



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DETERMINACIÓN DE LA ESTRUCTURA QUÍMICA DE
METABOLITOS SECUNDARIOS DE ESTRUCTURA
NOVEDOSA DE *Salvia involucrata***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA**

PRESENTA

DIANA PÉREZ JUANCHI



MÉXICO, CDMX, 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: Baldomero Esquivel Rodríguez

VOCAL: Profesor: Ana Adela Sánchez Mendoza

SECRETARIO: Profesor: Juan Gómez Dueñas

1er. SUPLENTE: Profesor: Noé Zúñiga Villareal

2° SUPLENTE: Profesor: Elizabeth Reyes López

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 2-9,
EDIFICIO A, DEPARTAMENTO DE PRODUCTOS NATURALES.
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Baldomero Esquivel Rodríguez

SUPERVISORA TÉCNICA:

Dra. Celia Bustos Brito

SUSTENTANTE:

Diana Pérez Juanchi

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	I
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
II.1 Generalidades sobre la familia Lamiaceae.....	2
II.2 La familia Lamiaceae en México	4
II.2.1 El género <i>Salvia</i> en México	6
II.3 Perfil químico del género <i>Salvia</i>	7
II.4 Generalidades sobre la biosíntesis de los diterpenos	9
II.5 Generalidades sobre la biosíntesis de los diterpenos con esqueleto tipo clerodano.....	13
III. OBJETIVOS	15
III.1 Objetivos particulares	15
IV. HIPÓTESIS	15
V. MATERIALES Y MÉTODOS	16
V.1 Procedimientos generales.....	16
V.2 Material vegetal.....	16
V.3 Extracción y purificación de los metabolitos secundarios de estructura novedosa de <i>Salvia involucrata</i>	17
V.4 Datos espectroscópicos y espectrométricos de los compuestos aislados	18

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	22
VI.1 Determinación estructural de la involucratina A, un nuevo diterpeno con esqueleto tipo <i>cis-neo-clerodano</i>	22
VI.2 Determinación estructural de la involucratina B, un nuevo diterpeno con esqueleto tipo <i>cis-neo-clerodano</i>	35
VI.3 Determinación estructural de la involucratina C, un nuevo diterpeno con esqueleto tipo 5,10- <i>seco-neo-clerodano</i>	42
VI.4 Propuesta biogenética	49
VII. CONCLUSIONES	51
VIII. REFERENCIAS	52
IX. ESPECTROS	55

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
[α]	Rotación óptica específica
°C	Grados Celsius
A	Absorbancia
AcOEt	Acetato de etilo
APT	A ttached P roton T est
b	Longitud de trayectoria de la muestra (longitud de la celda)
c	Concentración de la muestra
CC	Cromatografía en columna
CCDa	Cromatografía en capa delgada analítica
CCDp	Cromatografía en capa delgada preparativa
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CHCl ₃	Cloroformo
cm	Centímetros
COSY	C orrelation S pectroscop Y : Espectroscopía de correlación ¹ H- ¹ H en dos dimensiones
<i>d</i>	Doble
<i>da</i>	Doble ancho
DART	D irect A nalysis in R eal T ime: Espectrometría de masas mediante Análisis Directo en Tiempo Real
<i>dd</i>	Doble de dobles
<i>ddd</i>	Doble de doble de dobles
dm	Decímetros
DMAPP	Pirofosfato de dimetilalilo
EM-DART-AR	Espectroscopía de M asas por DART de A lta R esolución
FCME	Herbario de la Facultad de Ciencias de la UNAM, México
g	Gramos

	Heteronuclear Multiple Bond Correlation: Correlación
HMBC	Heteronuclear a través de Enlaces Múltiples (^{13}C - ^1H a larga distancia)
	Heteronuclear Single Quantum Coherence o Heteronuclear
HSQC	Single Quantum Correlation: Correlación Heteronuclear ^{13}C - ^1H a un enlace
Hz	Hertz
IPP	Pirofosfato de isopentenilo
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
kg	Kilogramos
L	Litros
l	Longitud de la celda
<i>m</i>	Múltiple
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
MHz	Megahertz
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
nm	Nanómetros
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy: Espectroscopía de Efecto Nuclear Overhauser
pf	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
<i>s</i>	Simple
<i>sa</i>	Simple ancho
<i>t</i>	Triple
<i>ta</i>	Triple ancho

UV	Ultravioleta
α	Rotación óptica observada
δ	Escala <i>Delta</i> para describir el desplazamiento químico en RMN
ϵ	Coefficiente de absortividad molar
λ	Longitud de onda de la luz
$\lambda_{\text{máx}}$	Longitud de onda máxima
$\nu_{\text{máx}}$	Número de onda máximo
Ω	Número de insaturaciones

I. INTRODUCCIÓN

El estudio de la composición química de las especies mexicanas de plantas de la familia Lamiaceae es una línea de investigación de gran importancia que se inició en forma sistemática en el Instituto de Química de la UNAM (IQ-UNAM) en 1984, fundamentalmente enfocado en el género *Salvia*.

Salvia involucrata es una especie endémica del país y no existen estudios previos en cuanto a su composición química por lo que el presente trabajo se realizó con el objetivo de contribuir al conocimiento de la composición química de las especies del género *Salvia* a través del aislamiento de metabolitos secundarios presentes en el extracto de CH₂Cl₂ de *S. involucrata*. Para lograr el objetivo, se realizó el aislamiento de los compuestos mediante el empleo de métodos cromatográficos convencionales y la elucidación estructural se realizó mediante el uso de técnicas espectroscópicas, principalmente RMN de alta frecuencia.

Como resultado del trabajo se aislaron y caracterizaron estructuralmente tres metabolitos secundarios novedosos de tipo *neo-clerodánico*.

La estructura de los compuestos aislados se estableció mediante el empleo de técnicas espectroscópicas modernas y se estableció su configuración relativa mediante el análisis del experimento NOESY y considerando cuestiones biogénicas. Además, se estableció la relación estructural de los compuestos aislados mediante la propuesta de rutas biogénicas.

II. ANTECEDENTES

II.1 Generalidades sobre la familia Lamiaceae

La Familia Lamiaceae (Labiatae) es un grupo muy amplio y diversificado de plantas con 236 géneros y más de 7,000 especies. Los miembros de esta familia se encuentran distribuidos en todo el mundo, con excepción de las regiones polares, y están particularmente adaptados a las áreas tropicales, subtropicales y en las zonas templadas del mundo. En esta familia podemos encontrar tanto especies adaptadas a climas semi-áridos como a hábitats húmedos, las áreas de mayor diversidad de esta familia son la zona Mediterránea, Asia Central, el Continente Americano (México, Centro y Sudamérica), las Islas del Pacífico y las zonas tropicales de África y China.¹ A pesar de tener una amplia variedad en cuanto a géneros, la mayoría de las especies se concentran en ocho de ellos (ver tabla 1).²

Tabla 1. Géneros más abundantes de la familia Lamiaceae

Género	No. de especies	Género	No. de especies
<i>Salvia</i>	1000	<i>Isodon</i>	200
<i>Hyptis</i>	350	<i>Stachys</i>	200
<i>Scutellaria</i>	360	<i>Nepeta</i>	100
<i>Coleus</i>	200	<i>Teucrium</i>	100

Aunque existen también géneros minoritarios que nos son familiares, pues poseen importancia económica en varias partes del mundo, ya sea como condimentos, por sus aceites esenciales, por sus propiedades medicinales o como ornamentales, estos géneros son *Origanum*, *Thymus*, *Mentha*, *Lavandula*, *Pogostemon*, entre otros; las figuras 1-3 ejemplifican algunas de las especies de los géneros mencionados.



Figura 1. *Origanum vulgare*



Figura 2. *Mentha spicata*
(Hierbabuena arodi)



Figura 3. *Lavandula dentata*

Una de las características más distintivas de las Lamiaceas es la presencia de glándulas en la superficie de sus hojas que almacenan aceites esenciales, por lo que son conocidas como plantas aromáticas, además cuentan con propiedades organolépticas y distintas actividades biológicas, entre las que destacan antiinflamatorias, antioxidantes y antimicrobianas.³ Cabe mencionar que las raíces de muchas de estas especies también son utilizadas en la medicina tradicional de diversas partes del mundo.

Desde el punto de vista químico, los géneros de esta familia han sido ampliamente estudiados en lo que se refiere al aislamiento de distintos tipos de metabolitos secundarios. Entre los géneros más estudiados se encuentran *Isodon*,⁴ *Teucrium*,⁵ *Salvia*,⁶ *Scutellaria*,⁷ *Stachys*⁸ y *Coleus*.⁹ Estos estudios han resultado en el

aislamiento de un gran número de metabolitos secundarios, tales como esteroides, flavonoides, iridoides, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterterpenos, triterpenos, entre otros.

II.2 La familia Lamiaceae en México

La familia está representada en México por 32 géneros y 591 especies (considerando tanto los nativos como los naturalizados),¹ esto implica que el 13.56% de los géneros y aproximadamente el 8.44% de las especies del mundo existen en México. Además, esta familia es la octava más abundante del país y tiene un endemismo del 65.82%.¹

Aunque esta familia está representada en el país por 32 géneros, es en cinco de ellos donde se concentra la mayor cantidad de especies (468 especies, correspondientes al 79.19% del total, ver tabla 2).¹

Tabla 2. Géneros más abundantes de la familia Lamiaceae en México y su porcentaje de endemismo

Género	No. de especies	% de endemismo
<i>Salvia</i>	307	75.57
<i>Scutellaria</i>	56	67.86
<i>Stachys</i>	41	70.73
<i>Hyptis</i>	35	48.57
<i>Hedeoma</i>	29	72.41

Aunque los miembros de esta familia se pueden encontrar en todos los tipos de vegetación que existen en el país, se distribuyen principalmente en las zonas montañosas, siendo la Sierra Madre Oriental y el Eje Volcánico donde se concentra la mayoría de las especies (ver figura 4).



Figura 4. Distribución de la familia Lamiaceae en México¹⁰

México es el país con el mayor número de especies de *Salvia* (cuenta con aproximadamente el 30% del total de especies a nivel mundial), por lo que puede ser considerado como uno de los centros de diversificación más activos del planeta en lo que se refiere a este género. Algo similar ocurre con el género *Scutellaria*, pues se considera al país como el sitio de mayor diversificación que existe en América. De lo dicho anteriormente se puede concluir que, aunque México no es un país muy rico en plantas de la familia Lamiaceae, sí es la región más rica a nivel mundial en lo que se refiere a uno de sus géneros (*Salvia*), además, con base en trabajos recientes, se concluyó que este género es el más abundante en México.¹

Es importante mencionar que esta familia tiene una legendaria costumbre de uso en México, tanto en medicina tradicional como en la preparación de alimentos. Por ejemplo, en Chiapas se usan para el tratamiento de padecimientos gastrointestinales, respiratorios, febriles, reumáticos, dermatológicos y de tipo traumatológicos (como inflamaciones, contusiones y heridas de los pies) e incluso algunos grupos étnicos de la región las utilizan para tratar algunos síndromes de filiación cultural.¹¹ Las especies de esta familia que más contribuyen a la medicina tradicional de este estado se enlistan en la tabla 3.

Tabla 3. Géneros y número de especies utilizadas en la medicina tradicional en Chiapas

Género	Especies medicinales
<i>Salvia</i>	17
<i>Hyptis</i>	5
<i>Mentha</i>	5
<i>Stachys</i>	3
<i>Ocimum</i>	3

El estudio de la composición química de las especies mexicanas de plantas de la familia Lamiaceae es una línea de investigación de gran importancia que se inició en forma sistemática en el Instituto de Química de la UNAM (IQ-UNAM) en 1984, fundamentalmente enfocado en el género *Salvia*. El perfil químico de estas plantas ha sido una herramienta útil para establecer una clasificación más adecuada de las mismas y ha contribuido además a la obtención de productos bioactivos. El estudio químico y biológico de las Lamiaceae mexicanas es uno de los grandes proyectos de largo plazo que se han desarrollado en el IQ-UNAM.¹²

II.2.1 El género *Salvia* en México

La palabra “*Salvia*” proviene del latín *salvus*, que significa salvo, intacto, seguro, haciendo referencia al valor medicinal que se le atribuye a estas plantas. Como se observa en la tabla 1, este género es el más abundante de la Familia Lamiaceae con alrededor de 1000 especies distribuidas por todo el mundo.¹ Y como se mencionó anteriormente, México es el país con el mayor número de especies de este género, y representa más del 50 % de todas las especies de la familia Lamiaceae que existen en el país.



Figura 5. Distribución del género *Salvia* en México¹³

Al igual que muchas otras Lamiaceae, las salvias muestran una fuerte preferencia por las zonas montañosas, aunque se pueden encontrar prácticamente en todos los tipos de vegetación de México. El hecho de que existan tantas especies de *Salvia* en México puede deberse tanto a la historia geológica de la región como al éxito evolutivo de estas plantas, pues han desarrollado mecanismos de defensa muy eficientes contra sus depredadores naturales (herbívoros, nemátodos, hongos, fitopatógenos e insectos), además son capaces de inhibir el desarrollo e incluso la germinación de plantas competitivas en su hábitat.¹⁴

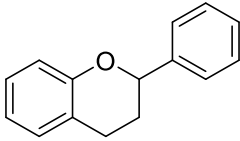
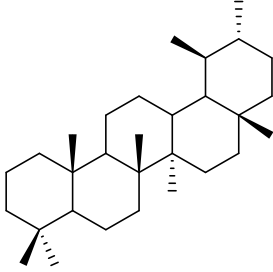
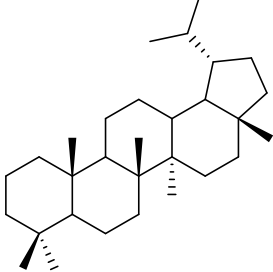
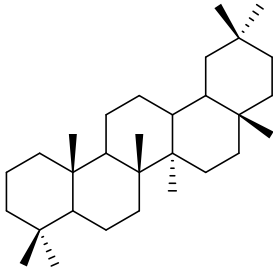
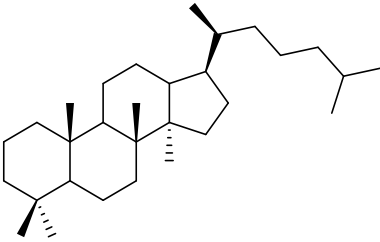
II.3 Perfil químico del género *Salvia*

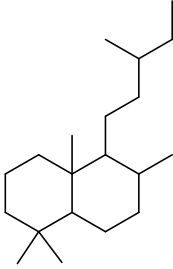
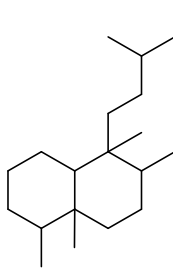
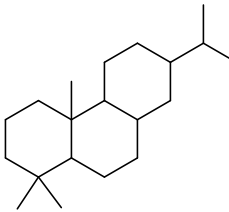
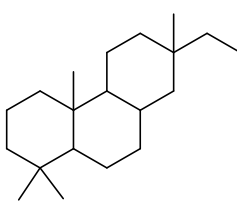
Según datos del 2012, de las especies de *Salvia* que se conocen (alrededor de 1000) se han estudiado aproximadamente 134,¹⁵ esto ha conducido a poder establecer un perfil químico de los metabolitos secundarios que se podrían encontrar en especies de este género, sin embargo, debe tomarse únicamente como una aproximación y no generalizarse para todas las especies, sobre todo para aquellas que aún no han sido estudiadas.

De estas plantas se han aislado compuestos esteroidales como β -sitosterol y estigmasterol. También es común encontrar flavonoides en las hojas de las plantas,

así como también triterpenos con esqueletos de tipo ursano, oleanano, lupano y damarano. En algunas especies de *Salvia* de Medio Oriente se han logrado aislar sesterterpenos, como en *S. hypoleuca*¹⁶ y *S. sahendica*,¹⁷ ambas especies endémicas de Irán. Sin embargo, el tipo de compuestos más comúnmente aislados e identificados en estas plantas son los diterpenos. Dentro de estos se encuentran labdanos,¹⁸ clerodanos,¹⁹ abietanos²⁰ y pimaranos,²¹ principalmente.

Tabla 4. Tipos de compuestos aislados de especies del género *Salvia*

Tipo de compuesto	Esqueleto o estructura básica	
Flavonoides		
Triterpenos	 <p data-bbox="678 1209 781 1241">Ursano</p>	 <p data-bbox="1105 1209 1208 1241">Lupano</p>
	 <p data-bbox="659 1558 797 1589">Oleanano</p>	 <p data-bbox="1084 1545 1235 1577">Damarano</p>

Tipo de compuesto	Esqueleto o estructura básica	
Diterpenos	 <p data-bbox="662 604 790 640">Labdano</p>	 <p data-bbox="1084 604 1229 640">Clerodano</p>
	 <p data-bbox="662 892 790 924">Abietano</p>	 <p data-bbox="1092 892 1221 924">Pimarano</p>

II.4 Generalidades sobre la biosíntesis de los diterpenos

Los terpenos pueden definirse como metabolitos secundarios cuya estructura puede considerarse por la repetición de una unidad básica de 5 átomos de carbono. Algunos de ellos por tratamiento térmico pueden descomponerse produciendo isopreno (Figura 6).

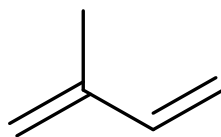


Figura 6. Estructura química del isopreno (2-metil-1,3-butadieno)

La estructura de muchos terpenos puede seccionarse y considerarse formada por la unión cabeza-cola de unidades de isopreno, a esto se le conoce como la regla del isopreno.²² Los terpenos son nombrados según el número de átomos de carbono que poseen (ver tabla 5) y existe una amplia variedad de cada uno de estos grupos, así como derivados de estos también.

Tabla 5. Tipos de terpenos

Número de átomos de carbono	Nombre
5	Hemiterpenos
10	Monoterpenos
15	Sesquiterpenos
20	Diterpenos
25	Sesterterpenos
30	Triterpenos
40	Carotenoides

Si bien durante mucho tiempo se consideró al isopreno como el precursor de los terpenoides, diversos estudios condujeron a la conclusión de que estos tienen como precursor a su equivalente bioquímico conocido como pirofosfato de isopentenilo (también nombrado como difosfato de isopentenilo o IPP).

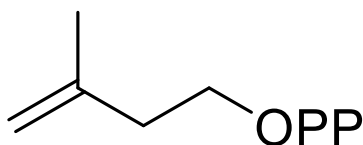
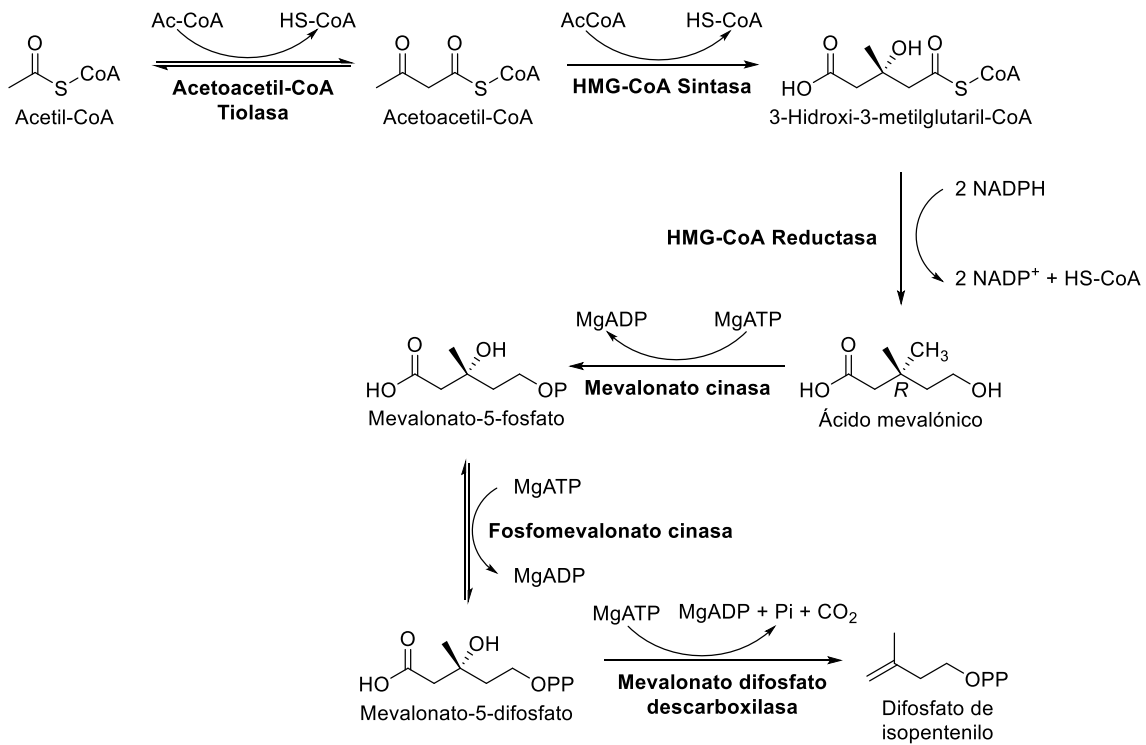
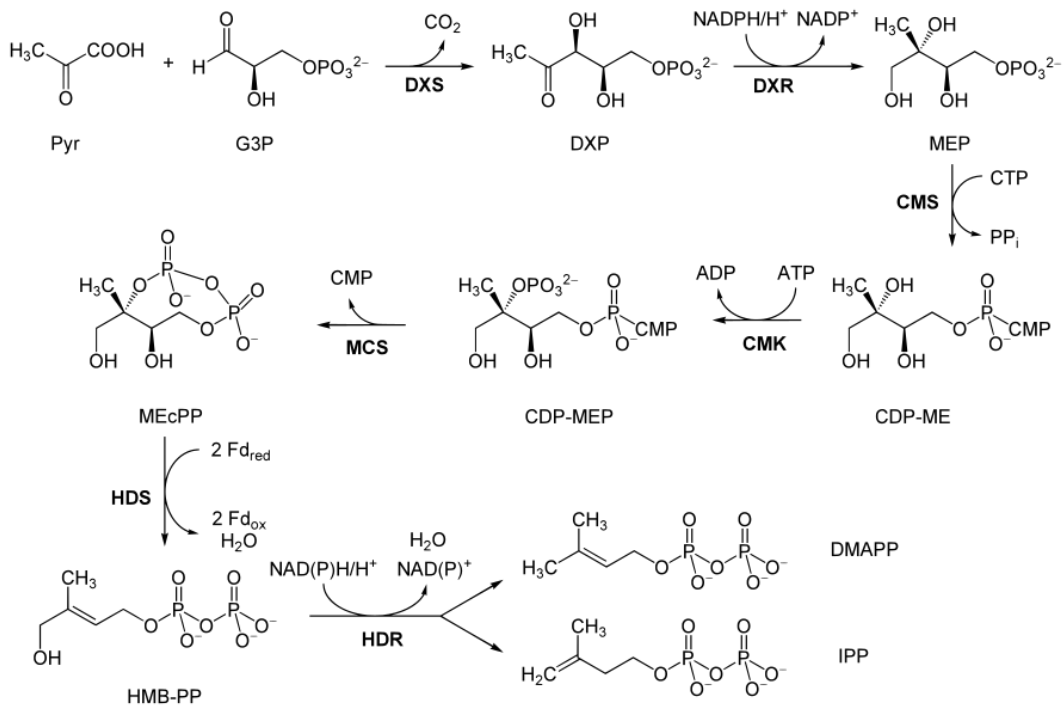


Figura 7. Estructura química el IPP

Hasta el momento se conocen dos rutas biosintéticas para la obtención del IPP, estas se ejemplifican en los esquemas 1 y 2.

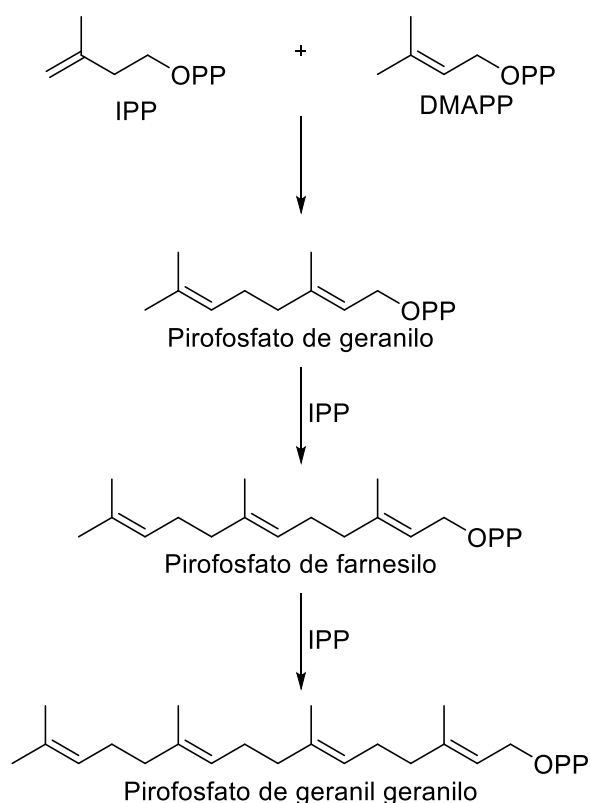


Esquema 1. Ruta del ácido mevalónico para la biosíntesis del difosfato de isopentenilo²³



Esquema 2. Ruta de la DXP o DOXP para la biosíntesis del difosfato de isopentenilo²⁴

Ambas rutas metabólicas están mediadas por enzimas y dan como resultado el IPP, posteriormente éste se isomeriza para dar el pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP), éste último funge como electrófilo mientras que el IPP lo hace como nucleófilo en la combinación lineal que se da para la producción de los precursores de los terpenos. Es importante mencionar que esto está favorecido ya que el grupo pirofosfato o difosfato es un muy buen grupo saliente, lo que permite que en el DMAPP se forme un catión alílico que posteriormente es atacado nucleofílicamente por el IPP y forma moléculas más grandes. En el caso de la biosíntesis de diterpenos este proceso se ve repetido hasta llegar a un precursor con 20 átomos de carbono conocido como el pirofosfato de geranilgeranilo (ver esquema 3).



Esquema 3. Combinación lineal de IPP con DMAPP para generar moléculas precursoras de terpenos

El precursor de los diterpenos es el pirofosfato de geranilgeranilo, y algunos estudios de marcaje isotópico han demostrado que las moléculas de IPP que dan como resultado este pirofosfato provienen de la ruta biosintética de la DXP.²⁴

II.5 Generalidades sobre la biosíntesis de los diterpenos con esqueleto tipo clerodano

Los clerodanos son diterpenos bicíclicos (ver figura 8). El esqueleto básico de estos está dividido en dos fragmentos: un resto de decalina (C-1 – C-10) y una cadena lateral de seis carbonos en C-9 (C-11 – C-16, con C-16 unido a C-13). Los cuatro carbonos restantes (C-17 – C-20) están unidos a C-8, C-4, C-5 y C-9, respectivamente, en el sistema de decalina.²⁵

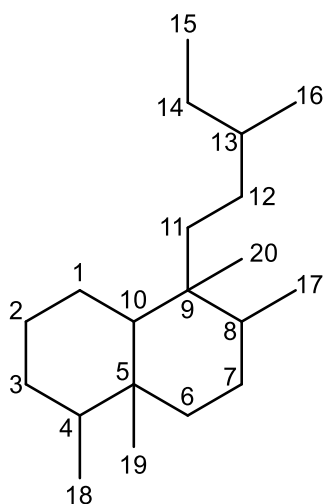
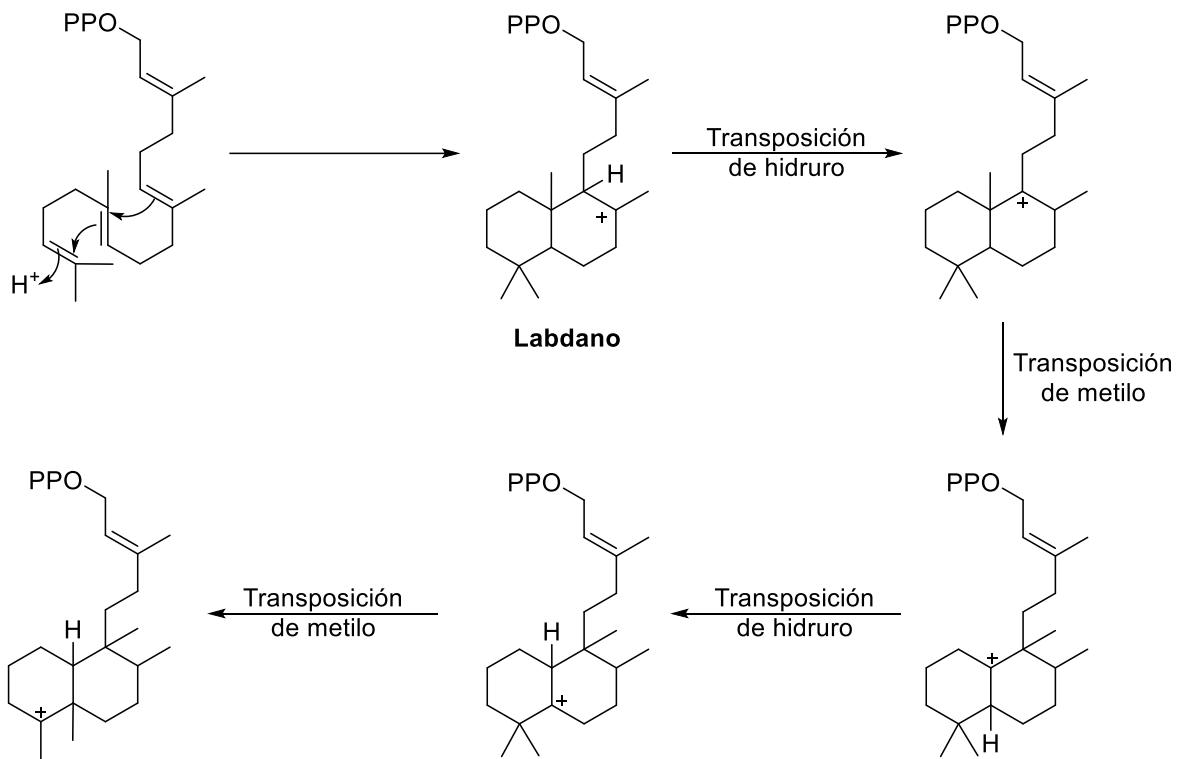


Figura 8. Esqueleto de clerodano

De los clerodanos que se han aislado de fuentes naturales se sabe que aproximadamente el 25% de estos tienen una fusión 5:10 *cis*, mientras que el 75% restante tienen una fusión *trans*.²⁵ La biosíntesis simplificada de los clerodanos a partir del pirofosfato de geranilgeranilo se ejemplifica en el esquema 4.



Esquema 4. Esquema general para la biosíntesis de los diterpenos de tipo clerodano

En esta biosíntesis se puede observar que el pirofosfato de geranylgeranilo toma una cierta conformación para poder favorecer las ciclaciones que se llevan a cabo, estos procesos también están mediados por enzimas y los carbocationes que se forman durante el proceso pueden ser estabilizados por los residuos aromáticos de los aminoácidos presentes en las enzimas que son partícipes.

III. OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo es contribuir al conocimiento de la composición química de *Salvias* endémicas de México, como parte del proyecto sobre el estudio de especies de este género que se lleva a cabo en el Instituto de Química de la UNAM, mediante el estudio químico de la especie *Salvia involucrata*.

III.1 Objetivos particulares

- Llevar a cabo el aislamiento de metabolitos secundarios presentes en el extracto de CH₂Cl₂.
- Determinar la estructura de los compuestos aislados mediante el empleo de técnicas espectroscópicas modernas.
- Establecer la configuración relativa de los compuestos aislados.
- Establecer, de ser posible, una relación estructural entre los compuestos aislados con base en la propuesta de probables rutas biogénicas.

IV. HIPÓTESIS

El estudio sistemático de distintas especies de *Salvia* mexicanas ha conducido al aislamiento e identificación de distintos metabolitos secundarios, principalmente diterpenos de tipo abietano y clerodano, sin embargo, los clerodanos son mayormente aislados de estas especies, por lo que es altamente probable aislar este tipo de compuestos de *Salvia involucrata*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1 Procedimientos generales

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos. Los espectros de infrarrojo se obtuvieron en un espectrómetro Bruker Tensor 27; los espectros de UV se registraron en un espectrómetro UV-Visible Shimadzu; las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro Perkin-Elmer 323. Los experimentos de RMN 1D y 2D se realizaron en un espectrómetro HD Bruker Advance III a 700 MHz para ^1H y 175 MHz para ^{13}C . Los desplazamientos químicos (δ) están referenciados con la señal del disolvente residual CDCl_3 ($\delta_{\text{H}} = 7.26$, $\delta_{\text{C}} = 77.16$) y las constantes de acoplamiento (J) están dadas en Hz. La espectrometría de masas de alta resolución por la técnica DART (EM-DART-AR) se realizó en un espectrómetro de masas Jeol The AccuTOF JMS-T100LC. Los experimentos de RMN se procesaron en el programa MestReNova versión 12.0. La optimización de las estructuras se realizó con el programa ChemBio3D Ultra 13.0.

Para el aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios, se realizaron separaciones mediante cromatografía en columna (CC) en gel de sílice de malla 230-400 (Macherey-Nagel). La cromatografía en capa delgada preparativa (CCDp) fue realizada en placas Macherey-Nagel Sil G/UV₂₅₄ de 20 x 20 cm de 0.25, 0.50 y 1.00 mm de espesor. El monitoreo del progreso de las separaciones cromatográficas se realizó mediante cromatografía en capa delgada analítica (CCDa) utilizando cromatofolios de gel de sílice de 0.20 mm de espesor con indicador de fluorescencia adquiridas de Macherey-Nagel. La visualización de las placas se llevó a cabo con una lámpara de luz UV Spectroline modelo ENF-240C a dos longitudes de onda (254 y 365 nm) y utilizando solución de sulfato cérico amoniacal como revelador.

V.2 Material vegetal

El estudio se realizó con dos poblaciones de *Salvia involucrata* colectadas en el estado de San Luis Potosí, municipio de Xilitla en diferentes épocas del año.

La primera colecta se realizó en mayo de 2017 por el M. en C. Alejandro Hernández. El material botánico fue identificado por el Dr. J. García Pérez y una muestra del ejemplar se encuentra depositada en el Herbario Isidro Palacios del Instituto de Investigación de Zonas Desérticas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí (el voucher de la especie es FCME-161792). La figura 9 muestra un ejemplar de la especie de estudio.

La segunda colecta se realizó en octubre de 2018 por la Dra. Brenda Yudith Bedolla García y el Dr. Sergio Zamudio.



Figura 9. Ejemplar de *Salvia involucrata*

Se realizó el estudio fitoquímico de ambas poblaciones, sin embargo, debido a la similitud en sus perfiles químicos y la reproducibilidad del análisis, el trabajo se referirá a *Salvia involucrata* sin considerar la época de colecta.

V.3 Extracción y purificación de los metabolitos secundarios de estructura novedosa de *Salvia involucrata*

El material vegetal se secó a temperatura ambiente y en la sombra, posteriormente se molió en un molino de cuchillas. Se pesaron 1.39 kg del material y se extrajo por percolación con 1.2 L de CH_2Cl_2 . El extracto de CH_2Cl_2 se concentró en un rotavapor y se obtuvieron 38 g. Se tomaron 37 g del extracto crudo (1 g se guardó como referencia) se separaron por cromatografía en columna (CC) en sílica gel

empleando como eluyente una mezcla de Hexano:AcOEt (100:0-0:100) hasta obtener 96 fracciones de 300 mL cada una. Las fracciones se reunieron de acuerdo a su similitud en cromatografía en capa delgada analítica (CCDa) en 30 fracciones primarias (A-D'). La fracción X (803.8 mg) se sometió a CC en gel de sílice utilizando como eluyente Hexano:AcOEt (1:1) hasta obtener 24 fracciones de 50 mL cada una. De acuerdo a su perfil cromatográfico se reunieron las fracciones 14-21 (203.1 mg) y se purificaron mediante CC utilizando como eluyente Hexano:AcOEt (1:1) hasta obtener 51 fracciones de 5 mL cada una, de esta columna se obtuvo el compuesto **1** (15.2 mg). La fracción W (1067.8 mg) se purificó por CC utilizando una mezcla de CH₂Cl₂:M1* como fase móvil, obteniéndose de esta el compuesto **2** (12.7 mg). La fracción S (600 mg) se purificó por cromatografía en columna flash. Las condiciones con las que se realizó la columna fueron:

- Sílica gel 230-400 como soporte
- Flujo de 2.5 mL/min
- Fracciones de 25 mL c/u
- Hexano:Acetona (4:1) como eluyente
- Longitud: 16.5 cm
- Diámetro: 2.5 cm

De esta columna se obtuvieron 28 fracciones secundarias y por similitud en CCDa se reunieron las fracciones 12-14, estas fracciones se purificaron por CCDp eluyendo con una mezcla de Hexano:AcOEt (1:1) para obtener el compuesto **3** (26.1 mg).

V.4 Datos espectroscópicos y espectrométricos de los compuestos aislados

Las especificaciones con las que se realizaron los experimentos de rotación óptica de los compuestos aislados (concentración de cada compuesto y el disolvente que se utilizó) y la rotación óptica observada para cada uno de ellos se presentan en la tabla 6.

* M1 = AcOEt:MeOH:H₂O 200:16:7 (95:5)

Tabla 6. Datos y resultados de los experimentos de rotación óptica

Compuesto	Concentración (g/mL)	Disolvente	α	$[\alpha]$
1	0.0038	Metanol	+ 0.0580	+15.26
2	0.0020	Metanol	+ 0.1151	+57.55
3	0.0072	Cloroformo	- 0.3160	-44.20

La longitud de la celda donde se llevaron a cabo los experimentos fue de 1 dm.

Para calcular la rotación óptica específica se utilizó la ecuación 1.

$$[\alpha]_{\lambda} = \frac{\alpha}{l \cdot c}$$

Ecuación 1. Ecuación para determinar rotación óptica específica

$[\alpha]$: rotación óptica específica

α : rotación óptica observada

l : longitud de la celda (dm)

c : concentración de la muestra (g/mL)

λ : longitud de onda de la luz (nm)

La tabla 7 muestra la concentración, el disolvente empleado y los resultados de los experimentos de UV para cada uno de los compuestos.

Tabla 7. Datos y resultados de los experimentos de UV

Compuesto	Concentración (mol/L)	Disolvente	λ (nm)	Absorbancia
1	3.02×10^{-4}	Metanol	207	0.485
			299	0.749
2	3.25×10^{-4}	Acetonitrilo	285	0.543
			297	0.533
3	1.01×10^{-4}	Metanol	212	0.460
	5.03×10^{-4}		291	1.321

La longitud de la celda donde se llevaron a cabo los experimentos fue de 1 cm.

De acuerdo con la Ley de Lambert-Beer (ecuación 2) la absorbancia es directamente proporcional a la absorptividad molar.

$$A = \epsilon bc$$

Ecuación 2. Ley de Lambert-Beer

A: absorbancia

ϵ : coeficiente de absorptividad molar

b: longitud de trayectoria de la muestra (longitud de la celda)

c: concentración de la muestra (mol/L)

Los datos que se reportan son de $\log \epsilon$, para lo que se utiliza la ecuación 3.

$$\log \epsilon = \log \frac{A}{bc}$$

Ecuación 3. $\log \epsilon$

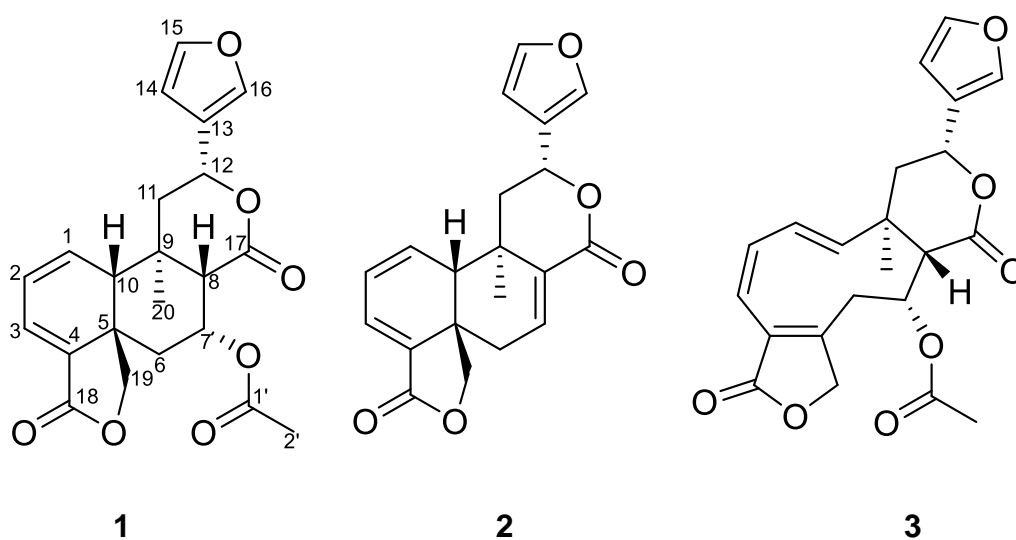
Involucratina A (1): polvo amarillo; pf = 158-162 °C; $[\alpha]_{589} = +15.26$; $\lambda_{\text{máx}}$ [nm] ($\log \epsilon$): 207 (3.21), 299 (3.40); IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx}}$ [cm⁻¹]: 1756, 1677, 1602, 1590, 1365, 1208, 1187, 1027; RMN ¹H y ¹³C, ver Tabla 8; HR-DART-MS m/z [M+H]⁺ 399.14588 (calculado para C₂₂H₂₃O₇, 399.14438).

Involucratina B (**2**): polvo amarillo; pf = 194-200 °C; $[\alpha]_{589} = +57.55$; $\lambda_{\text{máx}}$ [nm] (log ϵ): 285 (3.22), 297 (3.21); IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx}}$ [cm⁻¹]: 1737, 1565, 1372, 1231, 1020, 732; RMN ¹H y ¹³C, ver Tabla 10; HR-DART-MS m/z [M+H]⁺ 339.12263 (calculado para C₂₀H₁₉O₅, 339.12325).

Involucratina C (**3**): polvo amarillo claro; pf = 122-126 °C; $[\alpha]_{589} = -44.20$; $\lambda_{\text{máx}}$ [nm] (log ϵ): 212 (3.66), 291 (3.42); IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx}}$ [cm⁻¹]: 1748, 1645, 1616, 1441,; RMN ¹H y ¹³C, ver Tabla 12; HR-DART-MS m/z [M+H]⁺ 399.14479 (calculado para C₂₂H₂₃O₇, 399.14438).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las hojas de *Salvia involucrata* recolectada en el Municipio de Xilitla del Estado de San Luis Potosí se aislaron mediante técnicas cromatográficas tres compuestos de tipo diterpénico (**1-3**) (Esquema 5), caracterizados como *neo*-clerodanos. Las estructuras asignadas a estos compuestos fueron establecidas mediante el empleo de técnicas espectroscópicas. De acuerdo con la literatura química, estos compuestos corresponden a estructuras novedosas no descritas previamente. En este trabajo se realizará la determinación estructural completa y se abordará la completa asignación de sus espectros de RMN de ^1H y ^{13}C , además del análisis de las distintas técnicas espectroscópicas realizadas.



Esquema 5. Compuestos diterpénicos aislados de *Salvia involucrata*

VI.1 Determinación estructural de la involucratina A, un nuevo diterpeno con esqueleto tipo *cis-neo-clerodano*

El compuesto **1** fue aislado como un polvo amarillo, en cuyo espectro de UV se observaron dos máximos en 207 y 298 nm, el primero indica la presencia de un grupo furano,²⁶ mientras que el segundo indica la presencia de un sistema de dieno conjugado homoanular.²⁷ En el espectro de IR se puede observar una banda intensa y ancha (Espectro 7) en 1756 cm^{-1} , lo que indica que en la molécula hay al menos un grupo carbonilo y que por la posición en la que aparece (Pretsch, 1980, pp. 204)

puede tratarse de una γ -lactona conjugada.²⁸ Se observa una banda de estiramiento C-O en 1187 cm^{-1} , esta se atribuye a una lactona (dicha lactona puede ser γ o δ). También se observan bandas en 1677 , 1602 y 1590 cm^{-1} que se atribuyen a estiramientos C=C, siendo las bandas de 1602 y 1590 cm^{-1} asignadas a las dobles ligaduras del furano de la molécula (Pretsch, 1980, pp. 187). El espectro de masas de alta resolución obtenido mediante la técnica de Análisis Directo en Tiempo Real (DART por sus siglas en inglés) de este producto natural (Espectro 8) permite establecer una fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_7$. Con esta fórmula molecular se puede calcular el grado de insaturación que tiene la molécula.

$$\Omega = \frac{2C + 2 + N - (X + H)}{2}$$

Ecuación 4. Ecuación para calcular el número de insaturaciones de un compuesto orgánico

Ω : número de insaturaciones

C: número de átomos de carbono

N: número de átomos de nitrógeno

X: número de átomos de halógenos

H: número de átomos de hidrógeno

Al tratarse de un compuesto con fórmula molecular de $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_7$ se puede simplificar la ecuación 4 a la siguiente:

$$\Omega = \frac{2C + 2 - H}{2}$$

Ecuación 5. Ecuación para calcular el número de insaturaciones de un compuesto orgánico con fórmula molecular $\text{C}_x\text{H}_y\text{O}_z$

Por consiguiente, el número de insaturaciones o grado de insaturación que tiene el compuesto **1** es de 12.

En el espectro de RMN de ^1H (Espectro 1, Tabla 8) se observa una señal característica de un grupo acetato en 2.05 ppm (s), la cual se asigna a los átomos

de hidrógeno del metilo de la posición C-2', y también se observa una señal aguda en 1.35 (s) que se asigna a los hidrógenos del grupo metilo del C-20, pues ambas señales integran para tres átomos de hidrógeno; las señales en 7.44 ppm (*t*, $J = 1.70$ Hz), 7.48 ppm (*sa*) y 6.42 ppm (*m*) confirman la presencia de un furano, el cual está β -sustituido, y se asigna para H-15, H-16 y H-14, respectivamente; se observan las señales para un sistema AB en 4.00 ppm (*dd*, $J = 8.3$ y 2.2 Hz) y 4.44 ppm (*d*, $J = 8.3$ Hz) que se asignaron a los átomos de hidrógeno del metileno de la posición C-19, el átomo de H-19 *pro R* que está orientado β tiene un acoplamiento a larga distancia (en *W*, ver figura 10) con un átomo de hidrógeno cuya señal aparece en el espectro en 1.80 ppm (*ddd*, $J = 14.7, 7.2,$ y 2.2 Hz) y que se confirma al observarse en el espectro COSY (Espectro 5), esta señal es del átomo de hidrógeno α de un sistema ABX que se asigna al metileno de la posición C-6 y mediante el experimento COSY es posible asignar la señal del átomo de hidrógeno β en 2.30 (*dd*, $J = 14.7$ y 9.4 Hz).

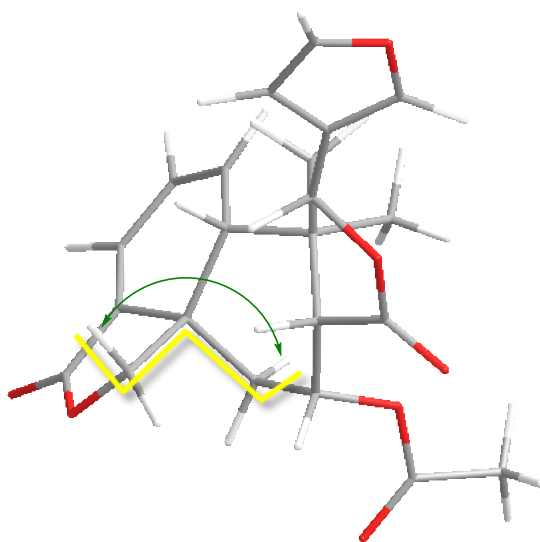


Figura 10. Acoplamiento a larga distancia de H-19 *pro R* con H-6 α

Las señales de 6.86 ppm (*d*, $J = 5.4$ Hz), 6.22 ppm (*ddd*, $J = 9.8, 5.4,$ y 3.0 Hz) y 5.94 ppm (*dd*, $J = 9.8$ y 2.6 Hz) se asignan a átomos de hidrógenos vinílicos correspondientes a las posiciones C-3, C-2 y C-1, respectivamente, el hidrógeno de la posición C-3 tiene un acoplamiento vecinal con el hidrógeno de la posición C-2,

éste a su vez tiene también un acoplamiento vecinal con H-1 y un acoplamiento a larga distancia con H-10, por último, el hidrógeno de la posición C-1 tiene acoplamiento vecinal con H-2 y con H-10. Las señales en 5.76 ppm (*ddd*, $J = 9.4, 7.2$ y 4.8 Hz) y 5.33 ppm (*dd*, $J = 10.5$ y 4.1 Hz) corresponden a átomos de hidrógeno unidos a carbonos con hibridación sp^3 y que son geminales a oxígenos, dichas señales corresponden a las posiciones H-7 y H-12, respectivamente, los acoplamientos de la señal H-7 (9.4, 7.2 y 4.8 Hz) sugieren que el grupo acetato presenta una orientación α -ecuatorial, para comprobar lo anterior, se construyó un modelo Dreiding de la estructura, y se realizó la optimización (MM2) de la estructura geométrica del compuesto (ver figura 11), en tal optimización se puede observar que el anillo B adopta una conformación de tipo bote debido a la fusión *cis* de los anillos A-B (en la figura 12 se ejemplifica el compuesto **1** con fusión *trans* de los anillos A-B), los ángulos diedros que se observan para H6 β -C6-C7-H7 β (27.9°) y H6 α -C6-C7-H7 β (135.4°) explican el valor de las constantes de acoplamiento de 9.7 y 7.2 Hz, respectivamente, en concordancia con a la gráfica de Karplus.

La señal para H-12 presenta dos acoplamientos, uno de 10.5 Hz y otro de 4.0 Hz, ambos con los átomos de hidrógeno de la posición C-11. Las señales del sistema ABX del C-11 se pueden ubicar en el espectro de 1H al analizar las correlaciones que tiene el H-12 en el espectro COSY, al hacer esto se pueden ubicar las dos señales en 2.25 ppm (*dd*, $J = 14.6$ y 4.1 Hz) y 2.11 ppm (*dd*, $J = 14.6$ y 10.5 Hz).

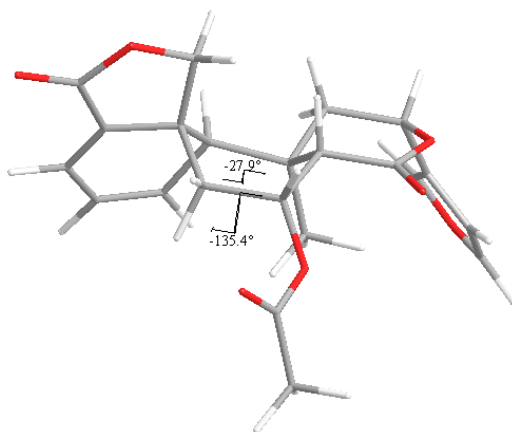


Figura 11. Estructura geométrica optimizada del compuesto **1** con fusión *cis* de los anillos A-B y los ángulos diedros para H6 β -C6-C7-H7 β y H6 α -C6-C7-H7 β

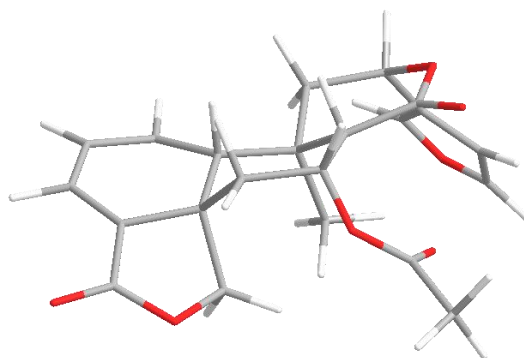


Figura 12. Estructura geométrica optimizada del compuesto **1** suponiendo una fusión *trans* de los anillos A-B

La señal de 2.46 ppm (*d*, $J = 4.7$ Hz) se asignó para el H-8, la cual únicamente tiene acoplamiento axial-ecuatorial con H-7, y, por último, la señal de 2.92 (*sa*) se asignó al H-10, que tiene correlaciones en el espectro COSY con H-1 y H-2.

Mediante el análisis del espectro HSQC (Espectro 3) se logró asignar las señales de 144.1, 139.9, 131.7, 128.8, 122.8, 108.4, 78.7, 70.6, 63.2, 52.2, 47.6, 46.0, 32.0, 27.6 y 21.2 ppm a los carbonos C-16, C-15, C-1, C-3, C-2, C-14, C-19, C-12, C-7, C-10, C-11, C-8, C-6, C-20 Y C-2', respectivamente. Para asignar las señales de los carbonos no enlazados a hidrógeno se hizo uso del experimento HMBC (Espectro 4, Tabla 8, ver también figuras 13 y 14), arriba de 168 ppm aparecen tres señales en el espectro APT que se asignan a grupos carbonilo de la molécula, la señal de 170.2 se asignó al C-1', pues tiene correlación a tres enlaces de distancia con los átomos de hidrógeno de la posición C-2', las señales de 168.61 y 168.56 ppm se asignan a C-17 y C-18, sin embargo, debido a la similitud en desplazamiento entre ellas, no fue posible definir con precisión a cuál carbono corresponde cada una de ellas, y por lo tanto podrían ser intercambiables. Las señales que están en la zona en que se observan los carbonos con hibridación sp^2 (correspondientes a dobles ligaduras C-C) son las de 128.0 y 123.8 ppm, y estas se asignan a C-13 y C-4, por último, las señales que se encuentran en 39.0 y 34.2 ppm se asignan a C-5 y C-9, respectivamente.

Tabla 8. Datos de RMN de ^1H , ^{13}C y correlaciones HMBC de **1**.

Posición	δ_{C}	Tipo	δ_{H} (J en Hz)	HMBC
1	131.7	CH	5.94, <i>dd</i> (9.8, 2.6)	3, 5, 9, 10
2	122.8	CH	6.22, <i>ddd</i> (9.8, 5.4, 3.0)	4, 10
3	128.8	CH	6.86, <i>d</i> (5.4)	1, 2, 5, 6,* 10,* 18
4	128.0	C		
5	39.0	C		
6 β	32.0	CH ₂	2.30, <i>dd</i> (14.7, 9.4)	4, 5, 7, 8, 10 19
6 α			1.80, <i>ddd</i> (14.7, 7.2, 2.2)	4, 5, 7, 10, 19
7	63.2	CH	5.76, <i>ddd</i> (9.4, 7.2, 4.8)	8, 9, 1'
8	46.0	CH	2.46, <i>d</i> (4.8)	6, 7, 9, 10, 11, 17, 20
9	34.2	C		
10	52.2	CH	2.92, <i>sa</i>	1, 2, 3,* 5, 6, 11, 19, 20
11 α	47.6	CH ₂	2.25, <i>dd</i> (14.6, 4.1)	8, 9, 10, 12, 13, 20
11 β			2.11, <i>dd</i> (14.6, 10.5)	8, 9, 10, 12, 13, 20
12	70.6	CH	5.33, <i>dd</i> (10.5, 4.1)	9, 11, 13, 14, 16
13	123.8	C		
14	108.4	CH	6.42, <i>dd</i> (1.7, 1.0)	12, 13, 15, 16
15	139.9	CH	7.44, <i>t</i> (1.7)	13, 14, 16
16	144.1	CH	7.48, <i>sa</i>	13, 14, 15
17	168.61	C		
18	168.56	C		
19 <i>pro S</i>	78.7	CH ₂	4.44, <i>d</i> (8.3)	4, 5, 6, 18
19 <i>pro R</i>			4.00, <i>dd</i> (8.3, 2.2)	5, 6, 10
20	27.6	CH ₃	1.35, <i>s</i>	1,* 7,* 8, 9, 10, 11
1'	170.2	C		
2'	21.2	CH ₃	2.05, <i>s</i>	7,* 1'

^1H 700 MHz, ^{13}C 175 MHz, CDCl_3 . *Correlación a través de cuatro enlaces.

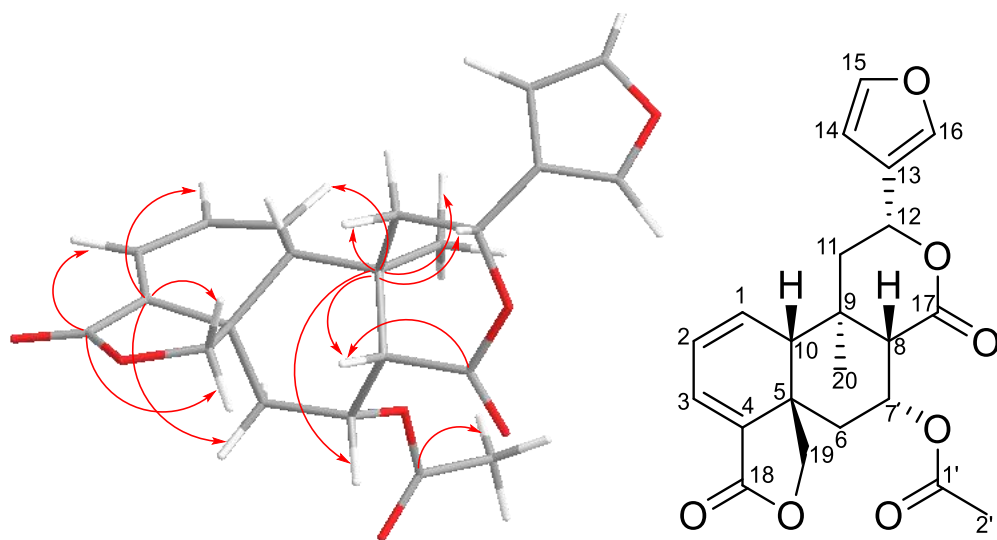


Figura 13. Estructura geométrica optimizada del compuesto **1** con correlaciones observadas en el espectro HMBC para los carbonos C-4, C-9, C-17, C-18 y C-1'

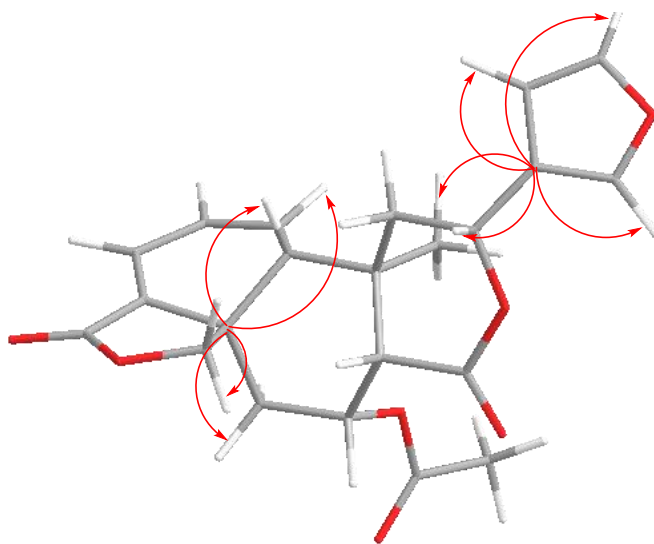


Figura 14. Estructura geométrica optimizada del compuesto **1** con correlaciones observadas en el espectro HMBC para los carbonos C-5 y C-13

La configuración relativa de **1** fue establecida con base en los valores de las constantes de acoplamiento ya discutidas y con ayuda del espectro NOESY (Espectro 6, ver también figura 15).

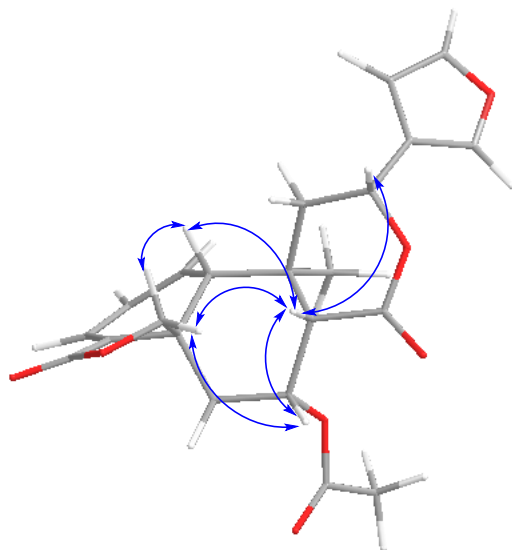
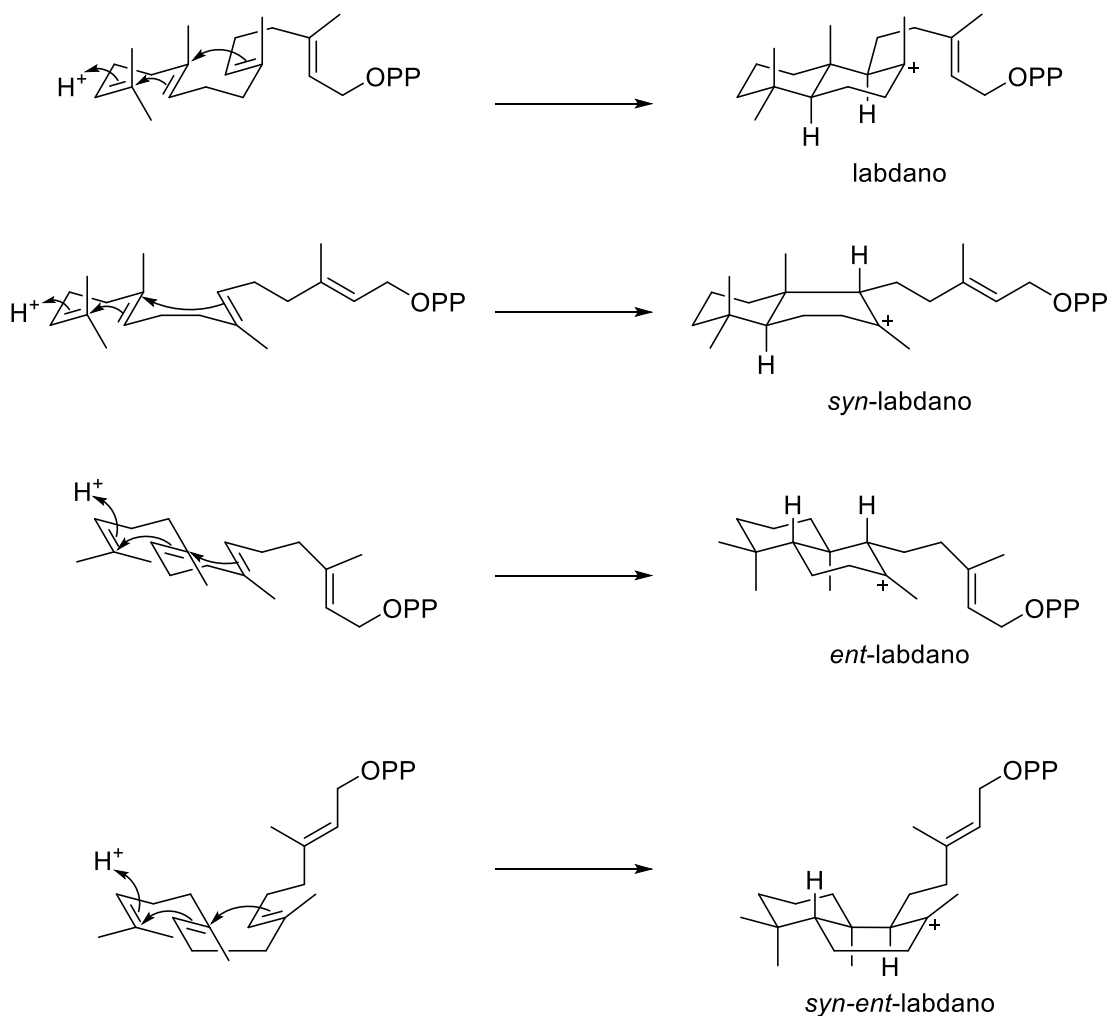


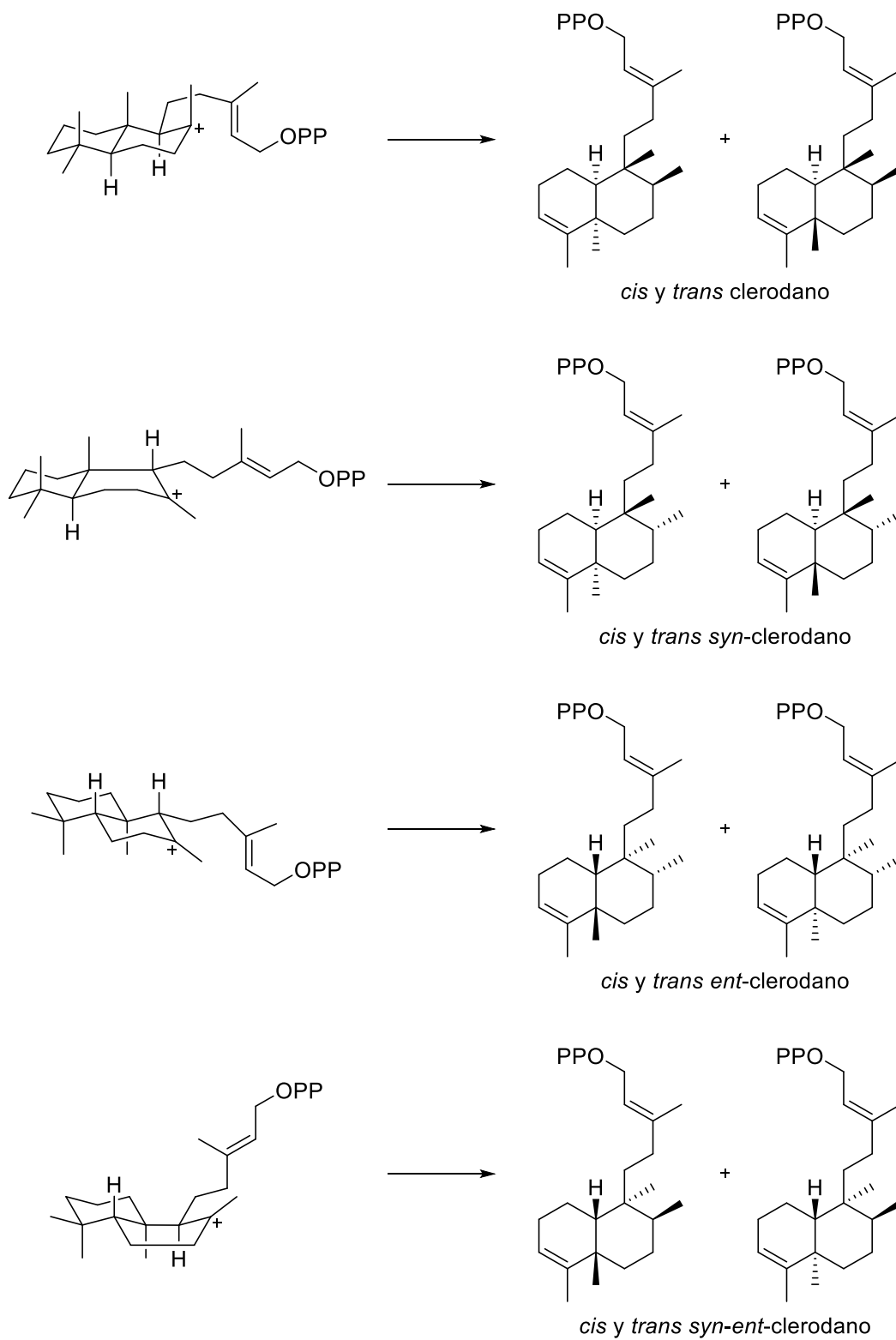
Figura 15. Estructura geométrica optimizada del compuesto **1** con correlaciones observadas en el espectro NOESY

Además, se tomaron en cuenta cuestiones biosintéticas que apoyan la estructura propuesta (ver esquema 6).



Esquema 6. Series enantioméricas de diterpenos de tipo labdano²⁹

En la serie enantiomérica de los labdanos se observa que el pirofosfato de geranylgeranilo puede tomar cuatro distintas conformaciones al momento de ciclarse, posteriormente, cada una de estas sufre una serie de transposiciones que da como resultado el esqueleto base de los diterpenos clerodánicos (ver esquema 7, ver también esquema 4 para las transposiciones que dan lugar a los clerodanos).



Esquema 7. Series enantioméricas de diterpenos de tipo clerodano

Como se puede observar, para cada uno de los confórmeros de la serie de los labdanos se derivan dos confórmeros de clerodanos, pues en la última transposición de metilo (ver esquema 4) puede transponerse aquel orientado en α o β , dando como resultado clerodanos con fusión *cis* y *trans* de los anillos A-B. Es importante mencionar que el primer *ent*-clerodano que se aisló de plantas³⁰ fue nombrado como *neo*-clerodano, y el *syn-ent*-clerodano se conoce como *syn-neo*-clerodano. De acuerdo con la estructura propuesta para **1**, éste debe provenir del *ent*-clerodano o del *syn-ent*-clerodano, sin embargo, se propone que se trata de un *neo*-clerodano, pues la mayoría de las biosíntesis de clerodanos que se han estudiado por medio de experimentos de marcaje isotópico conducen a la conclusión de que provienen de la serie enantiomérica a la que pertenece el *ent*-labdano, y por ende, del *neo*-clerodano; y aunque eso no es una razón de la que se tenga el 100% de certeza, es una muy buena aproximación, y la forma en que pudiera conocerse con exactitud la serie enantiomérica a la que pertenece éste compuesto sería llevar a cabo estudios y experimentos de marcaje isotópico con la *Salvia involucrata*, pero para los fines de este trabajo se referirá a este compuesto como *neo*-clerodano.

Una revisión exhaustiva de la literatura química condujo a la 7 α -acetoxi-7,8 α -dihidrogensnerofolina B (**1a**), un compuesto relacionado a **1** que fue aislado previamente de *Salvia gesneraeflora*,³¹ siendo **1** un triepímero en C-5, C-8 y C-10. El estudio comparativo entre los datos de RMN de ¹H y ¹³C de este compuesto con los obtenidos de **1** indica una gran similitud en casi todas las señales (Tabla 9), a excepción del desplazamiento para el sistema AB del C-19, el cual se observa a mayor desplazamiento en la 7 α -acetoxi-7,8 α -dihidrogensnerofolina B, debido a que por la orientación α del H-10 y del C-19, el anillo B toma una conformación tipo silla y el grupo acetato queda en el mismo plano que los átomos de hidrógeno de C-19, por lo que quedan en la zona de desprotección del acetato, haciendo que se desplacen hacia frecuencia alta; la segunda excepción que se nota es en las constantes de acoplamiento para H-7, pues en el compuesto aislado de *S. gesneraeflora* éste tiene un acoplamiento axial-ecuatorial y dos acoplamientos ecuatorial-ecuatorial, por lo que la señal se observa como un *dt* (5.7 y 3.0 Hz), mientras que en **1** se observa una señal *ddd* con $J = 9.4, 7.2$ y 4.8 Hz, y como ya se

explicó, esto se debe a la conformación de bote que adopta el anillo B debido a la fusión *cis* de los anillos y la orientación β de H-10 y C-19.

Tabla 9. Comparación de RMN de ^1H y C^{13} del compuesto **1** con **1a**

Posición	δ_{C}		Tipo	δ_{H} (J en Hz)	
	1	1a		1	1a
1	131.7	132.2	CH	5.94, <i>dd</i> (9.8, 2.6)	6.11, <i>dd</i> (9.5, 2.1)
2	122.8	127.4	CH	6.22, <i>ddd</i> (9.7, 5.4, 3.0)	6.43, <i>ddd</i> (9.5, 5, 3)
3	128.8	128.6	CH	6.86, <i>d</i> (5.4)	7.00, <i>d</i> (5.0)
4	128.0	132.5	C		
5	39.0	38.8	C		
6 β	32.0	31.2	CH ₂	2.30, <i>dd</i> (14.7, 9.4)	
6 α				1.80, <i>ddd</i> (14.7, 7.2, 2.2)	
7	63.2	64.7	CH	5.76, <i>ddd</i> (9.4, 7.2, 4.8)	5.68, <i>dt</i> (5.7, 3.0)
8	46.0	44.1	CH	2.46, <i>d</i> (4.8)	2.83, <i>d</i> (3)
9	34.2	35.4	C		
10	52.2	50.6	CH	2.92, <i>sa</i>	2.70, <i>ta</i> (2.1)
11 α	47.6	42.0	CH ₂	2.25, <i>dd</i> (14.6, 4.1)	2.53, <i>dd</i> (15.3, 4.0)
11 β				2.11, <i>dd</i> (14.6, 10.5)	1.95, <i>dd</i> (15.3, 12.3)
12	70.6	71.1	CH	5.33, <i>dd</i> (10.5, 4.0)	5.35, <i>dd</i> (12.3, 4.0)
13	123.8	135.1	C		
14	108.4	108.4	CH	6.42, <i>dd</i> (1.7, 1.0)	6.47, <i>dd</i> (2.0, 0.5)
15	139.9	143.9	CH	7.44, <i>t</i> (1.7)	7.46, <i>t</i> (2.0)
16	144.1	139.9	CH	7.48, <i>sa</i>	7.53, <i>m</i>
17	168.61	169.9	C		
18	168.56	168.2	C		
19 <i>pro S</i>	78.7	77.8	CH ₂	4.44, <i>d</i> (8.3)	4.15, <i>dd</i> (9.0, 1.5)
19 <i>pro R</i>				4.00, <i>dd</i> (8.3, 2.2)	4.86, <i>d</i> (9.0)
20	27.6	29.1	CH ₃	1.35, <i>s</i>	1.35, <i>s</i>
1'	170.2	169.5	C		
2'	21.2	21.4	CH ₃	2.05, <i>s</i>	2.10, <i>s</i>

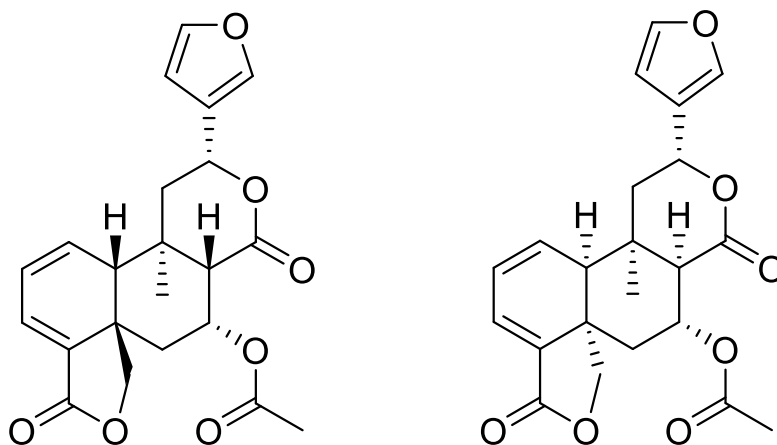


Figura 16. Compuesto **1** y 7 α -acetoxi-7,8 α -dihydrogensnerofolina B (**1a**)

Recientemente se identificó un compuesto muy relacionado de otra *Salvia* mexicana (*Salvia chamaedryoides*) cultivada en Italia denominado (5*R*,7*R*,8*S*,9*R*,10*R*,12*R*)-7-hidroxicleroda-1,3,13(16),14-tetraeno-17,12;18,19-diólida;³² a diferencia de **1**, el compuesto aislado de *S. chamaedryoides* posee un sustituyente OH en la posición C-7 del esqueleto clerodánico, por lo tanto, el compuesto **1** corresponde a la (+)-(5*R*,7*R*,8*S*,9*R*,10*R*,12*R*)-7-hidroxicleroda-1,3,13(16),14-tetraeno-17,12;18,19-diólida.

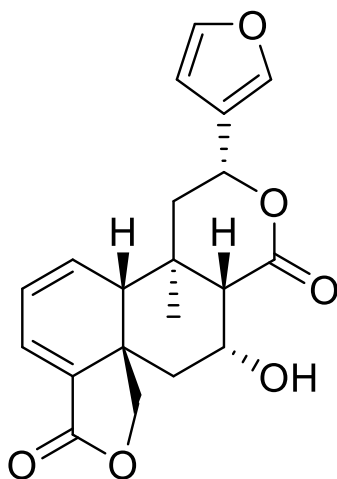


Figura 17. (5*R*,7*R*,8*S*,9*R*,10*R*,12*R*)-7-hidroxicleroda-1,3,13(16),14-tetraeno-17,12;18,19-diólida

En conclusión, el compuesto **1** corresponde a un compuesto nuevo, con un esqueleto de *cis-neo*-clerodano, el cual se denominó involucratina A.

VI.2 Determinación estructural de la involucratina B, un nuevo diterpeno con esqueleto tipo *cis-neo*-clerodano

El compuesto **2** fue aislado como un polvo amarillo, en cuyo espectro de UV se observan dos máximos en 285 y 297 nm lo que indica la presencia de un sistema de dieno conjugado homoanular. En el espectro de IR (Espectro 15) se observa una banda intensa y ancha en 1737 cm^{-1} , que evidencia la presencia de al menos un grupo carbonilo en la molécula. El espectro de masas de este producto natural (Espectro 16) establece una fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_5$ con 12 grados de insaturación (calculados con la ecuación 5). Los espectros de RMN de ^1H (Espectro 9, Tabla 10) y de APT (Espectro 10, Tabla 10) de este producto permiten establecer la estructura mostrada en el esquema 5 para el compuesto **2**, el cual está estrechamente relacionada con la involucratina A (**1**). En el apartado **VI.4** se da una propuesta biogénica para la obtención de la involucratina B a partir del compuesto **1**. De manera similar a **1**, en el espectro de RMN de ^1H del compuesto se observan señales en 7.48 ppm (*sa*), 7.44 ppm (*sa*) y 6.43 ppm (*s*) que indican la presencia de un furano β -sustituido, estas señales se asignan para H-16, H-15 y H-14, respectivamente. También se observa un par de señales correspondientes a un sistema AB, en 4.31 ppm (*d*, $J = 8.3\text{ Hz}$) y 4.15 ppm (*dd*, $J = 8.2$ y 1.5 Hz) y se asignan para H-19, al igual que en **1**, el átomo de hidrógeno *pro R* presenta un acoplamiento a larga distancia (en *W*, ver figura 18) con un átomo de hidrógeno del metileno de la posición C-6, este acoplamiento se corrobora mediante la correlación que tienen en el espectro COSY (Espectro 13) y se observa en el espectro de RMN de ^1H en 2.34 ppm (*da*, $J = 17.7\text{ Hz}$), este hidrógeno está orientado α , y el hidrógeno β está en 2.15 ppm (*m*), esto se confirma mediante el espectro HSQC (Espectro 11). Las señales que se encuentran en 7.01 ppm (*d*, $J = 5.2\text{ Hz}$), 6.34 ppm (*m*) y 6.26 ppm (*dd*, $J = 9.8$ y 2.3 Hz), se asignan a H-3, H-2 y H-1, y a diferencia del compuesto **1**, en **2** se observa una señal en 6.78 ppm (*dd*, $J = 6.8$ y 1.8 Hz), su desplazamiento indica que pertenece a un átomo de hidrógeno vinílico y se asigna

a H-7. Otra diferencia con **1** es que en **2** no se observa la señal correspondiente a H-8, lo que confirma la existencia del doble enlace entre C-7 y C-8. Se observa un sistema ABX, la parte AB constituida por los átomos de hidrógeno de C-11 se encuentran en δ 2.07 ($J = 14.1$ y 5.5 Hz) y 2.17 (m), y la parte X como un doble de dobles con constantes de acoplamiento de 10.9 y 5.5 Hz correspondiente a H-12. La señal que se encuentra en 2.17 se observa como un múltiple, puesto que se encuentra sobrepuesta con la señal de H-6b (la cual también se observa como un múltiple) y no se alcanza a distinguir con precisión la multiplicidad de la señal, no obstante, se sabe que debería observarse como un doble de dobles, por acoplamiento geminal con H-11b y acoplamiento vecinal con H-12.

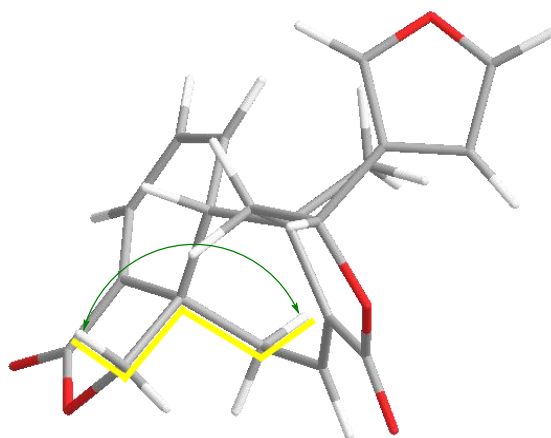


Figura 18. Acoplamiento a larga distancia de H-19 *pro R* con H-6 α

Mediante el análisis del espectro HSQC se logró asignar las señales de 144.1 , 140.0 , 134.9 , 133.6 , 129.4 , 125.2 , 108.7 , 77.2 , 71.0 , 48.8 , 45.3 , 29.1 y 27.8 ppm a los carbonos C-15, C-16, C-1, C-3, C-2, C-14, C-19, C-12, C-10, C-11, C-20 y C-6, respectivamente. Para asignar los demás átomos de carbono se hizo uso del experimento HMBC (Espectro 12, Tabla 10, ver también figuras 19 y 20), desplazadas a frecuencias más altas, se observa un par de señales pertenecientes a los grupos carbonilos de la molécula, la que se encuentra en 168.9 ppm se asigna al C-17, mientras que la señal de 168.7 ppm se asigna al C-18; la ausencia de un tercer carbonilo confirma que el grupo acetato no se encuentra presente en el compuesto **2**. A diferencia de la involucratina A, en **2** se observan dos señales extras

en la zona donde se observan las señales de carbono con hibridación sp^2 (correspondientes a dobles ligaduras C-C), estas señales se observan en δ 134.9 (asignada a C-7) 137.2, esta última se asigna al C-8, mientras que las señales de 131.0 y 123.8 ppm se asignan a C-4 y C-13, respectivamente. Por último, en la zona donde aparecen señales de carbonos alifáticos con hibridación sp^3 , las señales observadas en 40.4 y 34.8 ppm se asignan a C-5 y C-9, respectivamente.

Tabla 10. Datos de RMN de 1H , ^{13}C y correlaciones HMBC de **2**.

Posición	δ_C	Tipo	δ_H (J en Hz)	HMBC
1	133.6	CH	6.26, <i>dd</i> (9.8, 2.3)	3, 5, 9, 10
2	125.2	CH	6.34, <i>m</i>	4
3	129.4	CH	7.01, <i>d</i> (5.2)	1, 2, 5, 6,* 18
4	131.0	C		
5	40.4	C		
6 α	27.8	CH ₂	2.34, <i>da</i> (17.8)	5, 7, 10, 18,* 19
6 β			2.15 <i>m</i>	5, 7, 8, 10, 19
7	134.9	CH	6.78, <i>dd</i> (6.8, 1.8)	5, 6, 8, 9, 10,* 17
8	137.2	C		
9	34.8	C		
10	48.8	CH	2.79, <i>sa</i>	1, 2, 5, 6, 8, 9, 11, 19
11 β	45.3	CH ₂	2.17 <i>m</i>	8, 9, 10, 12, 13, 20
11 α			2.07, <i>dd</i> (14.1, 5.5)	8, 9, 10, 12, 13, 20
12	71.0	CH	5.06, <i>dd</i> (10.9, 5.5)	9, 11, 13, 14, 16, 17
13	123.8	C		
14	108.7	CH	6.43, <i>s</i>	12, 13, 15, 16
15	144.1	CH	7.44, <i>sa</i>	13, 14, 16
16	140.0	CH	7.48, <i>sa</i>	13, 14, 15
17	168.9	C		
18	168.7	C		

19 <i>pro S</i>	77.2	CH ₂	4.31, <i>d</i> (8.3)	4, 5, 6, 18
19 <i>pro R</i>			4.15, <i>dd</i> (8.3, 1.5)	5, 6, 10
20	29.1	CH ₃	1.44, <i>s</i>	1, * 5, * 8, 9, 10, 11

¹H 700 MHz, ¹³C 175 MHz, CDCl₃. *Correlación a través de cuatro enlaces.

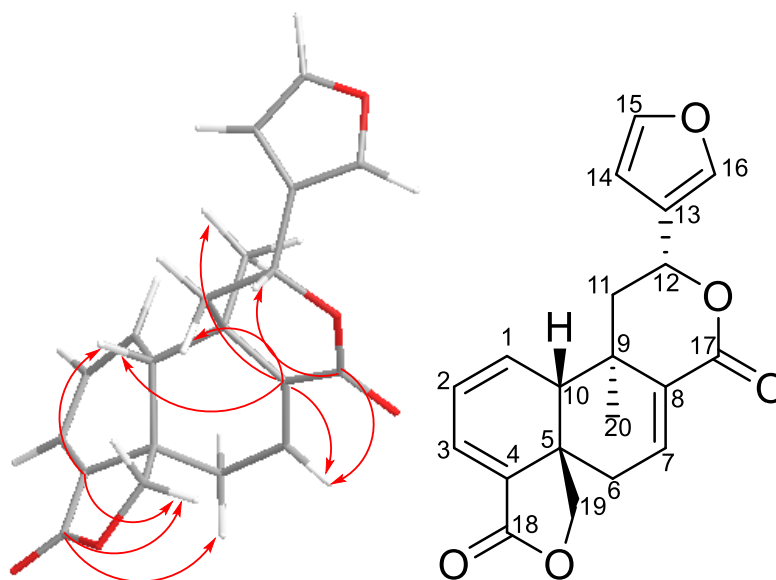


Figura 19. Estructura geométrica optimizada del compuesto **2** con correlaciones observadas en el espectro HMBC para los carbonos C-4, C-8, C-17 y C-18

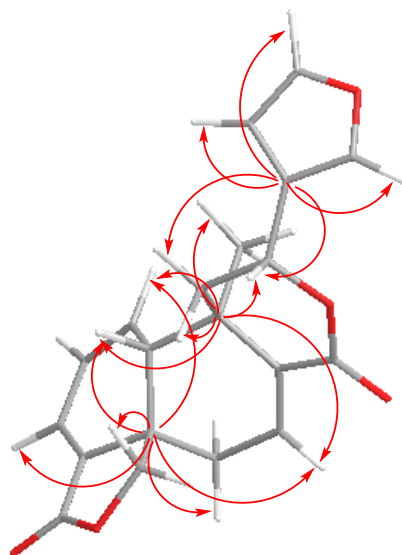


Figura 20. Estructura geométrica optimizada del compuesto **2** con correlaciones observadas en el espectro HMBC para los carbonos C-5, C-9 y C-13

Al igual que en la involucratina A, la configuración relativa de **2** fue establecida con los valores de las constantes de acoplamiento previamente discutidas y con ayuda del espectro NOESY (Espectro 14, ver también figura 21).

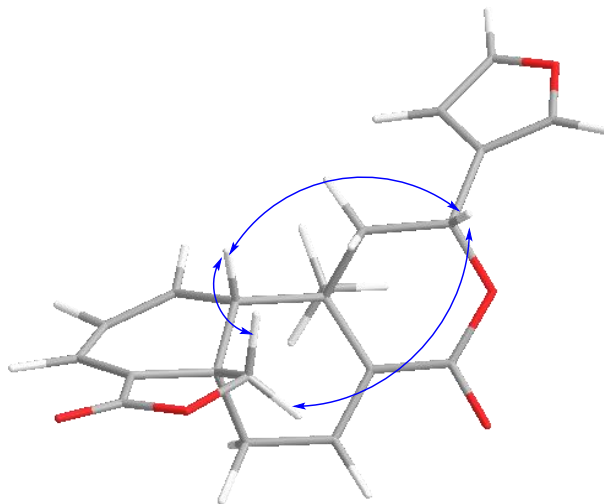


Figura 21. Estructura geométrica optimizada del compuesto **2** con correlaciones observadas en el espectro NOESY

Para tener una noción de qué tipo de clerodano se trata, también se consideraron las cuestiones biosintéticas que se discutieron para la involucratina A, por lo que **2** es un *cis-neo*-clerodano, el cual también está relacionado con un compuesto aislado de *Salvia gesneraeflora*, conocido como gesnerofolina B³¹, siendo **2** un diepímero en C-5 y C-10. Al hacer la comparación de los datos espectroscópicos correspondientes a RMN de ¹H y ¹³C del compuesto descrito previamente y el obtenido en este trabajo (Tabla 11), se observa una estrecha similitud en casi todas las señales, a excepción de la señal correspondiente a H-7, pues en el artículo se describe como una señal triple con $J = 3.5$ Hz, mientras que para **2** se reporta señal como un doble de dobles con $J = 6.8$ y 1.8 Hz, esta diferencia se explica con base en las estructuras geométricas optimizadas para dichos compuestos (Figuras 22 y 23).

Tabla 11. Comparación de RMN de ^1H y C^{13} del compuesto **2** con la gesnerofolina B (**2a**)

Posición	δ_{C}		Tipo	δ_{H} (J en Hz)	
	2	2a		2	2a
1	133.6	133.7	CH	6.26, <i>dd</i> (9.8, 2.3)	6.04, <i>dd</i> (9.5, 2.5)
2	125.2	127.1	CH	6.34, <i>m</i>	6.43, <i>ddd</i> (9.5, 5.0, 3.5)
3	129.4	128.4	CH	7.01, <i>d</i> (5.2)	7.00, <i>d</i> (5.0)
4	131.0	133.0	C		
5	40.4	38.5	C		
6 α	27.8	32.4	CH ₂	2.34, <i>da</i> (17.8)	2.39, <i>dd</i> (18.0, 3.5)
6 β				2.15 <i>m</i>	2.35, <i>ddd</i> (18.0, 3.5, 1.0)
7	134.9	138.8	CH	6.78, <i>dd</i> (6.8, 1.8)	6.85, <i>t</i> (3.5)
8	137.2	123.2	C		
9	34.8	34.3	C		
10	48.8	48.6	CH	2.79, <i>sa</i>	2.70, <i>dd</i> (3.5, 2.5)
11 β	45.3	40.8	CH ₂	2.17 <i>m</i>	2.54, <i>dd</i> (15.0, 12.0)
11 α				2.07, <i>dd</i> (14.1, 5.5)	2.11, <i>dd</i> (15.0, 2.5)
12	71.0	72.1	CH	5.06, <i>dd</i> (10.9, 5.5)	5.13, <i>dd</i> (12.0, 2.5)
13	123.8	134.3	C		
14	108.7	108.4	CH	6.43, <i>s</i>	6.49, <i>dd</i> (2.0, 1.0)
15	144.1	143.9	CH	7.44, <i>sa</i>	7.46, <i>t</i> (2.0)
16	140.0	139.9	CH	7.48, <i>sa</i>	7.54, <i>m</i>
17	168.9	167.9	C		
18	168.7	168.1	C		
19 <i>pro S</i>	77.2	79.0	CH ₂	4.31, <i>d</i> (8.3)	4.24, <i>dd</i> (8.5, 1.0)
19 <i>pro R</i>				4.15, <i>dd</i> (8.3, 1.5)	4.46, <i>d</i> (8.5)
20	29.1	33.1	CH ₃	1.44, <i>s</i>	1.28, <i>s</i>

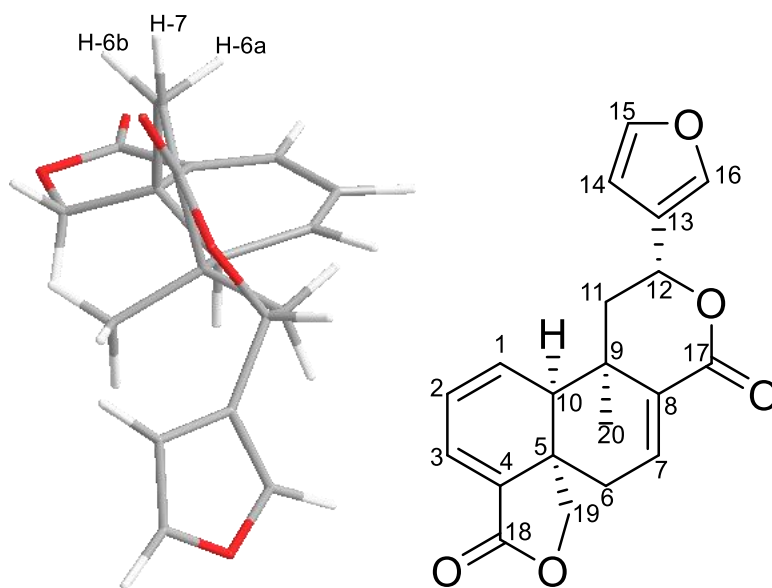


Figura 22. Estructura geométrica optimizada de la gesnerofolina B (**2a**)

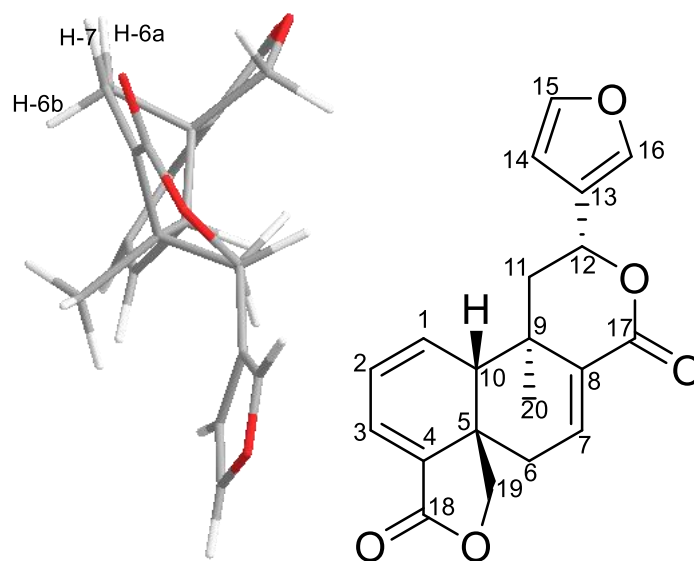


Figura 23. Estructura geométrica optimizada del compuesto **2**

Si bien ambos compuestos tienen configuración *cis* en la fusión de los anillos A-B, el hecho de que en la gesnerofolina B H-10 y C-19 estén con orientación α define que el H-7 presente la misma constante de acoplamiento con los átomos de hidrógeno del metileno C-6 debido a la conformación que toma el anillo B, en cambio en **2** se observa que cuando H-10 y C-19 se encuentran β orientados, la conformación del anillo B es distinta, y como consecuencia H-7 y H-6 α se

encuentren casi en el mismo plano, siendo esta la correlación más fuerte que se observa ($J=6.8$ Hz) y la correlación que existe entre H-7 y H-6 β se observa con menor intensidad ($J=1.8$ Hz). Por lo tanto, el compuesto **2** es un *cis-neo*-clerodano correspondiente a la (+)-(5*R*,9*R*,10*R*,12*R*)-cleroda-1,3,7,13(16),14-pentaeno-17,12; 18,19-diólida, el cual se nombró involucratina B.

VI.3 Determinación estructural de la involucratina C, un nuevo diterpeno con esqueleto tipo 5,10-*seco-neo*-clerodano

El compuesto **3** fue aislado como un polvo amarillo claro, en cuyo espectro de UV se observan dos máximos 212 y 291 nm, el primero indica la presencia de un grupo furano, mientras que el segundo indica la presencia de un sistema de trieno conjugado homoanular. En el espectro de IR (Espectro 23) se observa una banda intensa y ancha en 1748 cm^{-1} , lo que indica la presencia de al menos un grupo carbonilo en la molécula. El espectro de masas de este producto natural (Espectro 24) establece una fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_7$, con lo cual se puede hacer el cálculo del grado de insaturación para este compuesto (Ecuación 5), resultando de $\Omega=12$. Los espectros de RMN de ^1H (Espectro 17, Tabla 12) y de ^{13}C (Espectro 18, Tabla 12) de este producto permiten establecer la estructura **3** para el mismo, la cual está relacionada con la involucratina A (**1**). En el apartado **VI.4** se da una propuesta biogénica para la obtención de la involucratina C a partir de **1**. De manera similar a **1** y **2**, en el espectro de RMN de ^1H se observan señales que confirman la presencia de un grupo furano β -sustituido, estas señales se encuentran en 7.43 ppm (s), 7.40 ppm (*t*, $J=1.6$ Hz) y 6.38 (*sa*) y se asignan a H-16, H-15 y H-14, respectivamente. Las señales correspondientes a los átomos de hidrógeno H-1, H-2 y H-3 se encuentran en 6.06 ppm (*da*, $J = 16.0$ Hz), 6.35 ppm (*d*, $J = 11.4$ Hz) y 6.12 ppm (*d*, $J = 11.5$ Hz). Otra similitud que tiene con **1** es que se observa una señal característica de un grupo acetato en 2.09 ppm y que se asigna al grupo metilo de C-1', mientras que la señal correspondiente al grupo metilo C-20 se observa como una señal simple aguda en 1.54 ppm. Los átomos de hidrógeno correspondientes al sistema AB del C-19 se encuentran en 4.85 y 4.74 ppm ($J = 18.1$ Hz). A diferencia de los compuestos anteriores, en **3** no se observa

acoplamiento W con H-6 α . Es importante hacer notar que el acoplamiento geminal de los H-19 es demasiado grande a comparación con los compuestos anteriores, lo que indica algo en la molécula está afectando el acoplamiento que existe entre estos átomos de hidrógeno; se sabe que la tensión de los anillos modifica la constante de acoplamiento, en el caso de **3** la tensión de la γ -lactona al ser un anillo de 5 miembros, donde uno de estos es un heteroátomo (oxígeno), presenta cierta tensión, sin embargo, el doble enlace entre los carbonos C4-C5 aumenta considerablemente dicha tensión incrementando la constante de acoplamiento. Considerando las estructuras de **1** y **2**, no podría existir un doble enlace entre C4-C5 debido a que C-5 ya es un carbono cuaternario, para que esto pueda ocurrir debió romperse el enlace entre C-5 y C-1 debido a un movimiento de electrones dando como resultado un anillo de 10 átomos de carbono con tres dobles enlaces entre los carbonos C5-C4, C3-C2 y C1-C10 (cabe mencionar que cuando existe una ruptura de enlace C-C en compuestos terpénicos se antepone el prefijo x,y-seco seguido del nombre del esqueleto del que se trata, donde x y y hacen referencia al enlace que se rompió entre esos dos átomos de carbono), es por eso que a diferencia de los compuestos anteriores, el H-10 se observa a frecuencia más alta, pues se trata de un hidrógeno vinílico, y se ubica en 6.04 ppm casi sobrepuesta con la señal correspondiente a H-1.

En 3.57 ppm (*ta*, $J = 12.7$ Hz) y 2.64 ppm (*dd*, $J = 13.7$ y 6.1 Hz) se observan las señales correspondientes al metileno C-6, ambas presentan acoplamiento geminal y acoplamiento vecinal con H-7, este último, con ayuda del espectro COSY (Espectro 21), se puede ubicar en el espectro en 5.66 ppm, se observa como un *ddd* con $J = 12.2$, 6.1 y 2.2 Hz, los acoplamientos más grandes se deben a la correlación de H-7 con los hidrógenos del metileno C-6, mientras que el más pequeño se debe al acoplamiento que existe entre H-7 y H-8, el cual se encuentra en el espectro en 2.67 ppm y se observa como una señal simple y ancha.

La señal de H-12 se pudo ubicar en el espectro debido al acoplamiento a tres enlaces de distancia que tiene con H-16 (mediante el análisis del espectro COSY) y se encuentra en 5.34 ppm como una señal *dd*, con acoplamientos de 12.0 Hz y

2.9 Hz con los dos átomos de hidrógeno del metileno C-11; estos últimos se encuentran en el espectro de ^1H en 2.14 y 1.95 ppm, el primero corresponde al átomo de hidrógeno H-11 β , pues se distingue como una señal doble y ancha, debido a un acoplamiento grande ($J = 14.1$ Hz) con H-11 α y la señal se ensancha debido al acoplamiento pequeño que existe con H-12.

Mediante el análisis del espectro HSQC (Espectro 23) se logró asignar las señales de 143.9, 140.6, 140.0, 133.4, 123.8, 121.6, 108.4, 71.8, 70.9, 70.2, 46.4, 45.0, 33.1, 23.5 y 22.1 ppm a los carbonos C-15, C-10, C-16, C-2, C-1, C-3, C-14, C-19, C-7, C-12, C-8, C-11, C-6, C-20 Y C-2', respectivamente. Para asignar los demás átomos de carbono se analizó el espectro HMBC (Espectro 20, Tabla 12, ver también figuras 24 y 25), arriba de 170 ppm aparecen tres señales en el espectro de RMN de ^{13}C que se asignan a los tres grupos carbonilo de la molécula, la señal de 174.6 se asigna para C-18, pues tiene correlaciones a tres enlaces de distancia con H-3 y los H-19, y un acoplamiento a cuatro enlaces de distancia con uno de los átomos de hidrógeno del C-6; las señales de 170.9 y 170.1 ppm se asignan a C-17 y C-1', respectivamente, pues para la primera señal se observa una correlación a tres enlaces de distancia con H-12, mientras que para la segunda señal se observa una señal a dos enlaces de distancia con H-2' y otra a tres enlaces de distancia con H-7. Las señales observadas en la zona de carbonos con hibridación sp^2 (correspondientes a dobles ligaduras C-C) son las de 151.9, 124.9 y 123.8 ppm, que se asignan a C-5, C-4 y C-13, respectivamente, por último se observa una señal en 39.1 ppm que se asigna a C-9, pues es el único carbón cuaternario y alifático que está presente en la molécula, esto también confirma el hecho de que exista la doble ligadura entre C-4 y C-5, pues en los compuestos anteriores se observaba la señal de C-5 en la zona de carbonos alifáticos.

Tabla 12. Datos de RMN de ^1H , ^{13}C y correlaciones HMBC de **3**

Posición	δ_{C}	Tipo*	δ_{H} (J en Hz)	HMBC
1	123.8	CH	6.07, <i>da</i> (16.0)	2, 3, 9, 10
2	133.4	CH	6.35, <i>d</i> (11.4)	4
3	121.6	CH	6.12, <i>d</i> (11.5)	1, 2, 5, 10,* 18
4	124.9	C		
5	151.9	C		
6 β	33.1	CH ₂	3.57, <i>ta</i> (12.7)	7
6 α			2.64, <i>dd</i> (13.7, 6.1)	3,* 4, 5, 7, 8, 18*
7	70.9	CH	5.66, <i>ddd</i> (12.2, 6.1, 2.2)	6, 8, 9, 17, 1'
8	46.4	CH	2.67, <i>sa</i>	-
9	39.1	C		
10	140.6	CH	6.04, <i>da</i> (16.0)	1, 2, 8, 9, 20
11 β	45.0	CH ₂	2.14, <i>da</i> (14.1)	9, 10
11 α			1.95, <i>dd</i> (14.7, 12.0)	1,* 8, 9, 10, 13, 20
12	70.2	CH	5.34, <i>dd</i> (12.0, 2.9)	9, 11, 13, 14, 16, 17
13	123.5	C		
14	108.4	CH	6.38, <i>sa</i>	12, 13, 15, 16
15	143.9	CH	7.40, <i>t</i> (1.6)	13, 14, 16
16	140.0	CH	7.43, <i>sa</i>	12, 13, 14, 15
17	170.9	C		
18	174.6	C		
19 <i>pro S</i>	71.8	CH ₂	4.85, <i>d</i> (18.1)	2,** 3,* 4, 5, 6, 7,* 18
19 <i>pro R</i>			4.74, <i>d</i> (18.0)	2,** 3,* 4, 5, 6, 7,* 18
20	23.5	CH ₃	1.54, <i>s</i>	1,* 9, 10, 11, 12*
1'	170.1	C		
2'	21.1	CH ₃	2.09, <i>s</i>	7,* 1'

^1H 700 MHz, ^{13}C 175 MHz, CDCl_3 . *Correlación a través de cuatro enlaces.

**Correlación a través de cinco enlaces

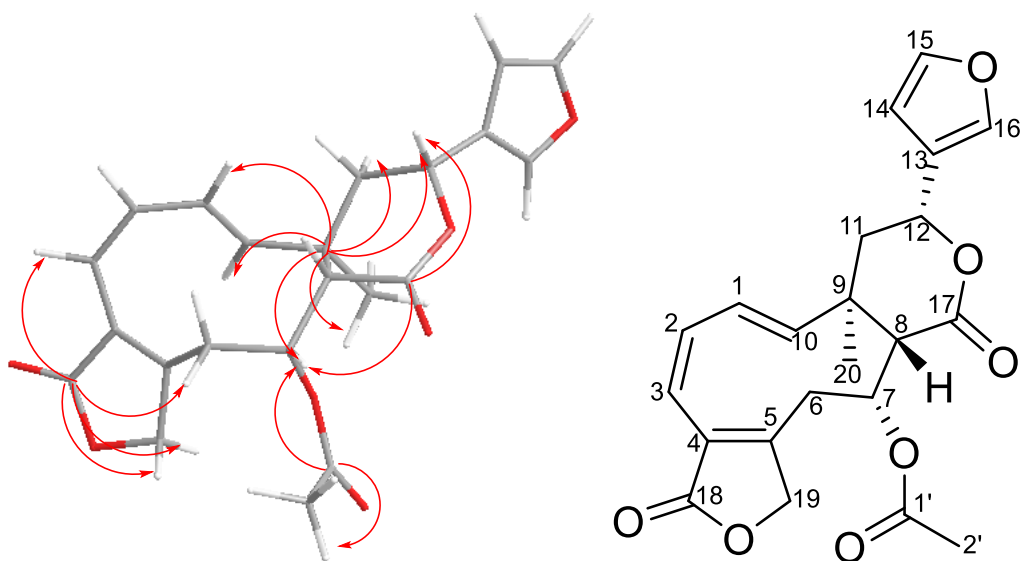


Figura 24. Estructura geométrica optimizada del compuesto **3** con correlaciones observadas en el espectro HMBC para los carbonos C-9, C-17, C-18 y C-1'

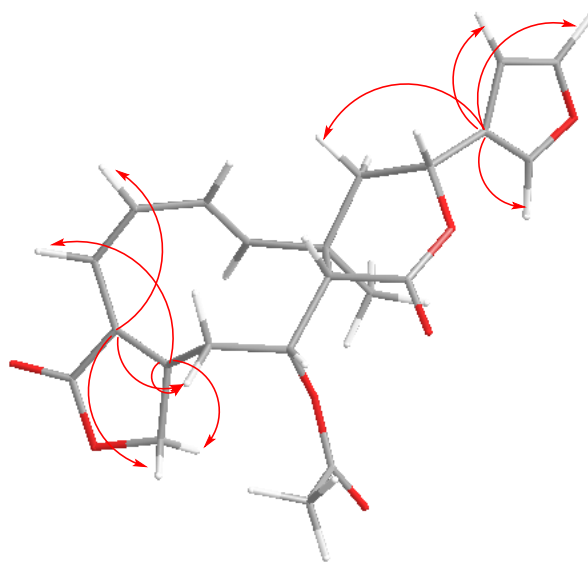


Figura 25. Estructura geométrica optimizada del compuesto **3** con correlaciones observadas en el espectro HMBC para los carbonos C-4, C-5 y C-13

La configuración relativa de **3** fue establecida mediante el análisis de las constantes de acoplamiento ya discutidas y con ayuda del espectro NOESY (Espectro 22, ver también figura 26).

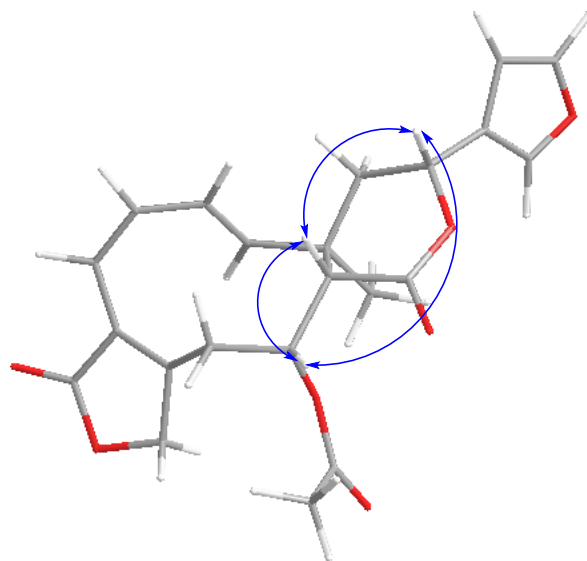


Figura 26. Estructura geométrica optimizada del compuesto **3** con correlaciones observadas en el espectro NOESY

Este compuesto está relacionado con la (7*R*,8*S*,9*R*,12*R*)-7-hidroxi-5,10-*seco-neo*-cleroda-1(10),2,4,13-(16),14-pentaeno-17,12;18,19-diólida (nombrado a partir de ahora como **3a**) aislada previamente de *Salvia chamaedryoides*.³² La única diferencia entre **3** y **3a** es el sustituyente de la posición C-7, pues en **3a** se tiene un grupo OH, mientras que en el compuesto aislado (**3**) se tiene un grupo acetato, esto se confirma mediante el análisis los datos espectroscópicos reportados para ambos compuestos (RMN de ¹H y ¹³C, ver tabla 13), en **3a** se observan 20 señales en el espectro de RMN de ¹³C, mientras que para **3** se ven dos señales adicionales, además, en RMN de ¹H se observa una notable diferencia en el desplazamiento de H-7, pues en **3a** se observa en 4.64 ppm, mientras que en **3** se observa en 5.66 ppm, debido a la mayor desprotección que produce el grupo acetato con respecto al OH.

Tabla 13. Comparación de RMN de ^1H y C^{13} del compuesto **3** con **3a**

Posición	δ_{C}		Tipo	δ_{H} (J en Hz)	
	3	3a		3	3a
1	123.8	124.4	CH	6.07, <i>da</i> (16.0)	6.07, <i>dd</i> (16.3, 3.4)
2	133.4	133.8	CH	6.35, <i>d</i> (11.4)	6.35, <i>dd</i> (11.7, 3.4)
3	121.6	122.0	CH	6.12, <i>d</i> (11.5)	6.15, <i>dd</i> (11.7)
4	124.9	152.9	C		
5	151.9	125.2	C		
6 β	33.1	35.4	CH ₂	3.57, <i>ta</i> (12.7)	3.73, <i>dd</i> (14.1, 13.2)
6 α				2.64, <i>dd</i> (13.7, 6.1)	2.60, <i>dd</i> (14.1, 5.3)
7	70.9	71.0	CH	5.66, <i>ddd</i> (12.2, 6.1, 2.2)	4.64, <i>ddd</i> (13.2, 5.3, 2.0)
8	46.4	48.0	CH	2.67, <i>sa</i>	2.50, <i>d</i> (2.0)
9	39.1	39.3	C		
10	140.6	141.0	CH	6.04, <i>da</i> (16.0)	6.00, <i>d</i> (16.3)
11 β	45.0	45.7	CH ₂	2.14, <i>da</i> (14.1)	2.13, <i>dd</i> (14.8, 3.0)
11 α				1.95, <i>dd</i> (14.7, 12.0)	1.94, <i>dd</i> (14.8, 12.3)
12	70.2	71.4	CH	5.34, <i>dd</i> (12.0, 2.9)	5.33, <i>dd</i> (12.3, 3.0)
13	123.5	123.2	C		
14	108.4	108.7	CH	6.38, <i>sa</i>	6.40, <i>ma</i>
15	143.9	144.4	CH	7.40, <i>t</i> (1.6)	7.42, <i>ma</i>
16	140.0	140.3	CH	7.43, <i>sa</i>	7.47, <i>ma</i>
17	170.9	175.3	C		
18	174.6	174.8	C		
19 <i>pro S</i>	71.8	72.0	CH ₂	4.85, <i>d</i> (18.1)	4.71
19 <i>pro R</i>				4.74, <i>d</i> (18.0)	4.70
20	23.5	24.5	CH ₃	1.54, <i>s</i>	1.57, <i>s</i>
1'	170.1		C		
2'	21.1		CH ₃	2.09, <i>s</i>	

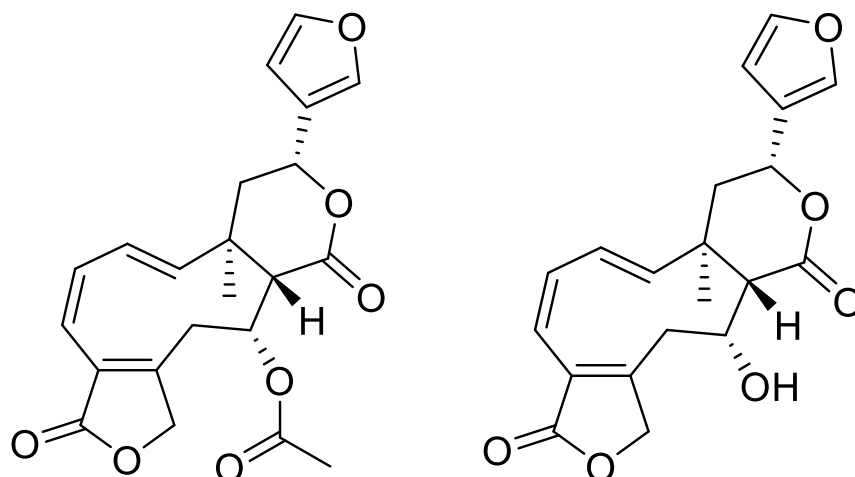
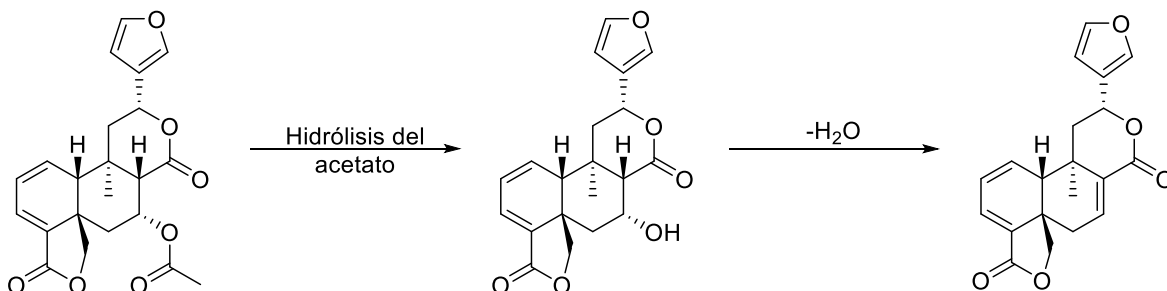


Figura 27. Compuesto **3** y (7*R*,8*S*,9*R*,12*R*)-7-hidroxi-5,10-*seco*-*neo*-cleroda-1(10),2,4,13-(16),14-pentaeno-17,12;18,19-diólida (**3a**)

Después del análisis que condujo a la elucidación estructural de **3**, se concluyó que se trata de un compuesto nuevo de tipo 5,10-*seco*-*neo*-clerodano correspondiente a la (7*R*,8*S*,9*R*,12*R*)-7-acetoxi-5,10-*seco*-*neo*-cleroda-1(10),2,4,13-(16),14-pentaeno-17,12;18,19-diólida y se propone el nombre de involucratina C.

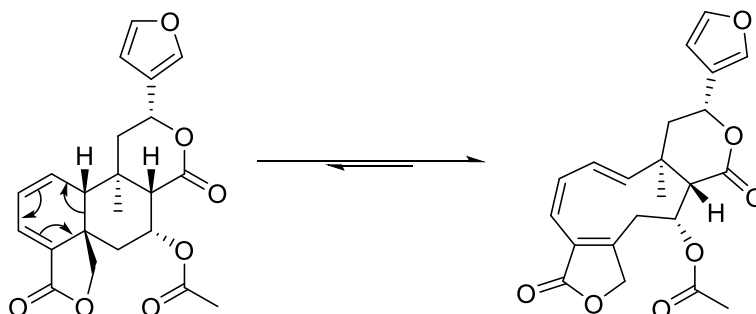
VI.4 Propuesta biogénica

Después del análisis que condujo a la identificación de estos tres nuevos compuestos (**1-3**), se proponen dos rutas biogénicas para la obtención de los compuestos **2** y **3** a partir de **1**, y las cuales se muestran a continuación (Esquemas 8 y 9).



Esquema 8. Biogénesis del compuesto **2** a partir de **1**

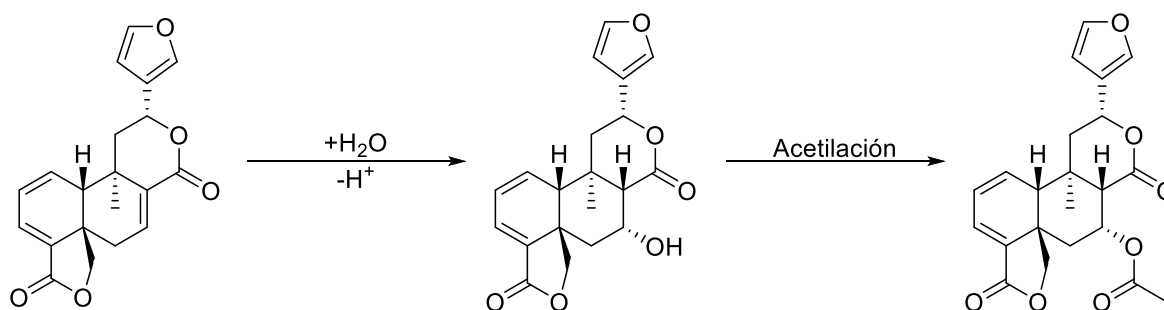
Llevando a cabo una hidrólisis del grupo acetato de la posición C-7 se obtiene un alcohol, que mediante su posterior eliminación mediante la pérdida de una molécula de agua se obtiene la involucratina B (**2**).



Esquema 9. Biogénesis del compuesto **3** a partir de **1**

Para la obtención de la involucratina C se propone una ruptura del enlace que une a los carbonos C-5 y C-10, mediante una reacción electrocíclica.

Si bien ambas rutas son químicamente viables y explican cómo *Salvia involucrata* pudo haber biosintetizado los compuestos **2** y **3**, se propone también otra ruta en la que la involucratina B (**2**) da origen al compuesto **1** (esquema 10) y este a su vez a **3**, como mostró en el esquema 9.



Esquema 10. Biogénesis del compuesto **1** a partir de **2**

En esta propuesta se hidrata el doble enlace entre C-7 y C-8 para dar un alcohol secundario (reacción anti-Marcovnikov) con orientación α , posteriormente se acetila el alcohol recién formado y se obtiene el compuesto **1**.

VII. CONCLUSIONES

1. Del estudio de las hojas de *Salvia involucrata* se aislaron e identificaron tres diterpenos de estructura novedosa con esqueletos de tipo *neo-clerodano*, con lo que se contribuye al conocimiento sobre la composición química de especies del género *Salvia* en México, como parte del proyecto del estudio sistemático de este género que inició en el año 1984 en el Instituto de Química de la UNAM.
2. Se realizó la caracterización completa de los compuestos aislados.
3. Se estableció la configuración relativa de los tres compuestos aislados mediante el análisis del experimento NOESY y el análisis de las constantes de acoplamiento observadas en RMN de ^1H , conjuntamente, se tomaron en cuenta cuestiones biosintéticas para apoyar y reforzar la configuración propuesta.
4. Se propusieron rutas biogénicas que respaldan la relación estructural entre los compuestos aislados.
5. Se realizó la asignación completa de los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C para los compuestos aislados.
6. Se identificó por primera vez la presencia de diterpenos con esqueleto tipo *cis-neo-clerodano* en una especie mexicana de *Salvia*.

VIII. REFERENCIAS

- ¹ Martínez-Gordillo M, Fragoso-Martínez I, García-Peña M, Montiel O. 2013. Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 84(1): 30-86.
- ² Cronquist A. 1981. *An integrated system of classification of flowering plant*. Columbia University Press, New York. pp 924-927.
- ³ Kuhnt M, Pröbstle A, Rimpler H, Bauer R, Heinrich M. 1995. Biological and pharmaceutical activities and further constituents of *Hyptis verticillata*. *Planta Med* (61): 227-232.
- ⁴ Sun HD, Huang SX, Han QB. 2006. Diterpenoids from *Isodon* species and their biological activities. *Nat Prod Rep* 23(5): 673-698.
- ⁵ Rodríguez-Hahn L, Esquivel B, Cárdenas J. 1994. Clerodane diterpenes in Labiatae. *Prog Chem Org Nat Prod* 63: 107-196.
- ⁶ Wu YB, Ni ZY, Shi QW, Dong M, Kiyota H, Gu YC, Cong B. 2012. Constituents from *Salvia* species and their biological activities. *Chem Rev* 112(11): 5967-6026. Ver también referencia 5.
- ⁷ Shang X, He X, Li M, Zhang R, Fan P, Zhang Q, Jia Z. 2010. The genus *Scutellaria* an ethnopharmacological and phytochemical review. *J Ethnopharmacol* 128(2): 279-313.
- ⁸ Tundis R, Peruzzi L, Menichini F. 2014. Phytochemical and biological studies of *Stachys* species in relation to chemotaxonomy: a review. *Phytochemistry* 102: 7-39. Ver también referencia 5.
- ⁹ Saraswati, Katnoria JK, Nagpal AK. 2016. Analytical techniques for phytochemicals screening and bioactivities of some *Coleus* species: a review. *J of Pharm Sci and Res* 8(4): 227-237.
- ¹⁰ [Distribución de la familia Lamiaceae en México]. (s.f.). Recuperado 3 octubre, 2019, de https://www.naturalista.mx/observations?place_id=6793
- ¹¹ Domínguez-Vázquez G, Castro-Ramírez A. 2002. Usos medicinales de la familia Labiatae en Chiapas, México. *Etnobiología* 2: 19-31.
- ¹² Baldomero Esquivel Rodríguez. El Departamento de Productos Naturales del Instituto de Química de la UNAM. Setenta y dos años de aportaciones relevantes a

la química mundial. En “Aportaciones Recientes a la Historia de la Química en México”. María de la Paz Ramos Lara y Felipe León Olivares, coordinadores. 287-303, Universidad Nacional Autónoma de México, 2014.

¹³ [Distribución del género *Salvia* en México]. (s.f.). Recuperado 8 octubre, 2019, de https://www.naturalista.mx/observations?place_id=6793&taxon_id=50644

¹⁴ Esquivel B. 2017. Contribución al estudio químico sistemático del género *Salvia* (Lamiaceae) en México (Tesis doctoral). Instituto de Química, UNAM, México.

¹⁵ Wu YB, Ni ZY, Shi QW, Dong M, Kiyota H, Gu YC, Cong B. 2012. Constituents from *Salvia* species and their biological activities. *Chem Rev* 112(11): 5967-6026.

¹⁶ Rustaiyan A, Niknejad A, Nazarians L, Jakupovic J, Bohlmann F. 1982. Naturally occurring terpene derivatives. Part 403. Sesterterpenes from *Salvia hypoleuca*. *Phytochemistry* 21(7): 1812-1813.

¹⁷ Moghaddam FM, Zaynizadeh B, Rueedi P. 1995. Salvileucolide methyl ester, a sesterterpene from *Salvia sahendica*. *Phytochemistry* 39(3): 715-716.

¹⁸ Farimani MM, Taleghani A, Aliabadi A, Aliahmadi A, Esmaeili MA, Namazi-Sarvestani N, Khavasi HR, Smiesko M, Hamburger M, Nejad-Ebrahimi S. 2016. Labdane Diterpenoids from *Salvia leriifolia*: Absolute Configuration, antimicrobial and cytotoxic activities. *Planta Med* 82(14): 1279-1285.

¹⁹ Rodríguez-Hahn L, Esquivel B, Cárdenas J. 1995. Neo-clerodane diterpenoids from American *Salvia* species. *Recent Advances in Phytochemistry* 29: 311-332.

²⁰ Esquivel B, Sánchez AA, Vergara F, Matus W, Hernández-Ortega S, Ramírez-Apan MT. 2005. Abietane diterpenoids from the roots of some Mexican *Salvia* species (Labiatae): Chemical diversity, phylogeographical significance, and cytotoxic activity. *Chemistry & Biodiversity* 2(6): 738-747.

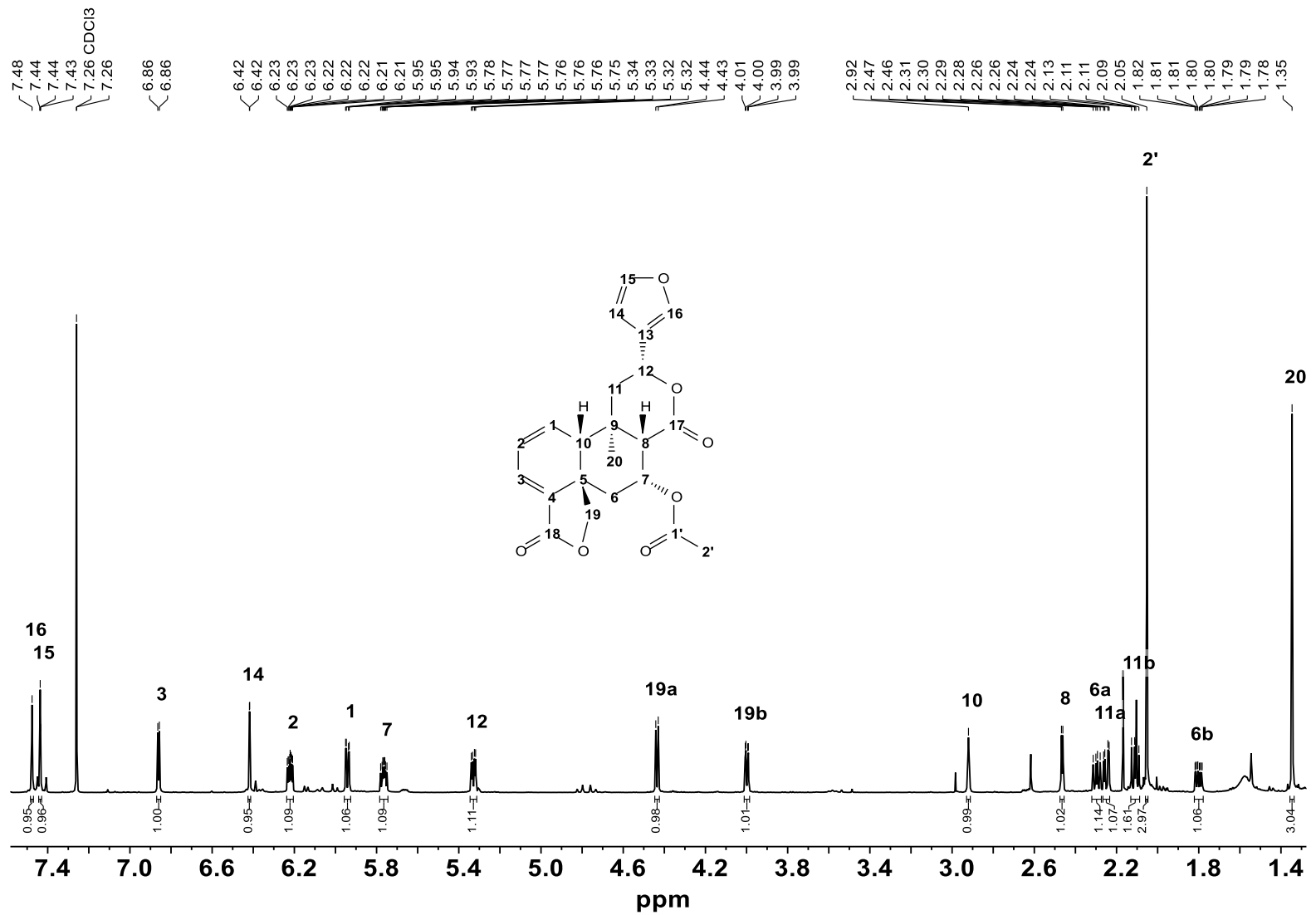
²¹ Touche EMG, López E, Reyes AP, Sánchez H, Honecker F, Achenbach H. 1997. Parryin, a diterpene with a tricyclic 6-7-5-ring system from *Salvia parryi*. *Phytochemistry* 45(2): 387-390.

²² Ruzicka L. 1953. Isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experienta* 9: 357-367.

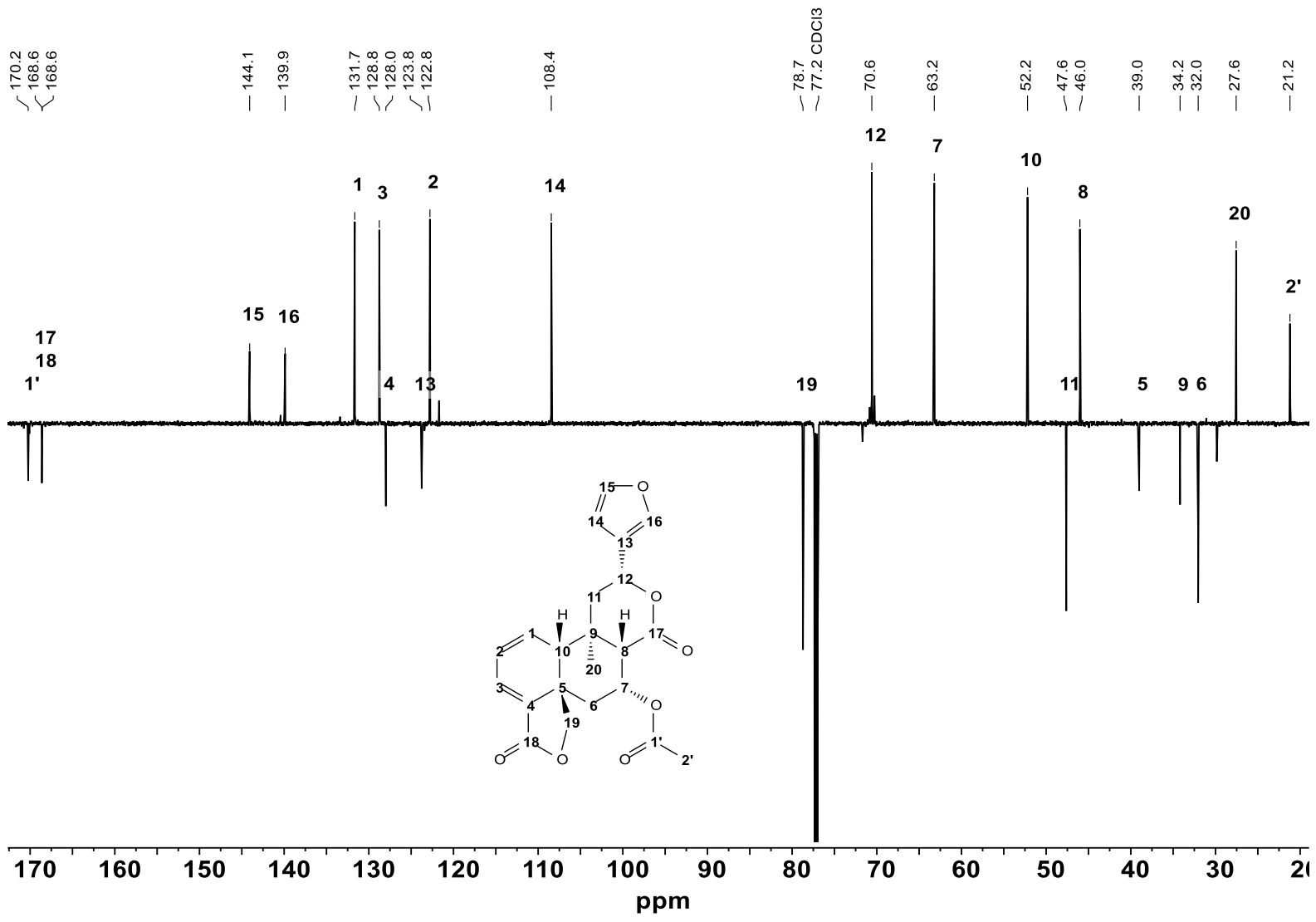
²³ Miziorko HM. 2011. Enzymes of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* 505(2): 131-143.

- ²⁴ Dewick PM. 2002. The biosynthesis of C5-C25 terpenoid compounds. *Nat Prod Rep* 19(2): 181-222.
- ²⁵ Li R, Morris-Natschke SL, Lee KH. 2016. Clerodane diterpenes: sources, structures, and biological activities. *Nat Prod Rep* 33(10): 1166-1226.
- ²⁶ Jiménez M, Moreno ED, Díaz E. 1978. Diterpenos de la *Salvia gesnerifolia* L. Estructuras de la gesnerofolinas A y B. *Rev Latinoam Quim* 10: 166-171.
- ²⁷ Esquivel B, Cárdenas J, Ramamoorthy TP, Rodríguez-Hahn L. 1986. Clerodane diterpenoids of *Salvia lineata*. *Phytochemistry* 25(10): 2381-2384.
- ²⁸ Pretsch E, Clerc T, Seibl J, Simon W. 1980. *Tablas para la elucidación estructural de compuestos orgánicos por métodos espectroscópicos*. Ciudad de México, México: Alhambra Mexicana, S. A.
- ²⁹ Dickschat JS. 2019. Bacterial Diterpene Biosynthesis. *Angew Chem Int Ed* 58(45): 15964-15976.
- ³⁰ Rogers D, Unal GG, Williams DJ, Ley SV, Sim GA, Joshi BS, Ravindranath KR. 1979. The crystal structure of 3-epicaryoptin and the reversal of the currently accepted absolute configuration of clerodin. *J Chem Soc, Chem Commun* (3): 97-99.
- ³¹ Esquivel B, Flores EA. 2001. A new *neo*-clerodane diterpenoid from *Salvia gesneraeflora* (labiatae). *Heterocycles* 55(3): 505-509.
- ³² Bisio A, De Mieri M, Milella L, Schito AM, Parricchi A, Russo D, Alfei S, Lapillo M, Tuccinardi T, Hamburger M, De Tommasi N. 2017. Antibacterial and hypoglycemic diterpenoids from *Salvia chamaedryoides*. *J Nat Prod* 80(2): 503-514.

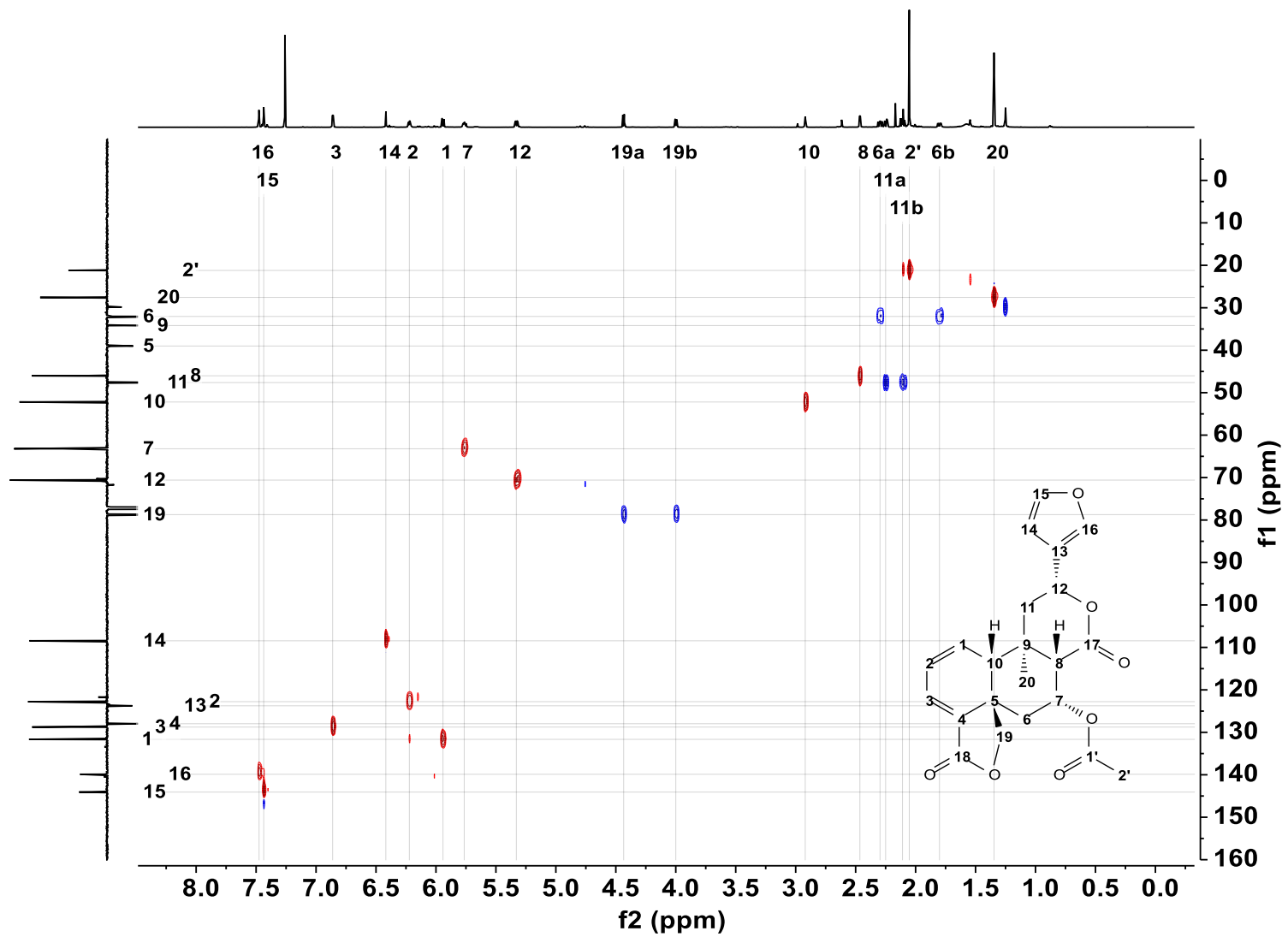
IX. ESPECTROS



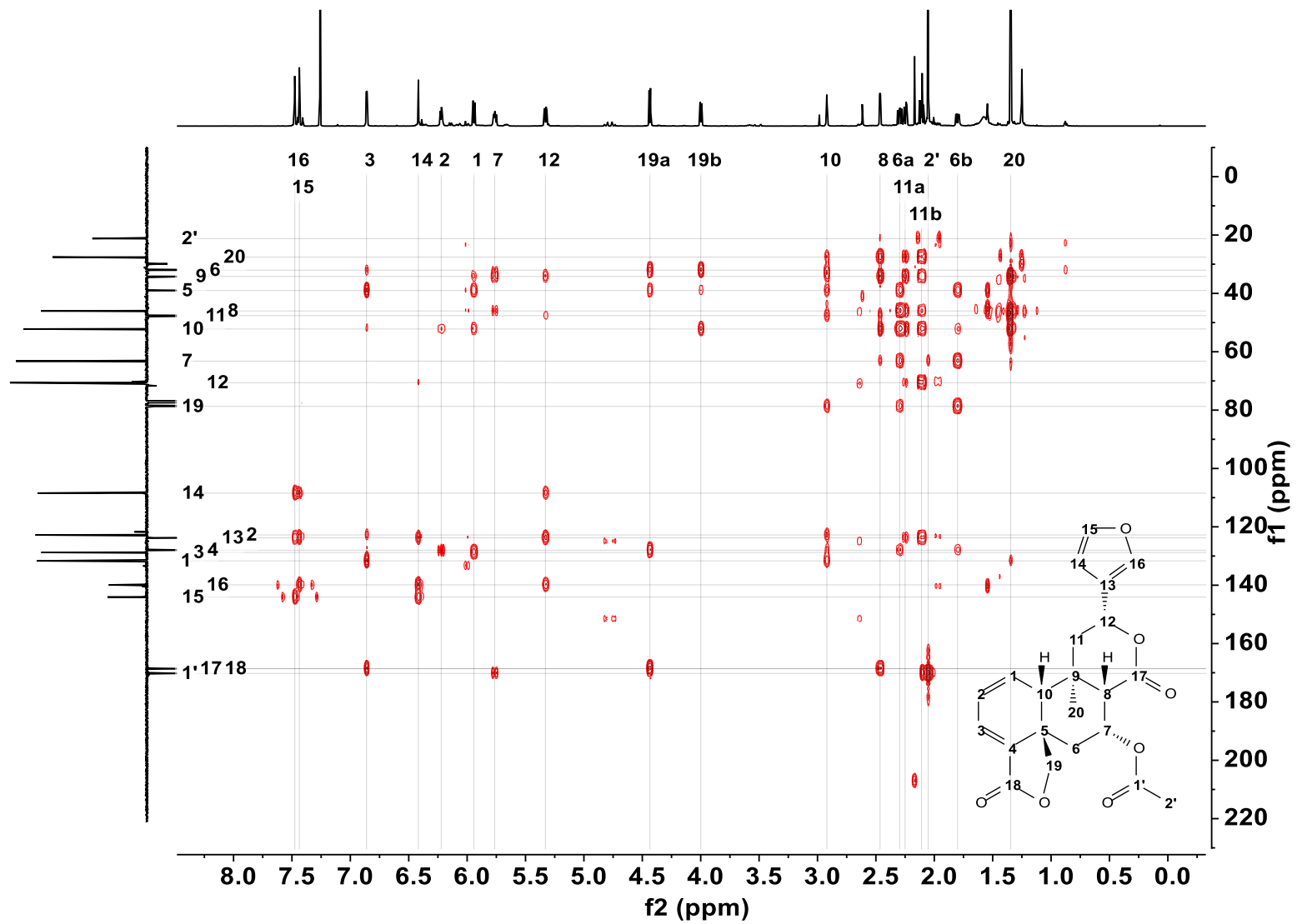
Espectro 1. RMN de ¹H del compuesto 1 (CDCl₃, 700 MHz).



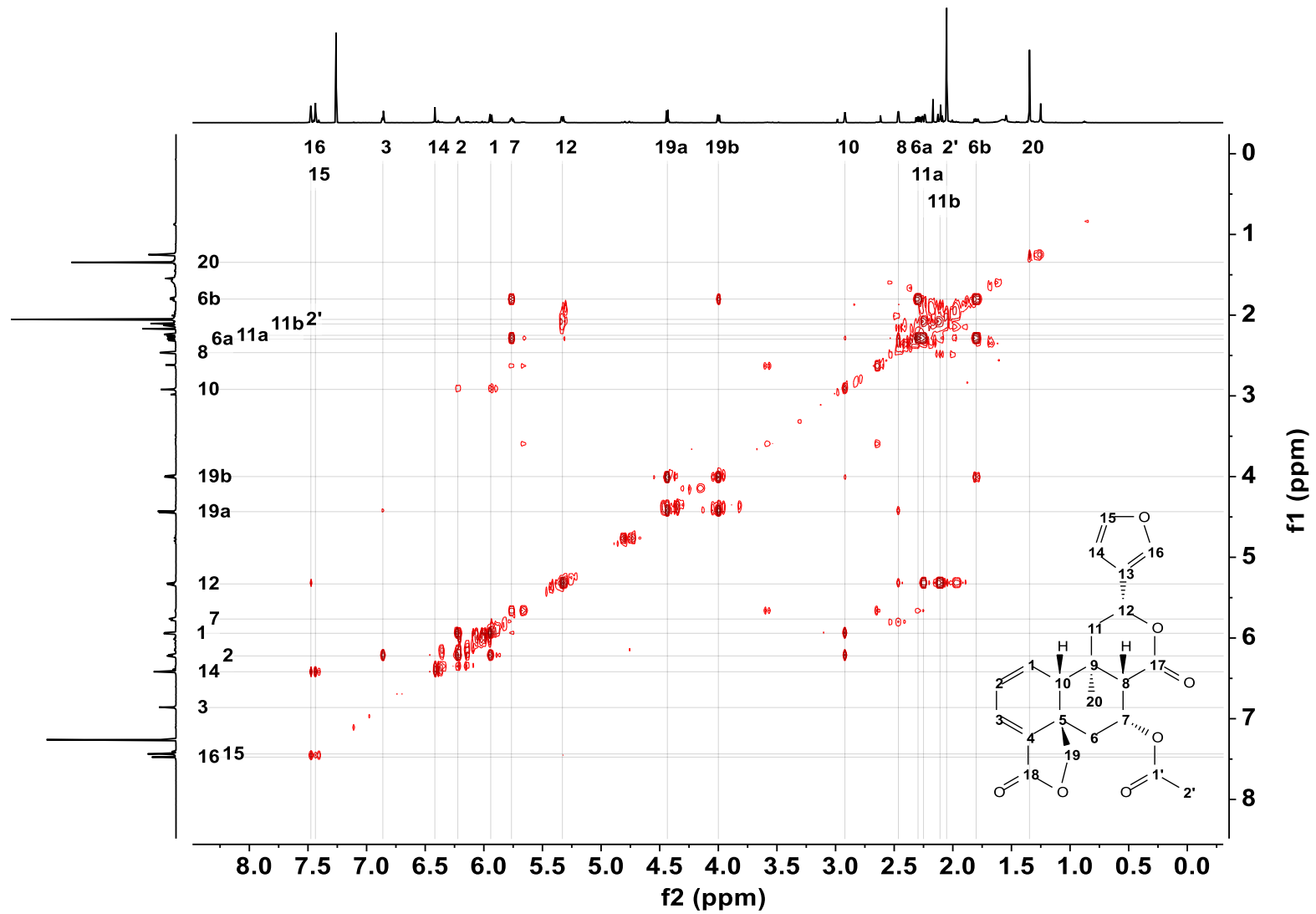
Espectro 1. APT del compuesto 1.



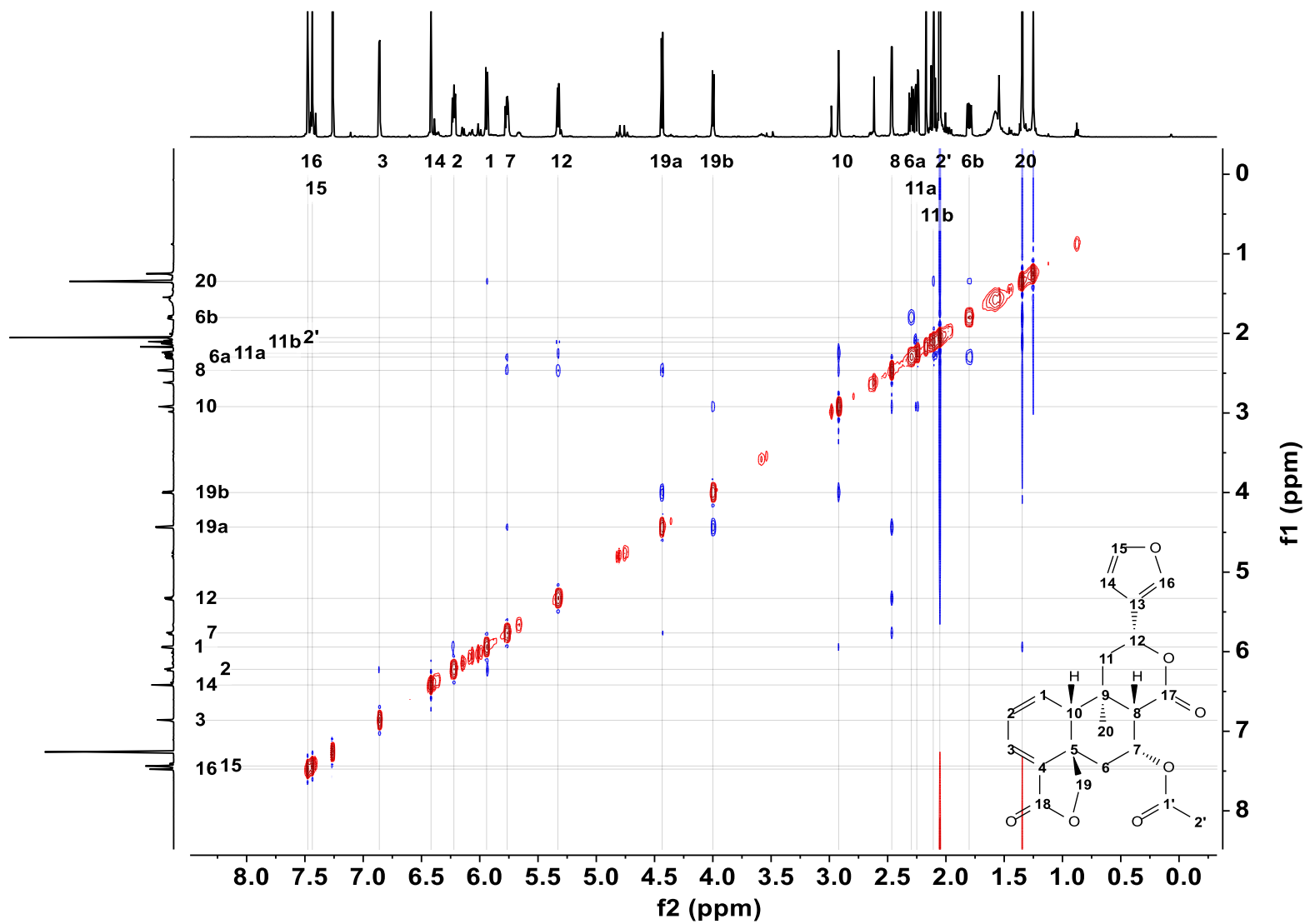
Espectro 2. HSQC del compuesto 1.



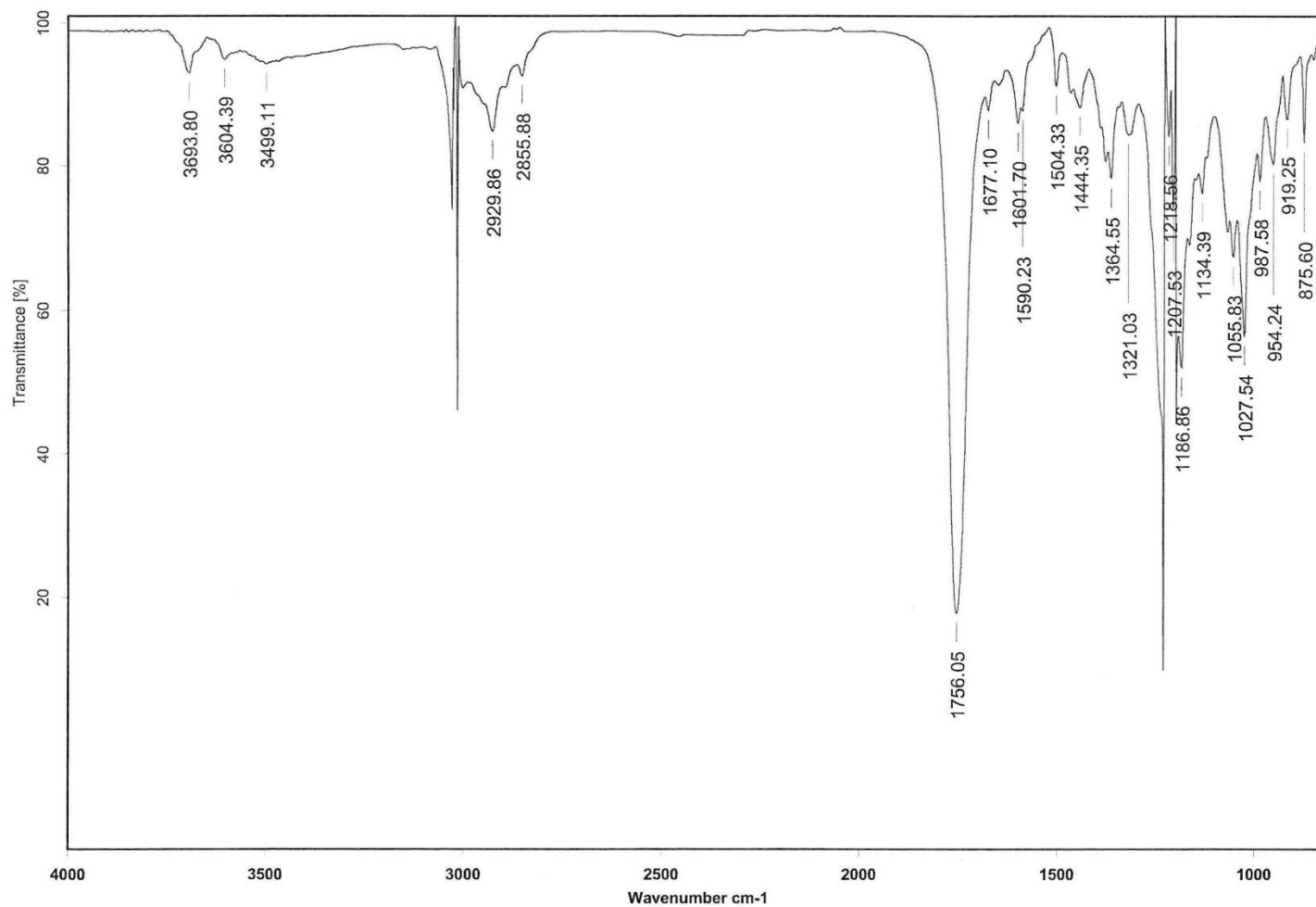
Espectro 3. HMBC del compuesto 1.



Espectro 5. COSY del compuesto 1.



Espectro 6. NOESY del compuesto 1.



Espectro 7. IR del compuesto 1 (CHCl₃).

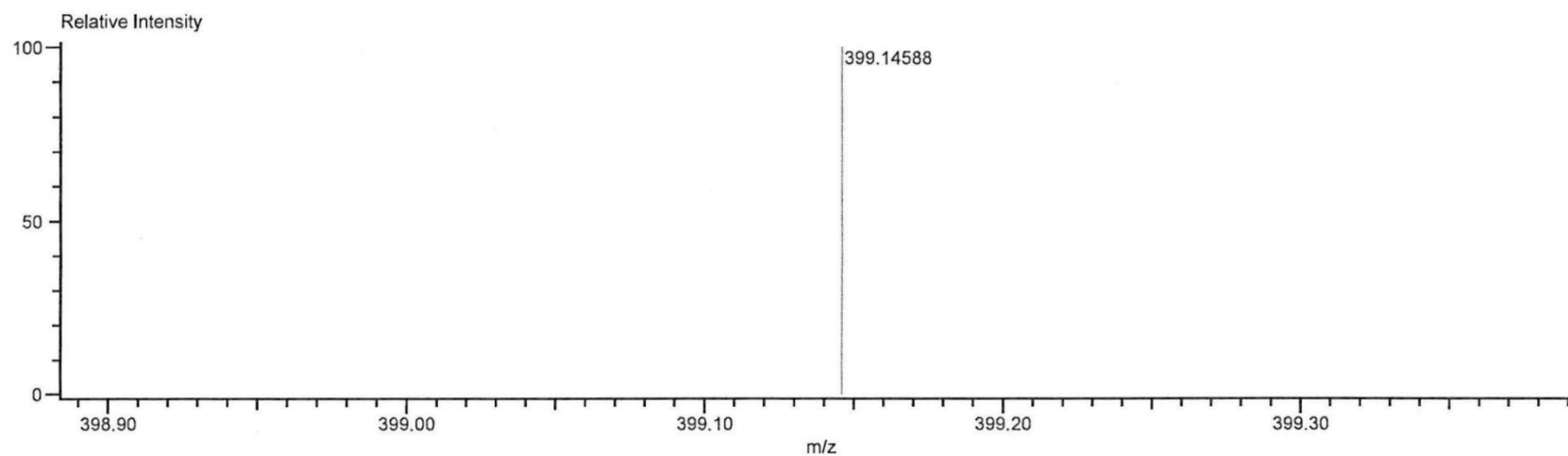
Ionization Mode: DART

History: Determine m/z [Peak Detect [Centroid, 30, Area]; Correct Base [1.0%]; Smooth [3]; Correct Base [5.0%]; Average... Created by: AccuTOF

Charge number: 1

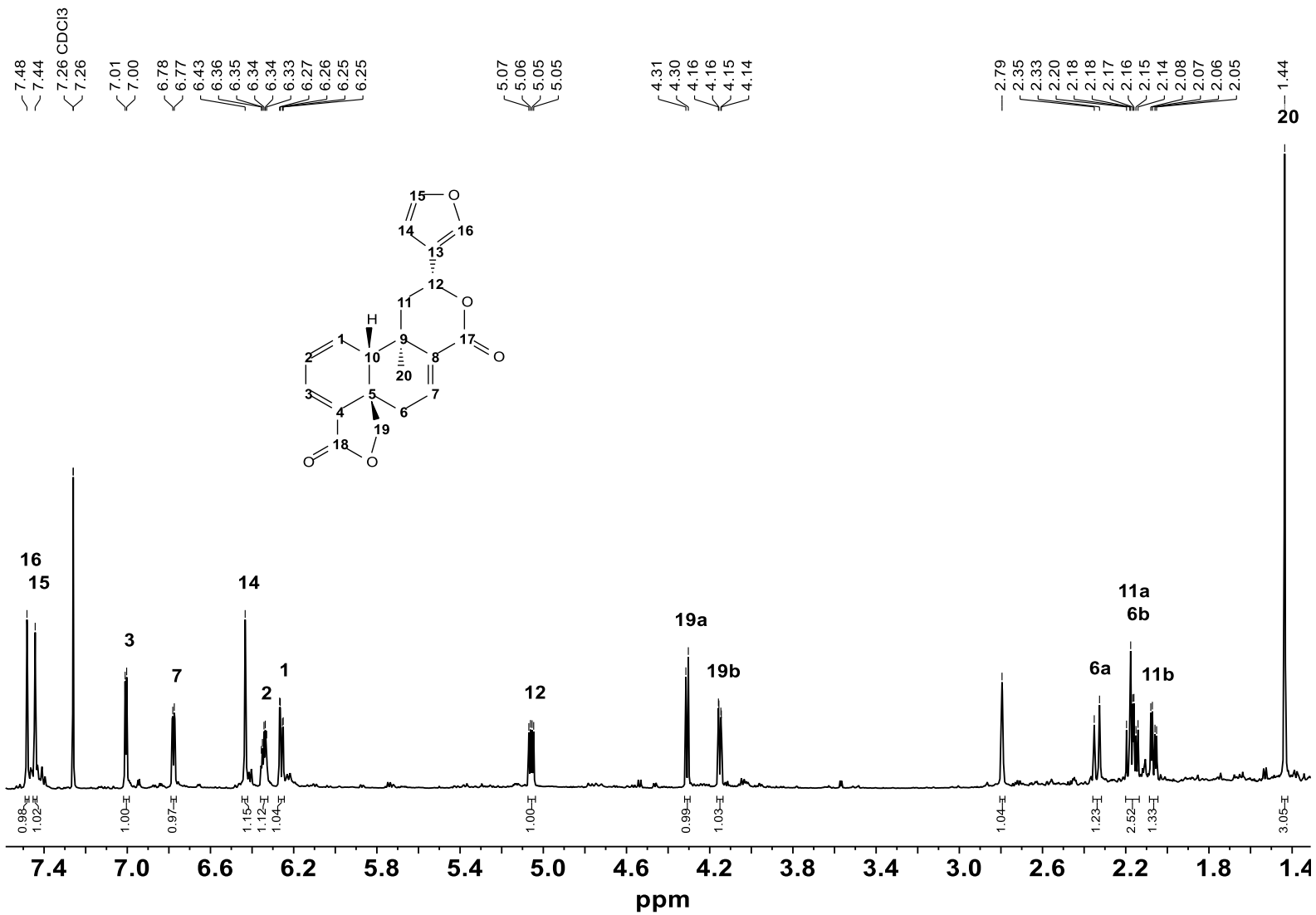
Tolerance: 20.00 (mmu)

Element: ^{12}C : 18 .. 25, ^1H : 20 .. 30, ^{16}O : 6 .. 9

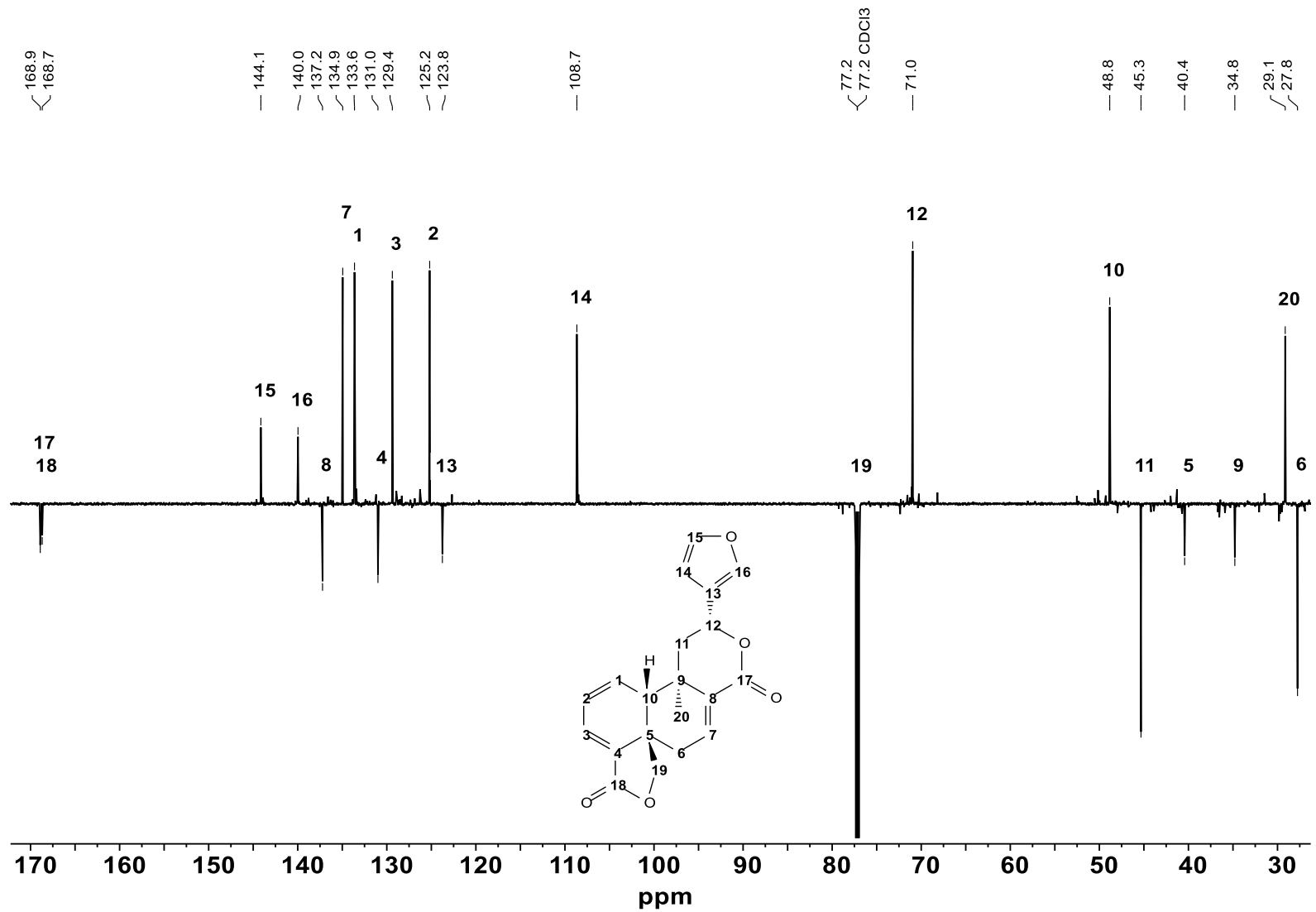


Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
399.14588	27431.16	399.14438	1.50	3.75	$^{12}\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{O}_7$	11.5

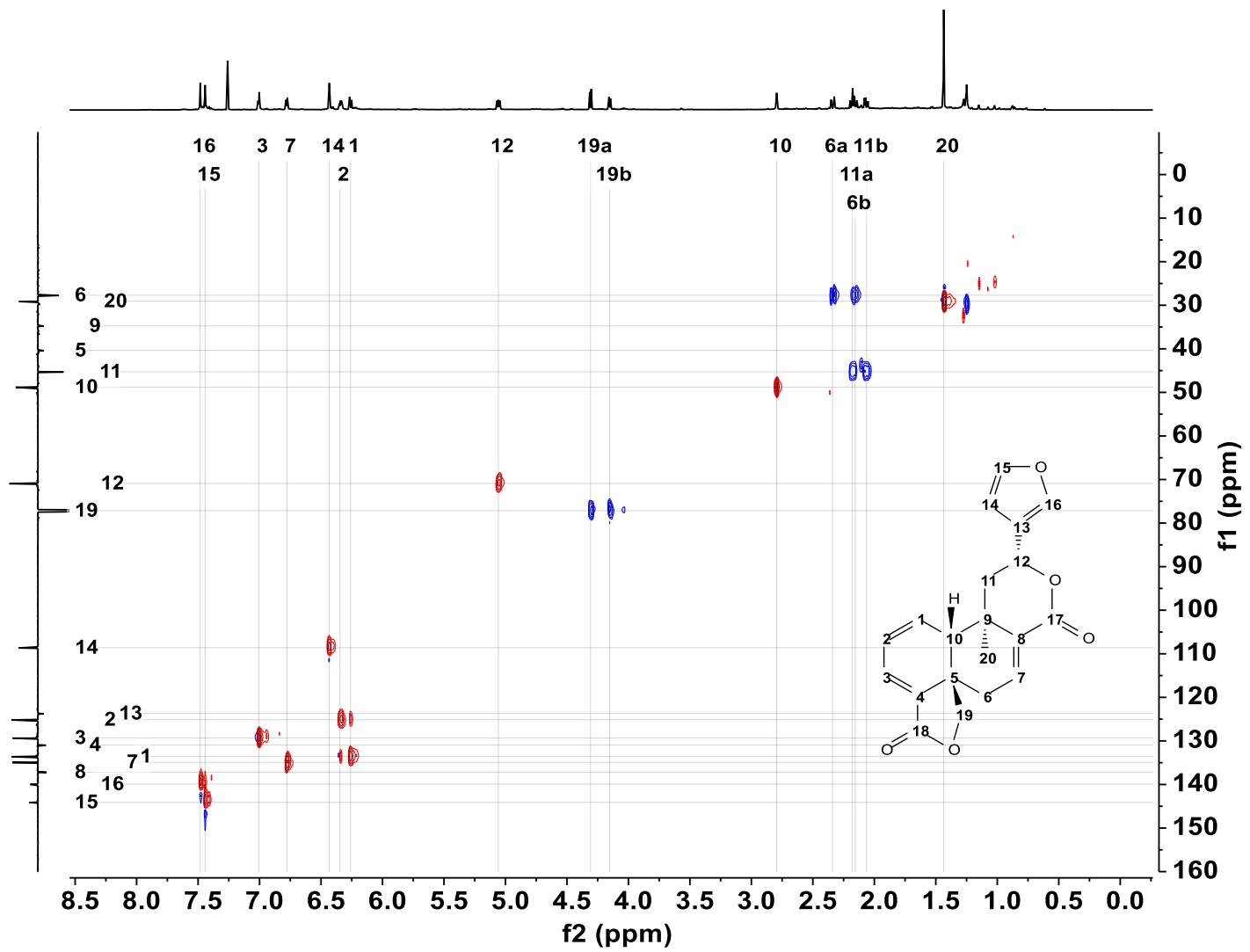
Espectro 8. Masas de alta resolución del compuesto 1 (EM-DART-AR).



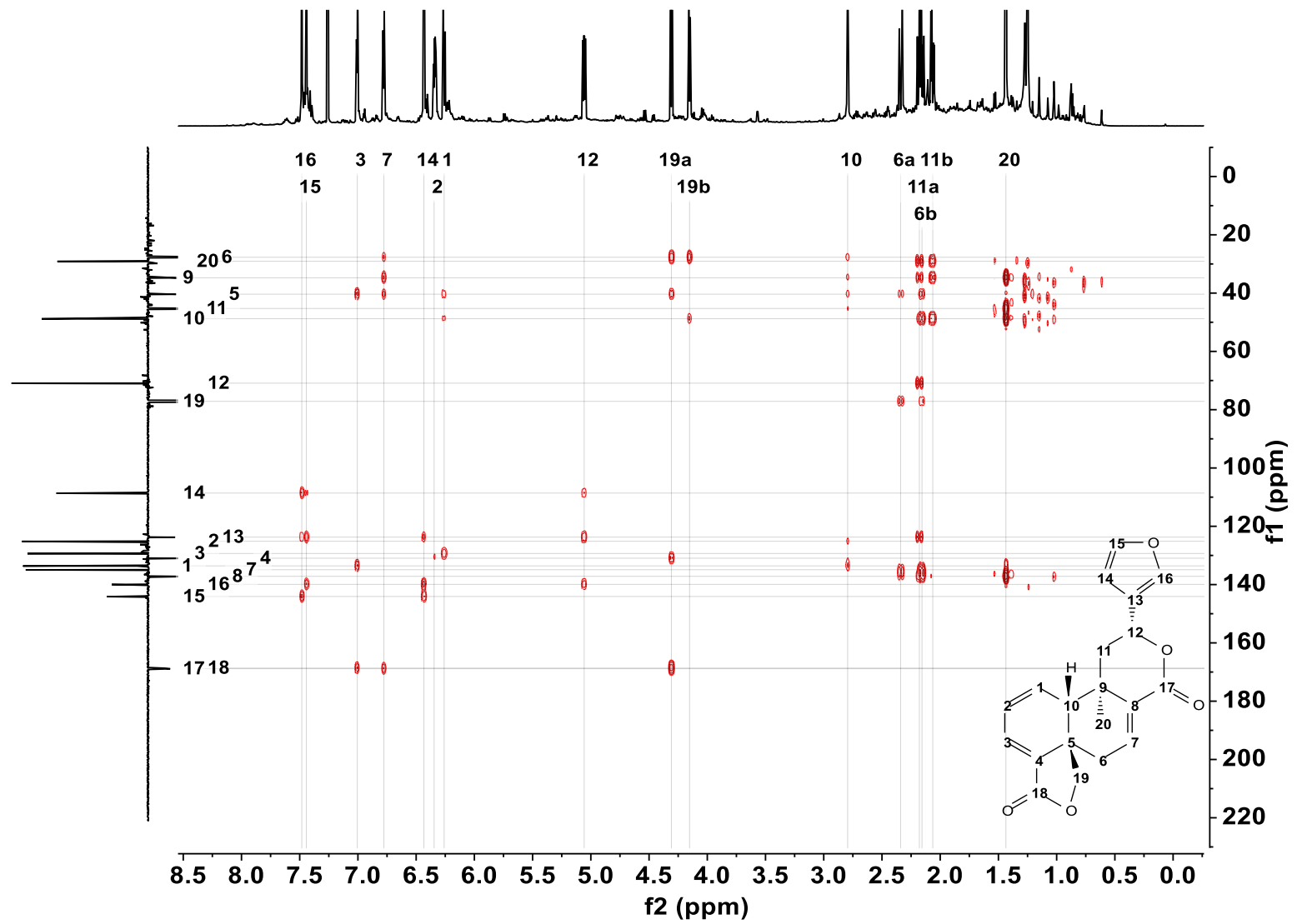
Espectro 9. RMN de ¹H del compuesto 2 (CDCl₃, 700 MHz).



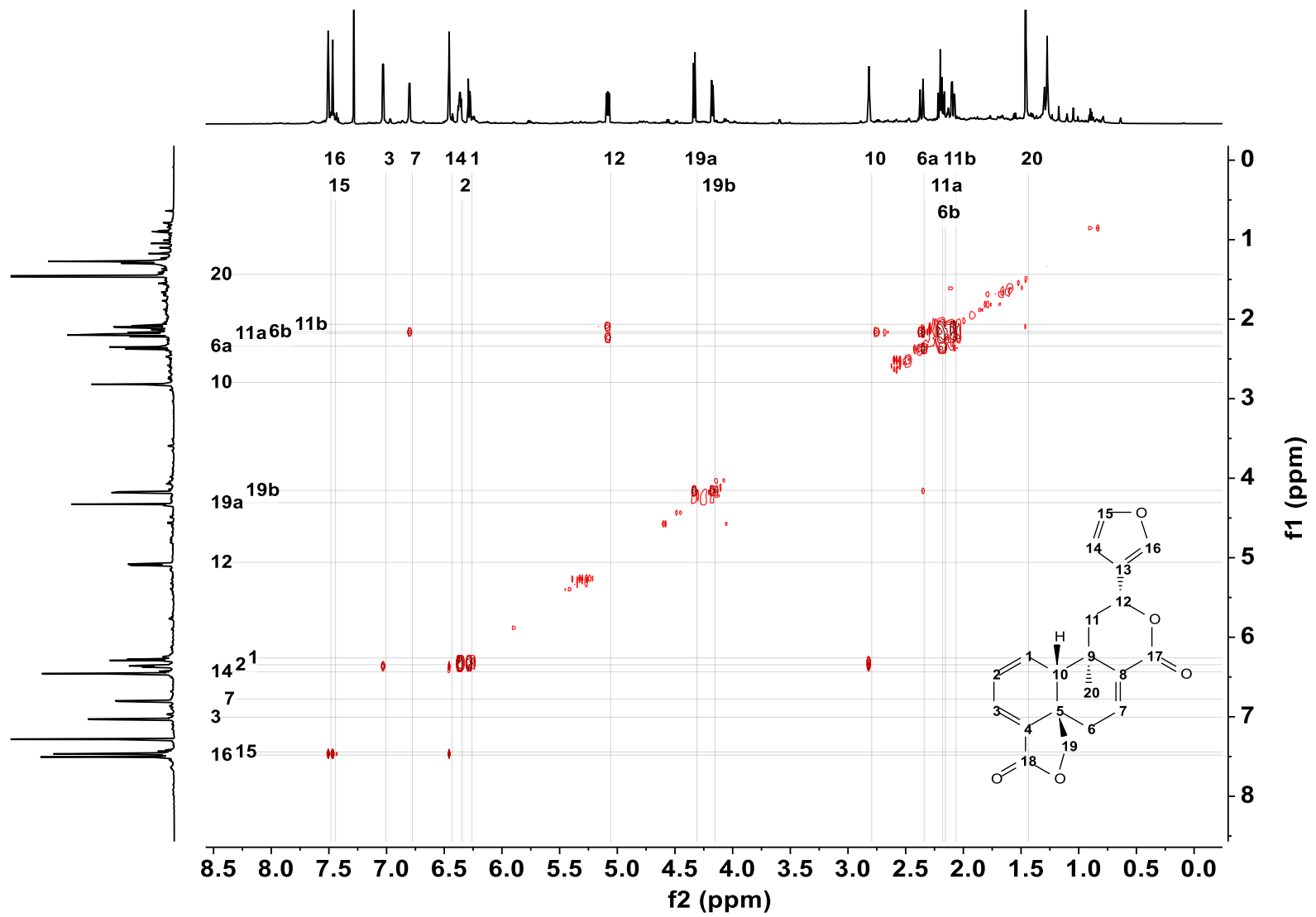
Espectro 10. APT del compuesto 2.

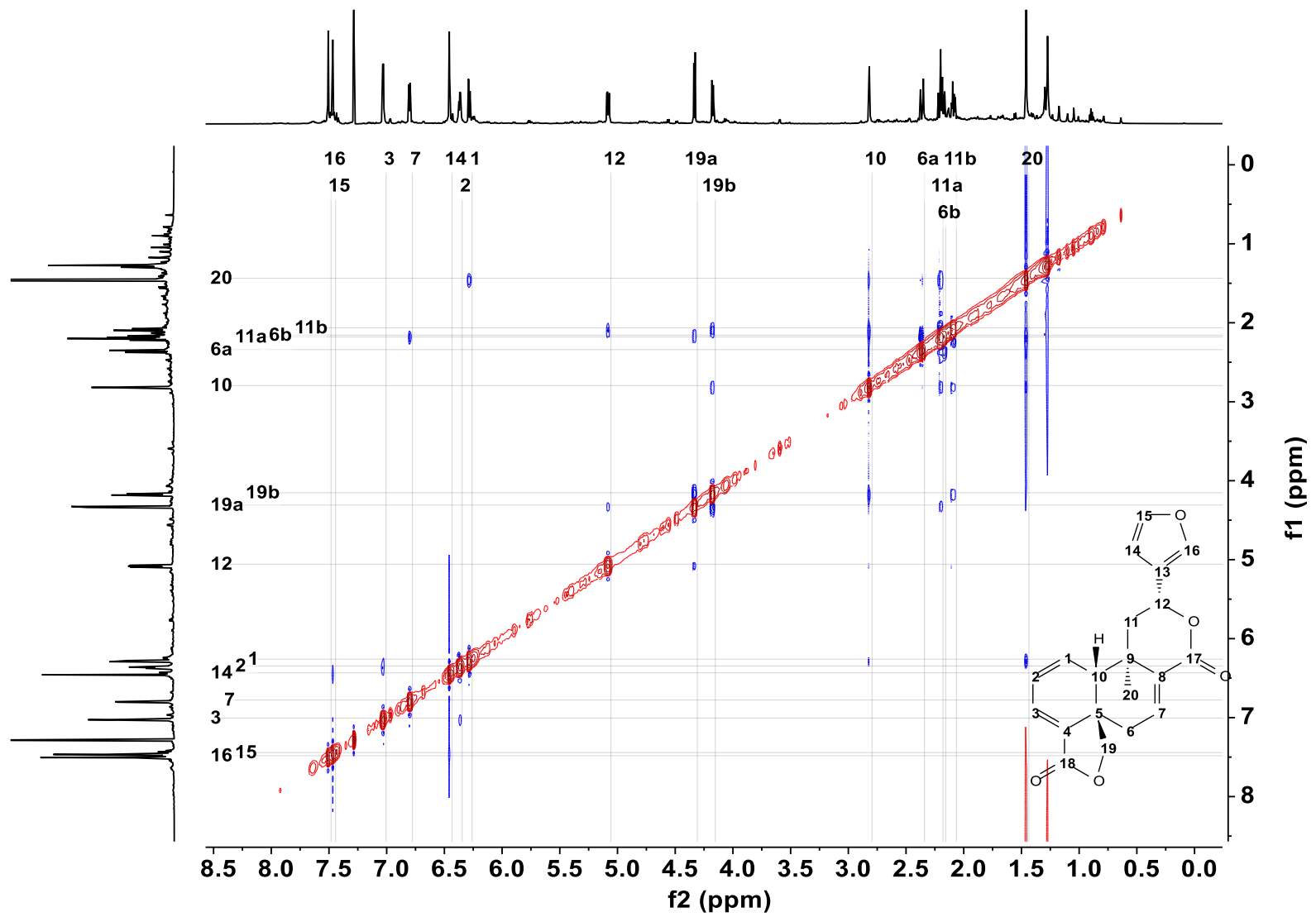


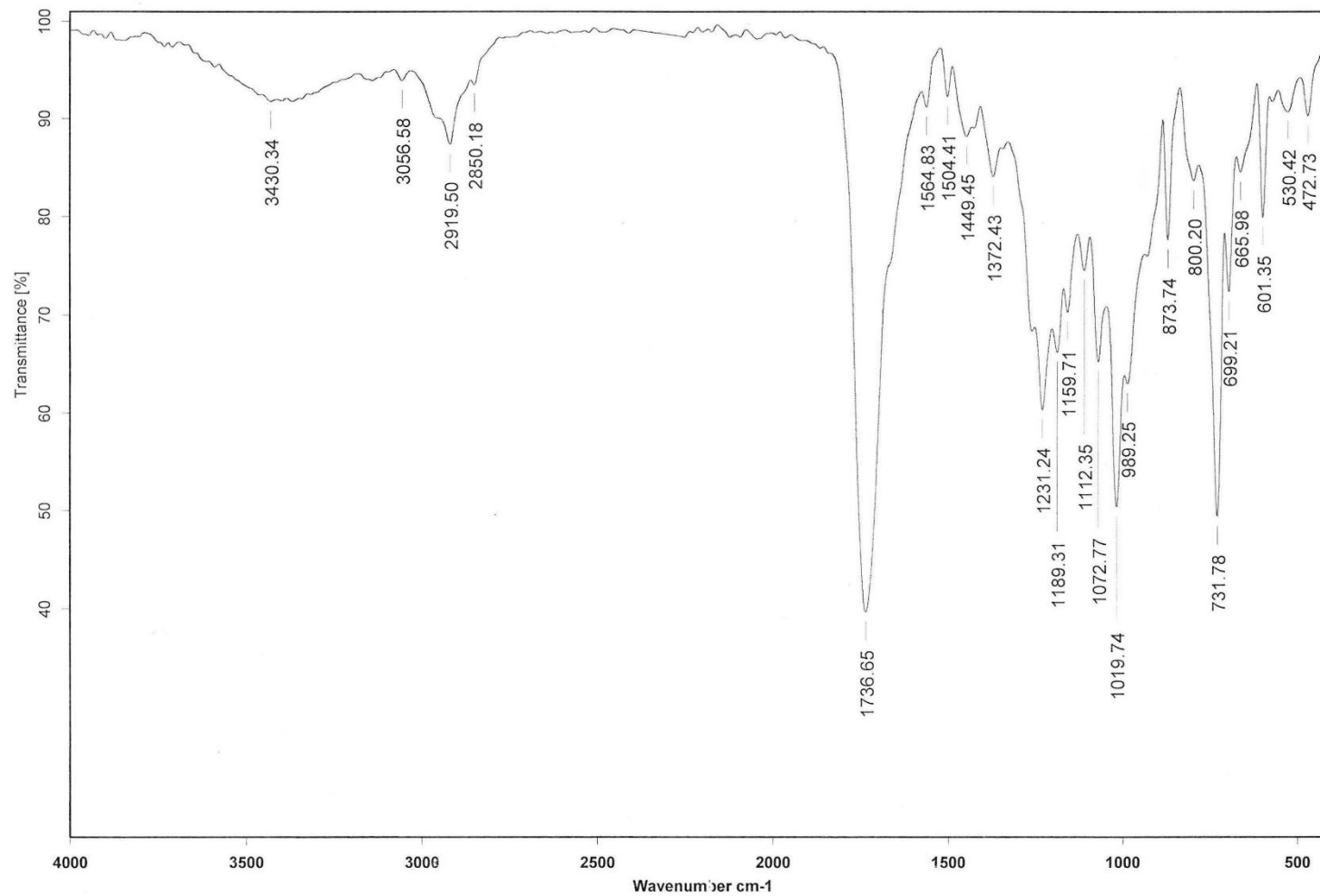
Espectro 11. HSQC del compuesto 2.



Espectro 12. HMBC del compuesto 2.







Espectro 15. IR del compuesto **2** (CHCl₃).

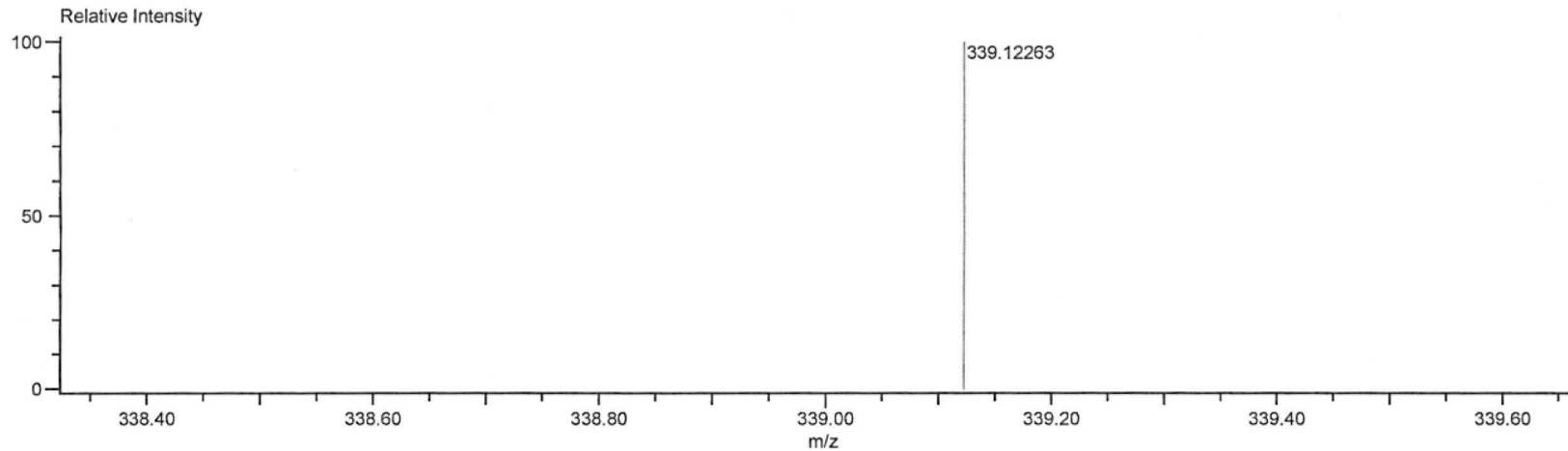
Ionization Mode:DART

History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area];Correct Base[];Smooth[5]];Correct Base[5.0%];Average(MS[... Created by:AccuTOF

Charge number:1

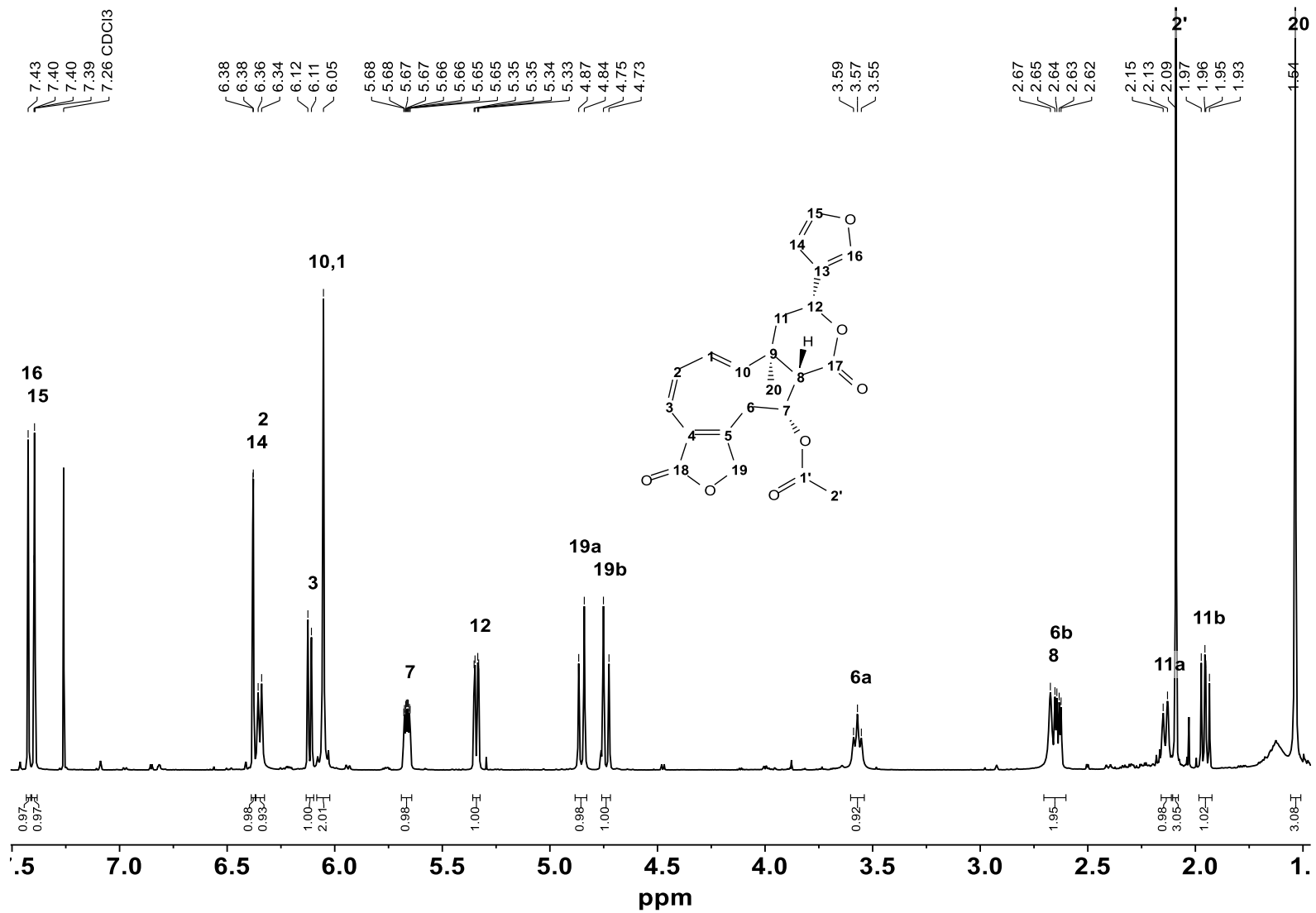
Tolerance:5.00(mmu)

Element:¹²C:18 .. 22, ¹H:16 .. 20, ¹⁶O:4 .. 8

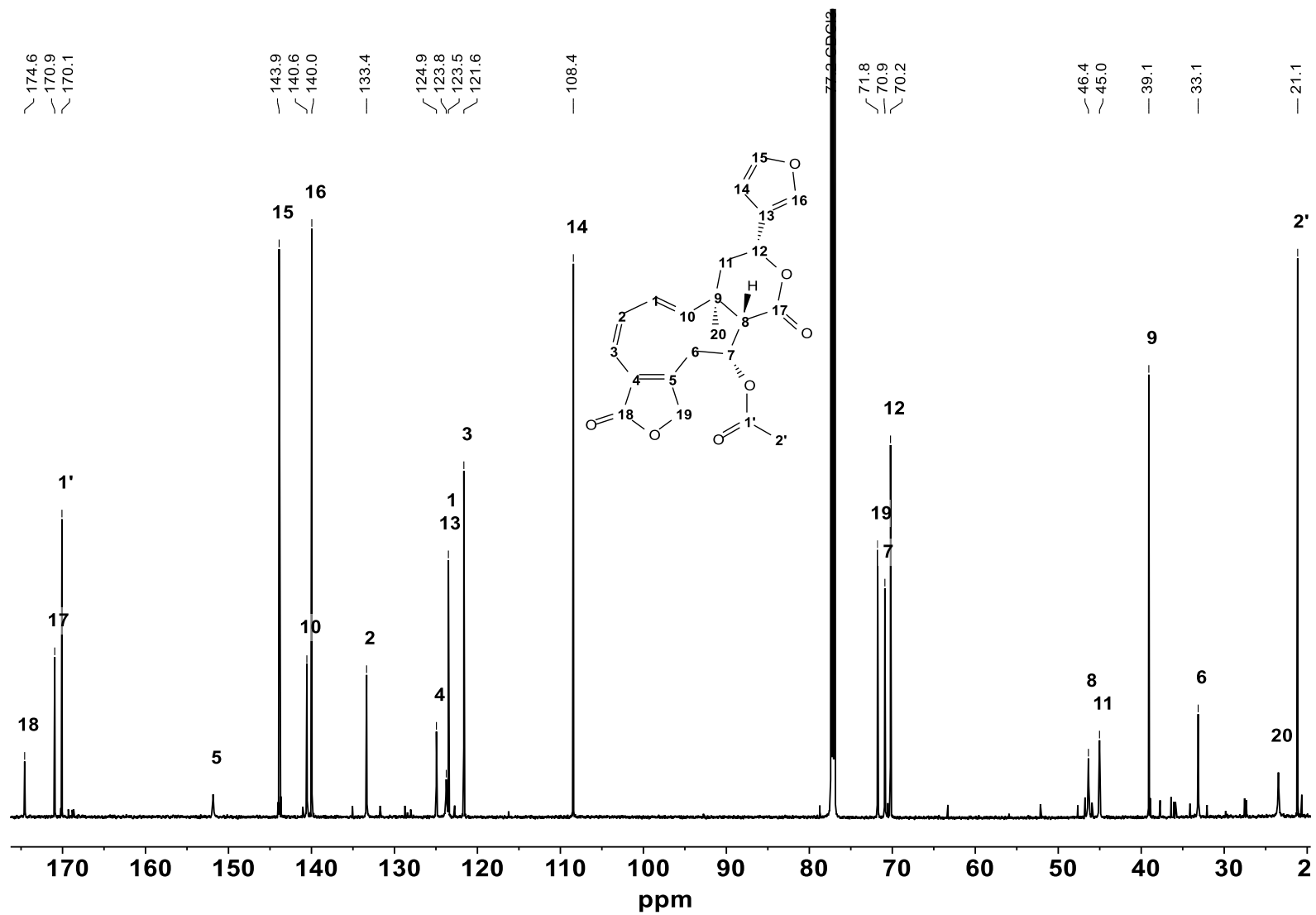


Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
339.12263	1863226.75	339.12325	-0.62	-1.83	¹² C ₂₀ ¹ H ₁₉ ¹⁶ O ₅	11.5

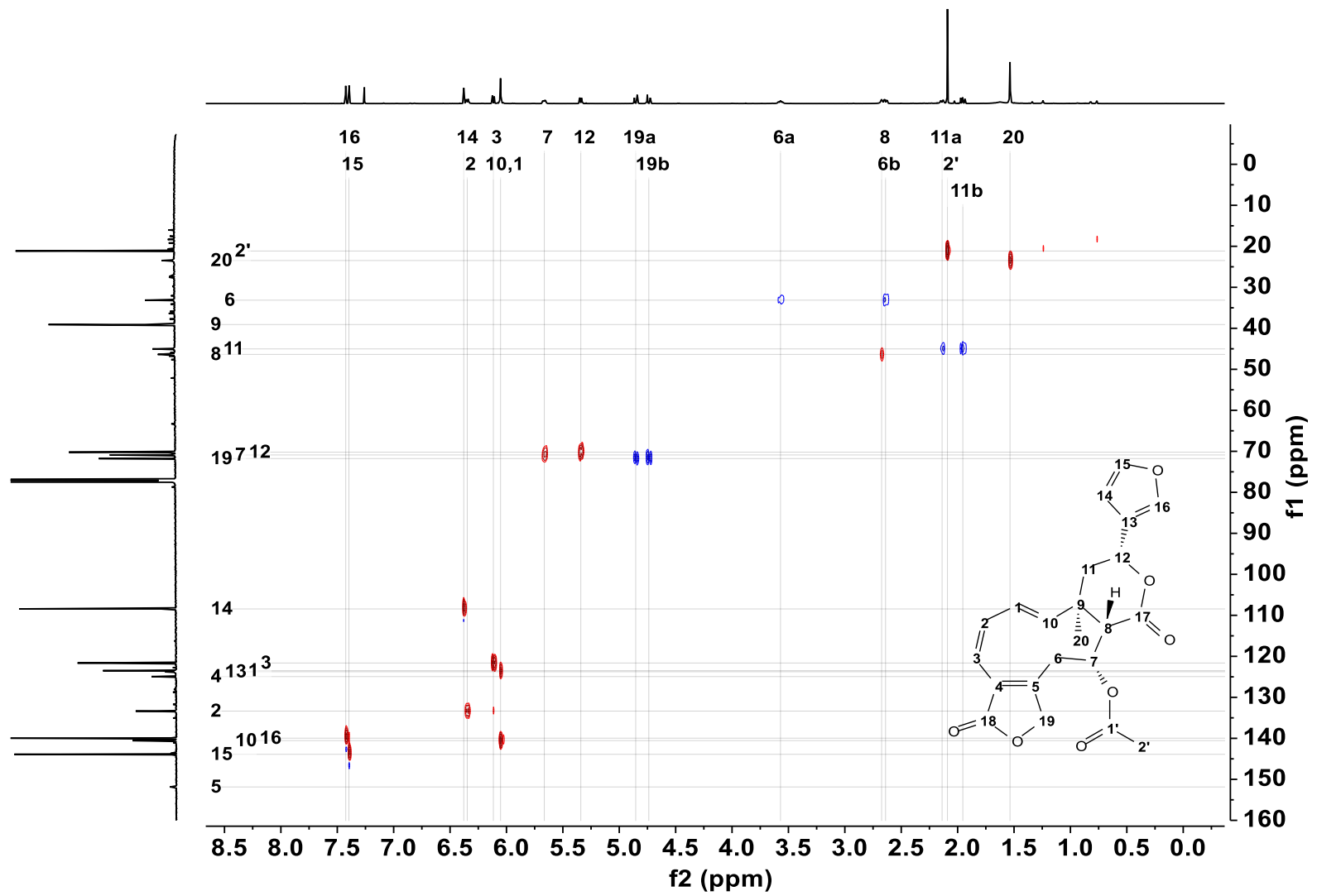
Espectro 16. Masas de alta resolución del compuesto **2** (EM-DART-AR).



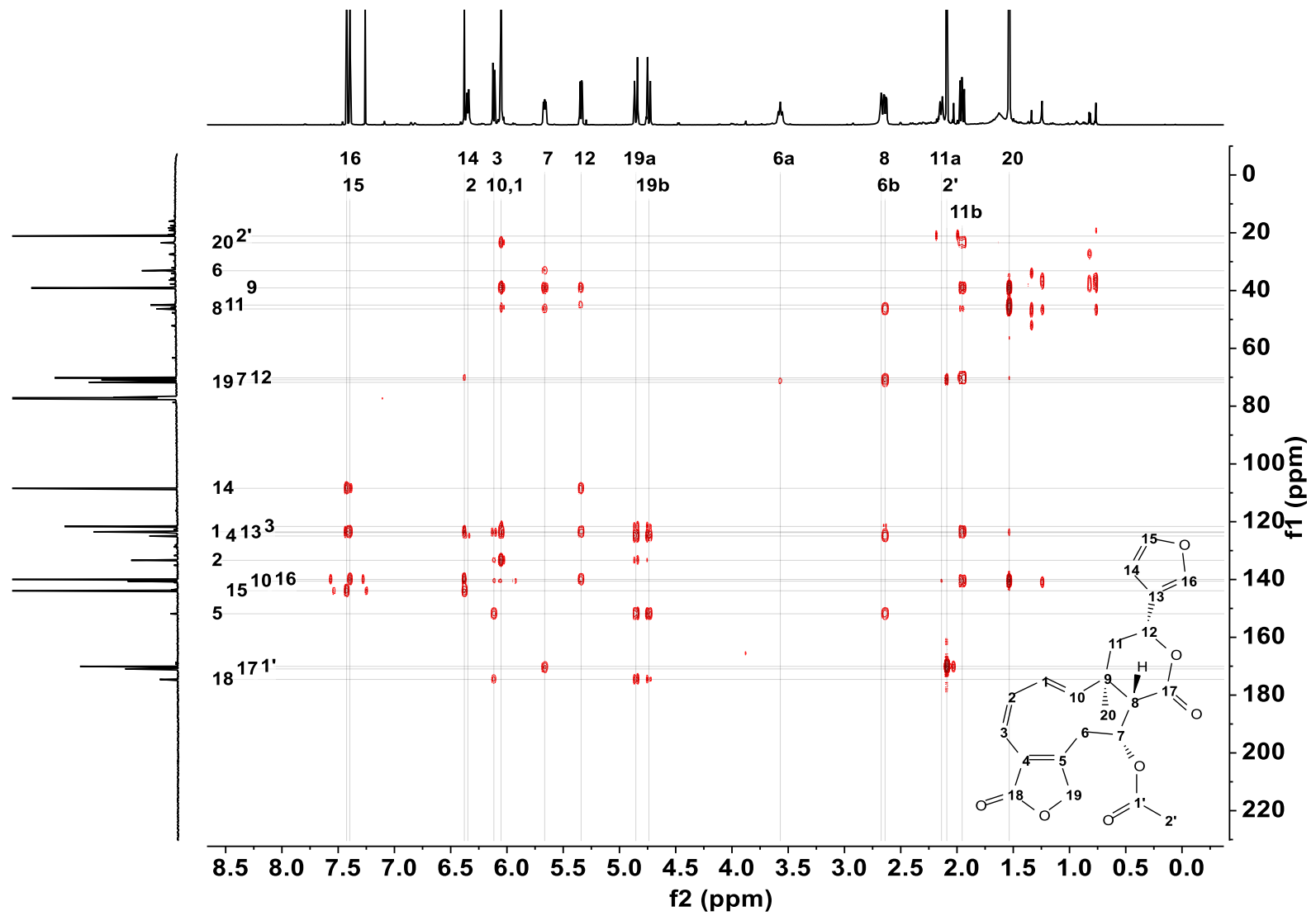
Espectro 17. RMN de ^1H del compuesto **3** (CDCl_3 , 700 MHz).



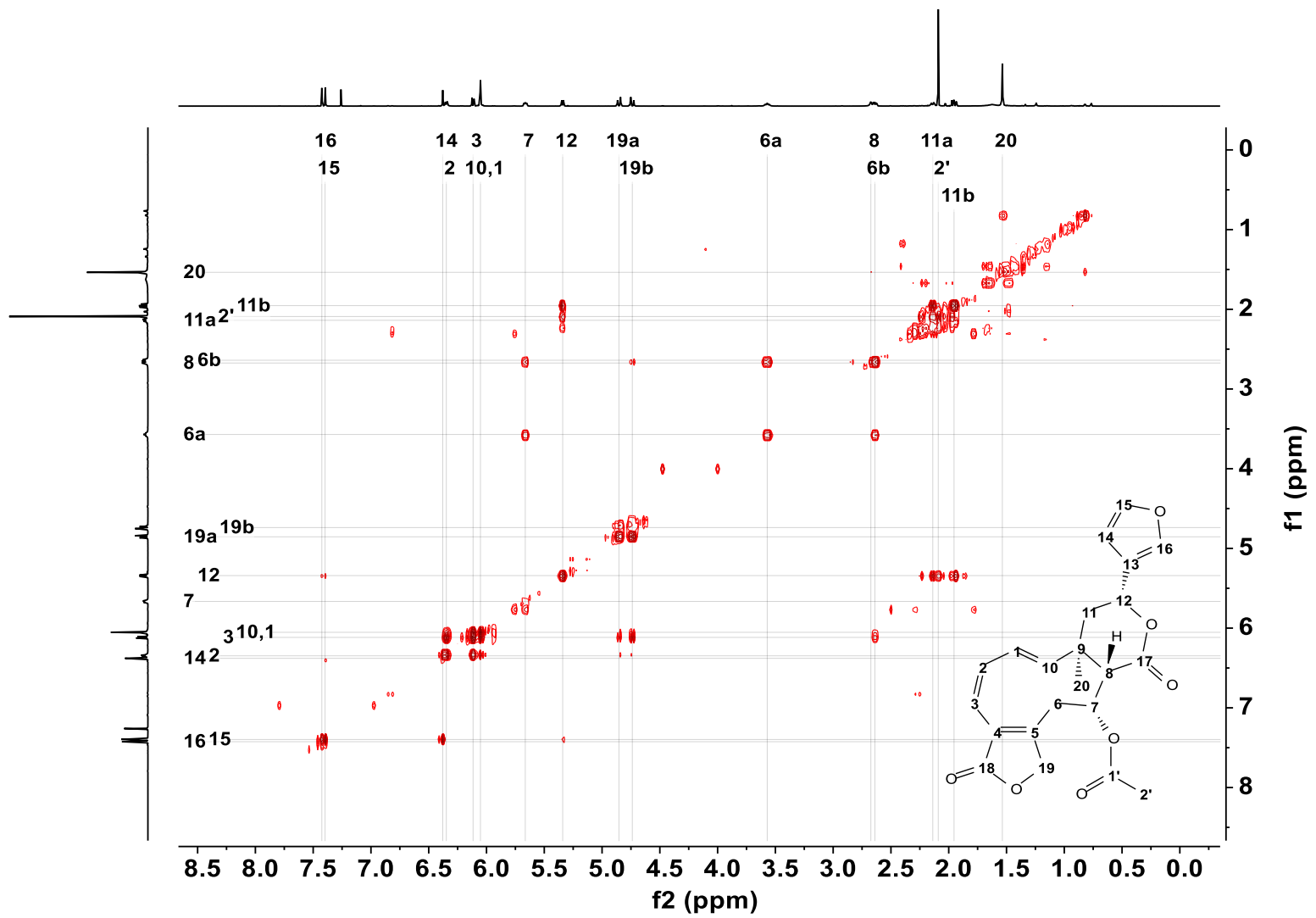
Espectro 18. RMN de ^{13}C del compuesto **3** (CDCl_3 , 175 MHz).



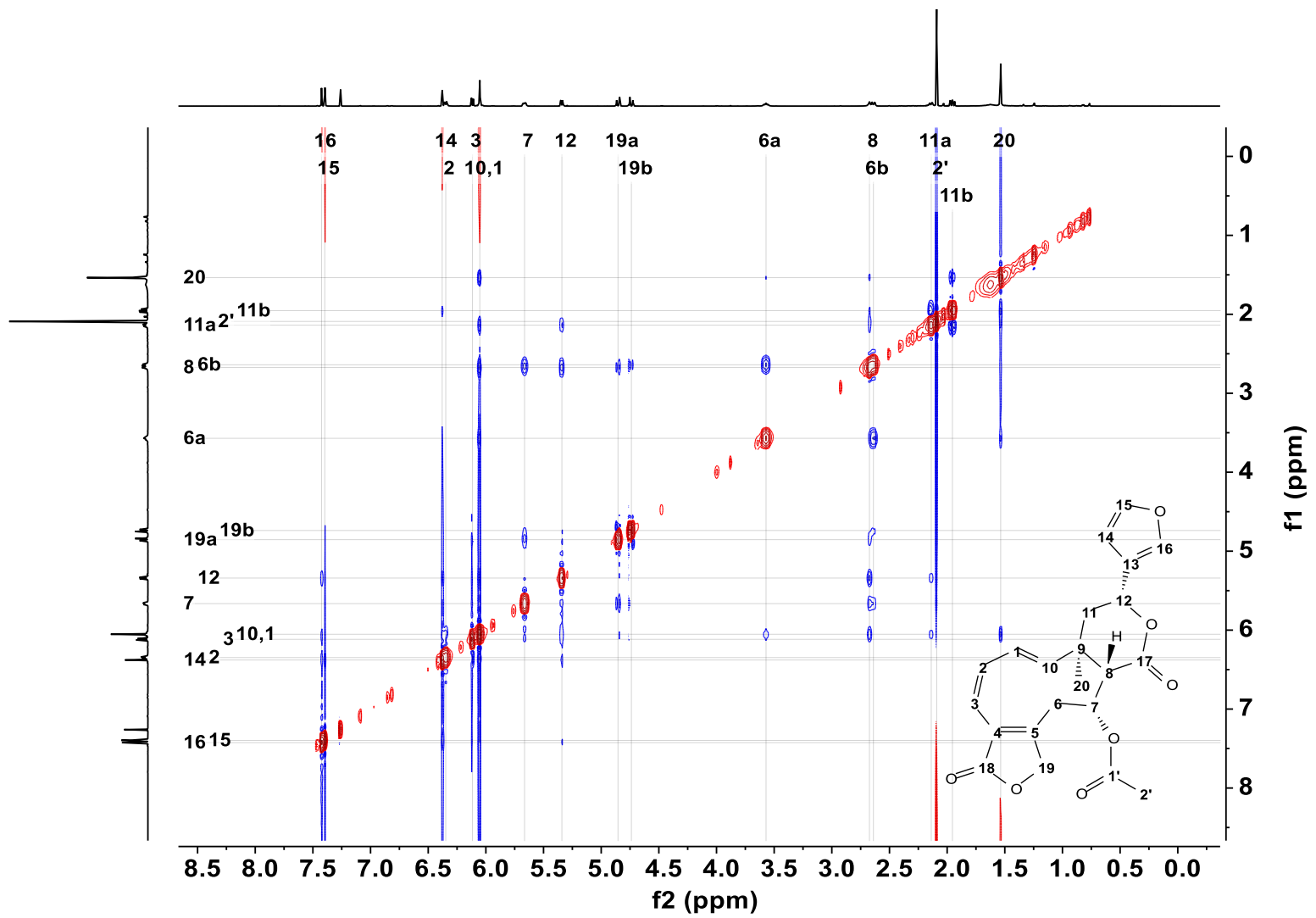
Espectro 19. HSQC del compuesto 3.



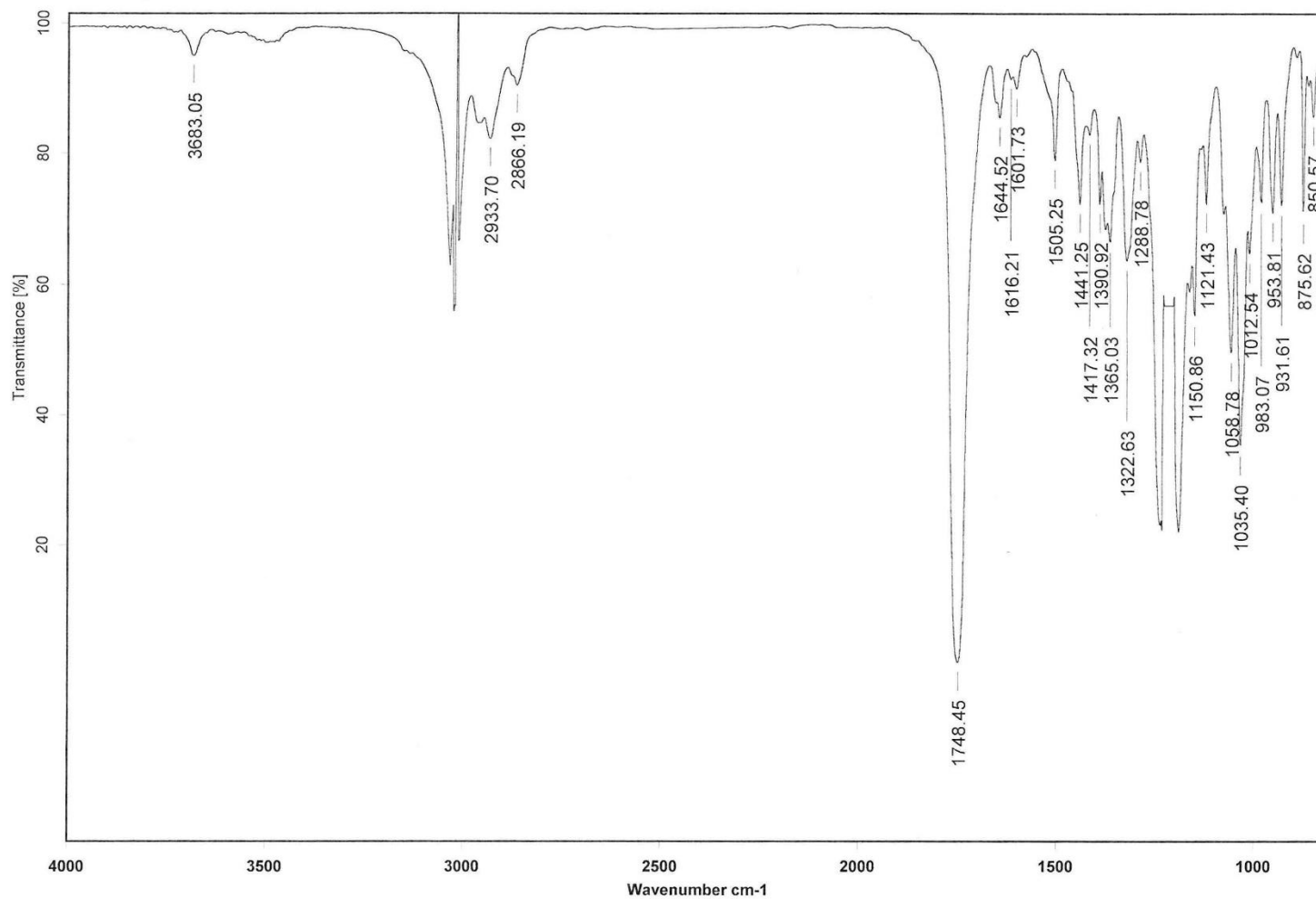
Espectro 20. HMBC del compuesto 3.



Espectro 21. COSY del compuesto 3.



Espectro 22. NOESY del compuesto 3.



Espectro 23. IR del compuesto 3 (CHCl₃).

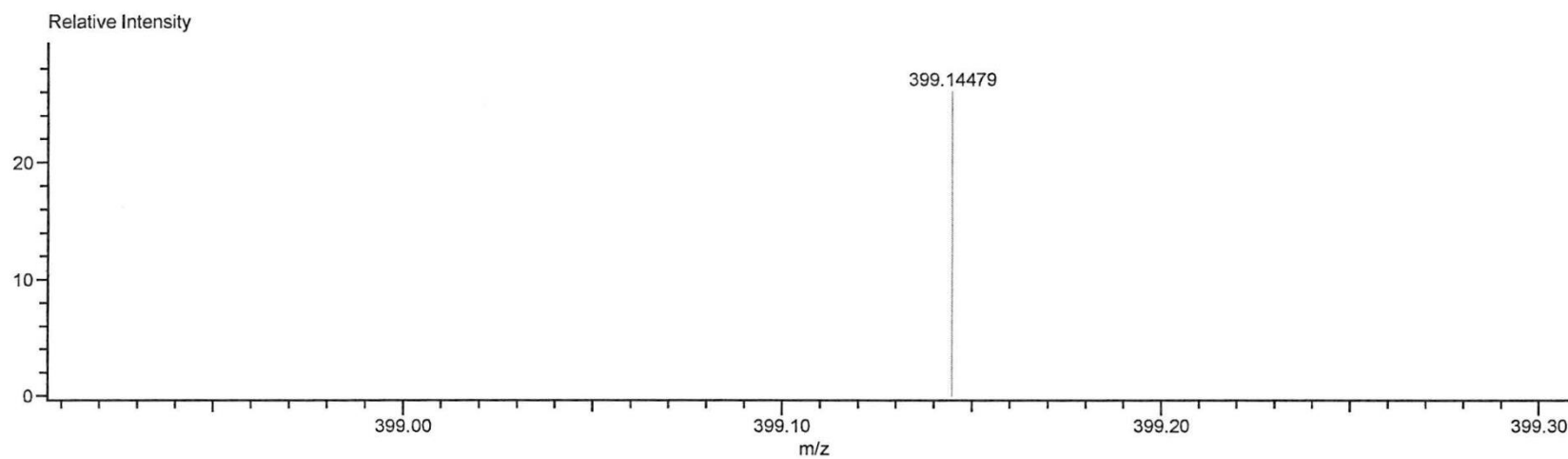
Ionization Mode:DART

History:Determine m/z[Peak Detect[Centroid,30,Area];Correct Base[];Smooth[5];Correct Base[5.0%];Average(MS[... Created by:AccuTOF

Charge number:1

Tolerance:3.00(mmu)

Element:¹²C:1 .. 50, ¹H:1 .. 50, ¹⁶O:1 .. 11



Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
399.14479	3382.84	399.14438	0.41	1.03	¹² C ₂₂ ¹ H ₂₃ ¹⁶ O ₇	11.5

Espectro 24. Masas de alta resolución del compuesto **3** (EM-DART-AR).