



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

AISLAMIENTO Y TRANSFORMACIÓN
QUÍMICA DE ALGUNOS TRITERPENOS
ANTIINFLAMATORIOS DE
Salvia Mexicana L. var. minor Benth.

P U B L I C A C I Ó N
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN QUÍMICA INDUSTRIAL
P R E S E N T A :
ROSALBA ARGUMEDO DELIRA

ASESOR: DR. MARIANO MARTÍNEZ VÁZQUEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉX.

2005

m340561



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
 DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
 P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
 Jefe del Departamento de Exámenes
 Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos :

La Publicación: Aislamiento y Transformación Química de algunos
Triterpenos Antiinflamatorios de Salvia mexicana L. var. minor Benth.

que presenta la pasante: Rosalba Argumedo Delira
 con número de cuenta: 9656718-2 para obtener el título de :
Licenciada en Química Industrial

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 6 de julio de 2004

PRESIDENTE	<u>Dr. René Miranda Ruvalcaba</u>	
VOCAL	<u>Dr. Mariano Martínez Vázquez</u>	
SECRETARIO	<u>Q. Rafael García Barrera</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>MC. Ma. Inés Nicolás Vázquez</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MC. Benjamín Velasco Bejarano</u>	

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de investigación de Productos Naturales L 1-4, del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. bajo la dirección del Dr. Mariano Martínez Vázquez.

Agradecimientos a CONACYT por brindarme su apoyo al proporcionarme una beca a través del proyecto 34992-N

Agradecimientos

- A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por acogerme en su recinto y conducirme en mi superación profesional.
- Al Dr. Mariano Martínez Vázquez por brindarme su confianza y apoyo incondicional en el transcurso de esta investigación.
- A Hortensia Parra-Delgado, Ma. Teresa Ramírez Apan y Antonio Nieto Camacho por su participación en el desarrollo de este trabajo.
- A mis sinodales: Dr. René Miranda Ruvalcaba, Q. Rafael García Barrera, MC. Ma. Inés Nicolás Vázquez y MC. Benjamín Velasco Bejarano; por sus valiosas opiniones y en especial por su paciencia durante la revisión de este trabajo escrito.
- A todos los profesores de esta facultad gracias por sus enseñanzas de cada día, por el apoyo y la comprensión; en especial: Q. Victoria Hernández Palacios, Dr. Alberto Rojas, Ing. Leticia Zúñiga Gómez, Dr. Gabriel Arturo Arroyo Razo, MC. Raquel Gómez Pliego.

Dedicatoria

- A Dios por ser la luz que ilumina mi vida y por estar conmigo siempre.
- † A la memoria de mi madre Susana De Lira Vega por darme su amor, comprensión y todo su apoyo incondicional en los buenos y malos momentos de mi vida. Nunca te olvidaré ya que siempre estas presente en mi mente y en mi corazón.
- A mi padre Francisco Argumedo Ramírez por todos tus esfuerzos y sacrificios, además por ser mi gran ejemplo de vida y superación.
- A mis hermanos Francisco, Viviana, Concepción, Judith y a mi cuñada Gerardo por brindarme su apoyo y amor.
- A mis mejores amigas Eva, Florencia, Ma. Eugenia y Margarita por las palabras de aliento brindadas en los momentos difíciles y por su amistad incondicional.
- A todos mis amigos de la Facultad, en especial a Estela, Maritza, Maura, Elsa, Verónica, Blanca, Felipe, Jesús, Abel, Armando, Saúl y Nelson. Gracias por brindarme su amistad.
- A mis amigas del Instituto, en especial a Ibeth, Hortensia R., Hortensia P., Diana, Aida, Viviana y Monica por ayudarme y darme su amista gracias.

INDICE

	Página
GLOSARIO	i
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS	3
ANTECEDENTES Y GENERALIDADES	4
ARTICULO ORIGINAL	15
TRADUCCIÓN DEL ARTÍCULO	21
CONCLUSIONES	43

GLOSARIO

EtOAc	Acetato de etilo
bf	Banda fuerte
ba	Banda ancha
c	Señal cuadruple
°C	Grados centígrados
¹³ C-DEPT	Espectros de engrandecimiento de transferencia de polarización de menor distorsión de ¹³ C
CC	Cromatografía de columna
TLC	Thin layer chromatography (siglas en Inglés para cromatografía en capa fina)
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CHCl ₃	Cloroformo
CHCl ₂	Cloruro de metileno
d	Señal doble
D ₂ O	Agua deuterada
dd	Señal doble de doble
δ	Desplazamiento químico

H ₂ O	Agua
Hz	Hertz
IR	Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
m	Señal múltiple
m/z	Relación masa / carga
M ⁺	Ión molecular
MeOH	Metanol
MEXU	Herbario Nacional, Instituto de Biología
p.f.	Punto de fusión
P.M.	Peso molecular
ppm	Partes por millón
RMN ¹ H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
RMN ¹³ C	Resonancia magnética nuclear de carbono trece
s	Señal simple
t	Señal triple
TMS	Tetrametilsilano
%	Por ciento

-CH ₃	Metilo
-CH ₂	Metileno
-CH	Metino
COSY	Correlación espectroscópica homonuclear (¹ H – ¹ H)
DE ₅₀	Dosis efectiva 50
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
DPPH	Radical libre 2,2-difenil-1-picrihidracilo
g	Gramos
HETCOR	Correlación heteronuclear (¹³ C – ¹ H)
íp	Intraperitoneal
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µM	Micromolar
mg	Miligramos
v max	Frecuencia máxima
TPA	13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol
nm	Nanómetros
MHz	Megahertz

mL	Mililitros
EIMS	Electron impact mass spectrometry (siglas en Inglés para espectrometría de masas por imp acto electrónico)
NMR	Nuclear magnetic resonance (siglas en Inglés para resonancia magnética nuclear)

INTRODUCCIÓN

A lo largo del desarrollo de nuestra sociedad se han generado avances importantes en diversas áreas. Al respecto, y de forma muy particular, podemos mencionar la formación de profesionistas en Instituciones de Educación Superior, así como la actualización de manera objetiva de los planes de estudio, sin omitir mencionar los mecanismos requeridos para la obtención de un Título Profesional.

La Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México, es una institución donde se realiza investigación y por ende se procede a la divulgación de los resultados correspondientes, existiendo, en este sentido, una participación muy importante de alumnos; es en ella donde se ha creado la opción de titulación denominada **“Titulación por Publicación y Examen Oral”**.

“ A favor de este tipo de opción, está la conveniencia de aprovechar el arbitraje riguroso realizado por las instancias de alguna revista nacional o internacional, avalando la calidad del trabajo que se presenta para optar por un título universitario”

Así en esta ocasión se presenta el artículo **“Isolation and Chemical Transformations of Some Anti-Inflammatory Triterpenes from *Salvia mexicana* L. var. *minor* Benth”**, que ya ha sido publicado, esto para que la pasante de la

carrera de Química Industrial; Rosalba Argumedo Delira, pueda optar por el título correspondiente.

Respecto al artículo, en este se presenta la información correspondiente a el aislamiento de los metabolitos secundarios presentes en la *Salvia mexicana* var. *minor* Benth, que es una variedad que no había sido estudiada. También en este se informa de los resultados de la evaluación tanto antiinflamatoria como antioxidante de algunos de estos metabolitos y de los derivados del ácido ursólico .

OBJETIVOS

GENERAL

Realizar el estudio químico de los extractos (hexánico, acetónico y metanólico) de las hojas y flores de la *Salvia mexicana* L. var. *minor* Benth. Además de evaluar la actividad antioxidante y antiinflamatoria de algunos de estos extractos como de algunos de sus componentes presentes en ellos.

PARTICULARES

- 1) Preparar los extractos (hexánico, acetónico y metanólico) de hojas y flores.
- 2) Separar y purificar los metabolitos secundarios mayoritarios presentes en los extractos mencionados.
- 3) Elucidar la estructura de los compuestos aislados.
- 4) Evaluar la actividad antioxidante y antiinflamatoria de los extractos que se consideren más importantes.
- 5) Evaluar la actividad antioxidante de algunos de los compuestos aislados.
- 6) Evaluar la actividad antiinflamatoria y antioxidante de los derivados del ácido ursólico (que se supuso que podría encontrarse en la planta, de acuerdo a la literatura).

ANTECEDENTES Y GENERALIDADES

METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN LA FAMILIA LABIATAE.

El género *Salvia* pertenece a la familia labiatae la cual comprende más de 4000 especies agrupadas en cerca de 220 géneros¹, esta familia tiene una distribución cosmopolita.

La familia de la labiatae es químicamente rica en terpenoides (aceites esenciales, glicosidos de iridonio, diterpenos y triterpenos) y flavonoides. Los alcaloides solo se presentan en pocos géneros (un ejemplo de ello es en el género *Leonurus*). Las plantas que pertenecen a esta familia son conocidas como plantas aromáticas porque producen y acumulan aceites esenciales².

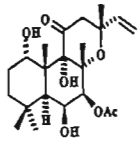
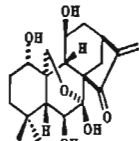
Algunas especies que pertenecen a la familia Labiatae tienen una gran importancia económica debido a sus aceites esenciales ya que tienen una amplia aplicación en la industria perfumera, licorera, de productos de confitería, cosmética y de detergentes principalmente. En cuanto a sus propiedades individuales, varían aunque se han recomendado para el tratamiento de disturbios estomacales menores; así como remedio dermatológico. En un pequeño número de casos las indicaciones incluyen el tratamiento de insomnio (el bálsamo y la lavanda). Algunas de estas plantas son mejor conocidas como especies o tradicionalmente hierbas de olor para uso ordinario que como plantas medicinales (orégano, tomillo e la albahaca dulce)³. El estudio de la composición de los aceites esenciales de estas plantas han mostrado la presencia de un gran número de productos, tales como monoterpenos y

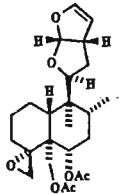
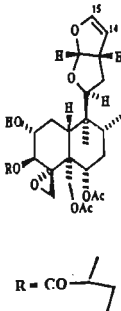

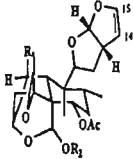
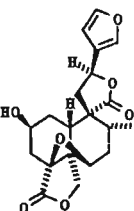
sesquiterpenos. Así en la menta (*Mentha*), salvia (*Salvia*), tomillo (*Thymus*), orégano (*Origanum*), entre otras; se han encontrado en sus aceites esenciales una gran variedad de monoterpenos de diferentes especies, los cuales a aún no son totalmente comprendidos⁴.

Además algunos géneros de la familia labiatae contienen diterpenos del tipo clerodano y abietano que varían con la distribución geográfica⁵ los cuales han mostrado que tienen una interesante actividad biológica como antitumoral, antifungicidad, bactericidad y como agente antialimentario en insectos⁶.

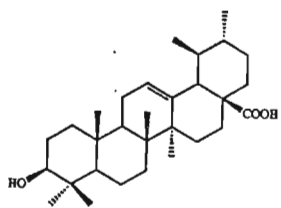
Los diterpenos aislados de las partes aéreas de las especies Europeas y Asiáticas de la *Salvia* presentan un esqueleto de abietano; mientras que las especies americanas de la *Salvia* que han sido estudiadas contienen diterpenos con el esqueleto del neo-clerodano. Se hace mención en la tabla 1 de varios diterpenos importantes de la familia Labiatae.

Tabla 1

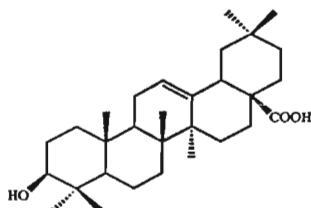
COMPUESTO	BIOACTIVIDAD	ESPECIES	REFERENCIA	FIGURA
Forskolin	- Antiespasmolítico - Hipotensivo	<i>C. forskohlii</i>	Ed, W., Herz, G. W., et al. 1993, Progress in the Chemistry of Organic Natural Products	
6,7-seco-ent-kaurano	- Antitumoral - Antibacterial	<i>R. japónica</i>	Kubota, T., Matsura, Y., Tsutsui, T., et al. 1996, Tetrahedron 22, 1659	

Clerodin	- Antitumoral - Antifungicidad - Bactericidad	<i>Infortunatum</i> <i>Clerodendron</i>	Barton, D. H. R., Cheung, H. T., et al. 1961, J. Chem. Soc. 5061-5073	
Agujapitin		<i>A. chamaepitys</i>	Camps, F. and Cortel, A., 1982, Chemistry Letters, 1053- 1056	 R = CO 
Jodrellina B	- Agente antialimentario	<i>S. rivularis</i> <i>S. woronowii</i>	De la Torre, M. C., Bruno, M., et al. 1992, Phytochemistry 31, 3639-3641 y De la Torre, M. C., Rodríguez, B., et al. 1997, J. Nat. Prod. 60, 1229-1235	 R ₁ = H; R ₂ = CO ^t Pr.
Chamaedroxido		<i>T. chamaedrys</i>	Éguren, L., Perales, A., et al. 1982, J. Org. Chem. 47, 4157- 4160	

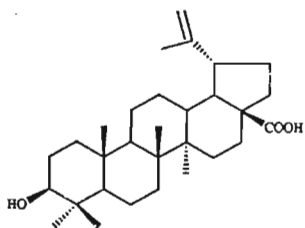
También se han aislado triterpenos de la familia Labiatae entre los más comunes se encuentra los ácidos ursólico **1**, oleanónico **2** y betulínico **3**. De igual forma el alcohol betulínico **4**, la α y β -amirina **5-6** por mencionar algunos de ellos. Algunos de estos compuestos se han probado como antiinflamatorios con buenos resultados.



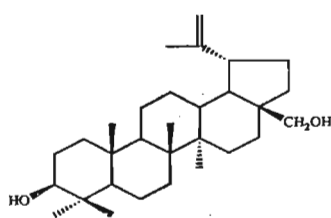
1



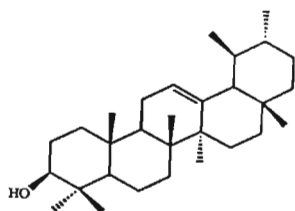
2



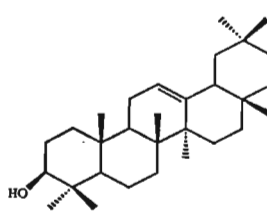
3



4



5



6

Los flavonoides son compuestos que están presentes en las especies de la familia labiatae y pueden ser divididos químicamente en tres grupos: agliconas ó flavonoides libres, flavonoides glicosidos y antocianinas. Las agliconas son compuestos que se localizan en la parte externa de las hojas. La mayoría de las flavonas están altamente metiladas con una oxigenación adicional en el anillo A (6 y 8). Por otro lado los flavonoles lipofílicos y algunas flavononas han sido también descritas, pero estas son de menor frecuencia que las flavonas, chalconas y dihidroflavonoles ya que han sido

detectados en pocos casos². Al respecto, en la tabla 2 se presenta un resumen de todo lo antes mencionado.

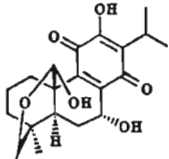
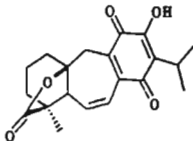
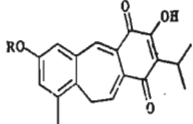
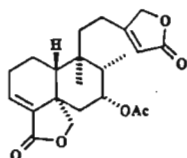
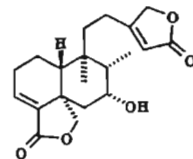
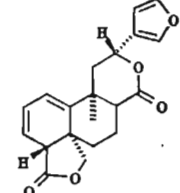
Tabla 2

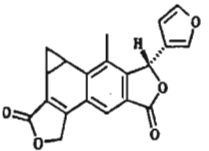
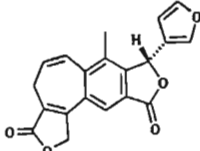
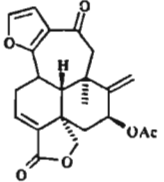
COMPUESTO	ESPECIES	REFERENCIA
2,6,2',4-tetrahidroxi-6'-metoxichalcona	<i>Scutellaria baicalensis</i>	Tomimori, T., Miyaichi et al. 104, 529 (1984)
2',4'-dihidroxi-2,3',6'-trihidroxichalcona	<i>Scutellaria discolor</i>	Tomimori, T., Miyaichi et al. Chem. Pharm. Bull. 33, 4457 (1985)
4,2',6'-trihidroxi-4'-metoxichalcona	<i>Hyptis salzamanii</i>	Messana, I., Ferrari, F., et al. Phytochemistry 29, 329 (1990)
7-lactato luteolin 7-lactato apigenina	<i>Marrubium vulgare</i>	Nawwar, M.A.M. et al. Phytochemistry 28, 3201 (1989)
Hipolaetin 8-glucosido	<i>Sideritis leucantha</i>	Tomás, F., voirin, B., et al. Phytochemistry 24, 1617 (1984)
Cirsiliol 5-glucosido	<i>Salvia virgata</i>	Ulubelen, A. and Ayanoglu. E. J. Nat. Prod. 38, 446 (1975)
Luteolin 7,4'-diglucosido	<i>Origanum spp</i>	Husain, S. Z., Heywood, Aromatic Plants: Basic and Applied Aspects pp. 141-152 (1982)

El género *Salvia* L. Es uno de los géneros más diversificados de la familia *Labiatae* con cerca de 900 especies ampliamente distribuidas en el mundo. Betham⁷ divide este género en cuatro subgéneros: *Salvia*, *Sclarea*, *Leonia* y *Calasphace*, de acuerdo con las características morfológicas y su distribución geográfica⁸. Las especies Europeas y Asiáticas de *Salvia* fueron agrupadas en el subgéneros *Salvia* y *Slarea*. Las especies del género *Leonia* son encontradas en Norte América. Mientras que las especies encontradas en México en el subgénero *Salvia*, y las encontradas en el centro y sur de América han sido incluidas en el subgénero *Calosphace* con más de 500 especies organizadas en cerca de 105 secciones por Epling⁹. Los diterpenos que contienen las especies de *Salvia* están cercanamente relacionados con su distribución geográfica y su clasificación botánica. Además de que la presencia de los diterpenos del tipo abietano y clerodano ha postulado la quimiotaxonomía de este género; al respecto en la tabla 3 se dan algunos ejemplos de estos diterpenos.

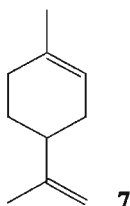
De otras especies de *Salvia* se han aislado triterpenos pentacíclicos como el ácido ursólico **1** e oleanólico **2** en la *S. triloba*, *S. officinalis*, *S. calycina*, *S. glutinosa*, *S. pratensis* y *S. sclarea*; la α y β -amirina **5** y **6** que se aislaron de la *S. apiana*. Otros nuevos tipos de triterpenos pentacíclicos de la serie del oleanano y del lupeol como el ácido vergático y el ácido micromérico han sido aislados de la *S. virgete* y *S. horminum*¹⁰.

Tabla 3

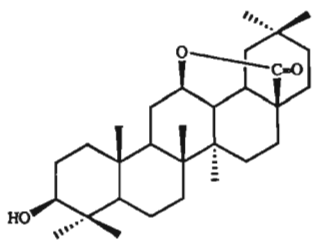
COMPUESTO	ESPECIES	REFERENCIA	FIGURA
Conacytona	<i>S. ballotaeflora</i> <i>S. pubescens</i>	Domínguez, X. A., González, F., et al. 1976, <i>Planta Medica</i> 30, 237-241	
Icetexona	<i>S. candicans</i>	Cárdenas, J. and Rodríguez-Hahn, L. 1995, <i>Phytochemistry</i> 38, 199-204	
Fruticulino A	<i>S. fruticulosa</i>	Rodríguez-Hahn, Esquivel, B., 1996, <i>Secondary Metabolites from Mexican Plants. Chemistry and Biological Properties.</i> Pp. 19-29 Trivandrum, India	
Kerlinolido	<i>S. keerlii</i>	Esquivel, B., Méndez, A., et al. 1985, <i>Phytochemistry</i> 24, 1769-1772	
Dilactona	<i>S. melissodora</i>	Esquivel, B., Hernández, L.M., et al. 1989, <i>Phytochemistry</i> 28, 561-566	
1,10-dehidrosalviarina	<i>S. lineata</i>	Esquivel, B., Cárdenas, J., et al. 1986, <i>Phytochemistry</i> 25, 2381-2384	

Benzonorcaradieno salvipuberulina	<i>S. puberula</i>	Rodríguez-Hahn, L., Esquivel, B., et al. 1988, J. Org. Chem. 53, 3933-3936	
Benzocicloheptatrieno isosalvipuberilina	<i>S. puberula</i> <i>S. tiliaefolia</i>	Rodríguez-Hahn, L., O'Reilly, R., et al. 1990, J.Org. Chem. 55, 3522-3525	
Languidulino	<i>S. languidula</i>	Cárdenas, J., Esquivel, B., et al. 1988, Heterocycles 27, 1809-1812	

Se han estudiado los aceites presentes en la *salvia mexicana* y en otras salvias tales como: *salvia canariensis*, *salvia confertiflora*, *salvia microphylla* (sinonimia *salvia grahamii*) y la *salvia somaliensis* Utilizando cromatografía de gases y cromatografía de gases acoplado a un espectrómetro de masas. Se reportan de este estudio alrededor de 100 constituyente. A continuación se mencionan los constituyentes que se encontraron en una proporción mas alta como sigue: α -pinano, β -pinano, camfano, δ -3-carano y limoneno **7** (monoterpenos hidrocarbonados); 1-8-cinealo, camfor, borneol y bornil acetato (monoterpenos oxigenados); β -cariofileno, γ -mouroleno, germacrano B y α -copaeno (sesquiterpenos hidrocarbonados) y globulol, gualol, spatulenol, α -eudesmol y β -eudesmol (sesquiterpenos oxigenados) fueron los principales constituyentes¹¹.

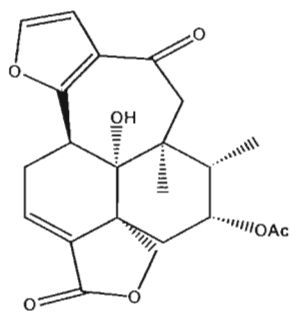


Del estudio fitoquímico realizado a la especie *salvia mexicana* se logro aislar de los extractos en cloroformo un triterpeno pentacíclico, de la serie del ácido oleanónico, al cual se le dio el nombre de salviólida **8**. Se aisló también otro triterpeno pentacíclico de la serie del lupeol, el cual fue identificado como alcohol betulínico **4**¹⁰.

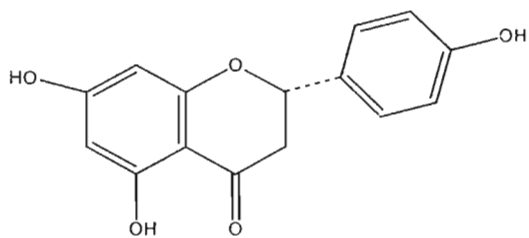


8

De la *salvia mexicana* L. var. mayor (Sección Briquetia) se aisló a la salvimexicanólida **9**, un diterpeno con esqueleto de languidulano el cual posee una fusión tipo *cis* entre los anillos A y B. Es el primer ejemplo de un languidulano con esta característica. Además de aislar a la naringenina (5,7,4'-trihidroxi flavanona) **10**, este flavonoide ha sido aislado en diversas plantas de varias familias¹².



9



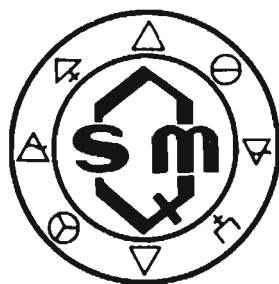
10

BIBLIOGRAFÍA

1. Kew, Richmond, Surrey, (1992) "Advances in Labiatae Science, The Royal Botanic Gardens" R.M. Harley and T. Reynolds (Editors), U.K.
2. Francisco A. Tomás-Barberán and María I. Gil (1990) "Labiatae Flavonoids: Chemical, Chemotaxonomical, Economical and Ecological Aspects" *Rev. Latinoamer. Quím.* **21/3-4**, 134-136.
3. Jean Bruneton, (1999) "Pharmacognosy Phytochemistry Medical Plants" Limusa (Editors) U.S.A., pp. 173-174.
4. Lawrence, B.M. (1992) Chemical Components of Labiatae Oils and their Exploitation, "Advances in Labiatae Science, The Royal Botanic Gardens" pp 399-436 R.M. Harley and T. Reynolds (Editors).
5. Lydia Rodríguez-Hahn and Jorge Cárdenas, (1999) "Comparative Chemotaxonomy in Labiatae" *Phytochemistry* **2**, 91-102.
6. Rodríguez-Hahn, L., Esquivel, B. and Cárdenas, J. (1994) "Clerodane Diterpenes in Labiatae" *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* pp. 107-196.
7. Bentham, G. (1986) "labiatae in Bentham" *Genera Plantarum* **2**, 1160-1223.
8. Rodríguez-Hahn, L., Esquivel, B., Cárdenas, J. and Ramamoorthy, T. P., (1992) "The Distribution of Diterpenoids in Salvia" In: R. M. Harley and T. Reynolds (Editors), *Advances in Labiatae Science* Cap. 27, pp. 335-347.
9. Epling, C., (1939) *Repert. Spec. Nov. Regni Veg. Beih* **110**, 1-383.
10. Collera, O., Gomora, E. y García Jiménez, F., (1980) "Salviolida, una Nueva Lactona Triterpenica" *Rev. Latinoamer. Quím.* **11**, 60-62.
11. Chialva, F., Monguzzi, F., et al., (1992) "Composition of the Essential Oils of Five Salvia Species" *J. Essent. Oil. Res.* **4(5)**, 447-455.
12. Esquivel, B., Ramírez-Dávalos, N. and Espinosa-Pérez, G., (1999) "A Cis-Languidulane Diterpenoid from Salvia mexicana var. major (Labiatae)" *Heterocycles* **51**, No. 7, 1647-1651.

REVISTA *de la* SOCIEDAD
QUÍMICA
de MÉXICO

(Rev. Soc. Quím. Méx.)



Páginas 101-210

Vol. 47, Núm. 2, abril-junio del 2003



de la SOCIEDAD
QUÍMICA
de MÉXICO

(Rev. Soc. Quím. Méx.)



Páginas 101-210

ISSN 0583-7693

Vol. 47, Núm. 2, abril-junio del 2003

CONTENIDO / CONTENTS

Vol. 47, Núm. 2, abril-junio del 2003

j

Investigación

Sesquiterpene Lactone Sequestration by the Tortoise Beetle <i>Physonota arizonae</i> (Cassidinae) Manuel Aregullín and Eloy Rodríguez*	143-145
Mechanism of Glutamate Neurochemistry: Electron Transfer and Reactive Oxygen Species Peter Kovacic, Ratnasamy Somanathan* and Michelle Inzunza	146-150
Cumarinas presentes en especies del género <i>Casimiroa</i> Aída N. García-Argáez, Nadia M. González-Lugo, Carmen Márquez y Mariano Martínez-Vázquez*	151-154
Preparación de materiales mesoporosos tipo Ti-MCM-41 y su uso en la apertura nucleofílica de epiclorhidrina con <i>L</i> -prolinol Deyanira Ángeles Beltrán, Ana Marisela Maubert Franco, Leticia Lomas, Victor Hugo Lara Corona, Jorge Cárdenas y Guillermo Negrón	155-159
New Eremophilanoids from the Roots of <i>Psacalium radulifolium</i> . Hypoglycemic, Antihyperglycemic and Anti-Oxidant Evaluations María Luisa Garduño-Ramírez and Guillermo Delgado*	160-166
Isolation and Chemical Transformations of Some Anti-inflammatory Triterpenes from <i>Salvia mexicana</i> L. var. <i>minor</i> Benth. Rosalba Argumedo Delira, Hortensia Parra-Delgado, Ma. Teresa Ramírez Apan, Antonio Nieto Camacho y Mariano Martínez-Vázquez*	167-172
Two New Oleanolic Acid Saponins from the Roots of <i>Viguiera hypargyrea</i> Laura Alvarez,* Alejandro Zamilpa, Silvia Marquina, and Manasés González	173-177
Análisis isoblográfico de la interacción entre α -sanshool, sesamina, asarinina, fagaramida y piperina sobre la actividad larvívica en <i>Culex quinquefasciatus</i> Say Andrés Navarrete,* Alejandro Flores, Carmen Sixtos y Benito Reyes	178-185
Cytotoxic Evaluation of a Series of Bisalkanoic Anilides and Bisbenzoyl Diamines Luis Chacón-García, M. Elena Rodríguez, and Roberto Martínez*	186-189
El análisis conformacional a la luz de la teoría topológica de átomos en moléculas. Contribución de la energía atómica a la energía molecular Fernando Cortés Guzmán,* Jesús Hernández-Trujillo,* Gabriel Cuevas	190-201
Synthesis and Properties of 2-diazo-1-[2-(thiophen-2-ylmethoxy)-phenyl]-ethanone. Intramolecular Cyclization Through a Carbenoid Intermediate Erick Cuevas Yañez, Abraham Arceo de la Peña, Joseph M. Muchowski y Raymundo Cruz Almanza*	202-206
Estudio fitoquímico de <i>Salvia uruapana</i> René Manjarrés, Bernardo A. Frontana-Uribe y Jorge Cárdenas*	207-209

*En los artículos con más de un autor, el asterisco indica a quién debe dirigirse la correspondencia.

Investigación

Isolation and Chemical Transformations of Some Anti-inflammatory Triterpenes from *Salvia mexicana* L. var. *minor* Benth.

Rosalba Argumedo Delira, Hortensia Parra-Delgado, Ma. Teresa Ramírez Apan, Antonio Nieto Camacho y Mariano Martínez-Vázquez*

Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, México, D. F. Tel: +(52) 56224403; E-mail: marvaz@servidor.unam.mx

Recibido el 6 de mayo del 2003; aceptado el 24 de junio del 2003

Dedicated to Dr. Alfonso Romo de Vivar

Abstract. The acetone and methanol extracts of aerial parts of *Salvia mexicana* L. var. *minor* showed anti-inflammatory and antioxidant properties in the TPA y DPPH models respectively. The chromatography of these extracts led the isolation of β -sitosterol, betulinol, betulinic acid, ursolic acid and arbutin. The presence of these triterpenes is in agreement with previous phytochemical studies of *Salvia*, however this is the first time that arbutin is isolated from a species of this genus. On the other hand, since none of the isolated compound showed antioxidant properties in the DPPH model, it can be inferred that minor compounds not isolated or synergism effects could account for the antioxidant properties of the extracts. It is known that some pentacyclic triterpene derivatives with an α,β -unsaturated carbonyl in the ring A showed a better nitric oxide synthase inhibition activity than the natural triterpenes. It was decided to synthesize the methyl ester of 2-formyl-3-oxo-urs-28-oic and 2-formil-3-oxo-urs-1-en-28-oic acids from ursolic acid and evaluate them using the DPPH and TPA models. The results showed that both compounds have anti-inflammatory activity, but only the 2-formyl-3-oxo-urs-1-en-28-oic acid methyl ester was active in DPPH assay, which is in agreement with the proposed mechanism of this test. This is the first chemical study of *Salvia mexicana* L. var. *minor* (Benth).

Keywords: Triterpenos, *Salvia mexicana* var. *minor*, antiinflammatory activity, chemical transformations.

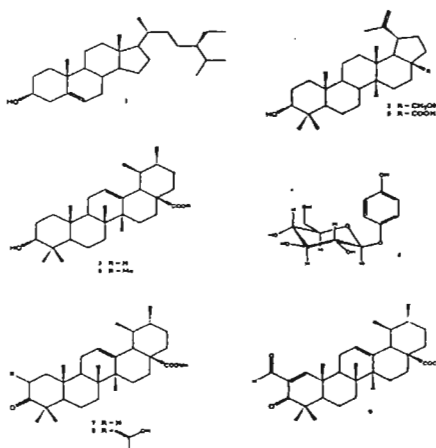
Resumen. Los extractos acetónico y metanólico de las partes aéreas de *Salvia mexicana* L. var. *minor*, mostraron poseer propiedades anti-inflamatorias y antioxidantes en los modelos de TPA y DPPH, respectivamente. La cromatografía de estos extractos permitió el aislamiento de β -sitosterol, betulinol, ácido betulínico, ácido ursólico y arbutina. La presencia de estos triterpenos está de acuerdo con estudios previos de *Salvia*, sin embargo, es la primera vez que se aísla arbutina de una especie de este género. Posiblemente las propiedades antiinflamatorias de los extractos se deban a la presencia del β -sitosterol y ácido ursólico, compuestos con probadas actividades antiinflamatorias. Por otro lado, es probable que las propiedades antioxidantes de estos extractos, se deban a la presencia de compuestos minoritarios o a efectos sinérgicos, ya que ninguno de los compuestos aislados fue activo en el modelo de DPPH. Datos recientes en la literatura señalan que algunos derivados de triterpenos pentacíclicos con una cetona α,β -insaturada en el anillo A, presentan una mayor inhibición de la enzima óxido nítrico sintetasa que los triterpenos naturales, por lo que se decidió obtener los ésteres metílicos de los ácidos 2-formil-3-oxo-urs-28-oico y 2-formil-3-oxo-urs-1-en-28-oico a partir del ácido ursólico, y evaluarlos en los modelos de DPPH y TPA. Los resultados muestran que ambos tienen propiedades antiinflamatorias, pero solo el éster metílico del ácido 2-formil-3-oxo-ursol-28-oico fue activo en el modelo de DPPH, resultado que está de acuerdo con el mecanismo asociado a esta prueba. Este es el primer estudio químico de la especie *Salvia mexicana* L. var. *minor* (Benth).

Palabras clave: Triterpenos, *Salvia mexicana* var. *minor*, actividad anti-inflamatoria, transformaciones químicas.

Introduction

Salvia is an important genus consisting of ca 900 species in the family Lamiaceae (formerly Labiatae). Some species of *Salvia* have been cultivated worldwide to be used in folk medicine and for culinary purposes [1]. The dried leaves of *S. officinalis* (sage) L., for example, is well known for their antioxidative properties used in the food processing industry but applicable also to the area of human health [2]. Studies on the chemical constituents of *Salvia* have been mainly confined to the diterpenoids and the tanshinones [3,4], and several reviews of these components have already been published [5, 6]. In addition, there are several reports on the biological activities of some species of this genus [7-9].

Most of the 500 species of *Salvia* found in Mexico, Central and South America belong to the Subgenus *Jungia* (formerly *Calosphaea*) [10]. The species *Salvia mexicana* has been divide in two varieties: *S. mexicana* var. *major* Benth. and *S. mexicana* L. var. *minor* Benth. Acetone extract of the aerial parts from the former afforded narigenine and a *cis*-lan-guidulane diterpenoid named salvimexanolide [10]. In addition, from the chloroform extract of the aerial parts of this species β -sitosterol, betulinic acid and a triterpene lactone called salviolide were isolated [11]. As a part of our ongoing systematic studies looking for bioactive compounds from Mexican species [12], we report in this paper the chemical study, the free radical scavenging and the anti-inflammatory activities of some extracts and isolates from *S. mexicana* L.



Scheme 1

var. *minor*. To our knowledge this is the first report on the chemical constituents as well as the free radical scavenging and anti-inflammatory activities of this species.

Results and Discussion

Flowers and leaves of this species were studied separately. The hexane, acetone and methanol extracts of each limb were obtained.

The method of DPPH free radical can be used to evaluate the antioxidant activity of specific compounds or extracts in a short time. It is based on the transformation of the stable free radical 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) to α,α -diphenyl- β -picryl hydrazine by means of putative antioxidant compounds [13].

On the other hand, the TPA-induced edema test is a screening method to evaluate the ability of test compounds or extracts to prevent an inflammatory reaction in response to the edemogen.

The values of the anti-oxidative evaluation, by DPPH method of some extracts of *S. mexicana* var. *minor* are shown in Table 1. Those of the anti-inflammatory evaluation assessed by TPA-induced edema in mice are shown in Table 2.

According to these results, the acetone and methanol extracts from flowers, as well as the methanol from leaves were active in the DPPH assay. A different pattern is observed in the TPA assay where only the hexane and acetone extracts from the flowers were active.

In order to isolate the possibly involved components, all the active extracts were chromatographed. Then, from the flower hexane extract, β -sitosterol (1; 157 mg; 0.034 %) and betulinol (2; 10 mg; 0.002 %) were isolated, while ursolic acid (3; 3.612 g; 0.8 %) and arbutin (4; 563 mg; 0.12 %) were iso-

lated from the flower acetone extract. Arbutin (4) was the only compound isolated from the flower and leaf methanol extracts, 3.180 g (0.69 %) and 5.103 g (0.96 %) respectively. The presence of 1, 2 and 3 in *S. mexicana* var. *minor* are in agreement with previous phytochemical reports of this genus. To our knowledge this is the first time that arbutin is isolated from species of *Salvia* genus.

All the isolated compounds were inactive in DPPH assay, thus indicating that activity of the extracts is due to the minor constituents not isolated or to a synergic effect. These results are in agreement with the assumed mechanism of this reaction, which postulate that the free radical scavenging activity of a compound in DPPH assay is attributed to their hydrogen donating ability [14].

On the other hand, the anti-inflammatory activities of the β -sitosterol (1) and ursolic acid (3) are well documented [15, 16] then the presence of 1 and 3 in this species could account for its anti-inflammatory activity (Table 2).

It is known that phorbol esters, such as TPA, induce skin inflammation and a hyperproliferative response with an infiltration of neutrophils [17]. It is also known that TPA stimulates PLA_2 , and that consequently a release of arachidonic acid and prostaglandins occurs [18]. Although the mechanism by which TPA causes inflammation is not completely clear, it seems to be related in part to the release of eicosanoid mediators. Then inhibitors of cyclooxygenase and lipoxygenase, as ursolic acid, have proven activity in the TPA model [19, 20]. The high output of nitric oxide (NO) produced by inducible nitric oxide synthase (iNOS), which is expressed in activated macrophages, plays an important role in host defense. However, excessive production of NO can also destroy functional normal tissues during acute and chronic inflammation. From a structure-activity study between 80 ursolic and oleanolic derivatives, the 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oic, is

Table 1. Free radical scavenging activities of some extracts of *S. mexicana* L. var. *minor*.

Extracts	Concentration (ppm)	Reduction of DPPH (%)
Acetone (flowers)	10	12.64*
	100	84.47*
	1000	95.35*
Methanol (flowers)	10	17.74*
	100	92.86*
	1000	91.55*
Methanol (leaves)	10	13.55*
	100	90.76*
	1000	92.52*
Nordihydroguaiaretic acid (positive control)	7.17	94.69*

The results were analyzed by ANOVA. Statistical comparison were made between control group and the experimental groups using a Dunnett's test. * $p \leq 0.05$.

the product with the highest inhibitory activity against production of nitric oxide (NO) induced by interferon γ (IFN- γ) in mouse macrophages. In general, it was found that oleanolic and ursolic derivatives with a 1-en-3-one functionality in ring A have significant inhibitory activity against production of NO. Also it is known that ursolic acid up regulate iNOS and TNF- α expression through NF- κ B transactivation in the resting macrophages [21]. Taking this information into account, it was decided to evaluate the free radical scavenging as well as the anti-inflammatory properties of both 8 and 9. Compounds 8 and 9 were synthesized from 3, according to the route illustrated in Scheme 1.

The results showed that only 8 was active as free radical scavenger (Table 3). However, both 8 and 9 showed almost the same activity as anti-inflammatory agents as ursolic acid (Table 4). These findings clearly indicate that the free radical scavenger activity of 8 is due to its hydrogen donating ability. On the other hand, in contrast to their inhibitory activity against the production of nitric oxide, the presence of unsaturated moieties in 8 and 9 are not relevant in terms of their anti-inflammatory activity, since both of them showed almost the same activity as ursolic acid.

Materials and Methods

General. The melting points (uncorrected) were determined on a Fisher-Johns apparatus. IR spectra were recorded as KBr pellets or liquid film on a Nicolet spectrophotometer model Magna 750. Mass spectra were recorded at 70 eV on a Jeol JMS-AX505HA mass spectrometer. NMR spectra were measured using Varian-Gemini 200 and Varian VXR-300 (1 H, 200 or 300 MHz, 13 C, 75 MHz) spectrometers in CDCl $_3$ or DMSO- d_6 with TMS as internal standard.

Plant material. Aerial parts of *S. mexicana* L. var. *Minor* Benth. were obtained from an orchard localized in Xabuen

street in San Miguel Tlaxipan (Texcoco, Edo. de Mexico, Mexico) in 2002. A voucher specimen was deposited in the Herbario Nacional (MEXU-1054424).

Flowers (456 g) and leaves (531 g) were separately treated. Then, plant material was exhaustively extracted with *n*-hexane, acetone and MeOH, successively. From the flowers, 24.62 g (5.39 %, dry weight) of the hexane extract, 24.47 g (5.36 %, dry weight) of acetone extract and 73.26 g (16.06 %, dry weight) of methanol extract were obtained, while from the leaves, 13.19 g (2.43 %, dry weight), 29.33 g (5.52 %, dry weight) and 179.55 g (33.77 %, dry weight) were obtained respectively.

All the extracts were chromatographed using an open column packed with Si-gel (G-Altech, 0.2-0.5 mm, ASTM) in a 1:30 proportion to the extract and eluted with solvent mixtures of increasing polarity starting with hexane and ending with methanol.

Chromatography of hexane extract of flowers. From the hexane extract of the flowers a total of 65 fractions of 200 mL each, were collected. Fractions showing similar TLC data were combined, affording eight pools (F1-F8): F3 (fractions 24-26, eluted with hexane-EtOAc, 9:1), F4 (fractions 27-35, eluted with hexane-EtOAc, 8:2), 3-sitosterol (1, 157 mg) was isolated from F3 and betulinol (2; 10 mg) from F4.

Chromatography of acetone extract of flowers. From the acetone extract of the flowers a total of 265 fractions of 200 mL each were collected. Fractions showing similar TLC data were combined, affording six pools (F1-F6): F3 (fractions 36-161, eluted with hexane-EtOAc, 7:3), F4 (fractions 162-237, eluted with hexane-EtOAc, 1:1). Ursolic acid (3; 3.682 g) was isolated from F3 and arbutin (4; 563 mg) from F4.

Chromatography of MeOH extract of flowers. From the MeOH extract of the flowers a total of 111 fractions of 200 mL each were collected. Fractions showing similar TLC data were combined, affording nine pools (F1-F9): F5 (fractions 50-77, eluted with EtOAc), F6 (fractions 78-89, eluted with EtOAc-MeOH, 9:1), F7 (fractions 90-93, eluted with EtOAc-MeOH, 7:3), F8 (fractions 94-102, eluted with EtOAc-MeOH, 1:1) and F9 (fractions 103-111, eluted with MeOH). Arbutin (4; 3.180 g) was isolated from F5-F8 pools.

Chromatography of hexane extract of leaves. When the extract was concentrated, a yellowish solid precipitate (235 mg), which was filtered and chromatographed. A total of 16 fractions of 50 mL each were collected. Fractions showing similar TLC data were combined, affording three pools (F1-F3): F1 (fractions 1-4, eluted with hexane), F2 (fractions 5-8, eluted with hexane-EtOAc, 9:1) and F3 (fractions 9-16, eluted with hexane-EtOAc, 8:2). Betulinic acid (5; 84 mg; 36%) was isolated from F3. The remanent extract (13.19 g) afforded a total of 22 fractions of 200 mL each. Fractions showing similar TLC data were combined, affording six pools (F1-F6): F3 (fractions 7-12, eluted with hexane-EtOAc, 7:3), F4 (fractions

Table 2. Anti-inflammatory activities of some extracts of *S. mexicana* L. var. *minor*.

Extracts	Edema (mg, average SE)	Inhibition (%)
Control (methanol)	15.47 ± 0.32	—
Hexane (flowers)	4.77 ± 0.50	69.17*
Acetone (flowers)	5.60 ± 0.91	63.79*
Methanol (flowers)	13.70 ± 0.31	11.42
Methanol (leaves)	13.10 ± 1.07	15.0
Indomethacin (positive control)	1.07 ± 0.03	91.35*

All the extracts were tested at 1 mg / ear doses. The results were analyzed by ANOVA. Statistical comparison were made between control group and the experimental groups using a t student test. *p < 0.01

13-14, eluted with hexane-EtOAc, 1:1), F5 (fractions 15-19, eluted with hexane-EtOAc, 3:7) and F6 (fractions 20-22, eluted with EtOAc). β -sitosterol (1; 686 mg) was isolated from F3-F6 pools.

Chromatography of acetone extract of leaves. From the acetone extract of the leaves a total of 33 fractions of 200 mL each, were collected. Fractions showing similar TLC data were combined, affording nine pools (F1-F9): F3 (fractions 8-10, eluted with hexane-EtOAc, 7:3), F4 (fractions 11-15, eluted with hexane-EtOAc, 1:1), F5 (fractions 16-18, eluted with hexane-EtOAc, 3:7), F6 (fractions 19-21, eluted with EtOAc), F7 (fractions 22-25, eluted with EtOAc-MeOH, 7:3), F8 (fractions 26-29, eluted with EtOAc-MeOH, 1:1) and F9 (fractions 30-33, eluted with MeOH). Ursolic acid (3; 4.210 g; 14.35%) was isolated from F3-F5 pools and arbutin (4; 2.103 g; 7.168%) was isolated from F5-F8 pools.

Chromatography of MeOH extract of leaves. The MeOH extract was partitioned between *n*-butanol and CH_2Cl_2 . It afforded the *n*-butanol extract (46.16 g), which was chromatographed yielding a total of 22 fractions of 200 mL each. Fractions showing similar TLC data were combined, affording nine pools (F1-F9): F6 (fractions 9-13, eluted with EtOAc-MeOH, 9:1), F7 (fractions 14-15, eluted with EtOAc-MeOH, 7:3), F8 (fractions 16-18, eluted with EtOAc-MeOH, 1:1) and F9 (fractions 19-22, eluted with MeOH). Arbutin (4; 5.103 g, 4.3 %) was isolated from F6-F9 pools.

Ursolic acid methyl ester (6). A solution of ursolic acid (1 g, 2.19 mmol) in a mixture of ether / MeOH (50 mL) was cooled down to 0 °C in an ice-bath. Ethereal diazomethane was added until permanent yellow color was obtained. After 24 h the solvent was removed by distillation under low pressure to give ursol-28-oic acid methyl ester (6; 758 mg; 1.61 mmol; 73.5 % yield).

3-oxo-urs-28-oic acid methyl ester (7). To a solution of 6 (750 mg, 1.6 mmol) in acetone (10 ml) was added an excess

of Jones's reagent at 0 °C while stirring. The reaction course was followed by TLC. After 55 min, the excess of Jones's was destroyed by addition of MeOH, and then the reaction mixture was diluted with H_2O (30 mL). Extraction with CH_2Cl_2 (4 × 10 mL), drying (Na_2SO_4), filtration and evaporation of the solvent gave a residue, which by crystallization from hexane-EtOAc afforded 7 (321 mg; 0.7 mmol; 43.7 % yield). Mp 182-184°C, IR (KBr) ν_{max} : 2935, 2867, 1726, 1695, 1459, 1380 and 1142 cm^{-1} . EIMS 70eV *m/z*: 468 (M^+ , $\text{C}_{31}\text{H}_{48}\text{O}_3$), 453, 419, 407, 262, 249, 203 and 189. ^1H NMR 200 MHz CDCl_3 δ : 5.27 (1H, m, H-12), 3.61 (3H, s, OMe), 2.60 (1H, d, H-18), 2.25 (2H, m, H-2), 1.08 (3H, s), 1.04 (6H, s), 1.06 (3H, d, J=8 Hz), 0.95 (3H, s), 0.85 (3H, d, J=7Hz), 0.79 (3H, s).

2-Formyl-3-oxo-urs-28-oic acid methyl ester (8). To a solution of 0.7 mmol of 7 in 7 mL of dry pyridine, held under nitrogen, was added 1.5 mL (18.7 mmol) of ethyl formate (distilled from phosphorus pentoxide) followed by 1 mL of a solution of 294 mg (13.3 mmol) of sodium in 6 mL of absolute methyl alcohol. The resulting solution was then kept at room temperature under nitrogen overnight. The reaction was evidenced by the appearance of a deep color and / or the formation of an insoluble precipitate. The mixture was poured into a cold solution of 16 mL of glacial acetic acid in 150 mL of water, and the resulting precipitate was extracted with CH_2Cl_2 . The organic layer was washed with water and then extracted with 3 × 100 mL of 2 % potassium hydroxide solution. The combined basic extract were washed with ether and acidified with 10 mL of glacial acetic acid. Extraction of the aqueous layer with CH_2Cl_2 in the usual manner, afforded 2-formyl-3-oxo-urs-28-oic methyl ester (8; 226 mg; 0.46 mmol; 70 % yield).

Reddish viscous liq. IR (CHCl_3) ν_{max} : 2925, 2869, 1725, 1636, 1587, 1455, 1360 and 1147 cm^{-1} . EIMS 70eV *m/z*: 496 (M^+ , $\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{O}_4$), 481, 478, 437, 421, 262, 249, 233, 203 and 189. ^1H NMR 200 MHz CDCl_3 δ : 14.91 (1H, s, OH chelated), 8.57 (1H, s, H-23), 5.29 (1H, m, H-12), 3.61 (3H, s, OMe), 2.32 (1H, d, H-18), 1.25, 1.19, 1.11, 1.09, 0.8 (3H, s, each), 0.93 (3H, d, J=8 Hz), 0.86 (3H, d, J=7Hz).

Table 3. Free radical scavenging activities of 8 and 9.

Compound	Concentration (ppm)	Reduction of DPPH (%)
2-Formyl-3-oxo-urs-28-oic acid methyl ester (8)	10	12.69*
	100	40.87*
	1000	79.43*
2-Formyl-3-oxo-urs-1-en-28-oic acid methyl ester (9)	10	N. A.
	100	N. A.
	1000	N. A.

The results were analyzed by ANOVA. Statistical comparison were made between control group and the experimental groups using a Dunnet's test. *p < 0.05, N. A. = Not active.

Table 4. Anti-inflammatory activities of 8 and 9.

Compound	Edema (mg, average SE)	Inhibition (%)
Control (EtOAc)	11.80 ± 0.045	-
2- Formyl-3-oxo- urs-28-oic acid methyl ester (8)	3.03 ± 0.86	74.29*
2- Formyl-3-oxo- urs-1-en-28-oic acid methyl ester (9)	3.03 ± 0.86	74.29*

All the compounds were tested at 1 mg / ear doses. The results were analyzed by ANOVA. Statistical comparison were made between control group and the experimental groups using a t student test. * $p < 0.01$. The reported % of inhibition of urolic acid is 74.4 % at 1 mg/ear doses [16].

2- Formyl-3-oxo-urs-1-en-28-oic acid methyl ester (9). PhSeCl (120 mg) was dissolved in 12 mL of CH_2Cl_2 and cooled to 0 °C and 0.06 g (40 μl) of pyridine was added. After 15 min, 0.2 g of 8 in 3 mL of CH_2Cl_2 was added and the mixture was stirred for 15 min more. The CH_2Cl_2 solution was extracted with two 5 mL portions of 10 % HCl and cooled back to 0 °C, at which time 0.1 mL of 30 % H_2O_2 was added. An additional 0.1 mL of 30 % H_2O_2 was added after 10 min and again after 20 min. After an additional 10 min, 0.5 mL of H_2O was added and the CH_2Cl_2 layer was separated and washed with 5 mL of saturated NaHCO_3 . After being dried over Na_2SO_4 , the solution was filtered and the solvent evaporated under vacuum to yield 9 (53 mg; 0.11 mmol; 24 % yield). Reddish viscous liq. IR (CHCl_3) ν (cm^{-1}): 2921, 2858, 2721, 1719, 1672, 1604, 1455, 1379, 1224 and 1110. EIMS 70eV m/z: 494 (M^+ , $\text{C}_{37}\text{H}_{46}\text{O}_4$), 479, 476, 435, 419, 314, 262, 249, 233, 203, 189, 158, 133 and 117. ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): 10.01 (1H, s, COH), 7.80 (1H, s, H-1), 5.38 (1H, m, H-12), 3.62 (3H, s, OMe), 2.28 (1H, d, H-18), 1.25, 1.18, 1.09, 0.96, 0.87 (3H, s, each), 1.17 (3H, d, J = 7 Hz), 0.87 (3H, d, J = 8Hz).

Free radical scavenging Activity. DPPH assay was performed essentially according to the modified method of Cottele. Reaction mixture containing different concentrations of test samples in DMSO and 100 mM DPPH ethanol solution in 96-well microtiter plates, were incubated at 37 °C for 30 min, and subsequently the absorbencies were measured at 515 nm in a microplate reader Elx 808. Measurements were performed in triplicate in at least three independent experiments. The % inhibition of each compound was determined by comparison with a DPPH ethanol blank solution [22]. The results were analyzed by ANOVA. Statistical comparisons were made between control group and the experimental groups using Dunnett's test.

Animals. Male CD-1 mice, weighing 20-25 g each were used. Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México provided the experimental animals. All animals were held under standard laboratory conditions in the animal

house (temperature 27 ± 1 °C). They were fed laboratory diet and water *ad libitum*. All experiments were carried out using 4-8 animals per group.

TPA-induced edema model. Effects of the test substances on TPA-induced ear edema in mice were studied as described by De Young [17] with slight modifications. The substances (1 mg / ear) were applied topically. A solution of TPA (2.5 μg) in EtOH (10 μL) was applied topically to both faces (5 μL each face) of the right ear of the mice, 10 min after the test substances were applied (10 μL each face). The left ear received ethanol (10 μL) first, and 20 μL of the respective solvent subsequently.

Four hours later the mice were killed by cervical dislocation. A 7-mm diameter plug was removed from each ear. The swelling was assessed as the difference in weight between right and left ear plugs [19]. Inhibition of edema (EI, %) was calculated by the equation:

$$\text{EI (\%)} = 100 - [\text{B} \times 100 / \text{A}], \text{ with } \text{A} = \text{edema induced by TPA alone, and } \text{B} = \text{edema induced by TPA plus sample.}$$

Data were expressed as the mean SEM of 4-8 mice. All the extracts and compounds were tested at 1 mg / ear doses. The results were analyzed by ANOVA. Statistical comparisons were made between control group and the experimental groups using a t student test. * $p < 0.01$.

References

- Lu, Y.; Yeap-Foo, L. *Phytochemistry* 2002, 59,117-140.
- Baricevic, D.; Sosa, S.; Della Loggia, R.; Tubazo, A.; Simonovska, B.; Krasna, A.; Zumpancic, A. *J. Ethnopharmacol.* 2001, 75, 125-132.
- Chang, H. M.; Cheng, K. P.; Choang, T. F.; Chow, H. F.; Chui, K. Y.; Hon, P. M.; Lau Tan, F. W.; Yang, Y.; Zhong, Z. P.; Lee, C. M.; Sham, H. L.; Chan, C. F.; Cui, Y. X. *J. Org. Chem.* 1990, 55, 3537-3543.
- Zhang, K. Q.; Bao, Y.; Wu, P.; Rosen, R. T.; HO, C. T. *J. Agric. Food Chem.* 1990, 38, 1194-1197.
- Tang, W.; Eisenbrand, G. Chinese Drugs of Plant Origin. Chemistry, Pharmacology, and use in Traditional and Modern Medicine. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1992, pp. 891-902.
- Rodríguez-Hahn, L.; Esquivel, B.; Cárdenas, J. *Recent Advances in Phytochemistry*, 1995, 29, 311-332.
- Takahashi, K.; Ouyang, X.; Komatsu, K.; Nakamura, N.; Hattori, M.; Baba, A.; Azuma, J. *Biochem. Pharmacol.* 2002, 64, 745-750.
- Cao, C-M.; Xia, Q.; Zhang, X.; Xu, W-H.; Jiang, H-D.; Chen, J-Z. *Life Sciences* 2003, 72, 2451-2463.
- Ebringerova, A.; Kardosova, A.; Hromádkova, Z.; Híbalova, V. *Fitoterapia*, 2003, 74, 52-61.
- Esquivel, B.; Ramírez-Dávalos, N.; Espinosa-Pérez, G. *Heterocycles*, 1999, 51, 1647-1651.
- Collera, O.; Gomora, E.; Garcia Jiménez, F. *Rev. Latinoamer. Quím.* 1980, 11, 60-62.
- Estrada-Reyes, R.; Álvarez, C.; López-Rubalcava, C.; Rocha, L.; Heinze, G.; Moreno, J.; Martínez-Vázquez, M. *Z. Naturforsch.* 2002, 57c, 29-32.
- Tamil Selvi, A.; Joseph, G. S.; Jayaprakasha, G. K. *Food Microbiology* 2003, 20, 455-460.
- Shimada, K. K.; Fujikawa, K. Y.; Nakamura, T. *J. Agric. Food Chem.* 1992, 40, 945-948.

15. Martínez-Vázquez, M.; Ramírez A., T. O.; Lazcano, M. E.; Bye, R. *Rev. Soc. Quím. Mex.* 1999, 43, 103-105.
16. Recio, M. C.; Giner, R.; Terencio, M. C.; Sanz, M. J.; Ríos, J. L. *Planta Med.* 1991, 57, A56-57.
17. De Young, L. M.; Kheifets, J. B.; Ballaron, S. L.; Young, J. M. *Agents Actions.* 1989, 26, 335-341.
18. Fuerstenberg, G.; Richter, H.; Fusenig, N. E.; Marks, F. *Cancer Lett.* 1981, 11, 191-204.
19. Carlson, R. P.; O'Neil-Davis, L.; Chang, J.; Lewis, A. J. *Agents Actions.* 1985, 17, 197-204.
20. Najid, A.; Simon, A.; Cook, J.; Chable-Rabinovitch, H.; Delage, C.; Chulia, A. J.; Rigaud, M. *FEBS.* 1992, 213-217.
21. You, H. J.; Chul, Y. C.; Ji, Y. K.; Park, S. J. Hahn, K.; Jeong, H. G. *FEBS Lett.* 2001, 509, 156-160.
22. Cottele, N.; Bernier, J. L.; Catteau, J. P.; Pomnery, P.; Wallet, J. C.; Gaydou, E. M. *Free Radical Biology & Medicine.* 1996, 20, 35-43.

Investigación

AI SLAM I ENTO Y TRANSFORMAC I ON QU I M I CA DE ALGUNOS TRITERPENOS ANTIINFLAMATORIOS DE LA *Salvia mexicana* L. var. *minor* Benth.

Rosalba Argumedo Delira, Hortensia Parra-Delgado, Ma. Teresa Ramírez Apan, Antonio Nieto Camacho y Mariano Martínez Vázquez

Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, México, D.F. Tel: + (52) 56224403; E-mail: marvaz@servidor.unam.mx

Recibido el 6 de mayo del 2003, aceptado el 24 de junio del 2003

Dedicated to Dr. Alfonso Romo de Vivar

Abstract. The acetone and metanol extracts of aerial parts of *Salvia mexicana* L. Var. *minor* showed anti-inflammatory and antioxidant properties in the TPA y DPPH models respectively. The chromatography of these extracts led the insolation of β -sitosterol, betulinol, betulinic acid, ursolic acid and arbutin. The presence of these triterpenes is in agreement with previos phytochemical studies of *Salvia*, however this is the first time that arbutin is isolated from a species of this genus. On the other hand, since none or the insolated compound showed antioxidant properties in the DPPH model. it can be inferred tha minor compounds not isolated or synergism effects could account for the antioxidant properties of the extracts. It is known that some pentacyclic triterpene derivatives with an α,β -unsaturated carbonyl in the ring A showed a better nitic oxide synthase inhibition activity that natural triterpenes. It was decided to synthesize the methyl ester of 2-formyl-3-oxo-urs-28-oic and 2-formil-3-oxo urs-1-en-28-oic acids from ursolic

acid and evaluate them using the DPPH and TPA models. The results showed that both compounds have antiinflammatory activity, but only the 2-formyl-3-oxo-ursol-28-oic acid methyl ester was active in DPPH assay, which is in agreement with the proposed mechanism of this test. This is the first chemical study of *Salvia mexicana* L. var. *minor* (Benth).

Keywords: Triterpenos, *Salvia mexicana* var. *minor*, antiinflammatory activity, chemical transformations.

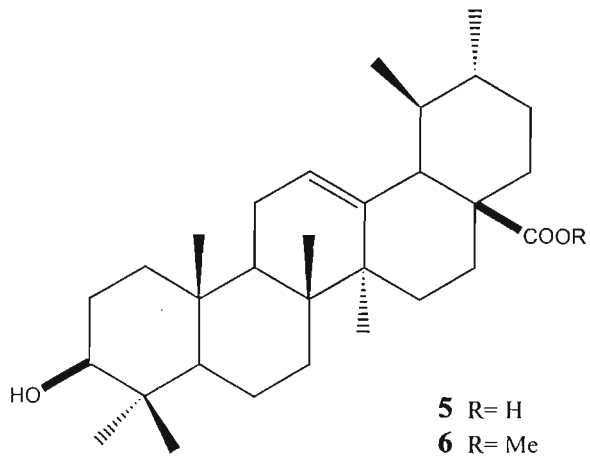
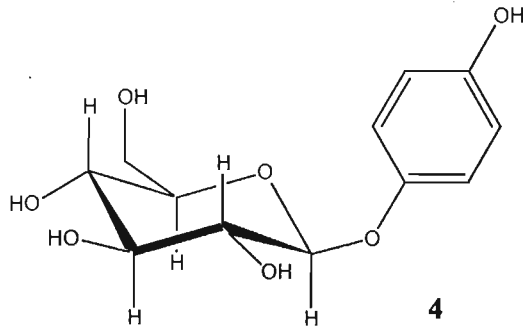
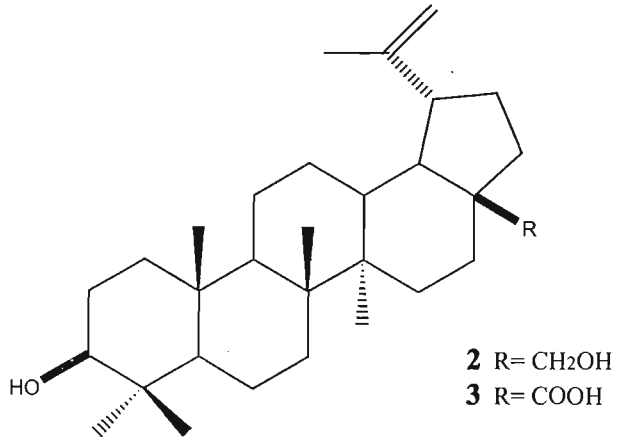
Resumen. Los extractos acetónico y metanólico de las partes aéreas de la *Salvia mexicana* L. var. *minor*, mostraron poseer propiedades antiinflamatorias y antioxidantes en los modelos de TPA y DPPH, respectivamente. La cromatografía de estos extractos permitió el aislamiento de β -sitosterol, betulinol, ácido betulínico, ácido ursólico y arbutina. La presencia de estos triterpenos está de acuerdo con estudios previos de *Salvia*, sin embargo, es la primera vez que se aísla arbutina de una especie de éste género. Posiblemente las propiedades antiinflamatorias de los extractos se deban a la presencia del β -sitosterol y ácido ursólico, compuestos con probadas propiedades antiinflamatorias. Por otro lado, es probable que las propiedades antioxidantes de estos extractos, se deban a la presencia de compuestos minoritarios o a efectos sinérgicos, ya que ninguno de los compuestos aislados fue activo en el modelo de DPPH. Datos recientes en la literatura señalan que algunos derivados de triterpenos pentacíclicos con una cetona α,β -insaturada en el anillo A, presentan una mayor inhibición de la enzima óxido nítrico sintetasa que los triterpenos naturales, por lo que se decidió obtener

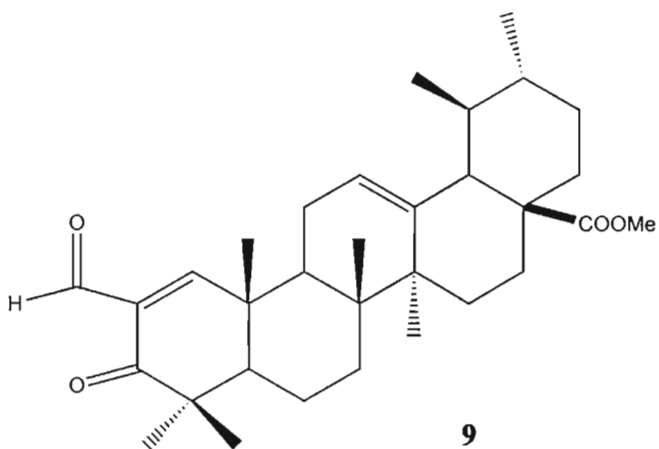
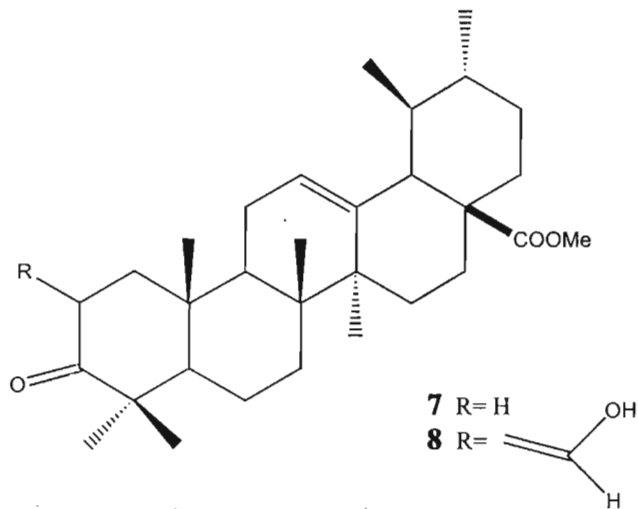
los ésteres metílicos de los ácidos 2-formil-3-oxo-urs-28-oico y 2-formil-3-oxo-urs-1-en-28-oico a partir del ácido ursólico. y evaluarlos en los modelos de DPPH y TPA. Los resultados muestran que ambos tienen propiedades antiinflamatorias, pero sólo el éster metílico del ácido 2-formil-3-oxo-urs-28-oico fue activo en el modelo de DPPH, resultado que está de acuerdo con el mecanismo asociado a esta prueba. Este es el primer estudio químico de la especie *Salvia mexicana* L. var. *minor* (Benth).

Palabra clave: Triterpenos. *Salvia mexicana* var. *minor* , actividad antiinflamatoria, transformaciones químicas.

Introducción

La *Salvia* es un importante género de la familia Lamiaceae que agrupa aproximadamente 900 especies (antes Labiatae). Algunas especies de *Salvia* han sido cultivados en varias partes del mundo ya que son usadas en la medicina tradicional y para propósitos culinarios [1]. Es bien conocido que las hojas secas de la *S. officinalis* (salvia) L., posee propiedades antioxidantes por lo que son usadas en algunos procesos industriales alimenticios, así como remedio en contra de algunas enfermedades humanas [2]. Estudios sobre los constituyentes químicos de la *Salvia* han sido confinados principalmente a la presencia de diterpenos y de tanshinonas [3,4], y varios estudios sobre estos compuestos han sido publicados [5,6]. Adicionalmente hay varias investigaciones sobre la actividad biológica de algunas especies de este género [7,8].





Esquema 1

Resultados y Discusión

Las flores y hojas de esta especie fueron estudiadas por separado. Obteniéndose los extractos hexánico, acetónico y metanólico respectivamente.

El método de reducción de radicales libres mediante DPPH puede ser usado para evaluar la actividad antioxidante de compuestos o extractos específicos en un corto tiempo. Este se basa en la transformación de un radical libre estable 1,1-difenil-2-picril hidrazil (DPPH) a el α -difenil- β -picril hirazina por medio de la actividad oxidante de los compuestos [13].

Por otro lado la inducción de edema es un método que evalúa la habilidad de los compuestos o extractos probados a evitar la reacción de inflamación en respuesta a un edemogena. Los valores de la evaluación antioxidante, por el método de DPPH , de algunos extractos de la *S. mexicana* var. *minor* se muestran en la tabla 1. Mientras que la evaluación de la actividad antiinflamatoria, evaluada por la inducción de edema TPA en ratón son mostrados en la tabla 2.

De acuerdo a estos resultados, el extracto acetónico, metanólico de flores, al igual que el extracto metanólico de hojas son activos en la prueba de DPPH. A diferencia de este modelo, en la prueba de TPA se observó que sólo los extractos hexánico y acetónico de flores fueron activos.

Con el fin de aislar los principios activos, todos los extractos fueron cromatografiados. Del extracto hexánico de flores se aislaron β -sitosterol (**1**) (1; 157 mg; 0.034 %) y betulinol (**2**) (2; 10 mg; 0.002 %), mientras que del ácido ursólico (**3**) (3; 3.612 g; 0.8 %) y de arbutin (4; 563 mg; 0.12 %) fueron aislados del extracto acetónico de flores. El arbutin (**4**) fue el único compuesto aislado de

los extractos metanólicos de hojas y flores, 3.180 g (0.69 %) y 5.103 g (0.96 %) respectivamente. Aunque la presencia de **1**, **2**, **3** en *S. mexicana* var. *minor*, esta de acuerdo a las investigaciones previas fitoquímicas reportadas sobre este género. Para nuestro conocimiento esta es la primera vez que el arbutin es aislado de especies del género *Salvia*.

Todos los compuestos aislados fueron inactivos en la prueba de DPPH, esto indica que la actividad que presentan los extractos es debida a los componentes minoritarios que no se aislaron o a un efecto sinérgico. Estos resultados están de acuerdo con el mecanismo de reacción, por lo cual se postula que la reducción de radicales libres de un compuesto en la prueba de DPPH es atribuida a su habilidad de donar un hidrógeno [14].

Por otro lado las actividades antiinflamatorias del β -sitosterol (**1**) y del ácido ursólico (**3**) están bien documentadas [15, 16] por lo que la presencia de **1** y **3** en éstas especies se relacionan con su actividad antiinflamatoria (tabla 2).

Se sabe que los ésteres de forbol, tal como el TPA, inducen la inflamación de la piel y una respuesta hiperproliferativa con una infiltración neutrofilis [17]. También es conocido como estimulador de PLA₂ y consecuentemente ocurre que libera ácido araquidonico y prostangladinas (18). Aunque el mecanismo por el cual el TPA causa inflamación no es completamente claro, este puede relacionarse en parte a la liberación de mediadores eicosanoides. Así el inhibidor

de ciclooxigenasas y lipoxigenasas como el ácido ursólico han mostrado actividad en el modelo de TPA [19,20].

La alta producción de óxido nítrico (NO) producida por la inducción de la enzima óxido nítrico sintasa ($iNOS$), la cual se expresa mediante la actividad de macrófagos, juega un papel muy importante en la defensa del huésped. Sin embargo la excesiva producción de óxido nítrico puede destruir también la funcionalidad normal de los tejidos durante una inflamación crónica. De un estudio de estructura-actividad entre 80 derivados del ácido ursólico y oléanólico, el 2-ciano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oico es el producto que tiene una alta actividad inhibitoria contra la producción de óxido nítrico inducido por interferón γ (IFN- γ) en macrófagos de ratón. En general se encontró que los derivados del ácido ursólico y oléanólico con una cetona α,β -insaturada en el anillo A tiene una actividad significativa ha significado contra la producción de NO. También es conocido que el ácido ursólico incrementa la actividad de $iNOS$ y así como de la expresión TNF- α a través de la transactivación del NF- κB basado en macrófagos[21]. Tomando esta información en cuenta, se decidió evaluar las propiedades antioxidantes e antiinflamatorias de **8** y **9** .

Los resultados muestran que sólo **8** fue activo en la prueba de reducción de radicales libres (tabla 3), de cualquier forma ambos **8** y **9** muestran casi la misma actividad que la del ácido ursólico como agente antiinflamatorio.

Estos hallazgos indican que la actividad de reducción de radicales libres de **8** es

debida a la habilidad que tiene para donar un hidrógeno, por otro lado en contraste a su actividad inhibitoria contra la producción de óxido nítrico, la presencia de una insaturación en **8** y **9** no son relevantes en términos de su actividad antiinflamatoria, ya que ambos muestran casi la misma actividad del ácido ursólico.

Material y métodos

General. Los puntos de fusión (sin corregir) fueron determinados en un aparato Fisher-Johns. Los espectros de IR fueron corridos en pastillas de KBr o películas líquidas sobre un espectrofotómetro Nicolet modelo Magna 750. Los espectros de masas fueron corridos a 70 eV en un espectrofotómetro de masas Jeol JMS-AX505HA. Los espectros de RMN fueron medidos usando los espectrómetros Varian-Gemini 200 y Varian VXR-300 (^1H , 200 o 300 MHz, ^{13}C , 75.4 MHz) en CDCl_3 o DMSO-d_6 con TMS como estándar interno.

Material vegetal. Las partes aéreas de la *Salvia mexicana* L. var. minor Benth se obtuvieron de un huerto localizado en la calle Xahuen en San Miguel Tlaixpan (Texcoco, Edo. de México, México) en el 2002. Un voucher del espécimen fue depositado en el Herbario Nacional (MEXU-1054424). Las flores (456 g) y las hojas (531 g) se trataron separadamente. Entonces el material vegetal fue exhaustivamente extraído con *n*-hexano, acetona y MeOH, sucesivamente. De las flores, se obtuvieron 24.62 g (5.39%, peso seco) del extracto hexánico, 24.47 g

(5.36%, peso seco) del extracto acetónico y 73.26 g (16.06%, peso seco) del extracto metanólico, mientras que de las hojas fueron obtenidos, 13.19 g (2.48%, peso seco), 29.33 g (5.22%, peso seco), 179.55 g (33.77%, peso seco) respectivamente.

Todos los extractos fueron cromatografiados usando una columna abierta empaquetado con Si-gel (G-Alltech, 0.2-05 mm, ASTM), en una proporción 1:30 para el extracto y eluida con mezclas de disolventes incrementando la polaridad empezando con hexano y terminando con metanol.

Tabla 1. Reducción de radicales libres de algunos extractos de la *S. mexicana* var. *minor*.

Extractos	Concentración (ppm)	Reducción de DPPH (%)
Acetónico (flores)	10	12.64*
	100	84.47*
	1000	95.35*
Metanólico (flores)	10	17.74*
	100	92.86*
	1000	91.55*
Metanólico (hojas)	10	13.55*
	100	90.76*
	1000	92.52*
Ácido Nordihidroguaiaretoico	7.17	94.69*

Los resultados fueron analizados por ANOVA. La comparación estadística fue realizada entre el grupo control y el grupo experimental usando la prueba de Dunnet * $p \leq 0.05$.

Cromatografía del extracto hexánico de flores. Del extracto hexánico de flores se colectaron un total de 65 fracciones de 200 mL cada una. Las fracciones que mostraban TLC similares fueron reunidas, agrupadas en 8 grupos (F1 -- F8): F1 (fracciones 1-15, eluidas con hexano), F2 (fracciones 16-23, eluidas con hexano-

EtOAc 9:1), F3 (fracciones 24-26, eluidas con hexano-EtOAc 9:1), F4 (fracciones 27-35, eluidas con hexano-EtOAc 8:2), F5 (fracciones 36-53, eluidas con hexano-EtOAc 7:3), F6 (fracciones 54-55, eluidas con hexano-EtOAc 1:1), F7 (fracciones 56-62, eluidas con EtOAc) y F8 (fracciones 63-65, eluidas con EtOAc-MeOH 9:1). Se aisló de F3 β -sitosterol (**1**) (157 mg) y betulinol (**2**) (10 mg) de F4.

Cromatografía del extracto acetónico de flores. Del extracto acetónico de flores se colectaron un total de 265 fracciones de 200 mL cada una. Las fracciones que mostraban TLC similares fueron reunidas, agrupadas en 6 grupos (F1 – F6): F1 (fracciones 1-20, eluidas con hexano), F2 (fracciones 21-35, eluidas con hexano-EtOAc 9:1), F3 (fracciones 36-161, eluidas con hexano-EtOAc 7:3), F4 (fracciones 162-237, eluidas con hexano-EtOAc 1:1), F5 (fracciones 238-248, eluidas con EtOAc-MeOH 1:1) y F6 (fracciones 249-265, eluidas con MeOH). Se aisló de F3 ácido ursólico (**3**) (3.682 g) y arbutin (**4**) (563 mg) de F4.

Tabla 2. Actividad antiinflamatoria de algunos de la *S. mexicana* var. *minor*.

Extractos	Edema (mg promedio SE)	Inhibición (%)
Control (metanol)	15.47 \pm 0.32	----
Hexánico (flores)	4.77 \pm 0.50	69.17*
Acetónico (flores)	5.60 \pm 0.91	63.79*
Metanólico (flores)	13.70 \pm 0.31	11.42
Metanólico (hojas)	13.10 \pm 1.07	15.00
Indometacin (control positivo)	1.07 \pm 0.03	91.35*

Todos los extractos fueron probados en dosis de 1 mg en cada oreja. El resultado fue analizado por ANOVA. La comparación estadística fue realizada entre el grupo control y el grupo experimental usando la prueba de t student * $p \leq 0.01$.

Cromatografía del extracto metanólico de flores. Del extracto MeOH de flores se colectaron un total de 111 fracciones de 200 mL cada una. Las fracciones que mostraban TLC similares fueron reunidas, agrupadas en 9 grupos (F1 – F9): F1 (fracciones 1-16, eluidas con hexano), F2 (fracciones 17-33, eluidas con hexano-EtOAc 9:1), F3 (fracciones 34-41, eluidas con hexano-EtOAc 7:3), F4 (fracciones 42-49, eluidas con hexano-EtOAc 1:1), F5 (fracciones 50-77, eluidas con EtOAc), F6 (fracciones 78-89, eluidas con EtOAc-MeOH 9:1), F7 (fracciones 90-93, eluidas con EtOAc-MeOH 7:3), F8 (fracciones 94-102, eluidas con EtOAc-MeOH 1:1) y F9 (fracciones 103-111, eluidas con MeOH). De los grupos F5-F8 se aisló arbutin (**4**) (3.180 g).

Cromatografía del extracto hexánico de hojas. Cuando el extracto fue concentrado, precipito un sólido amarillo (235 mg), el cual fue filtrado y cromatografiado. Se colectaron un total de 16 fracciones de 50 mL cada una. Las fracciones que mostraban TLC similares fueron reunidas, agrupadas en 3 grupos (F1 – F3): F1 (fracciones 1-4, eluidas con hexano), F2 (fracciones 5-8, eluidas con hexano-EtOAc 9:1) y F3 (fracciones 9-16, eluidas con hexano-EtOAc 8:2). El ácido betulínico (**5**) (80 mg, 34%) se aisló de F3. Lo que quedo del extracto (13.19 g) se obtuvieron, un total de 22 fracciones de 200 mL cada una. Las fracciones que mostraban TLC similares fueron reunidas, agrupadas en 6 grupos (F1 – F6): F1 (fracciones 1-4, eluidas con hexano), F2 (fracciones 5-6, eluidas con hexano-EtOAc 9:1), F3 (fracciones 7-12, eluidas con hexano-EtOAc 7:3), F4 (fracciones 13-14, eluidas con hexano-EtOAc 1:1), F5 (fracciones 15-19, eluidas

con hexano-EtOAc 3:7) y F6 (fracciones 20-22, eluidas con EtOAc). El β -sitosterol (**1**) (686 mg) se aisló de los grupos F3-F6.

Cromatografía del extracto acetónico de hojas. Del extracto acetónico de hojas se colectaron un total de 33 fracciones de 200 mL cada una. Las fracciones que mostraban TLC similares fueron reunidas, agrupadas en 9 grupos (F1 – F9): F1 (fracciones 1-3, eluidas con hexano), F2 (fracciones 4-7, eluidas con hexano-EtOAc 9:1), F3 (fracciones 8-10, eluidas con hexano-EtOAc 7:3), F4 (fracciones 11-15, eluidas con hexano-EtOAc 1:1), F5 (fracciones 16-18, eluidas con hexano-EtOAc 3:7), F6 (fracciones 19-21, eluidas con EtOAc), F7 (fracciones 22-25, eluidas con EtOAc-MeOH 7:3), F8 (fracciones 26-29, eluidas con EtOAc-MeOH 1:1) y F9 (fracciones 30-33, eluidas con MeOH). El ácido ursólico (**3**) (4.210 g, 14.35%) fue aislado de los grupos F3-F5 y el arbutin (**4**) (2.103 g) de los grupos F6-F8.

Cromatografía del extracto metanólico. El extracto MeOH de hojas fue particionado entre *n*-butanol y CH₂Cl₂. Obteniendo el extracto de *n*-butanol (46.16 g) el cual fue cromatografiado, dando un total de 22 fracciones de 200 mL cada una. Las fracciones que mostraban TLC similares fueron reunidas, agrupadas en 9 grupos (F1 – F9): F1 (fracciones 1-2, eluidas con hexano), F2 (la fracción 3, eluida con hexano-EtOAc 9:1), F3 (la fracción 4, eluida con hexano-EtOAc 7:3), F4 (la fracción 5, eluida con hexano-EtOAc 1:1), F5 (fracciones 6-8, eluidas con EtOAc), F6 (fracciones 9-13, eluidas con EtOAc-MeOH 9:1), F7

(fracciones 14-15, eluidas con EtOAc-MeOH 7:3), F8 (fracciones 16-18, eluidas con EtOAc-MeOH 1:1) y F9 (fracciones 19-22, eluidas con MeOH). El arbutin (4) (5.103 g, 4.3%) fue aislado de los grupos F6-F9.

La estructura de los compuestos fueron establecidas por comparación de datos espectrales y físicos reportados en la literatura.

Preparación del éster metílico del ácido ursólico (6). Una solución de ácido ursólico (1 g, 2.10 mmol) en una mezcla de éter / MeOH (50 mL) fue enfriada a 0° C en un baño de hielo. El diazometano etéreo fue adicionado hasta que se obtuviese un color amarillo. Después de 24 h el disolvente fue removido por destilación a baja presión dando el ursol-28-oico metil éster (758 mg, 1.61 mmoles, 73.5% de rendimiento).

Tabla 3. Reducción de radicales libres de 8 y 9.

Compuesto	Concentración (ppm)	Reducción de DPPH (%)
2-formil-3-oxo-urs-28-oico éster metílico del ácido	10	12.69*
	100	40.87*
	1000	79.43*
2-formil-2-oxo-urs-1-en-28-oico éster metílico del ácido	10	N.A.
	100	N.A.
	1000	N.A.

Los resultados fueron analizados por ANOVA. La comparación estadística fue realizada entre el grupo control y el grupo experimental usando la prueba de Dunnet * $p \leq 0.05$. N.A. No activo.

Preparación del 3-oxo-urs-28-oico éster metílico (7). En una solución de 6 (750 mg, 1.6 mmol) en acetona (10 mL) fue adicionado un exceso del reactivo de Jones en agitación. El curso de la reacción fue seguida con TLC. Después de 55

min, el exceso del reactivo de Jones fue eliminado adicionando MeOH, posteriormente la mezcla de reacción fue diluida con H₂O (30 mL). Se extrajo con CH₂Cl₂ (4 X 10 mL), secado (Na₂SO₄), se filtro y se evaporo el disolvente quedando un residuo el cual fue cristalizado con hexano-EtOAc, el producto 7 (321 mg, 07 mmol, 43.7% de rendimiento). P.f. 182-184 °C, IR (KBr) γ max (cm⁻¹): 2935, 2867, 1726, 1695, 1459, 1380 y 1142. EMIE 70 eV m/z: 468 (M⁺ C₃₁H₄₈O₃), 453, 419, 407, 262, 249, 203 y 189. RMN ¹H 200 MHz CDCl₃ δ : 5.27 (1H, m, H-12), 3.61 (3H, s, OMe), 2.60 (1H, d, H-18), 2.25 (2H, m, H-2), 1.08 (s, 3H), 1.04 (s, 6H), 1.06 (d, J = 8Hz, 3H), 0.95 (s, 3H), 0.85 (d, J = 7Hz, 3H). 0.79 (s, 3H).

Tabla 4. Actividad antiinflamatoria de **8** y **9**.

Compuesto	Edema (mg promedio SE)	Inhibición (%)
Control (EtOAc)	11.80 6 0.043	-----
2-formil-3-oxo-urs-28-oico éster metílico del ácido	3.03 6 0.80	74.29*
2-formil-2-oxo-urs-1-en-28-oico éster metílico del ácido	3.03 6 0.86	74.29*

Todos los compuestos fueron probados en dosis de 1 mg en cada oreja. El resultado fue analizado por ANOVA. La comparación estadística fue realizada entre el grupo control y el grupo experimental usando la prueba de t student * $p \leq 0.01$. El porcentaje de inhibición del ácido ursólico reportado en la literatura es de 74.4 % en dosis de 1 mg por oreja [16].

Preparación del 2-formil-3-oxo-urs-28-oico éster metílico (8). A una solución de 0.7 mmol de **7** en 7 mL de piridina seca, bajo una atmósfera de nitrógeno, fue adicionado 1.5 mL (18.7 mmol) de formiato de etilo (destilado con pentóxido de fosforo), seguida de 1 mL de una solución de 294 mg (13.3 mmol) de sodio en 6 mL de alcohol metílico absoluto. La solución resultante se mantuvo a temperatura

ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno una noche. La reacción se manifestó por la aparición de un color mas intenso y / o la formación de un precipitado insoluble.

La mezcla fue vertida en una solución fría de 16 mL de ácido acético glacial en 150 mL de agua, y el precipitado resultado fue extraído en CH_2Cl_2 . La fase orgánica fue lavada con agua y después se extrajo con una solución al 2% de hidróxido de potasio (3x 100 mL), lo que se extrajo con la base posteriormente fue lavado con éter y acidificada con 10 mL de ácido acético glacial. La extracción de la fase acuosa con CH_2Cl_2 , en la forma habitual, de dónde se obtuvo el 2-formil-3-oxo-urs-28-oico éster metílico (226 mg, 0.46 mmol, con un rendimiento del 70 %).

Líquido viscoso de color rosa claro. IR (CHCl_3) γ max (cm^{-1}): 2925, 2869, 1725, 1636, 1587, 1455, 1360 y 1147. EMIE 70eV m/z: 496 (M^+ $\text{C}_{32}\text{H}_{48}\text{O}_4$), 481, 478, 437, 421, 262, 249, 233, 203 y 189. ^1H RMN 200 MHz CDCl_3 δ : 14.91 (1H, s, OH quelatado), 8.57 (1H, s, H-23), 5.29 (1H, m, H-12), 3.61 (3H, s, OMe), 2.32 (1H, d, H-18), 1.25, 1.19, 1.11, 1.09, 0.80 (s, 3H para cada uno), 0.93 (d, J = 8Hz, 3H), 0.86 (d, J = 7Hz, 3H).

Preparación del 2-formil-urs-1-en-28-oico éster metílico (9). Se disolvió PhSeCl (120 mg) en 12 mL de CH_2Cl_2 , se enfrió a 0°C y se adiciono 0.06 g (40 μL) de piridina. Después de 15 minutos. fueron adicionados 0.20 g de **8** en 3 mL de CH_2Cl_2 y la mezcla estuvo en agitación por 15 minutos más. La solución

de CH_2Cl_2 fue extraída dos veces con 5 mL de HCl al 10% enfriado previamente a 0°C y una vez con H_2O , se agregan 0.1 mL de H_2O_2 al 30%. Se adicionan 0.1 mL de H_2O_2 al 30% después de 10 minutos y otra vez después de 20 minutos. Al transcurrir otros 10 minutos más se agregaron 0.5 mL de H_2O y la fase orgánica fue separada y lavada con 5 mL de una solución saturada de NaHCO_3 . Se secó con Na_2SO_4 , la solución fue filtrada y el disolvente evaporado en el vacío para dar el producto 9 (53 mg, 0.11 mmol, 24% de rendimiento). Se obtiene un líquido amarillo viscoso. IR (CHCl_3) γ max (cm^{-1}): 2921, 2858, 2721, 1719, 1672, 1604, 1455, 1379, 1224 y 1110. EMIE 70eV m/z: 494 (M^+ $\text{C}_{32}\text{H}_{46}\text{O}_4$), 479, 476, 435, 434, 419, 314, 262, 249, 223, 203, 189, 158, 133 y 117. ^1H RMN 200 MHz CDCl_3 δ : 10.01 (1H, s, COH), 7.80 (1H, s, H-1), 5.38 (1H, m, H-12), 3.62 (3H, s, OMe), 2.28 (1H, d, H-18), 1.25, 1.18, 1.09, 0.96, 0.87 (s, 3H para cada uno), 1.17 (d, $J = 7\text{Hz}$), 0.87 (d, $J = 7\text{Hz}$).

Evaluación de la actividad antioxidante por medio de la reducción de radicales libres. El ensayo de DPPH fue realizado esencialmente de acuerdo al método de Cottele. La mezcla de reacción contiene diferentes concentraciones de la muestra en DMSO y una solución etanólica de 100 mM de DPPH en placas de 96 microlitros, fueron incubadas a 37°C por 30 minutos y subsecuentemente las absorbancias fueron medidas a 515 nm en un lector modelo Elx 808. Las mediciones se llevaron a cabo por triplicado, en por lo menos tres experimentos independientes. El porcentaje de inhibición de cada compuesto fue determinado por la comparación de estos con un blanco (una solución etanólica de DPPH) [22

]. Los resultados fueron analizados por ANOVA. La comparación estadística fue hecha entre un grupo de control y un grupo experimental usando la prueba de Dunnet.

Modelo de inducción de edema por TPA. Animales: Fueron usados ratones macho CD-1, con un peso entre los 20-25 g cada uno. El Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México proporciono los ratones para los ensayos. Todos los animales estuvieron bajo las condiciones de laboratorio en una casa de ratones (temperatura $27 \pm 0^{\circ}\text{C}$), fueron alimentados con una dieta alimenticia balanceada y agua *ad libitum*. Todos los experimentos se llevaron a cabo usando un grupo de 4-8 animales. Los efectos de las sustancias probadas sobre el edema inducido por TPA en oreja de ratones fue llevado a cabo como lo describe De Young [17] con algunas ligeras modificaciones. Los compuestos (1 mg / por oreja) fueron aplicadas como frecuentemente se hace. La solución de TPA (2.5 μg) en EtOH (10 μL) fueron aplicadas típicamente en ambas caras (5 μL en cada cara) en la oreja derecha del ratón . 10 minutos después las sustancias probadas fueron aplicadas (10 μL en cada cara). Mientras que la oreja izquierda recibe primero etanol (10 μL) y 20 μL del respectivo disolvente subsecuentemente.

Cuatro horas después los ratones fueron sacrificados por dislocación cervice. Las biopsias circulares (7mm de diámetro) fueron removidas de cada oreja. La inflamación fue evaluada con la diferencia de peso entre la oreja derecha e

izquierda (Carlson et al. 1985) La inhibición de edema (EI, %) fue calculada por la ecuación: $EI(\%) = 100 - [B \times 100/A]$; de donde A = edema inducido por TPA solamente, y B = edema inducido por TPA mas la muestra.

Los datos fueron expresados con la media \pm de 4-8 ratones. Todos los extractos y los compuestos fueron probados en dosis de 1mg/por oreja. Los resultados fueron analizados por ANOVA. La comparación estadística fue hecha entre el grupo de control y el grupo de experimentación usando una t student * $p \leq 0.01$.

Referencias

1. Lu, Y.; Yeap-Foo, L. *Phytochemistry*. **2002**, *59*, 117-140.
2. Baricevic, D.; Sosa, S.; Delia Loggia, R.; Tubazo, A.; Simonovska, B.; Krasna, A.; Zupancic, A. *J of Ethnopharmacology*, **2001**, *75*, 125-132.
3. Chang, H. M.; Cheng, K. P.; Choang, T. F.; Chow, H. F.; Chui, K. Y.; Hon, P. M.; Lau Tan, F. W.; Yang, Y.; Zhong, Z. P.; Lee, C. M.; Sham, H. L.; Chan, C. F.; Cui, Y. X. *J of Organic Chemistry*, **1990**, *55*, 3537-3543.
4. Zhang, K. Q.; Bao, Y.; Wu, P.; Rosen, R. T.; HO, C. T. *J of Agricultural and Food Chemistry*, **1990**, *35*, 1194-1197.
5. Tang, W.; Eisenbrand, G. Chinese Drugs of Plant Origin. Chemistry, Pharmacology. and Use in Traditional and Modern Medicine. Springer-Verlag, Berlin. Heidelberg. pp. 891-902 (1992).
6. Rodriguez-Hahn, L.; Esquivel, B.; Cardenas, J. *Recent Advances in Phytochemistry* 1995,29,311-332.
7. Takahashi, K.; Ouyang, X.; Komatsu, K.; Nakamura, N.; Hattori, M.; Baba, A.; Azuma, J. *Biochemical Pharmacology* **2002**, *64*, 745-750.
8. Cao, C-M.; Xia, Q.; Zhang, X.; Xu, W-H.; Jiang, H-D.; Chen, J-Z. *Life Sciences*, 2003,72,2451-2463.
9. Ebringerova, A.; Kardosova, A.; Hromadkova, Z.; Hibalova, V. *Fitoterapia*, **2003**, *74*,52-61.
10. Esquivel, B.; Ramírez-Dávalos, N.; Espinosa-Pérez, G. *Heterocycles*, **1999**, *57*, 1647-1651.
11. Collera, O.; Gomora, E.; García Jiménez, F. *Rev. Latinoamer. Quim.* **1980**, *77*, 60-62.
12. Estrada-Reyes, R.; Álvarez, C.; López-Rubalcava, C.; Rocha, L.; Heinze, G.; Moreno, J.; Maitinez-Vazquez, M. *Z Naturforsch*, 2002, *57c*, 29-32.
13. Tamil Selvi, A.; Joseph, G. S.; Jayaprakasha, G. K. *Food Microbiology*, **2003**, *20*, 455-460.

14. Shimada, K. K.; Fujikawa, K. Y.; Nakumara, T. J. *Agric. Food Chern.* **1992**, *40*, 945-948.
15. Martinez-Vázquez, M.; Ramírez A. T. O.; Lazcano, M. E.; Bye, R. *Rev. Soc. Quim. Mex.* **1999**, *43*, 103-105.
16. Recio, M. C.; Giner, R.; Terencio, M. C.; Sanz, M. J.; Rios, J. L. *Planta Med.* 1991, *57*, A56-57.
17. De Young, L. M.; Kheifets, J. B.; Ballaron, S. L.; Young, J. M. *Agents Actions*, 1989, *26*, 335-341.
18. Fuerstenberg, G.; Richter, H.; Fusening, N. E.; Marks, F. *Cancer Lett.* **1981**, *77*, 191-198.
19. Carlson, R. P.; O'Neil-Davis, L.; Chang, J.; Lewis, A. J. *Agents Actions*, **1985**, *77*, 197-204.
20. Najid, A.; Simon, A.; Cook, J.; Chable-Rabinovitch, H.; Delage, C.; Chulia, A. J.; Rigaud, M. *FEBS*, **1992**, *299*, 213-217.
21. You, H. J.; Chul, Y. C.; Ji, Y. K.; Park, S. J.; Hahm, K.; Jeong, H. G. *FEBS Lett.* **2001**, *509*, 156-160.
22. Cottele, N.; Bemier, J. L.; Catteau, J. P.; Pommery, P.; Wallet, J. C.; Gaydou, E. M.. *Free Radical Biology & Medicine* **1996**; *20*: 35-43.

CONCLUSIONES

En primer instancia, se contribuyó al acervo científico en el área de la fitoquímica de la flora nacional. En el presente trabajo se logró el aislamiento y elucidación estructural de los compuestos presentes en la *Salvia mexicana* var. *minor* Benth, Así del extracto hexánico de flores se logró aislar β -sistoterol y el alcohol betulínico. Mientras que del extracto hexánico de hojas se obtuvo β -sistoterol y ácido betulínico. El compuesto mayoritario en ambos extractos fue el β -sitosterol.

Del extracto acetónico de flores y de hojas se aisló el ácido ursólico y el arbutin, obteniéndose en mayor proporción a éste último.

De los extractos metanólicos sólo se aisló arbutin en una proporción abundante.

El perfil químico de la *Salvia mexicana* var. *minor* no concuerda con las demás especies de *Salvias* ya que no se aislaron diterpenos, los cuales son compuestos con gran importancia quimiotaxonomica para el género.

La presencia del arbutin en abundancia, de acuerdo en la literatura puede estar relacionado a la supervivencia de la planta en condiciones adversas.

Por otro lado se evaluaron los extractos, acetónico de flores y metanólico tanto de flores e hojas en la prueba de DPPH, los resultados mostraron que los tres extractos tienen una buena actividad antioxidante. Los compuestos aislados: ácido ursólico, ácido betulínico, alcohol betulínico y arbutin no mostraron actividad en la prueba de DPPH. Lo cual hace suponer que la mezcla constituyente de los extractos es la responsable de esta actividad.

Sin embargo en la prueba de TPA. se ensayaron los extractos: hexánico, acetónico y metanólico de flores además del metanólico de hojas. En este caso los dos extractos metanólicos tanto de hojas como de flores fueron negativos en esta prueba. Mientras que el extracto hexánico mostró cierta actividad, que se relaciona con la presencia del β -sitosterol y el alcohol betulínico presentes en este extracto y que tiene antecedentes de poseer una buena actividad antiinflamatoria. De igual manera sucede con el extracto acetónico de flores que como se ha mencionado el componente mayoritario es el ácido ursólico que también tiene antecedentes de presentar una relevante actividad antiinflamatoria.

Sabiendo por medio de antecedentes bibliográficos que el ácido ursólico, ácido betulínico, alcohol betulínico e β -sitosterol tienen una buena actividad antiinflamatoria, no se probaron en la prueba de TPA. Sin embargo se realizaron modificaciones químicas al ácido ursólico con el fin de obtener moléculas con mayor actividad (las modificaciones químicas sólo se efectuaron en el ácido ursólico por

tener suficiente cantidad de este para llevar a cabo las reacciones correspondientes).

Las modificaciones realizadas produjeron al derivado formilado e insaturado del ácido ursólico. Los cuales se evaluaron en la prueba del TPA, mostrando ambos compuestos ser activos, sin embargo casi con la misma actividad que el compuesto original.

En la evaluación de estos compuestos en el modelo del DPPH se observó que solo es activo el derivado formilado y que la insaturación no mejora la actividad.