.

Ulubelen A., Oksuz S., Topcu G. Goren A.C., Bozoc-*Johansson C., Celik C., Kokdil G., Voelter W., (2001a). A new antibacterial diterpeno from the roots of *Salvia caespitosa*. *Natural Product Letters*. 15: 1-8.

Ulubelen A. (2003). Cardioactive and antibacterial terpenoids from some *Salvia* species. *Phytochemistry*, 64: 395-399.

Váldes III, Butler L.J., Hatfield W.M., Paul G.M., Koreeda A.G. (1984). Divinorin A, a psychotropic terpenoid, and divinorin B from the hallucinogenic mexican mint *Salvia divinorum*. *J. Org. Chem.* 49: 4716-4720.

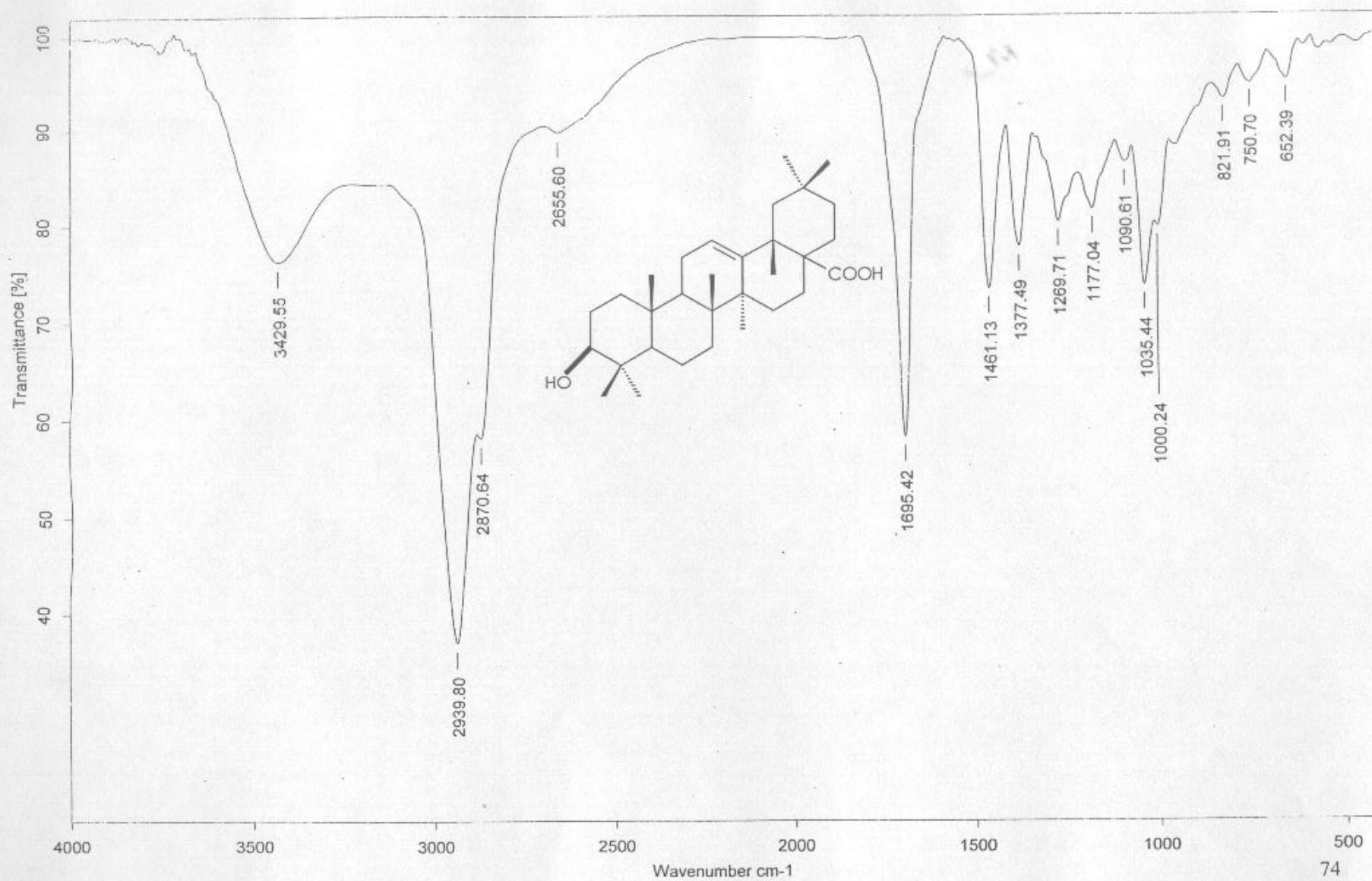
Valverde S., Escudero J, Cristóbal L.J, Rabanal R.M (1985). Two terpenoids from *Salvia bicolor*. *Phytochemistr*, 24: 111-113.

Vanden Berghe, D.A. and Vlietinck, A.S. (1991). Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. En: *Methods in plant biochemistry*. Vol. 6 "Assays for bioactivity". Edit. Hostettmann, K. Series (editor Dey P.M.). Academic Press. New York, USA. Pp. 47-71.

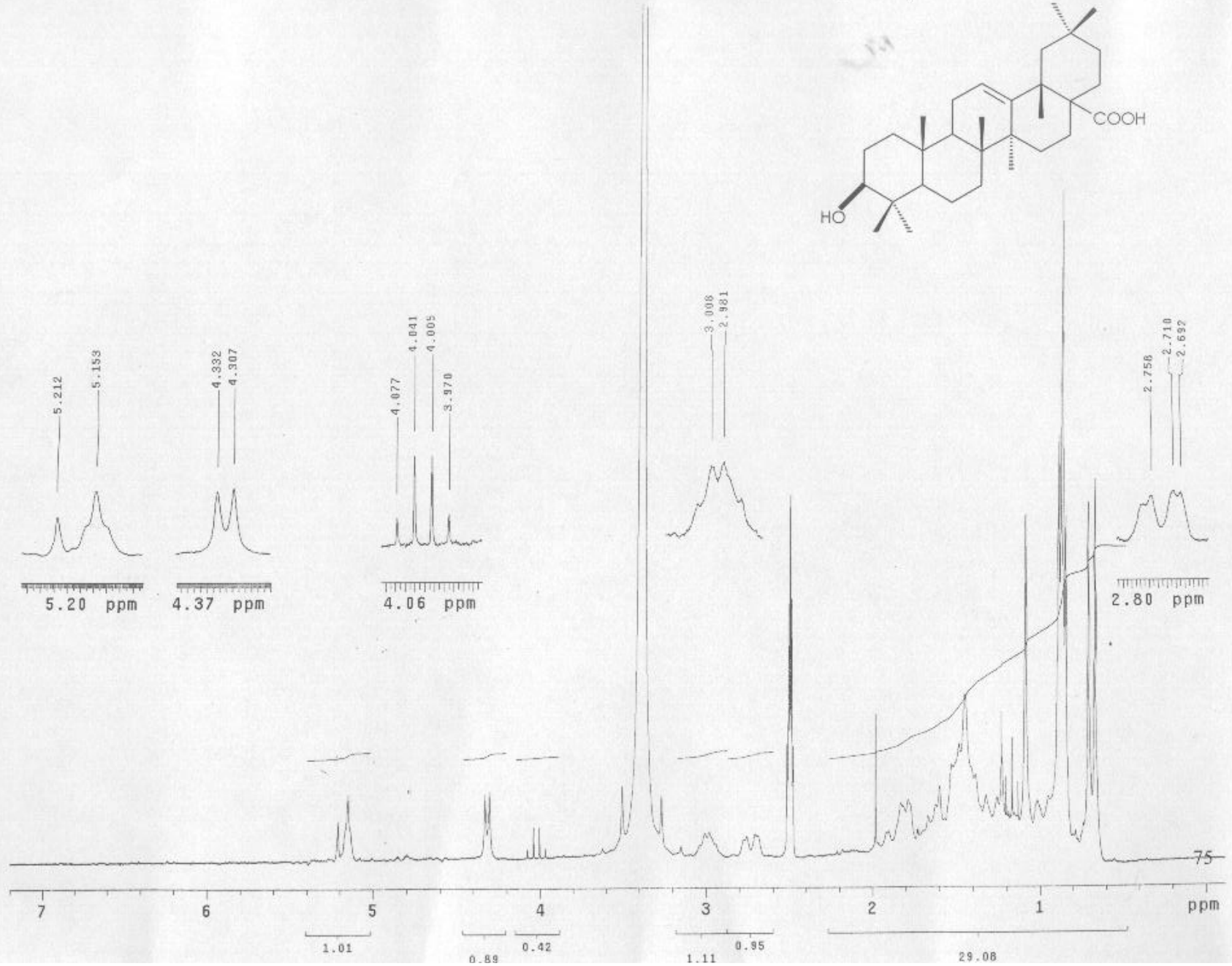
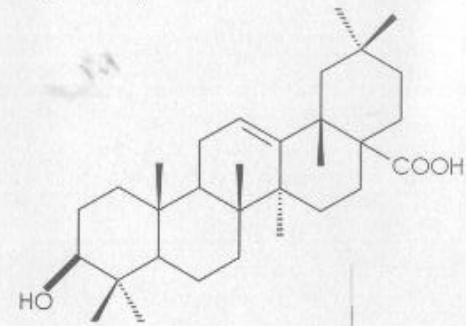
Werner S., Nebojsa S., Robert W., Robert S. y Olaf K. (2003). Spectral Assignments and Reference Data. *Magnetic Resonance in Chemistr*, 41: 636-638.

Wagner y Wolff P. (1976). "New Natural Products and Plant Drugs witch Pharmacological Activity". New York: Springer-verlag Berlin Heidelberg, pp. 82-87.

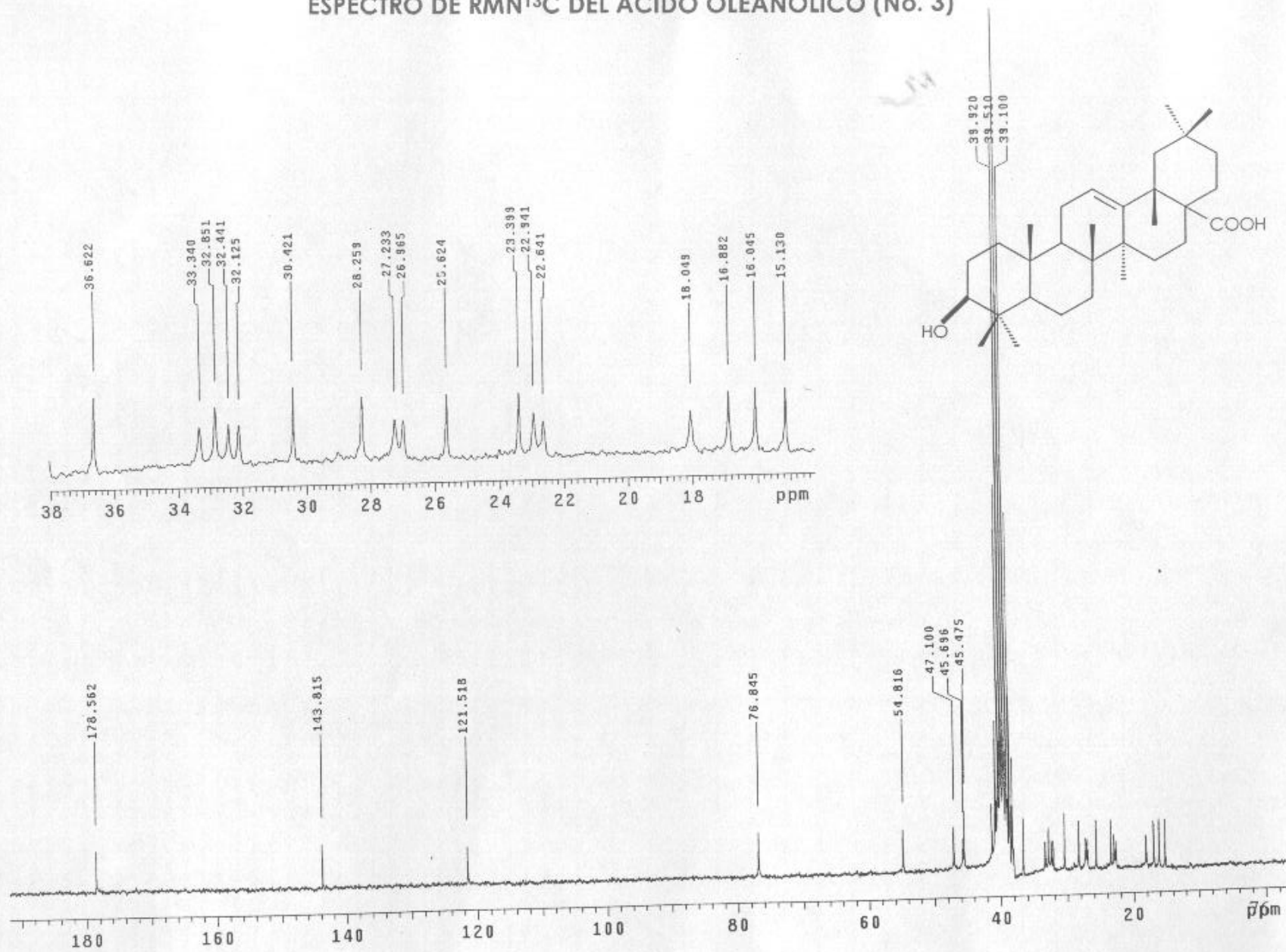
ESPECTRO DE IR DEL ÁCIDO OLEANÓLICO (No. 1)



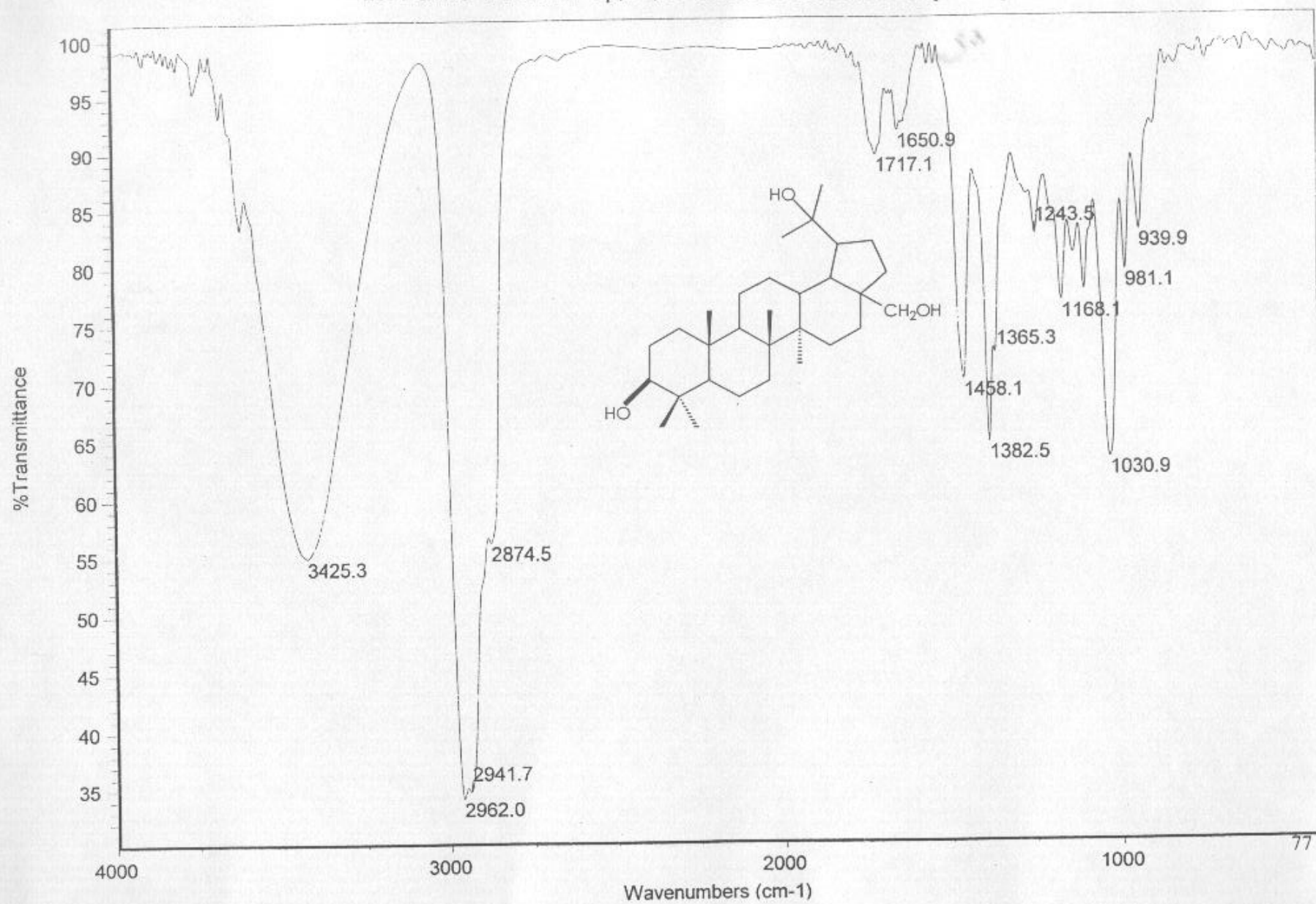
ESPECTRO DE RMN¹H DEL ÁCIDO OLEÁNOLICO (No. 2)



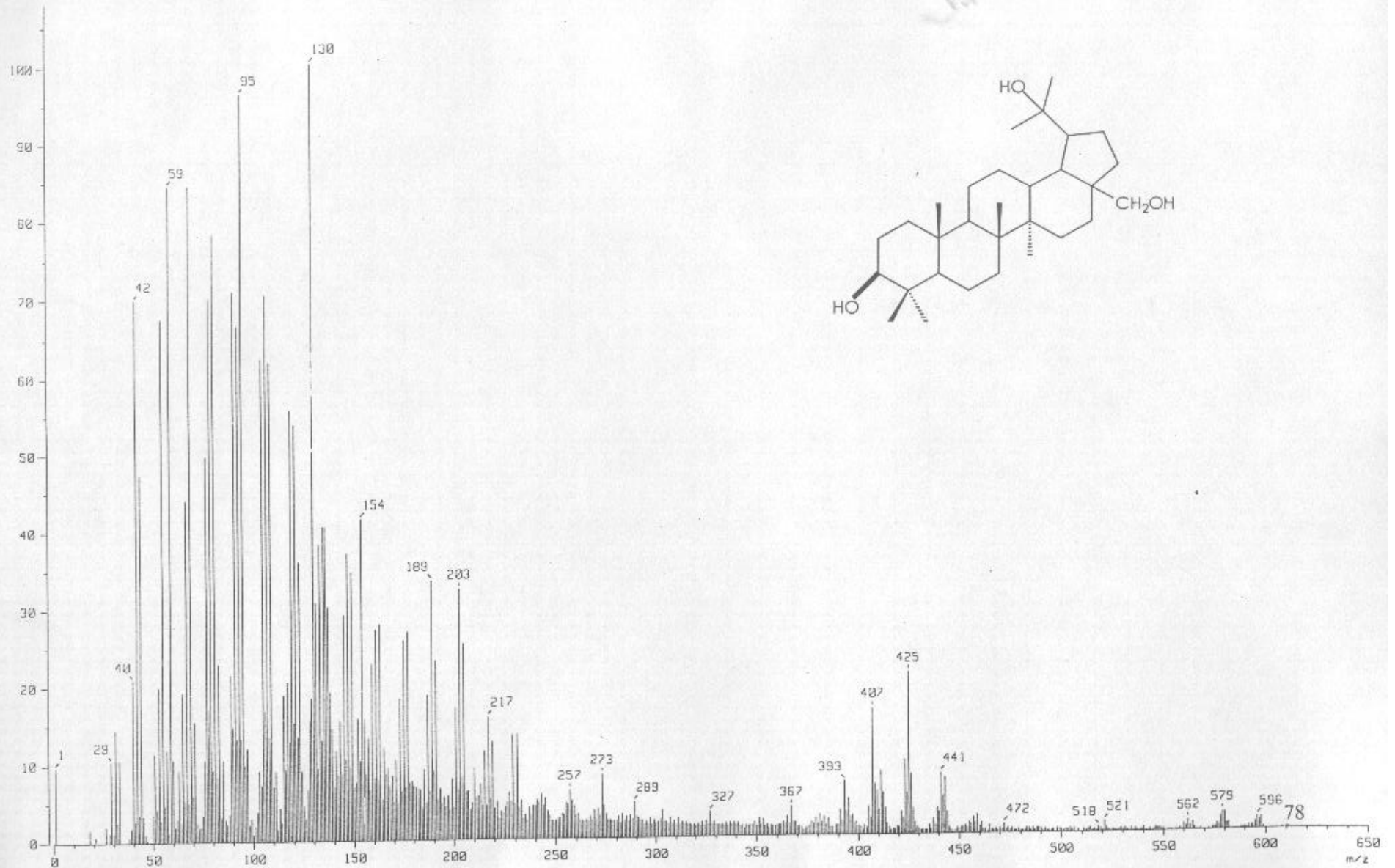
ESPECTRO DE RMN¹³C DEL ÁCIDO OLEÁNOLICO (No. 3)



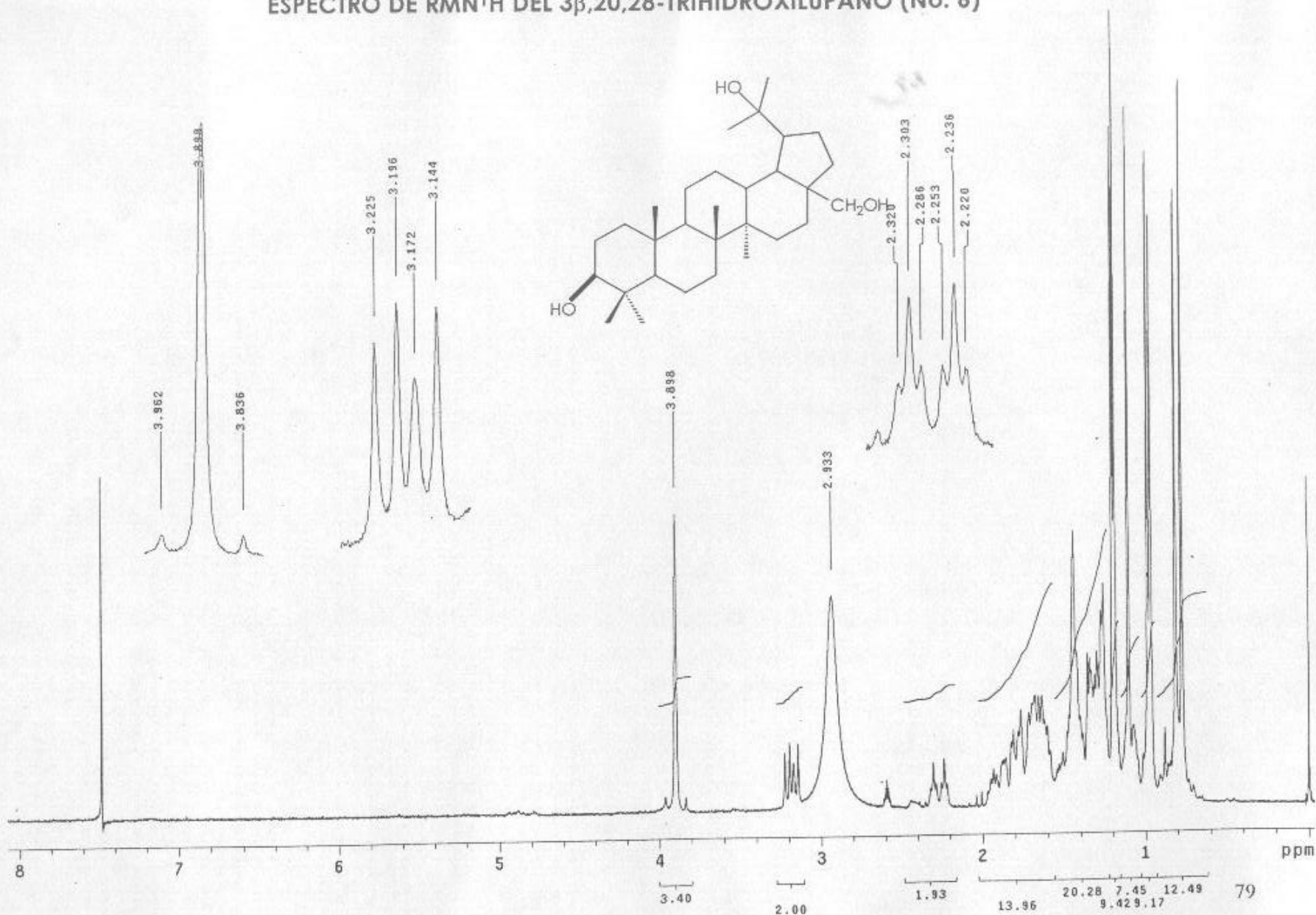
ESPECTRO DE IR DE 3 β ,20,28-TRIHIDROXILUPANO (No. 4)



ESPECTRO DE EM (IE) DEL 3 β ,20,28-TRIHIDROXILUPANO (No. 5)



ESPECTRO DE RMN¹H DEL 3 β ,20,28-TRIHIDROXILUPANO (No. 6)



ESPECTRO DE RMN¹³C DEL 3 β ,20,28-TRIHIDROXILUPANO (NO. 7)

