



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

**“AISLAMIENTO, DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL Y EVALUACIÓN
DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE METABOLITOS SECUNDARIOS
PROVENIENTES DE *Salvia axilliaris*”**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO**

PRESENTA

LUIS EDUARDO MORENO JIMÉNEZ



CIUDAD DE MÉXICO

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: HECTOR GARCIA ORTEGA
VOCAL: Profesor: ELIZABETH REYES LOPEZ
SECRETARIO: Profesor: LEOVIGILDO QUIJANO
1er. SUPLENTE: Profesor: CLAUDIA INES RIVERA CARDENAS
2° SUPLENTE: Profesor: TANIA ROJO PORTILLO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 2-6, DEPARTAMENTO DE PRODUCTOS NATURALES DEL INSTITUTO DE QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Leovigildo Quijano

SUPERVISOR TÉCNICO (Si lo hay):

Dra. Celia Bustos BRITO

SUSTENTANTE (S):

Luis Eduardo Moreno Jiménez

***A la memoria de Dolores Natalia, José Luis y Sara,
con todo mi amor.***

***La vida son todos esos bellos momentos que compartimos con nuestros
seres queridos.***

Agradecimientos

Al Dr. Leovigildo Quijano por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por todas las enseñanzas y el apoyo brindado.

Al Dr. Héctor García Ortega y a la Dra. Elizabeth Reyes López por tomarse el tiempo para revisar este trabajo y hacerme las correcciones necesarias.

A la Facultad de Química por haberme dado la formación, los conocimientos y los recuerdos que estarán conmigo hasta mis últimos días.

Al Instituto de Química por aceptarme como un alumno de la institución, por los cursos y oportunidades de seguir aprendiendo.

A todos los técnicos y académicos del Instituto de Química de los laboratorios analíticos que me apoyaron a la realización de este trabajo.

A CONACYT por el apoyo brindado como ayudante de investigador.

Dedicatorias

A mis padres Elsa Lucia Jiménez Castañeda y José Luis Moreno Montes de Oca por todo el apoyo, amor, comprensión, regaños y oportunidades que me han brindado, por ser un ejemplo de constancia y dedicación, porque mucho de lo que soy ahora se los debo a ustedes, gracias.

A mi madrina Araceli Esther Jiménez Castañeda y a mi tía Luz Mercedes Jiménez Castañeda que las dos han sido como una segunda madre para mí, que siempre han velado por mi salud, bienestar y felicidad, que me han dado todo su apoyo incondicional y amor.

A mis tíos: Alejandro, Abel, Enrique, Paul, Erick, José Luis, Salvador, a mis tías: Verónica, Irene, Elvia, Perla, Yanin, Judit, a mis primos: Christopher, Diego, Isis, Saraí, Paulina, Vianney, Judit, Ingrid, Salvador, Michell y Guadalupe. A todos ellos por estar en las buenas y en las malas y apoyarnos como familia.

A Estefanía Leonor Rosas Cortina por todo el amor y apoyo que me ha dado en casi 3 años, por ayudarme a ser mejor y no dejarme rendirme en los malos ratos, por todos esos lindos momentos juntos que espero nunca acaben.

A mis mejores amigos de la secundaria Sandra Ávila, Miriam Aguilar, Abdiel Hernández y Paola Fernández por acompañarme durante 10 años de mi vida en muchas aventuras llenas de alegría y amor, espero que nuestra amistad dure muchos años más.

A mis mejores amigos de la prepa Tonalí Vásquez, Rodolfo Rivera, Edwin Pineda, Axel Galicia y Andrés Carrasco, con los que pasé el mejor año de la prepa y tengo la fortuna de seguir contando con su bella amistad y apoyo incondicional.

A Scarlett de la Cruz, Jimena Escalona y Emilio Castañeda que, aunque los conocí mucho después, agradezco a Miriam el que los haya introducido a mi vida, porque con ustedes también he vivido muchas aventuras y les tengo mucho aprecio.

A mis amigos de la universidad Berenice, Daniela, Liliana, Fernanda, Sebastián, David, Ismael, Jimena Valeria, Karla Fany, Mariela, Uziel, Daniel, Jacobo, Lalo, Eduardo, Jorge, Miguel, Eliud, Alejandro, Koke, Carlos, Felipe, Luis, Gustavo y

a todos los demás con los que conviví en la facultad y de una u otra manera nos apoyamos para terminar esa etapa de nuestras vidas.

A mis amigos del Instituto de Química con los que en tan poco tiempo compartí muchas bellas experiencias y que también me apoyaron hasta el final; Roció Aguilar, Mariana López, Ricardo Gómez, Valeria Vázquez, Elizabeth Hernández, Enrique Serrano, Jaqueline Medina, Manuel Morales, Victoria Vergara, Adriana Cedillo, Enrique Aguilar, Jade Zacatenco, Blanca Martínez, Priscila Arcos, Diego Coporo.

A mis profesores que me enseñaron todo lo necesario para llegar a este momento, que me apoyaron y me inspiraron a continuar; Dr. Mario Alfredo Carrillo García, Dr. Ricardo Martínez Galicia, Dra. Lorena de Anda, Dra. Kira Padilla, Dr. Fernando Colmenares Landin, Dr. José Luz González Chávez, Dra. Selena Gutiérrez Flores, Dr. Marcos Martínez, Dr. Marcos Hernández, Dra. Elizabeth Reyes López, Dr. Gustavo Zelada Guillen, Dr. Salvador Guadalupe Hernández Vargas.

Índice

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tablas

1. Introducción.....	14
2. Antecedentes.....	15
2.1 Productos Naturales.....	15
2.2 Importancia de los productos naturales.....	16
2.2.1 Anticancerosos.....	17
2.2.2 Antioxidantes.....	18
2.3 Generalidades de la Familia Lamiaceae.....	19
2.4 Importancia de la Familia Lamiaceae.....	22
2.5 Género <i>Salvia</i>	26
2.6 Importancia del género <i>Salvia</i>	28
2.7 Metabolitos comunes producidos en especies del género <i>Salvia</i>	29
2.7.1 Terpenos.....	30
2.7.2 Ácidos fenólicos.....	32
2.8 <i>Salvia axillaris</i>	33
2.8.1 Estudios preliminares de <i>Salvia axillaris</i>	34
3. Justificación.....	35
4. Objetivos.....	36
4.1 Objetivo general.....	36
4.2 Objetivos particulares.....	36
5. Metodología experimental.....	37
5.1 Materiales y equipos.....	37
5.2 Material vegetal.....	39
5.3 Preparación de los extractos de las hojas de <i>Salvia axillaris</i>	40
5.3.1 Aislamiento de los metabolitos secundarios.....	40
5.4 Preparación de los extractos de las raíces de <i>Salvia axillaris</i>	42

5.4.1 Aislamiento de los metabolitos secundarios	42
5.5 Reacción	43
5.6 Actividad Biológica.....	44
5.6.1 Actividad citotóxica	44
5.6.2 Actividad antioxidante	46
6. Resultados y discusión	47
6.1 Estudio fitoquímico de las hojas de <i>Salvia axillaris</i>	47
6.2 Estudio fitoquímico de las raíces de <i>Salvia axillaris</i>	53
6.3 Ensayo de la actividad biológica	63
6.3.1 Actividad citotóxica	63
6.3.2 Actividad antioxidante.	66
7. Conclusiones	68
8. Bibliografía	69
Anexos	79

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
Me ₂ CO	Acetona
AcOEt	Acetato de etilo
CC	Cromatografía en columna
CCFA	Cromatografía en capa fina analítica
CCFP	Cromatografía en capa fina preparativa
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CHCl ₃	Cloroformo
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria media
cm	Centímetro
cm ⁻¹	Centímetro a la menos uno
<i>d</i>	Señal doble
<i>dd</i>	Señal doble de dobles
DCM	Diclorometano
<i>dt</i>	Señal doble de triples
EM	Espectrometría de Masas
EM-DART-AR	Espectrometría de Masas “Direct Analysis in Real Time” análisis directo en tiempo real de alta resolución
g	gramos
h	Horas
HMBC	“Heteronuclear Multiple Bond Correlation” Correlación Heteronuclear ¹³ C- ¹ H a larga distancia
HSQC	“Heteronuclear Single Quantum Correlation” Correlación Heteronuclear ¹³ C- ¹ H a un enlace
HX	Hexano
Hz	Hertz
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
kg	Kilogramo

<i>m</i>	Señal múltiple
<i>m/z</i>	Relación masa-carga
MeOH	Metanol
MHz	Mega Hertz
mg	Miligramo
μg	Microgramo
min	minutos
mL	Mililitros
μL	Microlitros
mm	Milímetro
mM	Milimolar
μM	Micromolar
nM	Nanomolar
<i>ppm</i>	Partes por millón
RMN ^{13}C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ^1H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno 1
<i>s</i>	Señal simple
<i>sep</i>	Señal séptuple
<i>t</i>	Señal triple
δ	Desplazamiento químico (ppm)
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius

Lista de ilustraciones

Ilustración 1. Ejemplos de productos naturales usados contra el cáncer.....	17
Ilustración 2. Esquema de las hojas e inflorescencias de las plantas.	19
Ilustración 3. Esquema de corolas, estambres, óvulos y frutos de las plantas.	21
Ilustración 4. Distribución de la familia Lamiaceae en México.....	22
Ilustración 5. Fotos de las especies enlistadas en la Tabla 1.	24
Ilustración 6. Jardín diseñado en 1908 por Gertrude Jekyll.	25
Ilustración 7. Esquema de los metabolitos más comunes del género <i>Salvia</i>	29
Ilustración 8. Estructura del isopreno.....	30
Ilustración 9. Diferentes tipos de diterpenos aislados de especies del género <i>Salvia</i>	31
Ilustración 10. Ácidos fenólicos más comunes en el género <i>Salvia</i>	32
Ilustración 11. Foto de <i>Salvia axillaris</i>	33
Ilustración 12. Distribución de <i>Salvia axillaris</i> en México.....	34
Ilustración 13. Estructura del 20-nor-abietano criptotanshinona.	34
Ilustración 14. Ubicación geográfica de la zona de colecta.....	39
Ilustración 15. Mecanismo de reacción de contracción de anillo.....	43
Ilustración 16. Estructuras del ácido ursólico (1) y del ácido oleanólico (2).	47
Ilustración 17. Estructura del estigmasterol (3) y β -sitosterol (4).....	49
Ilustración 18. Estructura del 20-nor-abietano criptotanshinona (5).	50
Ilustración 19. Estructura del myo-inositol (6).....	51
Ilustración 20. Estructura del ácido rosmarínico (7).....	52
Ilustración 21. Estructura del ferruginol (8).	53
Ilustración 22. Estructura de la miltirona (9).....	54
Ilustración 23. Estructura del 17-oxotanshinona IIA (10).....	55
Ilustración 24. Estructura de la 17-hidroxcriptotanshinona (11).....	59
Ilustración 25. Estructura del ácido 4-hidroxi-3,9,9-trimetil-3,4,6,7,8,9-hexahidro-2H-benzo[5,6]indeno[1,2-b]furan-4-oico (12).	60
Ilustración 26. Forma resonante de la criptotanshinona 5.....	61

Lista de tablas

Tabla 1. Algunas especies de la familia Lamiaceae utilizadas en la medicina tradicional mexicana.....	23
Tabla 2. Estados de la República Mexicana con mayor número de especies de <i>Salvia</i>	27
Tabla 3. Información de las líneas celulares utilizadas en laboratorio de pruebas biológicas del Instituto de Química.....	44
Tabla 4. Datos de RMN ¹ H (700 MHz) y RMN ¹³ C (175 Hz) del compuesto 10 en CDCl ₃	58
Tabla 5. Datos de RMN ¹ H (500 MHz) y RMN ¹³ C (125 Hz) del compuesto 12 en CDCl ₃	62
Tabla 6. “Screening” primario de actividad citotóxica de los compuestos aislados de <i>Salvia axillaris</i>	63
Tabla 7. Resultados de la curva CI ₅₀ de la muestra criptotanshinona.....	65
Tabla 8. Resultados del “screening” primario de la actividad antioxidante en el modelo de TBARS de los compuestos aislados de <i>Salvia axillaris</i>	66
Tabla 9. Actividad antioxidante de los compuestos aislados de <i>Salvia axillaris</i> en el modelo de TBARS.....	67

Este trabajo fue presentado en la 14° Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales celebrada del 23 al 26 de mayo en Cuernavaca, Morelos en la dinámica de cartel con el título “Estudio fitoquímico de las hojas y las raíces de *Salvia axillaris*”, así como en el simposio interno del Instituto de Química de la UNAM con el cartel “Estudio fitoquímico y biológico de las raíces de la especie *Salvia axillaris*”

1. Introducción

El presente trabajo expone el estudio fitoquímico de las hojas y raíces de *Salvia axillaris*, una planta endémica de México distribuida en los Estados de Durango y Jalisco a Veracruz y Oaxaca. En el estudio de la especie se identificaron 11 compuestos: una mezcla de ácidos oleanólico y ursólico, una mezcla de estigmasterol y β -sitosterol, *myo*-inositol, ácido rosmarínico y cinco diterpenos con estructura de abietano, uno de ellos no reportados en la literatura (compuesto **10**), así como la semisíntesis de un derivado de la criptotanshinona (compuesto **12**).

Los diterpenos aislados; criptotanshinona, miltirona y ferruginol fueron evaluados en dos tipos de ensayo de actividad biológica; citotoxicidad en líneas celulares cancerosas con el protocolo de sulforramida B y actividad antioxidante con el modelo de TBARS. De los tres compuestos estudiados, la criptotanshinona mostró actividad significativa en las líneas celulares de cáncer: U251=glía del SNC, PC-3=próstata, K562 =Leucemia, MCF-7= mama. Por otro lado, el ferruginol mostró actividad significativa en la actividad antioxidante en el modelo de TBARS. Con estos resultados, los compuestos aislados criptotanshinona y ferruginol podrían ser potenciales estructuras líderes para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de diversas enfermedades.

2. Antecedentes

2.1 Productos Naturales

Los productos naturales representan una gran familia de diversos compuestos químicos, producidos por plantas, bacterias, hongos y animales marinos (Katz, L., & Baltz, R., 2016). Estos compuestos químicos permiten el intercambio de información entre los seres vivos y manifiestan una o varias actividades biológicas, de ahí deriva su enorme importancia (Delgado, G.(Ed.), & Romo de Vivar, A.(Ed.) 2015). Se estima que menos del 10% de la biodiversidad del mundo ha sido evaluada por su actividad biológica, muchos productos naturales siguen esperando ser descubiertos (Dias, D, et al., 2012).

El impacto de los productos naturales en el tratamiento de diversas enfermedades ha sido documentado ampliamente. Los productos naturales derivados de plantas han tenido un uso particular por siglos para el tratamiento de una amplia variedad de padecimientos (DeCorte, B. 2016). Los registros más antiguos datan cerca del 2600 a.C. en Mesopotamia, donde se documenta el uso de aproximadamente 1000 sustancias derivadas de plantas, esto incluye aceites de algunas especies de Cedro (*Cedrus*) y Ciprés (*Cupressus sempervirens*), Regaliz (*Glycyrrhiza Glabra*), especies de Mirra (*Commiphora*) y Amapola (*Papaver somniferum*), todos estos aceites se siguen utilizando hoy en día para el tratamiento de diferentes malestares (Cragg, G., & Newman, D. 2013).

Los productos naturales también conocidos como metabolitos secundarios son compuestos que no tienen un rol definido en los procesos fundamentales de la planta o el organismo que los produce, sin embargo se ha encontrado que cumplen con funciones importantes desde el punto de vista ecológico en la disuasión de herbívoros, la competencia con plantas competidoras y la atracción de polinizadores. Los metabolitos secundarios son producidos en partes específicas del organismo que los produce y en etapas definidas del desarrollo (Davey, M. 2017).

2.2 Importancia de los productos naturales

Se estima que el 80% de la población de los países en desarrollo son totalmente dependientes de las plantas para tratar enfermedades y malestares (Hostettmann, K., & Marston, A. 2002). A pesar del desarrollo de nuevos métodos para descubrir o sintetizar medicamentos, los productos naturales siguen brindando nuevas estructuras líderes para el desarrollo de medicamentos (Butler, M. 2004). De las nuevas entidades químicas que han sido aprobadas como medicamentos por la Food and Drugs Administration (FDA) en los últimos cinco años, 40% son productos naturales o derivados de estos (Katz, L., & Baltz, R., 2016).

Los productos naturales han demostrado tener aplicaciones médicas para el tratamiento de diabetes mellitus tipo 2 (Xu, L., et al., 2018), tratamiento de enfermedades cardiovasculares (Choy, K., 2018), antivirales (Lin, L. et al., 2014), anticancerosas (Lee, D. et al., 2016), antiinflamatorias (Azab, A. et al., 2016) y antioxidantes (Ng, T. et al., 2000).

2.2.1 Anticancerosos

El cáncer es un conjunto de enfermedades relacionadas en las que las células se dividen a alta velocidad, más rápido de lo que se reproducen las células normales, se diseminan a los tejidos circundantes y forman tumores (Gutiérrez-Rodríguez, A. et al., 2018). Los tratamientos más comunes contra el cáncer son la quimioterapia y la radioterapia, en algunos casos cirugía como en casos de hígado, próstata, senos o la matriz de las mujeres (What Is Cancer?. 2018). El ensayo de citotoxicidad empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos es uno de los principales métodos en la búsqueda de moléculas potencialmente útiles en el tratamiento de cáncer (Linamaría Escobar, M., & Fabio A, A. 2010). La citotoxicidad se refiere a la habilidad de un compuesto químico para hacer daño a células vivas y puede consistir en un daño inicial a la célula causado por un compuesto químico, seguido de la disfunción de la mitocondria como consecuencia del daño inicial y finalmente, la muerte de la célula (Vinken, M., & Blaauboer, B., 2017). Algunos productos naturales usados como anticancerígenos son: vincristina y vinblastina aisladas de *Vinca rosea* usadas contra cáncer testicular, cáncer de mama, cáncer de pulmón y paclitaxel aislado de *Taxus brevifolia* usado contra tumores sólidos de ovario, de pulmón, de mama y cuello (Nobili, S. et al., 2009).

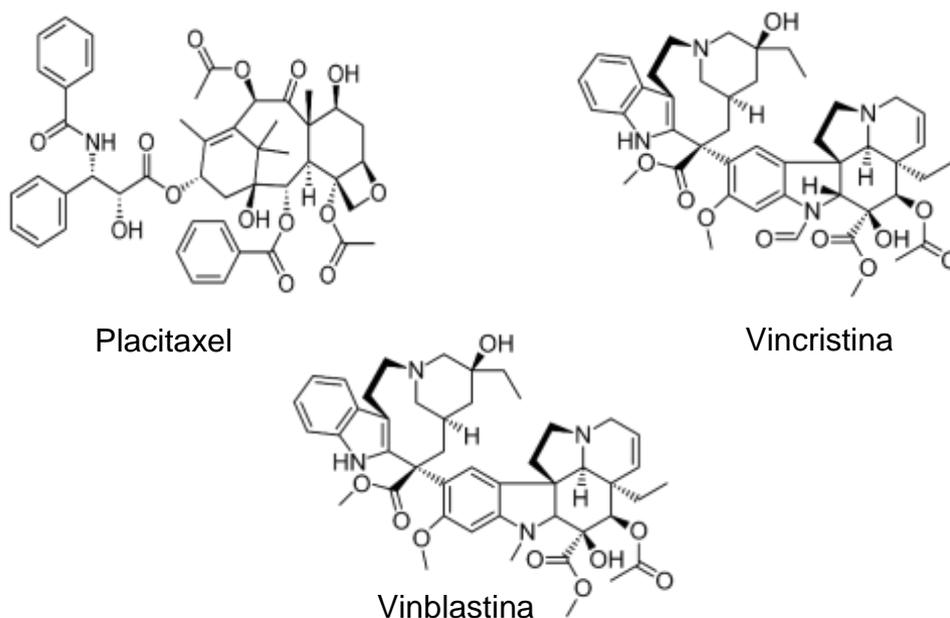


Ilustración 1. Ejemplos de productos naturales usados contra el cáncer.

2.2.2 Antioxidantes

En el cuerpo humano la oxidación de lípidos es causada por el estrés oxidativo el cual tiene efectos destructivos en la célula y está asociado con diversas enfermedades como el cáncer. La oxidación de lípidos forma hidroperóxidos de lípidos los cuales son inestables y se descomponen en otros productos secundarios como alcoholes, aldehídos, cetonas, ácidos grasos volátiles y epóxidos. (Shahidi, F., & Zhong, Y. 2015). El estrés oxidativo se produce cuando las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) sobrepasan la capacidad antioxidante reguladora del cuerpo humano (Liu, Z., et al. 2018). Estas especies reactivas de oxígeno modulan numerosos procesos bioquímicos en el cuerpo (captación de glucosa, expresión genética, señalización de calcio), los altos niveles de estas pueden causar daño en el ADN, en proteínas y en lípidos (Ward, C., et al., 2014). En otro contexto, la oxidación de lípidos es una de las principales causas del deterioro de la calidad de los alimentos y ha sido un desafío para científicos y los fabricantes de alimentos. Los lípidos son susceptibles a los procesos oxidativos en la presencia de catalizadores como calor, luz, enzimas, metales y microorganismos, dando lugar al desarrollo de sabores desagradables en los alimentos (Shahidi, F., & Zhong, Y., 2005).

Los antioxidantes son sustancias que en concentraciones muy bajas, retrasan, controlan o impiden los procesos oxidativos que conducen al deterioro de la calidad de los alimentos y la propagación de enfermedades degenerativas. Estas sustancias ejercen su efecto inhibitorio contra los procesos de oxidación mediante diferentes mecanismos y se pueden clasificar en primarios y secundarios. Los antioxidantes primarios inhiben la reacción en cadena de la oxidación al actuar como donantes de hidrógeno o aceptores de radicales libres y generar radicales más estables. Los antioxidantes secundarios previenen o retardan la oxidación al suprimir los promotores de la oxidación (Shahidi, F., & Zhong, Y. 2015).

2.3 Generalidades de la Familia Lamiaceae

La familia Lamiaceae conocida anteriormente como Labiatae o familia de la menta se distribuye casi en todo el mundo principalmente en zonas templadas (Lamiaceae 2018). Los miembros de esta familia son plantas herbáceas anuales o perennes, subarborescentes, arbustivas o rara vez arbóreas. Su tallo generalmente es cuadrangular con hojas opuestas, simples o rara vez compuestas, casi siempre sin estípulas y con inflorescencias cimosas, generalmente contraídas formando verticilastos pauci, agrupados en pseudoracimos o cabezuelas, en ocasiones en panículas.

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE PLANTAS



Fig. 1 DISPOSICIÓN DE LAS HOJAS
(Tomado de Lawrence, 1951).

a, b	=	alterna	g	=	imbricada
c	=	opuesta	h	=	caulinar
d	=	decusada	i	=	roseta
e	=	verticilada	j	=	basal
f	=	fasciculada			

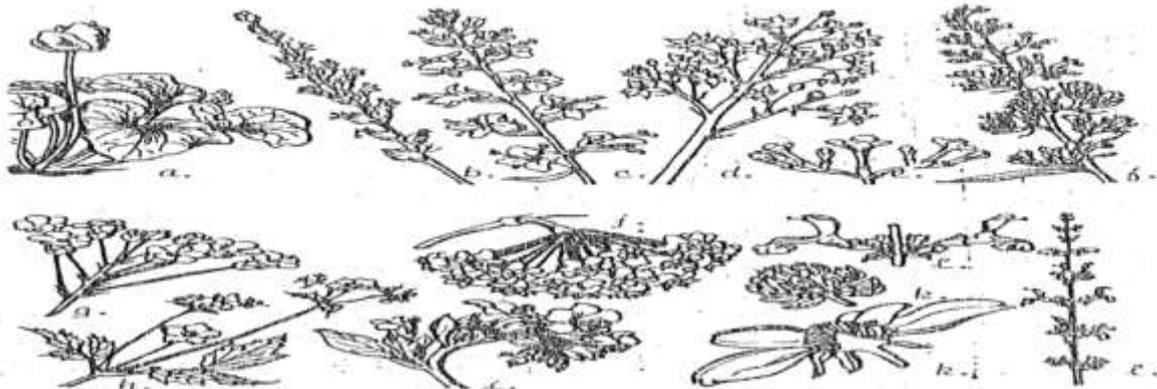


Fig. 2 TIPOS DE INFLORESCENCIA
(Tomado de Lawrence, 1951)

a	=	escaposa (flor solitaria)
b	=	espiga
c	=	racimo
d	=	panícula
e	=	dicasio
f	=	tirso
g	=	corimbo
h	=	cima
i	=	cima helicoidal
j	=	umbela
k	=	capítulo
l	=	verticilastro

Ilustración 2. Esquema de las hojas e inflorescencias de las plantas.

Las flores son hermafroditas, zigomorfas, rara vez actinomorfas, sésiles o pediceladas; cáliz persistente, corola simpétala, tubular con 4 o 5 lóbulos, limbo frecuentemente bilabiado, labio superior plano o cóncavo, entero o bipartido, en el inferior trilobulado, estambres 4, didínamos, con o sin estaminodios, anteras biloculares o unilocurales, frecuentemente divergentes, de dehiscencia longitudinal; disco nectarífero casi siempre presente. Ovario súpero, bicarpelar, tetralocular, óvulos anátropos, uno en cada lóculo, estilo por lo general ginobásico, estigma bifido; fruto formado por cuatro mericarpios lisos o reticulados, persistentes dentro del cáliz, rara vez unidos en pares (Calderón, G., & Rzedowski, J. 2010).

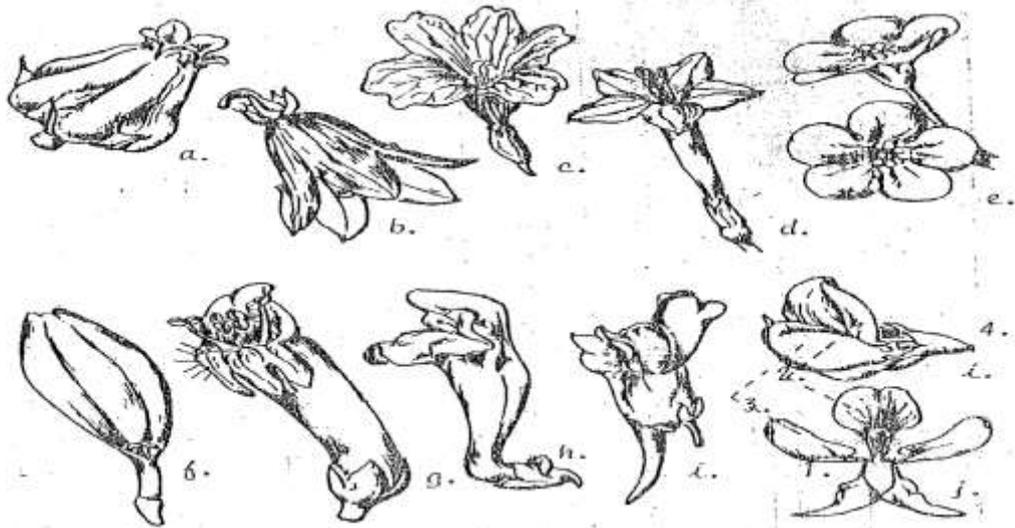


Fig. 11 TIPOS DE COROLAS
(Tomado de Lawrence, 1951)

- | | |
|----------------------|-------------------------------------|
| a = urceolada | f = ligulada |
| b = campanulada | g = tubular |
| c = infundibuliforme | h = bilabiada |
| d = salviforme | i = papilionada |
| e = rotada | j = partes de una flor papilionada: |

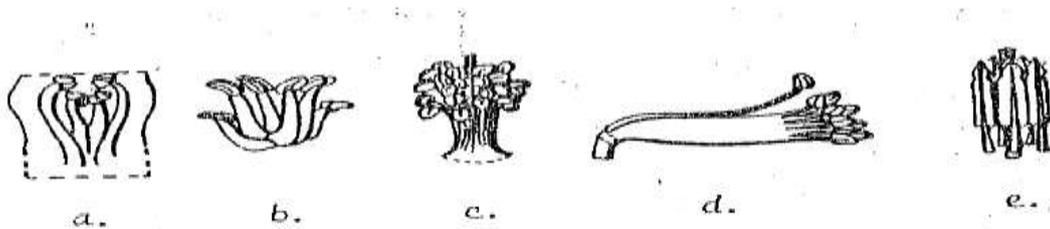


Fig. 10 TIPOS DE ESTAMBRES
(Tomado de Bailey, 1949)

- | |
|----------------------------|
| a = estambres didinamos |
| b = estambres tetradinamos |
| c = estambres monadelfos |
| d = estambres diadelfos |
| e = estambres singenésicos |

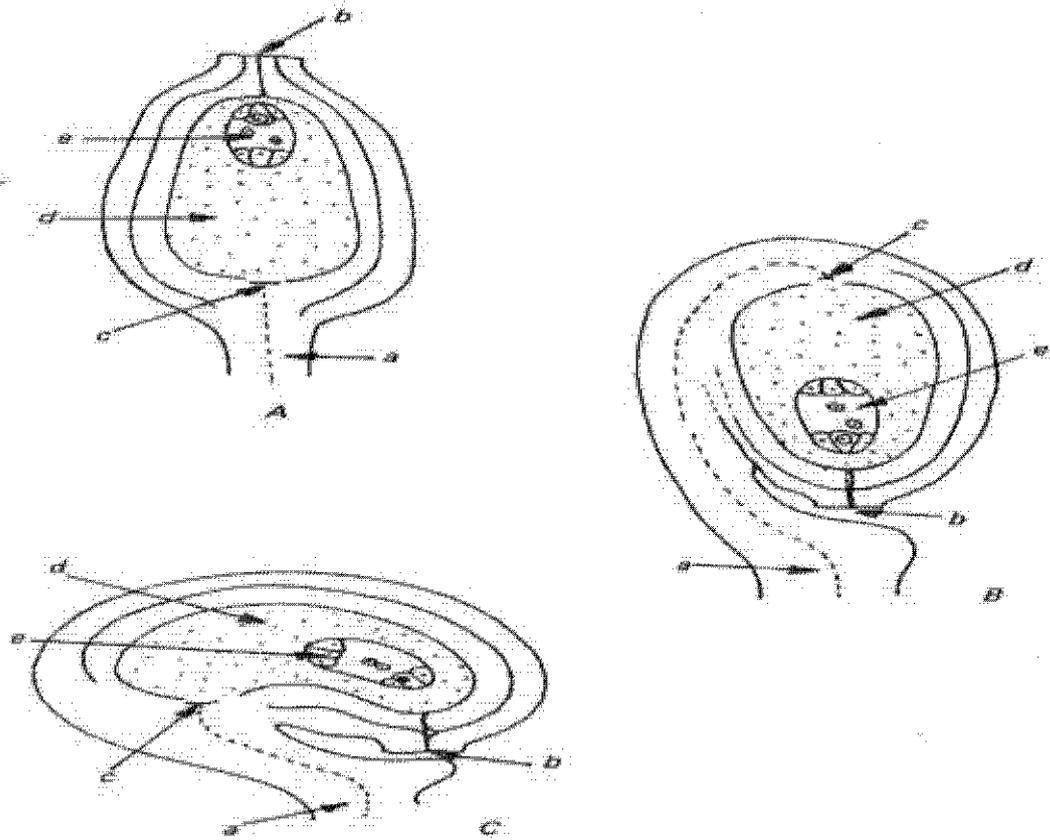


Figura 127. Tipos de óvulos. A: ortótropo; B: anátropo; C: campilótropo. Referencias: a, funículo; b, micrópila; c, chalaza; d, nucelo; e, saco embrionario.

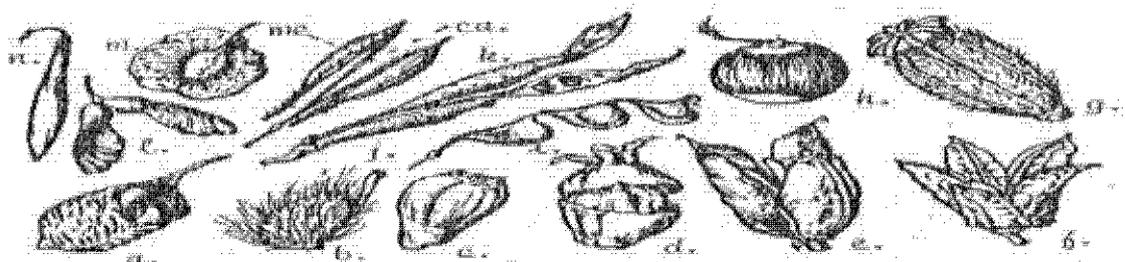


Fig. 12. TIPOS DE FRUTOS
(Tomado de Lawrence, 1961)

FRUTOS SECOS:

- a = folículo
- b = aquenio (Rosáceas)
- c = aquenio (Compositas)
- d = pixidia
- e = cápsula septicida
- f = cápsula loculicida
- g = cápsula poricida
- h = nuez
- i = lomento
- j = legumbre
- k = esquizocarpo
- l, m, o = samara
- n = mericarpo
- ca = carpóforo

Ilustración 3. Esquema de corolas, estambres, óvulos y frutos de las plantas.

2.4 Importancia de la Familia Lamiaceae

La Familia Lamiaceae es una de las más grandes en el mundo, incluye 236 géneros y 7,173 especies, está relacionada con las familias Verbenaceae, Acanthaceae, Scrophulariaceae, Gesneriaceae, Lentibulariaceae, Buddlejaceae y Bignoniaceae, que pertenecen al mismo orden de las Lamiales. Es una familia que tiene una importancia económica considerable en varias partes del mundo debido a que muchas de sus especies tienen diferentes usos, por ejemplo:

- Como condimentos (*Origanum*, *Thymus*, *Mentha*)
- Como aceites esenciales (*Lavandula*, *Pogostemon*, *Salvia*)

En México esta familia se encuentra distribuida en su mayoría a lo largo de las zonas montañosas **Ilustración 4** (Martínez-Gordillo, M. et al., 2013).



Ilustración 4. Distribución de la familia Lamiaceae en México.

En los últimos años se ha despertado interés por el potencial antifúngico de la familia Lamiaceae, de tal manera que 55 especies pertenecientes a 27 géneros de esta familia son susceptibles de una aplicación potencial en la industria farmacéutica contra hongos patógenos (Waller, S. B., et al 2017).

En la medicina tradicional muchas especies de la familia son usadas para el tratamiento de diferentes problemas de salud como infecciones de garganta, dolores de estómago, úlceras, espasmos, hemorragias, problemas de la piel, etc. Muchas de ellas también son apreciadas por la producción de aceites esenciales con propiedades antiinflamatorias, cicatrizantes, sedantes, diuréticas, etc.

(Ciocarlan, N. 2016). En la **Tabla 1** se enlistan algunos ejemplos de especies de la familia Lamiaceae que son utilizadas en la medicina tradicional mexicana. La foto de estas se muestran en la **Ilustración 5**.

Tabla 1. Algunas especies de la familia Lamiaceae utilizadas en la medicina tradicional mexicana.

Especie/ Nombre común	Parte utilizada	Uso medicinal
<i>Marrubium vulgare/</i> Manrubio (1)	Partes aéreas	Diarrea, Parásitos Intestinales (Hernández, T., et al., 2003)
<i>Mentha spicata/</i> Hierbabuena (2)	Hojas	Diarrea, Vomito (Hernández, T., et al., 2003)
<i>Ocimum basilicum/</i> Albahaca (3)	Partes aéreas	Diarrea, Cólicos (Hernández, T., et al., 2003)
<i>Rosmarinus officinalis/</i> Romero (4)	Partes aéreas	Diarrea, Artritis (Hernández, T., et al., 2003)
<i>Thymus vulgaris/</i> Tomillo (5)	Partes aéreas	Dolor estomacal (Alanís, A., et al., 2005)
<i>Hyptis suaveolens/</i> Chía (6)	Semillas	Indigestión (Moreno-Salazar, S., et al., 2008)
<i>Monarda austromontana/</i> Orégano (7)	Semillas	Dolor estomacal (Moreno-Salazar, S., et al., 2008)
<i>Mentha pulegium/</i> Poleo (8)	Toda la planta	Dolor corporal, Fiebre (Josabad Alonso-Castro, A., et al., 2012)
<i>Salvia leucantha/</i> <i>Salvia morada</i> (9)	Hojas	Dolor estomacal, Debilidad (Juárez-Vázquez, M., et al., 2013)



Ilustración 5. Fotos de las especies enlistadas en la Tabla 1.

Muchas especies de la familia Lamiaceae son apreciadas como ornamentales y son utilizadas ampliamente en la planificación de parques y jardines, así como en áreas verdes urbanas. Siendo especies del género *Lavandula* o lavanda de las más utilizadas para este fin, como se puede apreciar en obras de amantes de la naturaleza como de la taxónoma, paisajista y escritora inglesa Gertrude Jekyll **Ilustración 6** (López, A. 2017). Otras especies de la familia Lamiaceae que son utilizadas en la planificación de parques son *Stachys lanata*, *Salvia officinalis* y *Salvia splendens* (Devecchi, M. 2006).



Ilustración 6. Jardín diseñado en 1908 por Gertrude Jekyll.

2.5 Género *Salvia*

El nombre del género *Salvia* deriva del latín “*salvare*” que significa “curar o estar sano”, por ende, este nombre fue dado por el valor medicinal que presentan. Muchas de las especies de *Salvia* son notables por el brillante color de sus flores el cual va del rosa al rojo o del azul al morado (Wu, Y., et al., 2012).

El género *Salvia* es uno de los más numerosos de la familia Lamiaceae, esta extensamente distribuido en tres diferentes regiones Centroamérica y Sudamérica con 500 especies, Asia Central y el Mediterráneo con 250 especies y el Este de Asia con 90 especies (Xu, J., et al., 2018). México cuenta con 307 especies, de las cuales 232 son endémicas (Martínez-Gordillo, M. et al., 2013).

De acuerdo con Bentham el género *Salvia* se divide en 4 subgéneros: *Calosphace*, *Leonia*, *Salvia* y *Sclarea*, las especies mexicanas se incluyen dentro del subgénero *Calosphace*. La mayor diversidad de especies del género se presentan en las zonas montañosas de México, principalmente en el centro-sur del país en bosques templados, aunque también se pueden encontrar en bosques tropicales, zonas áridas y desérticas (Cornejo Tenorio, G., & Ibarra Manríquez, G. 2011).

Las especies del género *Salvia* son principalmente arbustos, subarbustos o plantas herbáceas, a menudo aromáticos; de hojas opuestas o a veces verticiladas; flores por lo general dispuestas en verticilos formando espigas (con frecuencia interrumpas), rara vez en racimos o panículas, o solitarias, brácteas a menudo grandes, deciduas o persistentes; cáliz bilabiado, por lo común ligera y lateralmente comprimido, el labio superior usualmente entero, a veces trifido, el inferior bilobado; corola conspicuamente bilabiada, el tubo recto, a veces abultado debajo del labio inferior, labio superior derecho o arqueado, en forma de casco (gálea), labio inferior trilobado, patente o a veces reflejo, el lóbulo medio más grande que los laterales; estambres 2, el conectivo muy alargado, articulándose sobre un filamento corto y llevando la antera en uno de los brazos (rara vez en ambos); ovario profundamente 4-partido, estilo bifido (Calderón, G., & Rzedowski, J. 2010).

En la **Tabla 2** se enlistan los estados de México con mayor riqueza de especies de *Salvia* (Cornejo Tenorio, G., & Ibarra Manríquez, G. 2011).

Tabla 2. Estados de la República Mexicana con mayor número de especies de *Salvia*.

Estado de la República Mexicana	Cantidad de especies
Oaxaca	63
Guerrero	51
Puebla	50
Jalisco	49
Michoacán	48

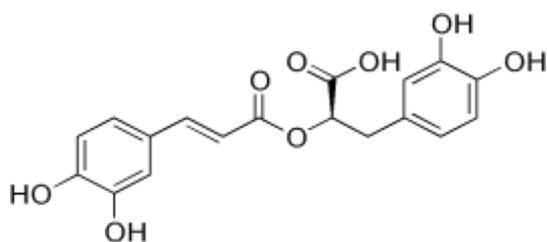
2.6 Importancia del género *Salvia*

Las especies de *Salvia* son reconocidas por la producción de compuestos biológicamente activos como los terpenos y los ácidos fenólicos, muchas especies de este género son utilizadas en la medicina tradicional, por ejemplo: *S. cavaleriei* contra la disentería y la hemoptisis; *S. desoleria* contra enfermedades gastrointestinales y ginecológicas; *S. bucharica* contra enfermedades hepáticas (Hao, D., et al., 2018), *S. blepharochlyna* contra la tuberculosis, *S. multicaulis* tiene efectos antifungicos, *S. prionitis* posee propiedades antibacteriales (Kabouche, A., & Kabouche, Z. 2008). Algunas otras especies de *Salvia* han mostrado tener efectos antiproliferativos de células cancerosas, por ejemplo: *S. miltiorrhiza*, *S. prionitis*, *S. menthaefolia* (Fiore, G., et al., 2006).

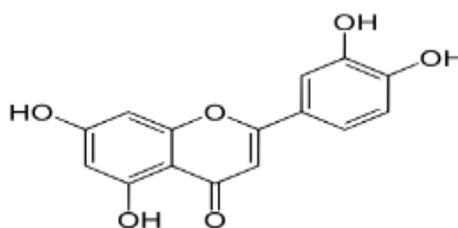
Estudios en animales e *in vitro* han confirmado que muchas especies de *Salvia* contienen compuestos activos como ácidos fenólicos, flavonoides y diterpenoides que pueden reforzar las actividades cognitivas y proteger contra enfermedades neurodegenerativas (Lopresti, A. 2016), tal es el caso de *S. miltiorrhiza* que ha mostrado poseer efectos terapéuticos contra el Alzheimer en modelos animales (Teng, Y., et al., 2014) y *S. elegans* que presenta efectos antidepresivos (Herrera-Ruiz, M., et al., 2006). Otras especies de *Salvia* como *S. divinorum* generan efectos alucinógenos comparables con el LSD, sin embargo esta planta ha sido utilizada por indígenas Mazatecos para tratar dolores de cabeza, reumatismo y diarrea (Listos, J., et al 2011).

2.7 Metabolitos comunes producidos en especies del género *Salvia*

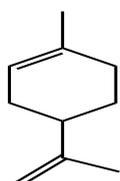
Las especies del género *Salvia* son una rica fuente de metabolitos secundarios como ácidos fenólicos, flavonoides, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterterpenos y triterpenos **Ilustración 7** (Lopresti, A. 2016).



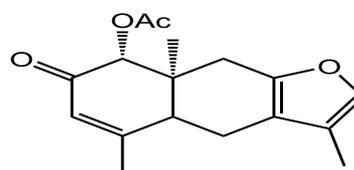
Ácidos fenólicos
(ácido rosmarínico)



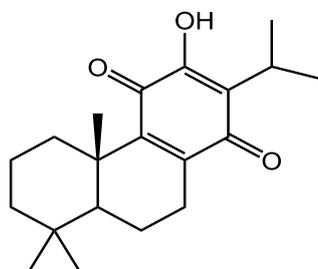
Flavonoides
(luteolina)



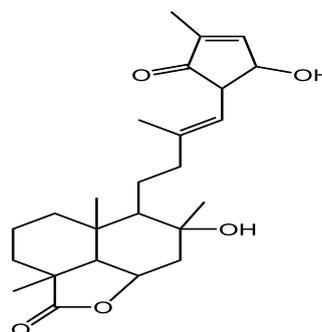
Monoterpenos
(limoneno)



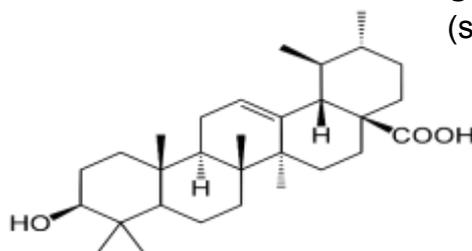
Sesquiterpenos
(Plebeiafuran)



Diterpenos
(royleanona)



Sesterterpenos
(salvileucolidona)



Triterpenos
(ácido ursólico)

Ilustración 7. Esquema de los metabolitos más comunes del género *Salvia*.

2.7.1 Terpenos

Los terpenos son una clase de compuestos orgánicos ampliamente distribuidos en la naturaleza caracterizados por la presencia repetitiva de una unidad de cinco átomos de carbono (2-metil-1,3-butadieno, isopreno) derivada del ácido mevalónico. Los terpenos se clasifican por el número de unidades de isopreno que conforman la molécula (dos unidades isoprénicas = unidad terpénica) (LaLonde, R. 2005):

- Hemiterpenos: una unidad de isopreno
- Monoterpenos: dos unidades de isopreno
- Sesquiterpenos: tres unidades de isopreno
- Diterpenos: cuatro unidades de isopreno
- Sesterterpenos: cinco unidades de isopreno
- Triterpenos: seis unidades de isopreno
- Tetraterpenos: ocho unidades de isopreno

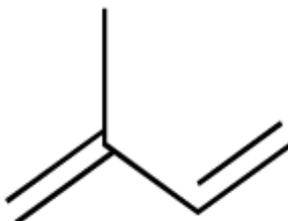


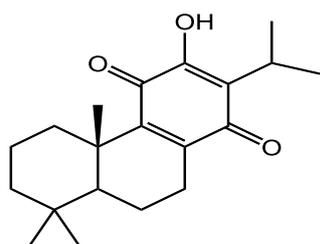
Ilustración 8. Estructura del isopreno.

Los terpenos sintetizados por las plantas son los responsables de ahuyentar a los depredadores, de atraer polinizadores y funcionan como mensajeros químicos que influyen en la expresión de genes involucrados en el mecanismo de defensa contra otras plantas vecinas (Zwenger, S., & Basu, C. 2008).

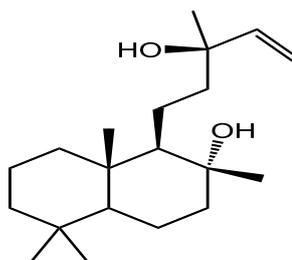
2.7.1.1 Diterpenos

Los diterpenos son parte de los compuestos responsables de las actividades biológicas del género *Salvia*. Efectos antibacteriales, antifúngicos, antioxidantes, antiinflamatorios y anticancerosos son producidos por este tipo de terpenos (Kabouche, A., & Kabouche, Z. 2008). En la **Ilustración 9** se muestran algunos ejemplos de los diferentes tipos de diterpenos que se han descrito en el género *Salvia*, entre ellos se encuentran:

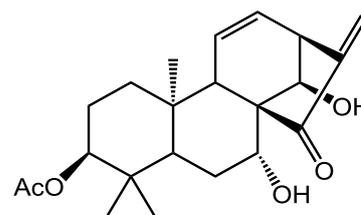
- Abietanos
- Clerodanos
- Labdanos
- Pimaranos
- Icetexanos
- *ent*-kauranos



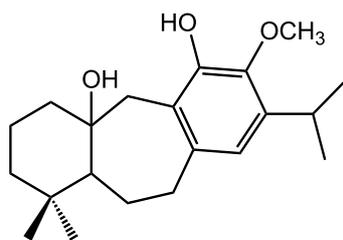
Abietano
(roileanona)



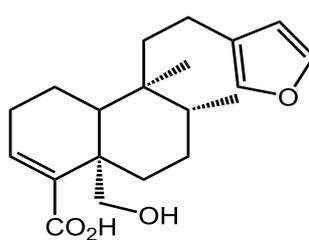
Labdano
(esclareol)



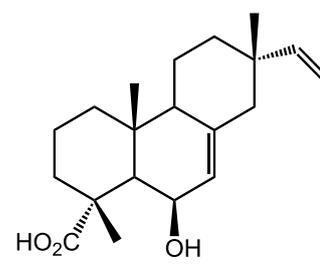
ent- kaurano
(11,12-Didehidroleukamenina E)



Icetexano
(salvicanol)



Clerodano
(ácido hautriwaico)



Pimaranos
(ácido 6 β -hidroxi-isopimárico)

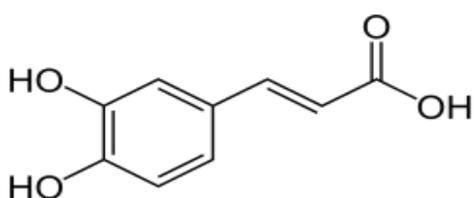
Ilustración 9. Diferentes tipos de diterpenos aislados de especies del género *Salvia*.

2.7.2 Ácidos fenólicos

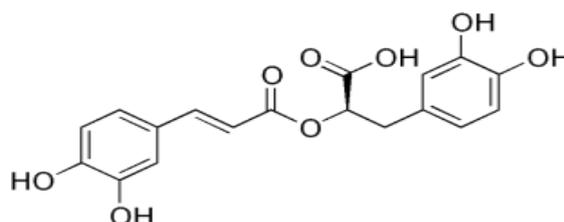
Los ácidos fenólicos son una subclase de compuestos de una numerosa categoría de metabolitos, el término fenólicos abarca aproximadamente 8,000 compuestos. Todos estos compuestos comparten una estructura característica, un anillo aromático con un sustituyente hidroxilo y dependiendo del número de sustituyentes se pueden clasificar en fenoles simples o polifenoles. El término ácido fenólico designa un fenol que posee un ácido carboxílico como sustituyente

Ilustración 10 (Robbins, R. 2003).

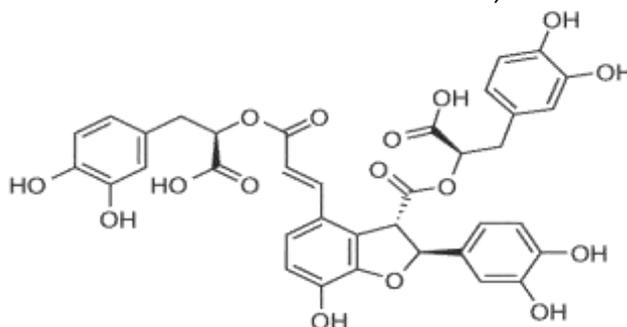
Los ácidos fenólicos tienen una gran variedad de beneficios a la salud debido a sus propiedades biológicas, especialmente antiinflamatorias y antioxidantes. Este tipo de compuestos se encuentran distribuidos ampliamente en los alimentos de origen vegetal. El consumo estimado de ácidos fenólicos es de 25 mg a 1 g dependiendo de la dieta: frutas, verduras, cereales, té, café, etc. (Stalikas, C. 2007).



ácido cafeico
(antioxidante Butt, M., & Sultan, M. 2011)



ácido rosmarínico
(antiinflamatorio y antioxidante Petersen, M. 2013)



ácido salvianólico B
(antiinflamatorio Ho, J., & Hong, C. 2011)

Ilustración 10. Ácidos fenólicos más comunes en el género *Salvia*.

2.8 *Salvia axillaris*

Clasificación taxonómica:

Reino: Plantae

Phylum: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Género: *Salvia*

Epíteto específico: *axillaris*

Nombre científico: *Salvia axillaris*



Ilustración 11. Foto de *Salvia axillaris*.

Descripción de *Salvia axillaris* según Calderón, G., & Rzedowski, J. es:

Planta herbácea perenne de raíces leñosas; tallo rastrero, extendido y ascendente, enraizando en los nudos, hispido-piloso o hispido-pubérulo.

Hojas sésiles, obovadas a oblanceoladas, de 0.7 a 1.2 cm de largo, de 3 a 4.5 mm de ancho, redondeadas en el ápice, cuneadas en la base, seríceas, sobre todo en el envés.

Flores solitarias, brácteas obovadas, de ± 3 mm de largo y ± 1 mm de ancho, caducas, pedicelos erectos, de 4 a 5 mm de largo, tomentosos; cáliz de 7 a 8 mm de largo, de ± 2 mm de ancho, patente, glanduloso-pubescente, su labio superior trífido, con la división central más corta, el labio inferior acuminado, ciliado en sus márgenes; corola de color lila claro o a veces blanca, de 1.3 a 1.4 cm (tubo de 8 a 9 mm) de largo, su labio superior de ± 2 mm de largo, el inferior de ± 5 mm de largo y de ancho; anteras todas bien desarrolladas, de ± 1 mm de largo, conectivos de ± 1.5 mm de largo; estilo de ± 1.5 cm de largo.

La especie se encuentra distribuida desde Durango y Jalisco hasta Veracruz y Oaxaca y se caracteriza por sus estambres con filamentos glabros y los tallos provistos de pelos extendidos, largos y glandulosos.



Ilustración 12. Distribución de *Salvia axillaris* en México, triángulos vacíos variedad *axillaris*, círculos vacíos variedad *hidalgoana*, círculos rellenos variedad *potosina* (Turner, B.L. 1996).

2.8.1 Estudios preliminares de *Salvia axillaris*

El estudio preliminar del extracto de acetona de las partes aéreas y las raíces de *Salvia axillaris* condujo al aislamiento de un 20-*nor*-abietano que fue identificado la criptotanshinona, aislada anteriormente de la especie de origen chino *S. miltiorrhiza* **Ilustración 13** (Esquivel, B., et al., 1997).

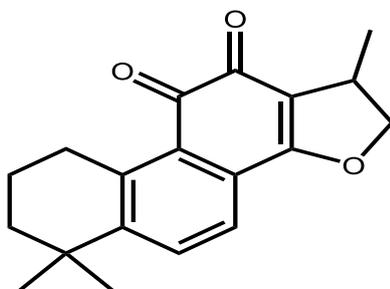


Ilustración 13. Estructura del 20-*nor*-abietano criptotanshinona.

3. Justificación

Estudios fitoquímicos de especies del género *Salvia* han mostrado que estas contienen principalmente diterpenos, triterpenos y ácidos fenólicos, varios de ellos con actividades biológicas interesantes como antioxidantes, antiinflamatorias y anticancerígenos. El estudio de *Salvia axillaris* ampliará el conocimiento sobre la composición química del género y de las especies endémicas de México.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

- Contribuir al conocimiento de la flora mexicana a través del estudio fitoquímico y biológico de la especie *Salvia axillaris*.

4.2 Objetivos particulares

- Aislar e identificar metabolitos secundarios no reportados de la especie *Salvia axillaris* por técnicas cromatográficas convencionales y técnicas espectroscópicas como Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Espectroscopia de Infrarrojo (IR) y Espectrometría de Masas (EM).
- Evaluar la actividad antiproliferativa y antioxidante de los metabolitos secundarios aislados.
- Obtener derivados semisintéticos de los metabolitos secundarios aislados.

5. Metodología experimental

5.1 Materiales y equipos

Para llevar a cabo el aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios, se emplearon técnicas cromatográficas convencionales como cromatografía en columna (CC) usando gel de sílice (230/400) como soporte en una relación de 1:20 por gramo de extracto, sephadex (LH-20) y cromatografía en capa fina preparativa (CCFP) en cromatoplasmas de marca MACHEREY-NAGEL de 20 x 20 cm y de 0.1 mm, 0.5 mm, 1.00 mm, 2.00 mm de espesor hechas en Alemania.

Durante el fraccionamiento se realizó el monitoreo constante por cromatografía en capa fina analítica (CCFA) usando placas de gel de sílice 60G UV₂₅₄ de marca MACHEREY-NAGEL de 20 x 20 cm y 0.12 mm de espesor. La detección por exposición a luz UV se observó en una lámpara portátil Spectroline Longlife Filter, con una longitud de onda de 254 nm. Para el revelado de las cromatoplasmas por aspersion y calentamiento, se utilizaron dos soluciones reveladoras, "OLEUM" preparada con 200 mL de ácido acético, 10 mL de ácido sulfúrico y 40 mL de agua y "SULFATO CÉRICO" preparada con 350 g de hielo, 12 g de sulfato cérico y 22.2 mL de ácido sulfúrico.

Los disolventes utilizados: metanol, acetona, acetato de etilo, diclorometano y hexano, fueron obtenidos de manera comercial y destilados en el laboratorio previo a su uso. Para la concentración de los extractos y de las fracciones se utilizó un evaporador rotatorio marca BÜCHI modelo R y RII con su respectivo baño de agua B-RII y B491.

Los espectros de infrarrojo (IR) fueron realizados en un espectrofotómetro Brucker tensor 27, utilizando la técnica de disolución en cloroformo (CHCl₃), los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de ¹H, ¹³C, COSY, DEPT 90, DEPT 135, HMBC y HSQC fueron realizados en espectrómetros modelos: Brucker avance III HD 500 MHz, Brucker Avance III 400 MHz, Jeol Eclipse 300 MHz y Brucker Avance III HD 700 MHz utilizando cloroformo deuterado (CDCl₃) o metanol deuterado (MeOD) como disolvente.

Los espectros de masas (EM) se obtuvieron en un espectrómetro Jeol AccuTOF JMS-T100LC por la técnica DART (Direct Analysis in Real Time) y Brucker Esquire 6000 con trampa de iones por introducción directa ESI⁺ (Electrospray Ionization).

5.2 Material vegetal

El material vegetal fue recolectado el 30 de septiembre de 2017 a 11.5 km del entronque de la Concepción a San Miguel Azatlá, Oaxaca.

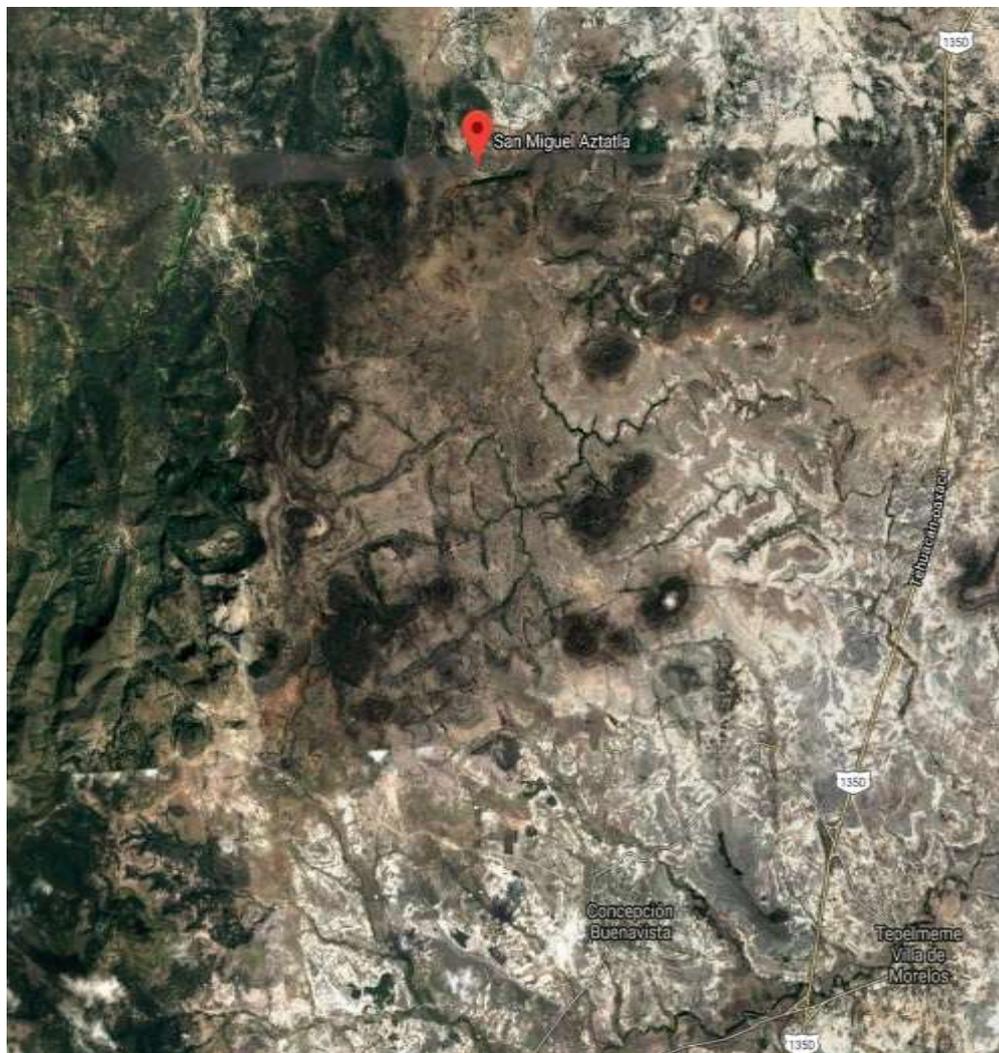


Ilustración 14. Ubicación geográfica de la zona de colecta.

5.3 Preparación de los extractos de las hojas de *Salvia axillaris*

La planta se secó a temperatura ambiente y a la sombra, posteriormente se molió en un molino de cuchillas. Se obtuvieron 600 g de planta seca y molida, se realizó la extracción con disolventes de polaridad ascendente utilizando hexanos (HX), diclorometano (DMC) y metanol (MeOH), obteniendo:

- 4 g del extracto de hexanos
- 3 g del extracto de diclorometano
- 9 g del extracto de metanol

5.3.1 Aislamiento de los metabolitos secundarios

Los compuestos **1** y **2** se identificaron como una mezcla que precipitó durante el proceso de preparación del extracto de hexanos.

El extracto de DMC se separó mediante CC usando gel de sílice (230/400) como soporte y una mezcla de HX-Ac en proporciones 95:5 a 0:100 como eluyente, se recolectaron 68 fracciones de 125 mL cada una, las cuales, se reunieron en 13 fracciones primarias (A-M) con base en el perfil cromatográfico mostrado en CCFA.

La mezcla de los compuestos **3** y **4** fue identificada como un sólido blanco en la fracción E.

La fracción H (222 mg) se separó mediante CC usando de soporte gel de sílice y una mezcla DCM-AC 95:5 como disolvente de elución, se recolectaron 6 fracciones de 50 mL cada una, se reunieron en 4 fracciones secundarias (HA-HD), la fracción HC (96 mg) se separó mediante CC usando de soporte gel de sílice y una mezcla DCM-AC 95:5 como eluyente, se recolectaron 8 fracciones de 50 mL cada una, se reunieron en 6 fracciones terciarias (HCA-HCF). De la fracción HCD se aisló el compuesto **5**.

El extracto de MeOH se separó mediante CC usando sephadex como soporte y MeOH como eluyente, se recolectaron 18 fracciones de 125 mL.

En la fracción 6 se obtuvo un precipitado de color blanco que fue identificado como el compuesto **6**.

En la fracción 9 se obtuvo un sólido de color verde y se identificó como el compuesto 7.

5.4 Preparación de los extractos de las raíces de *Salvia axillaris*

Las raíces se secaron a temperatura ambiente y a la sombra, posteriormente fueron molidas en un molino de cuchillas. Se obtuvieron 198 g de raíces secas y molidas, se realizó la extracción con disolventes de polaridad ascendente utilizando hexano (HX), diclorometano (DMC) y metanol (MeOH), obteniendo:

- 2.22 g del extracto de hexano
- 5.7 g del extracto de diclorometano
- 8.53 g del extracto de metanol

5.4.1 Aislamiento de los metabolitos secundarios

En el extracto de HX se separó mediante CC usando gel de sílice como soporte y una mezcla HX-AcOEt 95:5 a 20:80 como disolvente de elución, se recolectaron 70 fracciones de 25 mL cada una. Se obtuvo un precipitado color naranja (723 mg), el cual se separó una CC usando de soporte gel de sílice y usando una mezcla de HX-AcOEt 2:1 como eluyente, se recolectaron 15 fracciones de 125 mL cada una, de las fracciones 6 a 9 se obtuvo el compuesto **5**.

En la fracción 11 se obtuvo un precipitado de color naranja, el cual fue identificado como el compuesto **8**.

En la fracción 14 se obtuvo un aceite de color naranja, el cual fue identificado como el compuesto **9**.

En la fracción 25 se obtuvo un precipitado de color amarillo, el cual fue identificado como el compuesto **10**.

En la fracción 32 se obtuvo otro precipitado de color blanco que se identificó como una mezcla de los compuestos **3** y **4**.

El extracto de DCM se separó mediante CC usando de soporte gel de sílice (230/400) y usando una mezcla de HX-AC 80:20 a 0:100 como eluyente y al final metanol. Se recolectaron 99 fracciones y se reunieron en 18 fracciones primarias (A-Q).

La fracción C (436 mg) se separó mediante CC usando de soporte gel de sílice (230/400) y usando una mezcla de HX-AC 20:80 como eluyente, se recolectaron 12 fracciones diferentes (CA-CL) de 50 mL. La fracción CD se separó mediante CCFP para obtener el compuesto **11** como un aceite color rojo.

En la fracción N se obtuvo un precipitado rojo, el cual fue identificado como el compuesto **8**.

5.5 Reacción

El compuesto **12** se obtuvo mediante la reacción de contracción de anillo por el reordenamiento de un análogo del bencilo a un análogo al ácido bencílico usando como reactivos criptotanshinona e hidróxido de potasio y 1-4 dioxano como disolvente de reacción siguiendo la metodología de (Patra, A., et al. 2006). El mecanismo de la reacción se muestra en la **ilustración 15**.

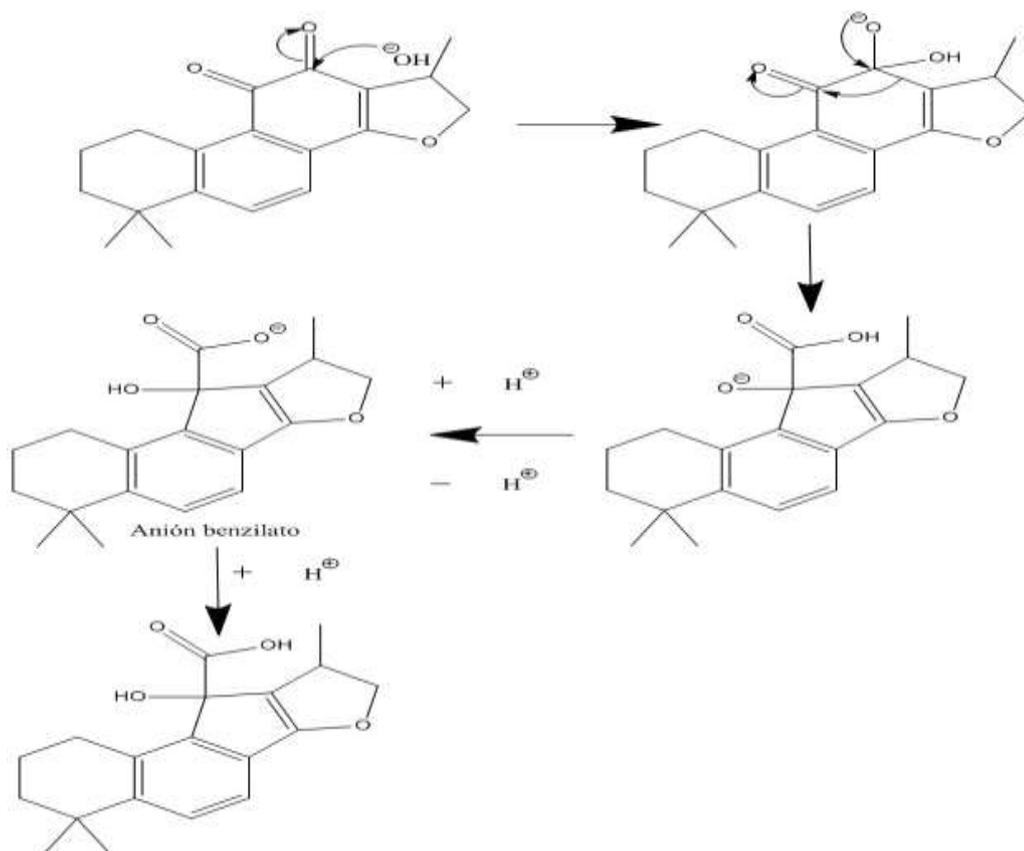


Ilustración 15. Mecanismo de reacción de contracción de anillo.

5.6 Actividad Biológica

Los ensayos de actividad citotóxica en líneas cancerosas y actividad antioxidante se llevaron a cabo en el Instituto de Química de la UNAM en el laboratorio de pruebas biológicas por el técnico M. en C. Antonio Nieto Camacho y la técnica M. en C. María Teresa Ramírez Apan.

5.6.1 Actividad citotóxica

Las líneas celulares que se utilizan en el laboratorio de pruebas biológicas del Instituto de Química pertenecen al panel del NCI, las cuales fueron adaptadas al medio de cultivo RPMI-1640 adicionado con suero fetal bovino (10%), una mezcla de antibióticos-antimicóticos al 10% y 2 μ M de glutamina. A estas líneas se les caracterizó el tiempo de duplicación y con ello se estableció la densidad de inóculo que se deposita en cada micropozo como se muestra en la **tabla 3**.

Tabla 3. Información de las líneas celulares utilizadas en laboratorio de pruebas biológicas del Instituto de Química.

Línea celular	Órgano de origen	Tiempo de duplicación (h)	Células/pozo	Concentración TCA(%)
K562	CML	19	5,000	50
HCT-15	colón	18.1	10,000	50
MCF-7	mama	25.6	5,000	50
PC-3	próstata	28.7	7,500	50
U251	SNC	25.4	7,500	50
SKLU	pulmón	25.4	7,500	50

TCA: ácido tricloroacético, CML: leucemia mieloblástica crónica, SNC: sistema nervioso central

Con excepción de la línea K562, las líneas restantes se adhieren a las botellas de cultivo y para cosecharlas se adiciona 1 mL de 0.05% de tripsina-EDTA. Enseguida que las células se desprenden del sustrato plástico, se les adiciona de 5-10 mL de medio de cultivo para inactivar la tripsina. Las células en suspensión son depositadas en tubos cónicos y centrifugadas por 3 min, ya formado el paquete celular se le agrega medio de cultivo para re-suspenderlas.

De la suspensión se toma 0.05 mL de inoculo y se re-suspende en 0.45 mL de azul de tripano, colorante que permite contar a las células vivas. Determinando el número de células por mL, se hacen los ajustes necesarios para depositar el inoculo en un volumen de 100 µL/pozo a la densidad antes mencionada.

Cada placa es inoculada con dos líneas celulares por triplicado y es pre-incubada por 24 horas a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO₂ y 100% humedad relativa para favorecer la estabilidad de estas antes de adicionar las sustancias a probar. Para un screening primario de un compuesto puro se prueba la concentración más alta permitida 50 µM y para el caso de extractos vegetales se emplea la concentración de 50 µg/mL. Todas las muestras son solubilizadas en dimetil-sulfoxido (DMSO) o agua 100 veces más concentradas que la concentración a probar. Inmediatamente después de la preparación de las muestras en solución y en el caso de realizar curvas concentración-respuesta (5 diluciones se prueban) se agregan 100 µL, siendo el volumen final del pozo de 200 µL. Nuevamente la microplaca es incubada por 48 horas bajo las condiciones antes mencionadas.

Al finalizar el periodo de incubación de los compuestos con las células, éstas son precipitadas (o fijadas) *in situ* añadiendo 50 µL de una solución de TCA frío al 50%, incubadas a 4 °C por 60 minutos. Se desecha el sobrenadante y las placas son lavadas 5 veces con agua desionizada y secadas al ambiente. El tinte de las células fijadas al sustrato del pozo, es con 100 µL de una solución al 0.4% de SRB e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. La SRB no unida es removida por 3 lavados con ácido acético al 1% y se dejan secar al ambiente. Las placas teñidas se les agrega 100 µL de un buffer de tris y se agitan por 10 minutos para favorecer la disolución del complejo; a continuación, se mide la DO en un lector de microplacas a una longitud de onda de 515 nm. Los datos se procesan obteniendo el promedio de la DO de los 3 pozos/línea tratados con el compuesto (DO_t), los 3 pozos tratados con DMSO (DO_c) y 2 pozos de testigos, es decir aquellos que no tienen células pero sí compuesto (DO_b). El % de inhibición del crecimiento (%IC) se calcula con la siguiente expresión:

$$\%IC = 100 - \left(\frac{DO_t - DO_b}{DO_c - DO_b} \right) * 100$$

5.6.2 Actividad antioxidante

El cerebro de rata es homogenizado con una solución amortiguadora de fosfatos a una concentración 9.5 mM y pH 7.4, posteriormente la solución es centrifugada a 3000 rpm por 10 min en un equipo 228 Fischer Scientific, al sobrenadante se le determina el contenido de ácidos grasos poliinsaturados por el método A₂₈₀₋₂₀₅ ajustándose a 2.3529 mg/mL.

En tubos ependorf de 1.5 mL se agregan 425 µL de la solución enriquecida de ácidos grasos poliinsaturados y 25 µL de la muestra, esta solución se incuba con agitación por 30 min a 37 °C; como control positivo se utiliza Butilhidroxi-tolueno (BHT). Transcurrido el tiempo se añaden 50 µL de la solución de FeSO₄ a una concentración 100 µM y se incuba nuevamente por una hora, a continuación se añaden 500 µL de la solución de Ácido tiobarbitúrico (ATB: ATB 1.0 % y ácido tricloroacético 1.0 %, en proporción 1:1, la muestra se deja incubar por 30 min en un baño de agua a 90 °C. Finalmente se dejan enfriar los tubos en un baño de hielo y se centrifugan a 10,000 rpm por 10 min, del sobrenadante se toma una muestra y se coloca sobre una microplaca para medir la absorbancia a 532 nm en un lector de microplacas Bio-Tek, ELx.808.

El valor obtenido se interpola en una curva estándar de tetrametoxipropano. El contenido de TBARS se expresa en nmoles TBARS/mg ácidos grasos y se transforma en % de inhibición usando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición: } \frac{\text{nMoles TBARS}_{\text{control}} - \text{nMolesTBARS}_{\text{extracto}}}{\text{nMoles TBARS}_{\text{control}}} * 100$$

6. Resultados y discusión

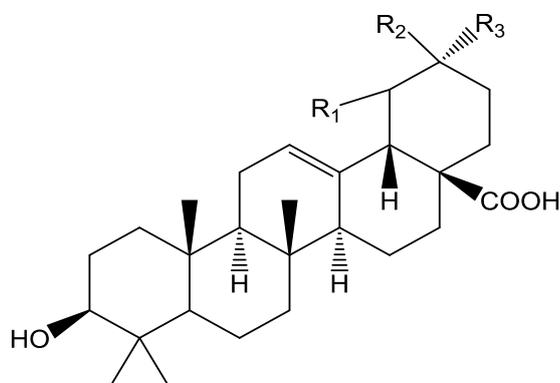
El estudio fitoquímico de *Salvia axillaris* condujo al aislamiento y determinación estructural de 11 compuestos y la semi-síntesis de un derivado de la criptotanshinona. El análisis de los compuestos se ha dividido en dos secciones principales para la mejor comprensión del trabajo: i) el estudio de las hojas y ii) el estudio de las raíces de la planta. Se presentan además los resultados de la actividad de algunos de los compuestos aislados como antioxidantes y como antiproliferativos.

6.1 Estudio fitoquímico de las hojas de *Salvia axillaris*

El estudio fitoquímico de las hojas de *S. axillaris* condujo al aislamiento e identificación de siete compuestos (1-7), todos ellos descritos previamente en la literatura.

Compuestos 1 y 2

Los compuestos 1 y 2 **Ilustración 16** se identificaron como una mezcla de los ácidos ursólico (1) y oleanólico (2), que se aislaron como un sólido de color verdoso con punto de fusión de 255 – 258 °C. Esta mezcla es muy usual en las especies del género *Salvia*. La mezcla se identificó por sus datos espectroscópicos y propiedades físicas que corresponden con las descritas en la literatura (Gnoatto, S., et al. 2008, Gohari, A. R., et al. 2009)



- 1) $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{CH}_3$ y $R_3 = \text{H}$
- 2) $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{CH}_3$ y $R_3 = \text{CH}_3$

Ilustración 16. Estructuras del ácido ursólico (1) y del ácido oleanólico (2).

Estos ácidos triterpénicos pentacíclicos se encuentran distribuidos ampliamente en la naturaleza, el ácido oleanólico tiene una función biológica en la planta que está asociado a la formación de una barrera contra la pérdida de agua y la defensa contra algunos patógenos. Por otro lado, el ácido ursólico está asociado con la protección contra herbívoros. Ambos compuestos muestran una buena actividad antibacteriana, antiviral y antiprotozoaria (Jesus, J., et al., 2015).

Estos compuestos también han mostrado efectos inhibitorios del crecimiento celular en líneas celulares cancerosas de próstata, páncreas y vejiga (Yan, S., et al., 2010)

Compuestos 3 y 4

Los compuestos **3** y **4** **Ilustración 17** se identificaron como una mezcla de estigmasterol **3** y β -sitosterol **4**, que se obtuvo como un sólido blanco con punto de fusión 138 – 141 °C.

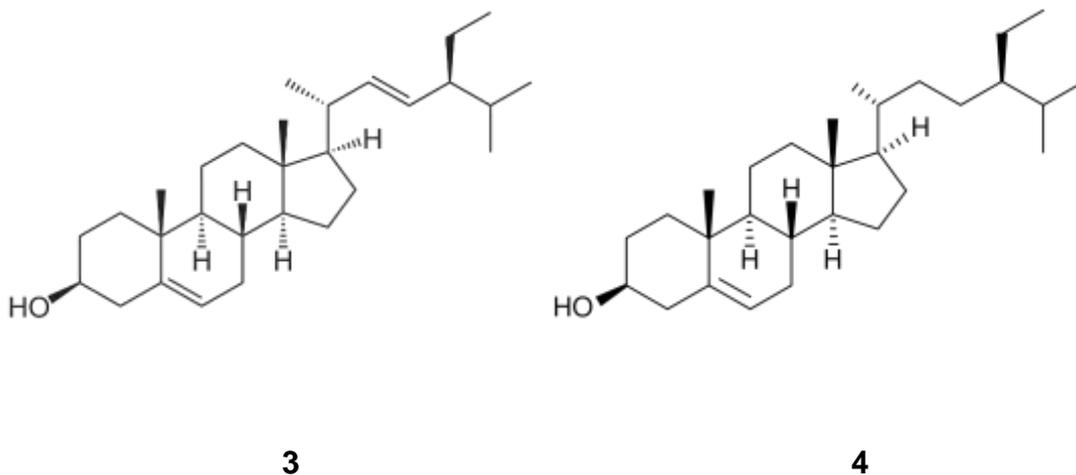


Ilustración 17. Estructura del estigmasterol (**3**) y β -sitosterol (**4**).

Estos dos compuestos son los esteroides de origen vegetal más abundantes en las plantas y actúan como componentes estructurales de las membranas vegetales (Palou, A. 2005). Un estudio realizado en el 2007 mostró que la mezcla de estigmasterol y β -sitosterol puede neutralizar el veneno víbora y cobra (Gomes, A., et al., 2007).

Los datos espectroscópicos obtenidos se compararon con los descritos en la literatura y son consistentes con los mismos (Chaturvedula, V., & Prakash, I. 2012).

Compuesto 5

El compuesto **5** **Ilustración 18** se aisló como un sólido de color naranja con punto de fusión de 182 °C, el cual se identificó como un diterpenoide del tipo 20-*nor*-abietano conocido como criptotanshinona. Los datos físicos y espectroscópicos obtenidos son congruentes con los descritos en la literatura (Fronza, M., et al. 2011).

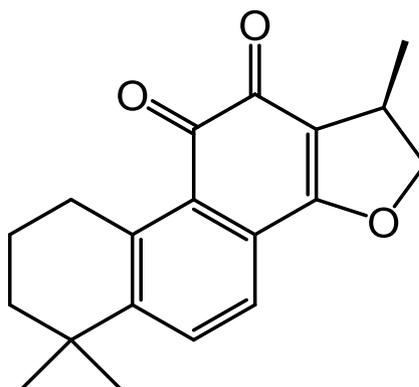


Ilustración 18. Estructura del 20-*nor*-abietano criptotanshinona (**5**).

El compuesto **5** ha sido aislado previamente de otras *Salvias* como: *S. ballotaeflora*, *S. apiana*, *S. glutinosa*, *S. mellifera*, *S. miltiorrhiza*, *S. munzii*, *S. trijuga*, *S. przewalskii* (Wu, Y., et al. 2012).

Este *nor*-abietano ha demostrado tener una actividad importante en la inhibición de la proliferación de diferentes líneas celulares de: cáncer de colon (Xu, Z., et al. 2017), cáncer de glía (Lu, L., et al. 2017), cáncer de mama (Chen, W., et al. 2010), cáncer de próstata (Shin, D., et al. 2009) y cáncer de pulmón (Zhang, B., et al. 2016). La criptotanshinona (**5**) también ha mostrado tener actividad antibiótica (Lee, D., et al. 1999).

Compuesto 6

El compuesto **6 Ilustración 19** se caracterizó como un ciclohexitol que se identificó como *myo*-inositol, el cual se obtuvo como un sólido de color blanco con punto de fusión de 213 °C.

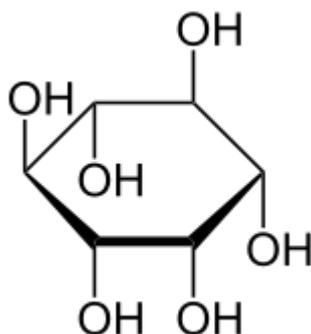


Ilustración 19. Estructura del *myo*-inositol (**6**).

Este compuesto pertenece a la familia de los inositoles, un grupo de moléculas polares pequeñas y químicamente muy estables que tienen propiedades versátiles. Los inositoles son formas isoméricas de ciclohexanhexol, de las que se conocen nueve, siendo el *myo*-inositol el más común en la naturaleza, aunque también son conocidos el *cis*-, *alo*-, *scyllo*-, *epi*-, *neo*-, *L-chiro*, *D-chiro*- y *muco*-inositoles (Michell, R. 2008).

El *myo*-inositol es necesario para el crecimiento y desarrollo en las plantas (Loewus, F., & Murthy, P. 2000). Los datos espectroscópicos obtenidos son congruentes con la literatura (Sekiyama, Y., et al., 2010)

Compuesto 7

El compuesto **7** **Ilustración 20** se identificó como el ácido rosmarínico, que se aisló como un sólido con punto de fusión de 170 °C.

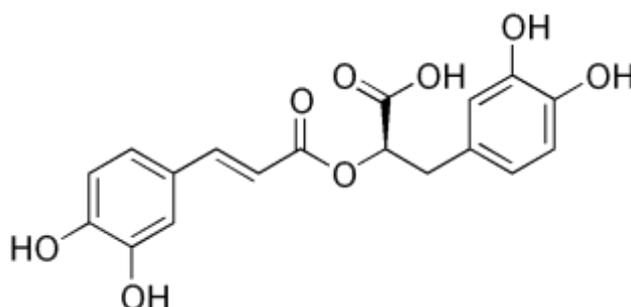


Ilustración 20. Estructura del ácido rosmarínico (**7**).

El ácido rosmarínico (**7**) es un éster de ácido cafeico y ácido 3,4-dihidroxifeniláctico (2-hidroxi-dihidrocafeico), este ácido fenólico se encuentra en muchas plantas de la familia Lamiaceae. Se ha aislado de especies de *Salvia*, como *S. officinalis* (Wu, Y., et al. 2012), *S. verticillata* (Tepe, B., et al. 2007), *S. miltiorrhiza* (Yan, Q., et al. 2006), siendo esta la primera vez que se describe de una especie Mexicana. Los datos espectroscópicos del compuesto aislado son congruentes con los descritos en la literatura (Al-Musayeib, et al. 2011).

Este compuesto también ha mostrado actividad biológica significativa como antiviral, antibacteriano, antiinflamatorio y antioxidante. Se ha descrito que en las plantas este compuesto tiene un rol en las funciones de defensa contra herbívoros (Petersen, M. 2013).

Estudios en modelos animales han demostrado que el compuesto **7** puede tener efectos neuroprotectores contra enfermedades del sistema nervioso central, así, el tratamiento de ratones con 10 mg/kg durante 21 días presentó una disminución del nivel de peroxidación de lípidos en múltiples áreas del cerebro en estos (Mushtaq, N., et al., 2013).

6.2 Estudio fitoquímico de las raíces de *Salvia axillaris*.

El estudio fitoquímico de las raíces de *S. axillaris* condujo al aislamiento e identificación de cuatro compuestos diterpénicos, todos con esqueleto de tipo abietano, uno de ellos con estructura química no descrita previamente en la literatura (compuesto 10). Además, se realizó la semisíntesis de un derivado de la criptotanshinona (compuesto 12).

Compuesto 8

El compuesto **8** se aisló como un sólido de color naranja con punto de fusión de 56 °C que se identificó como el ferruginol **Ilustración 21**.

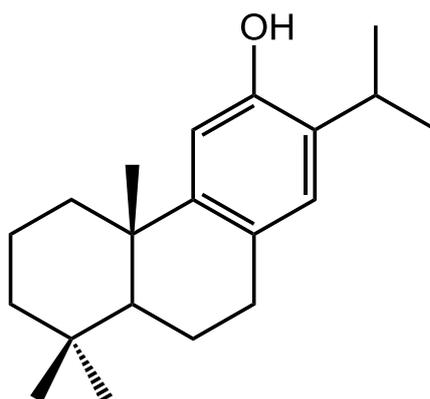


Ilustración 21. Estructura del ferruginol (**8**).

El ferruginol ha sido aislado de varias especies de *Salvia* como *S. miltiorrhiza*, *S. przewalskii*, *S. sclarea* (Wu, Y., et al. 2012). Este abietano ha demostrado tener actividad antibacterial (Li, W., et al. 2008), actividad antiproliferativa de células cancerosas de hígado (Yang, J., et al. 2017), de ovario (Xiong, W., et al. 2017) y actividad antioxidante (Saijo, H., et al. 2015).

Compuesto 9

El compuesto **9 Ilustración 22** se aisló como un aceite de color naranja, el cual, se identificó por sus características físicas y espectroscópicas como la miltirona (**9**). El compuesto ha sido aislado previamente de otras especies de *Salvia* como *S. officinalis* (Miura, K., et al. 2001), *S. miltiorrhiza* (Hayashi, T., et al. 1970), *S. rhytidea* (Jassbi, A. R., et al. 2017). Los datos espectroscópicos obtenidos en este trabajo son congruentes con los descritos en la literatura (Fronza, M., et al. 2011).

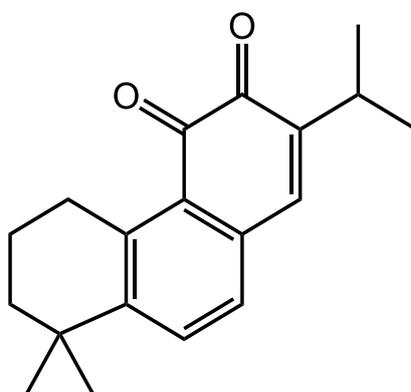


Ilustración 22. Estructura de la miltirona (**9**).

Este compuesto ha sido evaluado como antiproliferativo de células cancerosas de pulmón (Zhu, Z. 2018), antiinflamatorio en problemas del estómago (Wang, H et al. 2017), así como para prevenir problemas del corazón por sus efectos como antioxidante (Zhang, L., et al. 2016).

Compuesto 10

El compuesto **10** **Ilustración 23** se obtuvo como un precipitado de color amarillo con punto de fusión 205 - 211 °C, el cual se identificó como la 17-oxotanshinona IIA. Se determinó su composición molecular como C₁₉H₁₆O₄ con base en el ion [M + H⁺] obtenido por EM-DART-AR *m/z* 309.11323 (calculado para C₁₉H₁₇O₄ 309.14946) indicando doce grados de insaturación.

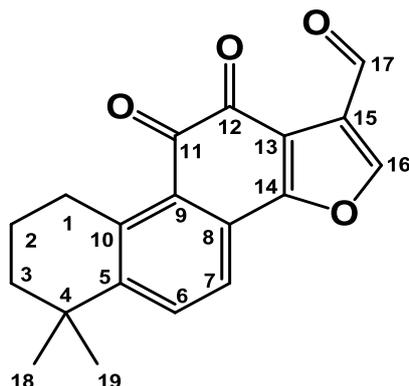


Ilustración 23. Estructura del 17-oxotanshinona IIA (**10**).

Los datos de RMN del compuesto **10** son muy similares a los reportados para la tanshinona IIA, previamente aislada de *S. miltiorrhiza* y *S. przewalskii* (Wu, Y., et al. 2012). La diferencia estructural entre ambos compuestos se encuentra en el carbono 17 que en la tanshinona IIA se encuentra como un grupo metilo mientras que en el compuesto **10**, este se encuentra oxidado a un aldehído.

El espectro de resonancia magnética nuclear de ¹³C (**Espectro 19, Tabla 4**) muestra 19 señales para igual número de átomos de carbono en la estructura propuesta (**Ilustración 23**), que corresponden a dos metilos (CH₃), tres metilenos (CH₂), cuatro metinos (CH) y diez carbonos cuaternarios, de acuerdo con los experimentos DEPT. De las últimas señales, tres se deben a grupos carbonilo (incluido un aldehído) y siete a carbonos aromáticos totalmente sustituidos.

El espectro de resonancia magnética nuclear de ¹H (**Espectro 18, Tabla 4**) exhibe una señal simple (1H, δ 10.47) que muestra acoplamiento con la señal de carbono a δ 185.2 en el experimento HSQC, lo que confirma la presencia de

un grupo aldehído en la molécula, que debe encontrarse en la posición 17 del núcleo diterpénico, (**Espectro 20**), lo que está de acuerdo con el experimento HMBC (**Espectro 21**), ya que se observan acoplamientos entre el protón del aldehído (H-17, δ 10.47) a dos enlaces con C-15 (δ 125) y a tres enlaces con los carbonos C-13 (δ 124.8) y C-16 (δ 150.4).

En la región de los protones aromáticos del compuesto **10**, se observa una señal simple (1H, δ 8.27), la cual fue asignada a H-16 ya que muestra acoplamiento con el carbono C-16 (δ 150.4) en el espectro HSQC. El desplazamiento de la señal a frecuencias altas se debe a que H-16, además de ser parte de un sistema aromático, se encuentra en la posición β a un carbonilo α,β -insaturado, la deslocalización electrónica o efectos resonantes entre el carbonilo y el doble enlace trae como consecuencia que el carbono de la posición beta presente una deficiencia electrónica que se ve reflejada en un desplazamiento hacia frecuencias mayores.

El resto del espectro de RMN es muy similar al descrito para la criptotanshinona y la tanshinona IIa. En la zona de protones aromáticos se observa un sistema AB en δ 8.12 y 7.80 ($J = 8.21$) correspondiente a los protones de los metinos CH-6 (δ 133) y CH-7 (δ 125.6). La asignación de estos fue confirmada en el espectro de HMBC, ya que en él se observan picos de correlación entre H-6 (δ 7.80) y los carbonos C-4 (δ 35.3), C-5 (δ 155.3), C-7 (δ 125.6), C-8 (δ 132.8), C-9 (δ 129.1), C-10 (δ 142.4), mientras que H-7 (δ 8.11) muestra acoplamientos con C-5 (δ 155.3), C-6 (δ 133), C-8 (δ 132.8), C-9 (δ 129.1), C-11 (δ 180.7) y C-14 (δ 154.6).

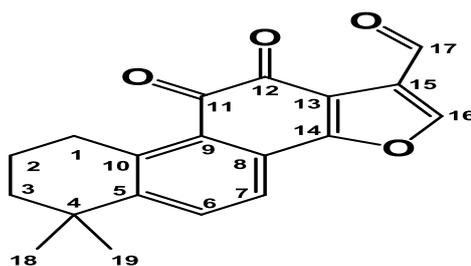
En la zona de protones alifáticos, se observa una señal triple en δ 3.37 (2H, $J = 6.42$, δ_c 30.2), que se asignó a los protones del metileno CH₂-1, ya que en el experimento COSY muestran acoplamiento con a una señal múltiple en δ_H 1.86 (2H δ_c 19.3) y estos a su vez con la señal múltiple en δ_H 1.70 (2H, δ_c 37.7), asignándose estas a los metilenos CH₂-2 y CH₂-3, respectivamente. Finalmente una señal simple en δ_H 1.36 (δ_c 32.0) que integra para seis protones, fue asignada a los protones de los metilos CH₃-18 y CH₃-19, unidos a C-4 (δ 32). La asignación completa de las señales de RMN de ¹H y ¹³C, se realizó mediante el análisis de los experimentos DEPT, COSY, HSQC y HMBC.

En el espectro infrarrojo (**Espectro 24**) se puede observar una banda intensa en 1670 cm^{-1} característica del grupo carbonilo, dos banda en 2850 cm^{-1} y 2888 cm^{-1} en lugar de una sola banda en 2800 cm^{-1} debido a la interacción de la tensión entre el hidrógeno y el carbonilo y la tensión $\text{C}(\text{sp}^3)\text{-H}$ (este tipo de interacción se llama resonancia de Fermi) y una banda en 3579 cm^{-1} debido al sobretono de tensión del grupo carbonilo.

Es importante hacer notar que esta es la primera vez que se describe este compuesto como un producto natural, anteriormente solo ha sido descrito como un derivado semisintético de la tanshinona IIA en una patente de origen chino (Defeng, X. 2013). El compuesto **10** presenta un esqueleto tipo abietano muy relacionado con las tanshinonas aisladas de *S. miltiorrhiza*.

Tabla 4. Datos de RMN ^1H (700 MHz) y RMN ^{13}C (175 Hz) del compuesto **10** en CDCl_3 .

Posición	Tipo	$\delta_{13\text{C}}$	$\delta_{1\text{H}}$ (J en Hz)	HMBC
1	CH_2	30.2	3.37, <i>t</i> (6.42)	2, 3, 5, 9, 10
2	CH_2	19.3	1.86, <i>m</i>	1, 3, 4, 10
3	CH_2	37.7	1.70, <i>m</i>	1, 2, 4, 5, 18, 19
4	C	35.3		
5	C	155.3		
6	CH	133.0	7.80, <i>d</i> (8.21)	4, 5, 7, 8, 9, 10
7	CH	125.6	8.11, <i>d</i> (8.20)	5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 16
8	C	132.8		
9	C	129.1		
10	C	142.4		
11	C	180.7		
12	C	176.3		
13	C	124.8		
14	C	154.6		
15	C	125.0		
16	CH	150.4	8.27, <i>s</i>	12, 13, 14, 15, 17
17	CH	185.2	10.47, <i>s</i>	13, 15, 16
18	CH_3	32.0	1.36, <i>s</i>	2, 3, 4, 5, 19
19	CH_3	32.0	1.36, <i>s</i>	2, 3, 4, 5, 18



Compuesto 11

El compuesto **11** **Ilustración 24** se aisló como un aceite de color anaranjado que se identificó como la 17-hidroxicriptotanshinona. El compuesto biogenéticamente puede derivarse de la criptotanshinona (**5**) como resultado de la oxidación del metilo 17 a un alcohol primario.

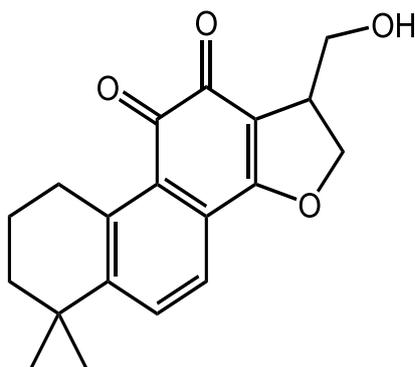


Ilustración 24. Estructura de la 17-hidroxicriptotanshinona (**11**).

El espectro de resonancia magnética nuclear de ^{13}C del compuesto **11** muestra 19 señales de manera similar al compuesto **5** con la única diferencia de que el carbono C-17 se observa desplazado a mayor frecuencia por estar unido a un grupo hidroxilo.

El espectro de resonancia magnética nuclear ^1H del compuesto **11** también es similar al del compuesto **5**. La diferencia más significativa se debe a la ausencia de la señal del metilo 17 y la sobreposición en δ 3.79 de las señales H-15 y a los dos protones H-17, lo que indica que el metilo 17 de la criptotanshinona se ha oxidado a un alcohol primario.

La comparación de los datos espectroscópicos obtenidos con los descritos en la literatura para la 17-hidroxicriptotanshinona, corresponden con dicha estructura (de la Torre, M., et al., 1992).

Compuesto 12

El compuesto **12** **Ilustración 25** se obtuvo como un derivado semisintético de la criptotanshinona **5** con un punto de fusión de 190 °C. Se determinó su composición molecular como C₁₉H₂₂O₄ con base en el ion [M + H⁺] obtenido por EM-DART-AR *m/z* 315.15912 (calculado para C₁₉H₂₃O₄ 315.15963) indicando ocho grados de insaturación.

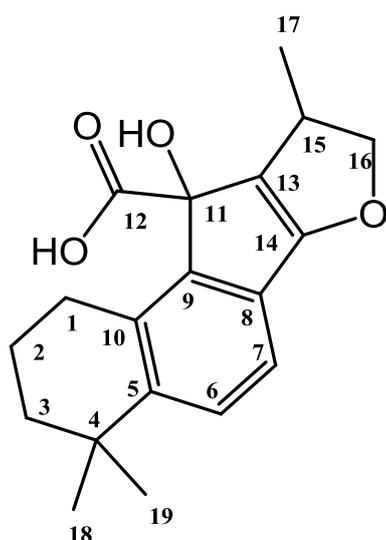


Ilustración 25. Estructura del ácido 4-hidroxi-3,9,9-trimetil-3,4,6,7,8,9-hexahidro-2H-benzo[5,6]indeno[1,2-b]furan-4-oico (**12**).

En el espectro de resonancia magnética nuclear de ¹H (**Espectro 29**, **tabla 5**) del compuesto **12** es similar al espectro de resonancia magnética nuclear del compuesto **5** (**Espectro 3**), la única diferencia es en el valor de los desplazamientos químicos de un sistema AB y de los protones H-16_A y H-16_B. En el espectro del compuesto **5** el sistema AB se encuentra en δ 7.63 y δ 7.48 (*J* = 8.04) correspondiente a los protones de los metinos CH-6 (δ 132.72) y CH-7 (δ 122.65). El protón H-16_A se encuentra a δ 4.88 (*t*) y el protón H-16_B se encuentra a δ 4.36 (*m*).

En el espectro del compuesto **12** el desplazamiento del sistema AB cambia a δ 8.00 y δ 7.76 (*J* = 8.24) correspondiente a los protones de los metinos CH-6 (δ 133.67) y CH-7 (δ 125.28). El protón H-16_A se encuentra a δ 3.93 (*dd*, *J* = 10.7, 7.6) y el protón H-16_B se encuentra a δ 3.83 (*dd*, *J* = 10.7, 5.1).

En el espectro de resonancia magnética nuclear de ^{13}C del compuesto **12** (**Espectro 30, tabla 5**) también es similar al de la criptotanshinona (**5**) (**Espectro 4**). La diferencia más significativa encontrándose en la región de carbonilos. Mientras que en el espectro del compuesto **5** se observan 3 señales: C-11 (δ 184.4), C-12 (δ 175.9) y C-14 (δ 171.0) las cuales corresponden a dos carbonilos de la *orto*-quinona y C-14 β a un carbonilo y enlazado a un oxígeno; en el espectro del compuesto **12** solo se observan 2 señales que corresponden al carbonilo del ácido: C-14 (δ 185.7) y C-12 (δ 183.0). La señal de C-11 se desplazó a δ 154.1 ya que paso de una hibridación sp^2 a una hibridación sp^3 por la contracción del anillo de 6 carbonos de una *orto*-quinona, a un anillo de 5 carbonos (ciclopentadieno) con un ácido carboxílico y un alcohol terciario sobre el mismo átomo de carbono.

La otra diferencia se encuentra en el desplazamiento químico de C-16, que en el espectro del compuesto **5** se encuentra a δ 81.6 y en el compuesto **12** se encuentra a δ 65.6 esto se puede deber a que en el compuesto **5**, el carbonilo C-12 puede tener una forma resonante **Ilustración 26** en la cual la densidad electrónica en C-16 es menor, dejándolo “desprotegido”. En el compuesto **12** ya no se presenta este efecto de resonancia debido a la contracción del anillo por lo que el C-16 se encuentra más “protegido” al no disminuir su densidad electrónica.

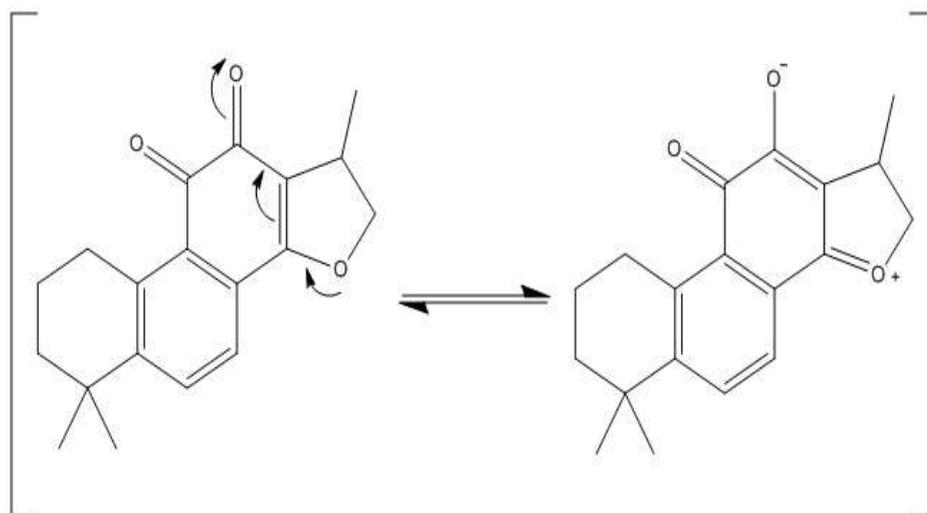


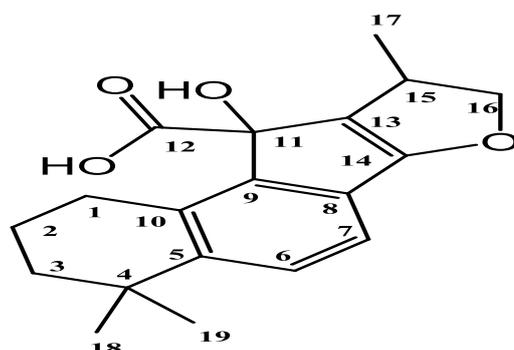
Ilustración 26. Forma resonante de la criptotanshinona **5**.

En el espectro infrarrojo (**Espectro 33**) se observa una banda en 1733 cm^{-1} correspondiente a la vibración del estiramiento del grupo carbonilo, una señal

ancha en 1287 cm^{-1} y una señal débil en 1416 cm^{-1} correspondiente a la torsión/estiramiento del grupo ácido carboxílico y una banda en 3610 cm^{-1} la cual corresponde a la vibración de estiramiento del enlace O-H para alcoholes terciarios libres de puentes de hidrogeno a causa de disolventes no polares.

Tabla 5. Datos de RMN ^1H (500 MHz) y RMN ^{13}C (125 Hz) del compuesto **12** en CDCl_3 .

Posición	Tipo	$\delta_{13\text{C}}$	$\delta_{1\text{H}}$ (J en Hz)	HMBC
1	CH ₂	30.1	3.25, <i>t</i> (6.48)	2, 3, 5, 9, 10
2	CH ₂	19.2	1.83, <i>m</i>	1, 3, 4, 10
3	CH ₂	37.8	1.67, <i>m</i>	1, 2, 4, 5, 18, 19
4	C	35.0		
5	C	153.1		
6	CH	133.7	7.74, <i>d</i> (8.24)	4, 5, 7, 8, 9, 10
7	CH	125.3	7.99, <i>d</i> (8.24)	5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 16
8	C	126.5		
9	C	132.7		
10	C	141.2		
11	C	154.1		
12	C	183.0		
13	C	123.0		
14	C	185.7		
15	CH	65.6	3.44, <i>m</i>	11, 13, 14, 16, 17
16	CH ₂	33.1	H _A 3.93, <i>dd</i> (10.68, 7.63) H _B 3.83, <i>dd</i> (10.76, 5.11)	12, 13, 14, 15, 17
17	CH ₃	14.7	1.27, <i>d</i> (7.17)	13, 15, 16
18	CH ₃	31.9	1.31, <i>s</i>	2, 3, 4, 5, 19
19	CH ₃	31.9	1.31, <i>s</i>	2, 3, 4, 5, 18



6.3 Ensayo de la actividad biológica

Los compuestos miltirona, criptotanshinona y el ferruginol fueron evaluados como inhibidores del crecimiento celular en cinco líneas cancerosas humanas (glía del SNC, próstata, colon, mama y pulmón) y una línea celular no cancerosa (células de riñón de mono) empleando el protocolo de sulfurodamida B. Además, se evaluó su actividad como antioxidantes en el modelo de TBARS (por sus siglas en inglés Especies Reactivas del Ácido Tiobarbitúrico).

6.3.1 Actividad citotóxica

En un primer paso, se realizó el “screening” primario utilizando el protocolo de la sulforrodamina B para determinar la actividad de los compuestos aislados contra las diferentes líneas celulares con el fin de descartar los compuestos no activos y establecer los candidatos idóneos para determinar CI_{50} . Los resultados obtenidos en este primer ensayo se muestran en la **Tabla 6**.

Tabla 6. “Screening” primario de actividad citotóxica de los compuestos aislados de *Salvia axillaris*.

Compuesto/ Línea celular	U251	PC-3	HCT- 15	MCF-7	SKLU- 1	COS-7
Miltirona	89.8	86.1	100	77.2	100	100
Ferruginol	19.1	4.4	29.9	5.4	3.9	9.0
Criptotanshinona	86.4	58.8	97.9	88.2	100	37.5
Adriamicina (0.5 μM)	75.5	45.4	79.7	24.9	77.8	65.1

Los compuestos están evaluados a una concentración de 25 μ M. U251 = glía del SNC, PC-3 = próstata, K562 = Leucemia, HCT-15 = colon, MCF-7 = mama, SKLU-1 = pulmón, COS7 = células de riñón de mono (no cancerosas).

Los resultados obtenidos del screening primario indican que de los tres abietanos evaluados, la criptotanshinona mostró mejor actividad inhibitoria no solo para cáncer de mama como ya se había descrito previamente (Chen, W., et

al. 2010), sino también para las células de cáncer de pulmón (100 %) y cáncer de colon (97.9 %).

Cabe resaltar que una de las características más importantes de un fármaco anticanceroso es la selectividad que presente el compuesto, es decir, que dañe las células cancerosas, pero no a las células normales, dicha característica parece ser presentada por la criptotanshinona, ya que, como se observa en los resultados, la inhibición del crecimiento celular de la línea celular normal (COS-7) es considerablemente menor (37.5 %) que en caso de las líneas celulares cancerosas.

Por otro lado, la miltirona, aunque presentó mejores porcentajes de inhibición que la criptotanshinona, también inhibió el crecimiento celular de la línea celular no cancerosa (100 %) por lo que fue descartada para la determinación de la CI_{50} . Sin embargo, este compuesto podría representar una estructura líder para la búsqueda de nuevos compuestos para el tratamiento del cáncer realizando las modificaciones estructurales necesarias para disminuir su toxicidad en las células normales y mantener o incrementar su actividad contra las células cancerosas. El ferruginol no tuvo actividad significativa contra ninguna línea celular de cáncer por lo que también fue descartada para la continuación del estudio.

Una vez determinada la actividad anticancerosa de la criptotanshinona, se procedió a realizar la curva de CI_{50} en todas las líneas celulares. Esta medida cuantitativa indica la dosis o concentración de un determinado fármaco u otra sustancia que se requiere para inhibir a la mitad un determinado proceso biológico, los resultados se muestran en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Resultados de la curva CI_{50} de la muestra criptotanshinona.

CI_{50} (μM) (IS)						
Compuesto/línea celular	U251	PC-3	K562	MCF-7	SKLU-1	COS-7
Criptotanshinona	9.2±1.0 (3.54)	9.7±1.2 (3.3)	10.8±0.5 (3.0)	7.5±0.7 (4.3)	15.0±0.7 (2.17)	32.6±2.3
Adriamicina	0.08±0.003 (3.1)	0.43±0.5 (0.58)	0.20±0.02 (1.3)	0.23±0.02 (1.1)	0.05±0.003 (5.0)	0.25±0.0019

Los resultados representan el promedio \pm DS de al menos tres experimentos diferentes; U251=glía del SNC, PC-3=próstata, K562 =Leucemia, MCF-7= mama, SKLU-1= pulmón, COS7= células de riñón de mono (no cancerosas). SI = Índice de selectividad calculado como IC_{50} de COS-7/ IC_{50} de la línea cancerosa.

Los resultados obtenidos indican que las CI_{50} mostradas por la criptotanshinona en todas las líneas celulares evaluadas son más elevadas que las determinadas para el fármaco de referencia (adriamicina). Sin embargo, es importante mencionar algunas las ventajas que presenta la criptotanshinona con respecto a la adriamicina; la criptotanshinona exhibe mayor selectividad en tres líneas celulares (próstata, leucemia y mama), en las cuales, la adriamicina no presenta ninguna selectividad. Además, se puede observar que la criptotanshinona provoca un menor daño a la línea celular normal ($CI_{50} = 32.6 \pm 2.3$) comparado con el ocasionado por la adriamicina ($CI_{50} = 0.25 \pm 0.0019$), en otras palabras, la dosis requerida para inhibir el crecimiento de las células normales es mucho mayor en el caso de la criptotanshinona que en el caso de la adriamicina.

6.3.2 Actividad antioxidante.

Se realizó la evaluación de la actividad antioxidante de algunos de los compuestos aislados empleando el modelo de TBARS. Para la prueba se realizó un “screening” primario para determinar si los compuestos evaluados presentaban actividad significativa usando concentraciones de 1, 10 y 100 μM , Los resultados se muestran en la **Tabla 8**.

Tabla 8. Resultados del “screening” primario de la actividad antioxidante en el modelo de TBARS de los compuestos aislados de *Salvia axillaris*.

Muestra	Concentración (μM)	Inhibición (%)
Miltirona (9)	1	0.42
	10	8.39
	100	95.17
ferruginol (8)	1	8.17
	10	95.46
	100	96.21
Criptotanshinona (5)	1	3.53
	10	10.34
	100	42.32

Los resultados del “screening” primario indican que el mejor agente antioxidante es el ferruginol ya que a una concentración de 10 μM ya se obtiene el 95 % de inhibición de la peroxidación en lípidos de cerebro de rata. La miltirona también exhibe actividad antioxidante significativa debido a que presenta un 95 % de inhibición a una concentración de 100 μM . Respecto a la criptotanshinona, ésta no presenta actividad antioxidante significativa.

Considerando los datos obtenidos en el cernimiento primario, se procedió a determinar la CI_{50} del ferruginol y la miltirona, los resultados se muestran en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Actividad antioxidante de los compuestos aislados de *Salvia axillaris* en el modelo de TBARS.

Compuesto	CI_{50} (μM)
ferruginol	2.21 ± 0.44
miltirona	15.67 ± 2.06
BHT (n=5)	1.22 ± 0.44
quercetina (n =3)	1.496 ± 0.031
α -tocoferol	6.79 ± 2.16

Los valores representan el promedio de tres experimentos independientes \pm el error estándar de la media.

Como se observa en la **Tabla 9**, el ferruginol es el compuesto que mostró mayor actividad antioxidante en el modelo evaluado, presenta mayor actividad que el α -tocoferol pero menor que el BHT y la quercetina. El mecanismo de acción propuesto para la actividad antioxidante del ferruginol por Saijo, H. y colaboradores es la desprotonación del grupo hidroxilo para formar una quinona como producto intermediario y la formación de otros 3 productos; dehidroferruginol, 7β -hidroxiferruginol y el sugiol.

La miltirona mostró actividad significativa, sin embargo, su CI_{50} (15.67 ± 2.06) es aproximadamente el doble que el α -tocoferol y mucho mayor que la del BHT y quercetina.

7. Conclusiones

El estudio fitoquímico de las hojas y raíces de *Salvia axillaris* condujo a la identificación de 11 compuestos, diez compuestos ya descritos previamente en la literatura (**1-8, 9 y 11**) y uno no descrito (**10**), así como la semisíntesis de un derivado de la criptotanshinona (**12**).

La evaluación de la criptotanshinona como inhibidor del crecimiento de células cancerosas indicó que este compuesto podría representar una estructura líder en el desarrollo de nuevos fármacos contra el cáncer ya que presenta alta selectividad, incluso mayor que la adriamicina, contra casi todas líneas celulares cancerosas evaluadas.

La evaluación de la actividad antioxidante en el modelo de TBARS mostró que el ferruginol posee actividad moderada contra el estrés oxidativo.

A diferencia de las salvias europeas y asiáticas, que se caracterizan por bio-sintetizar principalmente diterpenos de tipo abietano, las especies mexicanas se caracterizan por sintetizar mayoritariamente diterpenos derivados del esqueleto del *neo-clerodano* siendo este tipo de compuestos los más distintivos de estas plantas. En este aspecto, es importante señalar que el tipo de compuestos aislados de *Salvia axillaris*, que es una especie endémica de México, están estrechamente relacionados con las *Salvias* de origen asiático, principalmente con *S. miltiorrhiza*, una especie endémica de China.

Los resultados presentados en este trabajo representan una contribución al conocimiento químico y biológico de especies endémicas mexicanas pertenecientes al género *Salvia* y reafirman la importancia de las plantas como fuente de nuevas entidades químicas con potencial para el desarrollo de nuevos fármacos en el tratamiento de diferentes enfermedades.

8. Bibliografía

- Alanís, A., Calzada, F., Cervantes, J., Torres, J., & Ceballos, G. (2005). Antibacterial properties of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal Of Ethnopharmacology*, 100(1-2), 153-157.
- Al-Musayeib, N., Perveen, S., Fatima, I., Nasir, M., & Hussain, A. (2011). Antioxidant, Anti-Glycation and Anti-Inflammatory Activities of Phenolic Constituents from *Cordia sinensis*. *Molecules*, 16(12), 10214-10226.
- Azab, A., Nassar, A., & Azab, A. (2016). Anti-Inflammatory Activity of Natural Products. *Molecules*, 21(10), 1321.
- Butler, M. (2004). The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. *Journal Of Natural Products*, 67(12), 2141-2153.
- Butt, M., & Sultan, M. (2011). Coffee and its Consumption: Benefits and Risks. *Critical Reviews In Food Science And Nutrition*, 51(4), 363-373.
- Calderón, G., & Rzedowski, J. (2010). *Flora fanerogámica del valle de México*. México: Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Chaturvedula, V., & Prakash, I. (2012). Isolation of Stigmasterol and β -Sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. *International Current Pharmaceutical Journal*, 1(9).
- Chen, W., Luo, Y., Liu, L., Zhou, H., Xu, B., & Han, X. et al. (2010). Cryptotanshinone Inhibits Cancer Cell Proliferation by Suppressing Mammalian Target of Rapamycin-Mediated Cyclin D1 Expression and Rb Phosphorylation. *Cancer Prevention Research*, 3(8), 1015-1025.
- Choy, K., Murugan, D., & Mustafa, M. (2018). Natural products targeting ER stress pathway for the treatment of cardiovascular diseases. *Pharmacological Research*, 132, 119-129.
- Ciocarlan, N. (2016). Family Lamiaceae: Main Important Spontaneous Medicinal and Aromatic Species In The Republic Of Moldova. *Journal Of Botany*, 8(12), 86-91.

- Cornejo Tenorio, G., & Ibarra Manríquez, G. (2011). Diversidad y distribución del género *Salvia* (Lamiaceae) en Michoacán, México. *Revista Mexicana De Biodiversidad*, 82(1), 1279-1296.
- Cragg, G., & Newman, D. (2013). Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1830(6), 3670-3695.
- Davey, M. (2017). Secondary Metabolism in Plant Cell Cultures. *Encyclopedia Of Applied Plant Sciences*, 462-467
- DeCorte, B. (2016). Underexplored Opportunities for Natural Products in Drug Discovery. *Journal Of Medicinal Chemistry*, 59(20), 9295-9304.
- Defeng, X. (2013). Tanshinone compounds, preparation and use thereof. China. No. de Patente CN103193860A.
- Delgado, G.(Ed.), & Romo de Vivar, A.(Ed.). (2015). Temas Selectos de Química de Productos Naturales. Ciudad de México, México: Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- de la Torre, M., Bruno, M., Rodríguez, B., & Savona, G. (1992). Abietane and 20-nor-abietane diterpenoids from the root of *Meriandra benghalensis*. *Phytochemistry*, 31(11), 3953-3955.
- Devecchi, M. (2006). The Use Of Labiatae Of Ornamental Interest In The Design Of Parks And Gardens. *Acta Hortic.* 723, 51-58
- Dias, D., Urban, S., & Roessner, U. (2012). A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. *Metabolites*, 2(2), 303-336.
- Eggen, M. and Georg, G. (2002). The cryptophycins: Their synthesis and anticancer activity. *Medicinal Research Reviews*, 22(2), pp.85-101.
- Esquivel, B., Calderon, J. S., & Flores, E. (1997). Abietane and Icetexane diterpenoids from *Salvia ballotaeflora* and *Salvia axillaris*. *Phytochemistry*, 46(3), 531-534.
- Fiore, G., Nencini, C., Cavallo, F., Capasso, A., Bader, A., Giorgi, G., & Micheli, L. (2006). In vitro antiproliferative effect of six *Salvia* species on human tumor cell lines. *Phytotherapy Research*, 20(8), 701-703.
- Fronza, M., Murillo, R., Ślusarczyk, S., Adams, M., Hamburger, M., & Heinzmann, B. et al. (2011). In vitro cytotoxic activity of abietane

- diterpenes from *Peltodon longipes* as well as *Salvia miltiorrhiza* and *Salvia sahendica*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19(16), 4876-4881.
- Gohari, A. R., Saeidnia, S., Hadjiakhoondi, A., Abdoullahi, M., & Nezafati, M. (2009). Isolation and Quantificative Analysis of Oleanolic Acid from *Satureja mutica* Fisch. & CA Mey. *Journal of Medicinal Plants*, 1(29), 65-69.
 - Gomes, A., Saha, A., Chatterjee, I., & Chakravarty, A. (2007). Viper and cobra venom neutralization by β -sitosterol and stigmasterol isolated from the root extract of *Pluchea indica* Less. (Asteraceae). *Phytomedicine*, 14(9), 637-643.
 - Gnoatto, S., Dasonville-Klimpt, A., Da Nascimento, S., Galéra, P., Boumediene, K., & Gosmann, G. et al. (2008). Evaluation of ursolic acid isolated from *Ilex paraguariensis* and derivatives on aromatase inhibition. *European Journal Of Medicinal Chemistry*, 43(9), 1865-1877.
 - Gutiérrez-Rodríguez, A., Juárez-Portilla, C., Olivares-Bañuelos, T., & Zepeda, R. (2018). Anticancer activity of seaweeds. *Drug Discovery Today*, 23(2), 434-447.
 - Hao, D., Ge, G., & Xiao, P. (2018). Anticancer Drug Targets of *Salvia* Phytometabolites: Chemistry, Biology and Omics. *Current Drug Targets*, 19(1).
 - Hayashi, T., Kakisawa, H., Hsū, H. Y., & Chen, Y. P. (1970). The structure of miltirone, a new diterpenoid quinone. *Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications*, (5), 299a-299a.
 - Hernández, T., Canales, M., Avila, J., Duran, A., Caballero, J., Vivar, A., & Lira, R. (2003). Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). *Journal Of Ethnopharmacology*, 88(2-3), 181-188.
 - Herrera-Ruiz, M., García-Beltrán, Y., Mora, S., Díaz-Véliz, G., Viana, G., Tortoriello, J., & Ramírez, G. (2006). Antidepressant and anxiolytic effects of hydroalcoholic extract from *Salvia elegans*. *Journal Of Ethnopharmacology*, 107(1), 53-58.

- Hostettmann, K., & Marston, A. (2002). Twenty years of research into medicinal plants: Results and perspectives. *Phytochemistry Reviews*, 1(3), 275-285.
- Ho, J., & Hong, C. (2011). Salviolic acids: small compounds with multiple mechanisms for cardiovascular protection. *Journal Of Biomedical Science*, 18(1), 30.
- Instituto de Biología. "**Salvia axillaris** - IBUNAM:MEXU:OAX773188". UNIBIO: Colecciones Biológicas. 2011-08-12. Universidad Nacional Autónoma de México. Consultada en: 2018-8-2. Disponible en: <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:OAX773188>
- Jassbi, A. R., Eghtesadi, F., Hazeri, N., Ma'sumi, H., Valizadeh, J., Chandran, J. N., ... & Baldwin, I. T. (2017). The roots of *Salvia rhytidea*: a rich source of biologically active diterpenoids. *Natural product research*, 31(4), 477-481.
- Jesus, J., Lago, J., Laurenti, M., Yamamoto, E., & Passero, L. (2015). Antimicrobial Activity of Oleanolic and Ursolic Acids: An Update. *Evidence-Based Complementary And Alternative Medicine*, 2015, 1-14.
- Josabad Alonso-Castro, A., Jose Maldonado-Miranda, J., Zarate-Martinez, A., Jacobo-Salcedo, M., Fernández-Galicia, C., & Alejandro Figueroa-Zuñiga, L. et al. (2012). Medicinal plants used in the Huasteca Potosina, México. *Journal Of Ethnopharmacology*, 143(1), 292-298.
- Juárez-Vázquez, M., Carranza-Álvarez, C., Alonso-Castro, A., González-Alcaraz, V., Bravo-Acevedo, E., Chamarro-Tinajero, F., & Solano, E. (2013). Ethnobotany of medicinal plants used in Xalpatlahuac, Guerrero, México. *Journal Of Ethnopharmacology*, 148(2), 521-527.
- Katz, L., & Baltz, R. (2016). Natural product discovery: past, present, and future. *Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 43(2-3), 155-176.
- Kabouche, A., & Kabouche, Z. (2008). Bioactive Diterpenoids of *Salvia* Species. *Studies in Natural Products Chemistry*, 35, 753–833.
- LaLonde, R. (2005). Terpenes and Terpenoids. *Van Nostrand's Encyclopedia Of Chemistry*.

- Lamiaceae. (2018). In *Encyclopædia Britannica*. Retrieved from <https://academic.eb.com/levels/collegiate/article/Lamiaceae/46962> (revisado el día 25 de Julio del 2018 a las 13:13 pm)
- Lee, D., Kim, I., Saha, S., & Choi, K. (2016). Paraptosis in the anti-cancer arsenal of natural products. *Pharmacology & Therapeutics*, 162, 120-133.
- Lee, D., Lee, S., Noh, J., & Hong, S. (1999). Antibacterial Activities of Cryptotanshinone and Dihydrotanshinone from a Medicinal Herb, *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry*, 63(12), 2236-2239.
- Li, S., Wang, H., Hong, L., Liu, W., Huang, F., & Wang, J. et al. (2014). Cryptotanshinone inhibits breast cancer cell growth by suppressing estrogen receptor signaling. *Cancer Biology & Therapy*, 16(1), 176-184.
- Li, W., Chang, S., Chang, S. and Chang, H. (2008). Isolation of antibacterial diterpenoids from *Cryptomeria japonica* bark. *Natural Product Research*, 22(12), pp.1085-1093.
- Lin, L., Hsu, W., & Lin, C. (2014). Antiviral Natural Products and Herbal Medicines. *Journal Of Traditional And Complementary Medicine*, 4(1), 24-35.
- Linamaría Escobar, M., & Fabio A, A. (2010). Aplicación de un Método Fluorométrico para Evaluar la Proliferación Celular en Líneas Celulares Tumoraes. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, 17(2), 173-180.
- Listos, J., Merska, A., & Fidecka, S. (2011). Pharmacological activity of Salvinorin A, the major component of *Salvia divinorum*. *Pharmacological Reports*, 63(6), 1305-1309.
- Liu, Z., Li, G., Long, C., Xu, J., Cen, J., & Yang, X. (2018). The antioxidant activity and genotoxicity of isogarcinol. *Food Chemistry*, 253, 5-12.
- Loewus, F., & Murthy, P. (2000). myo-Inositol metabolism in plants. *Plant Science*, 150(1), 1-19.
- Lopresti, A. (2016). *Salvia* (Sage): A Review of its Potential Cognitive-Enhancing and Protective Effects. *Drugs In R&D*, 17(1), 53-64.
- López, A. (2017). Gertrude Jekyll: la 'influencer' del paisajismo y la jardinería. Retrieved from

https://elpais.com/cultura/2017/11/29/actualidad/1511950052_102590.html#comentarios

- Lu, L., Zhang, S., Li, C., Zhou, C., Li, D., & Liu, P. et al. (2017). Cryptotanshinone inhibits human glioma cell proliferation in vitro and in vivo through SHP-2-dependent inhibition of STAT3 activation. *Cell Death And Disease*, 8(5), e2767.
- Martínez-Gordillo, M., Fragoso-Martínez, I., García-Peña, M. D. R., & Montiel, O. (2013). Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84(1), 30–86.
- Michell, R. (2008). Inositol derivatives: evolution and functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(2), 151-161.
- Miura, K., Kikuzaki, H., & Nakatani, N. (2001). Apianane terpenoids from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry*, 58(8), 1171-1175
- Moreno-Salazar, S., Robles-Zepeda, R., & Johnson, D. (2008). Plant folk medicines for gastrointestinal disorders among the main tribes of Sonora, Mexico. *Fitoterapia*, 79(2), 132-141.
- Mushtaq, N., Schmatz, R., Pereira, L., Ahmad, M., Stefanello, N., & Vieira, J. et al. (2013). Rosmarinic acid prevents lipid peroxidation and increase in acetylcholinesterase activity in brain of streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell Biochemistry And Function*, 32(3), 287-293.
- Ng, T., Liu, F., & Wang, Z. (2000). Antioxidative activity of natural products from plants. *Life Sciences*, 66(8), 709-723.
- Nobili, S., Lippi, D., Witort, E., Donnini, M., Bausi, L., Mini, E. and Capaccioli, S. (2009). Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological Research*, 59(6), pp.365-378.
- Orhan, I., Senol, F., & Sener, B. (2018). Recent Approaches Towards Selected Lamiaceae Plants for Their Prospective Use in Neuroprotection.
- Palou, A. (2005). El Libro blanco de los esteroides vegetales en alimentación.
- Patra, A., Ghorai, S. K., De, S. R., & Mal, D. (2006). Regiospecific synthesis of benzo [b] fluorenones via ring contraction by benzil-benzilic acid rearrangement of benz [a] anthracene-5, 6-diones. *Synthesis*, 2006(15), 2556-2562.

- Petersen, M. (2013). Rosmarinic acid : new aspects. *Phytochemistry Reviews*, 12(1), 207–227
- Robbins, R. (2003). Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, 51(10), 2866-2887.
- Saijo, H., Kofujita, H., Takahashi, K. and Ashitani, T. (2015). Antioxidant activity and mechanism of the abietane-type diterpene ferruginol. *Natural Product Research*, 29(18), pp.1739-1743.
- Sekiyama, Y., Chikayama, E., & Kikuchi, J. (2010). Profiling Polar and Semipolar Plant Metabolites throughout Extraction Processes Using a Combined Solution-State and High-Resolution Magic Angle Spinning NMR Approach. *Analytical Chemistry*, 82(5), 1643-1652.
- Shahidi, F. and Zhong, Y. (2005). Lipid Oxidation: Measurement Methods. In Bailey's Industrial Oil and Fat Products, F. Shahidi (Ed.)
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal Of Functional Foods*, 18, 757-781.
- Shin, D., Kim, H., Shin, K., Yoon, Y., Kim, S., Han, D., & Kwon, B. (2009). Cryptotanshinone Inhibits Constitutive Signal Transducer and Activator of Transcription 3 Function through Blocking the Dimerization in DU145 Prostate Cancer Cells. *Cancer Research*, 69(1), 193-202.
- Stalikas, C. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal Of Separation Science*, 30(18), 3268-3295.
- Teng, Y., Zhang, M., Wang, W., Liu, L., Zhou, L., Miao, S., & Wan, L. (2014). Compound danshen tablet ameliorated $\alpha\beta$ 25-35-induced spatial memory impairment in mice via rescuing imbalance between cytokines and neurotrophins. *BMC Complementary And Alternative Medicine*, 14(1).
- Tepe, B., Eminagaoglu, O., Akpulat, H., & Aydin, E. (2007). Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia verticillata* (L.) subsp. *verticillata* and *S. verticillata* (L.) subsp. *amasiaca* (Freyn & Bornm.) Bornm. *Food Chemistry*, 100(3), 985-989.

- Turner, B.L. (1996). Synopsis of Section *Axillaris* of *Salvia* (Lamiaceae). *Phytologia*, 81(1), 16-21.
- Vinken, M., & Blaauboer, B. (2017). In vitro testing of basal cytotoxicity: Establishment of an adverse outcome pathway from chemical insult to cell death. *Toxicology In Vitro*, 39, 104-110
- Waller, S. B., Cleff, M. B., Serra, E. F., Silva, A. L., Gomes, A. dos R., de Mello, J. R. B., ... Meireles, M. C. A. (2017). Plants from Lamiaceae family as source of antifungal molecules in humane and veterinary medicine. *Microbial Pathogenesis*, 104, 232–237.
- Wang, H., Gu, J., Hou, X., Chen, J., Yang, N., & Liu, Y. et al. (2017). Anti-inflammatory effect of miltirone on inflammatory bowel disease via TLR4/NF-κB/IQGAP2 signaling pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 85, 531-540.
- Ward, C., Prosser, B., & Lederer, W. (2014). Mechanical Stretch-Induced Activation of ROS/RNS Signaling in Striated Muscle. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(6), 929-936.
- What Is Cancer?. (2018). American Cancer Society. Retrieved from <https://www.cancer.org/cancer/cancer-basics/what-is-cancer.html>
- Wu, Y., Ni, Z., Shi, Q., Dong, M., Kiyota, H., Gu, Y., & Cong, B. (2012). Constituents from *Salvia* Species and Their Biological Activities. *Chemical Reviews*, 112(11), 5967-6026.
- Xiong, W., Gong, J. and Xing, C. (2017). Ferruginol exhibits anticancer effects in OVCAR-3 human ovary cancer cells by inducing apoptosis, inhibition of cancer cell migration and G2/M phase cell cycle arrest. *Molecular Medicine Reports*, 16(5), pp.7013-7017.
- Xu, J., Wei, K., Zhang, G., Lei, L., Yang, D., & Wang, W. et al. (2018). Ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacology of Chinese *Salvia* species: A review. *Journal Of Ethnopharmacology*, 225, 18-30.
- Xu, L., Li, Y., Dai, Y., & Peng, J. (2018). Natural products for the treatment of type 2 diabetes mellitus: Pharmacology and mechanisms. *Pharmacological Research*, 1–15.

- Xu, Z., Jiang, H., Zhu, Y., Wang, H., Jiang, J., & Chen, L. et al. (2017). Cryptotanshinone induces ROS-dependent autophagy in multidrug-resistant colon cancer cells. *Chemico-Biological Interactions*, 273, 48-55.
- Yang, J., Xu, C., Chen, H., Huang, M., Ma, X., Deng, S., Huang, Y., Wen, Y., Yang, X. and Song, P. (2017). In vitro and in vivo antitumor effects of the diterpene-enriched extract from *Taxodium ascendens* through the mitochondrial-dependent apoptosis pathway. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 96, pp.1199-1208.
- Yan, Q., Shi, M., Ng, J., & Wu, J. (2006). Elicitor-induced rosmarinic acid accumulation and secondary metabolism enzyme activities in *Salvia miltiorrhiza* hairy roots. *Plant Science*, 170(4), 853-858.
- Yan, S., Huang, C., Wu, S., & Yin, M. (2010). Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in four human liver cancer cell lines. *Toxicology In Vitro*, 24(3), 842-848.
- Zhang, B., Ma, Z., Li, X., Zhang, C., Shao, Y., & Liu, Z. et al. (2016). Tanshinones suppress non-small cell lung cancer through up-regulating miR-137. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 48(8), 768-770.
- Zhang, L., Zhang, H., Li, X., Jia, B., Yang, Y., & Zhou, P. et al. (2016). Miltirone protects human EAhy926 endothelial cells from oxidized low-density lipoprotein-derived oxidative stress via a heme oxygenase-1 and MAPK/Nrf2 dependent pathway. *Phytomedicine*, 23(14), 1806-1813.
- Zhu, Z. (2018). Miltirone-induced apoptosis in cisplatin-resistant lung cancer cells through upregulation of p53 signaling pathways. *Oncology letters*, 15(6), 8841-8846.
- Zwenger, S., & Basu, C. (2008). Plant terpenoids: applications and future potentials. *Biotechnology And Molecular Biology Reviews*, 3(1), 001-007.

Anexos

Glosario de términos botánicos

Actinomorfa: flor con más de un plano de simetría, o sea, con simetría radiada.

Acuminada/o: ápice de un órgano terminado gradualmente en punta aguda.

Anátropo: óvulo girado 180° sobre su base de manera que el micrópilo se ubica junto al hilo y el funículo se suelda lateralmente dando origen a la rafe.

Androceo: conjunto de estambres. Los órganos masculinos de la flor.

Angiospermas: plantas con tejidos y órganos perfectamente diferenciados.

Apical: que se encuentra en el ápice.

Ápice: extremo de un órgano.

Antera: parte del estambre que lleva los sacos polínicos.

Annual: planta que cumple su ciclo en un año o menos, durante el cual florece, fructifica y muere. Se opone a perenne.

Bráctea: hoja situada en la cercanía de la flor, distinta de las hojas normales.

Bicarpelar: que tiene dos carpelos.

Bífido: el órgano profundamente dividido en dos partes en el ápice.

Carpelo: cada una de las hojas modificadas y fértiles, que forman el gineceo.

Caudícula: es un apéndice que sostiene el polinio, originado por el tapete de la antera.

Ciliado: que posee cilios.

Cilios: pelos dispuestos en hileras en el borde de un órgano.

Cimosas: relativo a la cima.

Corola: ciclo interno del perianto, formado por los pétalos.

Dehiscencia: que se abre espontáneamente a la madurez.

Decidua/o: caedizo.

Didínamo: androceo con dos estambres largos y dos cortos.

Estaminodio: aplicase al estambre atrofiado, estéril, reducido generalmente al filamento.

Estigma: porción apical del estilo, generalmente papilosa y receptiva del grano de polen.

Estípulas: estructuras laminares, a veces presentes, a los lados de la base del pecíolo.

Fanerógamas: subreino de plantas con los órganos sexuales, es decir, las flores, perceptibles a simple vista.

Gamopétalo: con pétalos soldados.

Gineceo: conjunto de los órganos femeninos de la flor.

Ginobásico: cuando el estilo nace de la base del ovario. Se opone a terminal.

Glabro/a: desprovisto de pelo, lampiño.

Gramíneas: planta monocotiledónea, de tallos cilíndricos, huecos, con nudos llenos, hojas alternas y largas, con flores en espiga y granos secos.

Hispido/a: se aplica a un órgano cubierto de pelos rígidos y rectos, áspero al tacto.

Inflorescencia: conjunto de flores que nacen dentro de un sistema de ramificación (ejes).

Lanceolado/a: órgano laminar con contorno en forma de punta de lanza, angostamente elíptico con los extremos agudos.

Limbo: porción laminar de la hoja. Parte libre de las corolas gamopétalas, en el extremo del tubo.

Monocotiledóneas: son una clase de plantas fanerógamas angiospermas, con los embriones de las semillas presentando un solo cotiledón u hoja inicial.

Obovado/a: de contorno ovado pero con la parte más ancha hacia el extremo.

Oblanceolado/a: lanceolado pero con la parte más ancha en el tercio superior.

Nectario: glándula que secreta néctar, ubicada generalmente en la flor, pero también fuera de ella.

Pauci: prefijo que indica poco o corto número.

Panícula: inflorescencia racemosa, compuesta, racimo de racimos.

Pedicelado/a: que tiene pedicelo.

Pedicelo: eje que sostiene cada una de las flores de una inflorescencia. En las gramíneas el eje que soporta la espiguilla.

Perenne: planta u órgano que vive más de dos años; se opone a anual y bienal. Vegetal cuyo ciclo vegetativo se extiende más de dos años.

Perianto: envoltura floral, formada por cáliz y corola.

Pilosa/o: con pelos.

Polínio: es el conjunto o masa de granos de polen de una teca que se traslada como una unidad de polinización. Generalmente lleva una o dos caudículas y un retináculo.

Pubérula/o: ligeramente pubescente o con pelitos muy finos, cortos y escasos.

Pubescente: órgano cubierto de pelos finos y suaves.

Retináculo: apéndice adherente de los polinios.

Seríceo/a: con pelos finos, cortos y aplicados a la superficie del órgano, con cierto brillo como la seda.

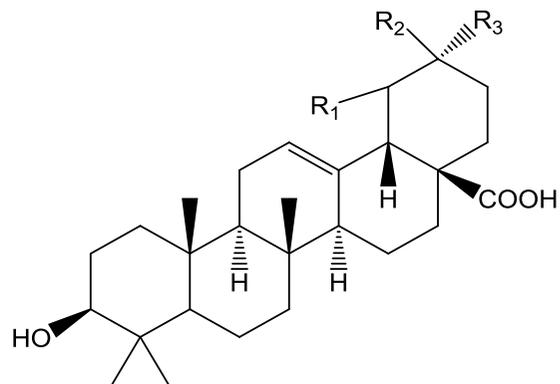
Sésil: el órgano que carece de pie o soporte.

Simpétala: corola formada con los pétalos soldados.

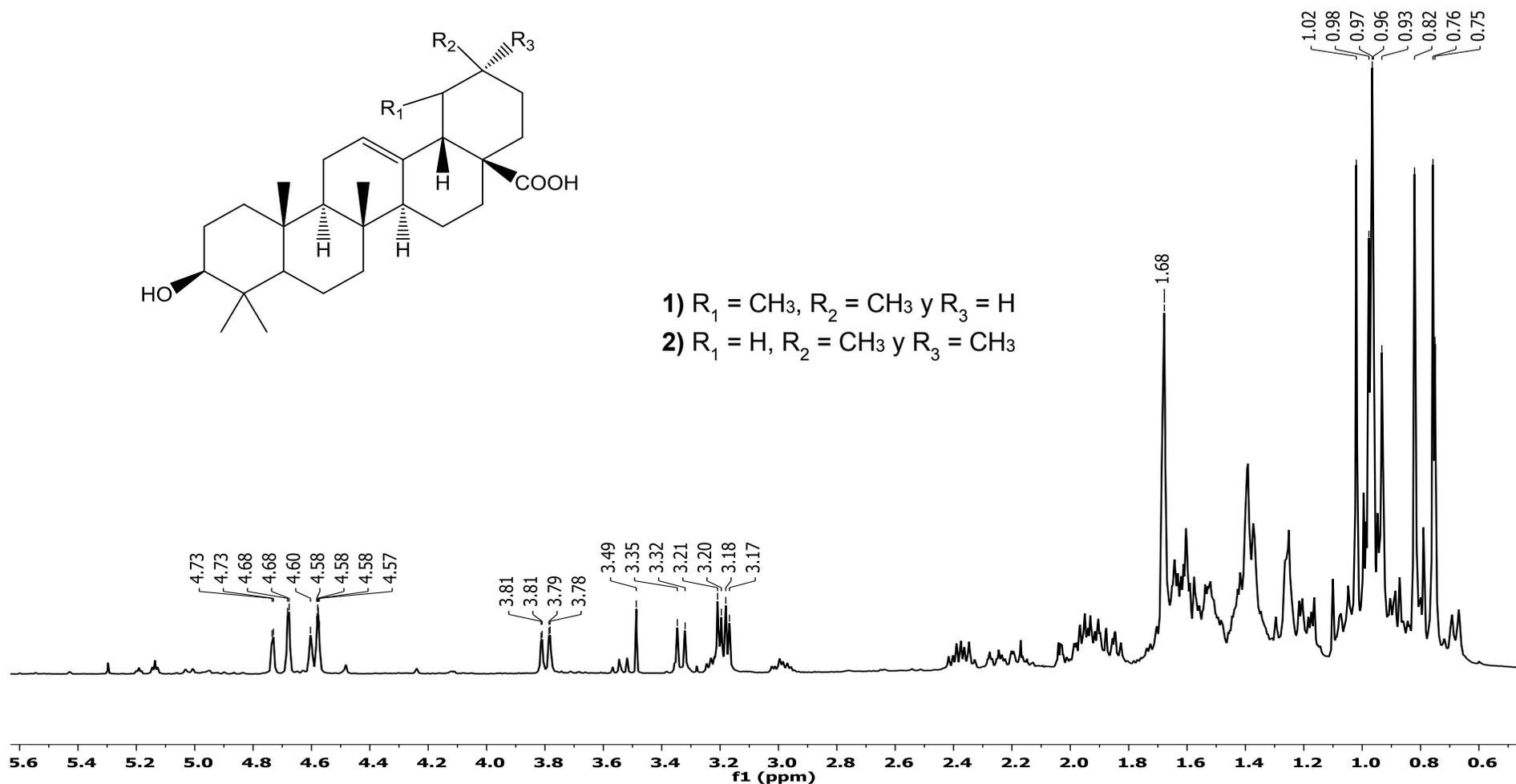
Teca: cada una de las dos mitades de la antera con dos sacos polínicos.

Trífido: dividido en tres.

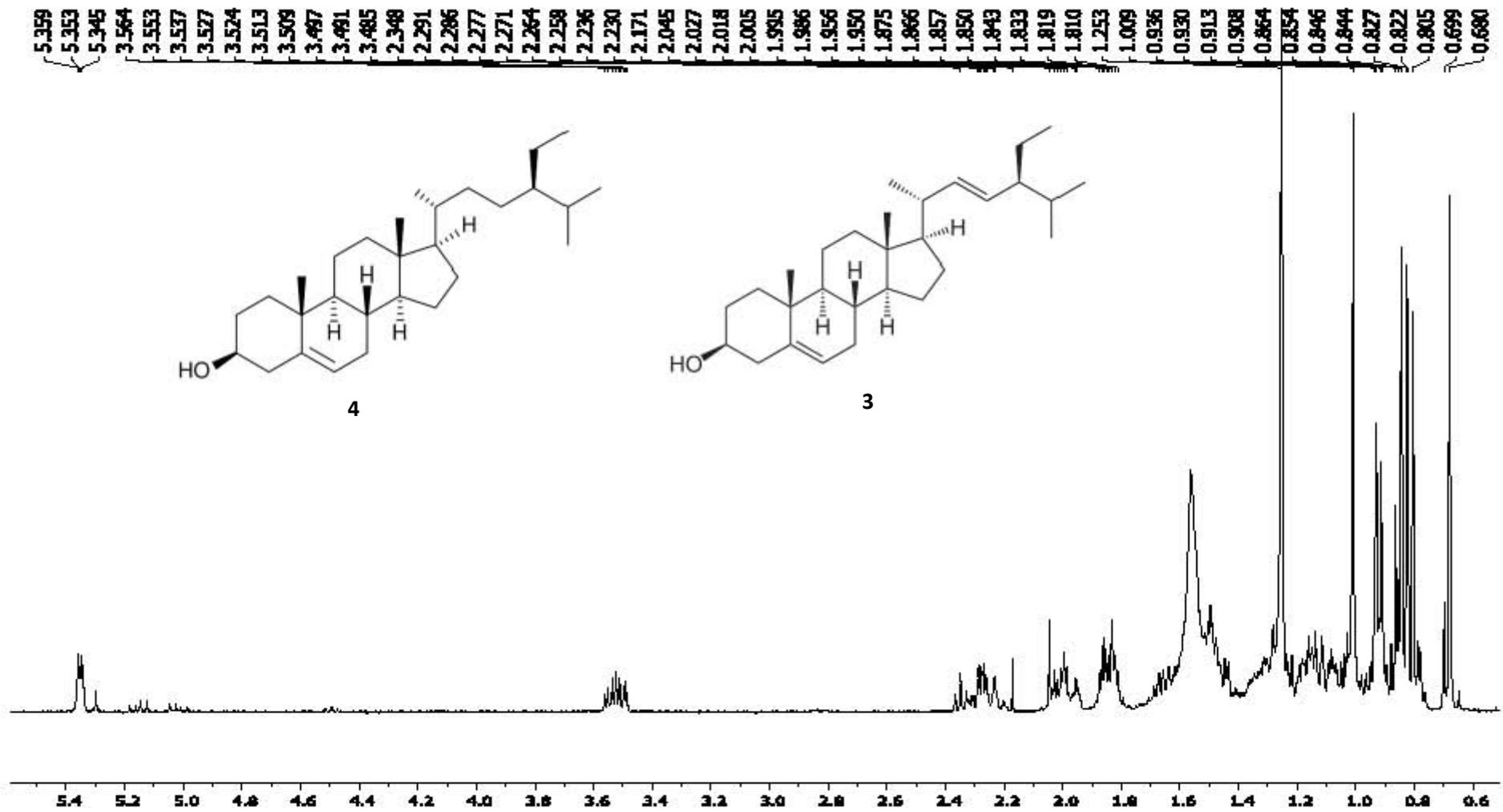
Zigomorfa: corola o flor con un solo plano de simetría, o sea, con simetría bilateral.



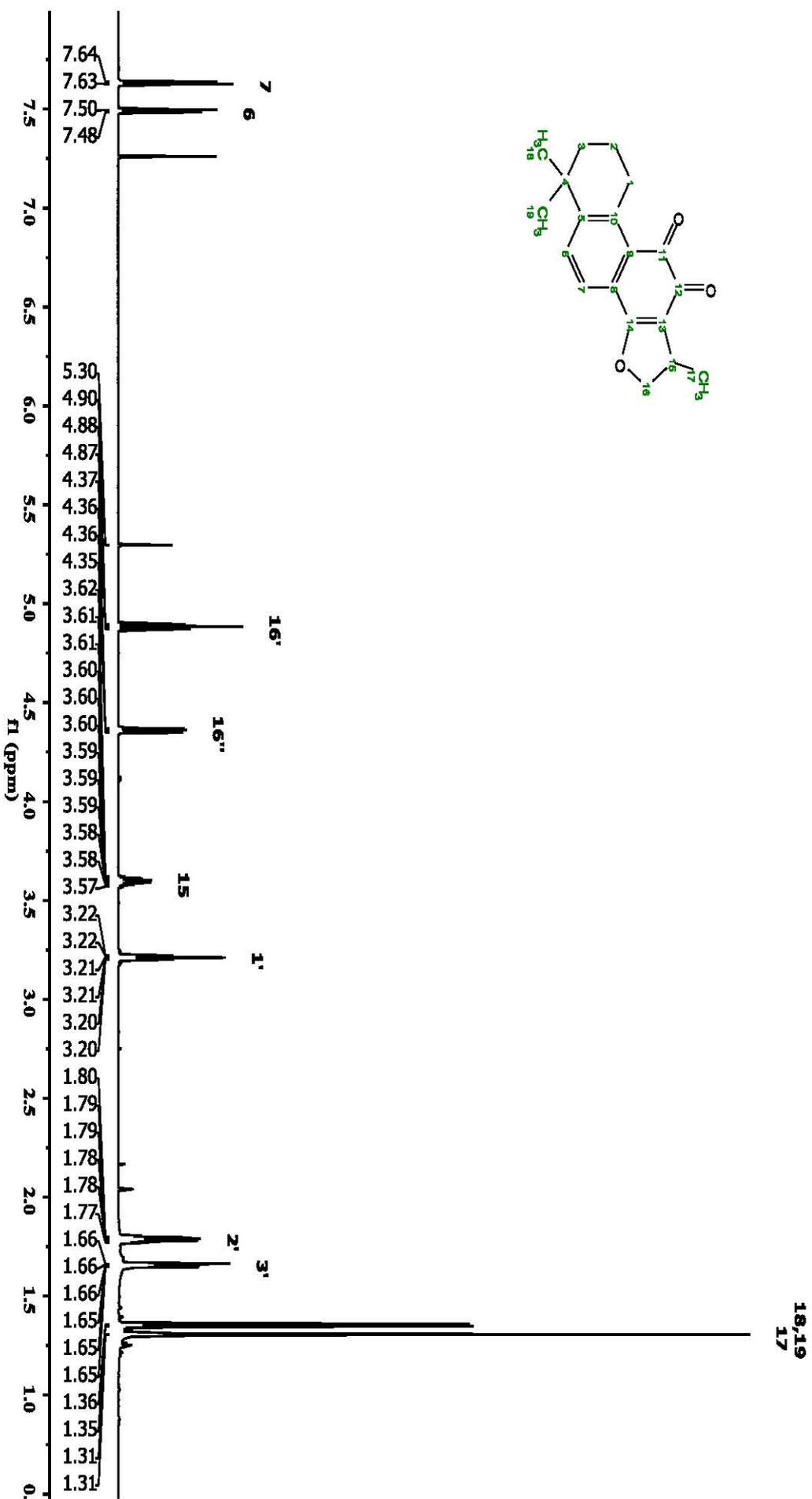
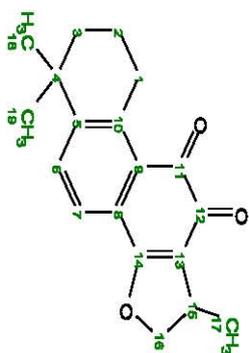
- 1) $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{CH}_3$ y $R_3 = \text{H}$
- 2) $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{CH}_3$ y $R_3 = \text{CH}_3$



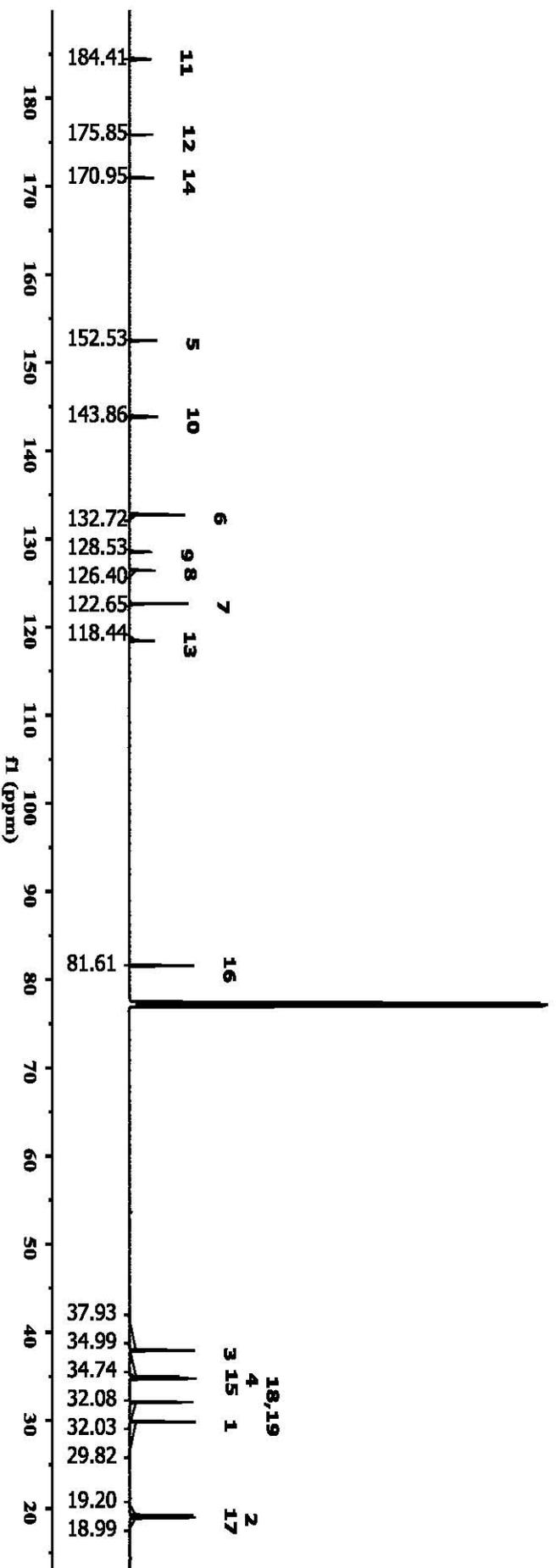
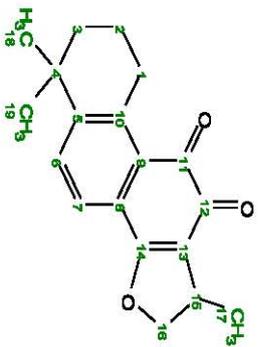
Espectro 1. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H de la mezcla de ácido ursólico (**1**) y ácido oleanólico (**2**) (400 MHz, CDCl_3).



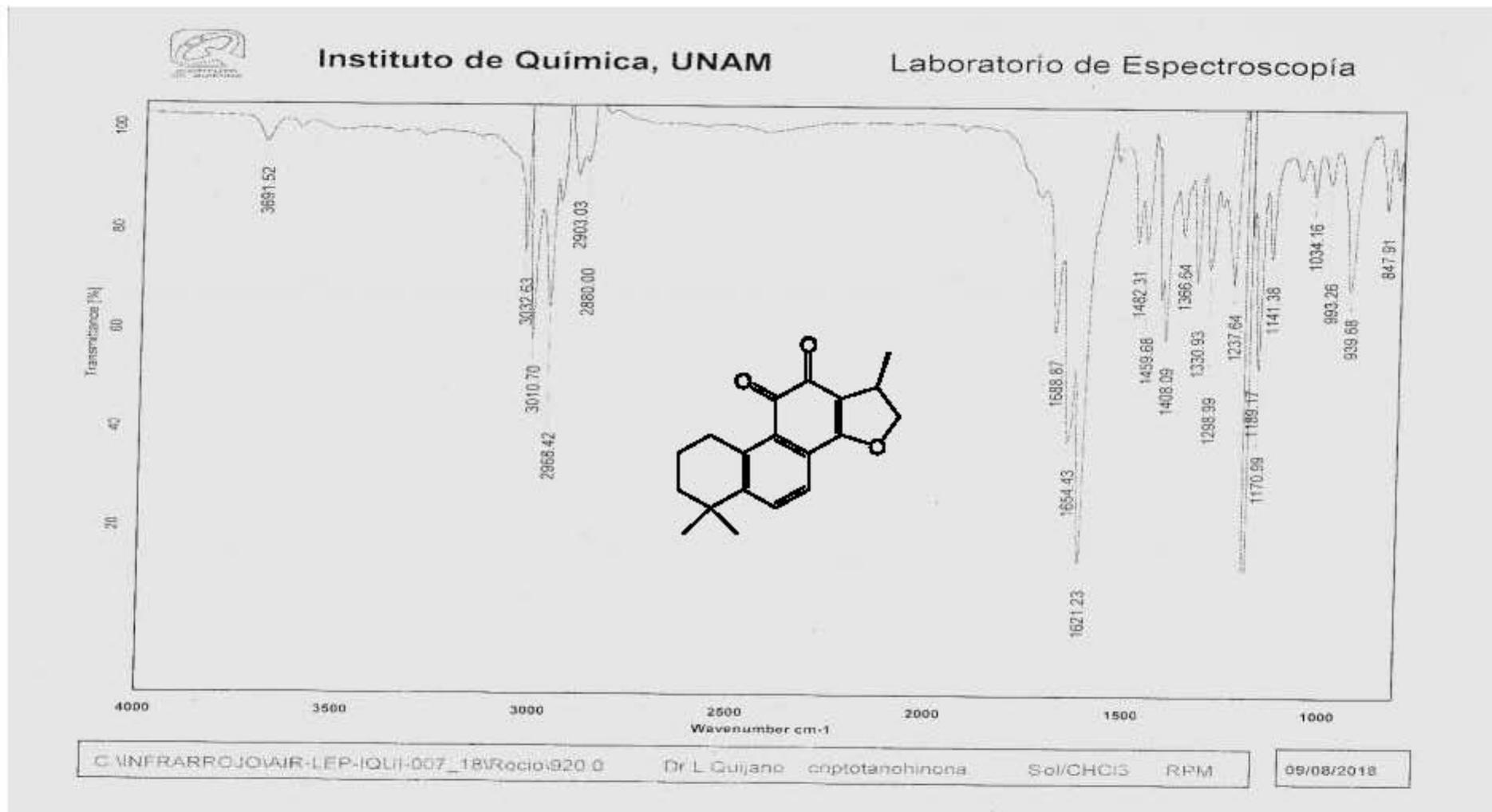
Espectro 2. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H de la mezcla de stigmasterol (**3**)- β -sitosterol (**4**) (400 MHz, CDCl_3).



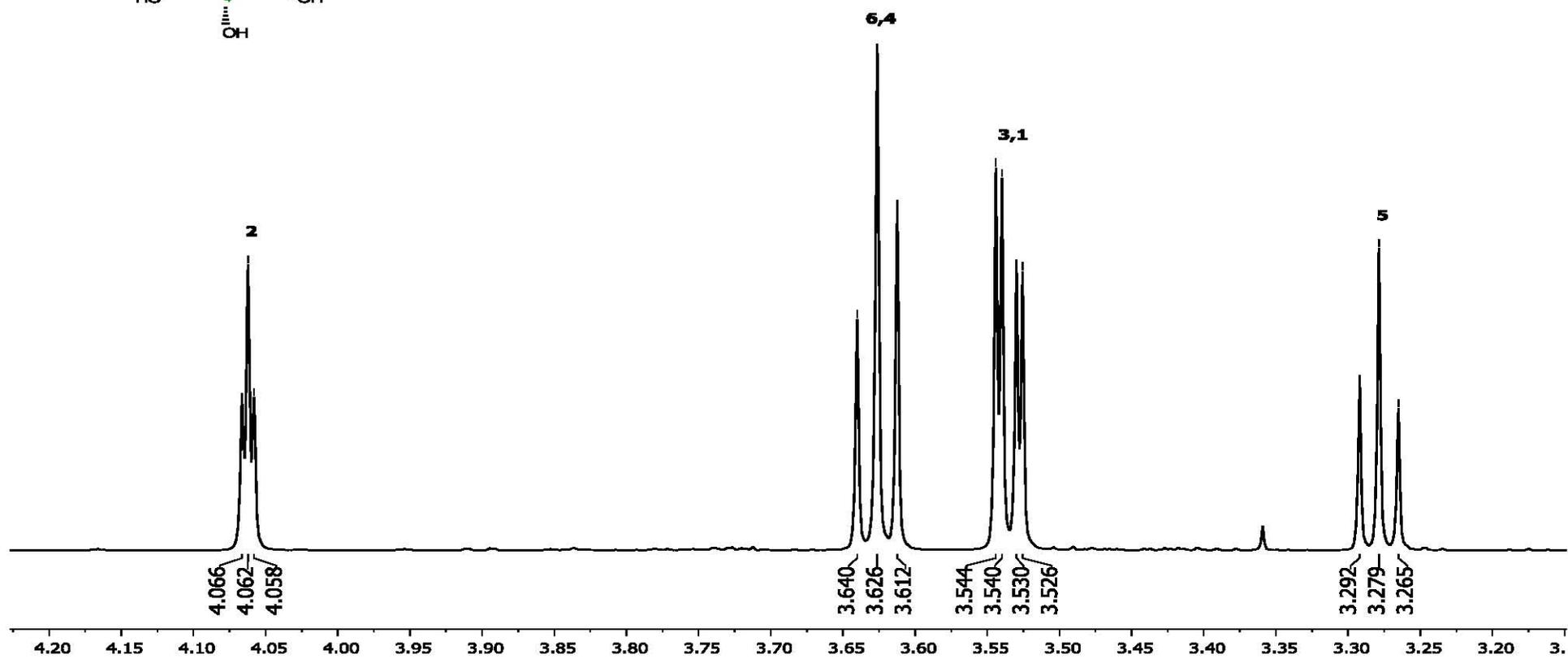
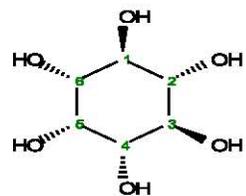
Espectro 3. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H del 20-nor-abietano criptotanshinona (500 MHz, CDCl_3).



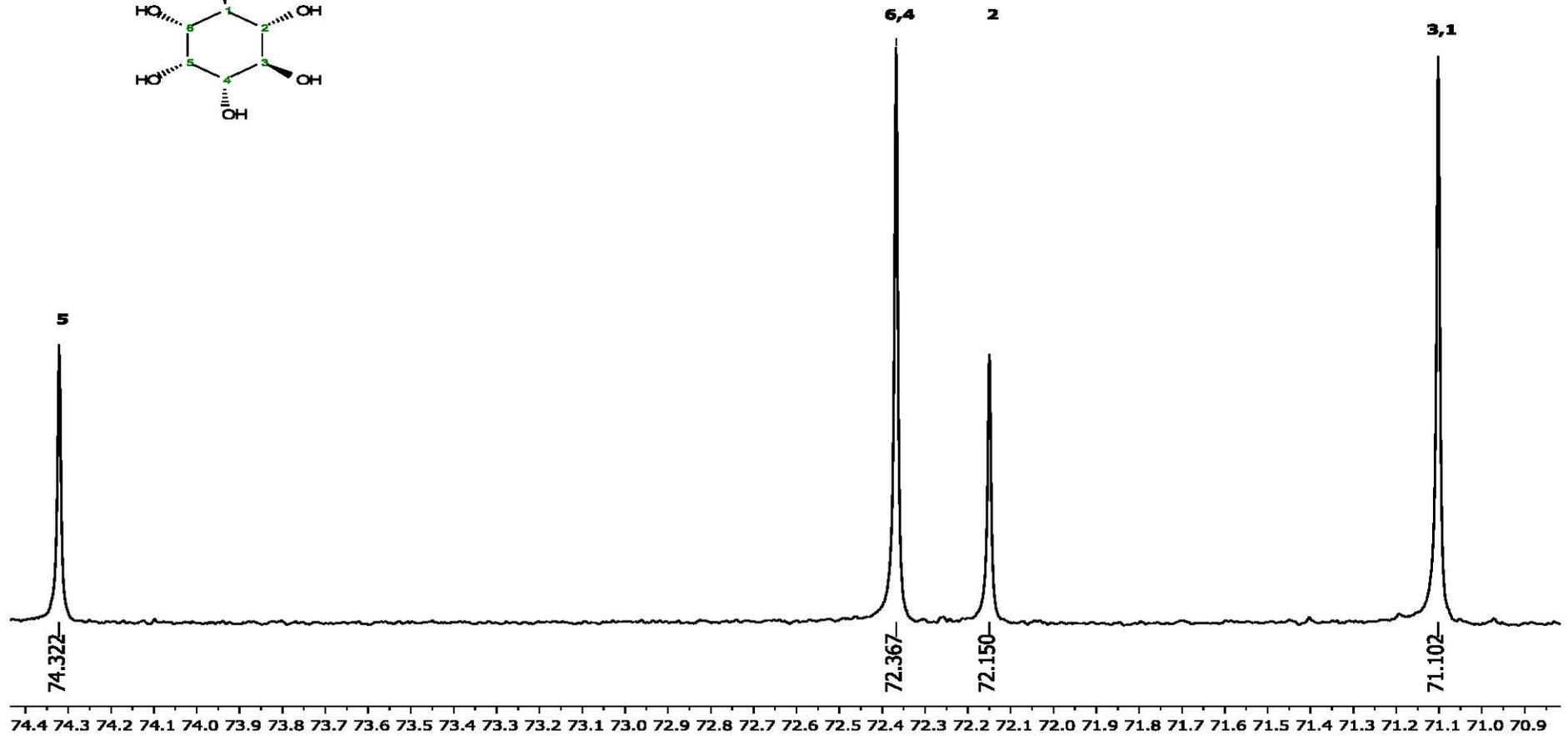
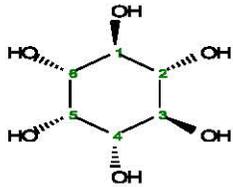
Espectro 4. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C del 20-nor-abietano criptotanshinona (125 MHz, CDCl_3).



Espectro 5. Espectro de Infrarrojo del 20-nor-abietano criptotanshinona por la técnica de solución en CHCl₃.



Espectro 6. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H del *myo*-inositol. (700 MHz, D_2O).

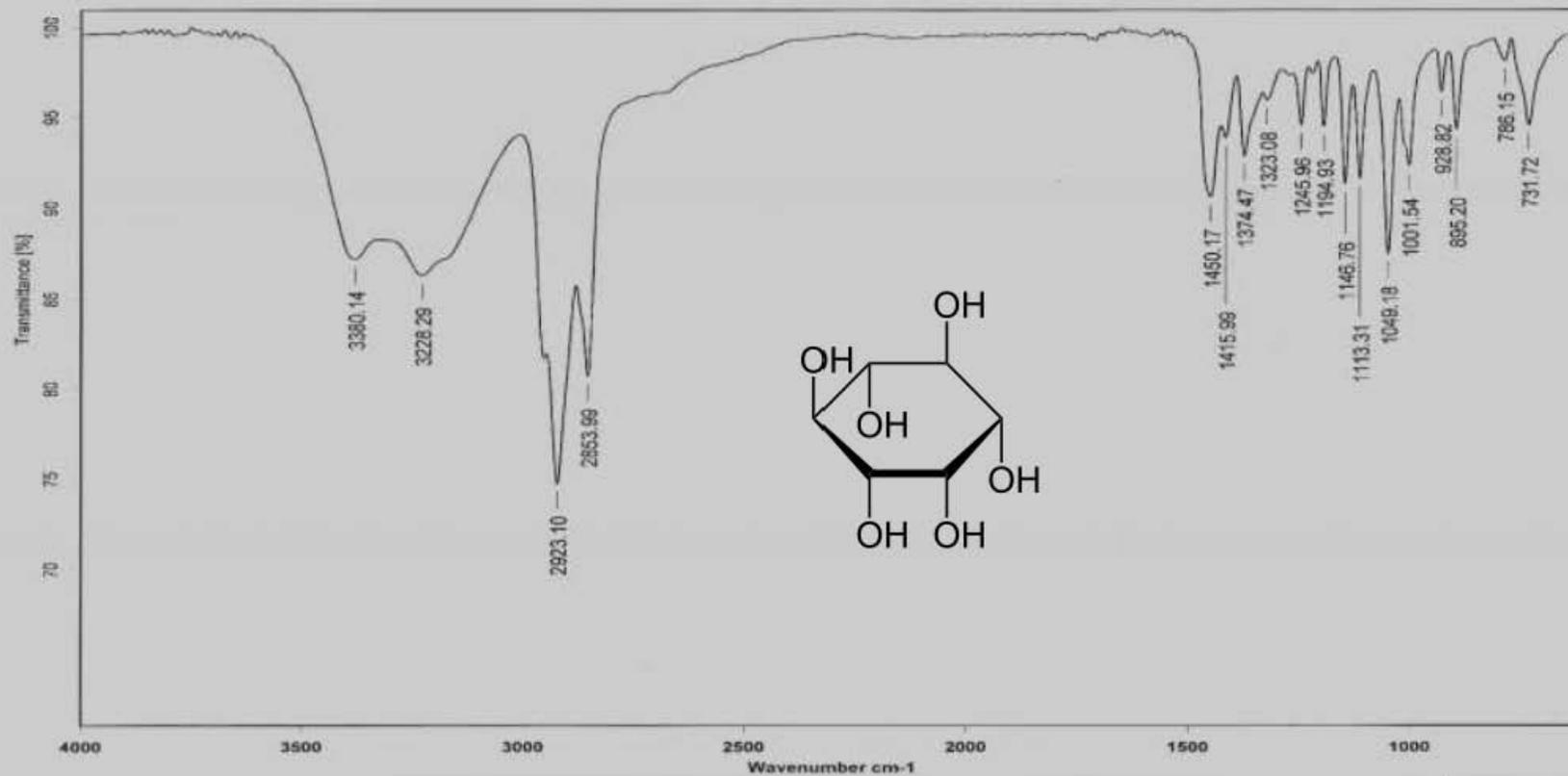


Espectro 8. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C del *myo*-inositol. (175 MHz, D_2O).



Instituto de Química, UNAM

Laboratorio de Espectroscopía



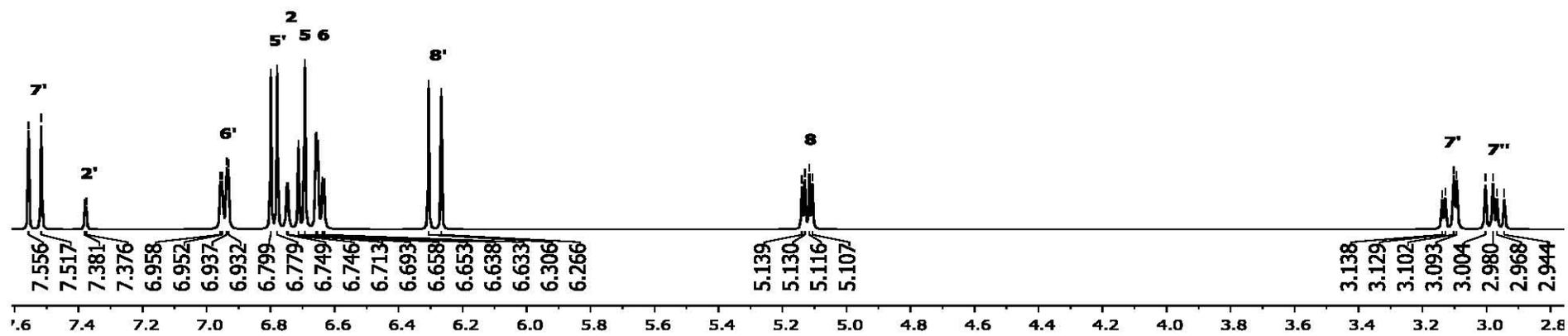
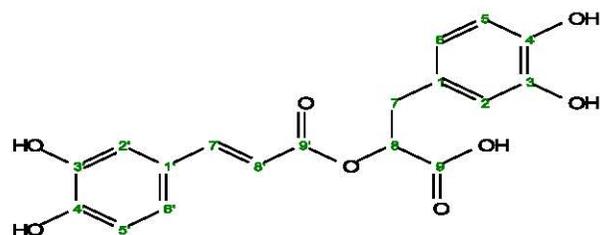
C:\INFRARROJO\AIR-LEP-IQUI-007_18\Rocio\987.0

Dr.L Quijano myo-inositol

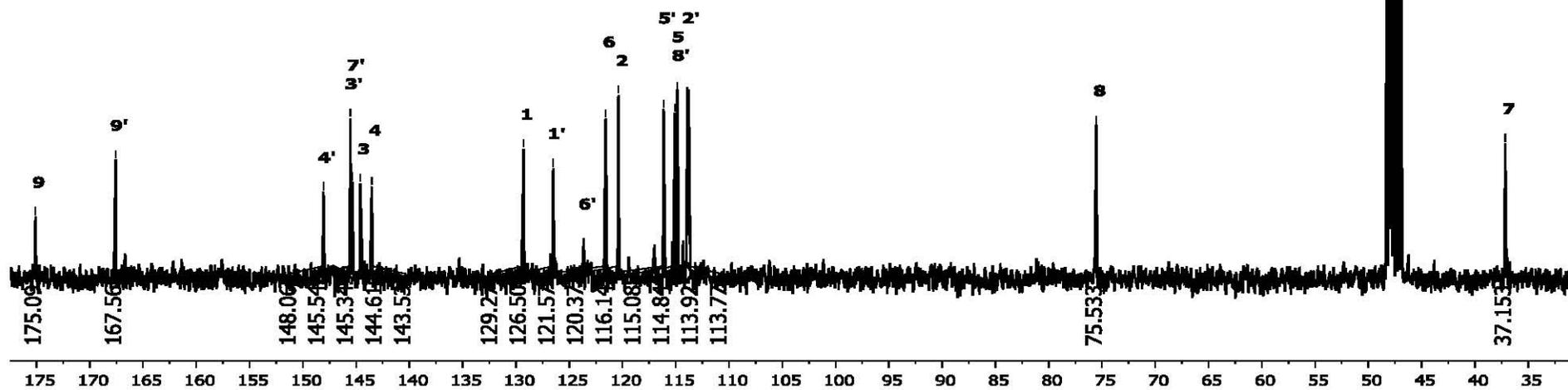
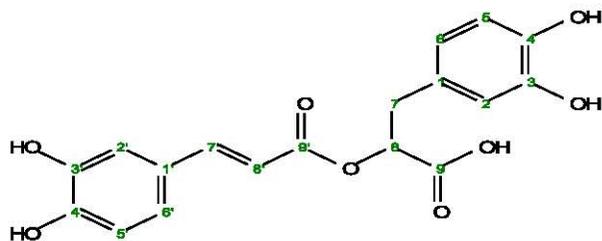
Susp/Nujol RPM

25/08/2018

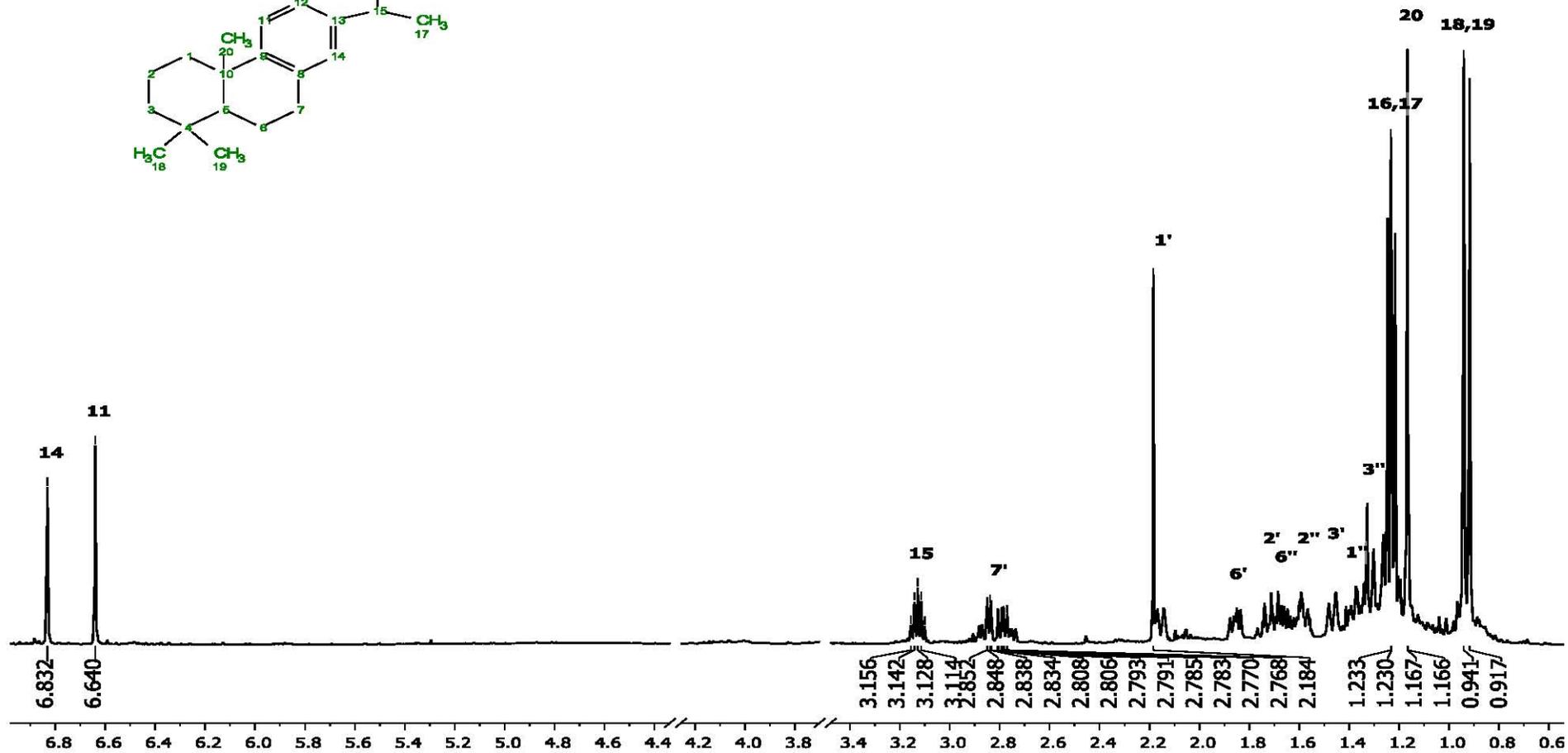
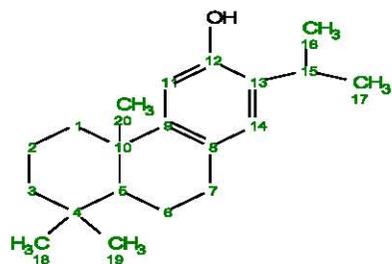
Espectro 9. Espectro de Infrarrojo del *myo*-inositol por la técnica de suspensión en Nujol.



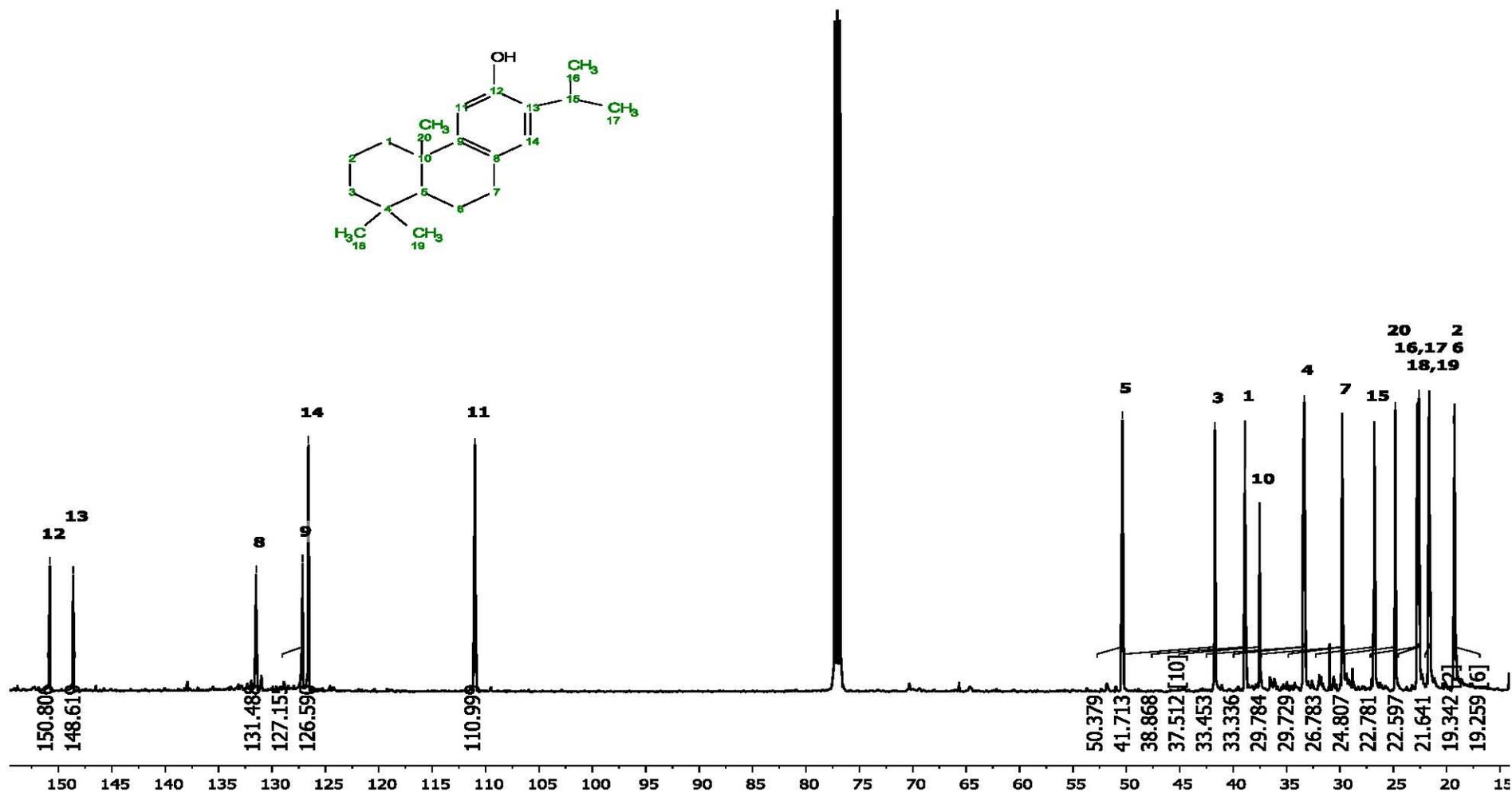
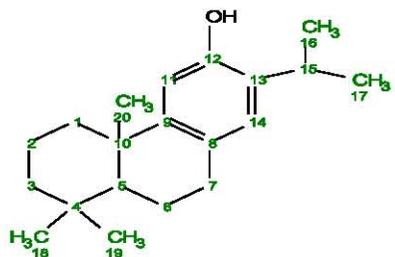
Espectro 10. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H del ácido rosmarínico. (400 MHz, MeOD).



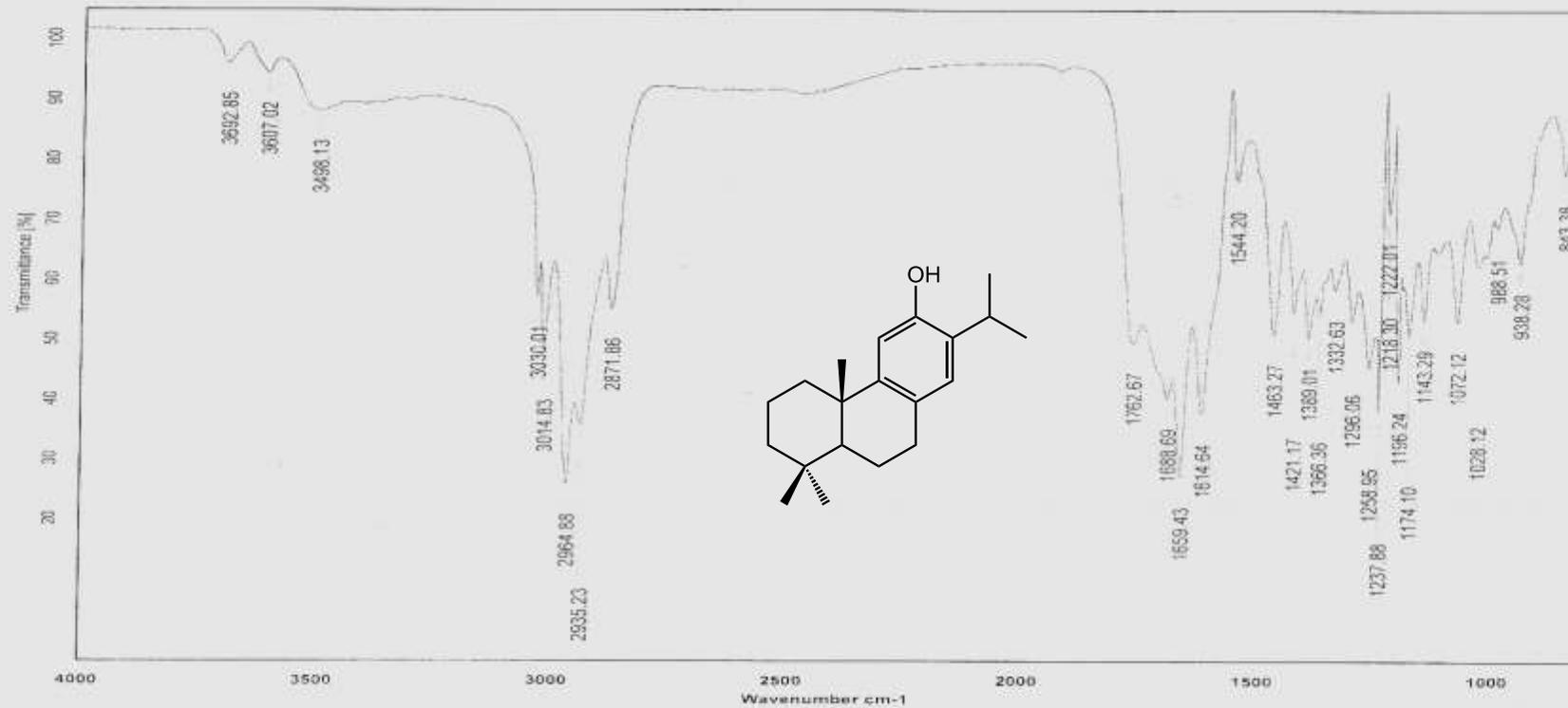
Espectro 11. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ¹³C del ácido rosmarínico. (100 MHz, MeOD).



Espectro 12. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H del ferruginol. (700 MHz, CDCl_3).



Espectro 13. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C del ferruginol. (175 MHz, CDCl_3).



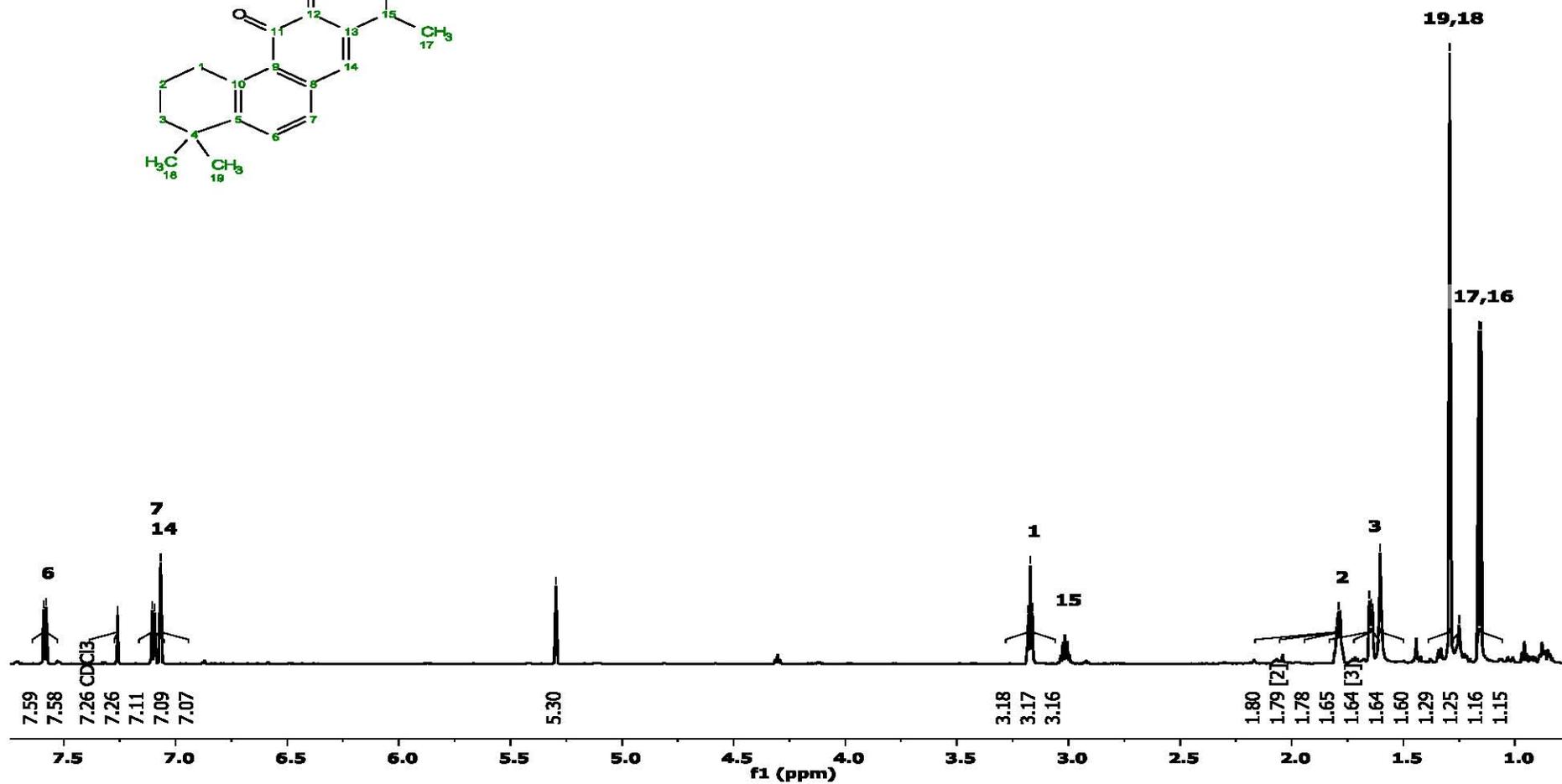
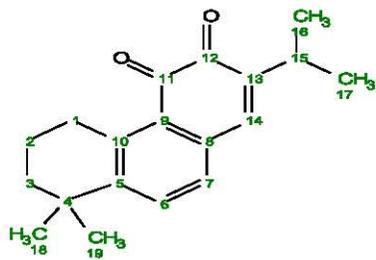
C:\INFRARROJO\AIR-LEP-IQUI-007_18\Recid\919.0

Dr. L. Quijano CB-Sar-H11

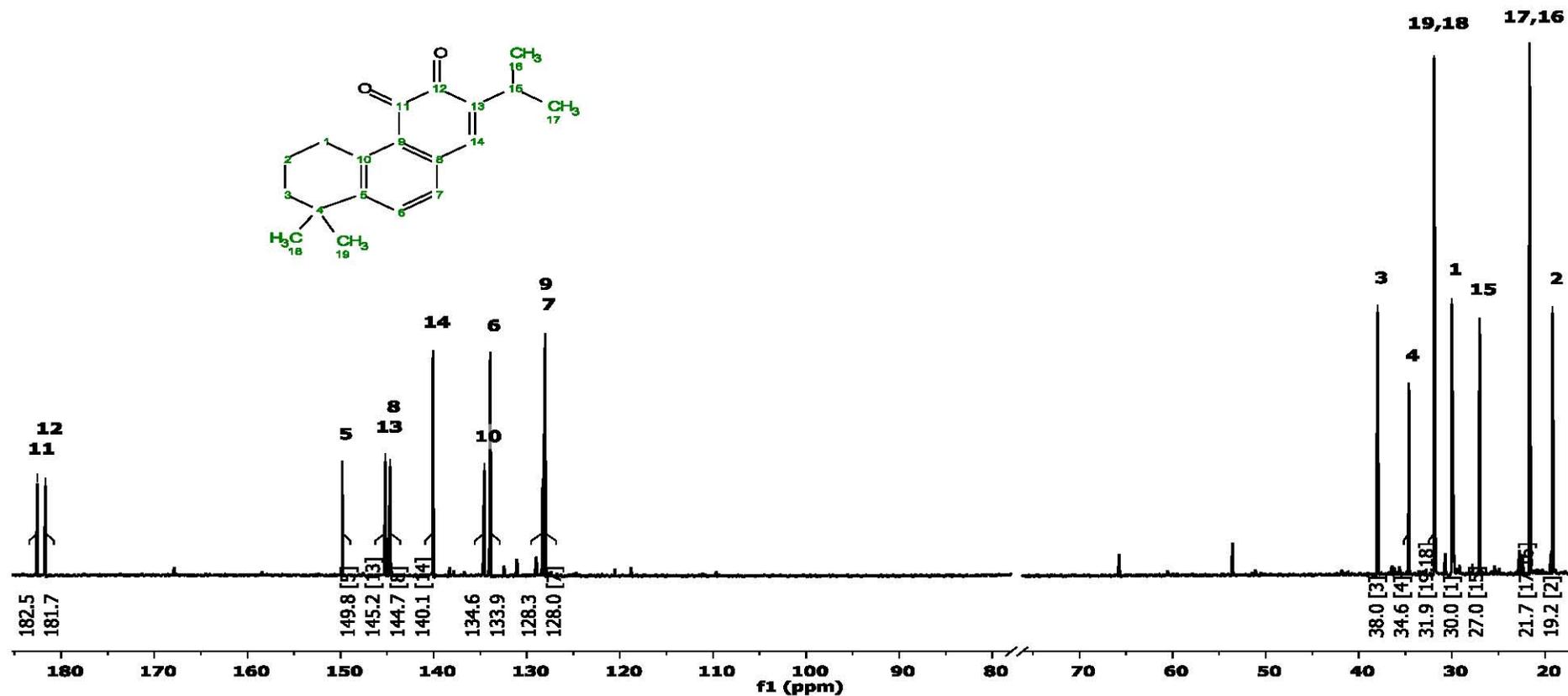
Sol:CHCl3 RPM

09/08/2018

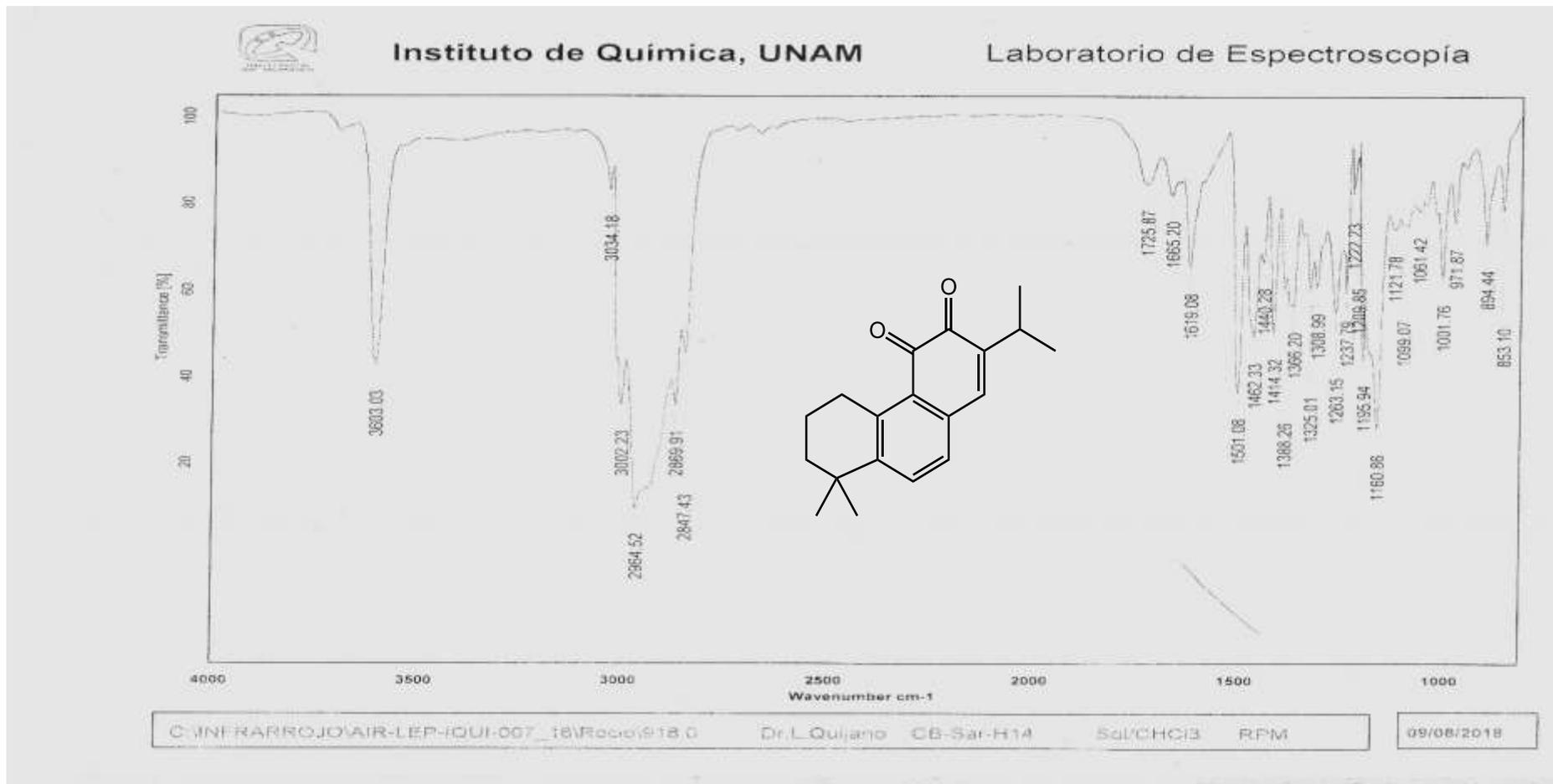
Espectro 14. Espectro de infrarrojo del ferruginol por la técnica de solución en CHCl₃.



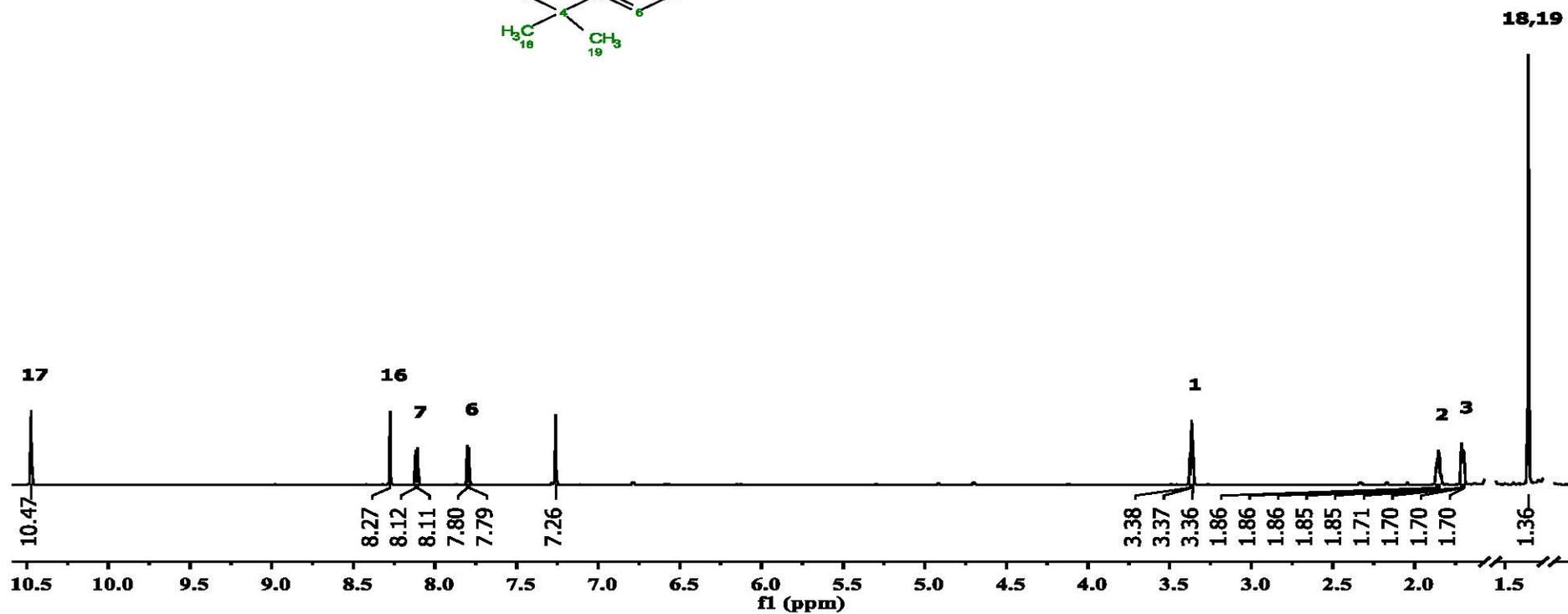
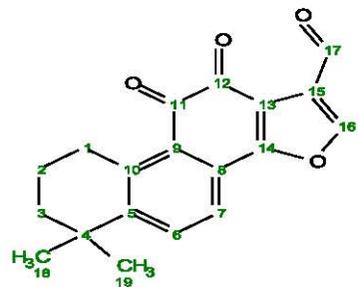
Espectro 15. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H de la miltirona. (700 MHz, CDCl_3).



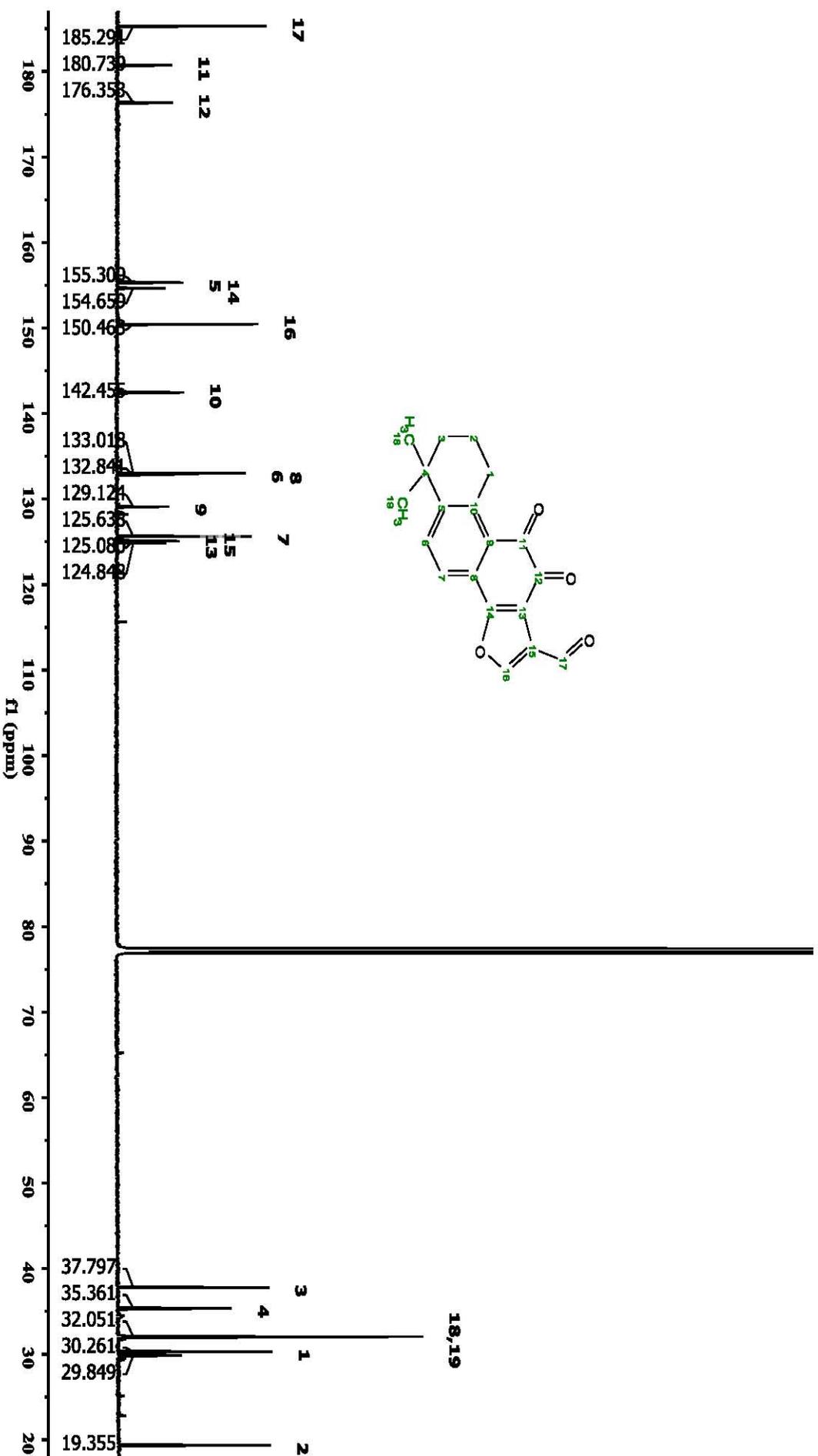
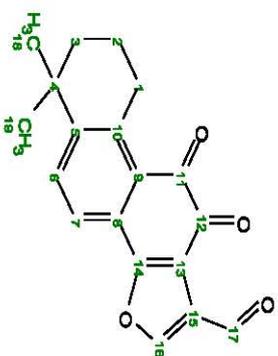
Espectro 16. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ¹³C de la miltirona. (175 MHz, CDCl₃).



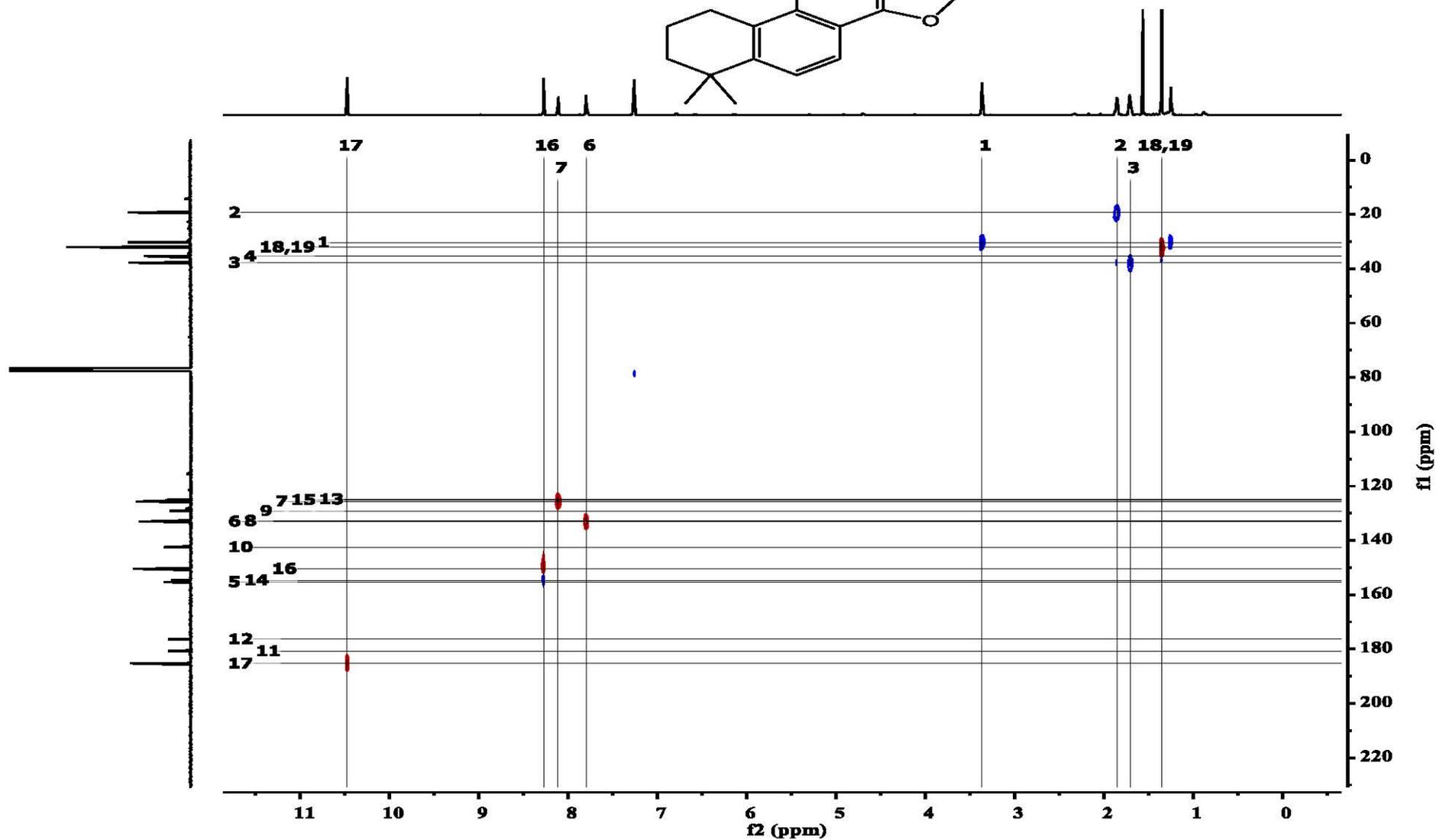
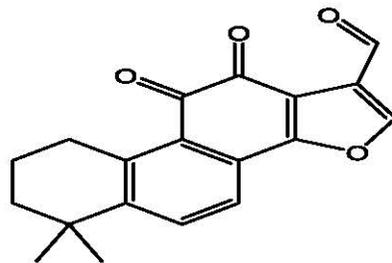
Espectro 17. Espectro de infrarrojo de la miltirona por la técnica de solución en CHCl₃



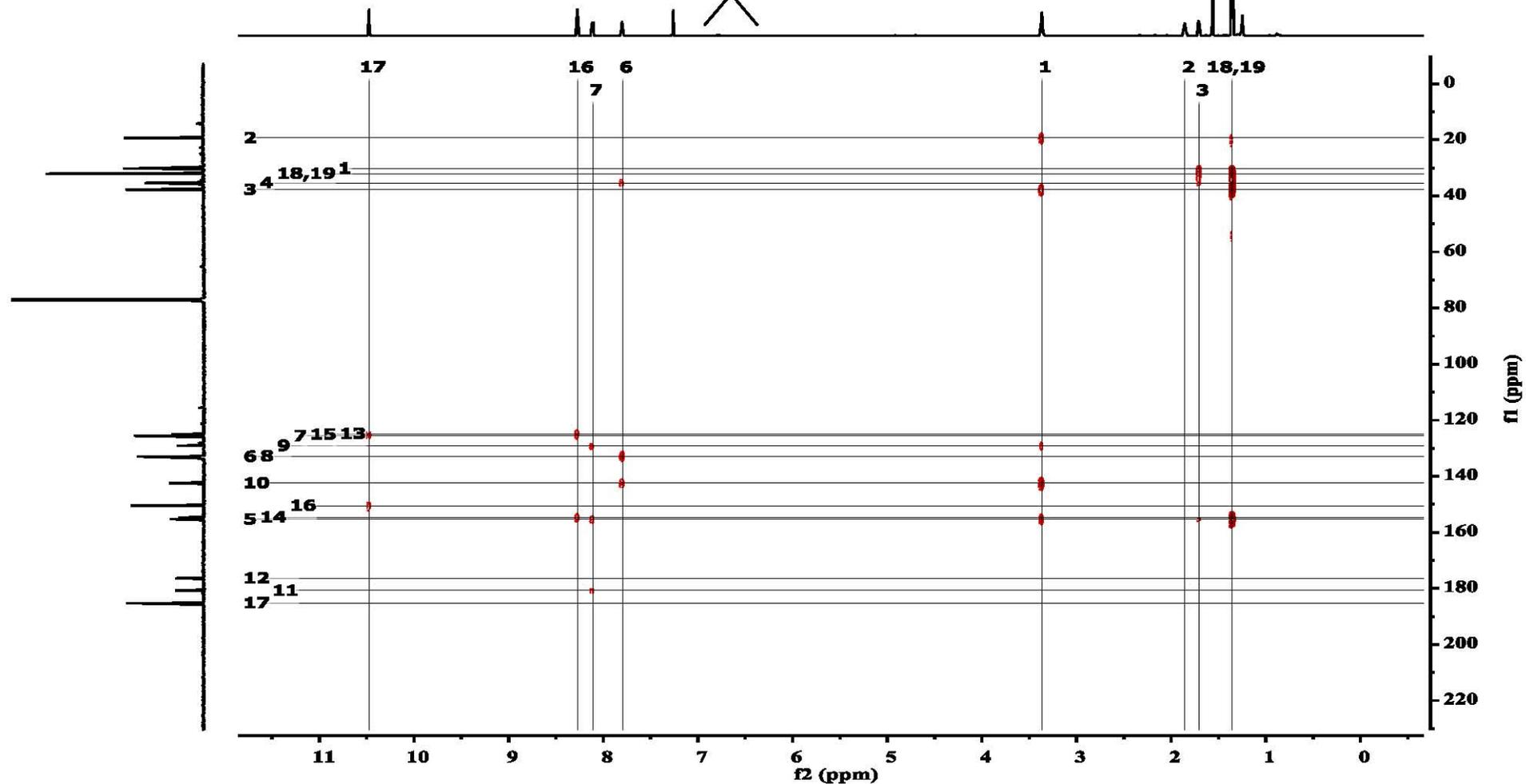
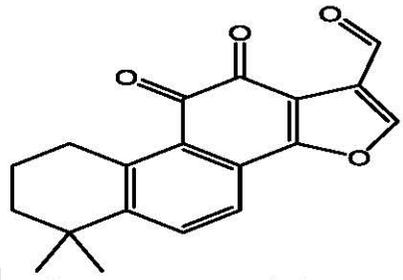
Espectro 18. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H del 17-oxotanshinona IIa (700 MHz, CDCl_3).



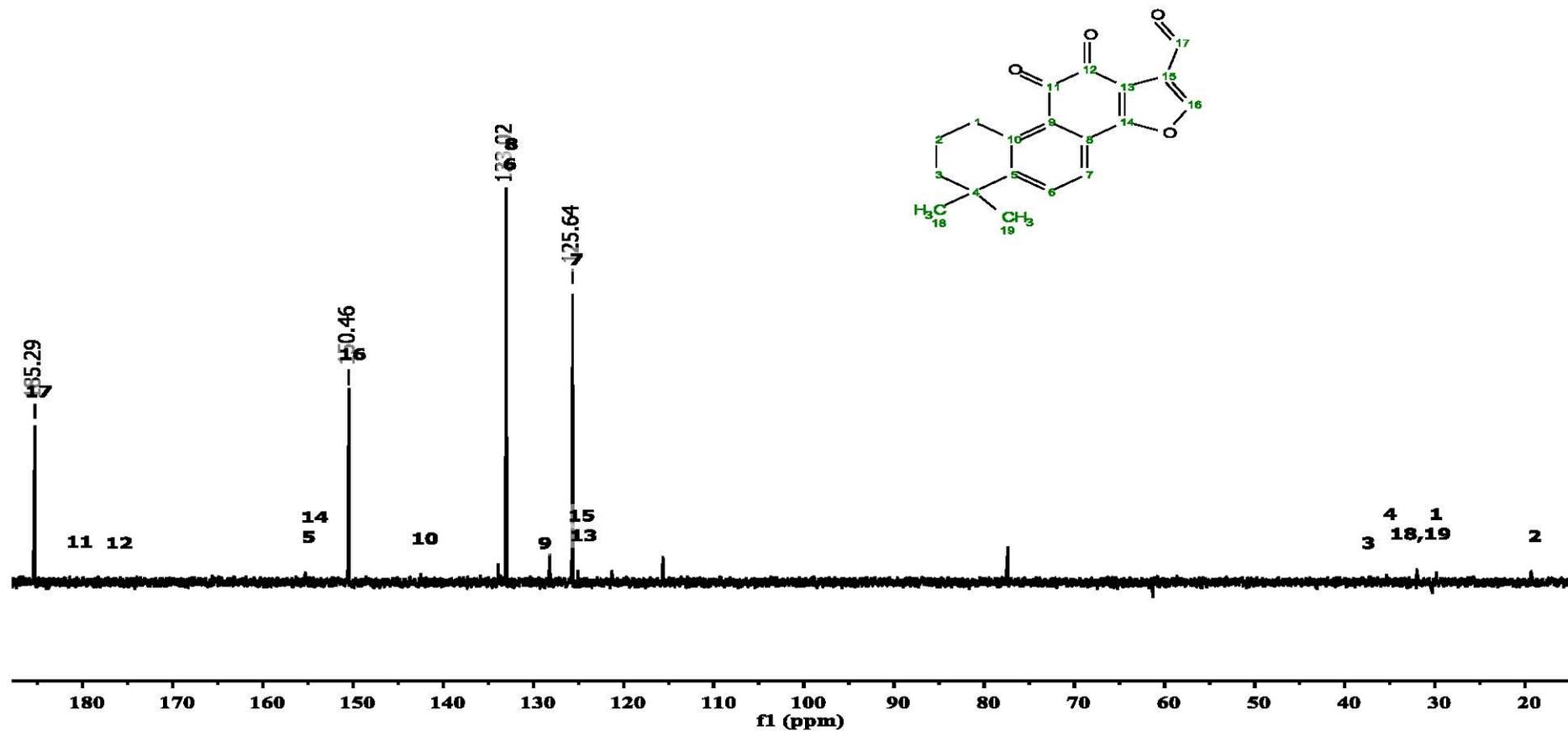
Espectro 19. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C del 17-oxotanshinona IIa (175 MHz, CDCl_3).



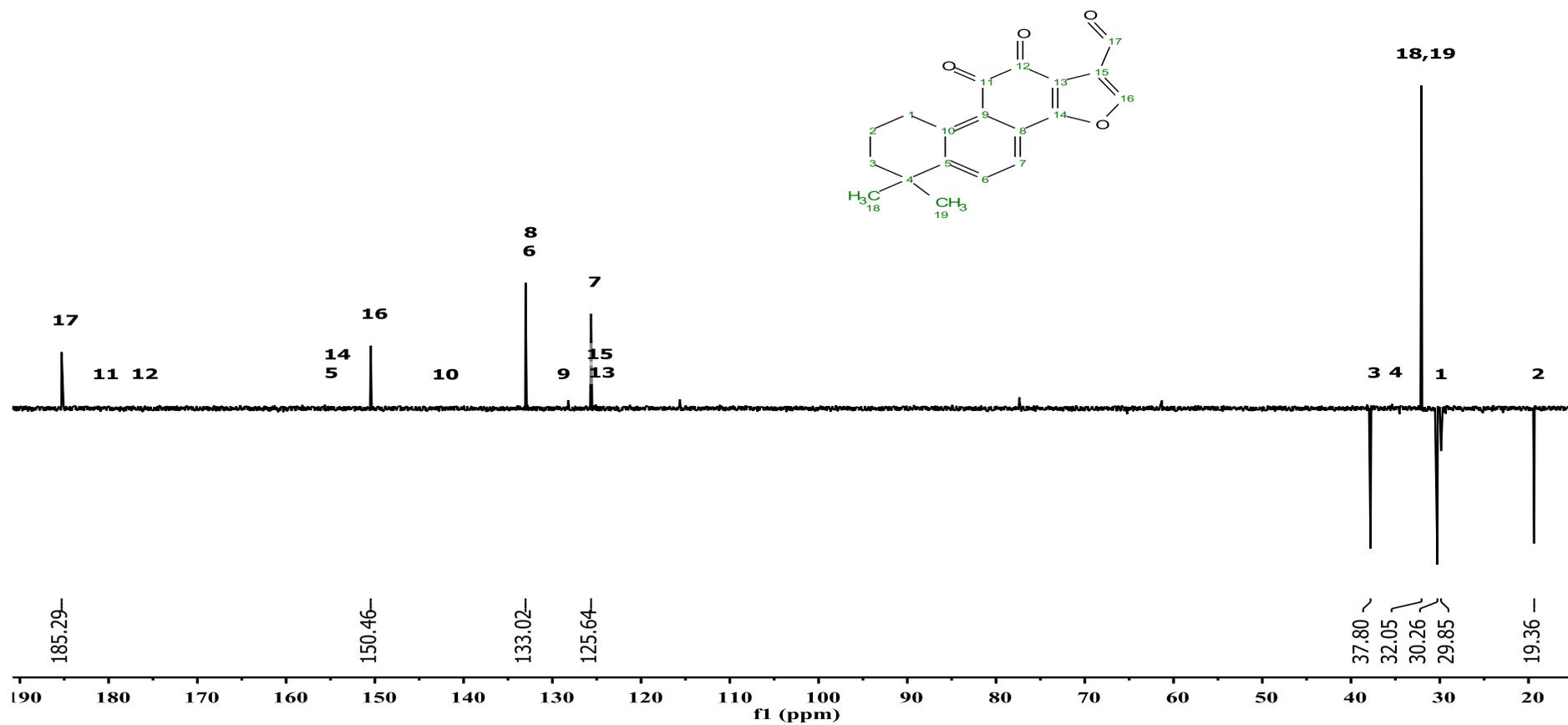
Espectro 20. Espectro HSQC del 17-oxotanshinona IIa (700 MHz, CDCl₃).



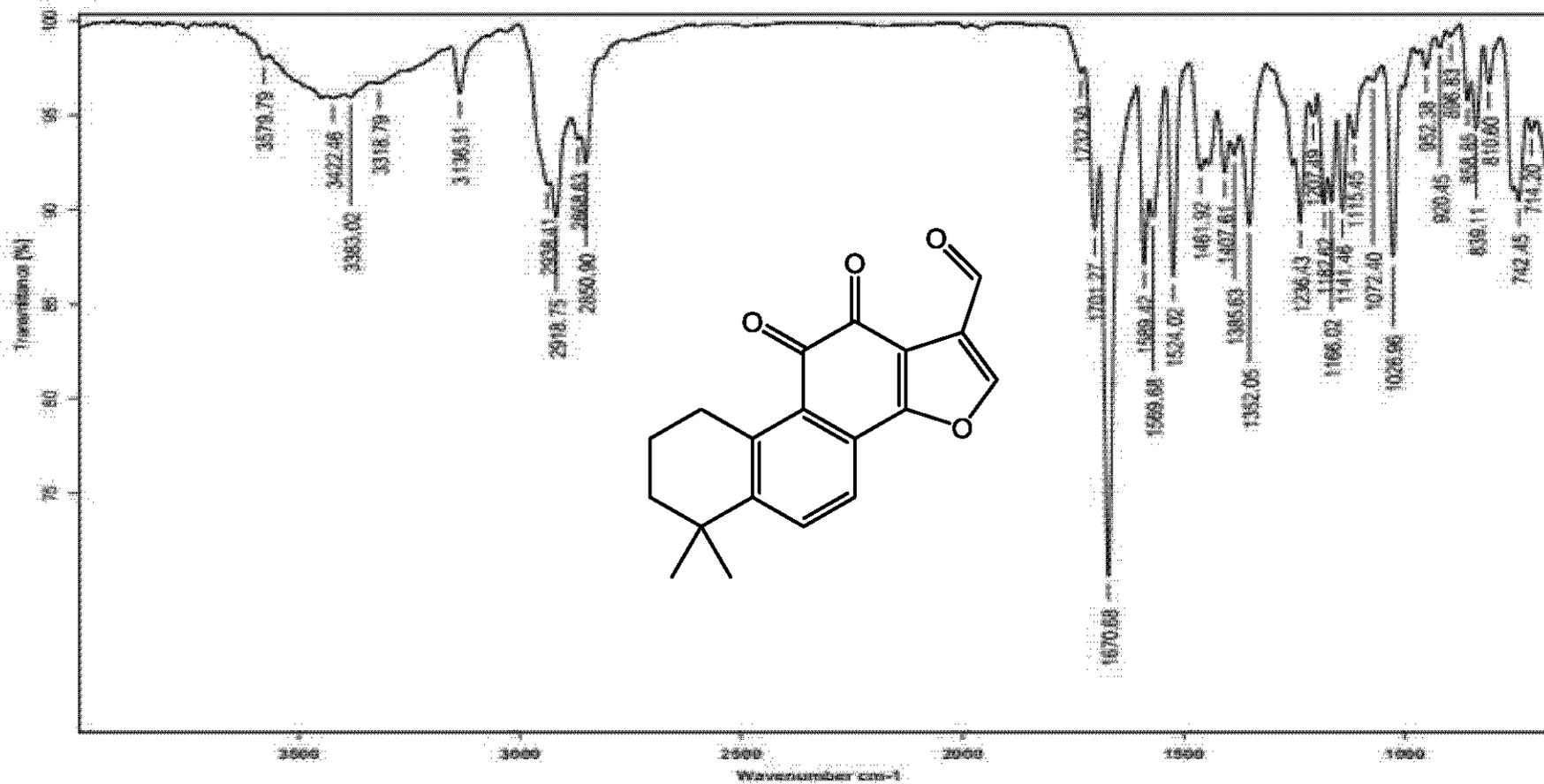
Espectro 21. Espectro HMBC del 17-oxotanshinona IIa (700 MHz, CDCl₃).



Espectro 22. Espectro DEPT 90 del 17-oxotanshinona IIa (700 MHz, CDCl₃).



Espectro 23. Espectro DEPT 135 del 17-oxotanshinona IIa (700 MHz, CDCl₃).



Espectro 24. Espectro de Infrarrojo del 17-oxotanshinona IIa por la técnica de película.

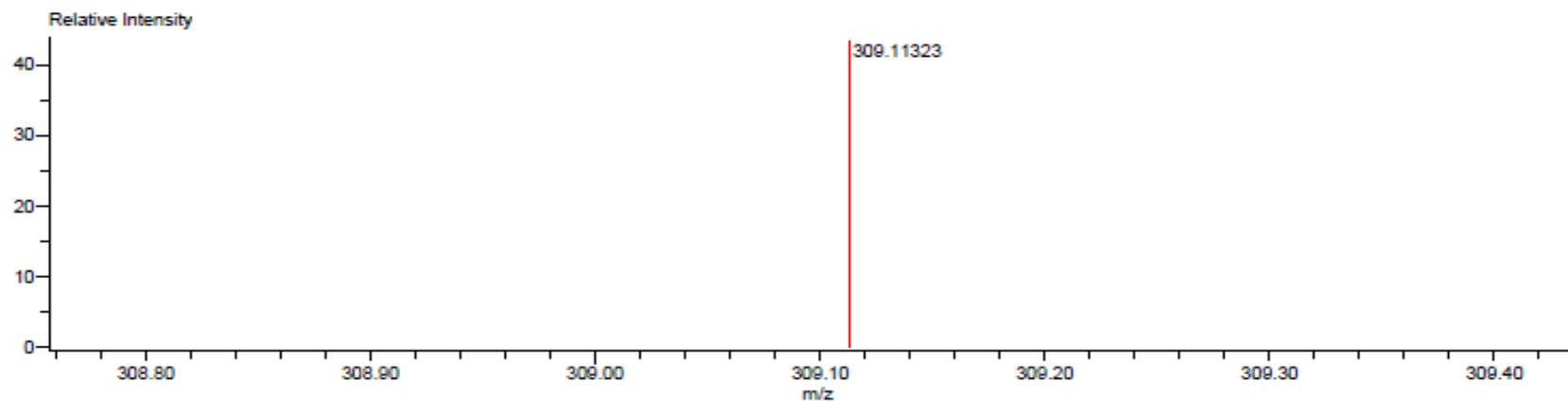
Data:U-181-EM-aldehido
Sample Name:Dr Leovigildo Quijano/ Celia Bustos
Description:
Ionization Mode:ESI+
History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area]:Correct Base[1.0%]:Correct Base[5.0%]:Average(MS[1] 1.5...

Acquired:2/21/2018 12:16:27 PM
Operator:AccuTOF
Mass Calibration data:Cal Peg 600
Created:2/21/2018 12:48:13 PM
Created by:

Charge number:1
Element:¹²C:17 .. 21, ¹H:15 .. 21, ¹⁶O:2 .. 5

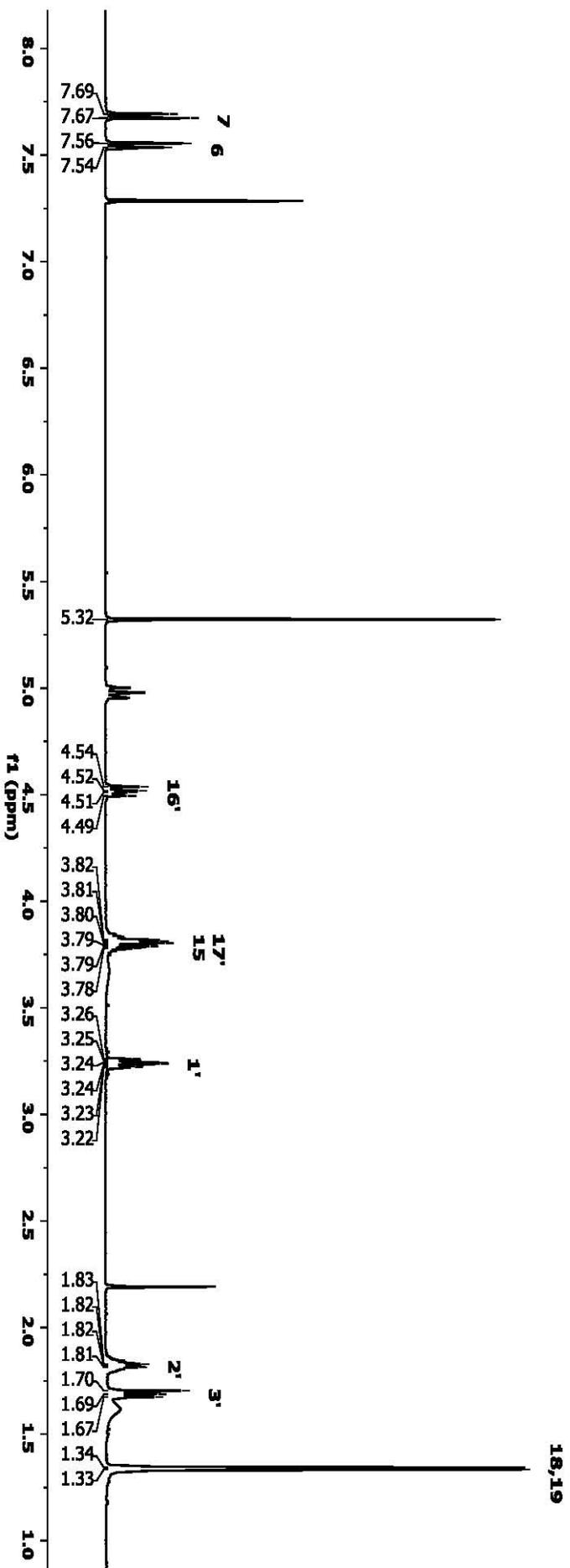
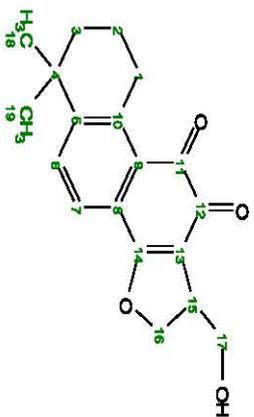
Tolerance:3.00(mmu)

Unsaturation Number:1.0 .. 40.0 (Fraction:Both)

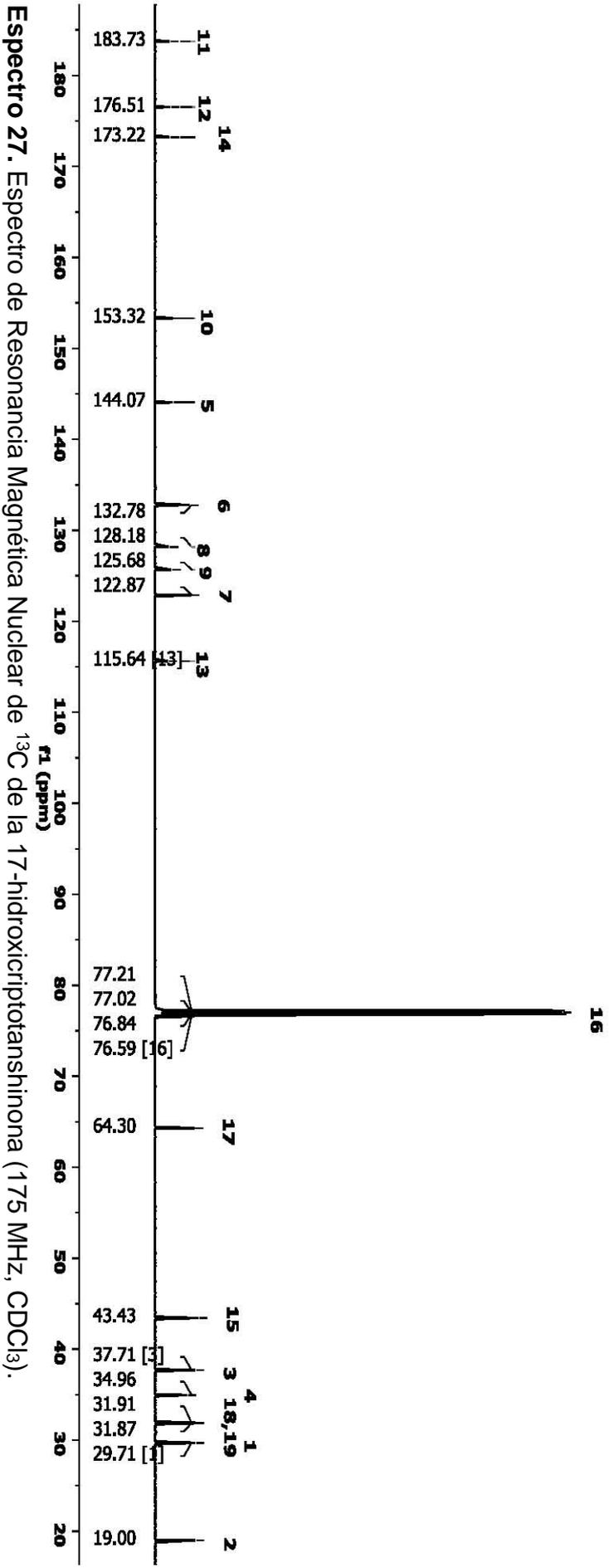
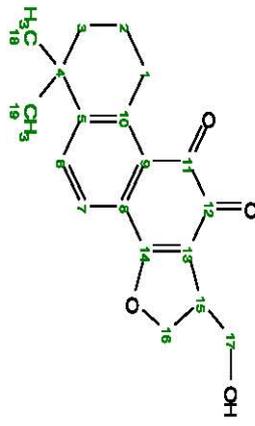


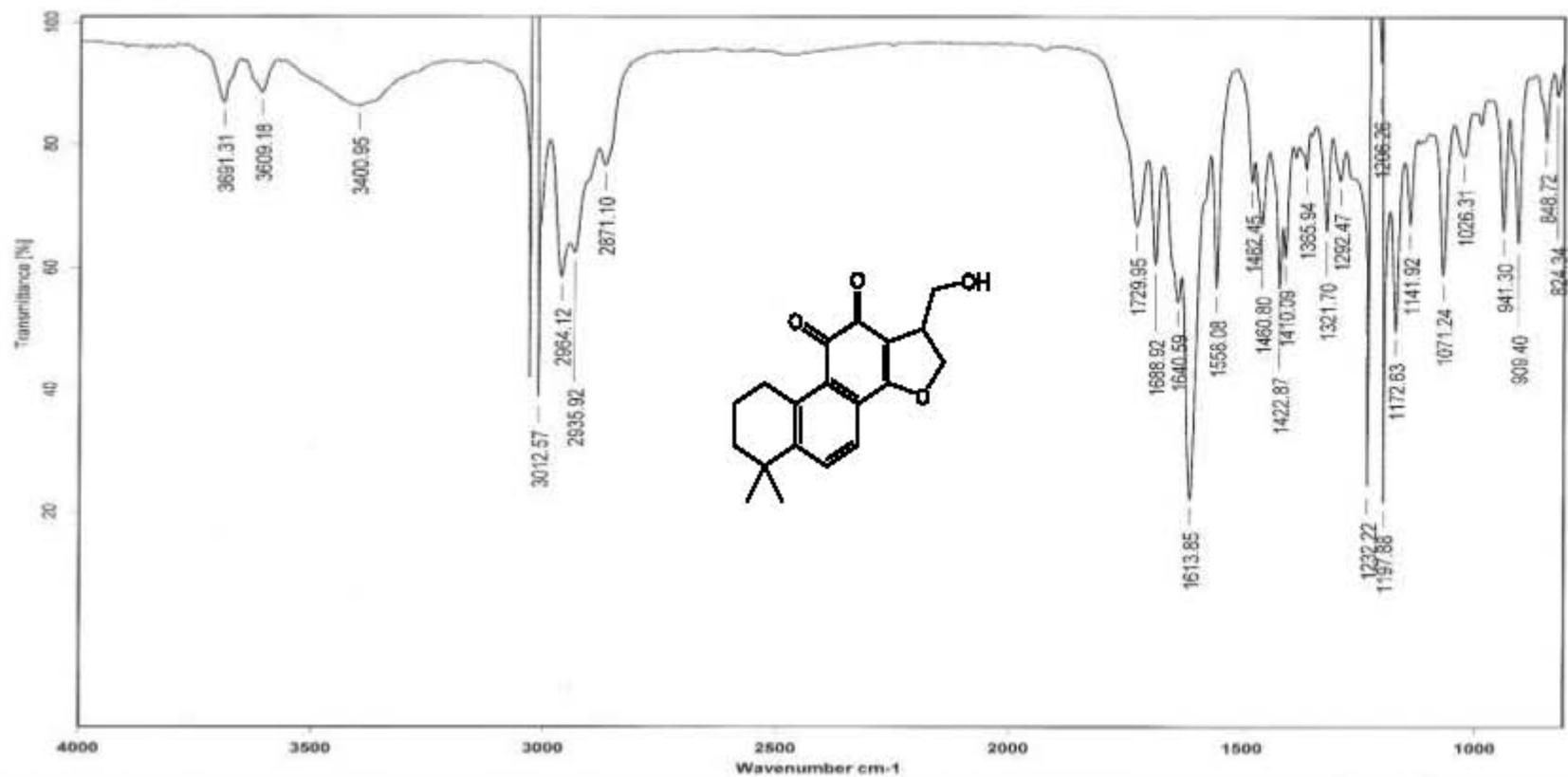
Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
309.11323	477.85	309.11268	0.55	1.77	¹² C ₁₉ ¹ H ₁₇ ¹⁶ O ₄	11.5

Espectro 25. Espectro de ionización en modo DART⁺ del 17-oxotanshinona IIa .



Espectro 26. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H de la 17-hidroxicriptotanshinona (700 MHz, CDCl_3).





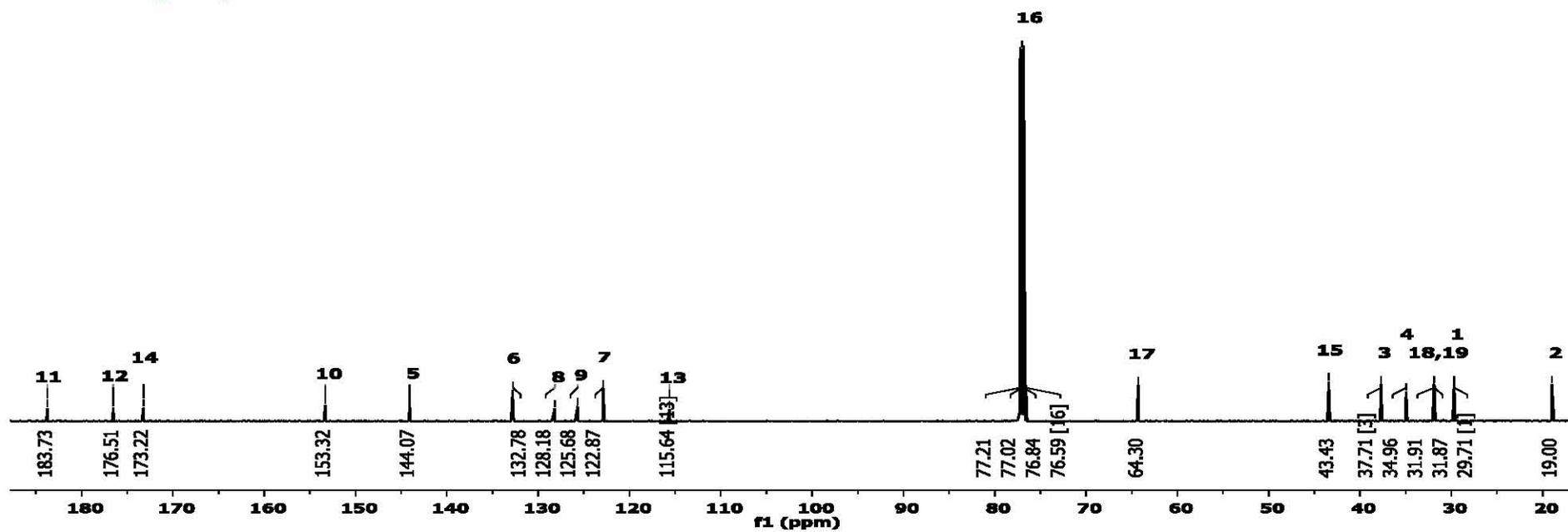
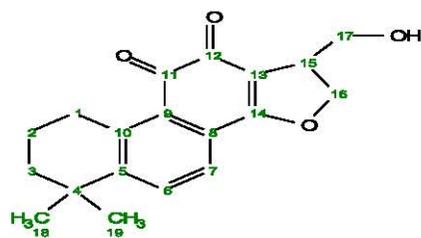
C:\INFRARROJOAIR-LEP-IQUI-007_18\Rocio\988.0

Dr.L. Quijano 17-hidroxi

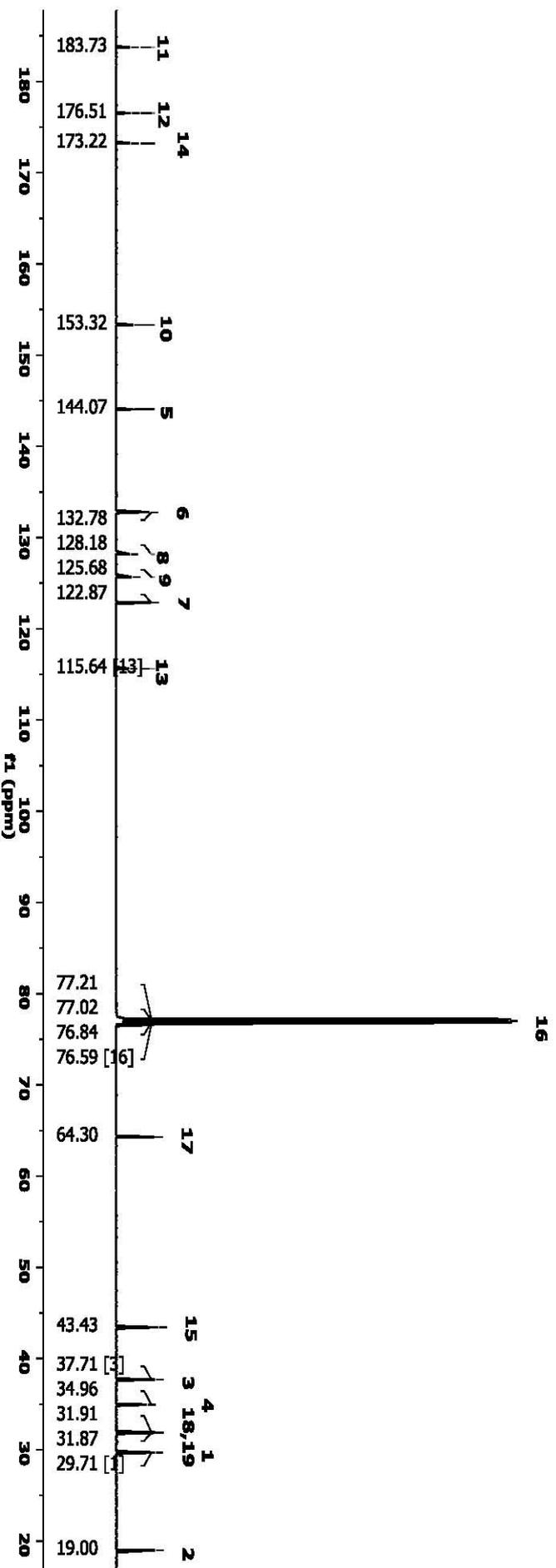
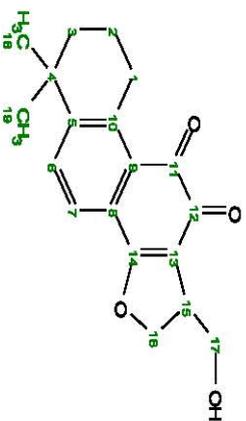
SOL/CHCl3 RPM

25/08/2018

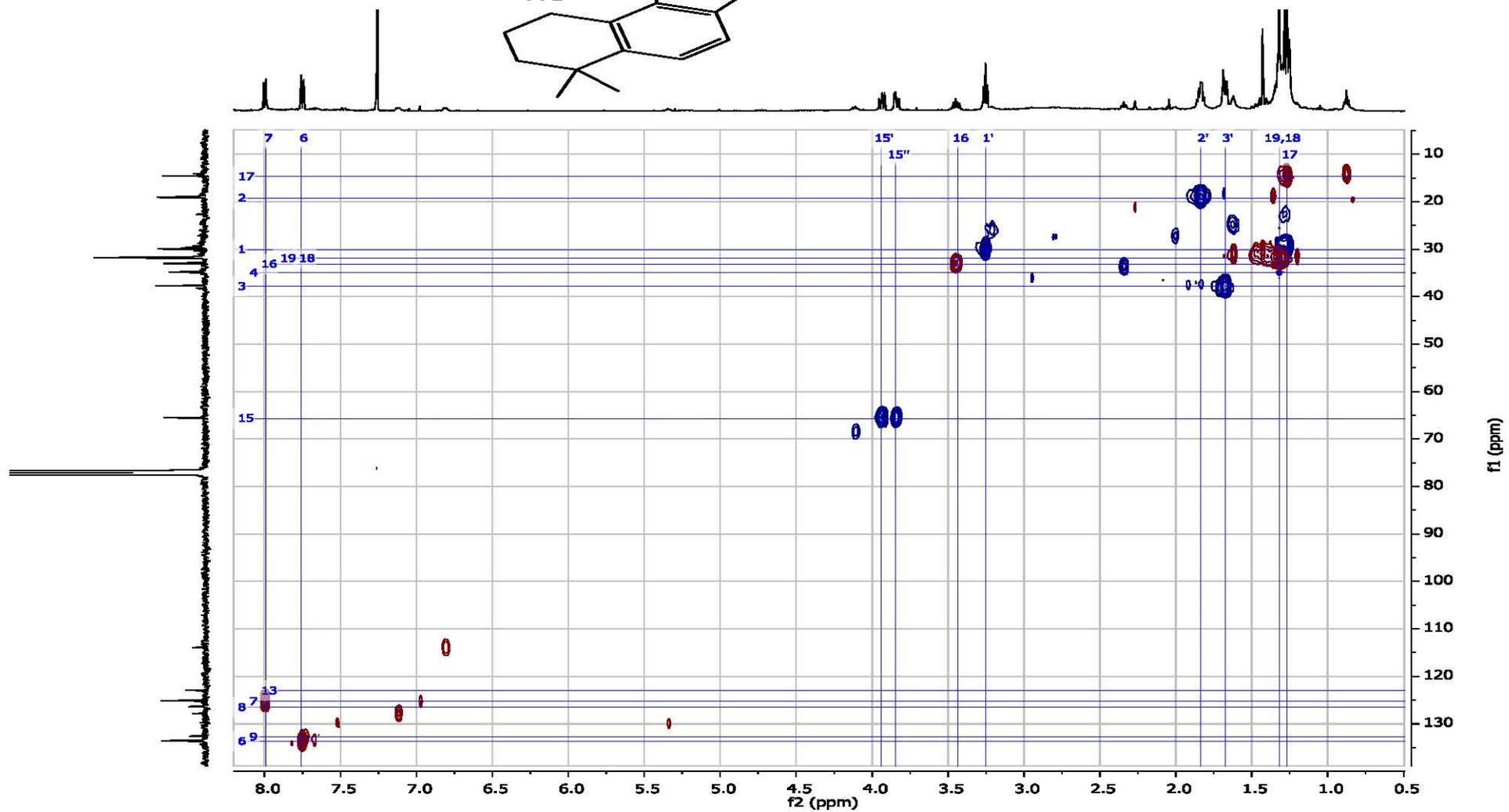
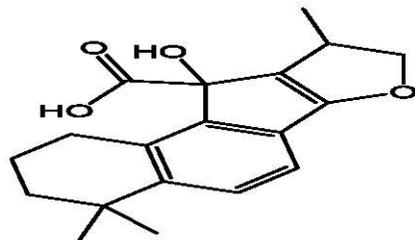
Espectro 28. Espectro de Infrarrojo de la 17-hidroxicriptotanshinona por la técnica de solución en CHCl₃.



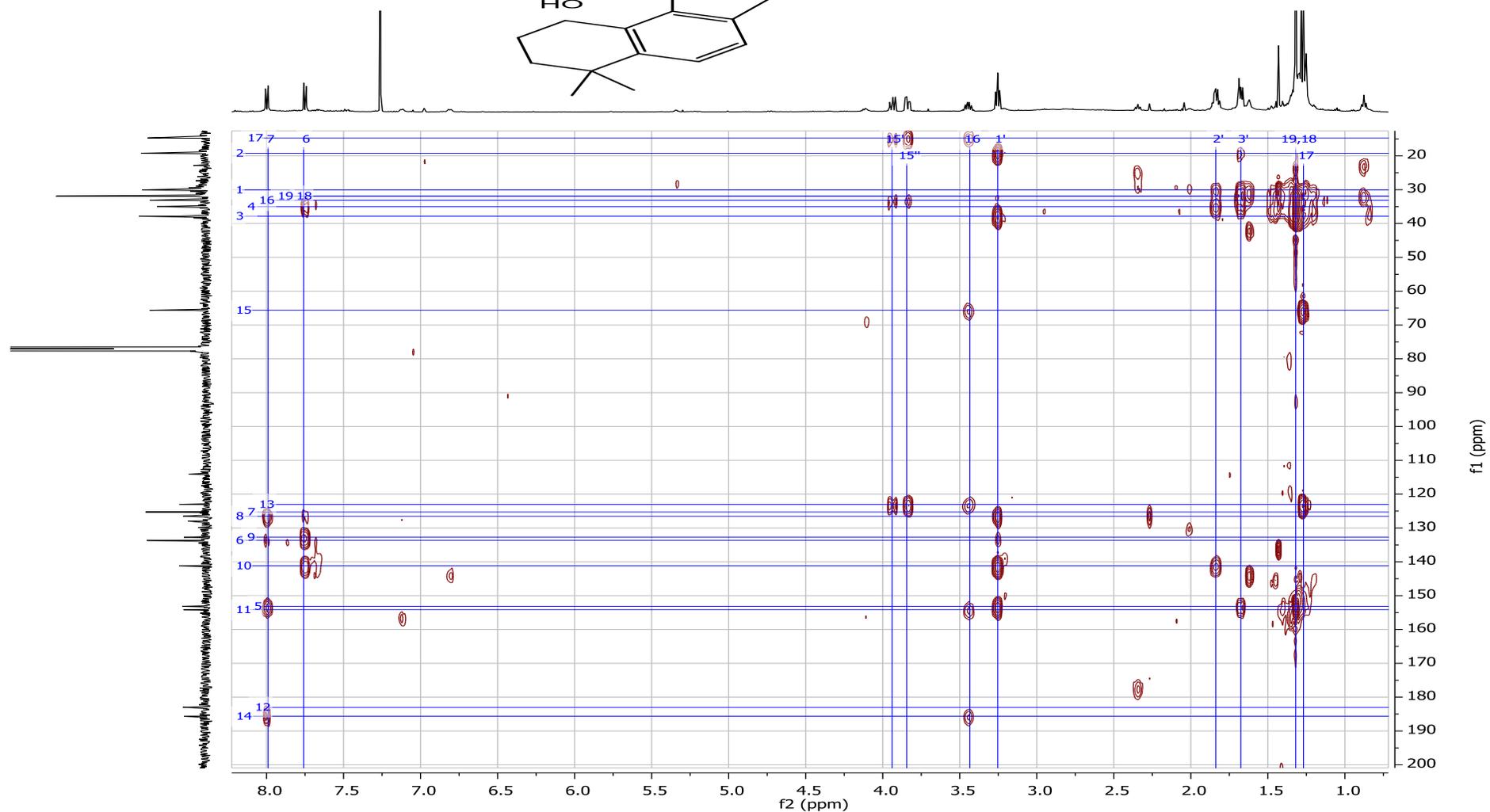
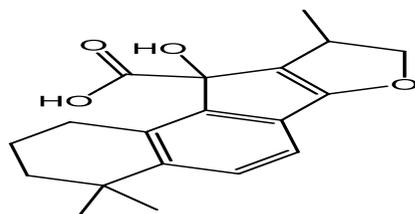
Espectro 29. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H del ácido 4-hidroxi-3,9,9-trimetil-3,4,6,7,8,9-hexahidro-2H-benzo[5,6]indeno[1,2-b]furan-4-oico (500 MHz, CDCl_3).



Espectro 30. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C del ácido 4-hidroxi-3,9,9-trimetil-3,4,6,7,8,9-hexahidro-2H-benzof[5,6]indeno[1,2-b]furan-4-óico (125 MHz, CDCl_3).



Espectro 31. Espectro de HSQC del ácido 4-hidroxi-3,9,9-trimetil-3,4,6,7,8,9-hexahidro-2H-benzo[5,6]indeno[1,2-b]furan-4-oico (500 MHz, CDCl_3).

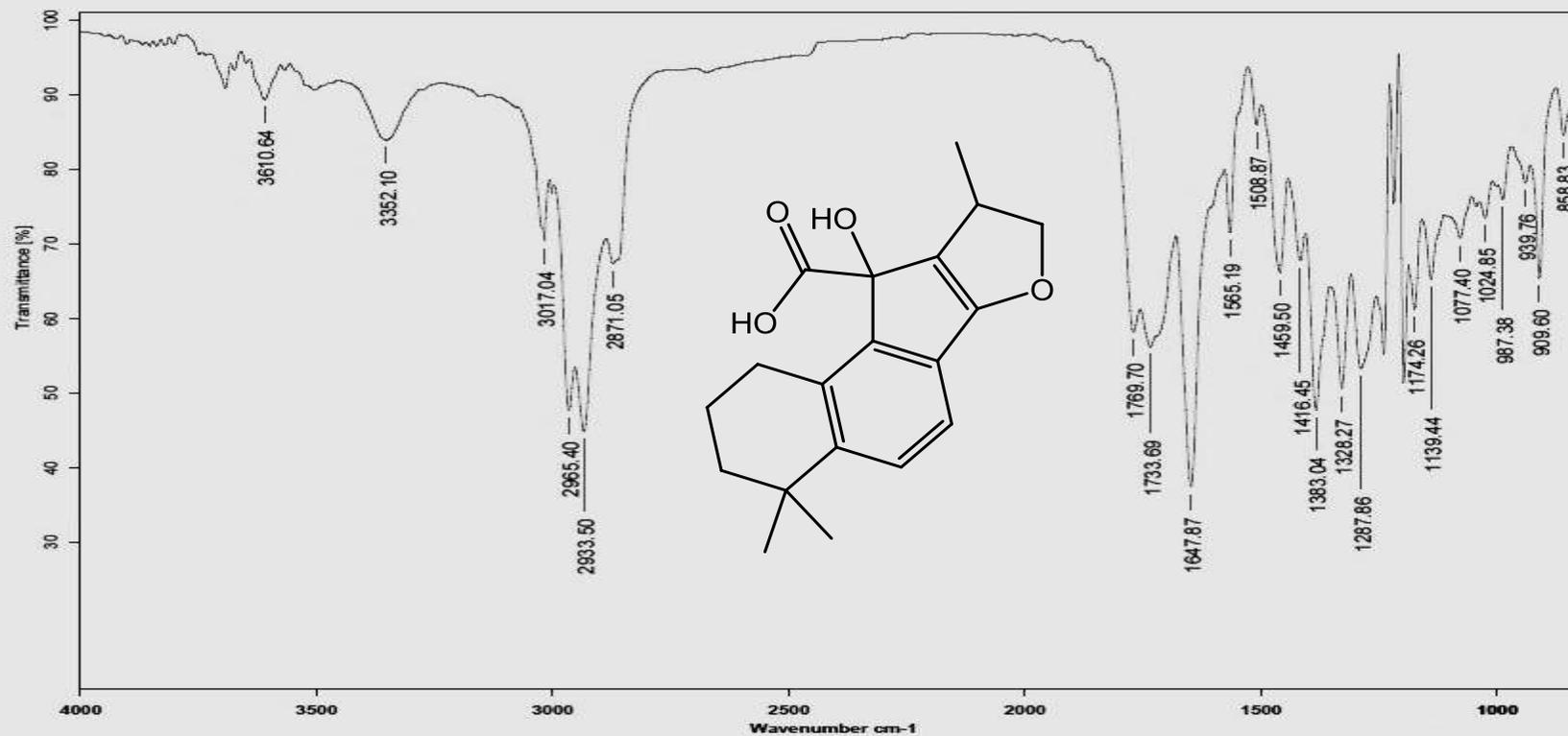


Espectro 32. Espectro de HMBC del ácido 4-hidroxi-3,9,9-trimetil-3,4,6,7,8,9-hexahidro-2H-benzo[5,6]indeno[1,2-b]furan-4-oico (500 MHz, CDCl_3).



Instituto de Química, UNAM

Laboratorio de Espectroscopía



C:\INFRARROJO\AIR-LEP-IQUI-007_18\Rocio\1336.0

Dr.L.Quijano

Cripta-F2

Sol/CHCl₃

RPM

30/10/2018

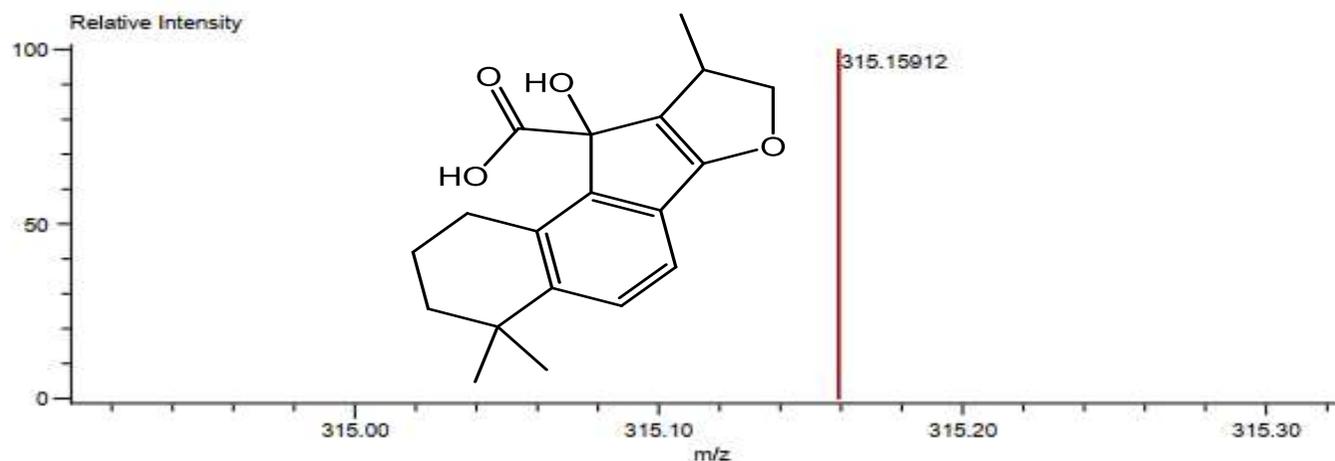
Espectro 33. Espectro de infrarrojo del ácido 4-hidroxi-3,9,9-trimetil-3,4,6,7,8,9-hexahidro-2H-benzo[5,6]indeno[1,2-b]furan-4-oico por la técnica de solución en CHCl₃.

Data:U 2905
Sample Name:DR. QUIJANO/ROCIO
Description:
Ionization Mode:ESI+
History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area];Correct Base[1.0%]];Correc...

Acquired:10/19/2018 10:16:52 AM
Operator:AccuTOF
Mass Calibration data:Cal Peg 600
Created:10/19/2018 10:35:50 AM
Created by:AccuTOF

Charge number:1
Tolerance:10.00(mmu)
Element:¹²C:1 .. 19, ¹H:1 .. 23, ¹⁶O:0 .. 4, ³²S:0 .. 0

Unsaturation Number:0.0 ... 18.0 (Fracti...



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula
315.15912	97542.98	315.15963	-0.52	-1.64	¹² C ₁₉ ¹ H ₂₃ ¹⁶ O ₄

Espectro 34. Espectro de ionización en modo DART⁺ del ácido 4-hidroxi-3,9,9-trimetil-3,4,6,7,8,9-hexahidro-2H-benzo[5,6]indeno[1,2-b]furan-4-oico.