



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA**

**“AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPONENTES
QUÍMICOS DE *Salvia polystachya*”**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACEUTICO BIÓLOGO
PRESENTA:
FRANCISCO ELIHU BAUTISTA REDONDA**

MÉXICO, D.F.

2007



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: Dra. MARIA ISABEL AGUILAR LAURENTS

Vocal: Profa. ROSA LUZ CORNEJO ROJAS

Secretario: Dr. ALFREDO ORTEGA HERNANDEZ

1er Suplente: Dr. JOSE FEDERICO DEL RIO PORTILLA

2do Suplente: Prof. RICARDO ALFARO FUENTES

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 2-7, Departamento de Productos Naturales
Instituto de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

Sustentante

Francisco Elihú Bautista Redonda

Asesor

Dr. Alfredo Ortega Hernández

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor el Dr. Alfredo Ortega Hernández por todo el apoyo y asesoría brindada para cultivarme académica y culturalmente.

A la M. en C. Emma Maldonado Jiménez por su valiosa ayuda y recomendaciones durante el desarrollo de este trabajo.

A la M. en C. Carmen Márquez por su apoyo en la determinación de los parámetros cromatográficos y de espectrometría de masas.

A la profesora Xochitl Arévalo Mora por su apoyo académico durante el curso de la carrera.

A mi madre Mariana y hermanos por su incondicional ayuda para concluir con mis estudios.

A mis amigos y compañeros con quien compartí los momentos de vida académica.

Al Sistema Nacional de Investigadores (SNI) por la beca otorgada para la realización de este trabajo

Contenido

	Página
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IV
LISTA DE TABLAS.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VII
Capítulo 1: INTRODUCCIÓN.....	1
Capítulo 2: ANTECEDENTES.....	2
2.1 Taxonomía	2
2.1.1 Familia Labiatae.....	2
2.1.2 Género <i>Salvia</i>	4
2.1.3 Subgénero Calosphace.....	5
2.1.4 Sección Polystachyae.....	5
2.1.5 <i>Salvia polystachya</i>	6
2.1.5.1 Descripción.....	6
2.1.5.2 Nombre común.....	6
2.1.5.3 Usos.....	6
2.1.5.4 Distribución.....	7
2.1.5.5 Química.....	7
2.2 Terpenos.....	9
2.2.1 Diterpenos.....	9

	Página
2.2.2 Funciones biológicas de diterpenos.....	11
2.2.3 Actividad biológica de diterpenos con esqueleto de clerodano.....	11
2.2.4 Biosíntesis de diterpenos.....	11
Capítulo 3: PARTE EXPERIMENTAL.....	13
3.1 Extracción.....	13
3.2 Aislamiento.....	13
3.3 Identificación.....	14
3.4 Purificación.....	15
3.5 Material y equipo utilizado.....	17
Capítulo 4: RESULTADOS Y DISCUSION.....	18
Capítulo 5: CONCLUSIONES.....	31
Capítulo 6: BIBLIOGRAFIA.....	32

Página

APENDICE.....	35
Cromatogramas.....	36
1. Mezcla de polystachynas A-E, salvifaricina y linearolactona.....	37
2. Fracción II-III-C-a.....	38
3. Fracción II-III-C-b.....	39
4. Fracción II-III-C-d.....	40
5. Fracción II-III-C-e.....	41
6. Fracción II-III-B.....	42
7. Fracción II-III-B cristales.....	43
8. Mezcla de compuestos de referencia fortificada con la fracción III-C-e.....	II- 44
9. Ionograma 1: Fracción II-III-C-e.....	45
10. Ionograma 2: Mezcla de diterpenos de referencia fortificada con la fracción II-III-C-e.....	46
11. Espectros de masas de cada señal del ionograma 2.....	47
Espectros.....	52
1. IR de la Polystachyna F.....	53
2. EM de la Polystachyna F.....	54
3. RMN ¹ H de la Polystachyna F.....	55
4. RMN ¹³ C de la Polystachyna F.....	56
5. Espectro DEPT de la Polystachyna F.....	57
6. Experimento de RMN: HSQC.....	58
7. Experimento de RMN: COSY.....	59
8. Experimento de RMN: HMBC.....	60
9. Experimento de RMN: NOESY	61

1.- INTRODUCCION

Las plantas han sido empleadas por el hombre a través de su historia para tratar distintos padecimientos; y en mesoamérica el uso de las plantas para tratar enfermedades no fue la excepción.

La *Salvia polystachya* ha sido empleada desde la época prehispánica por culturas como la mexicana. Las semillas de esta especie, junto con las de *S. hispanica* e *Hyptis suaveolens* formaban parte de la dieta y en conjunto estas tres especies conforman el complejo llamado "Chía". Esta planta tiene uso en la medicina tradicional, por lo que resulta importante estudiar químicamente a fondo la especie con la finalidad de conocer la mayoría de los metabolitos secundarios que confieren actividad a la planta.

1.2.- Objetivos

- ✓ Realizar un estudio fitoquímico de *Salvia polystachya*.
- ✓ Realizar la búsqueda de nuevos metabolitos secundarios o precursores de los ya conocidos en *Salvia polystachya*.
- ✓ Contribuir al conocimiento de la quimiotaxonomía del género *Salvia* y de la sección Polystachyae.

1-3.- Hipótesis

En un estudio preliminar fueron aislados nueve metabolitos secundarios de tipo terpenoide de *S. polystachya* y es probable que la planta produzca un número mayor de compuestos a los ya conocidos, aunque en menor cantidad.

2. - ANTECEDENTES

2.1. -Taxonomía

Salvia polystachya tiene la siguiente clasificación taxonómica: ⁶

Tabla 1: Clasificación taxonómica de *Salvia polystachya*.

Familia	Labiatae
Género	<i>Salvia</i>
Subgénero	Calosphace
Sección	Polystachyae
Especie	<i>Salvia polystachya</i> Ort.

2.1.1. -Familia Labiatae

Las culturas nativas y mestizas de América, han empleado un gran número de especies de esta familia; su uso está integrado en el complejo sistema socio-cultural; y una especie de planta medicinal puede tener diferentes funciones que dependen de la ubicación y distribución geográfica que ésta tenga.^{1,2}

La familia Labiatae es una familia distribuida en todo el mundo, consta de aproximadamente 4 000 especies agrupadas en 220 géneros; algunas de las especies son: la menta (*Mentha spicata*), el tomillo (*Thymus vulgaris*), y el orégano (*Origanum vulgare*) entre otras; con importancia económica por su contenido de aceites esenciales.^{1,2}

Las labiadas también son importantes por su uso en la medicina tradicional, este uso está directamente relacionado con los metabolitos secundarios (principalmente diterpenos) en cada especie, algunos de éstos son responsables de la actividad biológica.^{1,2}

Algunos géneros de plantas de la familia Labiatae, usados en la medicina tradicional y cuya actividad biológica se debe al contenido de diterpenos son: ¹

- ✓ *Ajuga:*
- ✓ *Coleus:*
- ✓ *Scutellaria*
- ✓ *Salvia*
- ✓ *Rabsodia*
- ✓ *Teucrium*

Los diterpenos encontrados en esta familia presentan esqueleto carbonado de: abietano (1), icetexano (2), ent-kaurano (3), labdano (4) y neo-clerodano (5).¹

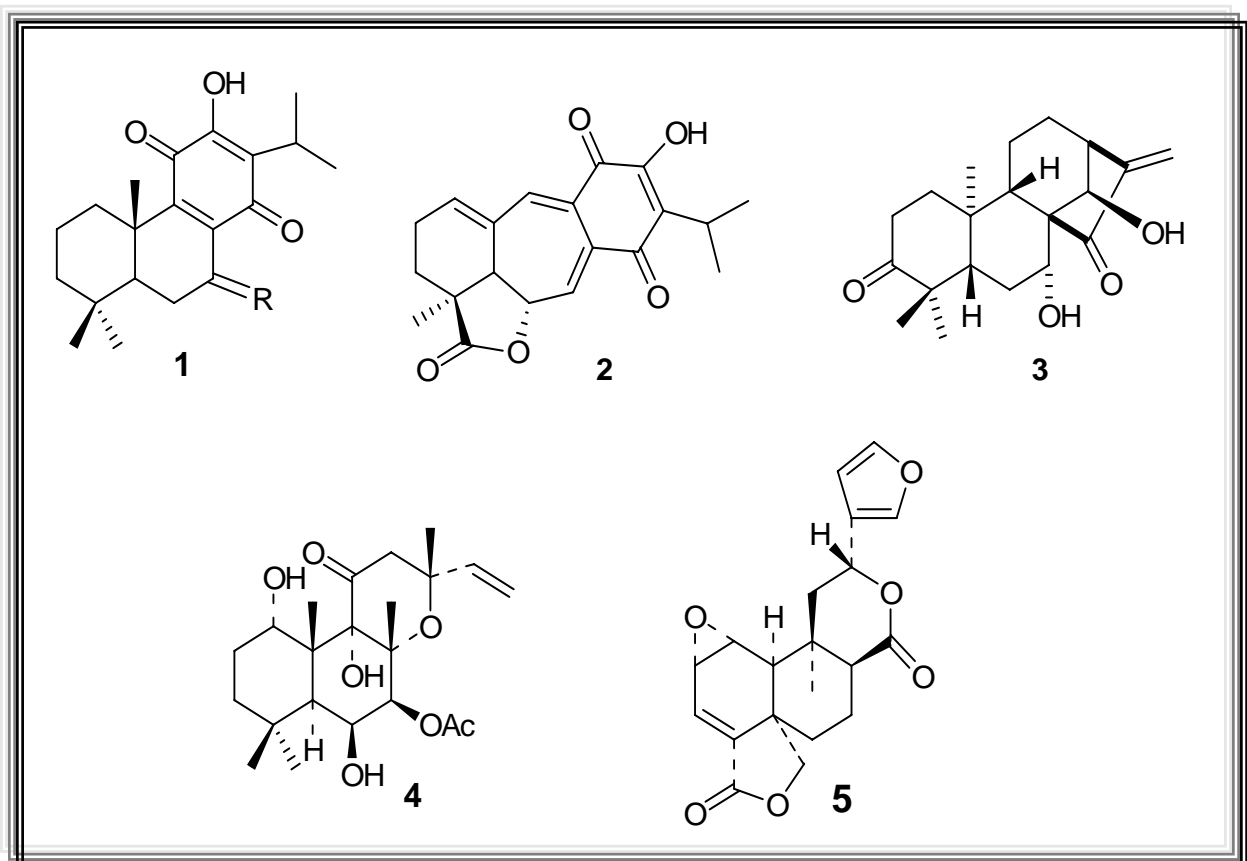


Figura 1: Diterpenos de la Familia Labiatae.

2.1-2. -Género *Salvia*

Este género consta de 900 especies agrupadas en 4 subgéneros (Bentham)³, la sistemática empleada para esta clasificación toma en cuenta sus características morfológicas y su distribución geográfica; los cuatro subgéneros son:¹

- ✓ *Salvia*
- ✓ *Sclarea*
- ✓ *Leonia*
- ✓ *Calosphace*

Uno de los usos más espectaculares de una especie del género *Salvia* es *Salvia divinorum* Epl. & Jativa², es una labiada empleada por los indígenas Mazatecos de la sierra de Oaxaca, por el efecto alucinógeno que produce al masticar sus hojas, fumarlas o beber una infusión de las mismas; es conocida como: “María pastora, Ska pastora u Hoja de la meditación”.² Los metabolitos responsables de este efecto son diterpenos con esqueleto de neo-clerodano y el principal es la *Salvinorina A*.⁴ Es uno de los pocos compuestos no nitrogenados que producen un efecto psicoactivo.^{4, 5}

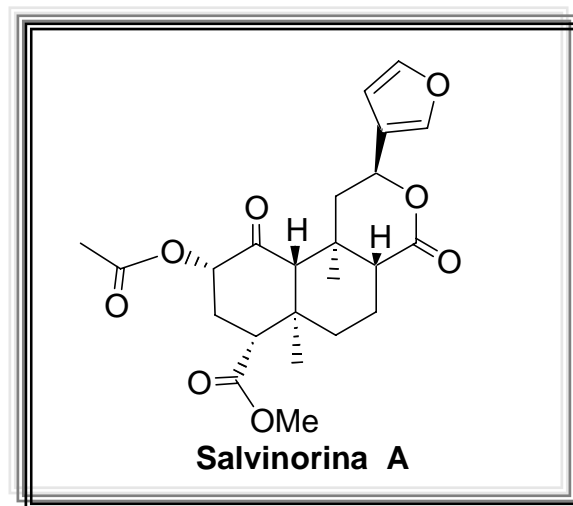


Figura 2: Estructura del diterpeno con esqueleto de neo-clerodano, responsable del efecto psicoactivo de *Salvia divinorum*.

2.1-3. - Subgénero Calosphace

Este subgénero consta de 105 secciones (Epling)⁶, y representa a las especies de *Salvia* distribuidas en México, Centro y Sur de América.

2.1.4. - Sección Polystachyae

Considera a 14 especies (tabla 2) distribuidas en México y América Central:⁶

Tabla 2: Especies de *Salvia* que conforman la sección Polystachyae

Especie	Especie
Salvia brachyodonta	Salvia lenta
Salvia compacta	<i>Salvia obtorta</i>
<i>Salvia connivens</i>	<i>Salvia perblanda</i>
<i>Salvia decora</i>	<i>Salvia plurispicata</i>
<i>Salvia durantiflora</i>	<i>Salvia polystachya</i>
<i>Salvia filipes</i>	<i>Salvia sacculus</i>
<i>Salvia igualensis</i>	<i>Salvia tonallensis</i>

La especie más representativa de esta sección es *Salvia polystachya*.⁶

2.1.5. - *Salvia polystachya*

2.1,5.1. - Descripción

Hierba hemicriptofita, hermafrodita que puede llegar a medir hasta un metro y medio de altura. Las ramas son pubescentes y los tallos son cuadrangulares.

Hojas

Opuestas de forma oval. El ápice es acuminado, el borde aserrado y la base obtusa.

Flor

Zigomorfa, bilabiadas de color azul; forman racimos terminales muy densos.

Fruto

Esquizocarpo.

Fenología

Florece desde mediados de junio hasta noviembre y fructifica de octubre a enero.⁷

Es una especie de hábito terrestre, arvense que crece desde los 2100 hasta los 2300 msnm. asociada a bosque de pino-encino. Es característica de las orillas de campos de cultivo y en barrancas.⁸

2.1.5.2. - Nombre común

Es conocida como “Chía”, aunque también otras especies de plantas se conocen con el mismo nombre, como es el caso de *Salvia hispánica* e *Hyptis suaveolens*; y en conjunto las tres especies forman el complejo llamado “Chía”.²

2.1.5.3. - Usos

- ✓ Preparación de aguas frescas (semillas).²
- ✓ Diurético (hojas).²
- ✓ Tratamiento de disentería (hojas y flores).⁹
- ✓ Purgante (hojas y flores).⁹

2.1.5.4. - Distribución

La distribución nacional de *S. polystachya* comprende los siguientes estados de la república mexicana: ⁶



Figura 3: Distribución nacional de *Salvia polystachya*.

2.1.5.5.- Química

Los metabolitos que han sido aislados de las partes aéreas de *Salvia polystachya*, son diterpenos con esqueleto de neoclerodano.¹⁰

De estos metabolitos, el diterpeno Linearolactona ha sido aislado de *Salvia lineata*,¹¹ la Dehydrokerlina fue obtenida de *Salvia rhyacophila*¹², la Salvifaricina fue encontrada en *Salvia farinacea*¹³, $1\alpha,2\alpha$ -epoxy-3,4 α -dihidro-linearolactona

identificada y aislada en *Salvia reptans*¹⁴; finalmente las Polystachynas A-E son metabolitos propios de la planta, hasta la fecha reportados sólo en *Salvia polystachya*.¹⁰ Los diterpenos aislados de *Salvia polystachya* se ilustran en la figura 4.

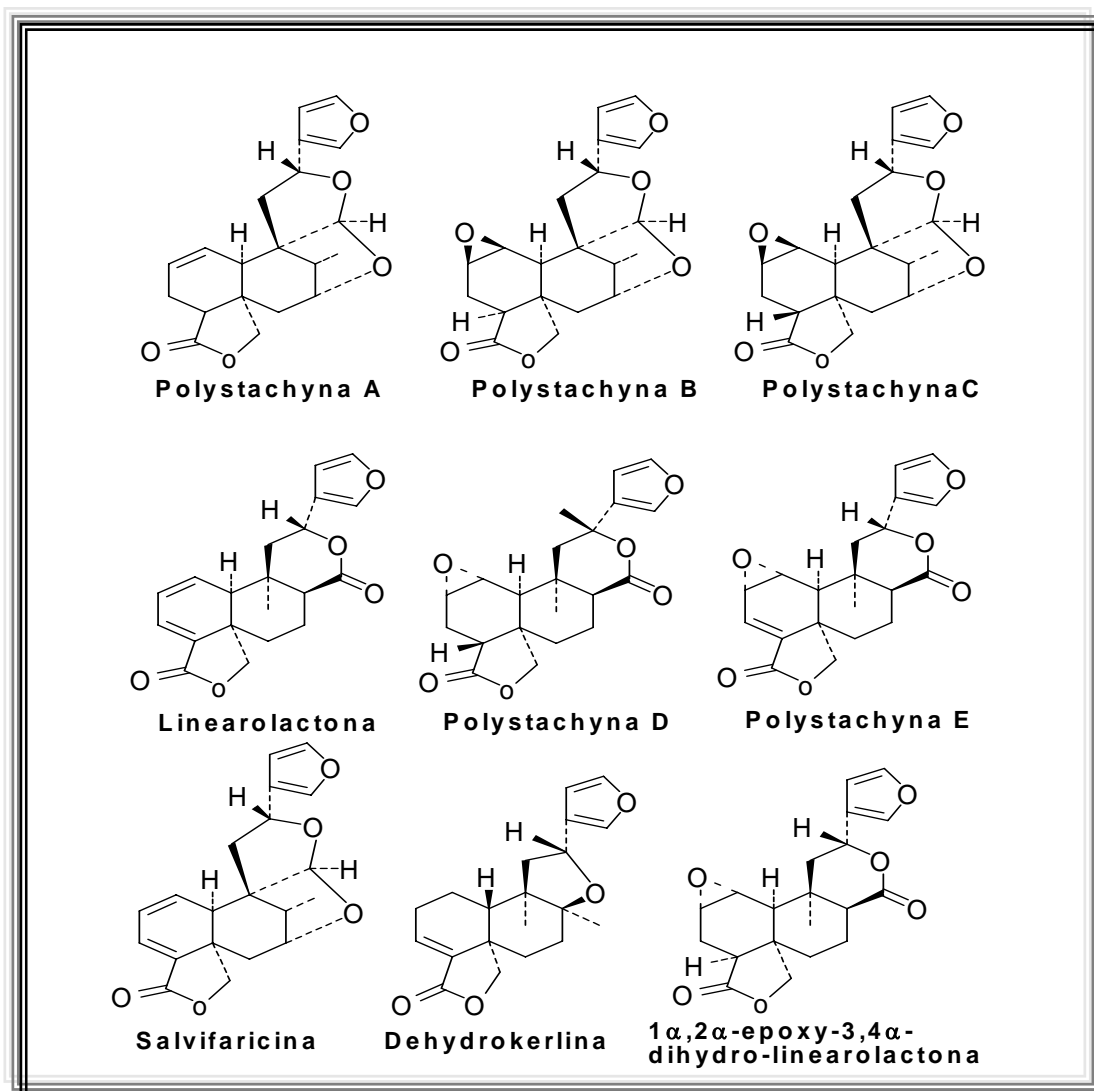


Figura 4: Metabolitos secundarios aislados de *Salvia polystachya*.

2.2.- Terpenos

Los principales metabolitos aislados del género *Salvia* son compuestos de tipo terpenoide (diterpenos); estos son compuestos de origen natural constituidos por unidades de isopreno y se clasifican de acuerdo al número de átomos de carbono y número de unidades de isopreno en:^{19, 20}

Tabla 3: Clasificación de terpenos.

Tipo de terpeno	Unidades de isopreno
Monoterpenos (C ₁₀)	Dos
Sesquiterpenos (C ₁₅)	Tres
Diterpenos (C ₂₀)	Cuatro
Sesterpenos (C ₂₅)	Cinco
Triterpenos (C ₃₀)	Seis

2.2.1.- Diterpenos

Los diterpenos son por definición compuestos con 20 átomos de carbono, contienen 4 unidades de isopreno y son una clase de productos naturales aislados principalmente de plantas, insectos y organismos marinos. Pueden ser divididos de acuerdo a su estructura en:²⁰

- ✓ Alifáticos
- ✓ Monocíclicos
- ✓ Bicíclicos
- ✓ Tricíclicos
- ✓ Policíclicos

El nombre que se le adjudica a cada diterpeno es a partir de la fuente biológica de la cual se obtuvo, generalmente influye el género y especie del organismo al nombrar un nuevo diterpeno. También existe una forma semisistemática de dar nombre a los diterpenos, basados en estructuras o esqueletos carbonados; y solo se indica el nombre del esqueleto carbonado.²⁰

En los años 70 se conocían 650 diterpenos agrupados en 70 estructuras base y para finales de los años 90 cerca de 2000 compuestos diterpenoides distribuidos en 170 esqueletos.²⁰

De los 170 esqueletos base, solo 7 de ellos originan cerca del 50 % de los diterpenos conocidos (Figura 5).²⁰

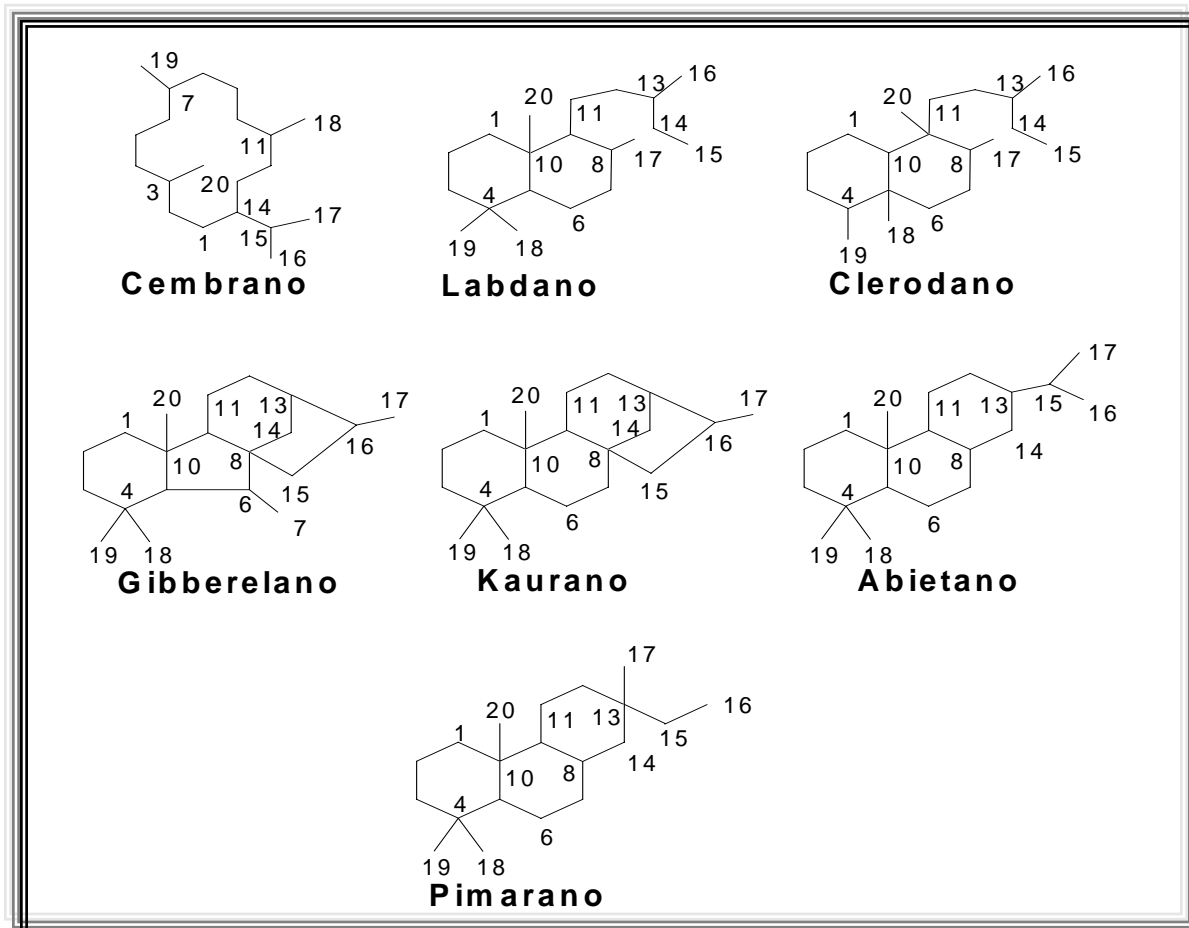


Figura 5: Principales esqueletos carbonados de diterpenos.

2.2.2.- Funciones biológicas de diterpenos

Las funciones biológicas de estos compuestos, por citar algunas son:

- ✓ Mensajeros químicos (Las termitas biosintetizan compuestos de este tipo para emplearlos como feromonas).
- ✓ Defensa química contra depredadores y parásitos (Efecto antialimentario en insectos).
- ✓ Interacciones ecológicas (alelopatía).²⁰

2.2.3.- Actividad biológica de diterpenos con esqueleto de clerodano

Los diterpenos conocidos de *Salvia polystachya* tienen un esqueleto carbonado de clerodano y los diterpenos con este tipo de esqueleto poseen diferentes tipos de actividad biológica en mamíferos, algunas de estas son:

- ✓ Antiinflamatoria¹⁴
- ✓ Citotóxica¹⁴
- ✓ Antiplasmódica¹⁵
- ✓ Antileishmánica¹⁵
- ✓ Antialimentaria en insectos¹⁶
- ✓ Antibacteriana¹⁷

2.2.4.- Biosíntesis de diterpenos

La forma en la que se lleva a cabo la biosíntesis de estos metabolitos es por la vía DOXP (1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato) en el compartimiento plastídico, a partir de IPP y DMAPP,²⁰ siendo su principal precursor biosintético el GGPP.²¹

Un ejemplo claro de la biosíntesis de diterpenos a partir de su precursor es la biosíntesis del esqueleto de clerodano a partir de GGPP (Figura 6).

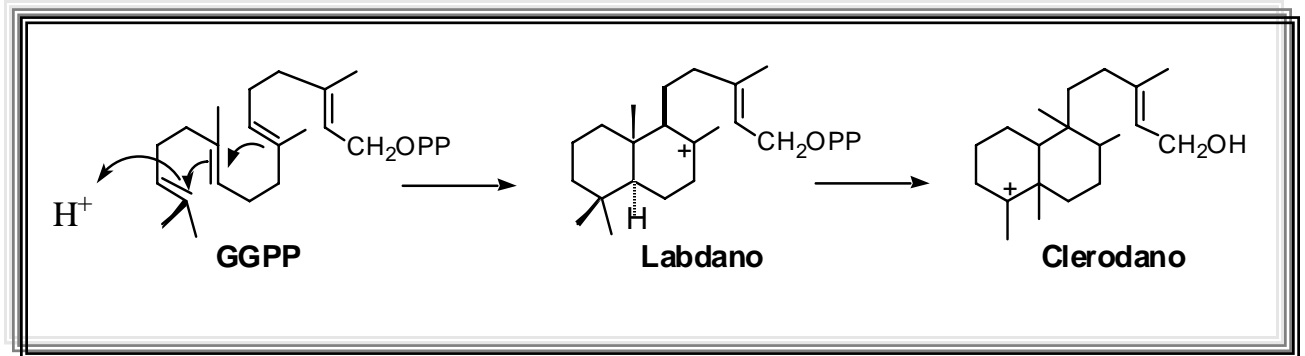


Figura 6: Biosíntesis del esqueleto de clerodano a partir de GGPP

3.- PARTE EXPERIMENTAL.

3.1.- Extracción

El material vegetal fue recolectado el día 8 de Junio de 2005, en los alrededores de Huitzilac, Morelos. Posteriormente el material vegetal fue desecado bajo la sombra a temperatura ambiente por una semana.

Una vez seca la planta, se realizó la respectiva molienda, obteniendo una cantidad de 1200 g; se empacó en una columna (28 cm altura x 11 cm de diámetro interno) y se realizó una extracción por percolación con acetona-metanol (10 y 2 l). Se obtuvieron 86.9 g de extracto total.

3.2.- Aislamiento

El extracto total de acetona-metanol, fue percolado en una columna (16 cm altura x 10 cm de diámetro interno) con sílica gel de fase normal Merck 60 G y eluida con CH_2Cl_2 -AcOEt en polaridad ascendente. Se obtuvieron 7 fracciones; las fracciones II y III fueron reunidas (15.67 g) para ser fraccionadas nuevamente.

La fracción II-III fue percolada en carbón activado y eluida con MeOH, después se realizó un nuevo fraccionamiento por cromatografía en columna empleando como fase estacionaria celita y como fase móvil un sistema de tres disolventes: Hex-AcOet-Acetona. Se eluyó en polaridad ascendente, obteniendo 93 fracciones; estas se reunieron en el siguiente orden:

- ✓ 4-6 (A)
- ✓ 7-14 (B)
- ✓ 15-39 (C)
- ✓ 40-43 (D)
- ✓ 44-48 (E)

Se realizó una cromatografía en columna para realizar la separación de los componentes de (C), adsorbiendo a (C) en celita, la fase estacionaria para

cromatografía fue Sílica gel 60 G; se eluyó con Hex-AcOEt en polaridad ascendente. Se obtuvieron 37 fracciones y se reunieron de la siguiente forma:

- ✓ 7 (a)
- ✓ 8-10 (b)
- ✓ 11-13 (c)
- ✓ 14-19 (d)
- ✓ 20-27 (e)

3.3.- Identificación

Una vez obtenidas estas fracciones, se llevó a cabo un estudio cualitativo por HPLC y HPLC-MS para identificar nuevos metabolitos. El estudio consistió en evaluar las fracciones obtenidas de II-III (ver figura 7), comparando los tiempos de retención de cada señal de estas fracciones con los tiempos de retención de los metabolitos ya aislados (Polystachynas A-E, linearolactona y salvifarinina) considerados como estándares, debido a que se contó con ellos en forma pura, obtenidos previamente en nuestro laboratorio.

Las condiciones de trabajo de HPLC y HPLC-MS en las que se observó la separación de cada metabolito en una mezcla de éstos fueron:

- ✓ Flujo: 1ml/min
- ✓ Columna: IB-SIL 5 PHENIL
- ✓ Fase estacionaria: Sílice modificada con fenilos.
- ✓ Diámetro interno: 1.5 mm
- ✓ Tamaño de partícula: 5 μ m
- ✓ Longitud: 250 mm
- ✓ Volumen de inyección: 10 μ l

Cromatografía de gradiente

Tabla 4: Proporción de disolventes para cada intervalo en la cromatografía de gradiente

Fase móvil	Proporción	Tiempo (min.)
H ₂ O/AcCN	80:20	0
H ₂ O/AcCN	40:60	20
H ₂ O/AcCN	20:80	25
H ₂ O/AcCN	80:20	30

Orden de elución:

Metabolito

Polystachyna C < D < B < E < Linearolactona < Salvifaricina < A

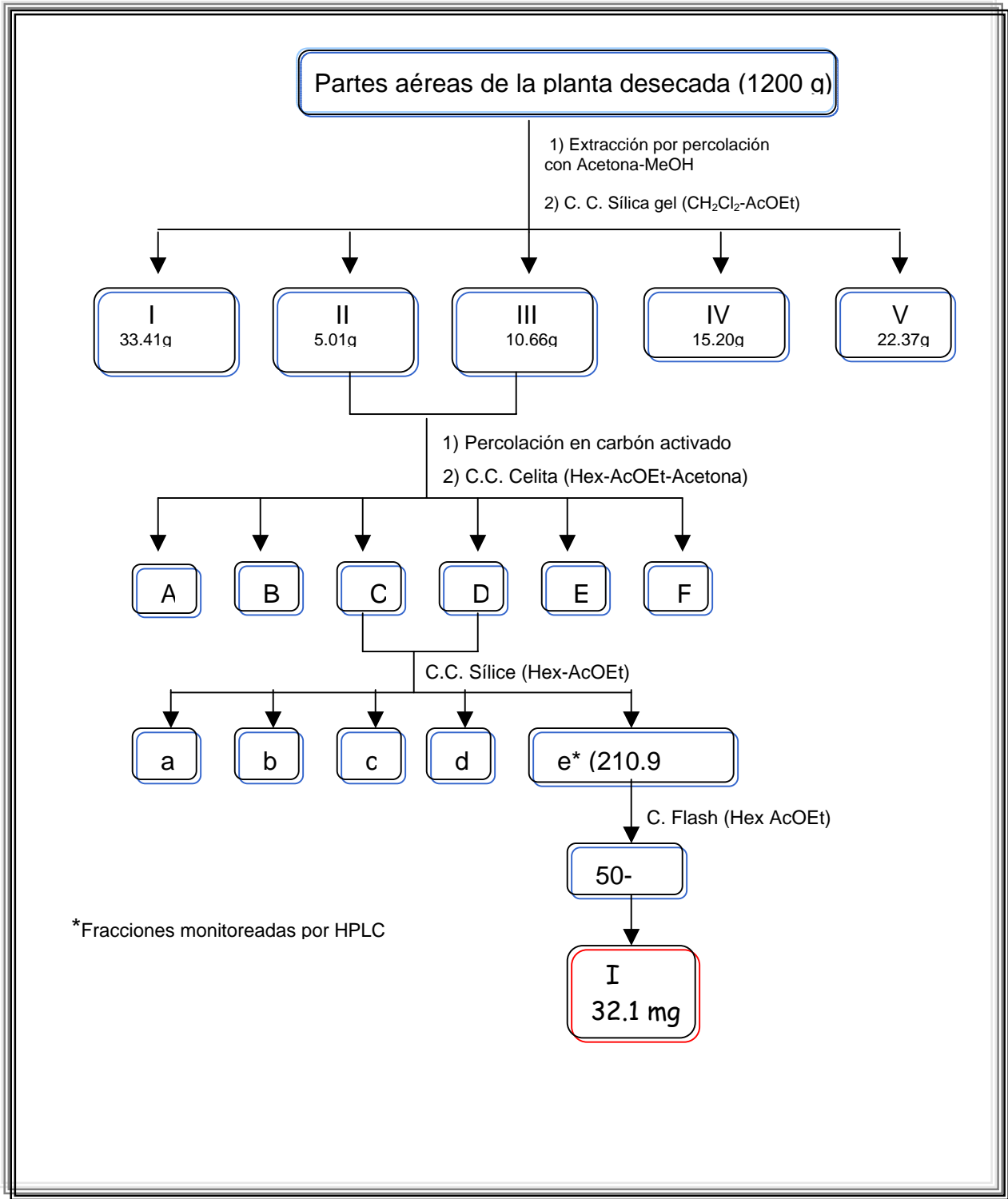
Las fracciones con las que se realizó el estudio por HPLC fueron:

- ✓ II-III-B
- ✓ II-III-C-a
- ✓ II-III-C-b
- ✓ I-III-C-d
- ✓ II-III-C-e

3.4 Purificación

Se realizó una cromatografía en columna relámpago para purificar el compuesto identificado por HPLC y HPLC-MS en la fracción II-III-C-e adsorbiendo esta fracción (210.9 mg) en celita, se empleó sílica gel gruesa (230-400 µm) como fase estacionaria; se eluyó con Hex-AcOEt en polaridad ascendente obteniéndose 90 fracciones. El metabolito identificado fue obtenido en las fracciones 50-64 y fue cristalizado en un sistema de acetona-hexano obteniendo 32.1 mg del compuesto en forma cristalina.

Figura 7: Diagrama general de trabajo: *Salvia polystachya*.



3.5 Material y equipo utilizado

Para realizar el aislamiento por cromatografía en columna se empleó sílica gel Merck 60 G de fase normal, celita y carbón activado como adsorbentes.

El punto de fusión se tomó en un aparato para punto de fusión Fischer-Johns.

El espectro de infrarrojo fue obtenido en un equipo Perkin Elmer 343 (película).

El espectro de masas fue obtenido en un espectrómetro de masas Esquire 6000 con ESI electrospray.

El estudio por HPLC se realizó en un cromatógrafo de líquidos (Bomba Waters 600 controller y detector de arreglo de diodos Waters 996; Software Millennium Ver. 2.1)

El estudio por HPLC-MS fue realizado en un cromatógrafo (bomba Waters 1525 y detector de arreglo de diodos Waters 2996; Software Empower) acoplado a un espectrómetro de masas Squire 6000 con ESI electrospray.

El espectro de ultravioleta fue obtenido en un aparato Shimadzu UV 160 U empleando MeOH como disolvente.

La difracción de rayos-X fue realizada en un equipo: Difractómetro Brucker Apex CCD. La radiación fue generada con Molibdeno.

Los espectros de RMN: ^1H , ^{13}C , DEPT, COSY, HMBC, HSQC, NOESY fueron obtenidos de un equipo Varian Unity Inova 500 MHz, empleando (CDCl_3) como disolvente

4.- RESULTADOS Y DISCUSSION

En un estudio químico anterior de *Salvia polystachya*, fueron aislados los diterpenos: polystachynas A-E, linearolactona, salvifaricina, dehidrokerlina y 1 α ,2 α -epoxi-3,4 α -dihidro-linearolactona. Todos con esqueleto de clerodano.

En el presente estudio se identificó un nuevo metabolito secundario por HPLC y HPLC-MS en la fracción II-III-C-e por comparación de los tiempos de retención de una mezcla de compuestos de referencia (polystachynas A-E, linearolactona y salvifaricina) con los tiempos de retención de las señales que presentó la fracción obtenida (Tablas 6 y 7), descartando aquellas con tiempos de retención correspondientes a los metabolitos conocidos.

Tabla 5.- Tiempos de retención de una mezcla de diterpenos aislados de *S. polystachya*.*

Diterpeno	Tr (min)
Polystachyna A	18.922
Polystachyna B	16.288
Polystachyna C	14.838
Polystachyna D	15.438
Polystachyna E	16.955
Linearolactona	18.038
Salvifaricina	18.322

*Se anexa cromatograma en el apéndice

La identificación de un nuevo compuesto en la fracción II-III-C-e fue corroborada al fortificar una mezcla de los metabolitos de referencia con esta fracción (figuras 8a y 8b) y por un estudio posterior por HPLC-MS.

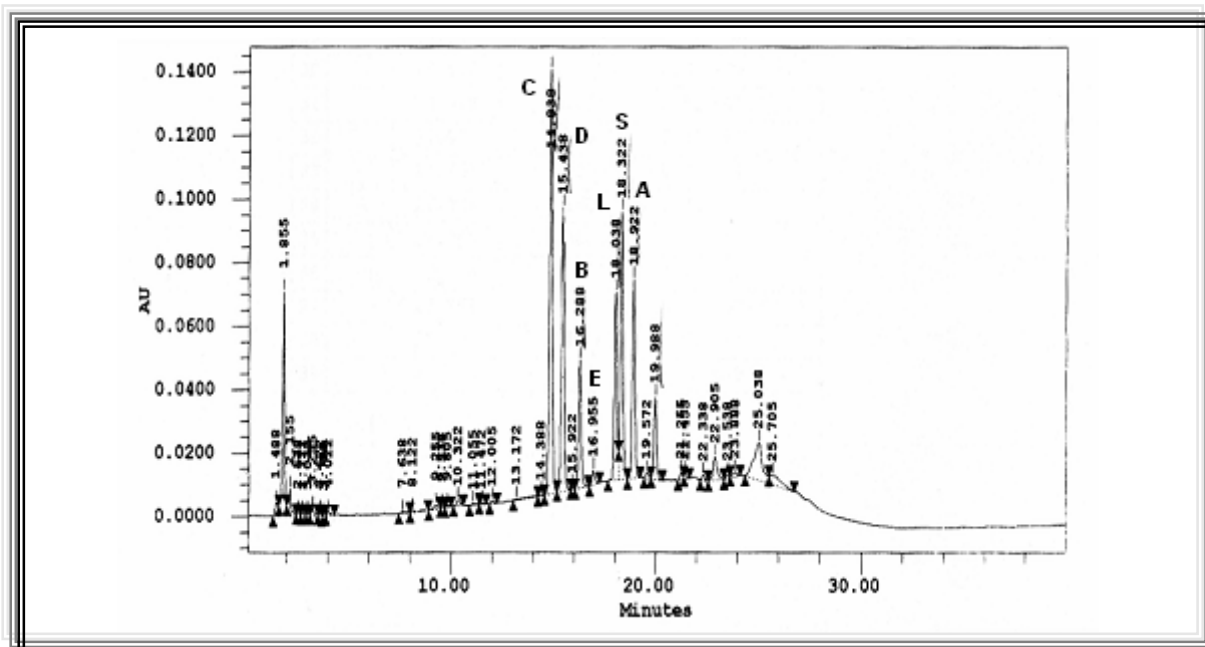


Figura 8a.- Cromatograma de una mezcla de diterpenos aislados de *S. Polystachya*

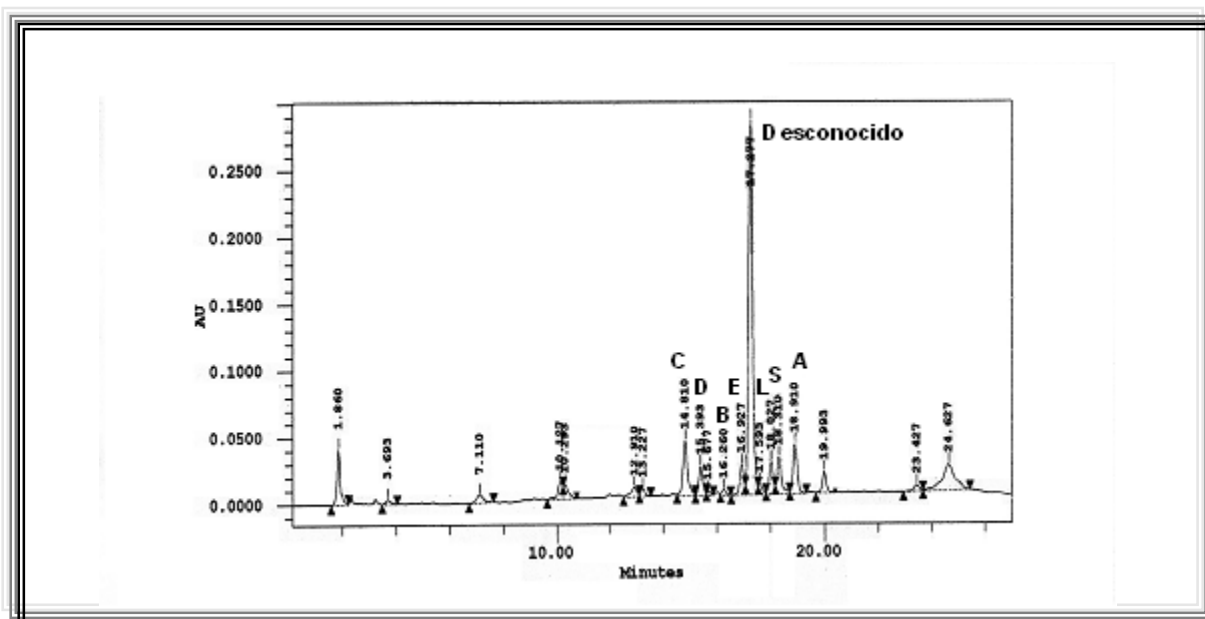


Figura 8b: Cromatograma de una mezcla de diterpenos aislados de *S. polystachya* fortificada con la fracción II-III-Ce.

Tabla 6.- Tiempos de retención de metabolitos de fracciones obtenidas de *S. polystachya*.

Fracción	Tr (min)	% Area	Metabolito identificado por comparación con tr de diterpenos de referencia.
II-III-B	1.985	22.93	ND
	16.218	26.68	Polystachyna B
	18.235	8.95	Salvifarinina
	18.835	41.44	Polystachyna A
II-III-B-cristales	16.257	86.3	Polystachyna B
II-III-C-a	16.3008	89.73	Polystachyna B
II-III-C-b	15.342	3.43	Polystachyna D
	16.242	83.366	Polystachyna B
	18.808	5.74	Polystachyna A
II-III-C-d	18.015	66.30	Linearolactona
	18.932	21.43	Polystachyna A
	19.982	12.21	ND
II-III-C-e	2.112	4.60	ND
	17.295	68.82	Desconocido
	22.912	9.88	ND

ND: No determinado

En el estudio por HPLC el tiempo de retención del metabolito de la fracción II-II-C-e resultó diferente al de los diterpenos conocidos y en el estudio realizado por HPLC-MS se inyectó la misma mezcla fortificada con la fracción en la que se identificó el metabolito (fracción II-III-C-e), bajo las mismas condiciones; y de cada pico identificado en el ionograma se obtuvo el correspondiente espectro de masas. Se detectó el ión molecular protonado $[M+H]^+$ y en algunos casos el

aducto con Na⁺, los resultados se ilustran en la tabla 8 y los espectros se anexan en el apéndice.

Tabla 7.- Tiempos de retención y m/z para una mezcla de diterpenos de *S. polystachya*.

Diterpeno	Masa molecular ¹⁰	Tr (min)	m/z *[M+H] ⁺ **[M+Na] ⁺
Polystachyna A	342	17.4	343*
Polystachyna B	358	15.4	427**♦
Polystachyna C	358	13.4	381**
Polystachyna D	358	14.1	381**
Polystachyna E	356	16.2	379**
Linearolactona	340	16.5	341*
Salvifaricina	340	18.4	341*
II-III-C-e	Desconocida	16.8	357*

♦Intercambio tres iones sodio.

Al compuesto hasta ahora desconocido se le llamó polystachyna F (ver figura 13); fue aislado de la fracción II-III-C-e por cromatografía en columna flash y purificado por cristalización en un sistema de acetona-hexano. Se determinó un p.f. de 135-138° C, su fórmula molecular fue determinada por espectrometría de masas (trampa de iones) detectándose el ión molecular protonado [M+H]⁺ con una relación m/z de 357 y [M+Na]⁺ con una relación m/z de 379, congruente con una fórmula molecular C₂₀H₂₀O₆.

Una vez determinada su fórmula molecular se dedujo que corresponde a un diterpeno con esqueleto carbonado de clerodano, dado el antecedente de los metabolitos aislados con anterioridad.⁹

En el espectro de IR de la polystachyna F se observan bandas características para carbonilo de una γ -lactona α,β -insaturada en 1751 cm⁻¹, metilos y metilenos

en 2927 y 2969 cm^{-1} , la señal de un anillo aromático de furano en 874 cm^{-1} y dobles ligaduras en 1645 cm^{-1} .

La estructura del compuesto Polystachyna F (Figura 13) fue determinada por los datos espectroscópicos de RMN de ^1H y ^{13}C (tabla 9), y por difracción de rayos-X (Figura 14). Los espectros de RMN se anexan en el apéndice.

En el espectro de RMN ^1H se observa un doblete con un $\delta = 1.46$ ($J = 7.5$) característico de un grupo metilo, asignado al metilo de C-8 del esqueleto de clerodano (C-17). En 2.11 p.p.m se observa un cuarteto ($J = 7.5$) asignado al protón de C-8, esto se confirma con la correlación en el espectro del experimento COSY entre el hidrógeno de C-8 y los hidrógenos de C-17.

En el espectro de RMN ^1H aparece un doblete con $\delta = 3.43$ ($J = 5.5$) y un singulete con $\delta = 3.01$, asignados a los hidrógenos de C1 y C10, los desplazamientos químicos son característicos para hidrógeno base de oxígeno, por lo que se propuso la presencia de un epóxido entre los carbonos 1 y 10, esto se corroboró por las correlaciones C-H en el experimento HSQC (Figura 9) y los desplazamientos químicos de los carbonos en el espectro de RMN de ^{13}C ; lo anterior indica que el anillo de decalina en el esqueleto de clerodano está abierto entre 5 y 10.

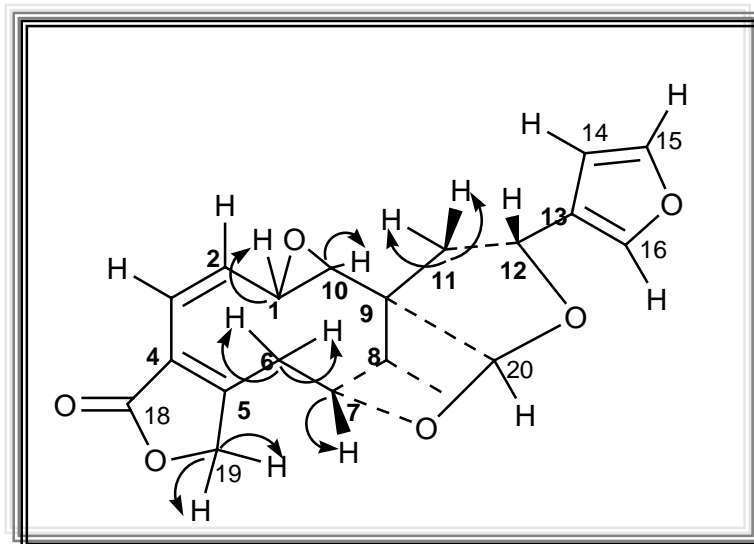


Figura 9.- Correlaciones HSQC

En el espectro de RMN ^1H se observa un triplete con un desplazamiento químico de $\delta = 5.90$ ($J = 9.5$) y un doblete con $\delta = 6.29$ ($J = 11$), estos desplazamientos son característicos para hidrógenos vinílicos, y fueron asignados a los hidrógenos de C-2 y C-3 respectivamente. La diferencia entre las constantes de acoplamiento ($J = 9.5$ y $J = 11$) puede deberse al ensanchamiento de las señales debido a la movilidad del anillo de 10 miembros. El triplete correspondiente al protón de C-2 se debe a un acoplamiento con los hidrógenos de C-1 y C-3. Para el protón de C-3 se observa un doblete por acoplamiento que presenta con H-2, sin embargo en el espectro del experimento COSY (Figura 10) se observan dos correlaciones, una con H-2 y otra con H-19a, esta última correlación se debe a un acoplamiento de tipo alílico, lo que sugirió la presencia de un doble enlace entre los carbonos 4 y 5, además, en el espectro de RMN de ^{13}C estos carbonos presentan un desplazamiento característico para carbonos vinílicos, con ello se confirmó que el anillo de decalina en el esqueleto de clerodano está abierto entre C5 y C10.

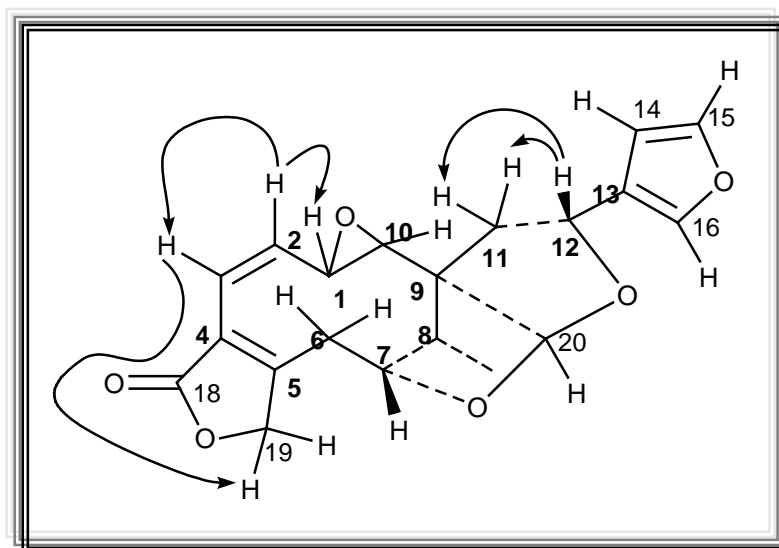


Figura 10.- Correlaciones COSY.

En el espectro de RMN de ^1H aparece un singulete ancho con $\delta = 2.8$ asignado a los hidrógenos del carbono 6, esto se confirma con la correlación C-H presente en el experimento HSQC (figura 9) y por la presencia de un CH_2 en el espectro del experimento DEPT para el desplazamiento químico del C-6.

En el espectro de RMN ^1H se observa una señal que aparece como un doble de dobles con un $\delta = 4.67$ ($J = 17.5$ y 8.5) asignada al protón de C-7, en el experimento HSQC la señal de este protón correlaciona con el carbono con $\delta = 85.0$ atribuible a un CH, esto se confirma en el espectro del experimento DEPT, por lo que lo anterior sugirió un sustituyente polar en C-7.

En el espectro de RMN ^{13}C se observó una señal con $\delta = 172.3$ que corresponde a un grupo carbonilo y una señal con $\delta = 72.5$ característica para un carbono base de oxígeno, con ello se dedujo la presencia de una lactona formada por los carbonos 4, 5, 18 y 19. La señal en $\delta = 172.3$ fue asignada a C-18 y la señal que aparece en $\delta = 72.5$ corresponde al carbono unido al oxígeno de la γ -lactona α,β -insaturada.

En el espectro de RMN ^{13}C se observa una señal con $\delta = 56.8$ asignada a C-9 del esqueleto del clerodano; en el espectro del experimento DEPT no aparece la señal correspondiente a este carbono, ya que es un carbono cuaternario. Con lo discutido anteriormente se dedujo la estructura parcial representada en la figura 11.

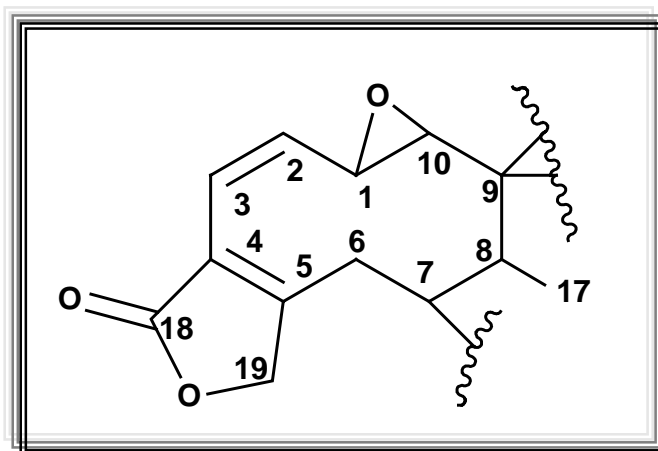


Figura 11.- Estructura del anillo de decalina.

En el espectro de RMN de ^1H aparece un triplete con un desplazamiento químico de $\delta = 5.17$ p.p.m. ($J=7.5$) que se asignó a H-12, este triplete se debe al acoplamiento con los hidrógenos vecinos de C-11 y en el espectro del experimento HMBC (Figura 12) se observan las correlaciones de H-12 con C-11. En el experimento HSQC se observa una correlación de C-12 ($\delta = 73.4$) con un protón y en el espectro del experimento DEPT la señal indica un grupo metino, se dedujo además que el C-12 está sustituido con un grupo polar por el desplazamiento observado.

En el experimento de RMN de ^{13}C se observa una señal con $\delta = 128.2$ que fue asignada al C-13, este desplazamiento es típico para carbono aromático y en el experimento DEPT no se observa la señal de este carbono por lo que se dedujo que es cuaternario y aromático.

En el espectro de RMN de ^1H se observa una señal que parece como un singulete ancho con un $\delta = 7.35$ asignada al protón de C-15 y un triplete con $\delta = 7.37$ ($J = 2.5$) asignada al protón de C-16. En el espectro de RMN de ^{13}C aparecen dos señales con desplazamiento de C aromático con $\delta = 138.9$ y 143.8 asignadas a los carbonos 16 y 15 respectivamente; en el espectro DEPT estos carbonos aparecen como grupos CH, lo anterior indicó que estos carbonos están sustituidos, con ello se dedujo que los carbonos 13, 14, 15 y 16 forman un anillo de furano, esto se confirmó por las correlaciones C-H de los carbonos 13, 14, 15 y 16 en el experimento HMBC (Figura 12).

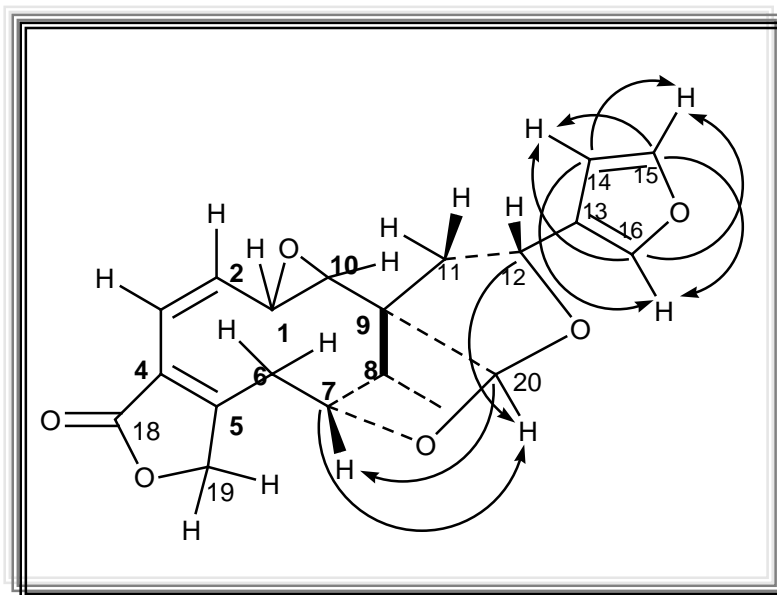


Figura 12.- Correlaciones HMBC.

Las sustituciones en los carbonos 12 y 20 originan un heterociclo de 5 miembros con oxígeno, esto se dedujo por el desplazamiento del C-12 que indica un carbono base de oxígeno, para el carbono 20 se tiene un desplazamiento similar solo que este está unido a dos oxígenos, lo que origina un desplazamiento químico a mayor frecuencia. La presencia del heterociclo de 5 miembros se observa por las correlaciones C-H obtenidas en el experimento HMBC entre los carbonos 12 y 20. La segunda sustitución de C-20 con oxígeno forma también un heterociclo con C-7, este último con $\delta = 85.0$ en el espectro de RMN de ^{13}C , indica un carbono

base de oxígeno y se confirma por las correlaciones de C-20 con H-7 en el espectro HMBC.

Tabla 8.- Desplazamientos químicos de ^1H y ^{13}C de la Polystachyna F

Posición	δ_{H} (ppm), multiplicidad	δ_{C} (ppm)
1	3.43 d, 5.5	57.9 d
2	5.90 t, 9.5	132.9 d
3	6.29 d, 11.0	122.5 d
4	--	126.3 s
5	--	161.0 s
6	2.80 sa	36.1 t
	2.80 sa	--
7	4.67 dd, 17.5, 8.5	85.0 d
8	2.11 q, 7.5	47.9 d
9	--	56.8 d
10	3.01 s	58.3 d
11	2.58 dd, 13.0, 7.5	34.3 t
	2.28 dd, 13.0, 7.5	--
12	5.16 t, 7.5	73.4 d
13	--	128.2 d
14	5.07 d, 17.5	108.5 d
15	7.37 d, 4.0	138.9 d
16	7.37 s	143.8 d
17	1.46 d, 7.5	17.1 q
18	--	172.3 s
19	5.083 sa	72.5 t
	4.723 sa	--
20	6.34 s	108.2 d

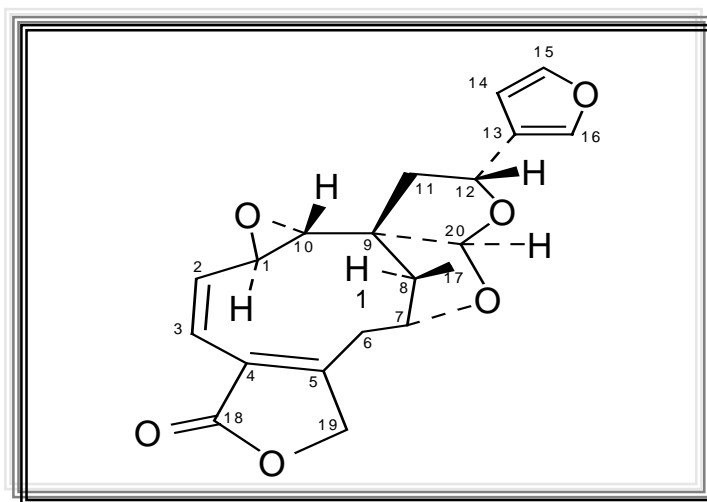


Figura 13.- Estructura de la Polystachyna F

Datos físicos y espectroscópicos de la polystachyna F :

Cristales incoloros en forma de aguja, p. f. 135-138 °C, los desplazamientos químicos de RMN de ^1H y ^{13}C se muestran en la tabla 3, I.R. (película) 1751 ($\text{C}=\text{O}$), 2927 y 2969 (CH_3 y CH_2), 894 (furano) y 1645 cm^{-1} ($\text{C}=\text{C}$); UV λ_{max} (MeOH) 210 nm ($\epsilon=14\ 820$), m/z: 357 $[\text{M}+\text{H}]^+$ y m/z: 379 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, $[\alpha]_{\text{D}}^{22} = -166.11^\circ$.

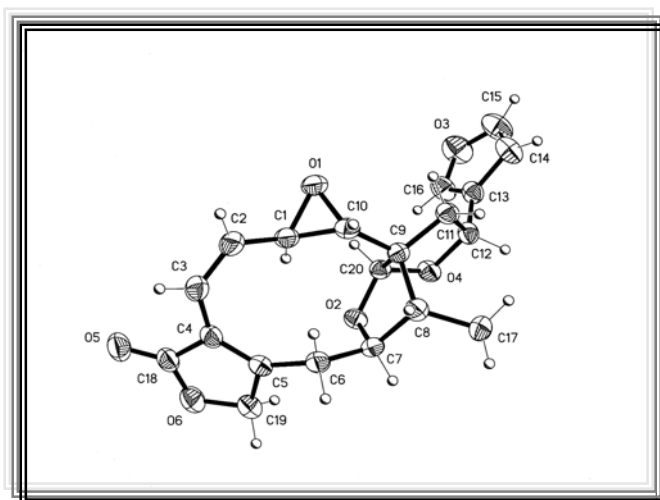


Figura 14.- Estructura obtenida por difracción de rayos X

En el espectro NOESY se observan correlaciones entre el metilo-17 con H-7; el metilo C-17 en los esqueletos carbonados de clerodano generalmente es β -ecuatorial debido a la biogénesis del esqueleto, por lo que la interacción indica que H-7 es β .

Con las interacciones antes mencionadas se determinó la estereoquímica relativa de la polystachyna F como 7R, 8S, 9R; sí 12 es R. Las correlaciones en el espectro NOESY de H-11 y H-11' con H-10 indican que H-10 es β y las interacciones de H-1 con H-20 sugieren que H-1 es α . Por ello la estereoquímica relativa de C-20 debe ser R.

En el espectro NOESY se observa una interacción entre H-2 y H-3 que indican una configuración Z de la doble ligadura.

Por otra parte las interacciones en el espectro (9) NOESY indican la presencia de dos conformeros principalmente. Para el conformero 1 (Figura 15) se observan correlaciones entre H-2 y H-3, H-2 y H-10, H-2 y H-1; H-1 y H-20; finalmente para H-10 se observa una interacción con H-8.

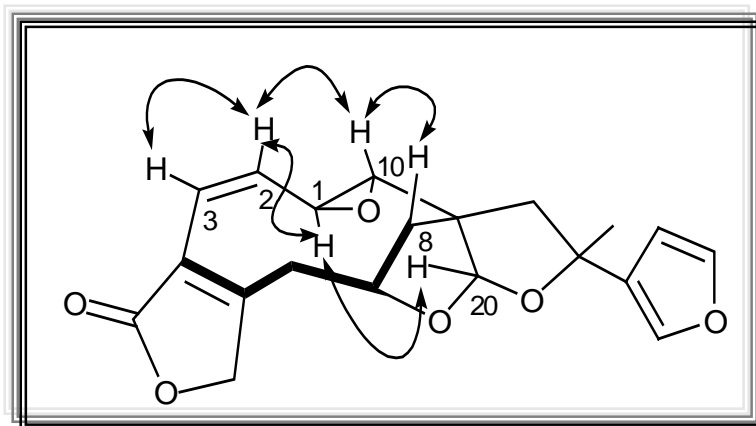


Figura 15.- Conformero 1 de la Polystachyna F

Para el conformero 2 se observan correlaciones de H-1 con H-8 y H-20; y correlaciones de H-8 con H-19'.

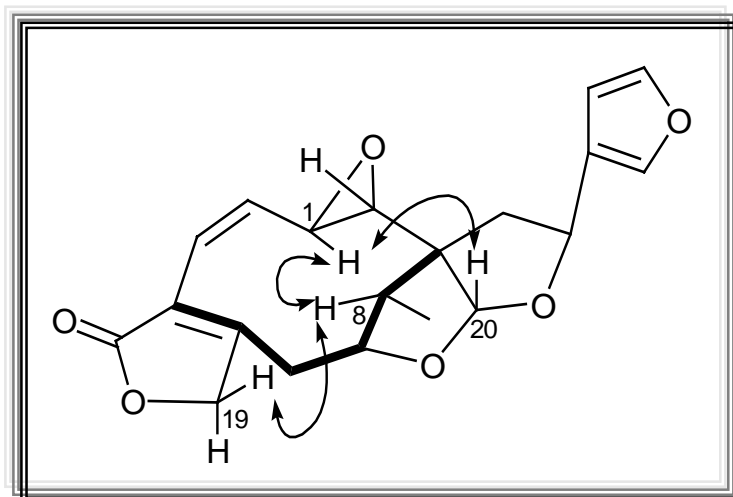


Figura 16.- Conformero 2 de la Polystachyna F

Este nuevo compuesto aislado de *Salvia polystachya* es similar a un compuesto aislado anteriormente de *Salvia tonalensis* llamado tonalensina²³; también es un 5,10-seco-neoclerodano y ambas especies pertenecen a la misma sección⁶ por lo que en estudios posteriores de especies de la sección Polystachyae, la presencia de 5,10-seco-neoclerodanos implicaría que estos pueden considerarse marcadores químiotaxonómicos de la sección.

5.- CONCLUSIONES

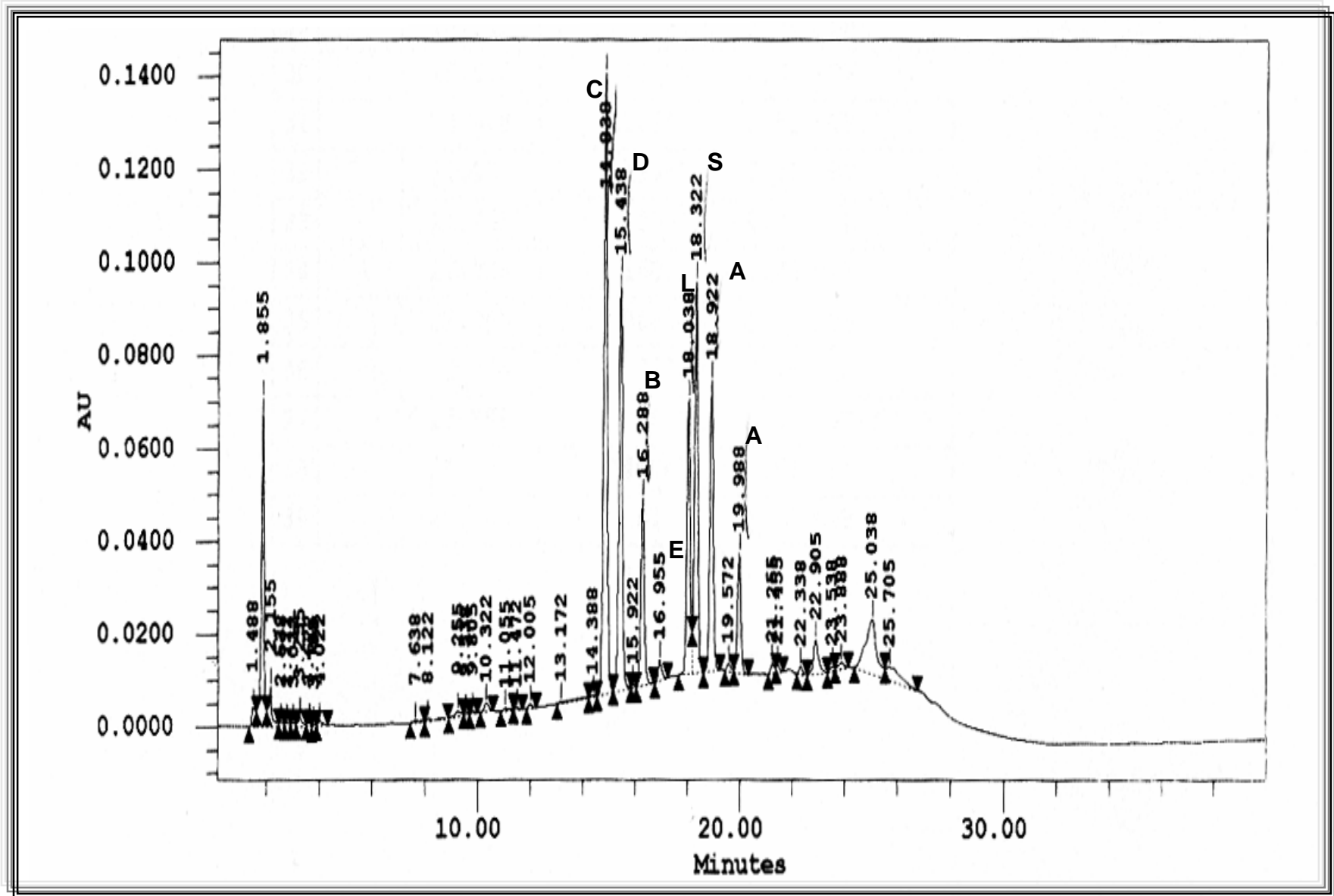
- ✓ Se identificaron los diterpenos aislados con anterioridad en nuestro laboratorio (Maldonado & Ortega) de *Salvia polystachya* en un estudio anterior.
- ✓ Se detectó por HPLC y posteriormente se aisló y elucidó la estructura de un nuevo diterpeno con esqueleto de seco-clerodano de *Salvia polystachya*.

6.- BIBLIOGRAFIA:

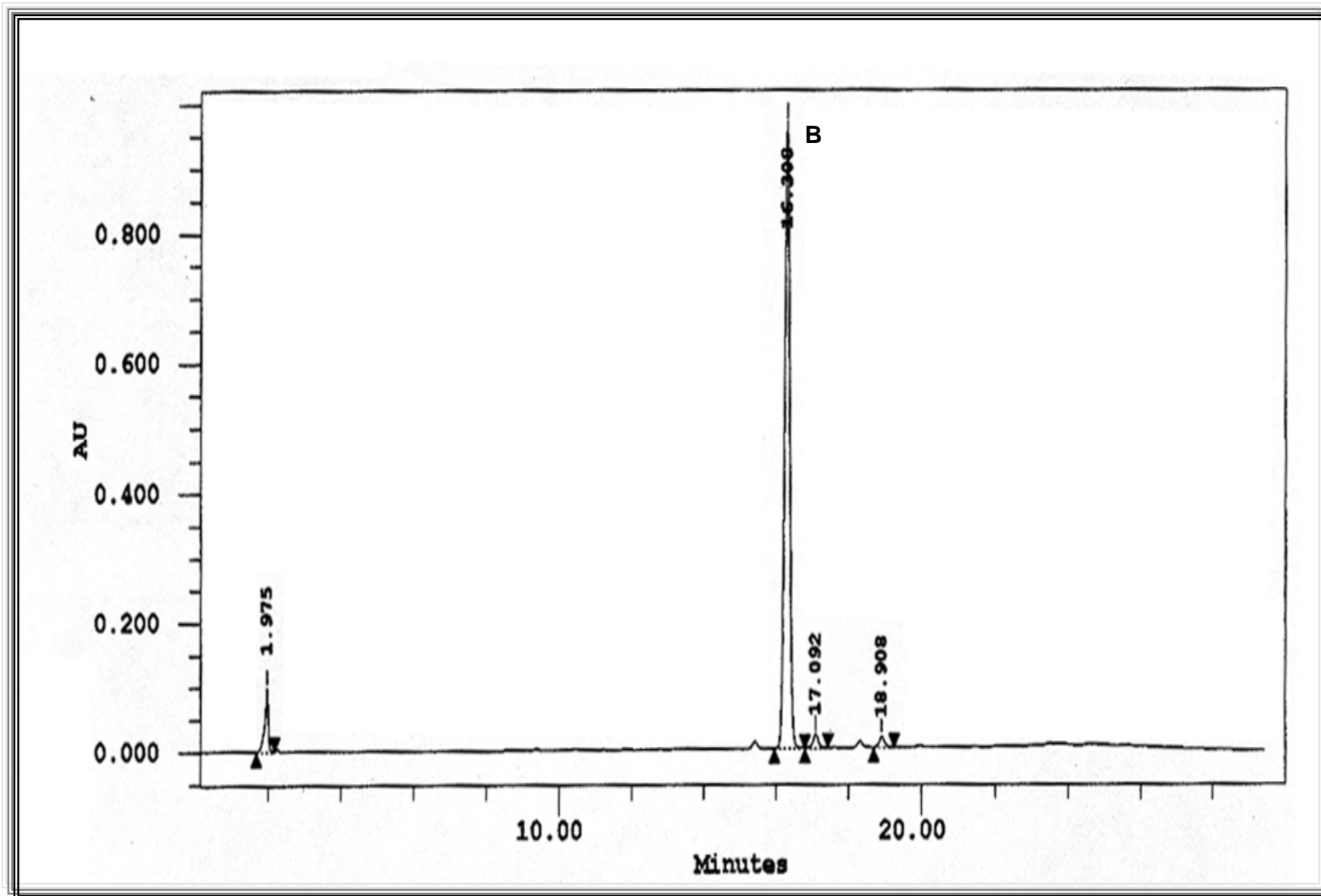
- 1) Rodríguez-Hann L, Cárdenas, J., "Comparative chemotaxonomy in *Labiatae*" *Phytochemistry* Vol. 2 (1999).
- 2) Henrich, M, *Economic Botany of American Labiatae*. In R.M. Harley and T. Reynolds (Editors). *Advances in Labiatae Science*, pp. 475-488. Royal Botanic Gardens. Kew.
- 3) Bentham, G. *Labiatae* in Bentham, G. and Hooker J.D. *Genera Plantarum* , Vol. 2: 1160-1223, Revve and Co. London, 1986
- 4) Ortega, A., Blount, J. F. and Marchand, P. S. Salvinorin A New *trans*-Neoclerodane Diterpene from *Salvia divinorum* (Labiatae). 1982, *J. Chem. Soc Perkin Trans.* 12505-12508.
- 5) Roth, B. L., Baner, K., Westkaemper, R., Siebert, D, Rice, KC, Steinberg, S, Ernsberger, P., and Rothman, RB. Salvinorin A: A Potent Naturally Occurring Nonnitrogenous Kappa Opioid Selective Agonist. *PNAS*. 99(18): 11934–11939 (2002).
- 6) Epling, Carl, *A revision of Salvia, Subgenus Calosphace*, Verlag des Repertoriums, 1939, Berlin, Germany, pp 213-233.
- 7) <http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/libros/379/flora38.html>
- 8) <http://www.semarnat.gob.mx/pfnm/SalviaPolystachya.html>.
- 9) Instituto Nacional Indigesta, *Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana* (Vol. I), 1994, México D.F., pp. 398
- 10) Maldonado E., Ortega, A., Polystachynes A-E, five *cis*-neo-clerodane diterpenoids from *Salvia polystachya*, *Phytochemistry* 53 (2000) 103-109.
- 11) Esquivel, B., Cárdenas, J., Ramamoorthy, T.P. & Rodríguez-Hahn, L. (1986). Clerodane diterpenoids from *Salvia lineata*. *Phytochemistry*, 25(10), 2381-2384.
- 12) Fernández, M. C., Esquivel, B., Cárdenas, J., Sánchez, A. A., Toscano, R. A., & Rodríguez-Hahn, L. 1991. Clerodane and aromatic seco-clerodane diterpenoids from *Salvia rhyacophila*. *Tetrahedron* 47 (35), 7199-7208.

- 13) Savona, G., Raffa, D., Bruno, M., & Rodríguez, B. (1983). Salvifarin and Salvifaricin, neoclerodane diterpenoids from *Salvia farinacea*, *Phytochemistry* 22 (3), 784-786.
- 14) Esquivel, B., Esquivel, O., Cárdenas, J., Sánchez, A. A., Ramamoorthy, T. P., Toscano, R. A. & Rodríguez-Hahn, L. (1991). Clerodane and secoclerodane diterpenoids from *Salvia reptans*. *Phytochemistry*, 30 (7), 2335-2338.
- 15) Demetzos, C., Dimas, K., Hatziantoniou, S., Anastasaki, T., & Angelopoulou, D. Cytotoxic and Anti-Inflammatory activity of labdane and cis-clerodane type diterpenes. *Planta Médica* 67 (2001) 614—618.
- 16) Jullian, V., Bonduelle, C., Valentin, A., Acebey, L., Duigou, A., Prévost, M. F., Sauvain, M. New neoclerodane diterpenoids from *Laetia procera* (Poepp.) Eichler (Flacourtiaceae), with antiplasmodial and Antileishmanial activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 15 (2005) 5065-5070.
- 17) Krishna-Kumari, G.N., Aravind, S., Balachandran, J., Ganesh, M. R., Soundarya-Devi, S., Rajan, S. S., Malathi, R., Ravikumar, K. Antifeedant neo-clerodanes from *Teucrium tomentosum* Heyne. (Labiatae). *Phytochemistry* 64 (2003) 1119-1123.
- 18) Urzua, A., Jara, F., Tojo, E., Wilkens, M., Mendoza, L., Rezende, M. C. A new antibacterial clerodane diterpenoid from resinous exudates of *Haplopappus uncinatus*. *Journal of Ethnopharmacology* (2006) 103 (2), 297-301.
- 19) Mata Essayag Rachel; Manual de Farmacognosia, Facultad de Química, UNAM, México 2005, pp 56.
- 20) Dev Sukh, Misra Renuka, CRC Handbook of terpenoids, Volume II, CRC Press Inc. Boca Raton Florida, U. S. A. 2000. pp 7-70.
- 21) Lichtenthaler H., The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 1999. 50:47-65.

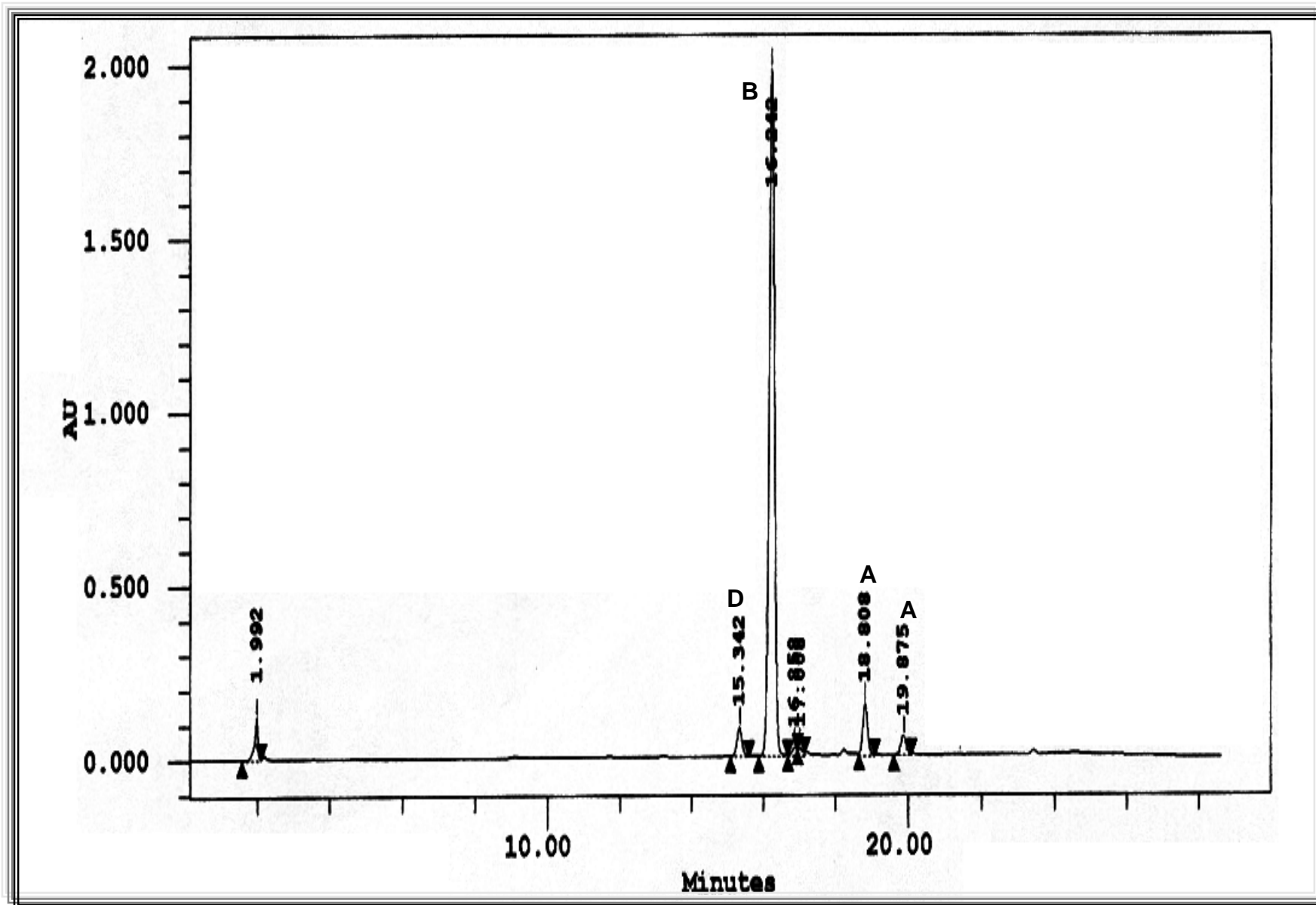
- 22) Knöss W., Reuter B., Biosynthesis of isoprenic units different pathways: Occurrence and future prospects, *Pharmaceutica Acta Helvetiae* 73 (1998) 45-52.
- 23) Alfredo Ortega, Emma Maldonado, Eduardo Díaz and William F. Reynolds; Variable temperature NMR studies on the conformations of tonalensin in solution. *Spectrochimica Acta Part A*, 54 (1998) 659-670.



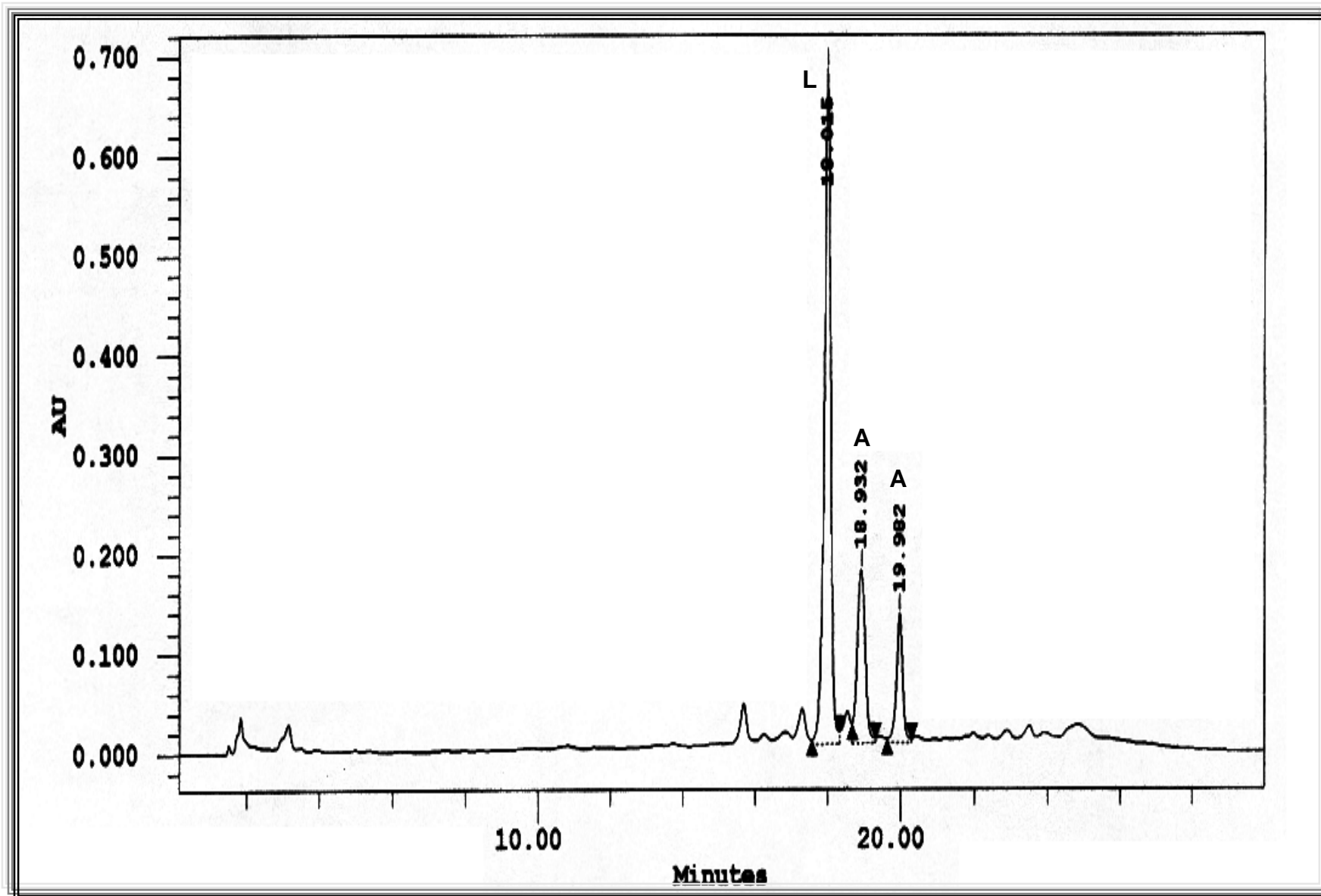
Cromatograma 1: Mezcla de polystachyngas A-E, salvifarinica y linearolactona



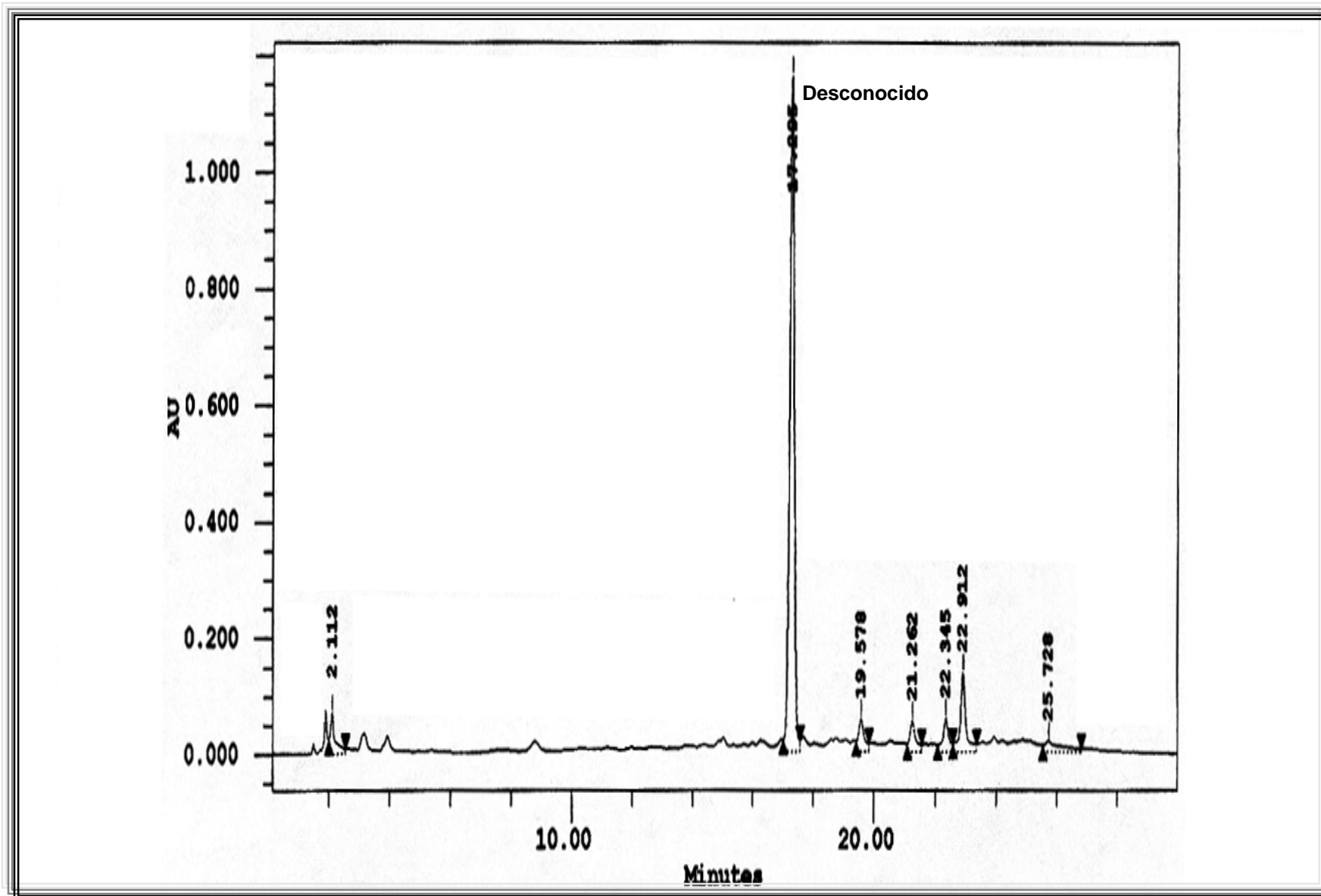
Cromatograma 2: Fracción II-III-C-a



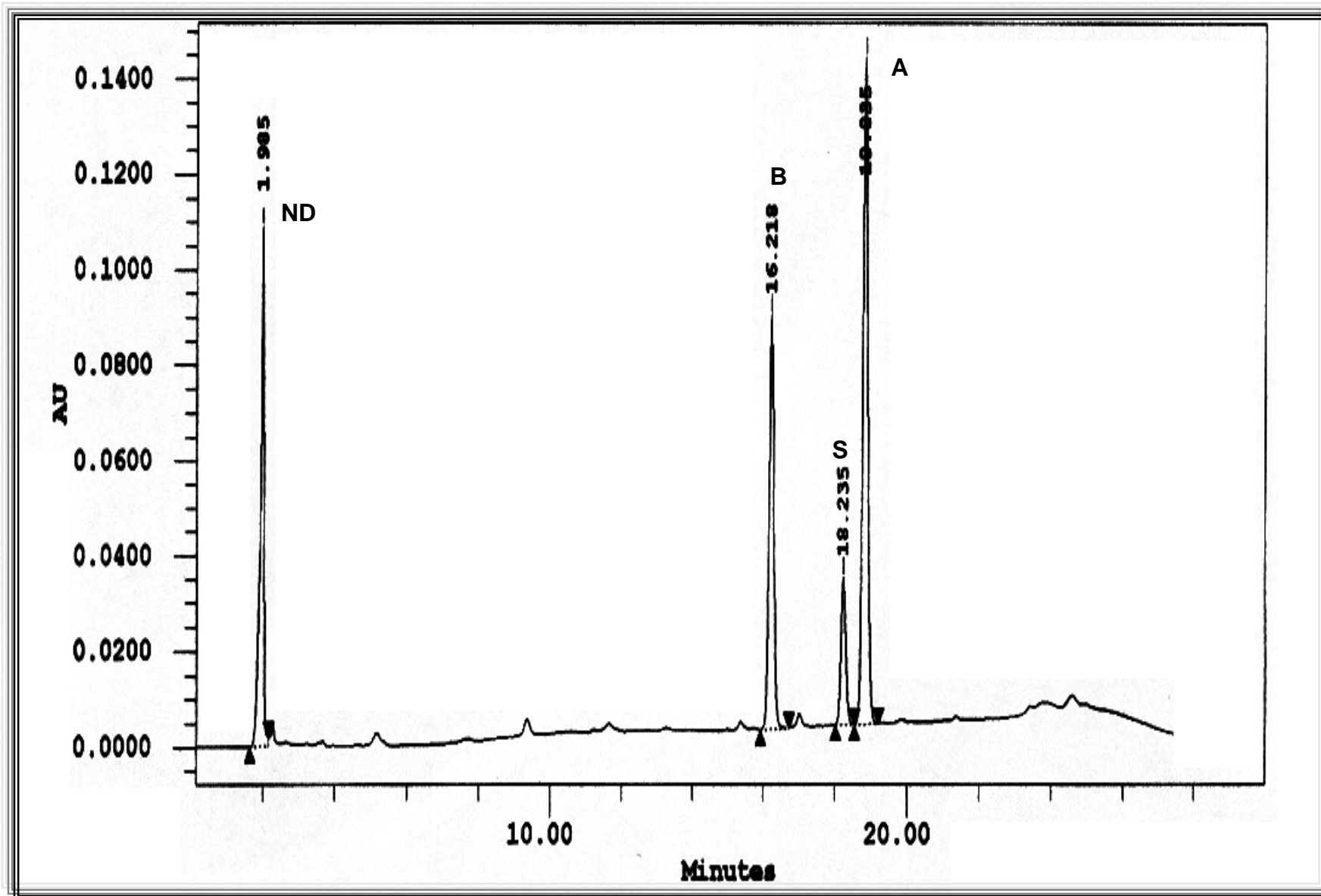
Cromatograma 3: Fracción II-III-C-b



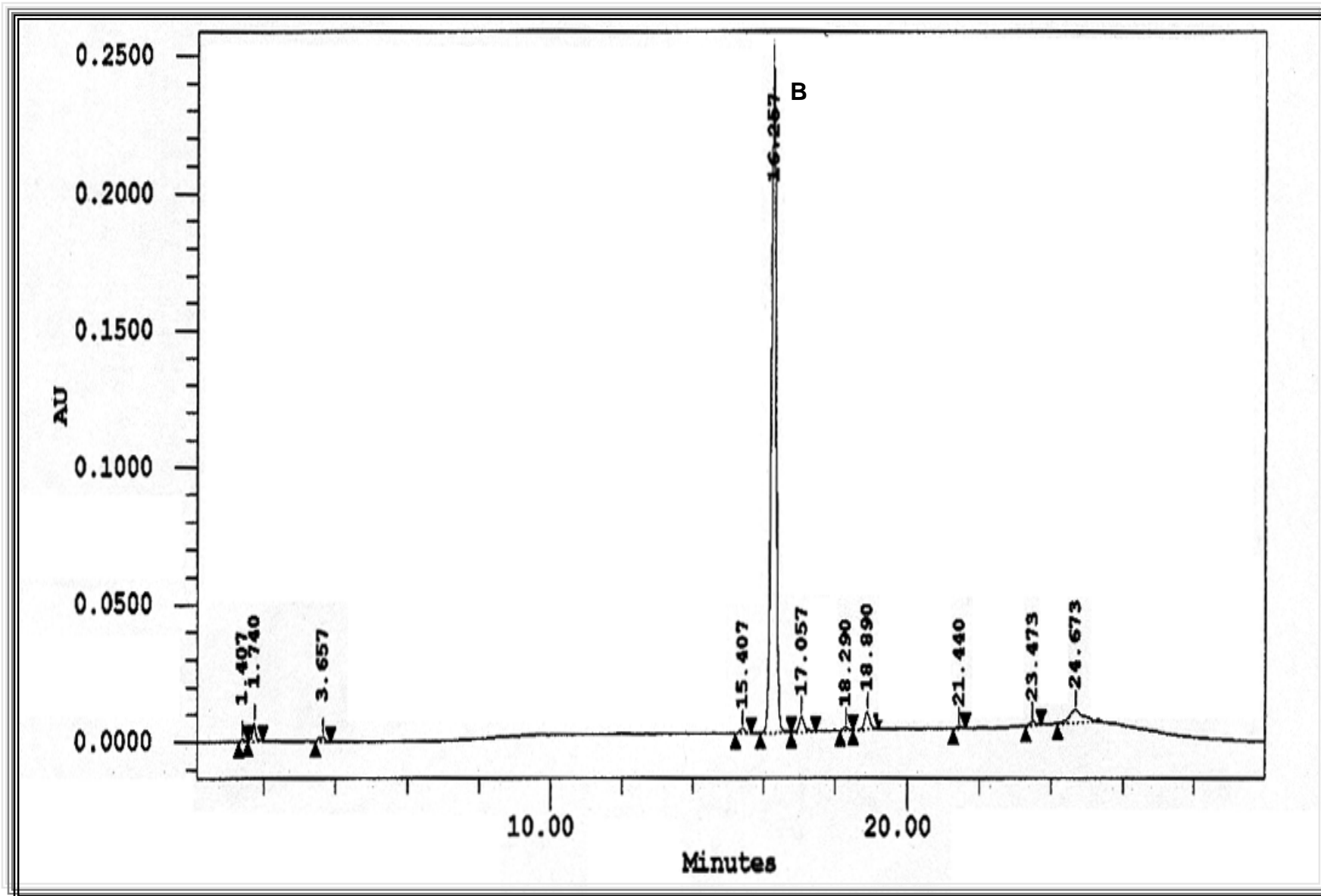
Cromatograma 4: II-III-C-d



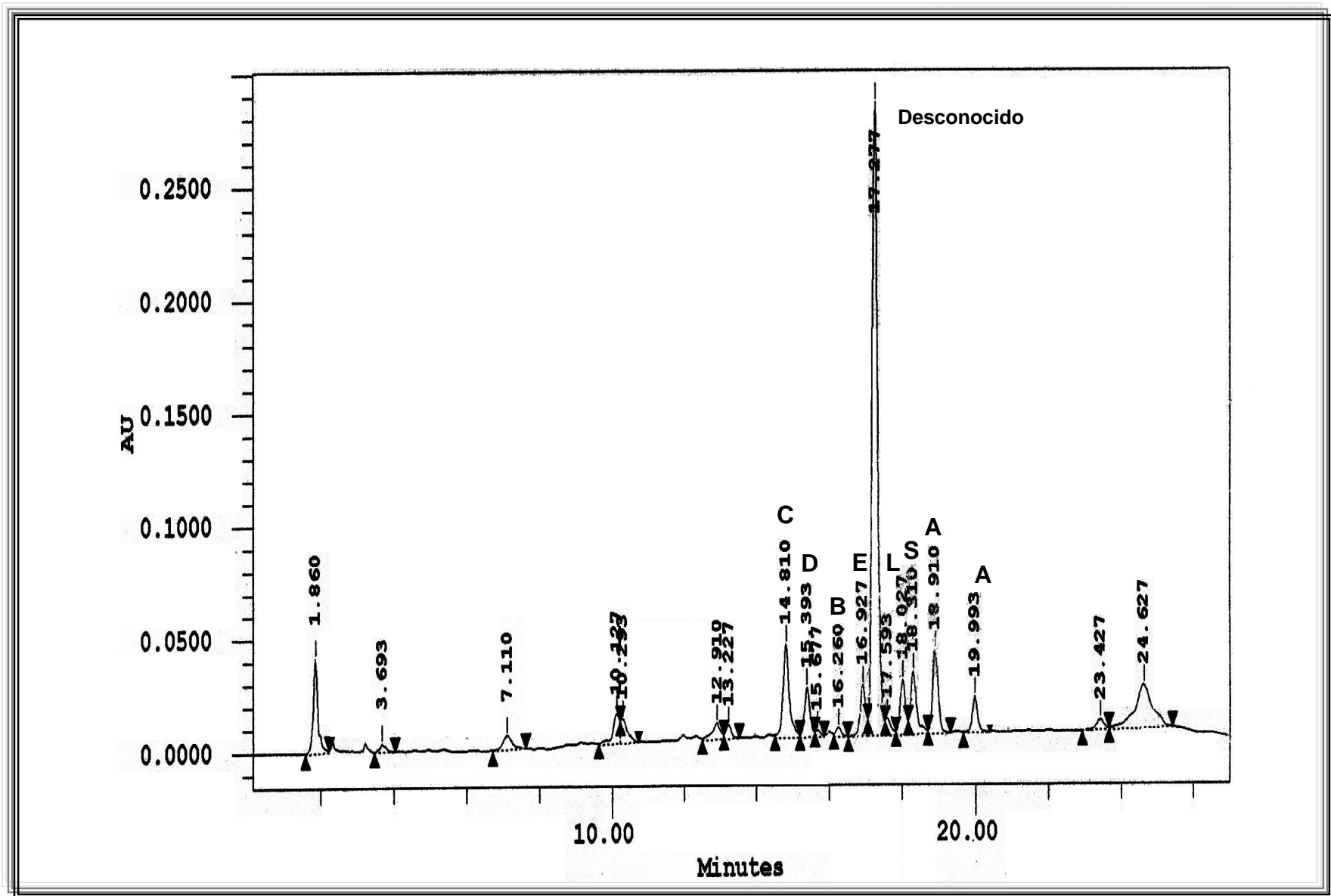
Cromatograma 5: II-III-C-e



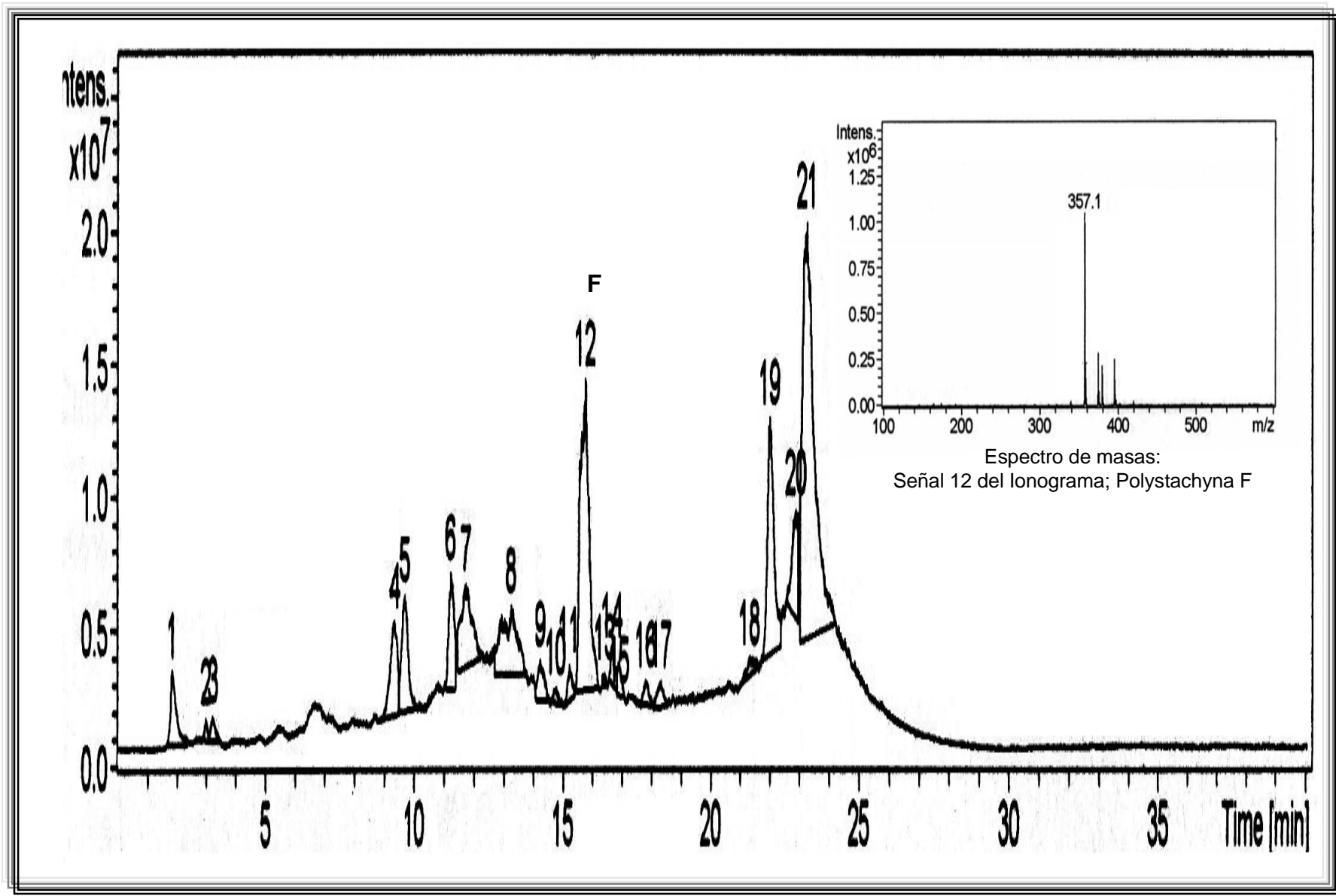
Cromatograma 6: II-III-B



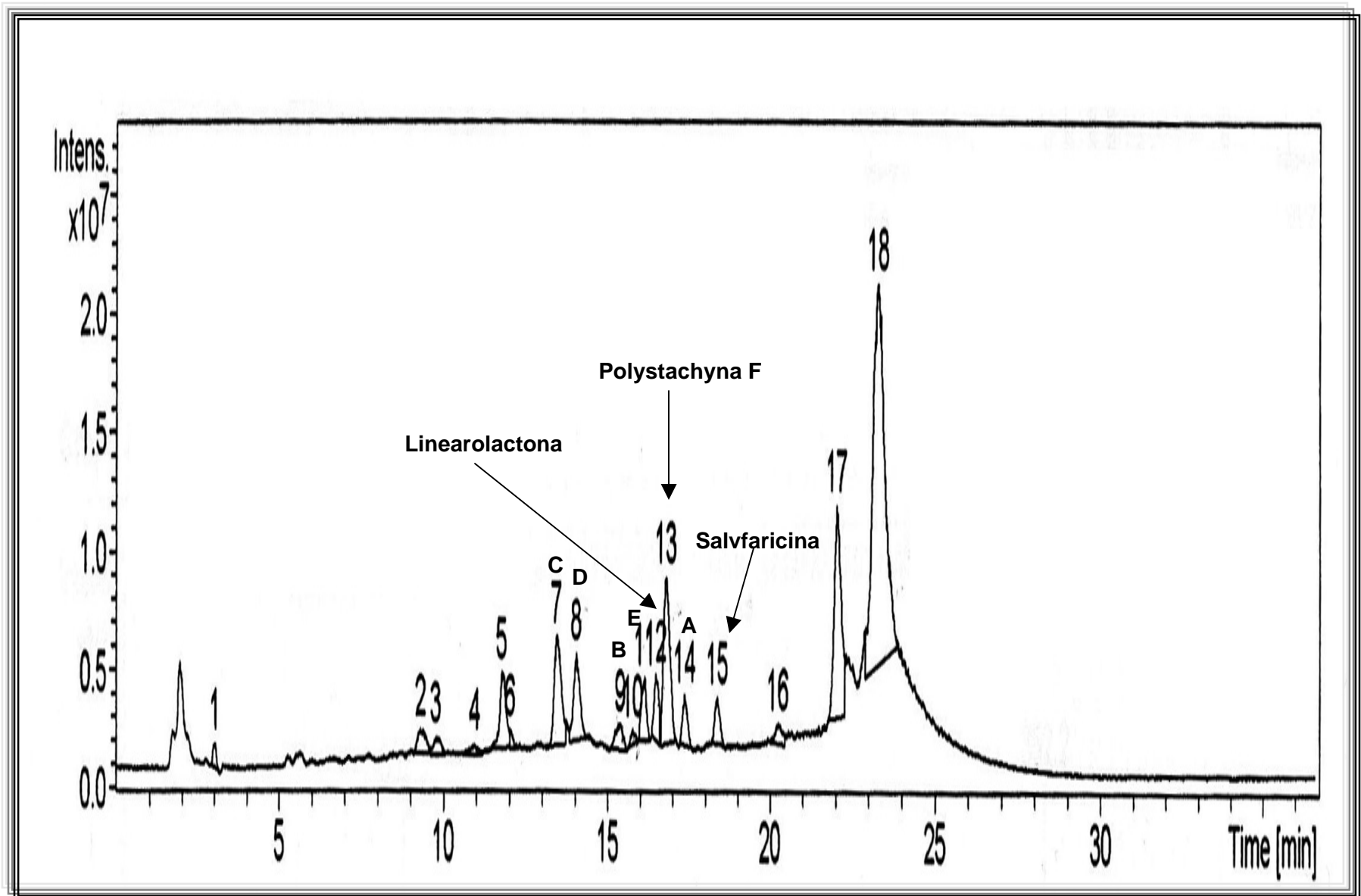
Cromatograma 7: II-III-B-cristales



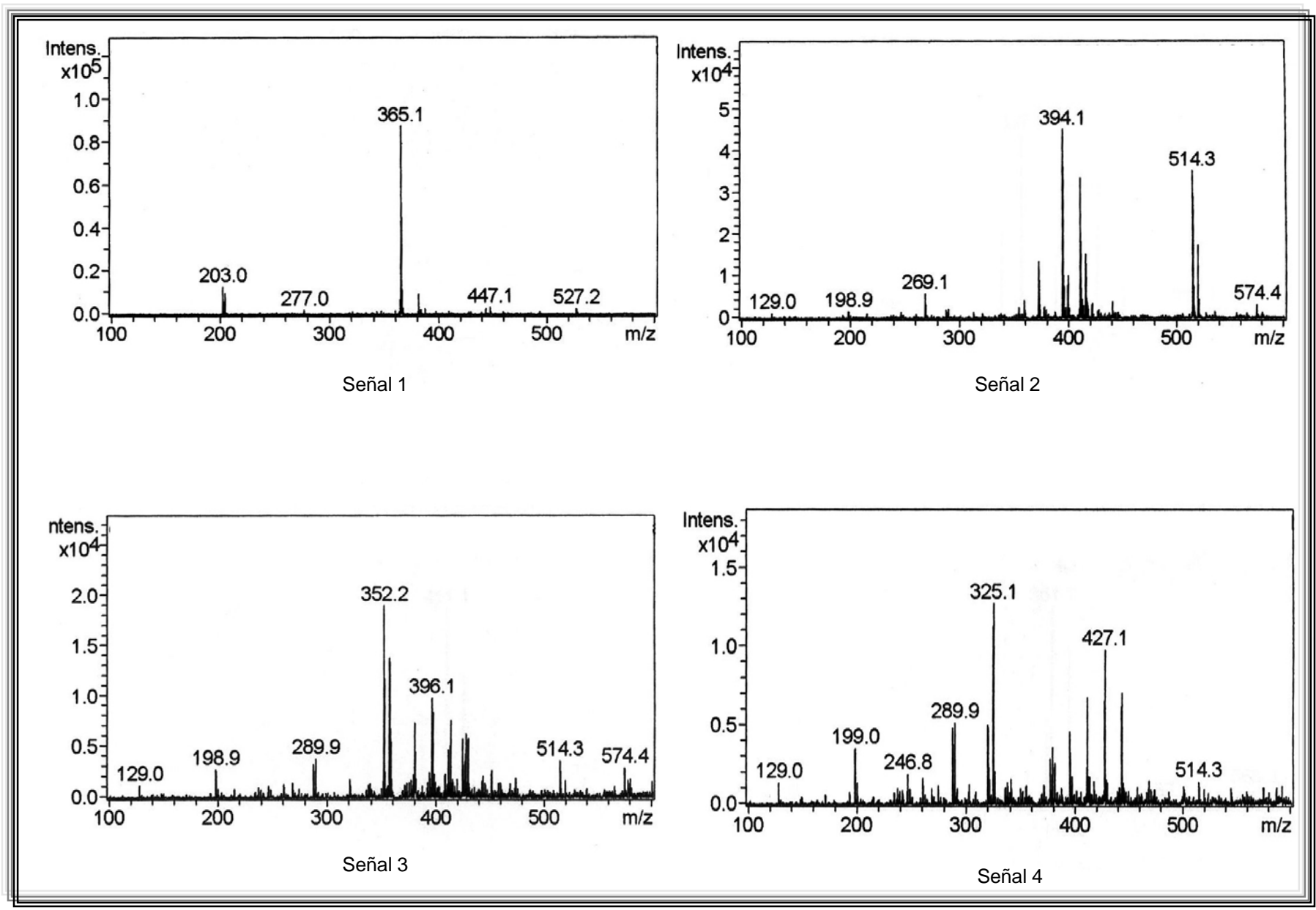
Cromatograma 8: Mezcla de compuestos de referencia fortificada con la fracción II-III-C-e



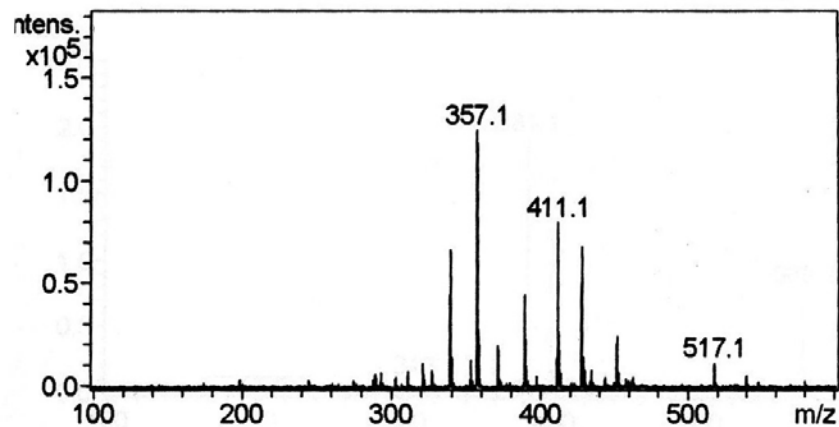
Ionograma 1: Fracción II-III-C-e



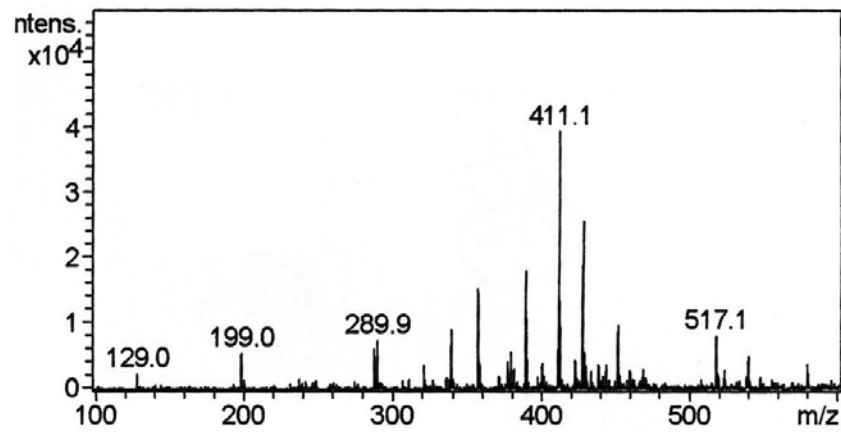
Ionograma 2: Mezcla de diterpenos de referencia fortificada con la fracción II-III-C-e



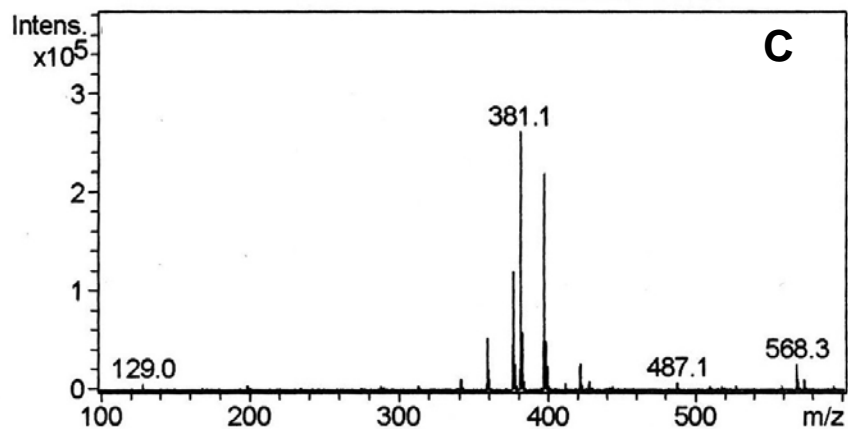
Espectros de masas de cada señal del Ionograma 2



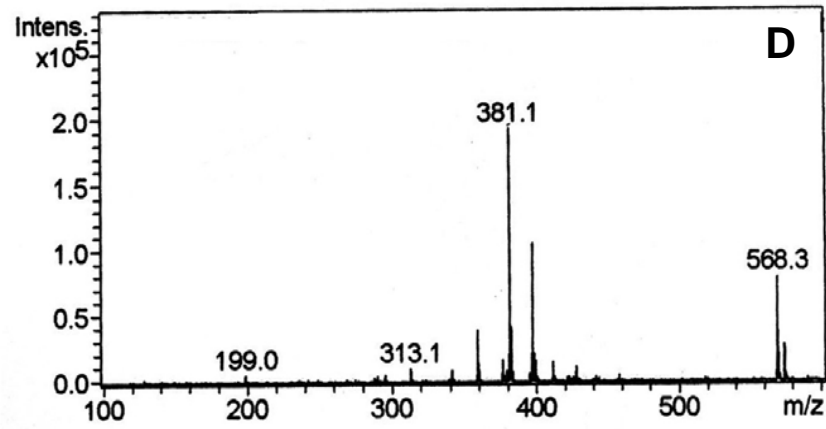
Señal 5



Señal 6

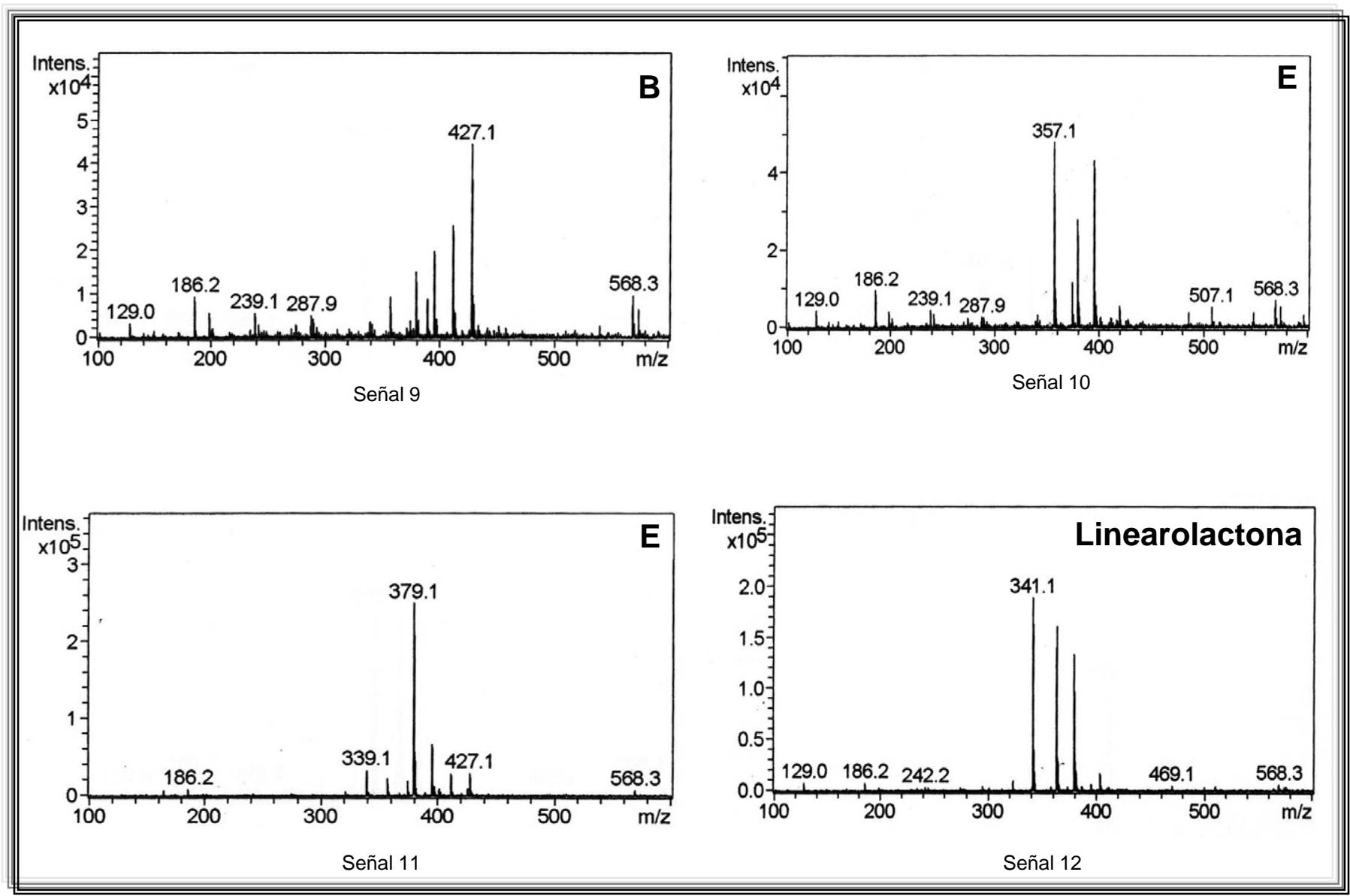


Señal 7

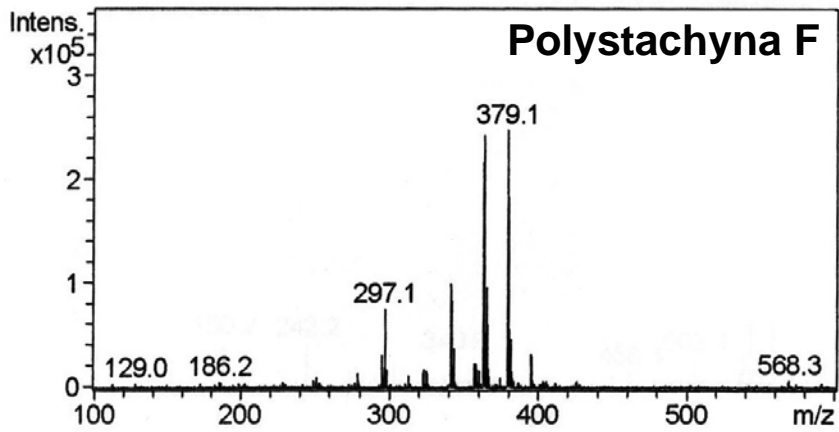


Señal 8

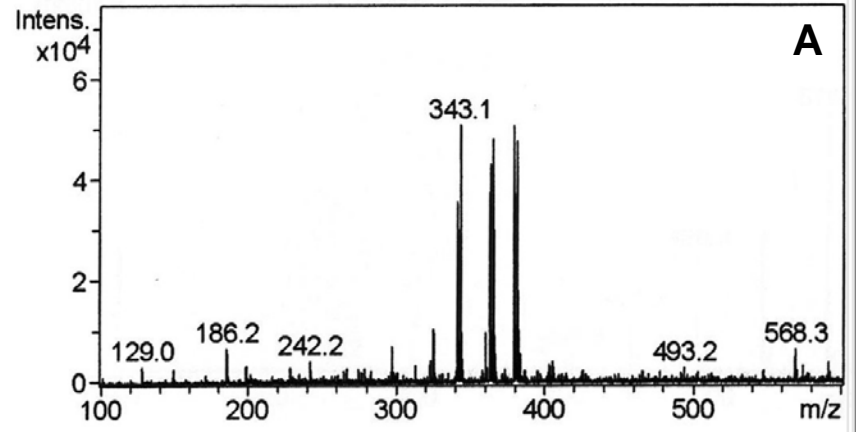
Espectros de masas de cada señal del Ionograma 2



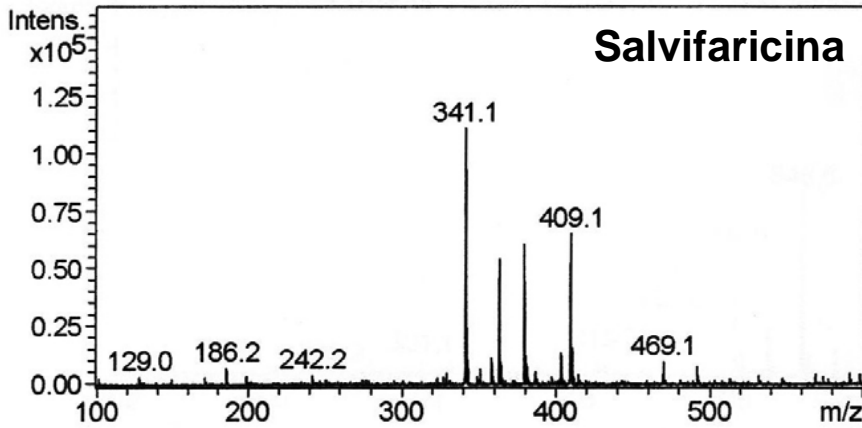
Espectros de masas de cada señal del Ionograma 2



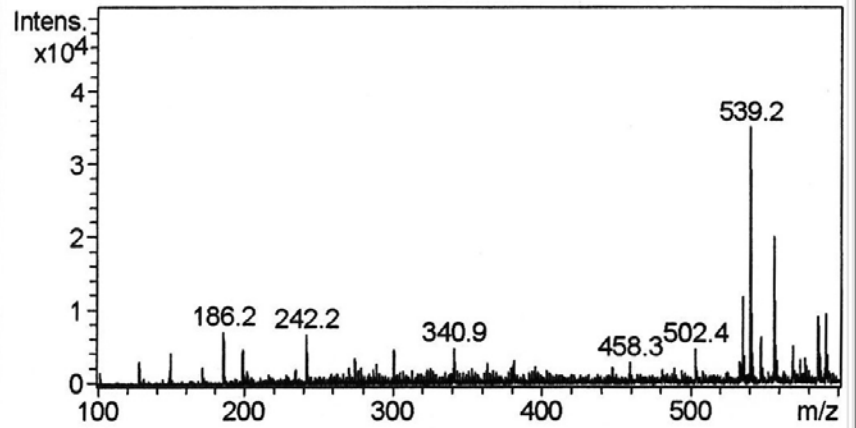
Señal 13



Señal 14

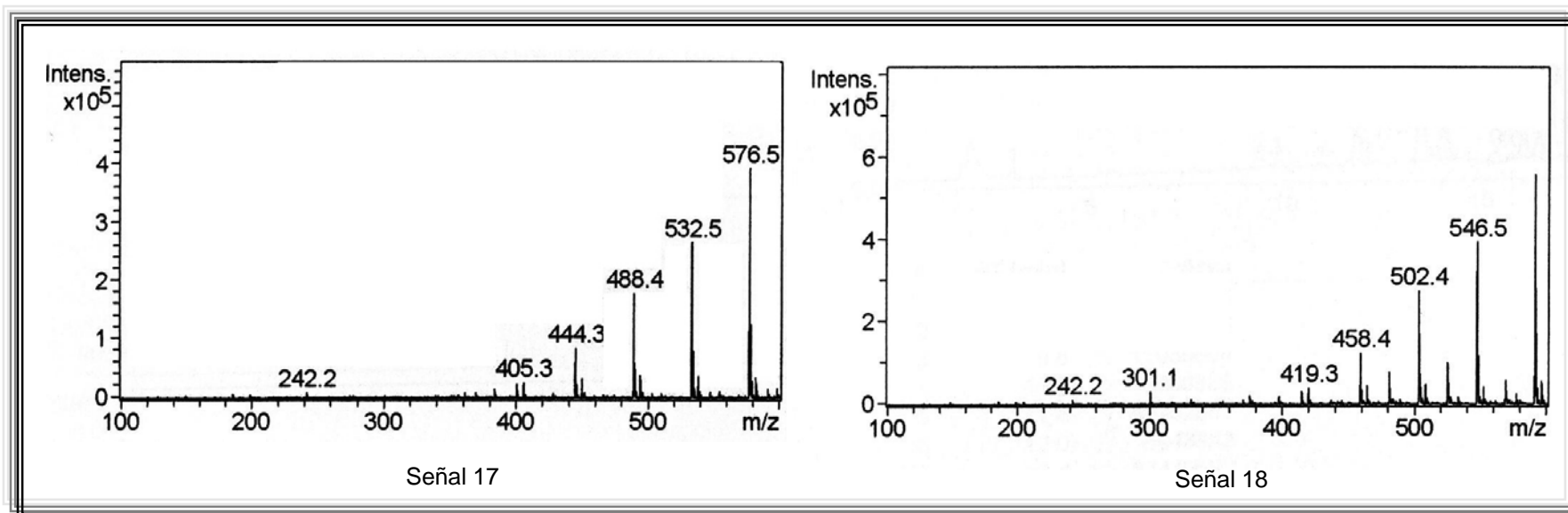


Señal 15

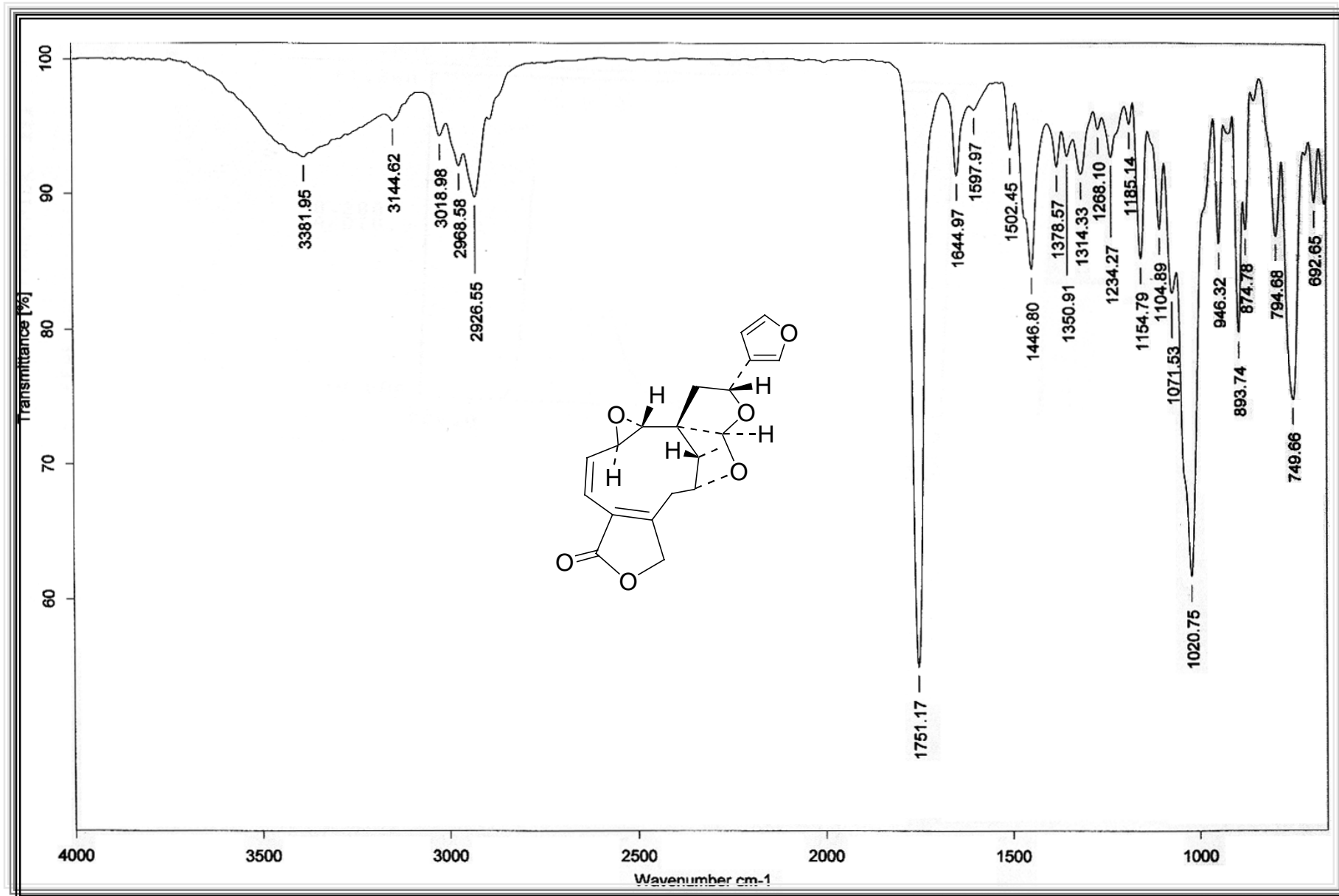


Señal 16

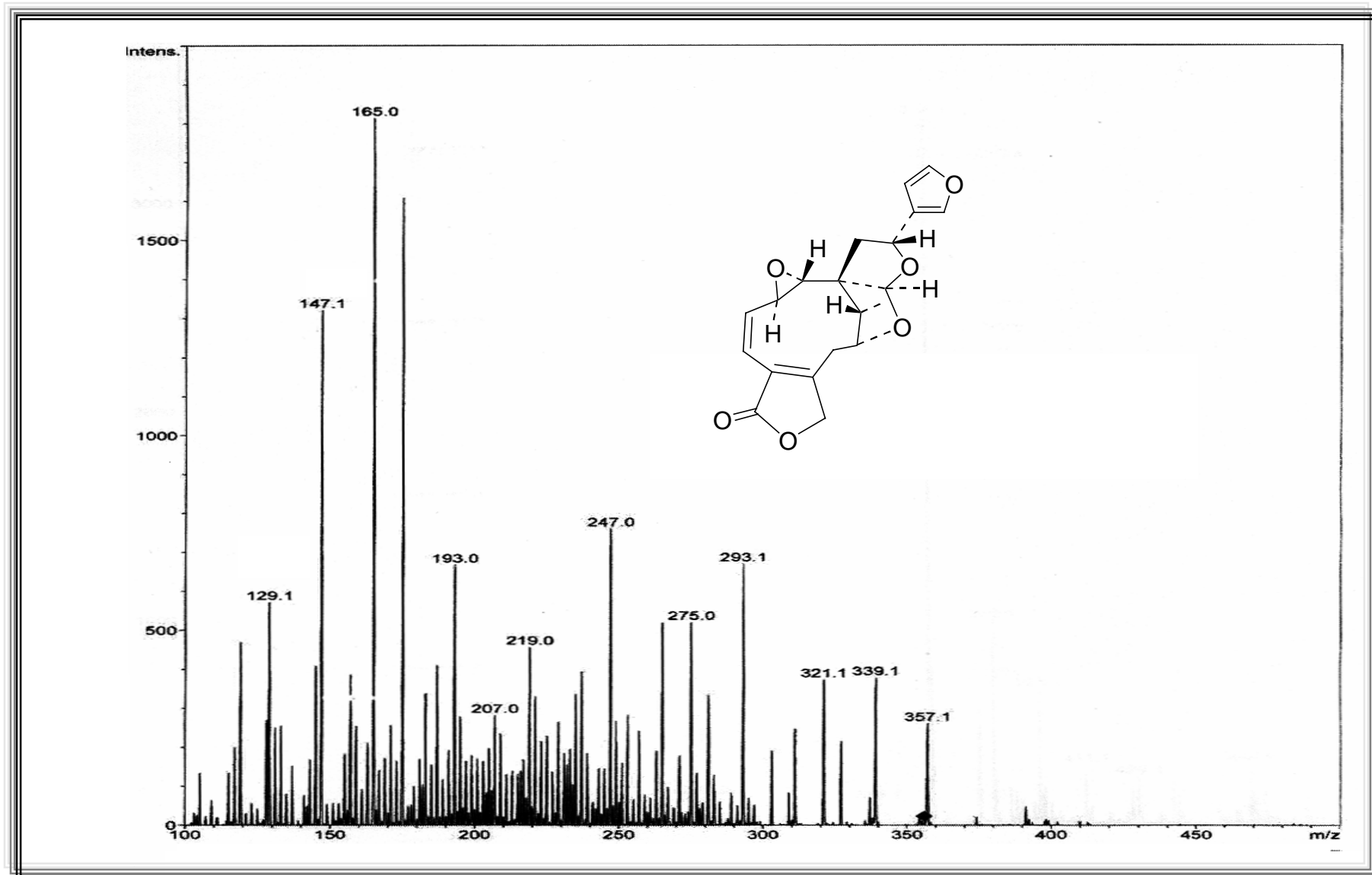
Espectros de masas de cada señal del Ionograma 2



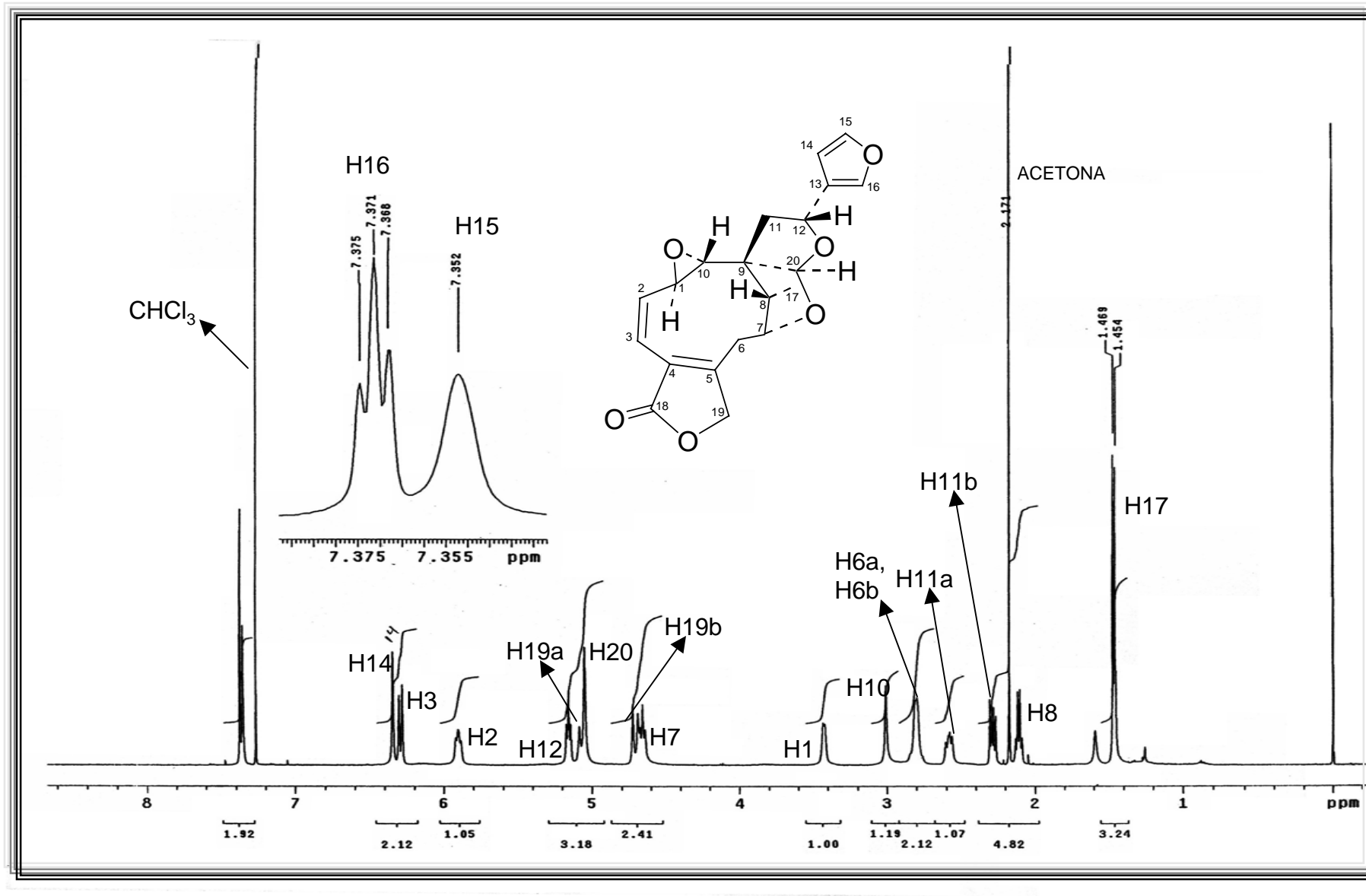
Espectros de masas de cada señal del Ionograma 2



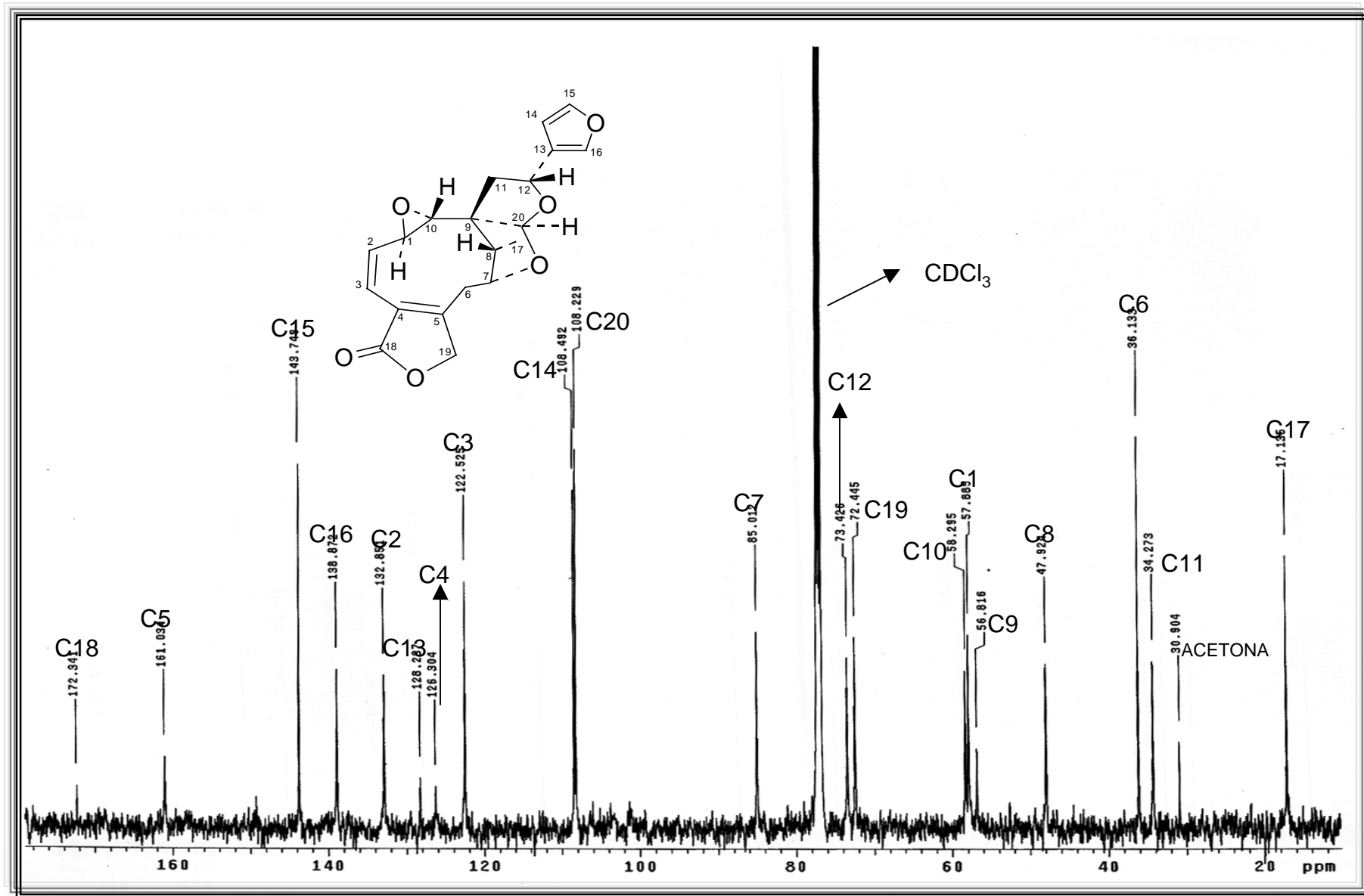
Espectro 1: IR de la Polystachyna F(película)



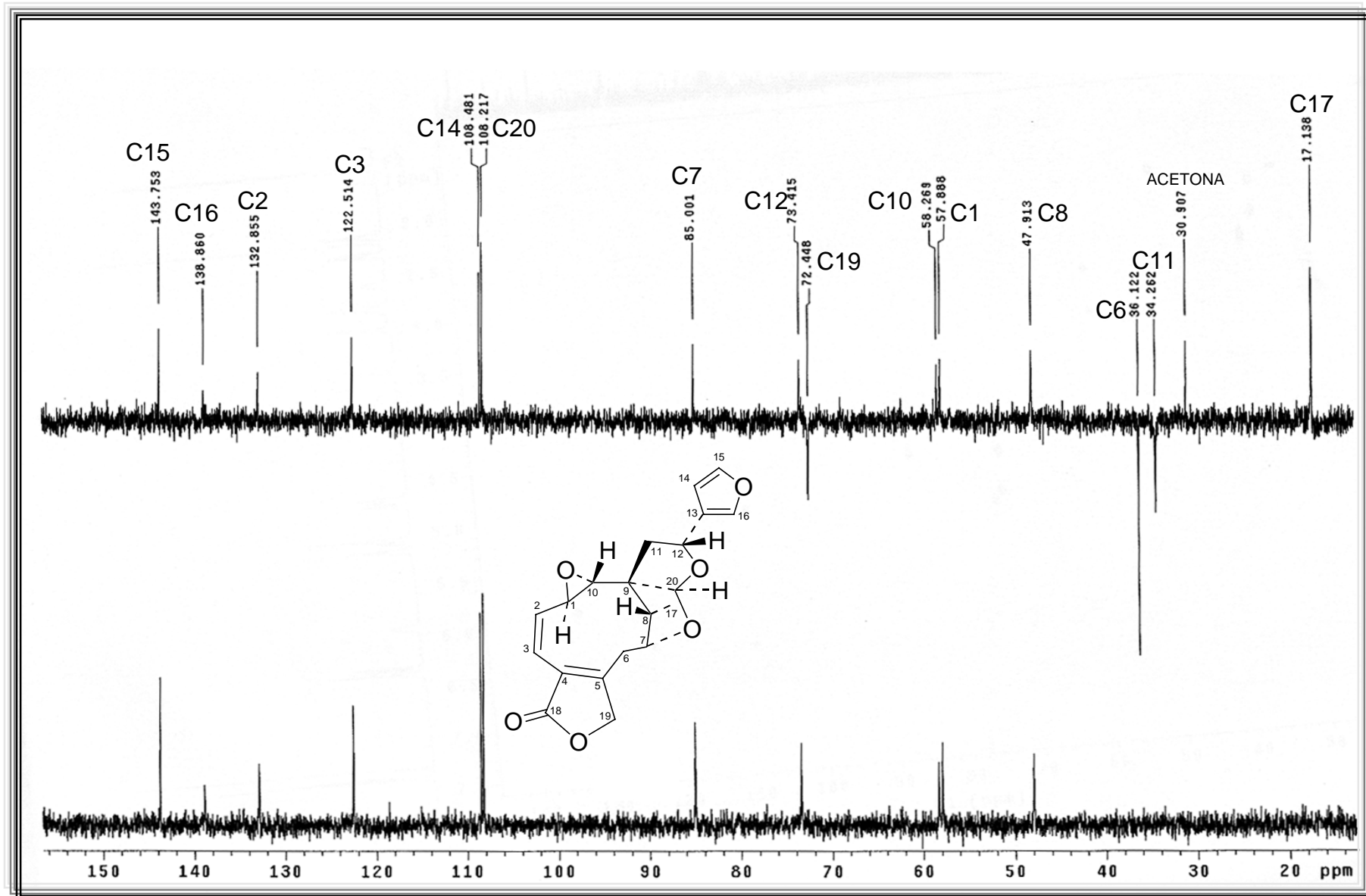
Espectro 2: EM (trampa de iones) de la polystachyna F



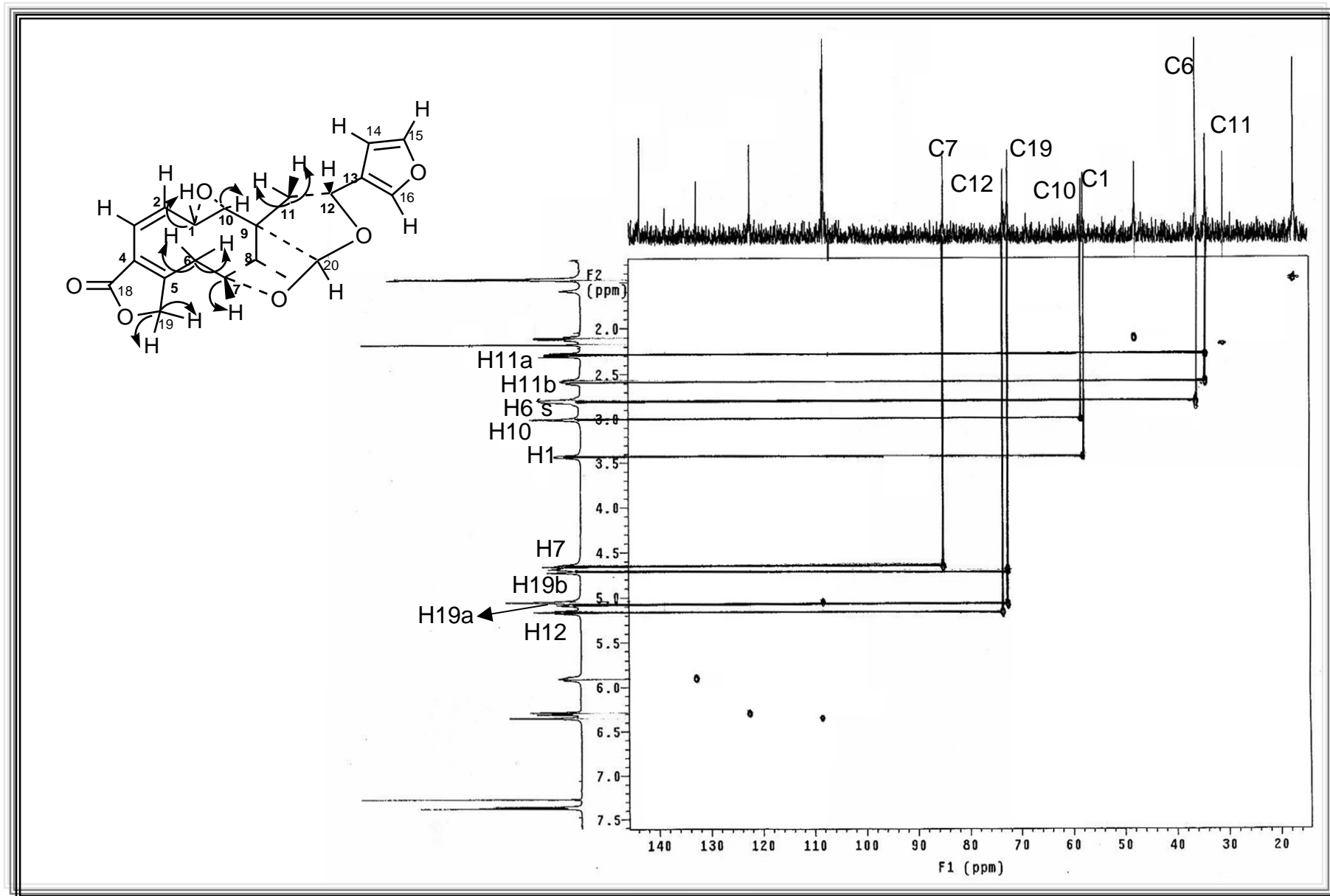
Espectro 3: RMN ¹H de la polystachyna F



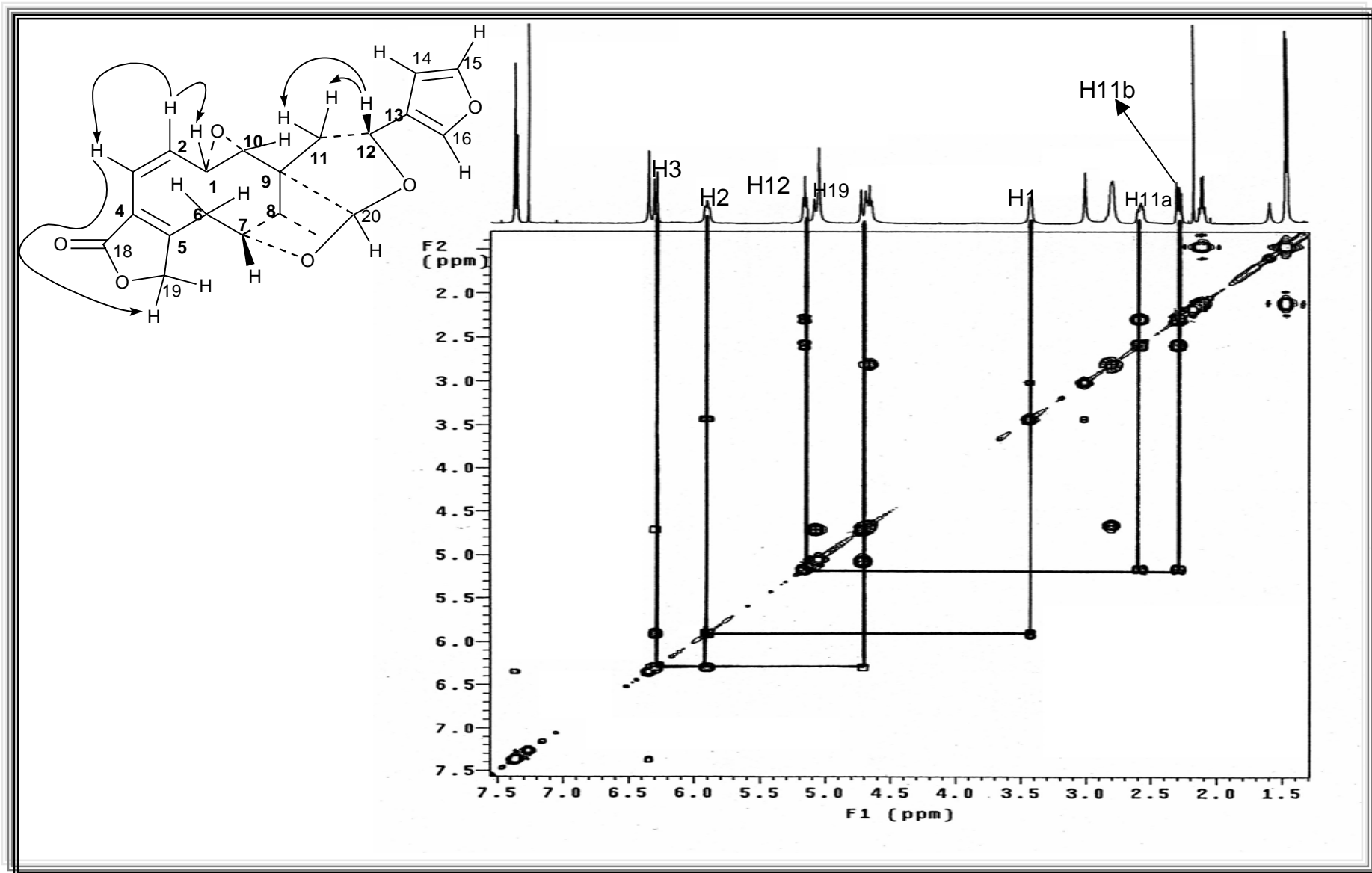
Espectro 4: RMN ¹³C de la Polystachyna F



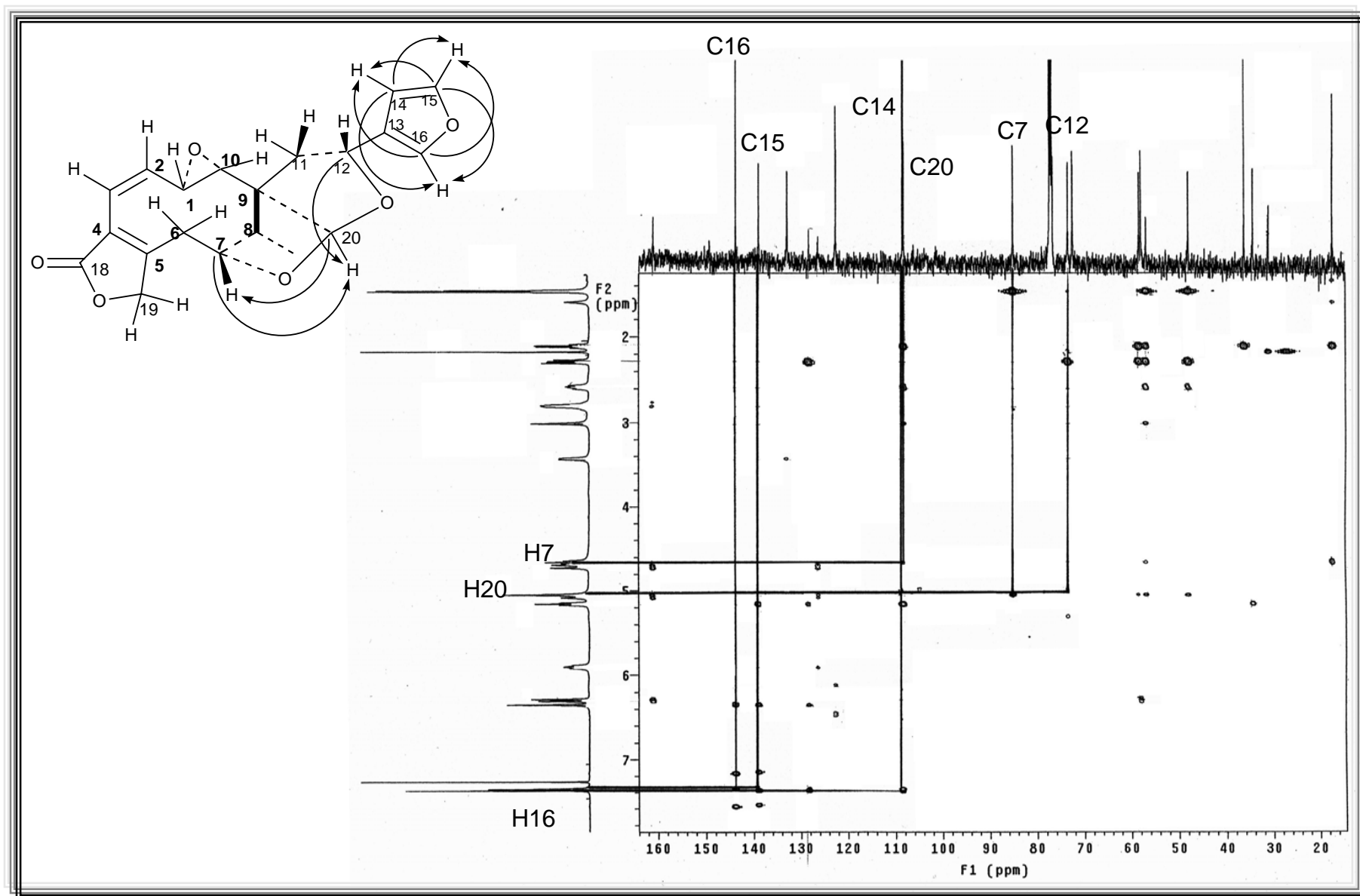
Espectro 5: Espectro DEPT de la Polystachyna F



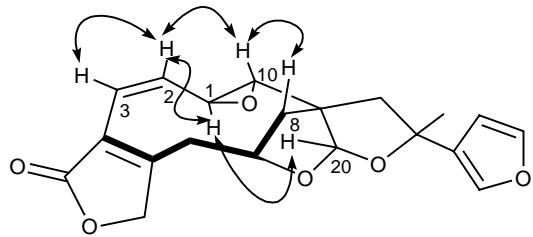
Espectro 6: Experimento HSQC.



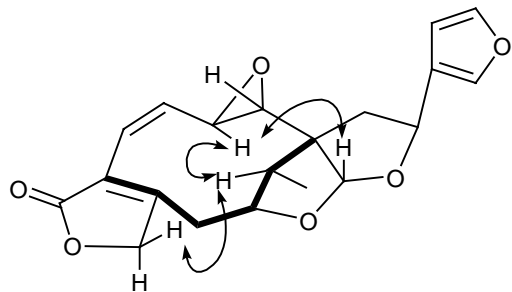
Espectro 7: Experimento COSY



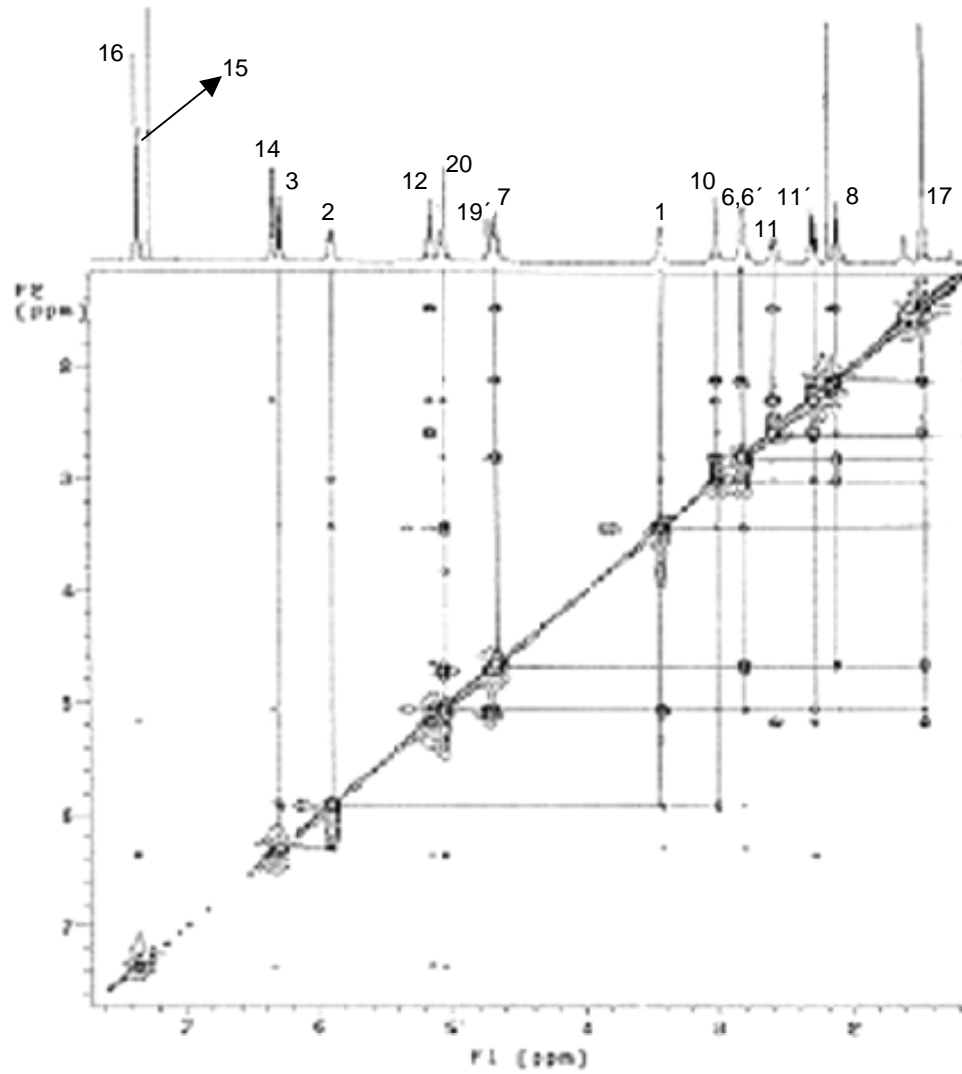
Espectro 8: Experimento HMBC



Conformero 1



Conformero 2



Espectro 9.- Correlaciones NOESY