



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO FITOQUÍMICO DE *SALVIA PANNOSA* FERNALD

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA

PRESENTA

CECILIA RUIZ ALEMÁN



CD.MX.

2017



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Dra. Yolanda Caballero Arroyo

VOCAL: Dra. María Isabel Aguilar Laurents

SECRETARIO: M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez

1er. SUPLENTE: Dr. José Federico Del Río Portilla

2° SUPLENTE: M. en C. Ana Adela Sánchez Mendoza

INSTITUTO DE QUÍMICA

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez

SUPERVISOR TÉCNICO:

M. en C. Ana Adela Sánchez Mendoza

SUSTENTANTE (S):

Cecilia Ruiz Alemán

En este trabajo se realizó el estudio de las fracciones poco polares del extractos de las partes aéreas de la especie *Salvia pannosa* Fernald.

Índice:

❖ Antecedentes	
Familia Labiatae.....	5
Género Salvia.....	8
<i>Salvia pannosa</i> Fernald.....	14
Terpenoides.....	14
Flavonoides.....	30
Diversas Actividades Biológicas Encontradas en Especies del Género Salvia.....	38
Diterpenos Como Compuestos con Actividad Antialimentaria en Contra de Insectos Fitófagos.....	45
El Proceso de Oxidación, Radicales Libres y Sustancias Implicadas.....	49
Antioxidantes y Compuestos con Actividad Antioxidante en Especies del Género Salvia.....	54
Propiedades físicas, químicas y biológicas de los ácidos ursólico y oleanólico.....	60
❖ Objetivos	
Objetivo General.....	70
Objetivos Particulares.....	70
❖ Hipótesis.....	70
❖ Material.....	71
❖ Parte Experimental.....	73
Colecta del Material Vegetal.....	73
Obtención de los Extractos de las Hojas Flores y de Ramas.....	74
Fraccionamiento Primario del Extracto de Hojas y Flores.....	74
Fraccionamientos Posteriores.....	75
❖ Resultados.....	76
Extracto.....	76
Fraccionamiento primario.....	79
Fraccionamientos posteriores.....	83
❖ Análisis de Resultados.....	84
❖ Conclusiones.....	99
❖ Bibliografía.....	100
❖ Cromatogramas y Espectros.....	104

ANTECEDENTES

Familia Labiatae.

La familia Labiatae es una extensa familia de plantas formada por alrededor de 224 géneros y aproximadamente 4000 especies.

Estas plantas se encuentran distribuidas principalmente en las zonas de los trópicos, subtropicos y regiones templadas del planeta. Los lugares con mayor diversidad de especies son el Mediterráneo, Asia Central, el continente americano, islas del Pacífico, las regiones tropicales de África y China, siendo el Mediterráneo y Asia central los lugares de mayor diversidad de las especies en cuanto al número y tipo. Esto puede indicar que la familia surgió en estas regiones durante el Cretácico Medio. (Ramamoorthy et. al. 1993).

Los miembros de esta familia se presentan principalmente como herbáceos, pequeños árboles y grandes arbustos, sus flores tienen cáliz y corola bilabiados, la placenta intrusiva divide al ovario maduro en cuatro núcleos y tienen un estilo ginobásico. Una de las características más distintivas de estas plantas es el contenido de terpenos en las glándulas de las células epidérmicas. Éstos le dan a las plantas un aroma característico. Como consecuencia de lo anterior, muchas especies son utilizadas en medicina tradicional y en la preparación de alimentos en muchas partes del mundo (Ramamoorthy et. al.1993).

Las plantas de la familia Labiatae son utilizadas principalmente con fines medicinales, en el tratamiento de padecimientos gastrointestinales, respiratorios, fiebres, reumáticos y problemas dermatológicos. Para este fin son utilizadas tanto numerosas especies de los géneros *Hyptis*, *Mentha*, *Ocimum*, *Salvia*, *Satureja* y *Stachys*, como especies específicas de géneros distintos como *Thymus vulgaris*, *Oreganum vulgare* y *Rosmarinus officinalis*.

Los patrones de distribución y el endemismo de las especies sugieren que los ancestros de la familia surgieron en el Cretácico, la única evidencia fósil indica que

la familia se pudo haber originado hace poco menos de 11 millones de años, durante el Mioceno. (Ramamoorthy et. al. 1993).

En México existen seis tribus de la familia, en las que se encuentran 27 géneros y alrededor de 512 especies. La tribu con más géneros y la más diversa es la tribu *Menthae* mientras que la tribu con más especies es la tribu *Salviae*. Mediante una clasificación de los géneros de la familia, de acuerdo a su tamaño, se puede observar que el género *Salvia* representa al 64% de todas las especies dentro de la familia, por lo que es el género más grande de la familia (Ramamoorthy et. al 1993).

Las plantas de esta familia en México se encuentran principalmente en las regiones montañosas y en los tipos de vegetaciones áridas, sin embargo, es posible encontrarlas en las regiones tropicales y tierras bajas. También, se pueden encontrar especies en los bosques de pino, roble y de coníferas, por lo general, estas especies no se encuentran en regiones húmedas. Algunas especies de los géneros *Cunila*, *Salvia*, *Satureja*, *Stachys* y *Scutellaria* crecen en lugares restringidos. Los patrones de distribución y el endemismo de la familia en México demuestran que la multiplicación de las especies se ha llevado a cabo en los desiertos y en las regiones áridas del país mientras que la especiación se ha llevado a cabo en las regiones montañosas. (Ramamoorthy et. al.1993).

En México existen pocos los géneros endémicos de esta familia pero el 75 % de las especies de la familia *Labiatae* son endémicas (Ramamoorthy, Elliot, 1993). El porcentaje de estas especies en el país, de la familia *Labiatae* se encuentra entre el 55 y 60%. Esto se debe a la topografía accidentada y a la compleja historia geológica. La incidencia local extrema de muchas especies muestra el papel tan importante que ha tenido la historia geológica y los cambios climáticos en la evolución de estas especies. La región con más especies endémicas está formada por los estados de Oaxaca, Puebla, Guerrero, Michoacán, y Jalisco (Ramamoorthy et. al.1993).

Los progenitores de las especies mexicanas de la familia surgieron, de igual forma, en el Cretácico para posteriormente formar parte de la flora Madro-Terciaria. La uniformidad de la morfología de la estructura de las flores, la rareza de los híbridos y la naturaleza extrema local de especies sugieren que la evolución de las especies se ha llevado a cabo debido a la ruptura de la población ancestral, seguido de la ruptura de la flora Madro-Terciaria, en los bosques de pinos y roble y de esta forma, se obtuvieron los constituyentes primarios de la familia. Este fenómeno también produjo la extinción de varias especies. A veces la polinización resulta en la autofecundación de las plantas o de una población, esto ha llevado al establecimiento de poblaciones genéticamente aisladas lo que posteriormente llevó a la diferenciación de las especies. La aneuploidia, la poliploidia y las diferencias en la morfología de los cromosomas en las especies de *Salvias* han tenido un papel crucial en la evolución de muchas especies. Esto se puede observar en especies que crecen en las montañas, pero no en los grupos de regiones tropicales y tierras bajas (Ramamoorthy et. al. 1993).

La aparición local extrema de ellas sugiere una rápida evolución de las especies de esta familia, la combinación de la biología de la polinización, un sistema favorable de una pequeña población, una compleja historia geológica, la ruptura de la flora Madro-Terciaria y la evolución de los desiertos y montañas han llevado a una diversidad existente en México, el rol de la variación cromosómica tiene un papel importante en la evolución de varios grupos (Ramamoorthy et. al. 1993).

No se tiene mucha información en cuanto a la polinización. Por observaciones realizadas por T. P. Ramamoorthy se sabe que los insectos que visitan a las flores son abejas, mariposas, colibríes y polillas. La diversidad de las especies en la familia está relacionada con la variedad de polinizadores (Ramamoorthy et. al. 1993).

Se han realizado estudios fitoquímicos con diversos géneros de esta familia en los que se han aislado una gran variedad de compuestos como flavonoides, varios tipos de terpenoides y esteroides, algunos de estos compuestos, presentan actividades biológicas de interés, como diversos tipos de actividad farmacológica y

actividad antialimentaria que va en contra de insectos fitófagos (Esquivel et. al. 2000).

Género *Salvia*:

El género *Salvia* es el género más grande de la familia Labiatae, con alrededor de 1000 especies en el mundo. Las regiones con mayor diversidad de *Salvias* son el Mediterráneo, el este de Asia, el sur de África y las montañas de México y América del sur. En México se encuentran aproximadamente 312 especies diferentes de las cuales, un gran porcentaje de ellas (al rededor del 88%) son endémicas. Este género está dividido en 5 subgéneros, *Calosphase*, *Salvia*, *Sclarea*, *Leonia* y *Audibertia*. Las plantas que se encuentran en México (con excepción de las *Salvias* californianas) y en América del Sur pertenecen principalmente al subgénero *Calosface* (Ramamoorthy et. al. 1993).

En México, el género se puede encontrar en casi todo tipo de hábitats. Estas plantas se encuentran predominantemente en bosques de abetos, pinos, pino-roble, roble y bosques fríos y caducifolios, además en desiertos y zonas áridas. También se pueden encontrar especies en zonas montañosas mientras que en zonas de baja altitud es poco común encontrar especies (Ramamoorthy et. al. 1993).

Alrededor del 92% de las especies de *Salvias* son perenes y los órganos perenes son diversos, raramente los estambres son vistos enraizados alrededor de los nodos los cuales pueden ser cilíndricos de cuatro multinodos, con los internodos a veces huecos. A veces las plantas son escaposas, es decir, no tienen hojas. Sus hojas pueden ser estrechas y filiformes hasta espectacularmente grandes y foliosas. Las flores nunca están solas, se pueden encontrar en pares o en racimos y dispuestos en vertical. Las brácteas son subuladas a ocasionalmente foliosas y son principalmente caducifolias tempranas. El cáliz es bastante uniforme y presenta variaciones en cuanto al tamaño y vestidura, sin embargo, las variaciones en la corola son evidentes y esto sugiere una variación en la longitud estaminal. Esta característica es muy importante en la polinización y en el

mantenimiento de la variación entre las especies en el género (Ramamoorthy et al. 1993).

Se han realizado varios estudios fitoquímicos de especies de *Salvias* de todos los subgéneros y de ellos se han aislado flavonoides y esteroides como β -sitosterol y estigmasterol. triterpenoides con esqueleto de ursano, damarano, lupano y oleanano y una gran diversidad de diterpenoides principalmente diterpenoides de tipo abietano que han sido encontrados predominantemente, tanto en las partes aéreas como en las raíces, de las especies de los subgéneros *Salvia* y *Sclarea*. Se han aislado también diterpenoides de tipo neo-clerodano, principalmente de *Salvias* del subgénero *Calosface* (Esquivel et al, 2000).

De los estudios fitoquímicos se ha observado que hay una relación entre especies de un mismo subgénero y sus características botánicas, su distribución geográfica y su composición química. Se ha obtenido mucha información acerca de la composición química de *Salvias* sin embargo, sólo se ha estudiado a un 15% de las *Salvias* del mundo (Esquivel et al., 2000).

De los datos obtenidos en estudios fitoquímicos, en comparación con la información taxonómica, se plantea que el subgénero *Calosface* se diferenció de los grupos ancestrales de *Salvias* del viejo mundo por un evento previo de diferenciación de grupos en el género. El género se ha ido diversificando por varios motivos, entre ellos, las relaciones que existen entre especies de distintas poblaciones; que los polinizadores no distinguen entre las especies, y la variación entre el número y forma de los cromosomas, entre otros (Ramamoorthy et al. 1993).

Epling distingue ciertas características significativas para identificar a cada sección. El subgénero *Calosface* está dividido en 104 secciones, 59 se encuentran en México y 25 son endémicas del país. Además de las variaciones morfológicas, se observa una distinción en cuanto a su composición química de las especies de cada sección debido a que en determinada sección existe algún tipo de diterpenoides (compuestos de 20 carbonos) (Ramamoorthy et al. 1993).

A la sección Scorodonia pertenecen 14 especies diferentes. Los miembros de esta sección presentan hierbas perenes. Pueden crecer como arbustos de entre 1 a 5 m o como matas, sus hojas pueden ser ovaladas o deltoides, raramente cordadas con peciolos cortos. Las hojas de las brácteas pueden ser lanceoladas u ovaladas. La corola es normalmente de color azul o púrpura, a veces de color blanca y raramente de color amarillo y los estambres surgen cerca del estilo. A continuación, se enlistan las especies que pertenecen a esta sección (Santos et. al. 1996, Turner et. al. 2009)

<i>S. aequidistans</i>	<i>S. paupercula</i>
<i>S. boegei</i>	<i>s. periconia</i>
<i>S. breviflora</i>	<i>S. ramosa</i>
<i>S. keerlii</i>	<i>S. rupícola</i>
<i>S. melissodora</i>	<i>S. semiatratha</i>
<i>S. occidua</i>	<i>S. tenorioi</i>
<i>S. pannosa</i>	<i>S. tepecensis</i>

Se han realizado estudios fitoquímicos sólo de cinco Salvias de esta sección.

De *S. breviflora*, de un ejemplar recolectado en el estado de Guerrero se obtuvo ácido ursólico, ácido oleanólico, acetato de brevifloralactona y brevifloralactona. Posteriormente el anillo heterocíclico de la brevifloralactona fue abierto por el tratamiento de la materia prima con ácido trifluoroacético en cloroformo. Además, la brevifloralactona fue sometida a una monoacetilación y posteriormente a una hidrogenación catalítica. De esta forma se logró obtener a un derivado tetrahidrogenado. Además, la brevifloralactona fue oxidada y se obtuvieron varios compuestos, entre ellos, al aldehído correspondiente. La estructura de la brevifloralactona fue confirmada mediante cristalografía de rayos X, aunque no se logró conocer su configuración absoluta. Los ácidos ursólico y oleanólico fueron comparados con referencias existentes (Cuevas et. al.1987).

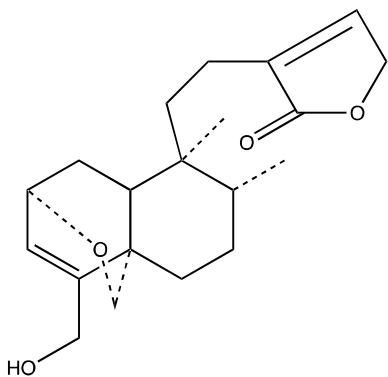


Figura 1 : Breviflorolactona

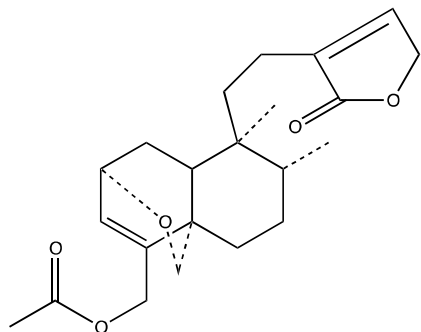


Figura 2: Acetato de breviflorolactona

De *S. keerlii*, de un ejemplar colectado en el estado de Oaxaca se aisló a la Kerlina y a la Kerlinólida. Posteriormente la Kerlina fue sometida a una hidrogenación catalítica, con H₂/Pd lo que produjo al derivado tetrahidrogenado mientras que la kerlinólida fue acetilada con anhídrido acético disuelto en piridina. Sus estructuras y su estereoquímica fueron confirmadas mediante un análisis por difracción de rayos X (Esquivel et. al. 1985).

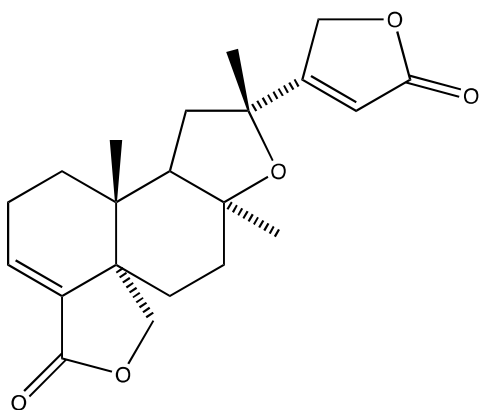


Figura 3: Kerlina

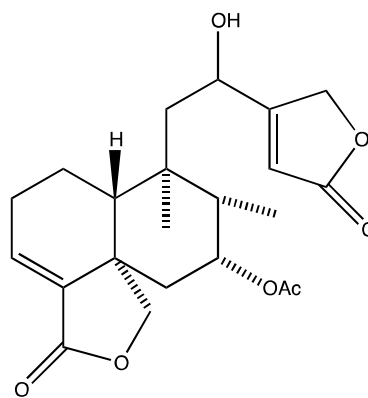


Figura 4: Kerlinolida

De *S. melissodora*. En un primer estudio, de un ejemplar obtenido del Valle de México se obtuvo al ácido melissodórico (Rodríguez Hahn et. al. 1973). Debido a que el ácido melissodórico presentó actividad antialimentaria en contra de insectos fitófagos, en estudios posteriores se buscó una adecuada fuente natural de este compuesto. En un estudio fueron analizados dos ejemplares colectados en diferentes regiones. De un ejemplar colectado en el Estado de México se obtuvieron, además de ácido ursólico y oleanólico, dos diterpenoides de tipo neo-clerodano que ya habían sido aislados de otras especies, uno de ellos fue aislado de *Baccharis trimera*, *Salvia semiatratha* y *S. microphylla*. El compuesto aislado fue comparado con muestras auténticas y con datos obtenidos de la literatura. El otro compuesto fue aislado previamente de *Portulaca* cv, este diterpenoide fue identificado como Portúlida C. La oxidación de Portúlida C con MnO_2 en cloroformo dió como resultado al 1-desoxibacrispina, un compuesto aislado previamente de *Baccharis crispa*. (Esquivel et. al. 1988).

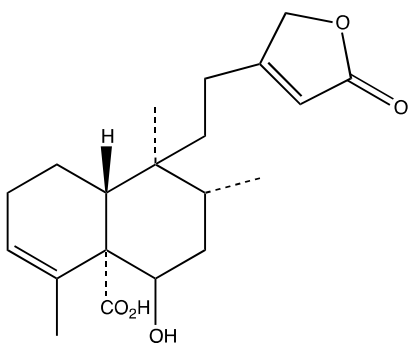


Figura 5: Ácido melissodórico

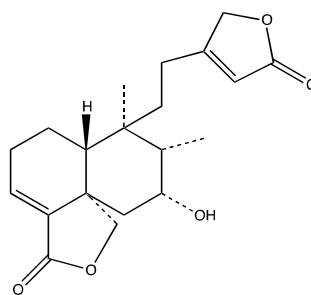


Figura 6: Semiatriin, diterpenoide aislado de *Baccharis trimera*, *S. semiatratha* y *S. microphylla*

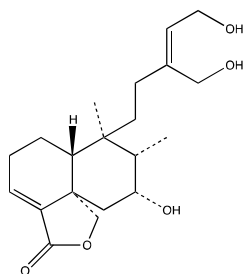


Figura 7: Portúlida C

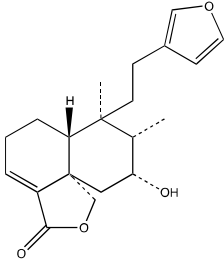


Figura 8: 1-deshidrobacrispina

De otro ejemplar colectado en el estado de Hidalgo se obtuvieron, además del ácido oleanóico, dos diterpenoides, uno de ellos es la brevifloralactona que ya se había aislado de *Salvia breviflora*. El compuesto obtenido fue comparado con referencias auténticas y con datos de la literatura. En este estudio se logró obtener la configuración absoluta de la brevifloralactona por medio de difracción de rayos X (Esquivel et. al. 1988).

A pesar de que el ácido melissodórico no fue aislado de ninguno de los ejemplares analizados, los diterpenoides presentes en esta especie resultan ser interesantes debido a la actividad antialimentaria en contra de insectos fitófagos. (Esquivel et. al. 1988).

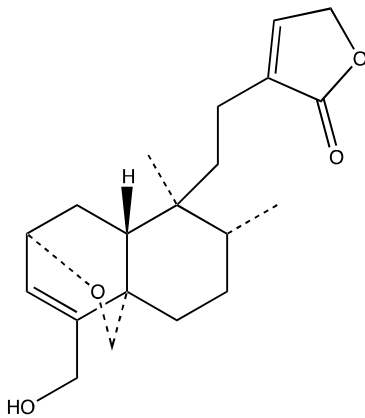


Fig 9: Estructura con estereoquímica absoluta de la brevifloralactona, un compuesto aislado de *S. breviflora* y *S. melissodora*

En otro estudio realizado con un ejemplar de la misma especie, colectada en el estado de San Luis Potosí se aislaron, además de sitosterol y ácido oleanóico, 10 diterpenoides de tipo ent-clerodano. (Esquivel et. al. 1989).

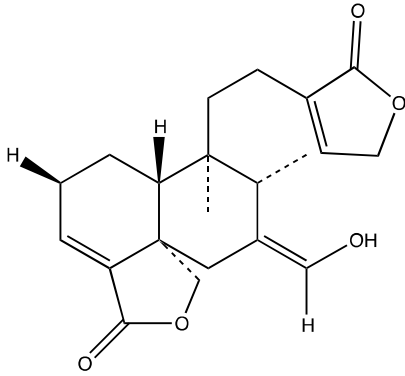


Figura 10: 7-hidroxi-ent-clerodan-3,13-dien-18,19-16,15-diolida, aislada en dos poblaciones de *S. melissodora* provenientes de los estados de Hidalgo y San Luis Potosí

De *Salvia semiatratha*, otra especie de la misma sección que fue estudiada, se obtuvo la semiatrina, un diterpenoide. Su estructura y su estereoquímica fueron establecidas por análisis de difracción de rayos X (Soriano et. al. 1987).

Salvia pannosa Fernald: Se encuentra en el sur de Puebla y en la frontera entre Puebla con Oaxaca, en una extensión de 1200 a 3000 m, crece entre los meses de julio y octubre. Se presenta como un arbusto que mide alrededor de 1 y 2 m de altura, sus hojas bicolor son lanceoladas o truncadas y subcordadas en la base y presenta abundantes flores moradas. (Turner et. al. 2009).

Terpenos y terpenoides:

Los terpenoides son un grupo grande y estructuralmente diverso de productos naturales los cuales están formados por unidades de 5 carbonos llamadas isopreno. Los terpenoides se clasifican de acuerdo al número de unidades de isopreno presentes en sus estructuras, en hemiterpenoides (C5), monoterpenoides (C10), sesquiterpenoides (C15), diterpenoides (C20), sesterpenoides (C25), triterpenoides (C30) y tetraterpenoides (C40). En la naturaleza es posible encontrar terpenoides con un número mayor de átomos de carbono. También se pueden encontrar terpenoides cíclicos o terpenoides que han perdido átomos de carbono durante la biosíntesis, además existen compuestos con fragmentos de terpenoides (Dewick et. al. 2002).

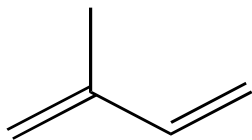


Figura 11: unidad de isopreno (C5)

En la biosíntesis de los terpenoides está involucrado un éster difosfato de cinco carbonos, el dimetilalil difosfato (DMAPP) el cual se puede sintetizar mediante dos rutas, en una de ellas, se tiene como intermediario al ácido mevalónico y la otra es la ruta del 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DXP) (Dewick et. al. 2002).

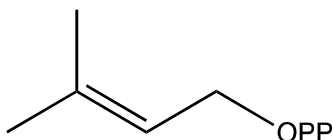


Figura 12: Dimetilalil difosfato DMAPP

La ruta del ácido mevalónico (figura 13) comienza con la formación de la acetoacetil-CoA debido a la combinación de dos moléculas de acetil-CoA, mediante una condensación de Claisen. Después, una tercer acetil-CoA se une al acetoacetil-CoA para formar al -hidróxil- -metilglutaril-CoA (HMG-CoA), por medio de una adición aldólica estereoespecífica. Después, el HMG-CoA se reduce de un tioéster a un alcohol primario, por medio de la enzima HMG-CoA reductasa, en dos pasos para formar al (3R)-ácido mevalónico, esta reducción es irreversible y se considera como un paso limitante de la reacción. Posteriormente, los grupos hidroxilo primario y secundario del (3R)-ácido mevalónico son fosforilados por dos enzimas dependientes de ATP, lo que da como resultado la formación del ácido mevalónico difosfato. Después se lleva a cabo una reacción de descarboxilación/deshidratación para formar al isopentenil difosfato (IPP), de cinco carbonos. Finalmente, el IPP es isomerizado para convertirse en el dimetilalil difosfato (DMAPP) por una enzima isomerasa. El DMAPP es un reactivo electrofílico y por lo tanto un buen grupo alquilante, además tiene un buen grupo saliente, el difosfato, y en una reacción de sustitución nucleofílica S_N1 , puede funcionar como un carbocatión electrofílico que es estabilizado por la deslocalización de la carga (Dewick et. al. 2002).

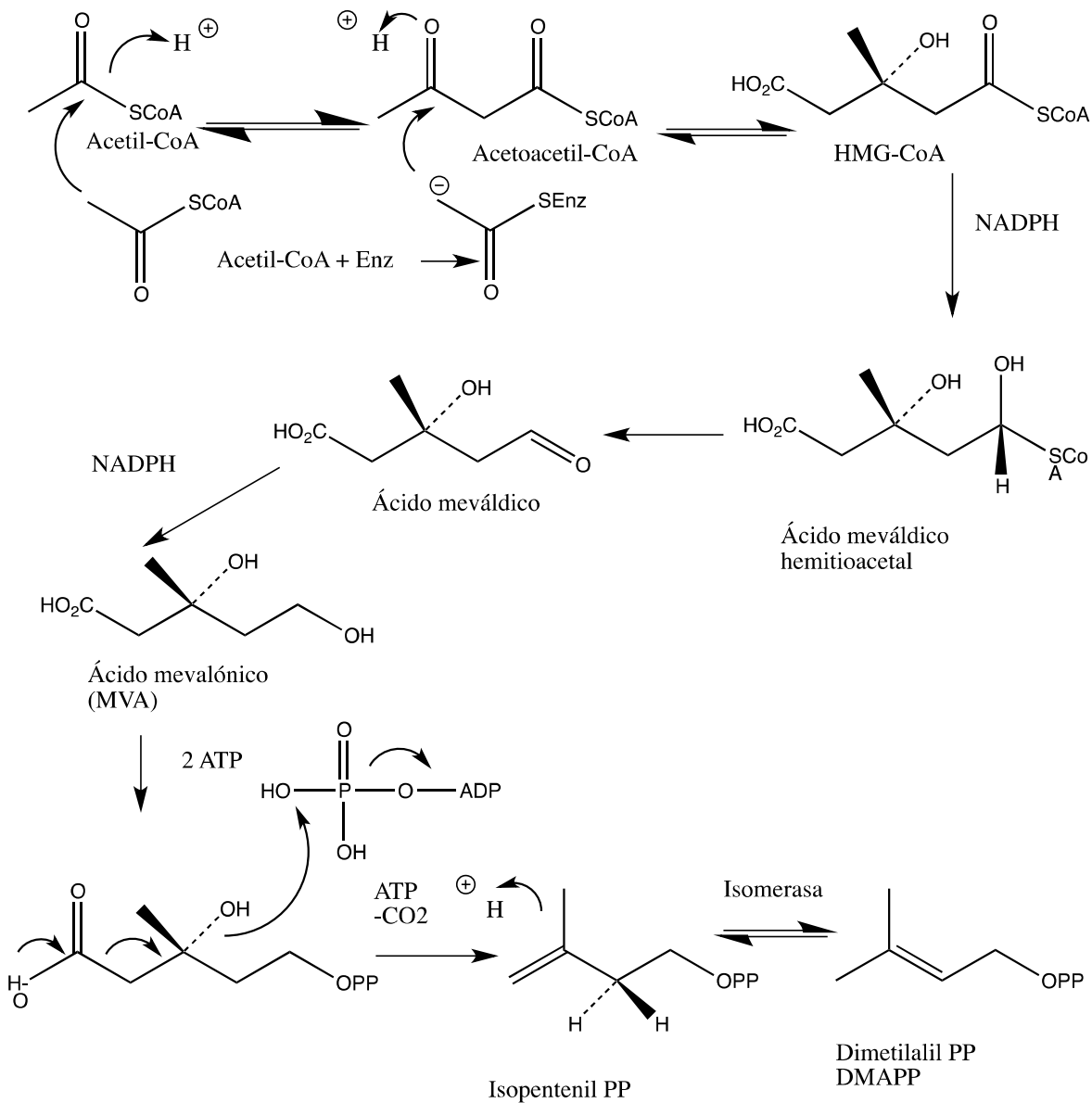
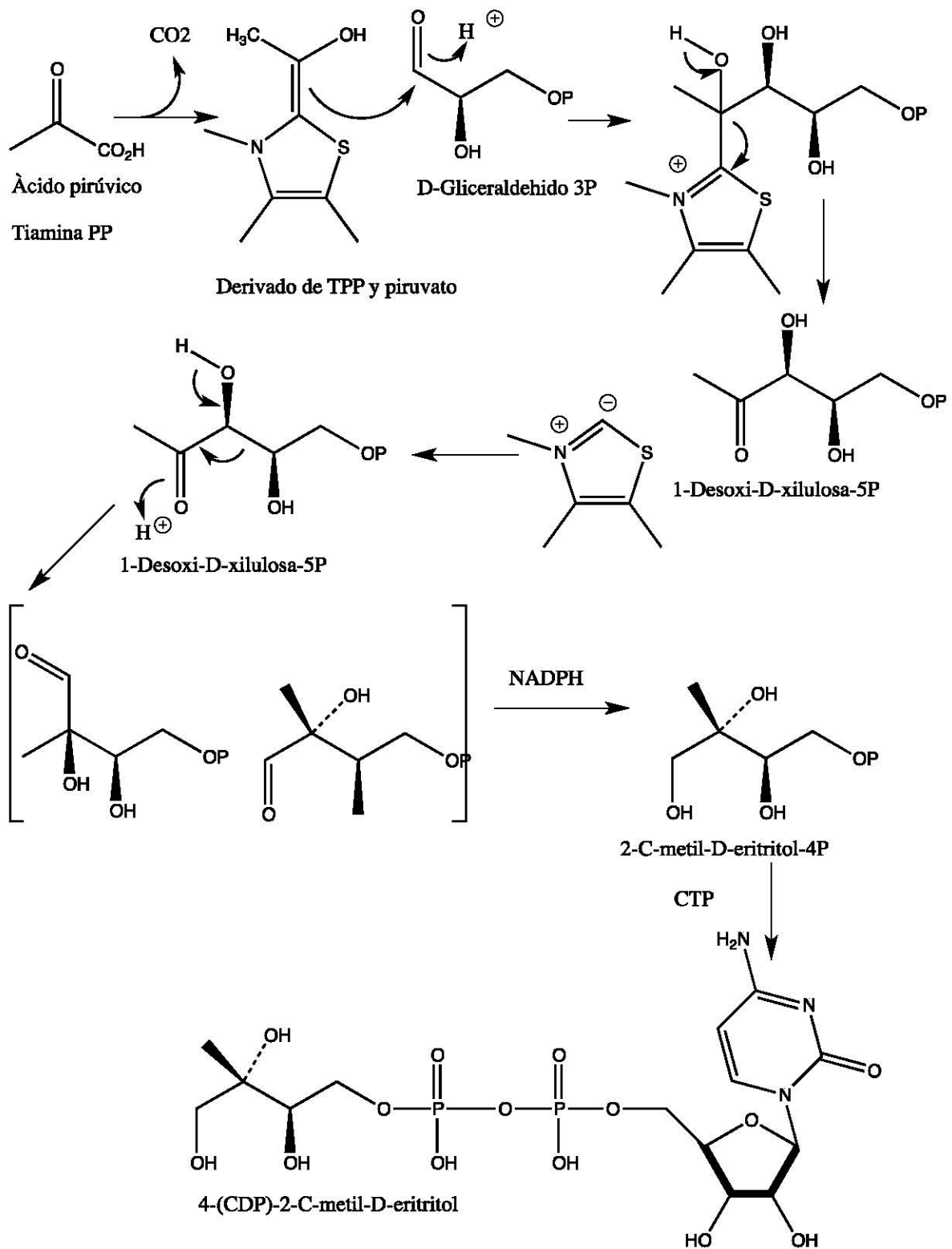


Figura 13: Biosíntesis de dimetilalil PP (DMAPP) por medio de la ruta del ácido mevalónico.

La ruta del 5-fosfato de 1-desoxixilulosa (DXP) (figura 14) comienza con intermediarios de la ruta glucolítica. El ácido pirúvico es descarboxilado por la tiamina difosfato. Este fragmento queda unido a la tiamina difosfato mediante un carbono en la posición de una imina. Esta especie, actúa como nucleófilo en una reacción de adición con el gliceraldehido 3-fosfato. Esto lleva a la formación de la desoxixilulosa difosfato y el ion tiamina es regenerado. Después, la desoxixilulosa difosfato se convierte en el 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato mediante una reacción de

rearrreglo, que es visto como un rearrreglo pinacólico, acoplada con una reducción. Esta reacción es catalizada por una sola enzima y la reducción se lleva a cabo sin la formación del aldehído intermedio. Después el 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato reacciona con una citidina trifosfato, lo que produce un derivado de la citidina difosfato que es fosforilado via ATP. El compuesto resultante se convierte en un fosfoanhídrido cíclico. Con la pérdida de una citidina fosfato se transforma en isopentenil difosfato IPP. Finalmente, el dimetilalil difosfato se produce por isomerización del IPP (Dewick et. al. 2002).



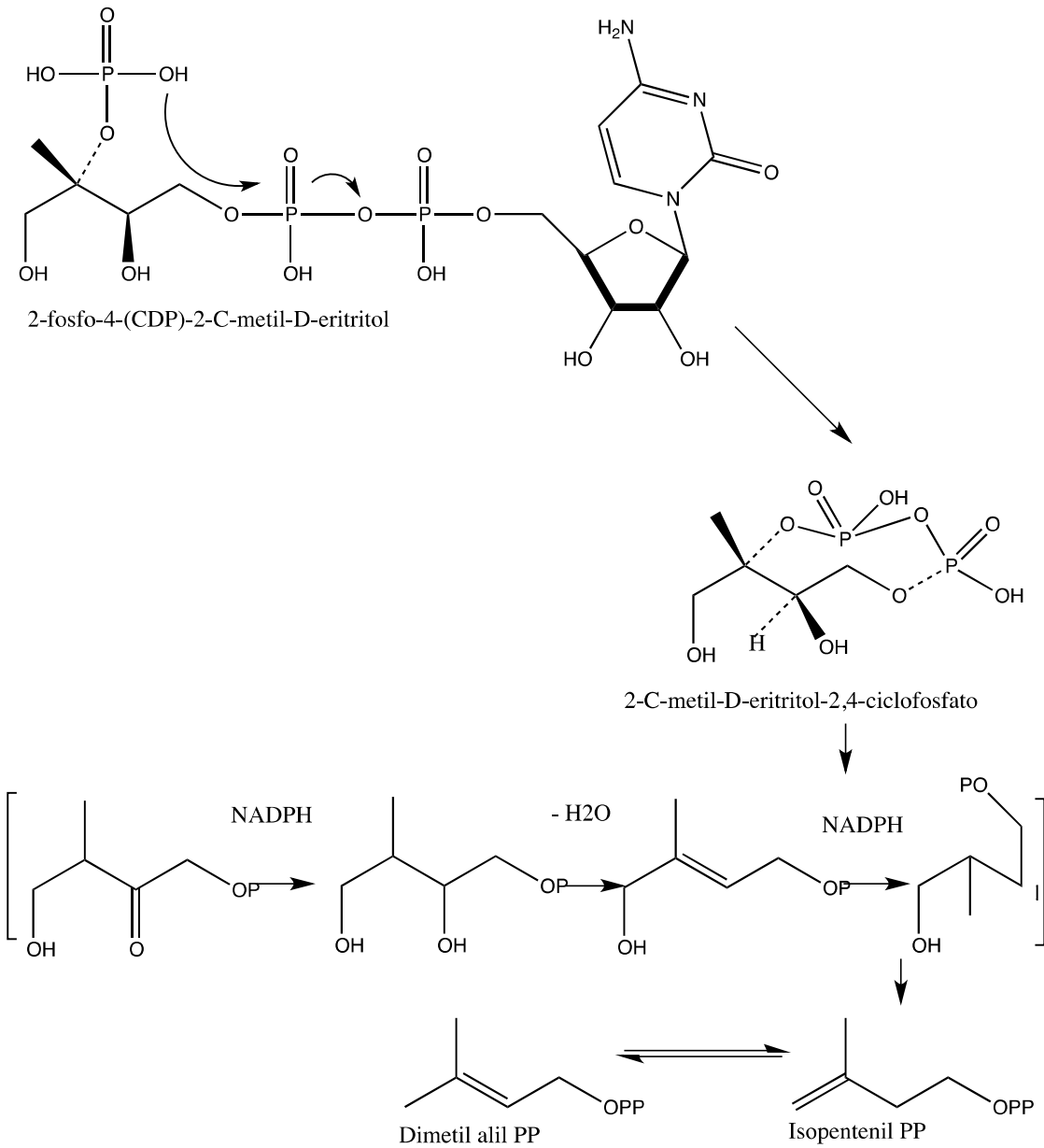


Figura 14: Biosíntesis del dimetilalil PP (DMAPP) por medio de la ruta 5-fosfato de 1-desoxixilulosa (DXP).

A pesar de que por ambas rutas se sintetizan las unidades de isopreno necesarias para la formación de terpenoides determinados, se ha observado que los animales utilizan exclusivamente la ruta del mevalonato para producir terpenoides mientras que organismos como las plantas utilizan ambas rutas, esto se debe a que las enzimas que participan en la ruta del mevalonato se encuentran en el citosol mientras que las que participan en la ruta del 5-fosfato de 1-desoxixilulosa se

encuentran en los cloroplastos. En el caso de las plantas, generalmente los triterpenoides y los esteroides son sintetizados mediante la ruta del mevalonato, los demás terpenoides son sintetizados por la ruta del 5-fosfato de 1-desoxixilulosa (Dewick et. al. 2002).

La combinación del dimetilalil difosfato con un isopentenil difosfato mediante la enzima prenil transferasa forman al geranil difosfato (GPP) (figura 15). En el proceso, el dimetilalil difosfato se ioniza, se forma un catión alílico y el isopentenil difosfato se une en esta posición por medio del carbono del doble enlace, posteriormente el isopentenil difosfato pierde un protón alílico, lo que forma al monoterpenoide geranil difosfato GPP con los dobles enlaces en posición trans y configuración E. El Linalil difosfato LPP y el neril difosfato NPP son isómeros del geranil difosfato formados por un rearrreglo del catión alílico del GPP. Esto permite cambiar de posición al grupo difosfato en el caso del LPP y también cambiar la configuración del doble enlace de E a Z en el caso del NPP. Estos cambios llevan finalmente a la formación de una gran diversidad de monoterpenoides, algunos de ellos, componentes de aceites esenciales (Dewick et. al. 2002).

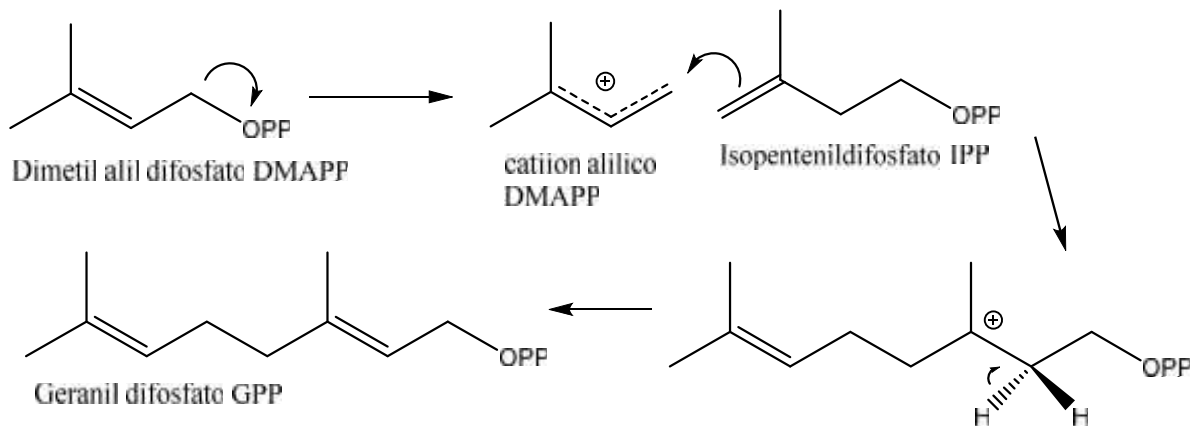


Figura 15: Formación del geranil PP (GPP)

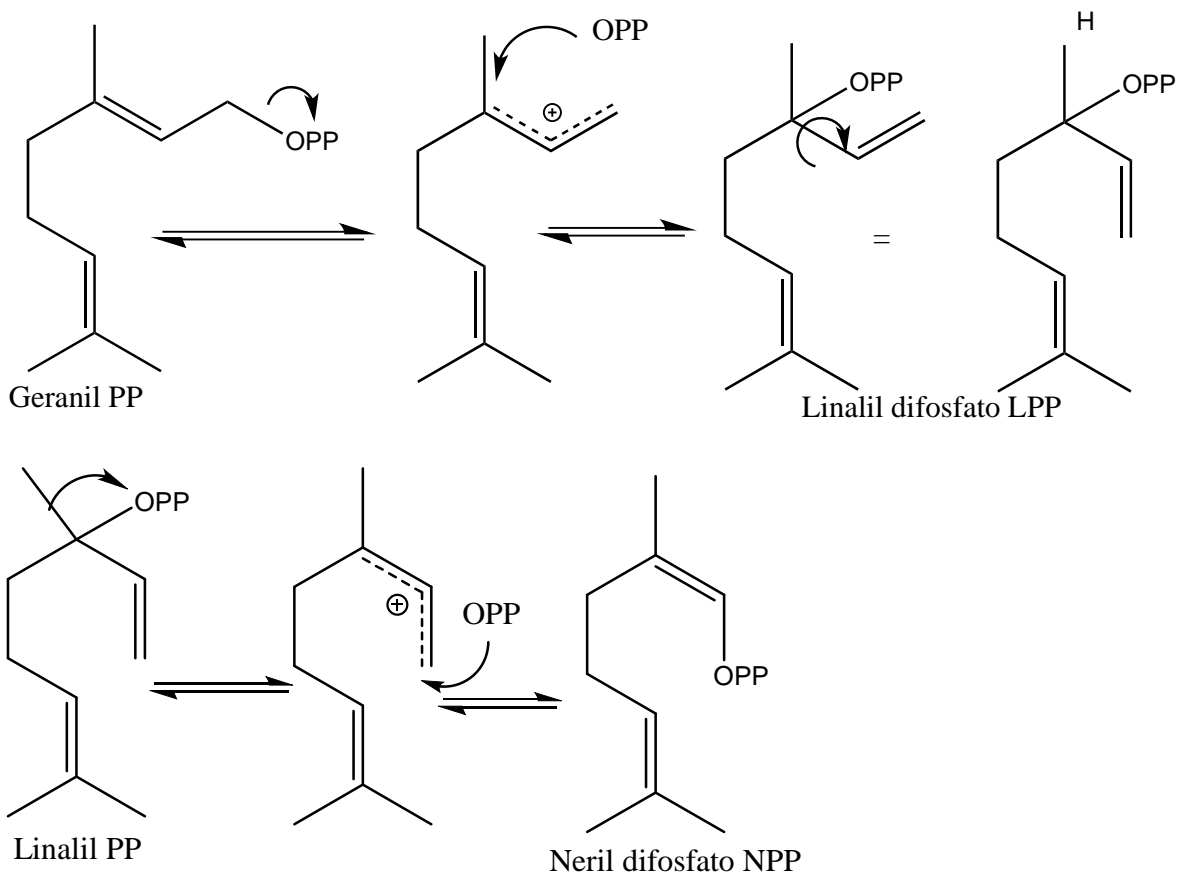


Figura 16: Formación de Linalil PP y Neril PP

La adición de un isopentenil difosfato al geranyl difosfato, con ayuda de la enzima prenil transferasa, da como resultado la formación del precursor fundamental de los sesquiterpenoides, el farnesil difosfato FPP (figura 17), esto se lleva a cabo de la misma forma en la que se enlaza el isopentenil difosfato al dimetilalil difosfato DMAPP en la formación del geranyl difosfato (GPP). Para el farnesil difosfato aumenta la posibilidad de formar compuestos cíclicos debido a que aumenta el número de dobles enlaces y aumenta la longitud de la cadena. En este caso, los dobles enlaces cercanos al difosfato, adoptan una configuración E que fácilmente puede cambiar a configuración Z por isomerización. Se ha considerado al nerolidin difosfato como un precursor más inmediato de los sesquiterpenoides que el FPP. Todo esto hace que la cadena sea más plegable y de esta forma se pueda llevar a cabo la formación de compuestos cíclicos si el ataque electrofílico al doble enlace es apropiado (Dewick et. al. 2002).

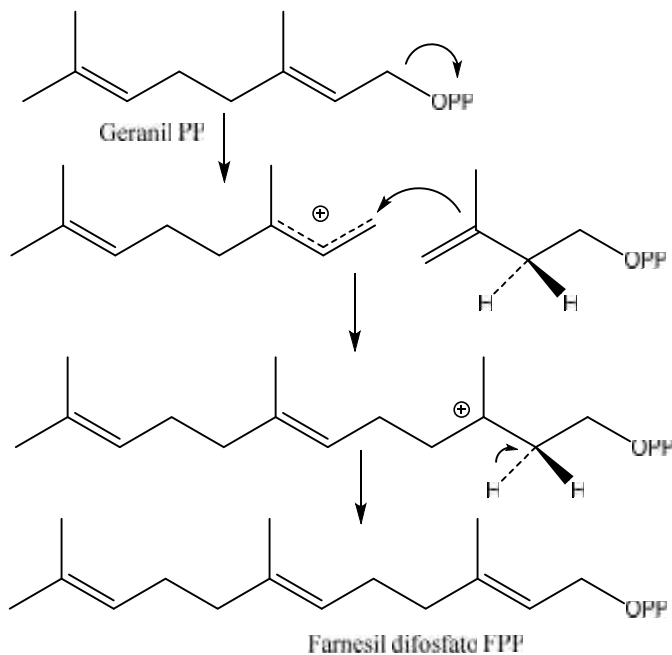


Figura 17: Formación del farnesil PP (FPP)

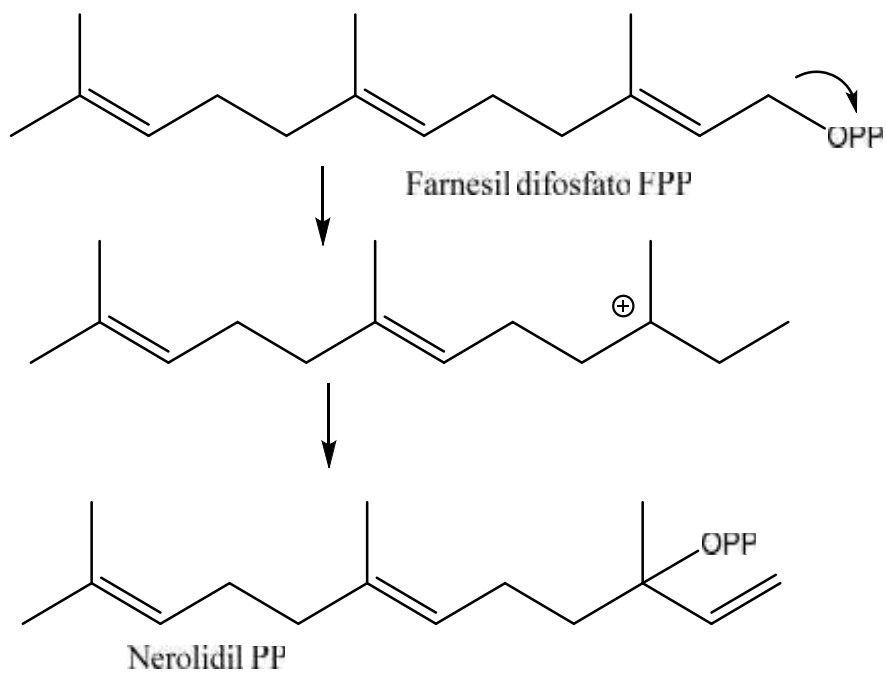


Figura 18: Formación del nerolidil PP

Al unir una molécula más de isopentenil difosfato (IPP) al farnesil difosfato, por el mismo mecanismo, se obtiene un fragmento de geranylgeraniol difosfato GGPP el cual es el precursor de la formación de los diterpenoides (figura 19) (Dewick et. al. 2002).

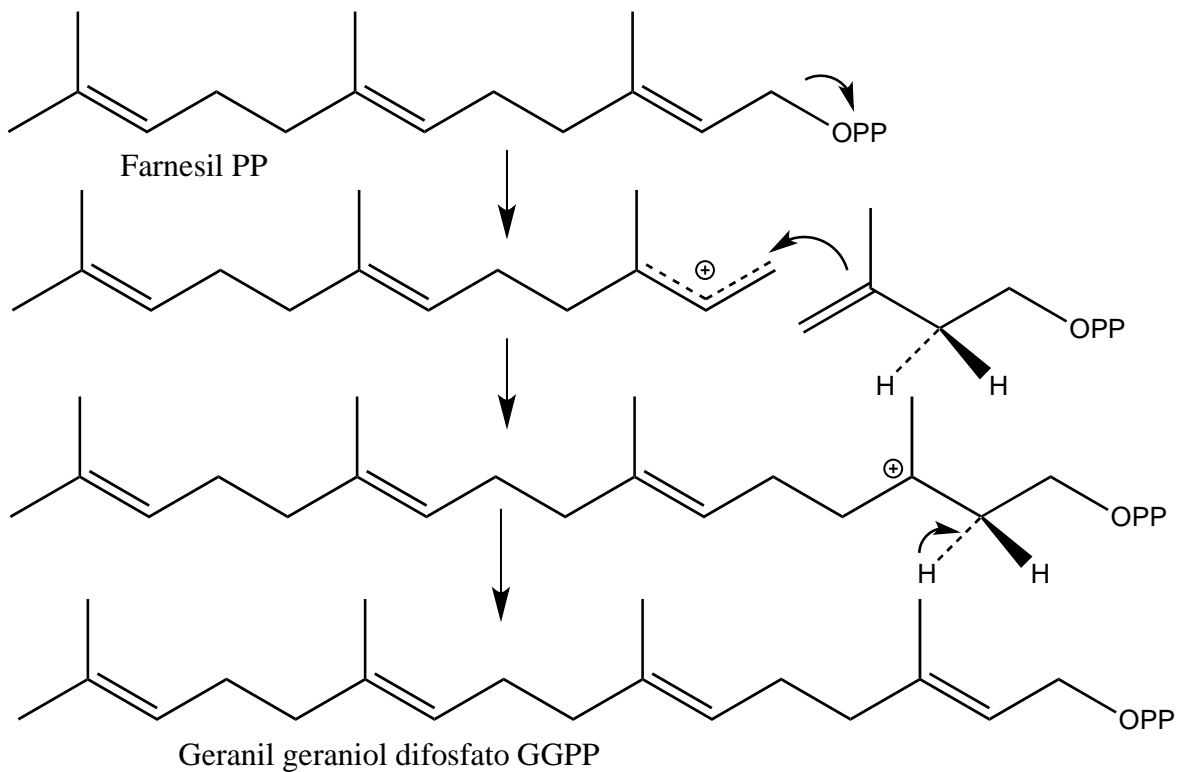


Figura 19: Formación del geranylgeraniol PP (GGPP)

El geranylgeraniol difosfato es capaz de formar estructuras cíclicas. Esto puede ocurrir cuando se forma el catión debido a la pérdida del grupo difosfato, o también debido a la protonación del carbono del doble enlace que se encuentra al inicio de la cadena. Esto lleva a la primera secuencia de ciclaciones. Posteriormente se pierde el grupo difosfato, lo que genera, de nuevo un carbocatión en el que facilita la formación de ciclos adicionales. Por lo tanto, la protonación del GGPP puede iniciar una secuencia concertada de ciclaciones, lo que termina en la pérdida de un protón de un grupo metilo. Esto genera al copalil difosfato (CPP). Su estereoquímica depende de la elasticidad del sustrato, en la superficie de la enzima, una alternativa en cuanto a la elasticidad es formar al labandienil difosfato (LPP), que presenta una configuración opuesta en los centros de la cadena que se formó (Dewick et. al. 2002).

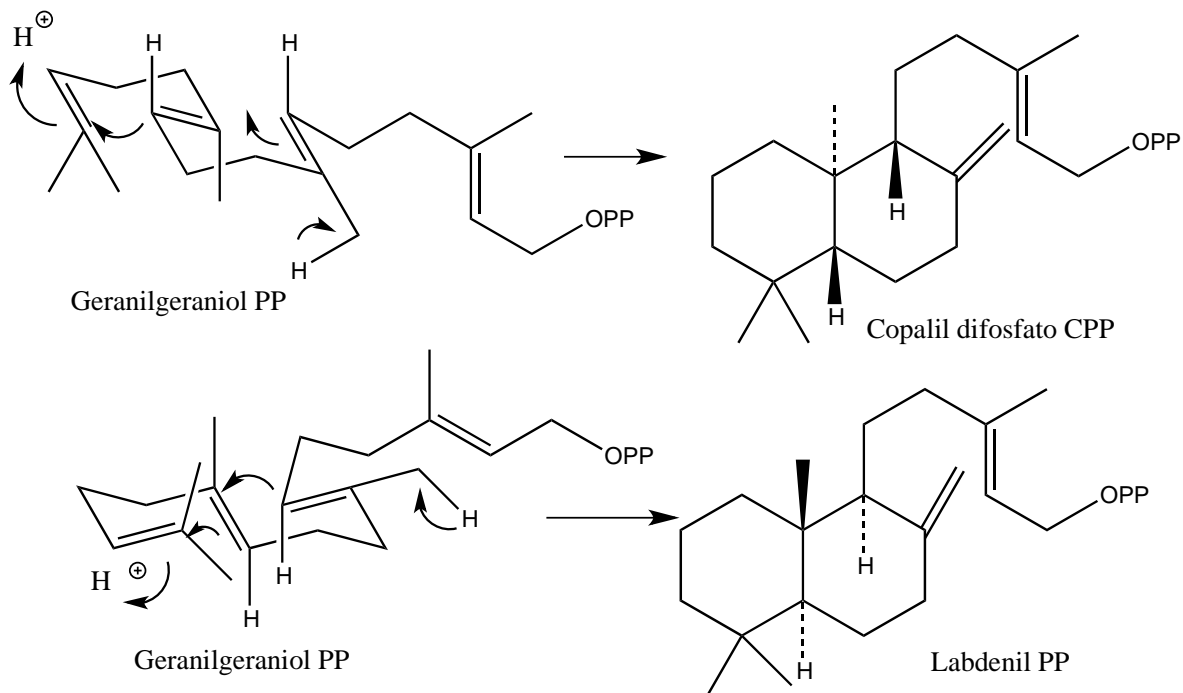
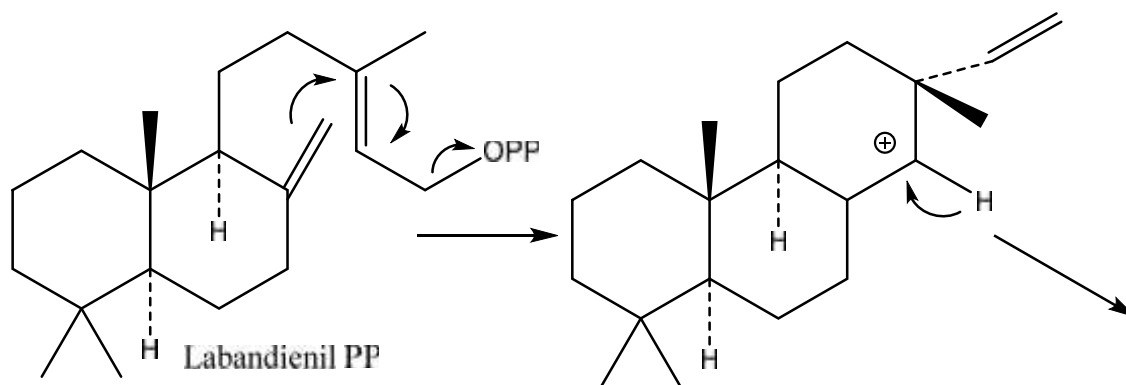


Figura 20: Formación del labdenil y copalil PP

A partir del labdenil difosfato (LPP) se forman los abietanos. Esto comienza con la pérdida del grupo difosfato, después el catión pierde un protón para formar al sandaracopimaradieno de donde migra un grupo metilo lo que modifica a la cadena secundaria. Posteriormente, una pérdida del protón forma al abietadieno. El ácido abiético se forma después de una serie de reacciones de oxidación de un grupo metilo en el anillo. Esto ocurre pasando por la formación del alcohol y del aldehído (Dewick et. al. 2002).



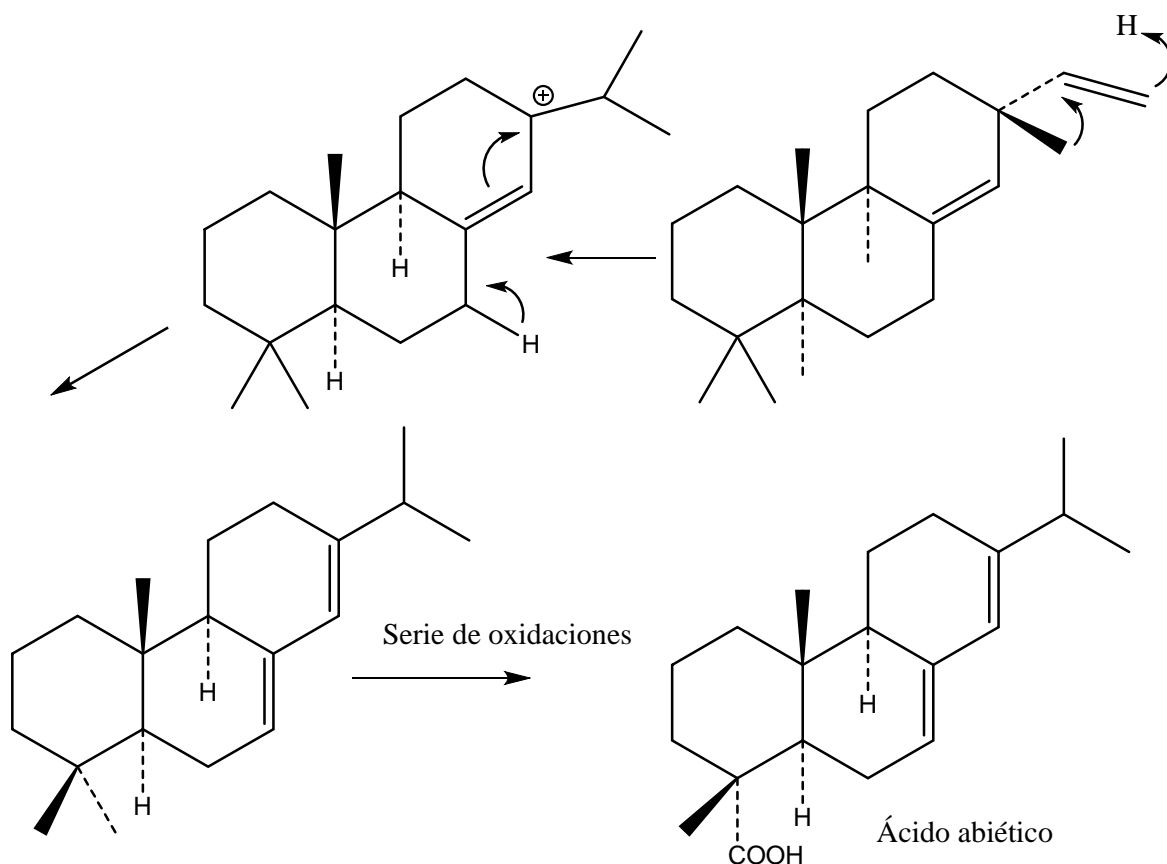
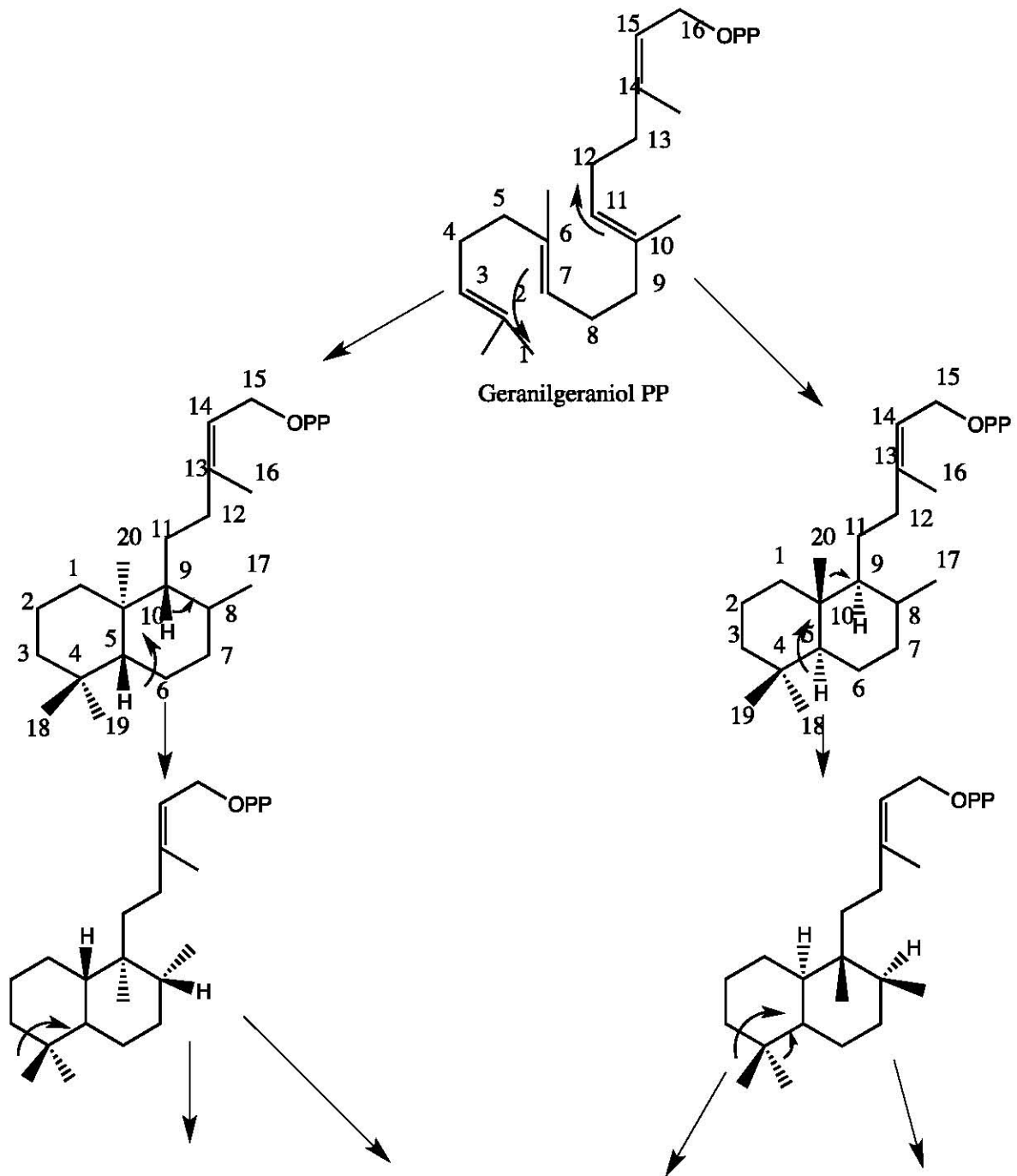


Figura 21: Formación de los diterpenoides tipo abietano.

Existen dos tipos de diterpenoides con esqueleto de clerodano, los que presentan configuración cis y los que presentan configuración trans. Estos diterpenos se forman a partir del GGPP por dos rutas las cuales comienzan con la formación de enlaces entre los carbonos 6 y 11 y 7 y 2, lo cual genera a los anillos A y B, por lo tanto, en una de las rutas se obtiene un metilo en el carbono 10 y un protón unido al C5 del nuevo intermediario mientras que por la otra ruta se forma un metilo en el carbono 10 y un hidrógeno en el carbono 5. Lo anterior depende del ataque trasero o delantero realizado por el metilo del carbono 10 al carbono 6. Después, se llevan a cabo una serie de desplazamientos, el desplazamiento de un protón del C9 al C8, el desplazamiento de un metilo del C10 al C9 y el desplazamiento de un proton del C5 al C10 producen al intermediario siguiente en ambas rutas. Posteriormente, si se lleva a cabo un desplazamiento de un metilo del C19 al C5, en el caso de ambos intermediarios, se produce un diterpeno trans-

clerodano mientras que, si se lleva a cabo un desplazamiento de un metilo del C18 al C5, se produce un diterpenos cis-clerodano (Akhila et. al. 1991).



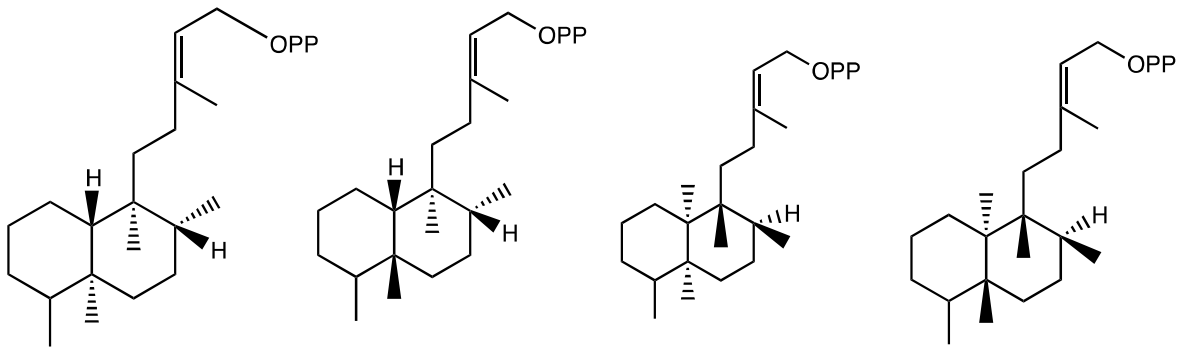


Figura 22: Formación de diterpenoides cis y trans-clerodano a partir de GGPP.

Los triterpenos se forman a partir del escualeno (C₃₀) (figura 24) que fue aislado por primera vez del aceite de hígado de tiburón. El escualeno se forma por la unión de dos moléculas de farnesil difosfato FPP por una adición electrofílica cuando el C1 de una de las moléculas de FPP se protona a partir del NADPH, el doble enlace que se encuentra en las posiciones 2 y 3 de la otra molécula de farnesil difosfato ataca al catión farnesilo, formando un catión terciario, el cual se neutraliza por la pérdida de un protón y la formación de un ciclopropano en el sitio de la pérdida. De esta forma se obtiene al presqualeno difosfato. Posteriormente, el presqualeno difosfato pierde al grupo difosfato lo cual forma a un catión primario inestable, entonces la carga positiva pasa del carbono donde se encontraba el grupo difosfato a la tercera posición, lo cual forma de nuevo un catión ciclopropílico terciario. Mediante un arreglo tipo Wagner Meerwein, ahora hay un enlace entre el carbono en donde se encontraba el grupo difosfato al carbono 1 del otro fragmento del farnesilo que, a su vez, está unido al C2 de la otra unidad de farnesilo. Después se rompe el enlace entre el C1 de un farnesilo con el C2 del otro farnesilo. Esto genera un doble enlace entre C2 y el C3 y un catión alílico estable. La formación del escualeno se lleva a cabo por el suministro de un hidrógeno por parte del NADPH (Dewick et. al. 2002).

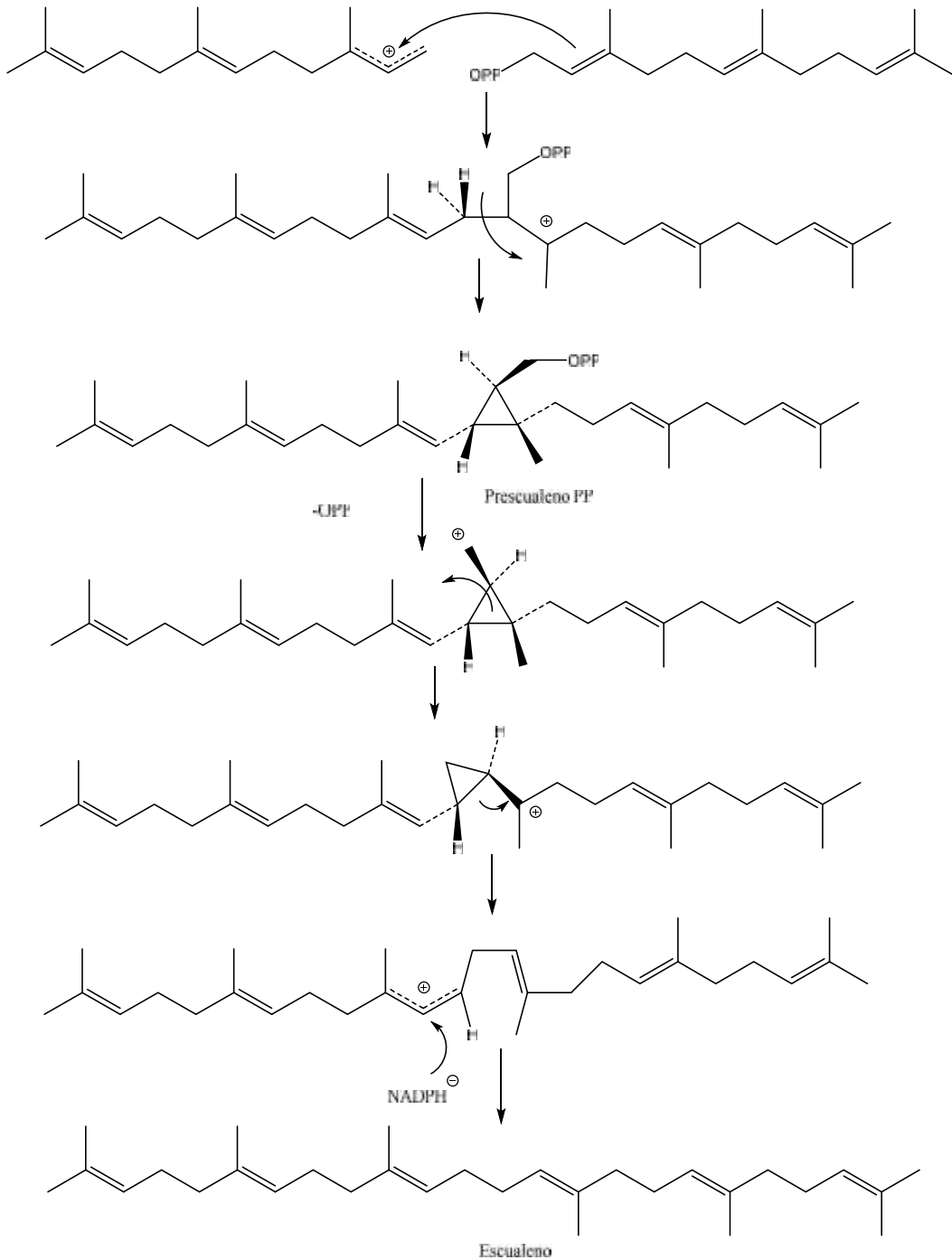


Figura 23: Formación del escualeno, precursor de los triterpenoides

Una ciclación del escualeno se realiza al producir al intermediario óxido-2,3-escualeno que se forma en una reacción, catalizada por una flavoproteína

requiriere O_2 y NADPH como cofactores. Si el óxido de escualeno se encuentra adecuadamente posicionado y éste se encuentra doblado sobre la superficie de la enzima, la formación de un triterpeno policíclico puede ser racionalizada como una serie de ciclaciones seguidas por migraciones concertadas de Wagner-Meerwein de metilos e hidruros. Las ciclaciones están mediadas por la formación de carbocationes y proceden en una secuencia de pasos escalonados. De esta forma, la protonación del epóxido permite la apertura del anillo y la generación de un carbocatión terciario que está posicionado para que se lleve a cabo una adición electrofílica y se forme un doble enlace. Esto lleva a la formación de un anillo de 6 carbonos y de un nuevo carbocatión terciario. Este proceso se repite dos veces más. Aunque el tercer anillo está formado por 5 miembros, éste se puede ampliar a uno de 6 mediante un desplazamiento 1,2-alquilo de Wagner-Meerwein, lo que disminuye la tensión en el anillo. Una adición electrofílica adicional genera un catión terciario protosterilo. La estereoquímica del carbocatión está controlada por el tipo de elasticidad en la superficie de la enzima y probablemente esto también limita el proceso de ciclación. De esta forma el óxido de escualeno se aproxima a la conformación silla, bote, silla bote. El catión protosterilo transitorio será producido con estas características conformacionales. Este catión sufre una serie de desplazamientos Wagner-Meerwein, generando un nuevo catión, la migración de un hidruro y un metilo, después se pierde un protón formando un doble enlace produciendo lanosterol que es el precursor del colesterol y de otros triterpenoides en los animales y hongos (Dewick et. al. 2002).

Sin embargo, en las plantas, el intermediario de la formación de triterpenoides es el cicloartenol que tiene un anillo de ciclopropano que se forma por la inclusión de un metilo al C10. En la formación de esteroides de muchas plantas se observa que el ciclopropano sustituyente es reabierto. Muchos triterpenoides provenientes de plantas tienen tres grupos hidroxilo. Una característica adicional del cation protosteril es que el metilo del C10 y el hidrógeno del C5 comparten una relación anti-axial y son suseptibles a un rearrreglo de Wagner-Meerwein, por lo tanto, el catión formado en el C9 puede iniciar migraciones adicionales (Dewick et. al. 2002).

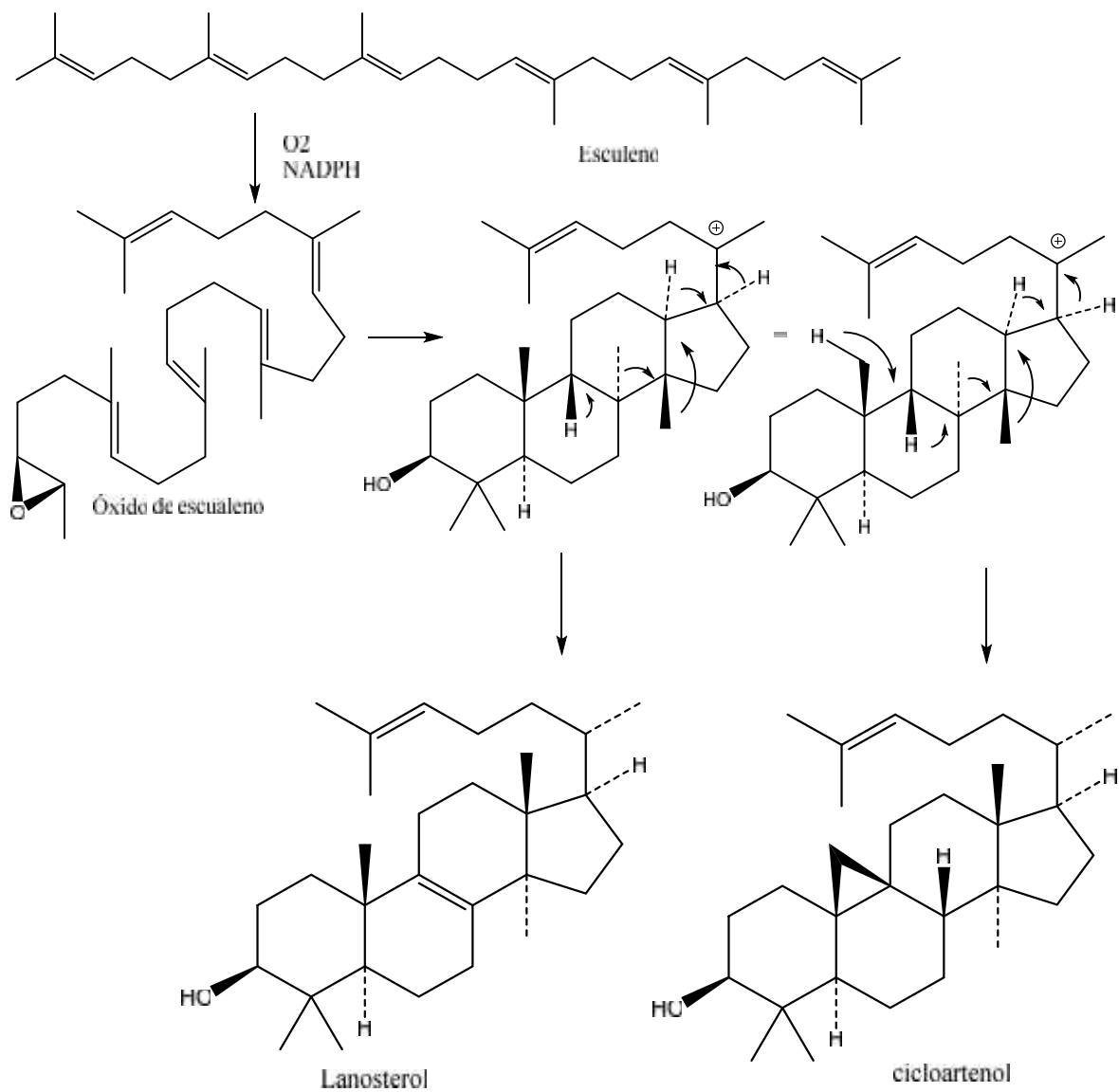


Figura 24: Formación del lanosterol y cicloartenol a partir de escualeno.

Flavonoides:

Los flavonoides son un grupo de metabolitos secundarios que parte de su estructura se forma mediante la ruta del ácido shikímico y la otra parte se forma mediante la ruta de los policétidos. Estos compuestos se encuentran conjugados normalmente con carbohidratos. Los flavonoides son responsables del color de muchas flores, de las algas y de algunos insectos (Dewick et. al. 2002).

La ruta del ácido shiquímico (figura 25) comienza cuando la D-glucosa se degrada y proporciona un fragmento de fosfoenol piruvato mientras que del ciclo de las penotosas se forma un fragmento de D-eritrosa-4-fosfato. Estos dos compuestos se unen mediante una condensación aldólica, en la superficie de una enzima para dar un derivado de heptulosa que pierde una molécula de ácido fosfórico y mediante una condensación aldólica intramolecular, se forma un anillo, el ácido 3-hidroquinico. La pérdida del ácido fosfórico se lleva a cabo por una oxidación del hidroxilo central dependiente de NAD⁺, después se regenera al grupo hidroxilo mediante una reacción de reducción dependiente de NADH. Todo este proceso se realiza en presencia de una sola enzima. La reducción del ácido 3-hidroquinico forma al ácido quinico. El ácido shikímico se forma por el mismo a partir del ácido 3-desidroquinico, mediante la formación del ácido 3-hidroshikímico, por una deshidratación y una reducción (Dewick et. al. 2002).

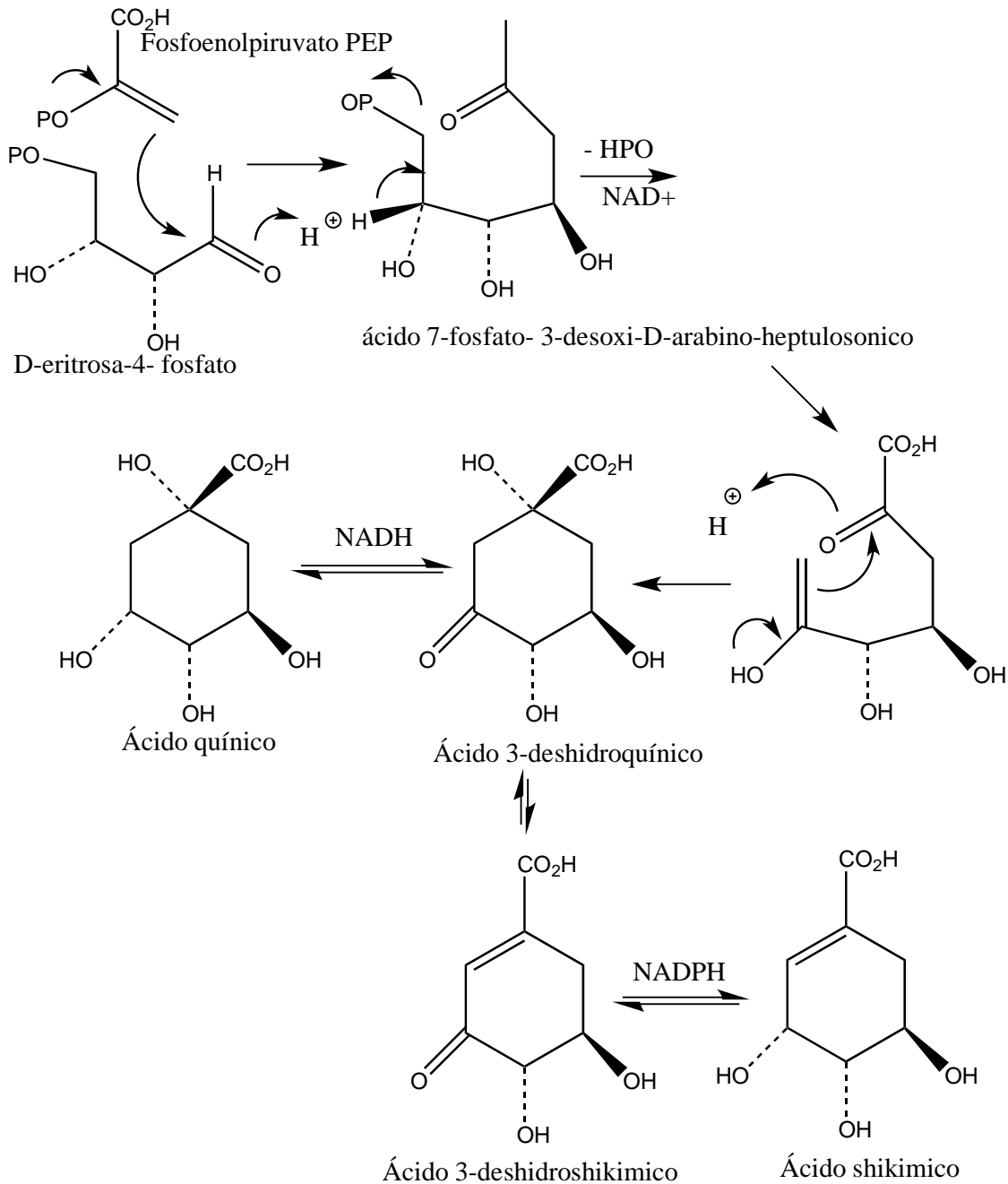


Figura 25: Biosíntesis del ácido shikímico.

Una vez que se ha formado el ácido shikímico, este se somete a una reacción de fosforilación que es dependiente de ATP para formar al ácido 3-fosfato shikimico al que se le adiciona una molécula más de fosfoenolpiruvato mediante una reacción de adición-eliminación para formar al ácido 3-fosfatoenolpiruvilshikímico. La transformación de este compuesto en ácido corísmico se lleva a cabo por la

eliminación de una molécula de ácido fosfórico de forma no concertada. El ácido corísmico es considerado como un punto de ramificación para la biosíntesis de compuestos aromáticos (Dewick et. al. 2002).

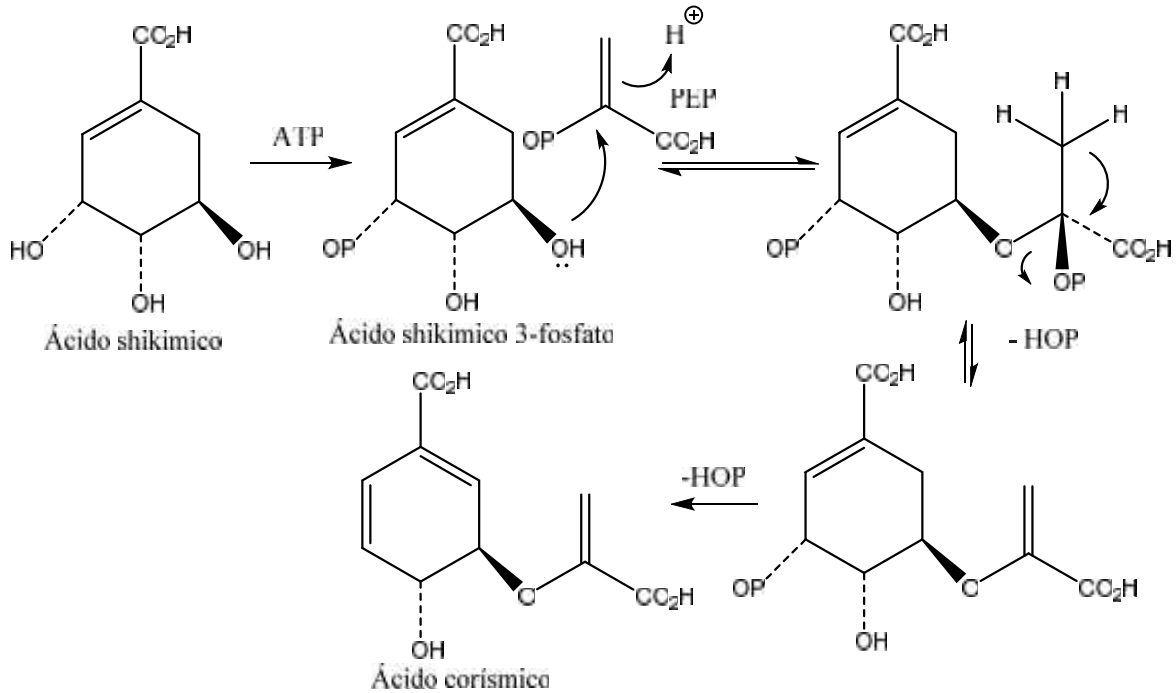


Figura 26: Formación del ácido corísmico a partir del ácido shikímico.

El ácido corísmico es una molécula que, para poder formar a los precursores de los flavonoides, se reorganiza de forma intramolecular, de tal forma que la cadena secundaria formada por el derivado del fosfoenol piruvato, quede directamente unida al carbociclo. Esta reacción se lleva a cabo por medio de una ciclación de Claisen la cual es catalizada por la enzima corismato mutasa, esta reacción lleva a la formación del ácido prefénico, el cual forma al esqueleto básico de los aminoácidos tirosina y fenilalanina (Dewick et. al. 2002).

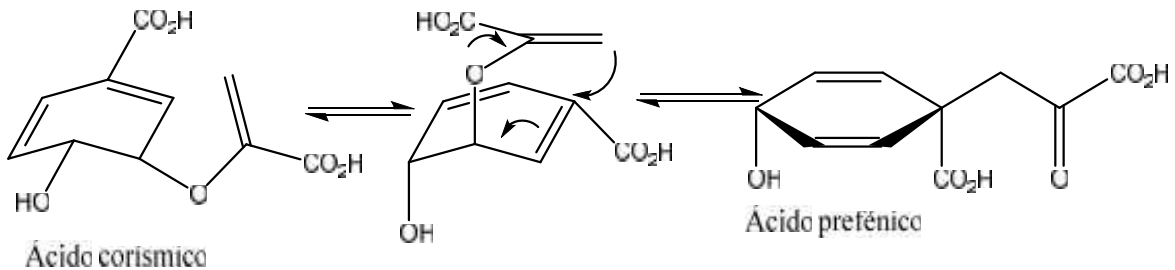


Figura 27: Transformación del ácido corísmico en ácido prefénico.

La transformación del ácido corismico en fenilalanina o bien en tirosina (figura 29) varían dependiendo del organismo. La variación de estas rutas biosintéticas depende de la activación de las enzimas disponibles. En esta transformación están involucradas tres reacciones, la aromatización descarboxilativa, la transaminación y en el caso de la biosíntesis de la tirosina, una reacción de oxidación. La descarboxilación oxidativa del ácido prefénilico lleva a la formación del ácido fenilpirúvico y la transaminación dependiente del ácido fenilpirúvico lleva a la formación de la L-fenilalanina. En presencia de la enzima deshidrogenasa dependiente de NAD⁺, la aromatización descarboxilativa ocurre con la retención del grupo hidroxilo. El ácido L-arogénico es el resultado de la transaminación la cual ocurre antes de la aromatización descarboxilativa y puede transformarse en L-fenilalanina o bien en L-tirosina, dependiendo de la activación de la enzima deshidrogenasa adecuada (Dewick et. al. 2002).

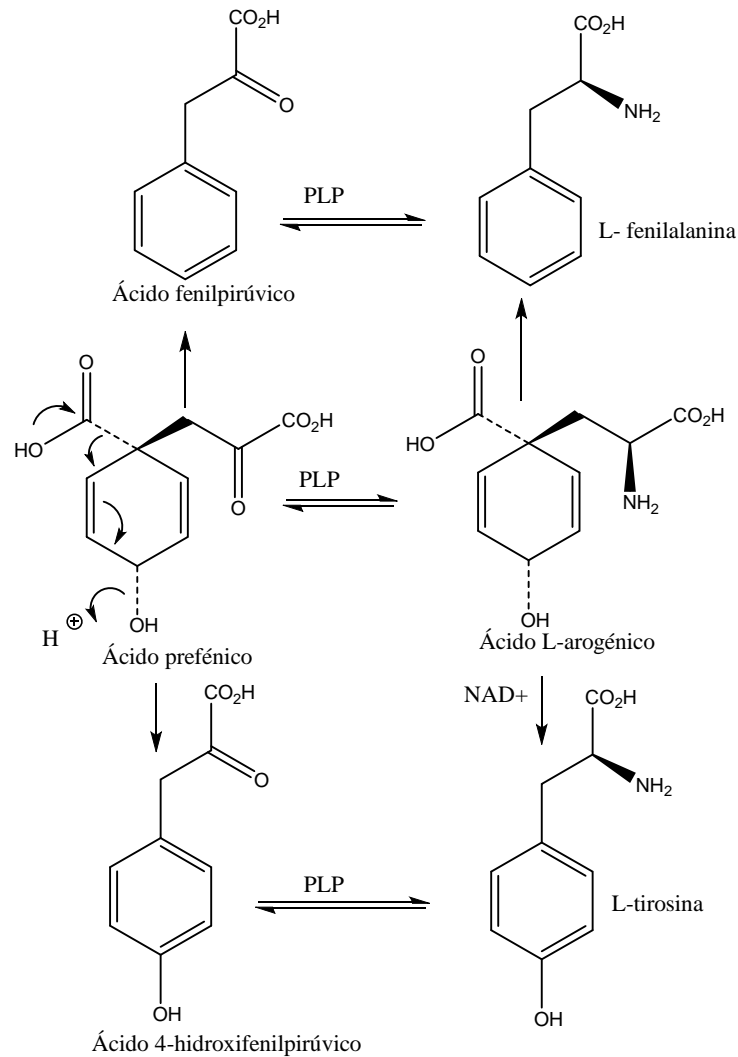


Figura 28: Formación de los aminoácidos L-fenilalanina y L-tirosina a partir del ácido prefénico.

La L-fenilalanina y la L-tirosina son dos aminoácidos por los cuales se pueden formar una amplia gama de productos naturales. Con la L-fenilalanina se forma el ácido cinámico y a partir de la L-tirosina se forma el ácido 4-cumárico. Todas las plantas pueden eliminar el amoníaco de la L-fenilalanina, debido a la acción de la enzima fenilalanina amonio liasa (FAL). Otra forma de obtener a los ácidos cinámicos es por medio de una hidroxilación secuencialmente unida con una reacción de metilación de un patrón de sustitución típico de los metabolitos de la ruta del ácido shikímico. El ácido 4-cumárico es un compuesto que se puede sintetizar de dos formas, una de ellas es a partir de la hidrólisis directa del ácido

cinámico o bien a partir de la tirosina, por desaminación. El ácido cinámico y el ácido 4-cumárico son precursores de muchos ácidos polifenólicos (Dewick et. al. 2002).

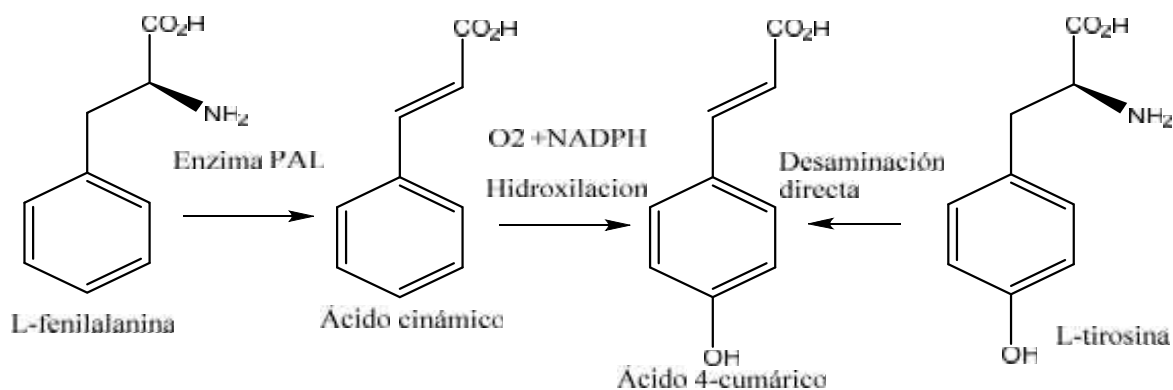
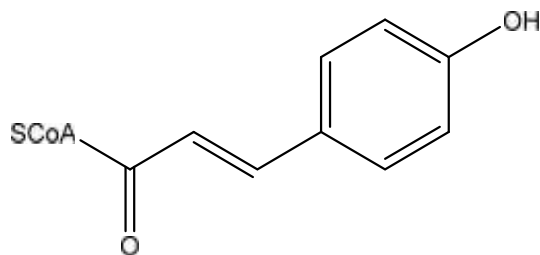


Figura 29: Formación del ácido cinámico y el ácido 4-cumárico a partir de los aminoácidos L-fenilalanina y L-tirosina.

La biosíntesis de los flavonoides comienza con la formación de 4-hidroxicinamoil-CoA la cual se forma a partir del ácido 4-cumárico y la acetil-CoA, que se unen por sustitución nucleofílica. La 4-hidroxicinamoil-CoA reacciona con tres moléculas de malonil-CoA para la extensión de la cadena que sustituye al anillo aromático. Esto lleva a la formación de un policétido que, dependiendo de la naturaleza de la enzima responsable de catalizar la siguiente reacción, el policétido forma al anillo aromático, si se forma por una reacción aldólica, catalizada por la enzima estilbeno sintasa, se forma un estilbeno pero si se forma por una reacción de Claisen, catalizada por la enzima chalcona sintasa se forma una chalcona (Dewick et. al. 2002).



4-hidroxicinamoil CoA

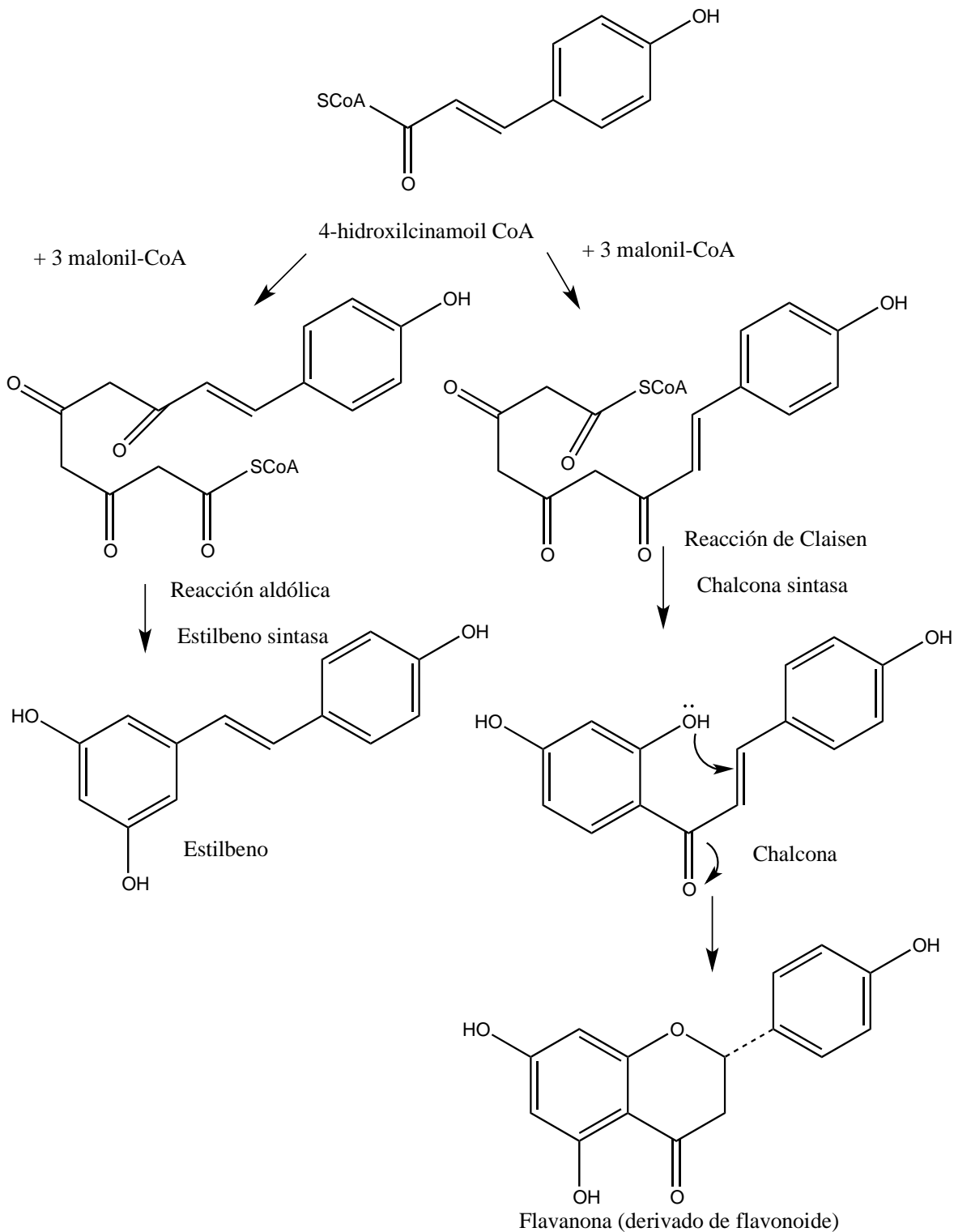


Figura 30: Formación de falvonoides y estilbenos a partir de 4-hidroxilcinamoil CoA.

Las chalconas son compuestos que actúan como precursores de una gran variedad de de flavonoides y sus derivados. Muchos de estos compuestos tienen

anillos heterocíclicos en sus estructuras que se forman en una reacción de Michael en donde una cetona insaturada es atacada por un grupo fenol. Muchos flavonoides han perdido a un grupo hidroxilo, pero también se han observado otras modificaciones como cambios en los patrones de hidroxilación en los dos anillos aromáticos, metilaciones, glicosilaciones y dimetilaciones. Entonces las flavanonas producen el esqueleto básico para la formación de una gran variedad de compuestos como flavonas, flavanoles, antocianinas y catequinas (Dewick et. al. 2002).

Los flavonoides se pueden encontrar en diferentes vegetales que se consumen diariamente. Desde hace tiempo se sabe que muchos de ellos son particularmente benéficos debido a que protegen a los organismos de las enfermedades cardiovasculares, ayudan a prevenir diversos tipos de cáncer y además son buenos antioxidantes ya que son eficientes en la reparación del daño producido por los radicales libres, debido a que contienen polifenoles (Dewick et. al. 2002).

Otras actividades biológicas encontradas en especies del género *Salvia*.

Algunas especies que pertenecen al género *Salvia* se utilizan desde hace mucho tiempo, en medicina tradicional. Tal es el caso de *Salvia officinalis*, *Salvia miltiorrhiza* y *Salvia sclarea*. Después de varios estudios realizados a plantas de este género, se han aislado varios metabolitos secundarios con diversas actividades biológicas, como actividad citotóxica, antiviral y antimicrobiana, principalmente (Rezza et. al. 2015).

Actividad Citotóxica:

Muchos compuestos con actividad citotóxica se han aislado de diferentes especies de plantas, sin embargo, estamos lejos de encontrar la cura de muchos tipos de cáncer, esto debido a la falta de disposición y de la eficiencia limitada de compuestos apropiados (Rezza et. al. 2015).

Se observó que los extractos metanólicos y de metanol- cloroformo, de *Salvia eremophila*, *S. santolinifolia*, así como del extracto de diclorometano de *S. limbata*, *S. hypoleuca*, *S. aethiopsis* y *Salvia reuterherana* presentaron una razonable actividad citotóxica en contra de células de leucemia promielocítica, leucemia mielógena crónica y adenocarcinoma de pecho. En otro estudio, el sclareol, aislado de *Salvia sclarea*, detuvo del crecimiento del tumor. En otro estudio fueron aislados de *S. cavaleriei* 15 diterpenos de tipo ent-kaurano los cuales mostraron actividad citotóxica en contra de 5 tipos de células cancerígenas de humanos, algunos compuestos probaron ser más potentes que el cisplatino a concentraciones más bajas. La royleneona, el acetato de horminona y la hormiona fueron aisladas de las raíces de *S. officinalis*, estas sustancias presentaron actividad citotóxica en contra de células de adenocarcinoma de colon y carcinoma hepatocelular, debido a que dañaron el ADN de las células cancerígenas. Varios diterpenoides que mostraron una eficaz actividad citotóxica en contra de varias líneas de células de cáncer, fueron aislados de *S. pachyphilla* y de *S. clevelandii*. Entre estos diterpenoides, el carnosol, el 16-hidroxycarnosol y el 20-desoxocarnosol fueron los compuestos más activos, aunque no se realizó ninguna comparación con algún agente anticancerígeno. De las raíces de *S. hipargeia* se aislaron varios diterpenoides de tipo abietano, de los cuales, la 6-hidroxisalvinona y el dimetilcriptojaponol presentaron actividad citotóxica en contra de células de cáncer de ovario en humanos. El salvileucalin, un diterpenoide de tipo neo-clerodano aislado de las partes aéreas de *S. leucantha* mostró actividad citotóxica en contra del adenocarcinoma de pulmón y adenocarcinoma de colon. La tanshinona, es una quinona de tipo fenantreno que fue aislada de *S. miltiorrhiza* presentó actividad anticancerígena en contra de varios tipos de células, incluyendo tumores y cáncer en la sangre, este compuesto también presentó propiedades anticancerígenas en células de ratón, además se observaron propiedades anticancerígenas en contra del carcinoma hepatocelular en compuestos relacionados con la tanshinona, aislados de la misma especie. De la misma planta se aisló un nor-diterpeno de tipo abietano, así como los diterpenos yunnannin y ferruginol, estos compuestos mostraron actividad citotóxica significativa en contra

de leusemia linfocítica, carcinoma nasofaríngeo y adenocarcinoma de colon. El salvinal, un compuesto aislado de *S. miltiorrhiza* presentó la mayor actividad citotóxica en contra de células de adenocarcinoma nasofaríngeo mientras que mostró tener poca actividad citotóxica en contra de adenocarcinoma de colon, esto al inhibir la polimerización de la tubulina y bloquear el ciclo celular. El danshensu, un derivado del ácido caféico, aislado de la raíz de *S. miltiorrhiza* presentó diversas actividades biológicas, entre ellas la inducción de la apoptosis de algunas células cancerígenas. Los efectos anticancerígenos de los diterpenoides de tipo abietano que contienen nitrógeno que se obtienen a partir de las raíces de *S. miltiorrhiza*, se ha observado para diversas células cancerígenas, estos compuestos presentan casi el mismo grado de actividad que el cisplatino. Varios diterpenoides aislados de las raíces de *S. digitaloides* presentaron actividad citotóxica ligeramente mayor a la del cisplatino y menor que la del taxol. La actividad citotóxica que se le atribuye a los diterpenos y monoterpenos aislados de *S. castanea* fue demostrada en diferentes células cancerígenas, en este estudio se observó que la neotanshinlactona y la metiltanshinona presentaron actividad citotóxica considerable en contra de algunas células cancerígenas, se vió incluso, que estas sustancias eran más potentes que el cisplatino, en algunos casos. Otros diterpenoides de tipo abietano han mostrado actividad citotóxica de interés en contra de algunas células de cáncer, como las productoras del cáncer de estómago (Rezza et. al. 2015).

Actividad antiviral

Los virus no son microorganismos autónomos, ellos necesitan vivir dentro de las células en donde ellos puedan replicarse. Debido a que en el metabolismo celular se ve involucrada la replicación de los virus, resulta difícil deshacerse de ellos sin que las células que lo tienen tengan efectos negativos. De muchas plantas medicinales se han aislado muchos metabolitos secundarios como terpenoides, flavonoides, lignanos, alcaloides, compuestos polifenólicos, cumarinas, saponinas, proteínas y péptidos con propiedades antivirales (Rezza et. al. 2015).

De *Salvia dugesii* se aisló un diterpenoide de tipo neo-clerodano, el dugesin, que presentó actividad antiviral en contra del virus de la influenza, además. El salvinorin A, además de ser el metabolito psicoactivo de *Salvia divinorium* y un fuerte alucinógeno, fue utilizado para el tratamiento del Virus de Inmunodeficiencia Humana VIH. El ácido salvianólico, un compuesto aislado del extracto acuoso de las raíces de *S. yunnannensis* inhibió a las enzimas transcriptasa reversa e integrasa del virus VIH a concentraciones que no resultan tóxicas para las células hospederas. El aldehído protocatechuico aislado de las raíces de *S. miltiorrhiza* inhibió la replicación del virus de la hepatitis. Dos compuestos fenólicos que fueron aislados de las raíces de *S. miltiorrhiza* son agentes anti VIH y no fueron tóxicos. Un diterpenoide de tipo abietano, la safficinólida fueron aislados de *S. officinalis*, la saffisinólida presentó actividad antiviral para atacar al virus de la estomatitis vesicular que ataca a los caballos (Rezza et. al. 2015).

Actividad antibacteriana:

A partir varias fuentes naturales se han obtenido diferentes compuestos para el tratamiento de diferentes problemas de salud, entre ellos, el tratamiento de infecciones bacterianas. De muchas especies de la familia de las labiadas se han aislado una gran cantidad de diterpenoides de tipo abietano con actividad antibacteriana. A continuación, se presentan algunos ejemplos (Rezza et. al. 2015).

Tres oxilipinas y el metil 9S,13R-2-hidroxi-13-oxo-10Z,15Z-fitodienolato aislados de las partes aéreas de *S. adenophora*, tres triterpenoides de tipo lupano aislados de las raíces y brotes de *S. viridis*, diversos flavonoides aislados de las flores de *S. leucantha*, la forskalinona aislada de *S. forskahlei*, la 7-acetilhorminona aislada de la misma especie, diversos diterpenoides de tipo abietano aislados de *S. sclarea*, de *S. chamelaeagnea* y de las raíces y brotes de *S. viridis*, un diterpenoide de tipo labdano aislado de *S. leriaefolia*, triterpenoides aislados de *S. officinalis*, el ácido ursólico y ácido oleanólico aislados de *S. chamelaeagnea*, un diterpenoide aislado de las raíces de *S. caespitosa*, y la cristimarina aislada de las hojas de *S. palaestina* presentaron actividad antibacteriana en contra de *Staphylococcus*

aureus. Por otra parte, el metil 9S,13R-2-hidroxi-13-oxo-10Z,15Z-fitodienolato y el 9S,13S-2-acetoxil-12-oxo-10Z,15Z-fitodienolato aislados de *S. adenophora*, la forskalinona aislada de *S. forskahlei*, la 7-acetilhorminona aislada de la misma especie, dos diterpenoides reareglados de tipo abietano aislados de *S. sclarea*, un diterpenoide aislado de las raíces de *S. caespitosa*, la bactrelina y otro diterpenoide de tipo abietano aislados de *S. bracteata* y de las hojas de *S. aethiopsis* y la cristimarina aislada de las hojas de *S. palaestina* presentaron actividad antibacteriana en contra de *Staphylococcus epidermidis*, mientras que el 9S,13S-2-acetoxil-12-oxo-10Z,15Z-fitodienolato resultó ser efectivo al atacar a *Staphylococcus agalactiae*. La forskalinona aislada de *S. forskahlei* pudo atacar a *Enterococcus faecalis*. De las raíces y brotes de *S. viridis* y de *S. reptans* se aislaron diversos diterpenoides de tipo abietano y tres triterpenos de tipo lupano los cuales presentaron actividad antibacteriana en contra de esta especie. Un diterpeno con arreglo de sec-nor-abietano, junto con otros dos diterpenoides de tipo abietano fueron aislados de *S. przewalskii*, por medio de un estudio se observó que la salprzelactona tenía mayor actividad que la acheomicina y la amicilina en contra de *Aerobacter aerogenes*. Por otro lado, la forskalinona y la 7-horminona aisladas de *S. forskahlei*, un diterpenoide aislado de las raíces de *S. caespitosa*, la bactrelina, un diterpenoide de tipo abietano aislada de *S. bracteata*, así como la salvigenólida D aislada de las partes aéreas de *S. gregii* y otro diterpenoides de tipo abietano que fue aislado de *S. aethiopsis* presentaron actividad antibacteriana en contra de *Bacillus subtilis*, se pudo observar que el iso-grandifoliol presentó mayor actividad antibacteriana que la streptomina en contra de esta bacteria, se observó que el ácido *o*-metilpispiférico pudo atacar a esta especie. El carnisolato de metilo, encontrado en el extracto etanólico de las hojas de *S. officinalis* y dos diterpenoides de tipo abietano aislados de *S. reptans* presentaron actividad antibacteriana en contra de *B. cereus*. Dos diterpenoides de tipo nor-abietano aislados de las raíces de *S. miltiorrhiza* presentaron actividad antibacteriana en contra de un amplio rango de bacterias gram-positivo a bajas concentraciones. El metil-12-*o*-metilcarnisolato aislado de *S. africana-lutea* presentó actividad antibacteriana en contra de *Mycobacterium tuberculosis*. Un

diterpenoide de tipo labdano proveniente de las hojas de *S. palaestina* presentó actividad antibacteriana en contra de diversas bacterias. La 7,8-seco-para-ferruginona que proviene de las raíces de *S. prionitis* presentó actividad antimicrobiana en contra de algunas bacterias gram-positivo. Otros triterpenoides aislados de *S. officinalis* presentaron actividad antimicrobiana en contra de *Streptococcus pneumoniae*. De las raíces de *S. reptans* fueron aislados dos diterpenoides de tipo abietano con actividad antibacteriana en contra de *Micrococcus luteus* y *E. Coli*. La cristimarina aislada de las hojas de *S. palaestina* presentó actividad antibacteriana en contra de, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *P. vulgaris* y *P. aeruginosa* (Rezza et. al. 2015).

Actividad antifúngica

Son pocos los compuestos con actividad antifúngica encontrados en especies del género *Salvia*. Dos tanshinonas, que fueron aisladas de *S. miltiorrhiza* presentaron actividad antifúngica en contra de *Candida albicans*, entre ellas, la dihidrotanshinona resultó ser activa a concentraciones bajas. Dos diterpenoides de tipo abietano que fueron aislados de *S. sclarea* presentan actividad antifúngica moderada en contra de *C. albicans*. Dos diterpenoides rearrreglados de tipo abietano aislados de *S. sahendica*, presentaron actividad antifúngica en contra de *Blakeslea trispora* (Rezza et. al. 2015).

Actividad antiprotozoaria

Las enfermedades provocadas por protozoarios representan un enorme problema en los países en desarrollo. Se ha observado que muchos extractos de plantas del género *Salvia* presentan actividad antiprotozoaria. Esto ha llamado mucho la atención de investigadores que están en búsqueda de agentes potenciales para el tratamiento de enfermedades de este tipo (Rezza et. al. 2015).

Los extractos clorofórmicos y de acetato de etilo de *S. santolinifolia* presentaron actividad antiprotozoaria en contra de *Leishmania major*. El ácido 12-metoxilcarnisólico fue el componente con mayor actividad antiprotozoaria aislado de *S. repens*, el cual ataca a los amastigoides de *L. donovani*. Los triterpenoides

aislados de los extractos acetónicos de *S. cilicia* presentaron actividad antiprotozoaria significativa en contra de *L. major* y *L. donovani*, para su amastigoide intracelular y en la forma de promastigoide extracelular. El extracto hidroalcohólico de *S. officinalis* detuvo por completo el crecimiento de *L. major*, lo que reduce el número de promastigoides. El ácido caféico y el ácido salvianólico presentaron actividad antiprotozoaria en contra de los parásitos que se encuentran en la etapa amastigoide, pero ninguno de estos triterpenos pudo atacar a los microorganismos en la etapa de promastigoides. Lo más interesante es que ninguno de estos compuestos resultó ser tóxico para las células hospederas. En otro estudio, las dos formas celulares de *L. major*, fueron estudiadas para determinar la actividad antiprotozoaria de los extractos de *S. officinalis*. El extracto de las hojas de esta planta resultó ser tóxico para la etapa de promastigoides de los microorganismos y también pudo reducir el número de amastigoides (Rezza et. al. 2015).

Actividad antimalárica

Existen compuestos como la cloroquinona y la artemisina que se han aislado de la especie *Artemisia annua* utilizados para el tratamiento de la malaria. El inconveniente es que esta sustancia se encuentra en otras especies del género *Artemisia*, pero en pequeñas cantidades, por lo tanto, se ha observado que algunas especies del género *Salvia* presentan actividad antimalárica (Rezza et. al. 2015).

De 17 plantas medicinales utilizadas para el tratamiento de la malaria, el extracto de *S. radula* fue el extracto más activo a la concentración más baja. De ahí se aisló al óxido de betulafolientriol y a la salvigenina. La hidrangenona, un diterpeno conjugado fue aislado de los brotes de *S. hydrangea*, presentó actividad antiplasmódica, en contra del protozoario que provoca la malaria (*Plasmodium falciparum*). En otro estudio se observó que la salvadiona y el provskon, dos diterpenos asociados con monoterpenos conjugados presentaron actividad antiplasmódica significativa en contra de *P. falciparum*. Además, estos compuestos también mostraron actividad antiprotozoaria significativa en contra de

Trypanosoma brucei. Todos los diterpenoides y diterpenoides transpuestos que fueron aislados del extracto hexánico de *S. shaendica* presentaron actividad antiprotozoaria en contra de *P. falciparum*, el 7- -acetoxi-12-desoxi-roylenona y el ⁹-ferruginol fueron los compuestos con mayor actividad. Ambos compuestos fueron menos activos en contra de *T. brucei*. La especie *S. polystachia* fue evaluada por sus componentes para atacar a los microorganismos responsables de la disentería amebóica y giardiasis: *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*. De *S. polystachia* fueron aislados 4 diterpenoides de tipo neo-clerodano, entre estos, la linearolactona fue el compuesto con mayor actividad en contra de ambos microorganismos, la linearolactona se considera como un compuesto antidiarreico. Los extractos de las raíces de *S. miltiorrhiza* fueron los extractos más activos debido a que inhibieron el crecimiento de las especies *P. falciparum* y *T. brucei*. De nueve diterpenoides de tipo tanshinona, los metabolitos más activos en contra de *P. falciparum* y de *T. brucei* fueron la metilenotanshinquinona y el metiltranshinonato. La actividad antiplasmódica se debe a los anillos de furano presentes en las estructuras de los diterpenoides (Rezza et. al. 2015).

Diterpenos como compuestos con actividad antialimentaria en contra de insectos fitófagos

Como se ha comentado anteriormente, se han aislado diversos diterpenoides que presentan actividad antialimentaria en contra de insectos fitófagos. Estos compuestos pueden proteger a los cultivos siendo amigables con el ambiente. Los compuestos con actividad antialimentaria a veces muestran una actividad significativa a bajas concentraciones y a veces son muy efectivos para atacar a una plaga en específico. Además, la posibilidad de que los insectos adquieran resistencia heredable ante estos compuestos resulta improbable (Klein et. al. 2002).

De acuerdo a muchas investigaciones, los diterpenoides con esqueleto de tipo neo-clerodano han mostrado tener una considerable actividad antialimentaria. Estos compuestos se han encontrado en un gran número de plantas de varias familias, principalmente en plantas de las familias Labiatae (en las especies del

género *Scutellaria* se han encontrado a los compuestos con actividad antialimentaria más potente) y Verbenaceae, así como en otros organismos biológicamente no relacionados como hongos, bacterias y esponjas marinas. En general, el rol fisiológico de los compuestos de tipo clerodano, no es conocido o no tienen una función directa, sin embargo, la producción de estos compuestos puede tener algún beneficio para la especie. Es posible que estos compuestos se produzcan como mecanismos de defensa para proteger a las especies contra animales fitófagos, contra hongos patógenos para las plantas o enfermedades (Klein et. al. 2002).

Se han realizado varios ensayos para evaluar la actividad antialimentaria de estos compuestos. En ellos, se han establecido parámetros fundamentales como la cantidad del compuesto a evaluar que es aplicado y el grado de disminución de la actividad antialimentaria (Klein et.al. 2002).

La capacidad de un insecto fitófago para considerar que una especie de planta es un huésped adecuado depende de la capacidad del sistema de quimiosensores del insecto que le permiten detectar a los tejidos de las plantas con un nivel favorable de estimulantes alimentarios y disuavizantes de la alimentación. No se puede esperar que un compuesto tenga la misma actividad antialimentaria para atacar a especies diferentes de insectos, los diversos cambios en la estructura de una molécula afectan la actividad antialimentaria de distintas formas y para diferentes tipos de insectos. La actividad antialimentaria observada para un compuesto varía también dependiendo del sustrato que se utilice como fagoestimulante. Los efectos en las variaciones de los parámetros para evaluar la actividad antialimentaria tales como la duración de la prueba, la cantidad de discos con sustrato, la cantidad de insectos que participan en la prueba, los insectos bien alimentados y los insectos privados del alimento son parámetros que no se evalúan con facilidad, pero no deben descartarse (Klein et. .al. 2002, Simonds et. al. 1996).

A partir de especies que pertenecen a la familia Labiatae se han aislado compuestos, principalmente diterpenoides de tipo neo-clerodano con actividad antialimentaria para insectos fitófagos como por ejemplo *Spodoptera litoralis* (rosquilla negra), *S. exemta*, (gusano africano) *S. litura* (polilla oriental de las hojas) y *Bombix mori* (gusano de seda). El Ajugarin aislado de *Ajuga remota* y Jodrelina B aislada de *Scutellaria worinowii* demostró tener la actividad antialimentaria más potente en contra de *Spodoptera litoralis*. Estos son ejemplos de diterpenos aislados de miembros de la familia Labiatae (Esquivel et. al. 2000). Hace algunos años se evaluó la actividad antialimentaria de algunos diterpenoides aislados de especies del género *Salvia*. La 1-(10)deshidrosalviarina es un diterpenoide aislado de *Salvia lineata* que ha mostrado tener una potente actividad antialimentaria en contra de *Spodoptera litoralis* este compuesto también fue evaluado por su actividad antialimentaria en contra de *Diabrotica virgifera virgifera*. Al compararlo con el Azadiractina se observó que el Azadiractina era tres veces más potente que la 1-(10)deshidrosalviarina pero debido a la complejidad en la estructura del Azadiractina se considera a la estructura de la 1-(10)deshidrosalviarina como punto de partida para sintetizar compuestos más potentes en contra de *Spodoptera litoralis* (Esquivel et. al. 2000).

Se ha observado que matar a toda la población de insectos no es la única alternativa para disminuir el daño producido por estos insectos, por ejemplo, si se observa el ciclo de vida de los Lepidópteros se puede intervenir en alguna de las etapas para mantener bajo control a la población de insectos. El crecimiento adecuado de los Lepidópteros requiere de un adecuado crecimiento de las larvas, el surgimiento de la gran mayoría de adultos a partir de la etapa de pupa y de la relación entre machos y hembras para llevar a cabo la reproducción. Los compuestos keerlina, semiatrin y el ácido melissodórico que fueron aislados de *Salvia keerlii*, *S. semiatratha* y *S. melissodora* resultaron ser disrutores en la transición de la etapa larval a la etapa de pupa a bajas concentraciones, aunque estos compuestos tienen actividad antialimentaria moderada, pueden ser una alternativa en el control de la población de insectos. La salvigenóida que fue

aislada de *Salvia fulgens* y de *Salvia xalapensis* causó una importante reducción en el surgimiento de adultos que provienen de la etapa de pupa y una reducción de la relación entre macho y hembra cuando se lleva a cabo la reproducción. Un compuesto en particular muy interesante, la linearolactona, que se aisló de *Salvia lineata* fue inactivo en *Spodoptera littoralis* pero inhibió por completo el surgimiento de adultos provenientes de la etapa de pupa, redujo de forma significativa la población de pupas que provenían de la etapa larval y mató al 75% de las larvas de una población de *Spodoptera frugiperda* (Cogollero de maíz) (Esquivel et. al. 2000).

La evaluación del ciclo completo de la especie *Trichlopusia ni* que ataca a especies de la familia de las Crucíferas como por ejemplo, cultivos de lechuga, coliflor y brócoli permitió demostrar que la linearolactona es un buen prototipo para controlar a la población de esta especie debido a que inhibe por completo la oviposición y reduce el número de machos y hembras que se relacionan para llevar a cabo la reproducción (Esquivel et. al. 2000).

En otro estudio fueron analizados los aceites esenciales de *S. fruticosa* para determinar las propiedades insecticidas y genotóxicas en contra de *Bactrocera oleae* (mosco de olivo) y de *Drosophila melanogaster* (mosco del vinagre), en este estudio se observó que el aceite esencial resultó ser tóxico sólo para *B. oleae*. En otro estudio fueron evaluados los aceites esenciales de *S. officinalis* y se determinó que los aceites esenciales, así como sus constituyentes mayoritarios presentaron actividad insecticida en contra de *Tribolium confusum*. Los aceites esenciales de varias especies de Salvias han sido evaluados por su actividad insecticida en contra de plagas de larvas. Los efectos antialimentarios de varios diterpenoides aislados de *S. broussonetti* fueron evaluados para las especies *Spodoptera littoralis* (gusano de hoja de algodón) y para *Lepinotarsa decemlineata* y se observó que un diterpeno de tipo abietano y un diterpeno con esqueleto de icetexano fueron los componentes más activos. En otro estudio fueron evaluados nueve diterpenoides y cuatro sesquiterpenoides que fueron aislados de especies de

la familia Labiatae y de la familia Astraceae y se encontró que la salviarina aislada de *S. reflexa* fue la más activa en contra de *Sp. litoralis*, se observó que la esteroquímica del C12 del diterpenoide de tipo clerodano ejerce un efecto impotente en su actividad (Rezza et. al. 2015).

En diferentes estudios se ha observado que los compuestos con mayor actividad antialimentaria son los diterpenoides de tipo clerodano que tienen un anillo de furano , -insaturado y una -lactona o un epóxido en C4, un grupo metilacetoxil en C5 y un grupo acilóxido en C12 (Rezza et. al. 2015).

La aplicación de los compuestos con actividad antialimentaria sigue siendo limitada y sólo pocos compuestos de origen natural o sintético están comercialmente disponibles. Se ha considerado la posibilidad de sintetizar a estos compuestos con actividad antialimentaria pero esto resulta ser complejo y caro lo que lo hace de poco valor práctico. Por lo tanto, en algunos casos, una de las alternativas es utilizar compuestos que presenten actividad antialimentaria considerable para el control moderado de algunas especies. Otra alternativa consiste en obtener compuestos con actividad antialimentaria significativa a partir de compuestos que son levemente activos y se puede disponer fácilmente de ellos (Klein et. al. 2002).

El proceso de oxidación, radicales libres y sustancias implicadas.

A pesar de la importancia vital del oxígeno, esta molécula también resulta ser dañina para los seres vivos, incluso para los organismos aeróbios. El oxígeno y sus derivados son generados *in vivo* en procesos de importancia biológica. También se producen otras moléculas que son derivados del oxígeno y que también son perjudiciales para los sistemas biológicos (Halliwell et. al. 2015). Un ejemplo de ello, son los productos obtenidos durante la respiración celular que se forman debido a una semireducción de los compuestos oxigenados (Floyd et. al. 1999). Estos productos son causantes de un gran número de enfermedades tales

como el cáncer, enfermedades cardiovasculares, desórdenes neurológicos, entre ellos, las enfermedades neurodegenerativas, defectos cognitivos débiles y envejecimiento (Alam et. al. 2013). Antes de empezar a hablar acerca del proceso de oxigenación y compuestos con actividad antioxidante, es importante tener en cuenta algunos conceptos:

En general, un triglicérido es un éster derivado de un ácido graso que está formado por la unión de una molécula de glicerol y tres moléculas de ácido graso. Por otra parte, los fosfolípidos son moléculas que forman parte de los liposomas y de otras estructuras. Existen principalmente tres ácidos grasos diferentes en los fosfolípidos. El ácido oléico, que es el más abundante en la naturaleza, tiene una insaturación en el carbono 9 empezando por el final de la cadena. El ácido linoléico tiene una insaturación en el carbono 6, partiendo desde el final de la cadena. El ácido linolénico tiene una insaturación en el tercer carbono, partiendo del final de la cadena (Hamilton et. al. 1997). Muchas moléculas biológicas pueden ser atacadas directamente por especies llamadas radicales libres o por productos generados por reacciones entre radicales libres (Halliwell et. al. 2015).

Un radical libre es una especie que cuenta con uno o más electrones desapareados, un electrón desapareado es aquel que ocupa por si solo un orbital atómico o molecular. Una característica de los radicales libres es que son paramagnéticos, lo que significa que actúan en respuesta a un campo magnético, además, son altamente reactivos, su reactividad varía ampliamente. Existen varios ejemplos de radicales libres y procesos de formación de radicales, entre ellos, la molécula de oxígeno (O_2) es un radical libre debido a que tiene dos electrones que se encuentran desapareados, esto se puede observar al realizar un esquema de orbitales moleculares. Además de moléculas orgánicas y los iones de metales de transición tales como el cobre, el manganeso, el hierro, algunos óxidos de nitrógeno son considerados radicales. Para dar un ejemplo de procesos de formación de radicales libres tenemos a la generación de humo en las reacciones de combustión. Estas especies son de suma importancia debido a que se

encargan de llevar a cabo la oxidación de los lípidos (Hamilton et. al. 1997, Halliwell et. al. 2015).

Los radicales libres se forman por la ruptura homolítica de un enlace covalente entre dos átomos, esto implica la separación de los dos átomos que forman un enlace, pero a diferencia de una ruptura heterolítica, cada átomo queda con un electrón del par de electrones que formaban el enlace de una molécula. Los radicales reaccionan de dos formas distintas, la primera de ellas consiste en la reacción entre dos radicales, lo que genera una molécula que no es un radical, la otra forma ocurre cuando un radical reacciona con un no radical, esto genera un nuevo radical, este nuevo radical lleva a cabo una reacción en cadena. Un radical puede funcionar como un reductor, por ejemplo, cuando se adiciona un radical hidrógeno a un átomo de carbono radical, debido a el único electrón del hidrógeno es donado al átomo de carbono radical. Pero también un radical puede funcionar como un agente oxidante, cuando otra especie dona su electrón al radical (Halliwell et. al. 2015).

Si bien el oxígeno puede inhibir la actividad de alguna enzima, las causas de la toxicidad del oxígeno no se deben principalmente a la molécula como tal, sino que sus efectos dañinos son causados por los radicales derivados del oxígeno molecular, como el radical superóxido y el oxígeno singulete. Además de que los radicales libres derivados de oxígeno se unen a las enzimas e inhiben su actividad, ellos también pueden dañar al ADN y provocar mutaciones. El oxígeno molecular no es una molécula muy reactiva con moléculas que no son radicales libres, como muchas moléculas que forman a los organismos vivos, esto se debe a que como el oxígeno es un radical por tener dos electrones desapareados, sólo puede aceptar a un electrón en cada reacción y no un par de electrones como lo aportarían moléculas que no son radicales libres. Debido a esto, los seres vivos no se deterioran tan rápidamente (Halliwell et. al. 2015).

Las especies derivadas del oxígeno molecular son incluso más reactivas que el oxígeno, una de ellas es el oxígeno singulete, que es generado por la adición de

energía al oxígeno molecular. Si se adiciona un solo electrón a una molécula de oxígeno, se forma al radical superóxido y si se adicionan dos electrones al oxígeno, se forma al ion peróxido. De acuerdo a lo que se establece en la teoría de orbitales moleculares, la adición de uno o más electrones al oxígeno debilita el enlace entre los dos átomos, la adición de dos electrones al ion peróxido rompe definitivamente al enlace. En un sistema biológico, la adición de dos electrones al oxígeno se da por la adición de dos hidrógenos lo que produce una molécula de peróxido de hidrógeno mientras que la adición de cuatro electrones forma a dos moléculas de agua (Halliwell et. al. 2015).

Como se ha mostrado anteriormente, el oxígeno es una molécula dañina y los organismos aerobios sobreviven a estas condiciones debido a que tienen defensas antioxidantes. Estas defensas se encuentran en un organismo o bien pueden ser obtenidas a partir de la dieta. **Una molécula antioxidante es cualquier molécula que retrase, prevenga o remedie el daño producido a las moléculas que pueden ser oxidadas.** Los agentes antioxidantes actúan de muy diversas formas, que consisten, ya sea en remover de forma catalítica a las especies reactivas, disminuir la formación de especies reactivas, proteger a las biomoléculas del daño oxidativo, atrapar a las especies reactivas o bien remplazar a moléculas que son sencibles al daño oxidativo por moléculas más resistentes al daño, o bien, utilizando moléculas que se oxidan mas fácilmente para que de esta forma, las moléculas biológicamente más importantes, queden protegidas. Cuando se estudia la capacidad de un antioxidante, se debe de tomar en cuenta lo siguiente: Los niveles de defensas antioxidantes son diferentes de tejido a tejido, incluso de célula a célula, además de que las defensas antioxidantes no son el 100 % efectivas (Halliwell et. al. 2015).

La producción de especies reactivas en aerobios saludables está casi en equilibrio con el sistema de defensas antioxidantes, esto también implica que este balance no es perfecto. Pero..., ¿Qué sucede cuando este balance es trastornado? Ó cuando la capacidad de remplazo falla. Cuando en un organismo se tiene una gran cantidad de especies reactivas en comparación con la cantidad de defensas

antioxidantes, este organismo se encuentra en una condición de estrés oxidativo. Evidentemente, en estas condiciones, las biomoléculas serán dañadas por las especies reactivas. El daño no se debe sólo a la aparición del estrés oxidativo, también se debe al fracaso en el intento por reparar al sistema. Básicamente el estrés oxidativo tiene dos causas, su aparición se puede deber a una disminución de la capacidad antioxidante, ya sea por mutaciones o por la disminución de las defensas antioxidantes, o bien por el aumento en la producción de especies reactivas lo cual se puede deber a la exposición a altas concentraciones de O_2 o a la presencia de sustancias tóxicas que producen especies reactivas o a la sobrestimación de sistemas que producen especies reactivas (Halliwell et. al. 2015).

Las consecuencias del estrés oxidativo pueden ser una o bien, una combinación de las mismas, esto depende del tipo de células afectadas y la severidad de la afectación. Las consecuencias son las siguientes: proliferación, que se presenta cuando la estimulación debido al estrés oxidativo es leve; adaptación, en la que se observa un incremento en las defensas antioxidantes por un intento de mantener el equilibrio entre antioxidante y especie oxidante, debido a un estímulo leve o moderado producido por el estrés oxidativo; daño celular que es el resultado de un estímulo físico o químico, deficiente o en exceso que se presenta de forma momentánea o permanente y que altera la homeostasis de una célula en este caso la célula se encuentra en un estado redox alterado, ocasionalmente el daño celular puede ser reparado; envejecimiento celular que se presenta por daño celular, en este caso las células sobreviven pero ya no se regeneran y en ocasiones, cuando el daño debido a un estímulo severo o moderado, producido por el estrés oxidativo, la célula muere. La muerte celular se produce principalmente por dos mecanismos: por necrosis, en donde la célula y los organelos se hinchan, las mitocondrias pierden integridad y eventualmente la membrana plasmática se rompe y se libera el contenido de la célula el cual puede dañar a las células de los alrededores; mientras que en la apoptosis la célula activa su mecanismo de suicidio en este caso no se libera el contenido de las

células pero en algunos casos, se liberan peróxidos los cuales pueden dañar a las células de los alrededores (Halliwell et. al. 2015).

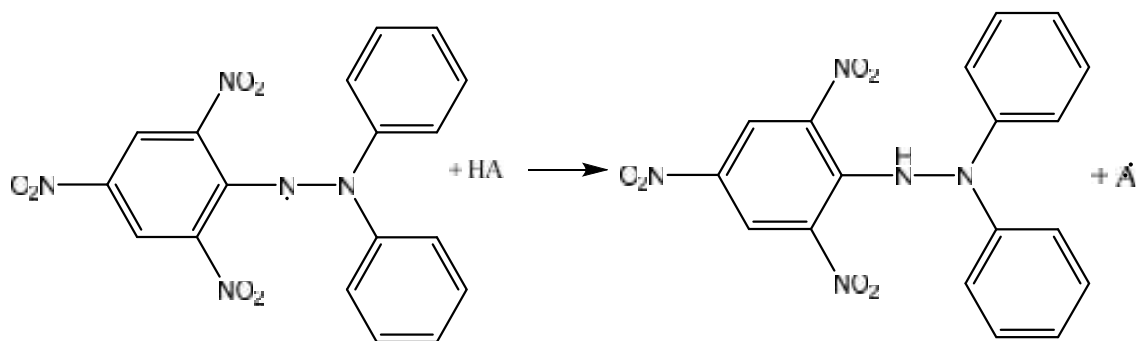
Antioxidantes y compuestos con actividad antioxidante en especies del género *Salvia*.

Como se mencionó anteriormente, la molécula de oxígeno, y sus derivados resultan ser tóxicos para todos los seres vivos en cierta forma, los organismos aerobios han podido sobrevivir en este ambiente rico en oxígeno debido a que han desarrollado defensas antioxidantes, los antioxidantes son utilizados en diversos ambitos, como en la industria alimentaria y en la industria química. Los seres vivos cuentan con un sistema de enzimas antioxidantes, por ejemplo, las enzimas superóxido dismutasas, las enzimas superóxido reductasas, y el sistema glutathion además, los antioxidantes también se pueden adquirir en la dieta, al consumir sustancias como ácido ascórbico, vitamina E, carotenoides y polifenoles (Halliwell et. al. 2015).

En particular, el cerebro es muy susceptible al daño producido por el estrés oxidativo. El cerebro está enriquecido con ácidos grasos que son fácilmente peroxidables, consume una fracción fuera de lo común de oxígeno con respecto a su masa relativamente pequeña y no está protegido ante la oxidación, además presenta una alta concentración de hierro en ciertas regiones y también una concentración de ascorbato, que, si se produce una alteración organizacional en el tejido cerebral, la mezcla hierro/ ascorbato resulta ser un potente agente oxidante. Es de particular importancia para el cerebro el peróxido de hidrógeno producido durante la desaminación oxidativa de las catecolaminas (Floyd et. al. 1999).

Una de las alternativas para contrarrestar los efectos provocados por las especies reactivas de oxígeno y algunas otras moléculas es obtener diferentes tipos de compuestos provenientes de la naturaleza, que tengan actividad antioxidante significativa (T. B. Ng et. al. 2000). En diferentes estudios se ha observado que el consumo de varios antioxidantes como una medida para prevenir enfermedades resulta más efectivo que el consumo de uno solo (Alam et. al. 2013).

Existen métodos *in vivo* y métodos *in vitro* para medir la actividad antioxidante de cierta sustancia. Para conocer dicha actividad, es necesario realizar varios estudios, además, estos métodos varían entre sí y por lo tanto no pueden ser comparados por completo. El investigador debe conocer a detalle a los distintos métodos antes de adoptar alguno que proponga para su investigación. Los métodos *in vitro* utilizan radicales libres para medir esta actividad. Entre todos, el método de atrapamiento de radical DPPH, que se describe a continuación, resulta ser el más sencillo, se realiza rápidamente y es poco costoso en comparación con otros métodos. Mientras tanto, en los métodos *in vivo*, la muestra a evaluar es generalmente administrada a animales con un régimen de dosificación dependiendo del método, después de un periodo de tiempo, los animales son sacrificados y su sangre o sus tejidos son evaluados. Se debe tener presente que los métodos pueden ser optimizados dependiendo del objetivo de cada investigación, además, para determinar la actividad antioxidante de algún compuesto o mezcla se deben llevar a cabo diversos experimentos (Alam et. al. 2013).



Radical 2,2-difenil-1-picrilhidracilo DPPH

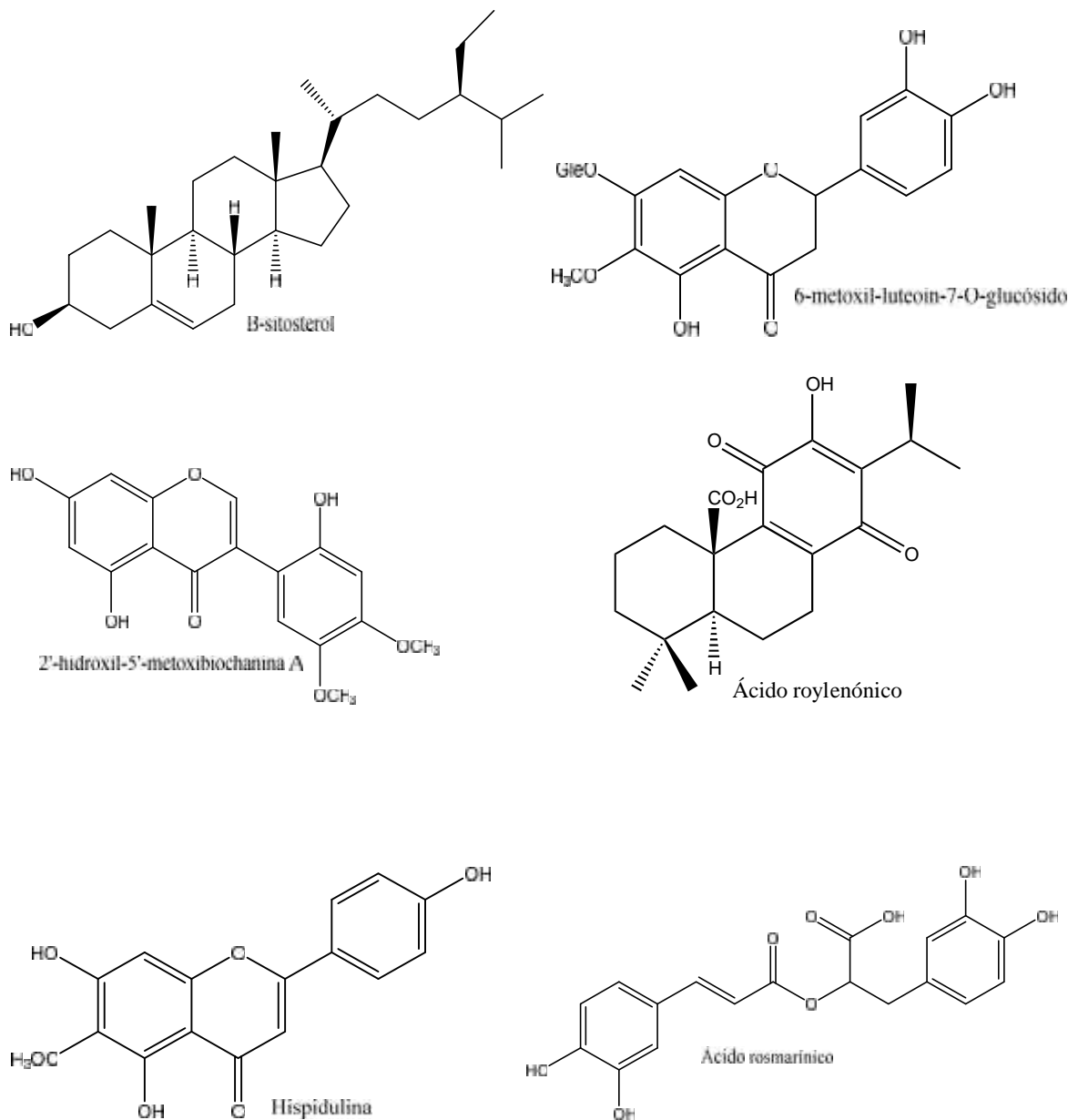
Figura 31: Reacción de neutralización del radical DPPH

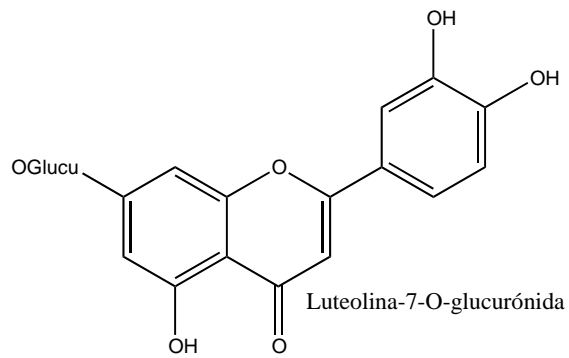
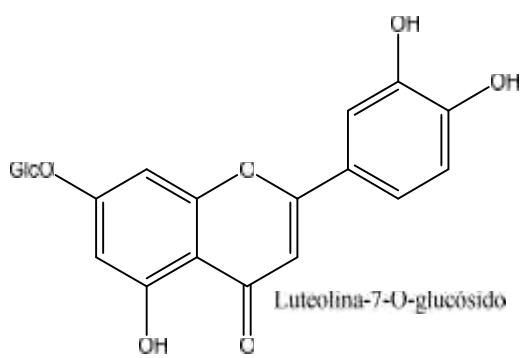
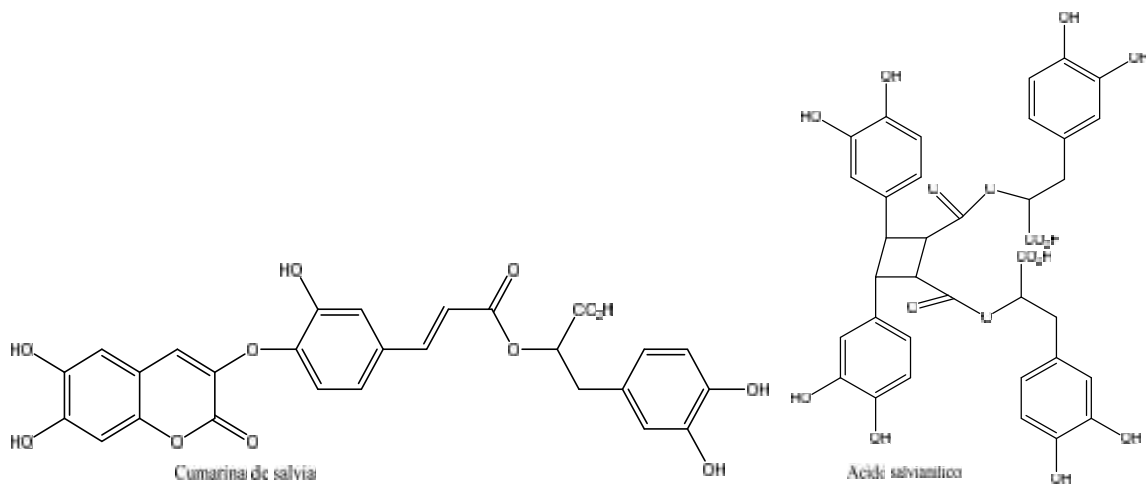
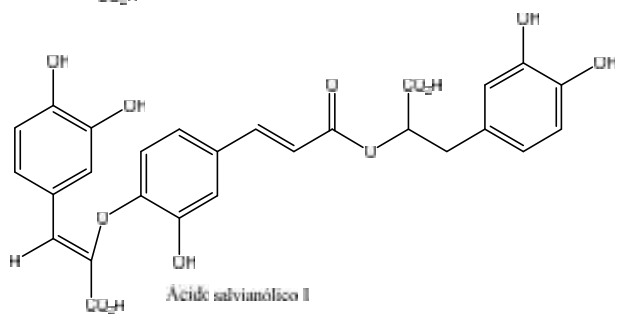
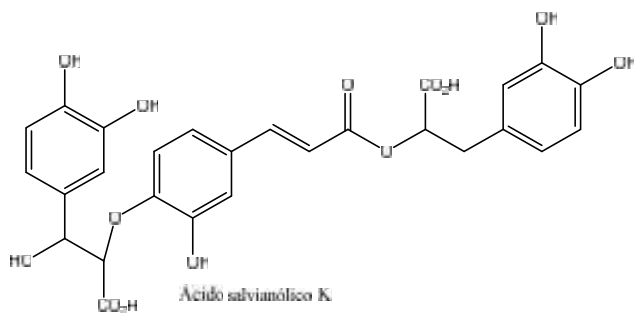
En el método de actividad atrapadora sobre el radical DPPH, la molécula 1,1-difenil-1,2-picrilhidrazil, el DPPH, se caracteriza por ser un radical libre estable, el electron de esta especie se deslocaliza por toda la molécula, debido a esto, la molécula no dimeriza como podria esperarse, así que cuando el radical se encuentra en una disolución etanolica, esta toma un color violeta intenso que se caracteriza por una banda de absorción centrada en 517 nm. Cuando una

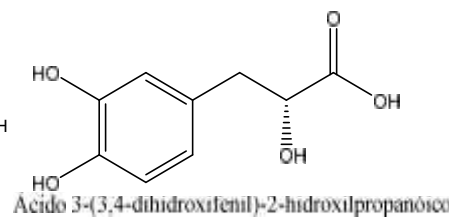
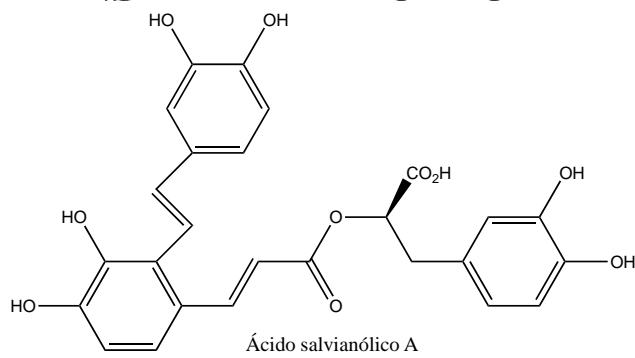
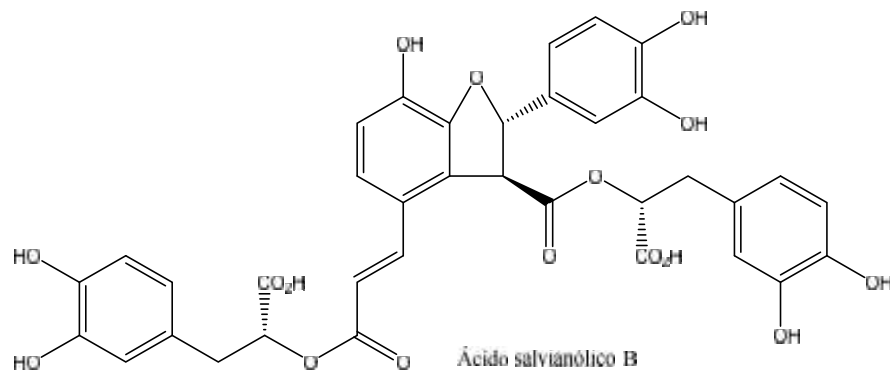
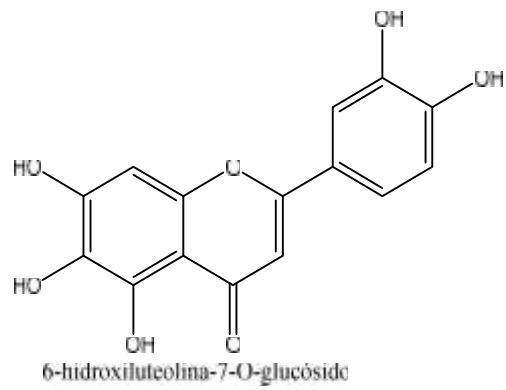
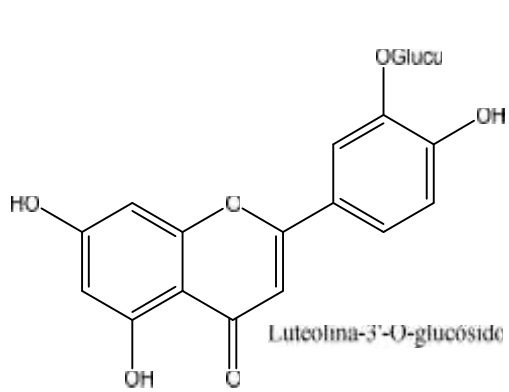
disolución del radical es mezclada con una especie que pueda donar un átomo de hidrógeno, se obtiene a la forma reducida del radical y por lo tanto desaparece el color de la disolución. Para evaluar la capacidad como antioxidante de una sustancia determinada, se mide la diferencia entre la densidad óptica de la disolución antes y después de la reacción. (Alam et. al. 2013).

Las especies del género *Salvia* son conocidas por ser una fuente rica en antioxidantes, además, las grandes cantidades de estos compuestos nos pueden salvar del daño producido en la peroxidación. Los derivados del ácido rosmarínico y algunos flavonoides son los compuestos más estudiados debido a su efecto biológico. De *Salvia plebeian* se aisló al β -sitosterol, 6-metoxiluteolina-7-O-glucósido y al 2-hidroxi-5'-metoxilbiochaning A los cuales tuvieron actividad antioxidante significativa. De esta planta, también se aisló al ácido royleónico y a la hispidulina los cuales prolongaron el tiempo para la inducción de la oxidación. Los polifenoles de *S. officinalis* mostraron tener una potente actividad antioxidante en las pruebas de DPPH y en el ensayo del anión superóxido, el ácido rosmarínico, el ácido salvianólico K, el ácido salvianólico I, las cumarinas encontradas en esta planta y el ácido sagerínico presentaron una actividad antioxidante mayor a la observada con trolox, en el ensayo del radical aniónico superóxido. Además, la luteolina-7-O-glucósido, la luteolina-7-O-glucuronida, la luteolina-3'-O-glucósido y la 6-hidroxiluteolina-7-O-glucosido presentaron una potente actividad antioxidante en el ensayo del radical aniónico superóxido. El ácido salvianólico A y el ácido salvianólico B, aislados de *Salvia miltiorrhiza* fueron más activos que el ácido ascórbico en las pruebas de DPPH y ABTS. El compuesto nombrado ácido 3-(3,4-dihidroxifenil)-2-hidroxiopropanóico que fue aislado de *S. miltiorrhiza* logró incrementar la actividad de la superóxido dismutasa al hacer dependientes de la dosis a los ratones a los que se les suministró. Los diterpenoides de tipo abietano como el rosmanol, el isorosmanol, el epirosmanol, el carnisol, el ácido carnisólico y el galdosol que fueron aislados de *Salvia officinalis* y recientemente de *Salvia eremophila* y *S. santolinifolia* presentaron una potente actividad antioxidante en las pruebas de DPPH Los compuestos que fueron determinados por el método de índice de estabilidad del aceite y posteriormente,

aislados de *Salvia officinalis* fueron comparados con los α -tocoferoles. Entre estos compuestos se pudo observar que la diferencia en la actividad no se encuentra en el tipo de anillo de lactona que presentan los compuestos, sino que los compuestos que tienen un grupo *orto*-dihidroxilo, presentan mayor actividad. Finalmente se observó en otro estudio que los polisacáridos aislados de *Salvia miltiorrhiza* presentaron una actividad antioxidante significativa (Reza et. al. 2015).







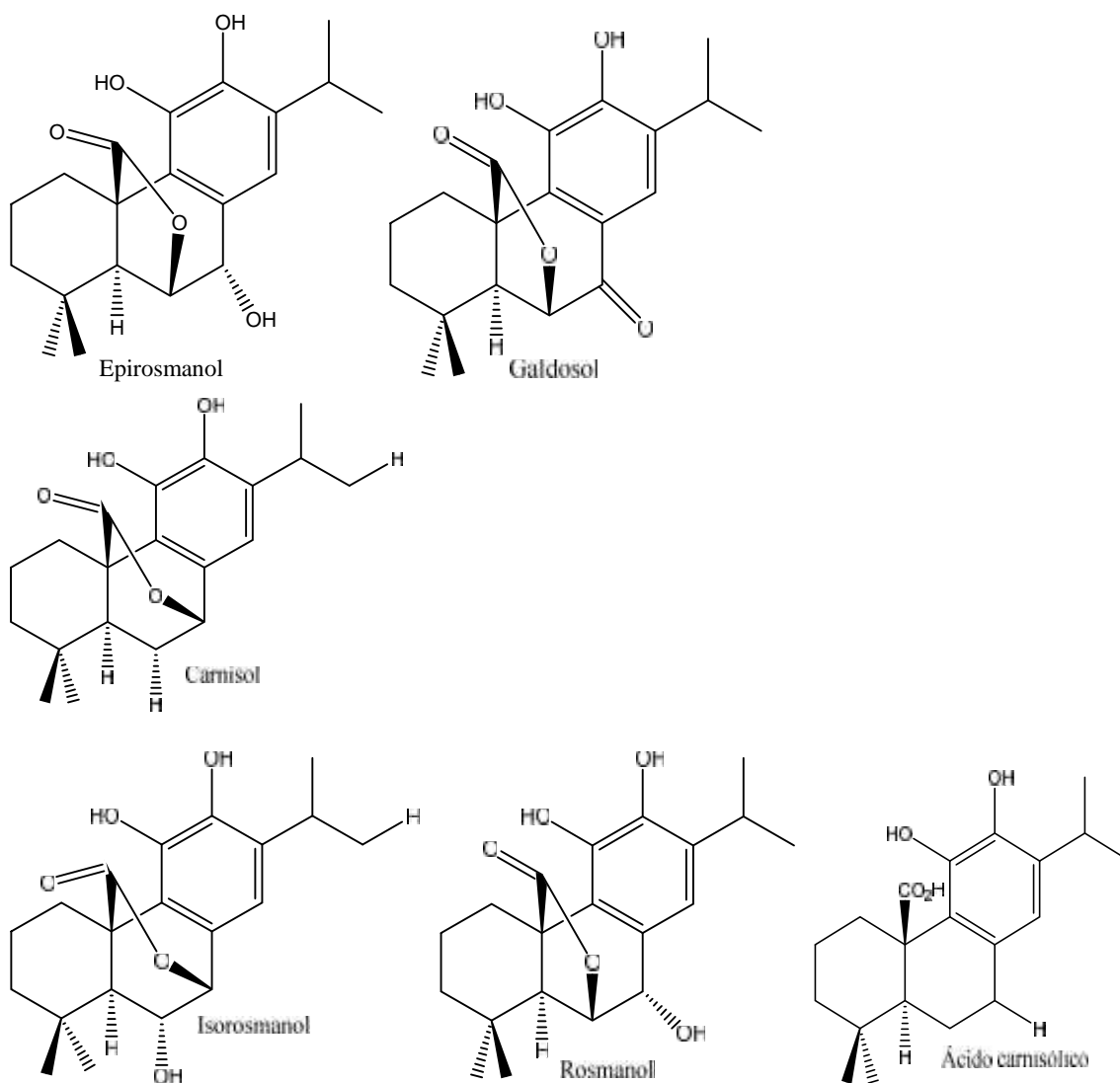


Figura 32: Compuestos con actividad antioxidante encontrados en diferentes especies del género *Salvia*.

Propiedades físicas, química y biológicas de los ácidos ursólico y oleanólico.

El ácido ursólico es un triterpenoide pentacíclico con fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_3$, el cual tiene una masa molecular de 456.7003 g/mol. El ácido ursólico es un sólido blanco cristalino con un punto de fusión de 283 °C- 285°C, es poco soluble en agua, pero es soluble en ácido acético glacial caliente y en disolución alcohólica de NaOH. La biosíntesis del ácido ursólico se lleva a cabo por medio de la

ciclación del escualeno. Este ácido puede comportarse como un ligante bi o tri dentado y puede donar fácilmente pares de electrones a cationes de metales de transición debido a la presencia de los átomos de oxígeno (Kashyap et. al. 2016).

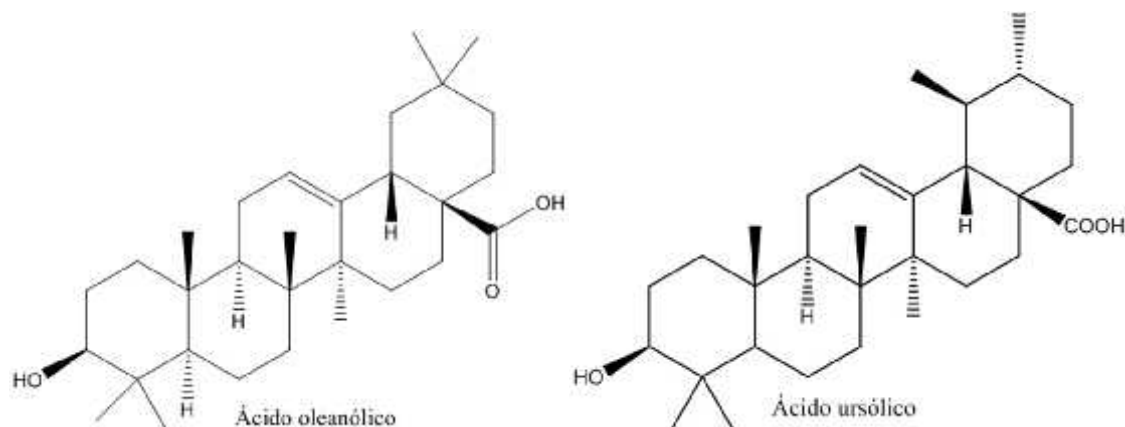


Figura 33: Estructuras de los ácidos oleanólico y ursólico

El ácido ursólico y su isómero, el ácido oleanólico, son dos ácidos que se pueden encontrar de forma libre o asociados con agliconas. Estos triterpenoides han mostrado diversas actividades biológicas, que comparten entre ellos al ser químicamente parecidos. Las plantas que contienen ácido ursólico y ácido oleanólico son utilizadas en medicina tradicional para el tratamiento de diversos problemas de salud. Después de haber aislado al ácido ursólico y al ácido oleanólico se han descubierto, adicionalmente, una gran cantidad de propiedades (Liu et. al. 1995).

Tanto el ácido oleanólico como el ácido ursólico funcionan como hepatoprotectores. Se ha observado que el ácido oleanólico funciona como un hepatoprotector contra el daño inducido químicamente con CCl_4 , al reparar el daño hepático producido a las células parenquimales (células que le dan una función específica a un órgano). El ácido oleanólico ejerce el mismo efecto en contra del daño inducido con acetaminofeno, bromobenceno, cadmio, tioacetamida, furosemida, colchicina y D-galactosamida mientras que para otras hepatotoxinas tales como el alcohol alílico, la dimetilnitrosamina y la α -amanitina no presenta este efecto. Se ha demostrado que también el ácido ursólico previene la colestasis

inducida con acetaminofeno, incluso se ha observado que es más efectivo que el ácido oleanólico en contra del daño producido por sustancias químicas. Se sabe que algunas hepatotoxinas requieren de activación metabólica, esta es, específicamente efectuada por el citocromo P-450. En diversos estudios se ha observado que el ácido oleanólico disminuye los niveles microsomales del citocromo P-450. Mientras tanto no se observó una disminución en cuanto a los niveles de NADP-citocromo reductasa C. El ácido oleanólico suprime a las enzimas CYP1A y CYP2A pero no suprime a CYP3A. Estos resultados se han observado también para el ácido ursólico. Los efectos hepatoprotectores del ácido oleanólico en contra de sustancias que requieren de la activación metabólica como el acetaminofeno, el bromobenzeno, el CCl₄ y la furosemida se deben a una desactivación metabólica producida por estos ácidos, sin embargo, para sustancias que no requieren de una activación metabólica, se desconoce el mecanismo por el cual aparece dicho efecto. Se sabe que, en el caso del cadmio, el ácido oleanólico secuestra al cadmio y por lo tanto queda desactivado. La prevención de las lesiones hepáticas debido a la progresión de la fibrosis o cirrosis y la reparación de las células parenquimales dañadas, son importantes en la actividad hepatoprotectora, se ha observado que el ácido oleanólico promueve la regeneración celular debido a la activación en la mitosis y disminuye los niveles de tirosina que se encuentran en los cerebros de ratones con cirrosis (Liu et. al. 1995).

El sistema inmunológico celular es incapaz de desactivar a las especies reactivas de oxígeno. La acumulación de especies reactivas de oxígeno lleva al organismo a una condición de estrés oxidativo. Se ha demostrado recientemente que estas especies están involucradas en el progreso de algunas enfermedades como el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas, la artereosclerosis y el infarto al miocardio, así como con defectos cromosómicos. Recientemente los antioxidantes naturales se han visto como agentes terapéuticos prometedores en la neutralización de radicales libres. Se ha observado que el ácido oleanólico presenta actividad antioxidante debido a que aumenta la actividad de algunas defensas antioxidantes en el hígado, tales como el glutatión, la metalotioleina, el

zinc, la glutatión-s-transferasa mientras que no se observa un aumento en la actividad de otras defensas antioxidantes como en los casos de la enzima glutatión peroxidasa, la enzima glutatión reductasa y en la enzima superóxido dismutasa (Liu et. al. 1995). En otro estudio se observó que el ácido ursólico invirtió los estados reducidos de las enzimas, superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión reductasa (GHS) y glutatión peroxidasa (GPx) así como también aumentó la tasa de supervivencia de estas enzimas. En otro estudio se observó que el ácido ursólico logró revertir a la α -galactosa producida por daño neurológico debido a los procesos oxidativos. En otro estudio en donde se utilizaron linfocitos de sangre humana se observó que el pretratamiento con ácido ursólico logró normalizar el efecto oxidativo de la radiación de los rayos UVB debido a que inhibió la peroxidación de lípidos, esto lo convirtió en un buen candidato para el tratamiento de enfermedades en la piel producidas por foto-inducción. En un estudio realizado con un modelo de células neurológicas se observó que el ácido ursólico logró atenuar al peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y al radical MPP⁺ los cuales indujeron la muerte celular y la formación de malonaldehído (MDA) (Kashyap et. al. 2016).

Se ha observado que el estrés oxidativo está asociado con la expresión incrementada de los receptores para los productos finales de la glicación avanzada, los cuales promueven la progresión de varios tipos de cáncer y de enfermedades cardiovasculares. En un estudio se demostró el efecto antioxidante del ácido ursólico debido a la modulación de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato por medio de la ruta oxidasa-NF- κ de señalización. El Nrf2, una molécula clave responsable de la regulación de las enzimas involucradas en la liberación de especies oxidantes, fue activada con ácido ursólico (Kashyap et. al. 2016).

Los procesos inflamatorios son procesos complejos que están asociados a la progresión de varias enfermedades tales como el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas y las enfermedades cardiovasculares. El factor transcripcional NF- κ se ha considerado como una vía principal de señalización que regula la expresión de algunos genes inflamatorios. Varios receptores que se enlazan a la

membrana extracelular son conocidos por activar a la ruta NF-K (Kashyap et. al. 2016). El ácido oleanólico y el ácido ursólico también presentan actividad antiinflamatoria. Este efecto fue descubierto debido a que el ácido oleanólico y el ácido ursólico lograron inhibir la aparición de un edema inducido con carragenina en la pata de ratones, este efecto fue confirmado en estudios posteriores, también inhibe la aparición de edemas debido a la inducción realizada con dextrano además funciona también como auxiliar en la supresión de artritis en ratones. Se ha comprobado que el ácido oleanólico resulta ser más efectivo al administrarlo de forma intravenosa que al administrarlo de forma oral. El ácido oleanólico también reduce la permeabilidad vascular inducida con ácido acético; la respuesta alérgica de algunos animales y suprime la hipersensibilidad retrasada producida por la inyección de RBC o la aplicación de forma tópica del dinitroclorobenceno en ratones (Liu et. al. 1995). El ácido ursólico también resultó ser un compuesto activo en la prevención de la formación de edemas en la oreja de los ratones, inducidos con acetato de 12-o-tetradecanoilforbol (Liu et. al. 1995).

El efecto antiinflamatorio del ácido ursólico fue comprobado al inducir un edema con el aceite de crotón. El lanzamiento de citoquinas pro-inflamatorias fue reducido por el ácido ursólico. Las enzimas pro-inflamatorias que hidrolizan a los fosfolípidos en diversos agentes inflamatorios, fueron desactivadas en presencia de ácido ursólico. En un estudio realizado in vivo en donde se utilizó cortex prefrontal de cerebro de ratones se observó que el ácido ursólico no sólo redujo la formación de productos finales de glicación avanzada y de especies reactivas de oxígeno, sino que también redujo la expresión de la ciclooxigenasa II. En otro estudio se vió que el ácido ursólico suprimió a los factores trasccripcionales tales como el factor nuclear activado de células T. En otro estudio, el ácido ursólico redujo el crecimiento del tumor e incrementó el rango de supervivencia de los ratones. Todas estas evidencias sugieren que el ácido ursólico podría tener un gran potencial en el desarrollo de antiinflamatorios efectivos (Kashyap et. al. 2016).

A los ácidos ursólico y oleanólico se les atribuyen propiedades antiinflamatorias debido a que inhiben el lanzamiento de histamina proveniente de los mastocitos,

inducido por algunas sustancias por la inhibición de la actividad de la lipoxigenasa y la ciclooxigenasa. De esta forma, se reducen algunos factores inflamatorios producidos durante la cascada del ácido araquidónico. Se sabe que el ácido ursólico y oleanólico en grandes dosis puede provocar atrófia del timo (Liu et. al. 1995).

La promoción y la iniciación de algunos tumores es inhibida por los ácidos ursólico y oleanólico en varios grados. Estos ácidos han logrado inhibir la mutagenicidad producida por benzo(a)pireno. El ácido ursólico es el componente activo de *Eriovotriya japonica* y se observó que puede inhibir la actividad de la aflatoxina-b1 que induce la mutagenicidad en *Salmonella triphymurium*. El ácido ursólico que se aísla de *Rosmarinus officinalis* es efectivo en la inhibición de la iniciación del tumor producido por 7,12-dimetilbenz(a)antraceno. El ácido ursólico que se aísla de *Prunella vulgaris*, *Psichotria serpens* y *Hyptis capitata* es uno de los principales compuestos citotóxicos para las células leucémicas P-388 y L-1210 así como para las células del carcinoma pulmonar de humano. El suministro de ácido oleanólico en la dieta de los ratones durante tres semanas detuvo el aumento y la multiplicidad del tumor intestinal inducido con azoximetano. El ácido ursólico y el ácido oleanólico, dos componentes activos de *Glechoma hederacea* lograron inhibir los efectos del tumor producido con TPA. El ácido ursólico y el ácido oleanólico disminuyeron de forma considerable el número promedio de ratones con papiloma de pecho, inducido mediante un experimento de dos pasos. Se cree que tanto el ácido ursólico como el ácido oleanólico pueden inhibir la iniciación y la promoción de los tumores debido a la inhibición de la inflamación que se produce por los promotores de tumores. Los ácidos ursólico y oleanólico inducen la diferenciación entre las células carcinogénicas debido a que producen cambios en la morfología de estas células, modulan el sistema de defensas corporales como las defensas antioxidantes y las defensas inmunológicas. El uso de los ácidos ursólico y oleanólico ha sido recomendado para el tratamiento del cáncer en la piel, los cosméticos que contienen la mezcla de ácido ursólico y ácido oleanólico se han utilizado para la prevención del cáncer en la piel (Liu et. al. 1995).

La metástasis es una reacción vigorosa en el crecimiento de las células cancerígenas y en la mayoría de los casos de cáncer, esta condición se asocia a una alta mortalidad en la población. Este comportamiento de las células cancerígenas lleva a la quimioterapia a ser la única alternativa para el tratamiento contra el cáncer. Tanto compuestos de origen natural como sintético se han utilizado para inhibir los efectos metastáticos producidos por las células cancerígenas (Kashyap et. al. 2016).

Durante dos décadas el ácido ursólico ha sido investigado por sus efectos antimetastáticos. La actividad de las proteasas está asociada con la invasión del tumor y la metástasis han sido significativamente inhibidas por el ácido ursólico. En otro estudio se observó que los factores tales como interleucina-1, fueron reducidos por el ácido ursólico, esto ocurrió por la desactivación del factor transcripcional NF- κ B. De forma similar, mediante un tratamiento dependiente de la dosis y del tiempo de células cancerígenas de pecho, el ácido ursólico logró inactivar al NF- κ B lo que además terminó en una baja regulación del MMP-2. En un estudio acoplado con adenocarcinoma transgénico de próstata en ratones, se observó que el ácido ursólico inhibe de forma significativa el crecimiento del tumor por la supresión de efectos pro-inflamatorios. En otro estudio dependiente de la concentración, el efecto antimetastático del ácido ursólico fue reportado para células de carcinoma de pulmón, mediante la inhibición de Na(+)-K(+)ATPasa. Similarmente, la inhibición de proteínas involucradas en la adhesión, invasión y migración de células cancerígenas, fueron reportadas para el ácido ursólico, en un estudio *in vitro* con células de adenocarcinoma de colon de humano y en células de melanoma de ratones. Además, al utilizar el modelo *in vivo* de células metastáticas de melanoma de pulmón, el ácido ursólico fue propuesto como un agente prometedor por su capacidad antimetastática. El MAPK/P38 es otra sustancia involucrada en la regulación de la expresión de MMPs, esta fue suprimida por el ácido ursólico en células de cáncer de estómago en humanos. Claramente, el ácido ursólico tiene la capacidad de suprimir la metástasis de células cancerígenas por medio de varios mecanismos, por lo tanto, el ácido

ursólico puede ser utilizado para la regulación del crecimiento de células cancerígenas (Kashyap et. al. 2016).

La angiogénesis es la formación de nuevos capilares a partir de capilares preexistentes, este mecanismo es esencial en el crecimiento de tumores y mejora el comportamiento invasivo de los tumores. Varios estudios indican que los tumores crean un microambiente en sus alrededores en los que se encuentra a una gran variedad de quimiocinas los que apoyan la angiogénesis. Existen muchos pasos en la angiogénesis en donde se podría inhibir el crecimiento de los tumores (kashyap et. al. 2016).

Un estudio *in vivo* con membrana clorioalantónica demostró que el ácido ursólico inhibió la formación de un nuevo sistema de vascularización. En otro estudio se demostró que el ácido ursólico suprimió al factor de crecimiento endotelial vascular y al óxido nítrico sintasa inducible, asociado con la angiogénesis. En un estudio realizado con células de cáncer de hígado se demuestra que el ácido ursólico suprime el factor inducible de hipoxia que aumenta la expresión de los factores angiogénicos. Esta regulación de la expresión de los factores angiogénicos puede estar asociada con la actividad antioxidante del ácido ursólico en contra de las especies reactivas de oxígeno y el monóxido de nitrógeno. En otro estudio en donde se utilizaron células de Ehrlich, se observó que el ácido ursólico no solo logró regular a las proteínas que regulan la angiogénesis, sino que también inhibió de forma significativa el crecimiento de las células cancerígenas. En otro estudio se demostró que el tratamiento con ácido ursólico logró inhibir la transducción de señales al desactivar la transcripción β y a algunos otros factores los cuales están asociados con la sobrevivencia de tumores, la proliferación, la invasión y la angiogénesis (Kashyap et. al. 2016).

Los ácidos ursólico y oleanólico también presentan efectos hipolipidémicos y antiarteroescleróticos. Se ha observado que al alimentar a conejos y ratas con ácido ursólico fue posible prevenir la arteroesclerosis y se produjo una disminución de los niveles de colesterol en la sangre y de la β -lipoproteína. El ácido oleanólico ha prevenido de la hiperlipidemia en conejos, puercos de guinea y ratones. Este ácido

también disminuye los niveles elevados de colesterol y -lipoproteína, este efecto es comparable al que se observa para el clorfibrato y mayor al observado para la berberina. El ácido oleanólico no afecta los niveles de -lipoproteína en conejos sanos, sin embargo, impide la precipitación del colesterol en los vasos sanguíneos. Con el tratamiento de ácido oleanólico incrementa la concentración de lipoproteínas de alta densidad, mientras que disminuye la concentración de lipoproteínas de baja densidad (Liu et. al. 1995).

Los ácidos ursólico y oleanólico han mostrado efectos antiulcéricos efectivos. En un experimento en el que se propició la formación de úlceras, se observó una disminución de las mismas después del tratamiento con ácido oleanólico. Se ha observado que la administración de ácido ursólico a ratones disminuye la ulceración gástrica inducida por ligadura pilórica. El hemisuccinato de ácido oleanólico tiene un mayor efecto antiulcérico que la carbenoxalona (Liu et. al. 1995).

El ácido ursólico y sus derivados presentan actividad antimicrobiana, estos compuestos pueden inhibir el crecimiento de las bacterias, como por ejemplo de *Staphylococcus aureus*, bacterias gram-negativas y *Microsporium lenosum*. El ácido ursólico, uno de los componentes activos de *Rosmarinus officinalis* puede inhibir el crecimiento de las bacterias y levaduras asociadas a los alimentos. Los ácidos oleanólicos que se encuentran asociados con saponinas ejercen un amplio efecto antifúngico, especialmente, en contra de *Candida glabrata* (Liu et. al. 1995).

El ácido oleanólico presenta actividad hipoglucémica, esto se observó debido a que disminuyó los niveles de glucosa en la sangre antes y después de haber provocado diabetes en ratones tratados con aloxano. El aumento en los niveles de glucosa en la sangre, ya sea por adrenalina o por glucosa se vio aminorado por el tratamiento con ácido oleanólico. En un experimento con ratones en donde eran intoxicados con grandes cantidades de aloxano, se observó que el tratamiento con ácido ursólico durante una semana, disminuyó los niveles de glucosa y fueron favorecidos el glucógeno hepático y la insulina (Liu et. al. 1995).

Por medio de un ensayo *in vitro*, se observó que el ácido oleanólico previene la aparición de caries debido a que inhiben a la glucosiltransferasa de la especie *Streptococcus mutans*, una bacteria cariogénica primaria (Liu et. al. 1995).

El ácido oleanólico también presentó efectos antiesterilizadores en ratones. Además, el ácido oleanólico junto con otros triterpenoides, logró inhibir a la enzima testosterona-5- a-reductasa, lo cual, inhibió la actividad de la testosterona (Liu et. al. 1995).

Objetivo general:

Obtener información acerca de la composición química de la especie *Salvia panosa* Fernald colectada entre las regiones de Nopala y Teontepec en el estado de Puebla México.

Objetivos particulares:

- Encontrar algún diterpenoide con actividad antialimentaria contra algunos Insectos o larvas.
- Identificar a los compuestos obtenidos durante este estudio mediante técnicas espectroscópicas de IR, H¹-RMN y espectrometría de masas.
- Realizar pruebas biológicas de los extractos y fracciones obtenidas durante el proceso para determinar algún tipo de actividad biológica.
- Contribuir al estudio de la composición química de plantas pertenecientes a la sección Scorodonia del subgénero Calosface.

Hipótesis:

En este estudio se obtendrá una diversa gama de terpenoides, como diterpenoides, especialmente, de tipo abietano y neo-clerodano, algunos de ellos con actividad antialimentaria en contra de insectos fitófagos. También se obtendrán triterpenoides con esqueleto de lupano, damarano, ursano y oleanano, así como flavonoides y otros polifenoles. No se descarta la posibilidad de que la especie posea algún compuesto con actividad biológica de otro tipo.

Material.

Durante la realización del trabajo experimental, los extractos, las fracciones y los compuestos obtenidos fueron evaluados mediante la técnica de Cromatografía en Capa Fina (CCF), para esto, se utilizaron cromatofolios de silica gel G UV₂₅₄ de 0.25 mm de grosor, soportada por una capa de aluminio, marca Macherey-Nagel. Los cromatofolios utilizados fueron observados en una lámpara de luz UV, modelo ENF-260C-(254-365 nm) y posteriormente revelados para lo que se utilizó una disolución de sulfato de cerio IV (Ce(SO₄)₂) disuelto en ácido sulfúrico/ H₂O.

Para realizar algunas separaciones, se utilizó la técnica de Cromatografía en Placa Preparativa. Para esto se utilizaron cromatoplasmas de silica gel G UV₂₅₄, que se encontraba sobre una lámina de vidrio, con 2 mm de grosor.

Para la separación del extracto y de algunas fracciones se ocupó la técnica de Cromatografía en Columna (CC) la cual se realizó utilizando como fase estacionaria silica gel para Cromatografía en Capa fina, silica gel 230-400 y alumina neutra.

Los disolventes utilizados (hexano, acetona, acetato de etilo, metanol y etanol) fueron destilados previamente.

Los espectros de IR se obtuvieron con el espectrofotómetro FIT-IR Buker Tensor 27.

Los espectros de RMN-¹H fueron realizados a una frecuencia de 400 MHz y se obtuvieron con el espectrofotómetro Buker Advance III.

Los análisis de Cromatografía de Gases acoplados a Espectrometría de Masas se realizaron con el cromatografo de gases- espectrómetro de masas JEOL GCMate III, los espectros de masas fueron obtenidos por medio de la técnica de Impacto Electrónico, con una energía de ionización de 70 eV.

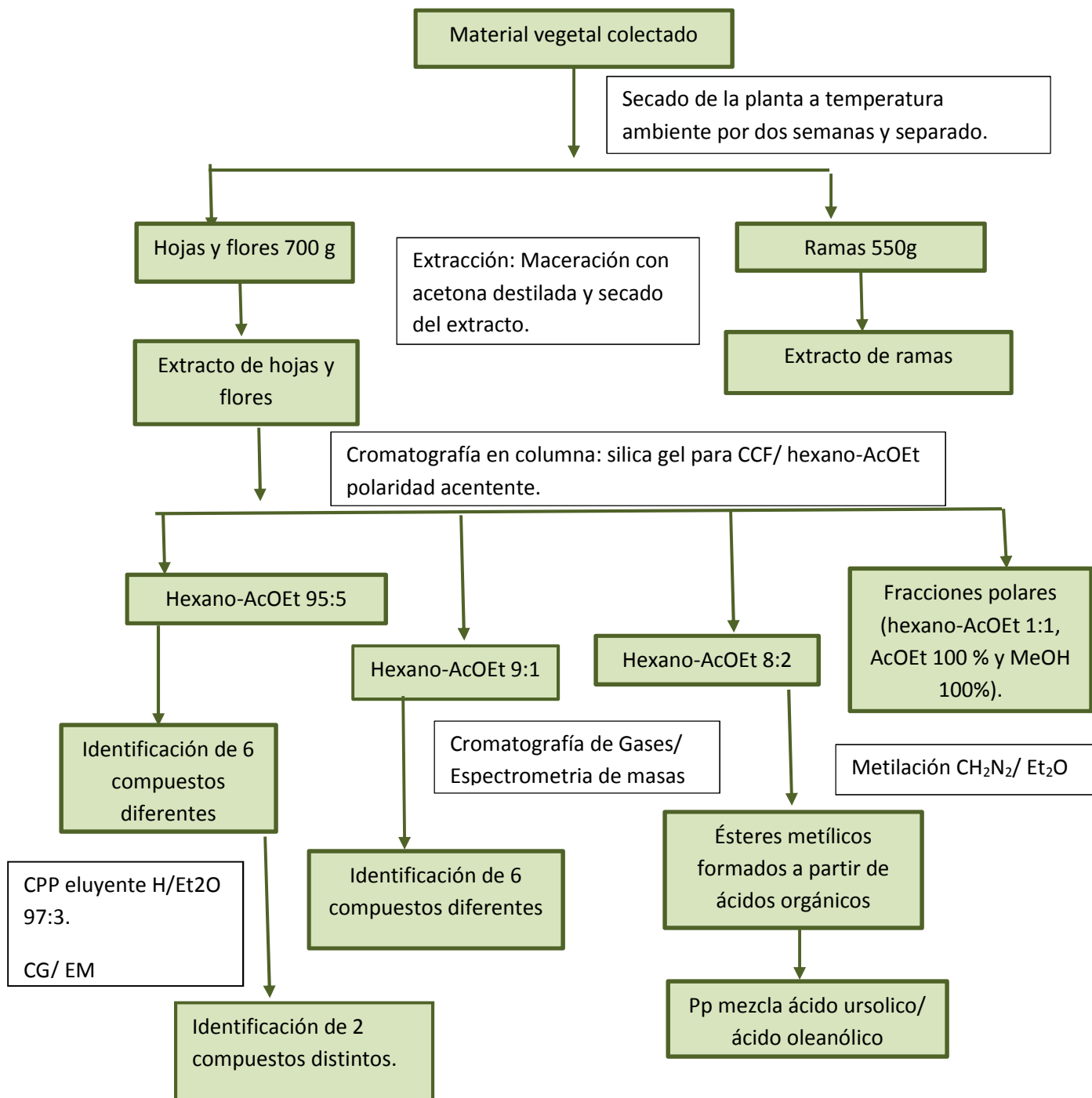
Para determinar la actividad antioxidante se realizaron las siguientes pruebas: Cuantificación de la reducción del radical libre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

para lo cual se utilizó una incubadora de CO₂, ESCO y un lector de microplacas marca Bio-Tek, modelo ELx-808 y la prueba de Inhibición de la peroxidación de lípidos inducida con FeSO₄ en homogenizado de cerebro de rata para lo cual se utilizó una balanza analítica BP61S Sartorius, un potenciómetro 50 pH Meter, Beckman, una centrífuga clínica 228 Fisher Scientific, una incubadora de CO₂, ESCO y un lector de microplacas marca Bio-Tk, modelo ELx-808.

Procedimiento experimental.

Colecta del material vegetal.

El material vegetal se colectó el 26 de septiembre de 2015 entre los poblados de Nopala y Teontepec en el estado de Puebla, México. En el diagrama siguiente se explica el procedimiento experimental:



El material vegetal fue secado al aire libre durante aproximadamente 2 semanas, posteriormente, fue separado en hojas, flores y ramas, tanto las hojas y flores como las ramas fueron pesadas, se obtuvieron 700 g de partes aéreas y 550 g de ramas.

Obtención del extracto de las hojas y flores y de ramas.

Los extractos de las hojas, flores y de las ramas fueron preparados por maceración con acetona destilada, para ello, ambas partes fueron colocadas en un matraz al que se agregó disolvente y de esta forma permanecieron durante aproximadamente una semana. Posteriormente, el disolvente fue evaporado por destilación a presión reducida y los extractos fueron secados con una bomba de alto vacío. Se realizaron tres extracciones por separado de cada parte de la planta.

Una vez obtenidos los extractos, se realizaron dos placas de Cromatografía en Capa Fina (CCF) en donde se colocó a los extractos de ambas partes, obtenidos en cada extracción. Las placas fueron eluidas en distintos sistemas, una en hexano-acetato de etilo (AcOE) 1:1 y otra en hexano-acetona 1:1. Esto se realizó para elegir un sistema de disolventes adecuado para la separación por Cromatografía en Columna de los extractos.

Fraccionamiento primario del extracto de las partes aéreas:

El fraccionamiento primario de las partes aéreas se llevó a cabo mediante Cromatografía en Columna, la cual fue empacada con sílica gel para Cromatografía en Capa Fina; de acuerdo con lo observado en Cromatografía en Capa Fina, se utilizó como eluyente una disolución formada por hexano-AcOEt de polaridad creciente. De esta columna se obtuvieron 77 fracciones más una obtenida con AcOEt. Las fracciones fueron reunidas de acuerdo al perfil cromatográfico que presentaron y finalmente se obtuvieron 14 fracciones.

Fraccionamientos posteriores:

Las fracciones obtenidas con hexano-AcOEt 95:5 y hexano-AcOEt 9:1 fueron separadas y analizadas por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas, realizada por la técnica de Impacto Electrónico. La fase estacionaria de la columna estaba formada por silica gel y el gas portador utilizado fue N₂. De la separación de la fracción obtenida con hexano- AcOEt 95:5 se lograron identificar 6 compuestos diferentes mientras que de la separación de la fracción obtenida con hexano-AcOEt 9:1 se lograron identificar 6 compuestos distintos.

Las fracciones obtenidas con hexano-AcOEt 85:15 en el fraccionamiento primario fueron separadas mediante Cromatografía en Columna, en donde la fase estacionaria estaba formada por alúmina neutra y la fase móvil era una disolución de hexano-AcOEt de polaridad creciente. De esta columna se obtuvieron 35 fracciones más una que se obtuvo con AcOEt 100%. Después, las fracciones fueron reunidas al tomar en cuenta su perfil cromatográfico, finalmente se obtuvieron 8 fracciones. Posteriormente, estas fracciones fueron disueltas en MeOH para después pasarlas por una columna de carbón activado y de esta forma, eliminar a las clorofilas presentes. Sin embargo, de esta columna, no se logró aislar a ningún compuesto.

Las fracciones obtenidas con hexano-AcOEt 8:2, 7:3 y 6:4 en el fraccionamiento primario, fueron estudiadas por Cromatografía en Capa Fina y se observó que las fracciones estaban compuestas por ácidos orgánicos, por lo tanto, estas fracciones se reunieron y se realizó una metilación de los ácidos por medio de una reacción de esterificación con diazometano, disuelto en éter etílico. Para preparar al diazometano, se utilizó 1 g de N-nitrosometilurea, una disolución de KOH al 40% m/v y aproximadamente 50 mL de éter etílico. La disolución etérea de diazometano fue adicionada a la fracción resultante. Una vez que se llevó a cabo la reacción, la fracción fue evaluada por Cromatografía en Capa Fina para elegir un eluyente adecuado para poderla separar y de esta forma obtener a los ésteres metílicos de los ácidos en la fracción.

Una vez elegido del sistema de elución, la fracción fue separada mediante Cromatografía en Columna Flash, en donde la fase estacionaria estaba formada por sílica gel 230-400 y el eluyente era una disolución formada por hexano-AcOEt 85:15. De esta columna se obtuvieron 43 fracciones las cuales fueron reunidas de acuerdo a su perfil cromatográfico mostrado en placas de CCF y finalmente se obtuvieron 8 fracciones.

La fracción obtenida en la columna del fraccionamiento primario, con un eluyente formado por hexano-AcOEt 95:5 fue separada mediante Cromatografía en Placa Preparativa, la fracción fue colocada en placas preparativas de vidrio en donde el adsorbente era una capa de sílica gel de 2 mm de grosor. Se tomaron 240 mg de la fracción para los que se utilizaron tres placas, la fracción se disolvió en éter dietílico y fue colocada a lo largo de un surco antes realizado. Las placas fueron corridas con una disolución formada por hexano-Et₂O 97:3 y después fueron separadas en fracciones, cada una de ellas fue retirada de forma independiente y posteriormente desadsorbidas con AcOEt. Posteriormente, una de las fracciones resultantes fue separada y analizada mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas en donde se pudieron identificar 2 compuestos diferentes.

Parte de la fracción obtenida en el fraccionamiento primario con hexano-AcOEt 95:5 fue separada en una columna en donde la fase estacionaria era sílica gel para Cromatografía en Capa Fina y la fase móvil era una disolución formada por hexano acetona 96:4.

Resultados:

Extracto:

Al extracto de las flores y hojas se le practicaron 3 pruebas biológicas distintas con el fin de encontrar algún tipo de actividad, estas fueron: actividad atrapadora sobre el radical DPPH, actividad antiinflamatoria inducida con TPA y Peroxidación de lípidos en cerebro de rata con el radical TBARS (la especie reactiva del ácido tiobarbiturico). A continuación, se presentan los resultados:

La prueba de actividad atrapadora sobre el radical DPPH consistió en preparar una disolución del radical DPPH con una concentración de 100 μM , utilizando como disolvente DMSO, después, a esta disolución se le midió su actividad óptica. Posteriormente se prepararon disoluciones del del extracto a diferentes concentraciones, finalmente, se midió la densidad óptica de las disoluciones resultantes a 515 nm. En la siguiente tabla, se presentan los resultados.

Tabla 1: Resultados de la prueba de actividad atrapadora sobre el radical DPPH con el extracto de partes aéreas de la planta:

Pozo	Muestra	Conc. $\mu\text{g/mL}$	D. O. 515 nm	% de reducción del DPPH
1 A-D	DPPH (100 μM)	-	0.655	-
5 E-H	SPELH1	1	0.638	2.59
6 E-H	SPELH1	10	0.593	9.51
7 E-H	SPELH1	100	0.281	57.12

Nota: SPELH1= Extracto de las partes aéreas de la planta.

La prueba de actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido con TPA consistió en inducir un edema en la oreja de ratones con TPA e intentar reducirlo con una disolución del extracto preparada con acetona. A continuación, se muestran los resultados.

Tabla 2: Resultados de la prueba de actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido con TPA:

Muestra	Dosis	Edema (mg)	% de Inhibición
Control	-	16.57 +/- 0.58	-
SPE1HO	1 mg/oreja	5.37 +/- 0.88	65.39 +/- 5.33

Nota: SPE1HO= disolución acetónica del extracto.

La prueba de peroxidación de lípidos en cerebro de rata con TBARS consistió en extirpar el cerebro de varios ratones para poder extraer sus lípidos. Una vez extraídos, se midió la absorbancia a 540 nm de la disolución formada por los

lípidos. Para medir la actividad antioxidante del extracto se indujo el estrés oxidativo con una disolución de FeSO₄ a una concentración de 10 µM. Primero se prepararon varias disoluciones de lípidos extraídos de los cerebros, luego se les agregaron disoluciones del extracto a diferentes concentraciones, después se agregó la disolución de FeSO₄ 10 µM a cada una de las disoluciones, posteriormente, se agregó una disolución de ácido tiobarbitúrico (TBA) y finalmente se mide la absorbancia a 540 nm de las disoluciones, se interpolan los valores de la curva estándar y de esta forma se obtienen las concentraciones de TBARS que se encontraron finalmente en las disoluciones. A continuación, se presentan los resultados obtenidos.

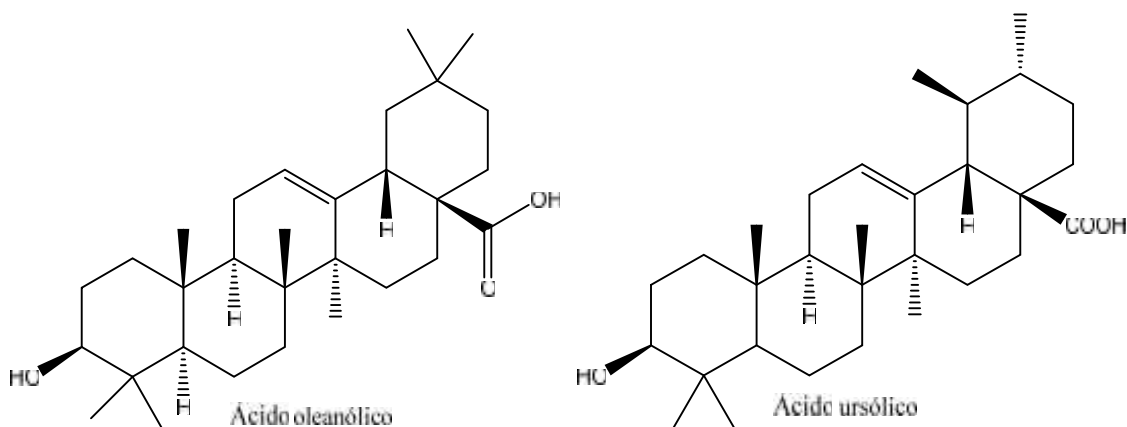
Tabla 3: Resultados de la prueba de peroxidación de lípidos en cerebro de rata TBARS:

Pozo	Muestra	Código	Conc. (µg/mL)	A 540 nm	µM	nmol/mg	% de inhibición
1 A-D	Blanco	-	-	0.000	-	-	-
2 A-D	Basal	-	-	0.014	0.295	0.295	95.99
3 A-D	FeSO ₄ (10 µM)	-	-	0.673	9.017	9.017	-22.74
4 A-D	DMSO	Control	-	0.547	7.347	7.347	0.00
5 A-D	DMSO	-	-	0.547	7.347	7.347	0.00
9 A-D	SPELH1	-	1	0.488	6.573	6.573	10.54
10 A-D	SPELH1	-	10	0.018	0.348	0.348	95.27
11 A-D	SPELH1	-	100	0.013	0.281	0.281	96.17

Nota: SPELH1= Muestra correspondiente al extracto.

Fraccionamiento primario:

De las fracciones obtenidas durante el fraccionamiento primario con una polaridad de hexano-AcOEt 85:15, se obtuvo un compuesto que precipitó en forma de agujas. Al compararlo con referencias obtenidas en otros estudios se pudo observar mediante Cromatografía en Capa Fina que este compuesto correspondía al β -sitosterol. Se obtuvieron 42.5 mg de este compuesto, se sabe se encuentra en varias especies del género *Salvia* y especies relacionadas. A partir de las fracciones obtenidas con hexano-AcOEt 8:2 se obtuvo un sólido blanco que precipitó en grandes cantidades. Al compararlo con referencias obtenidas en otros estudios, se determinó que el compuesto corresponde al ácido ursólico. Fueron pesados 5396.8 mg, aunque se observó que el compuesto todavía se encontraba entre las fracciones. Este compuesto se encuentra ampliamente distribuido en el reino vegetal y comúnmente en plantas del género *Salvia* y de la familia Labiatae.



La fracción obtenida con un eluyente formado por hexano-AcOEt con proporción 95:5 fue analizada por Cromatografía de Gases, acoplada a Espectrometría de Masas. En esta fracción se lograron identificar a 6 compuestos diferentes. Se observa que el compuesto que se encuentra en mayor proporción es el óxido de cariofileno.

El primer compuesto presenta un tiempo de retención de 17.12 min. En el espectro de masas se observa a la señal correspondiente al ion molecular con un m/z de

220. En el espectro se pueden observar señales de baja y mediana intensidad. El pico base corresponde a la señal con un m/z de 43.

El segundo compuesto se obtuvo en un tiempo de retención de 20.48 min. Se puede observar que básicamente aparecen picos intensos lo que indica que durante la fragmentación se formaron iones estables, los picos más intensos se encuentran en 123 m/z , 95 m/z , 81 m/z y 43 m/z . El pico base corresponde al pico con un m/z de 81.

El tercer compuesto se obtuvo en un tiempo de retención de 26.54 min. Se observa que la señal correspondiente al ion molecular tiene un m/z de 286. En el espectro se observan señales de mediana y baja intensidad. Se observa que el pico base tiene un m/z de 286, esta señal es la del ion molecular.

El siguiente compuesto se obtuvo en un tiempo de retención de 31.05 min. En el espectro se puede observar que el ion molecular tiene un m/z de 410 aunque la señal correspondiente es muy pequeña. En el espectro se observan señales de baja o muy baja intensidad, esto indica que muy pocas moléculas del compuesto en la muestra siguieron el patrón de fragmentación descrito por el espectro. Se observa que sólo la señal que tiene un m/z de 69, la correspondiente al pico base, es intensa.

El compuesto siguiente apareció en un tiempo de retención de 33.79 min. Las fragmentaciones observadas en el espectro son demasiado pequeñas, únicamente las señales con un m/z de 430 y de 165 son intensas. La señal correspondiente al pico base tiene un m/z de 165.

Debido a que se obtuvieron buenos resultados con el extracto en la prueba de peroxidación de lípidos en cerebro de rata, la fracción obtenida con hexano-AcOEt 95:5 fue sometida a esta prueba. A continuación, se presentan los resultados:

Tabla 4: Prueba de peroxidación de lípidos en cerebro de rata realizada a la fracción obtenida con hexano-AcOEt 95:5:

Pozo	Muestra	Código	Conc. (µg/mL)	A 540 nm	µM	nmol/mg prot.	% de inhibición
1 A-D	Blanco	-	-	0.000	-	-	-
2 A-D	Basal	-	-	0.059	0.890	0.890	89.61
3 A-D	FeSO ₄ (10 µM)	-	-	0.630	8.452	8.452	1.35
4 A-D	FeSO ₄ +DM SO	Control	-	0.639	8.567	8.567	0.00
11 A-D	SPA1213P B	-	1	0.615	8.256	8.256	3.63
12 A-D	SPA1213P B	-	10	0.555	7.463	7.463	12.90
1 E-H	SPA1213P B	-	100	0.030	0.513	0.513	94.01

Nota: SPA1213PB= Muestra de la fracción obtenida con hexano-AcOEt 95:5.

Una de las fracciones obtenidas con una polaridad hexano-AcOEt 9:1, de la columna del fraccionamiento primario, fue analizada mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas. En el cromatograma se pueden observar 10 señales correspondientes a tiempos de retención diferentes, de aquí, se pudieron identificar 6 compuestos diferentes, se observa que el compuesto que está en mayor proporción es el lupeol.

El primer compuesto aparece en un tiempo de retención de 18.63 min. En el espectro de masas se observa la señal correspondiente al ion molecular la cual presenta un m/z de 220, básicamente se observan señales de mediana intensidad, la señal que presenta un m/z de 43 corresponde a la señal del pico base.

El siguiente compuesto aparece con un tiempo de retención de 39.68 min., presenta un ion molecular con 426 m/z. En el espectro se pueden observar señales con intensidades relativas muy bajas, el ion correspondiente, el pico base tiene un m/z de 218.

El siguiente compuesto surge con un tiempo de retención de 40.16 min. En el espectro se puede observar a la señal correspondiente al ion molecular con un m/z de 426. Al principio de la fragmentación se encuentran señales con intensidades relativas medias y bajas, después se observan señales relativamente altas. El pico base es la señal que tiene un m/z de 43.

Por último, el compuesto siguiente aparece en un tiempo de retención de 40.59 min. El ion molecular presenta un m/z de 412, se observan señales con una intensidad relativa baja. El pico base de esta molécula tiene un m/z de 124.

Esta fracción fue evaluada mediante la prueba de Peroxidación de lípidos en cerebro de rata, sin embargo, no se obtuvieron resultados satisfactorios. A continuación, se muestran los resultados:

Tabal 5: Resultado obtenido con la fracción obtenida con hexano-AcOEt 9:1 en la prueba de Peroxidación de lípidos en cerebro de rata:

Pozo	Muestra	Código	Conc. (µg/mL)	A 540 nm	µM	nmol/m g prot.	% de inhibición
1 A-D	Blanco	-	-	0.000	-	-	-
2 A-D	Basal	-	-	0.008	0.215	0.215	96.68
3 A-D	-	-	-	0.550	7.396	7.396	-13.96
4 A-D	FeSO4 + Vehículo	Control	-	0.485	6.490	6.490	0.00
6 A-D	SPA1922B	-	1	0.485	6.530	6.530	-0.61
7 A-D	SPA1922B	-	10	0.445	6.007	6.007	7.44
8 A-D	SPA1922B	-	100	0.282	3.847	3.847	40.72

Nota: SPA1922B= Muestra de la fracción obtenida con hexano-AcOEt 9.1.

De la misma forma, fueron evaluadas las fracciones obtenidas con AcOEt durante el fraccionamiento primario, se observa que los resultados son parecidos a los obtenidos con la fracción de hexano-AcOEt 95:5. A continuación se presentan los resultados:

Tabla 6: Resultados obtenidos con las fracciones obtenidas con AcOEt en la prueba de peroxidación de lípidos en cerebro de rata.

Pozo	Muestra	Código	Conc. (µM)	A 540 nm	µM	nmol/mg prot.	% de inhibición
1 A-D	Blanco	-	-	0.000	-	-	-
2 A-D	Basal	-	-	0.013	0.285	0.285	95.39
3 A-D	FeSO ₄ (10µm)	-	-	0.535	7.195	7.195	-16.59
4 A-D	FeSO ₄ + DMSO	Control	-	0.458	6.173	6.173	0.00
2 E-H	SPAACOET	-	1	0.423	5.709	5.709	7.50
3 E-H	SPAACOET	-	10	0.399	5.389	5.389	12.70
4 E-H	SPAACOET	-	100	0.048	0.745	0.745	87.94

Nota: SPAACOET= Muestra de la fracción obtenida con AcOEt.

Fraccionamientos posteriores.

Después de haber separado la fracción obtenida con hexano-AcOEt 95:5 mediante cromatografía en placa preparativa, se obtuvo una fracción que fue analizada por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. En el cromatograma se observan cuatro señales correspondientes a 4 tiempos de retención distintos mientras que en esta fracción se encontraron 2 compuestos distintos, uno de ellos, el óxido de cariofileno que se obtuvo en un tiempo de retención de 18.87 min y se encuentra en mayor proporción, se encuentra en la fracción original. A continuación, se describen los espectros de masas de los compuestos nuevos.

El primero de ellos aparece en un tiempo de retención de 19.23 min, en el espectro se observan señales de baja y mediana intensidad. El pico base corresponde a una señal con un m/z de 43.

El siguiente compuesto surge en un tiempo de retención de 29.51 min. En el espectro de masas de este compuesto se observa la señal correspondiente al ion molecular con un m/z de 286, básicamente se observan señales de baja y mediana intensidad, la señal correspondiente al pico base tiene un m/z de 271.

De la columna flash realizada para separar una fracción que fue esterificada con diazometano, precipitó un sólido que fue analizado mediante espectrometría de masas, por espectroscopia de infrarrojo y espectroscopia de resonancia magnética nuclear. A continuación, se describen los espectros correspondientes:

En el espectro de infrarrojo se observa una serie de bandas de absorción entre 800 cm^{-1} , se observa una señal aguda centrada en 1027.83 cm^{-1} , se observa una banda débil que se encuentra en 1644.94 cm^{-1} . Se observa una pequeña banda en 1723.61 cm^{-1} . Se observan dos señales agudas centradas en 2928.72 cm^{-1} y en 2868 cm^{-1} y finalmente se observa una señal ancha en 3352.22 cm^{-1} .

En el espectro de RMN- ^1H se observa un doblete centrado en 0.67 ppm, el cual presenta una constante de acoplamiento de 12.5 Hz e integra para 8. Se observa un singulete en 0.88 ppm el cual integra para 29. Se observa un singulete en 1.05 ppm el cual integra para 2. Se observa un multiplete centrado en 1.24 ppm que integra para 10. Se observa un multiplete centrado en 1.5 ppm el cual integra para 9. Se encuentra un singulete con un desplazamiento de 1.63 ppm y que integra para 3. Se observa que hay un multiplete centrado en 1.83 ppm que integra para 5. Se observa un triplete doble de dobletes los cuales presentan una constante de acoplamiento de 16 Hz, 11.4 Hz y 5.9 Hz respectivamente, esta señal integra para 2. Se presenta un singulete muy intenso en 3.44 ppm que integra para 16, finalmente se observa un multiplete centrado en 3.51 ppm, el cual integra para 1.

En el espectro de masas se puede observar una señal muy pequeña que corresponde a un fragmento con un m/z de 455. Después se observa una señal que se produce por un fragmento con un m/z de 442 m/z . El pico base del espectro es producido por un fragmento con un m/z de 203. También se observa que durante la fragmentación se formó un ion con un m/z que por lo general se produce por un ion propilio.

Análisis de resultados:

En las fracciones analizadas por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas fueron detectados los siguientes compuestos.

1) Óxido de cariofileno

Se observa a la señal correspondiente al ion molecular la cual tiene un m/z de 220, lo que coincide con la masa molecular reportada para este compuesto. La señal que se encuentra en 205 m/z se debe a que, durante la fragmentación, el ion molecular perdió un grupo metilo. El pico base tiene un m/z de 43 m/z lo cual significa que al final de la fragmentación, todas las moléculas correspondientes a este compuesto formaron un ion propilio.

Este compuesto se ha encontrado en el aceite esencial de *Salvia leucantha*. El aceite esencial de esta planta presenta actividad larvicida, actividad antialimentaria y resulta ser altamente tóxico para la especie *Anopheles quadrimaculatus* (Ali A. et. al. 2015). También se ha encontrado en otras especies del género *Salvia*, por ejemplo, en *Salvia deserta* y *Salvia verticillata*, por mencionar algunas (Korolyuk et. al. ,2002, Baikova et. al. 2002) y en el aceite esencial de *Salvia bracteata* (Sefidkon, Hooshidary, Hamzad 2007).

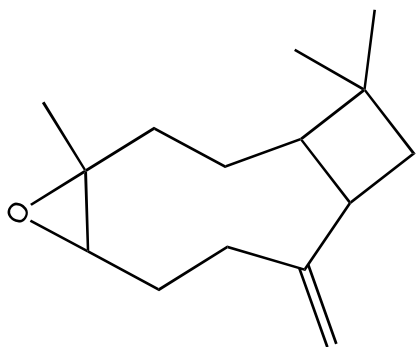


Figura 34: Estructura del óxido de cariofileno.

2) [1R-(1R*,3E,7E,11R*)]-12-oxabicyclo-1,5,5,8-tetrametil-[9,10]-dodeca-3,7-dieno (epóxido de humuleno).

La señal con un m/z 138 indica que durante la fragmentación se llevó a cabo la pérdida de un fragmento de cinco carbonos con dos dobles enlaces, a partir del ion molecular, este fragmento probablemente corresponde a una molécula de isopreno. Finalmente, la señal con m/z 43 corresponde al pico base e indica que

en la fragmentación todas las moléculas que corresponden a esta estructura formaron un ion propilio.

Este compuesto ha sido observado al realizar un estudio de los aceites esenciales de las especies *Salvia deserta* y *Salvia verticillata*, dos especies que crecen en el sur de Siberia (Korolyuk et. al. 2002). Así como en otro estudio en donde fue analizada, por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, la composición de aceites esenciales de quince especies del género *Salvia* que son cultivadas en Novosibirsk, Rusia (Baikova et. al. 2002).

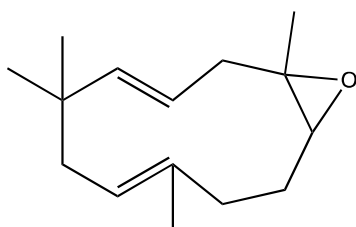


Figura 35: Estructura del [1R-(1R*,3E,7E,11R*)]-12-oxabicyclo-1,5,5,8-tetrametil-[9,1,0]-dodeca-3,7-dieno (epóxido de humuleno)

3) 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol.

En el espectro de masas de este compuesto se observa una señal de un fragmento con m/z 278, el cual corresponde al fragmento M^+-18 , esto indica que el ion molecular perdió al grupo hidroxilo en forma de una molécula de agua. La señal con un m/z de 81 corresponde también al pico base de la molécula, esto significa que todas las moléculas de este compuesto formaron un fragmento de 6 carbonos con dos insaturaciones. Finalmente, la señal con un m/z de 43 muestra que al final de la fragmentación se obtuvieron grupos propilo. Este compuesto también es considerado como un antioxidante por los resultados obtenidos en la prueba de DPPH con los extractos metanólicos y acuosos de *E. odoratum*. (Venkata et. al. 2012).

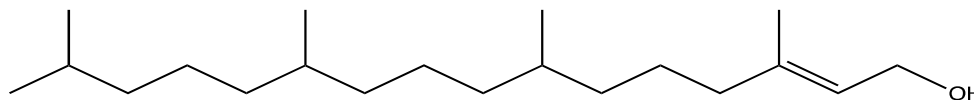


Figura 36: Estructura del 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol

4) Ferruginol

Se observa a la señal del ion molecular con un m/z de 286. Esto coincide con la masa molecular reportada para este compuesto, a su vez, este pico también es el pico base lo que implica que el compuesto forma un ion molecular estable. Se observa una señal que tiene un m/z de 271, lo que demuestra que el ion molecular perdió un grupo metilo, el cual, probablemente formaba parte del grupo isopropilo unido al anillo aromático. Las señales con un m/z de 69 y de 55 corresponden a pérdidas de grupos metilo.

El compuesto se ha encontrado en *Salvia digitaloides*, las raíces de esta planta son utilizadas por los tibetanos para preparar un vino rojo especial (Xu et. al. 2010). Este compuesto también fue encontrado en las raíces peludas de un cultivo preparado de *Salvia sclarea* (Kuzma et. al. 2006).

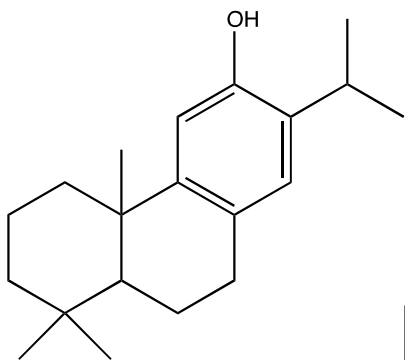


Figura 37: Estructura del ferruginol.

5) 2,6,10,14,18,22-hexametil-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaeno (Escualeno)

En el espectro de masas se observa al pico correspondiente a un m/z de 410 del ion molecular. La señal de 69 m/z se debe a la formación de un fragmento de isobutileno. Esta señal corresponde al pico base, por lo tanto, todas las moléculas de escualeno formaron a este ion. Es importante notar que las pérdidas que se ven en el espectro no son simétricas, aunque la molécula si lo es, esto se debe a las diversas migraciones de dobles enlaces durante la fragmentación (Silverstein et. al. 2005).

El escualeno es el precursor de todos los triterpenos y esteroides (Dewick et. al. 2002), alrededor del 50 % del aceite de hígado de tiburón está formado por

escualeno (Owen et. al. 1997), los aceites de muchas semillas son una fuente rica de escualeno (Dewick et. al. 2002).

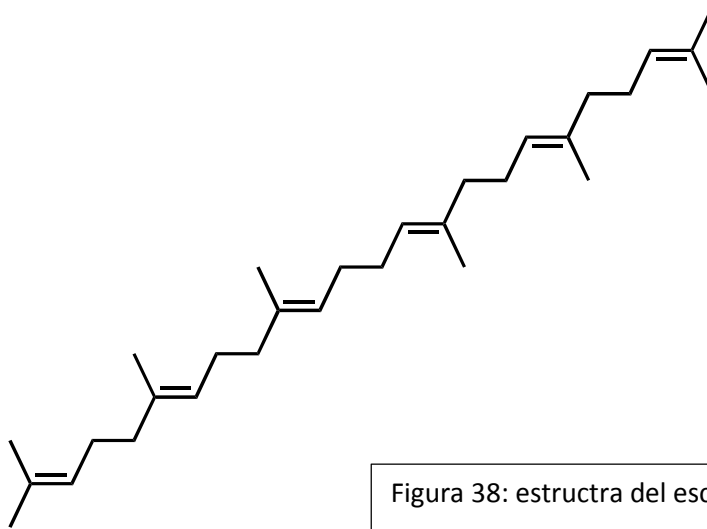


Figura 38: estructura del escualeno

6) Stigmastano-3,5-dieno

Se aprecia que la señal correspondiente al ion molecular se encuentra en 396 m/z, lo que coincide con la masa molecular reportada para esta molécula. Se observa que, durante la fragmentación, hubo una pérdida de 15 m/z lo que corresponde a la pérdida de un grupo metilo de la cadena alifática de 7 carbonos. En el espectro se observa que primero se pierden los sustituyentes de la cadena alifática de 7 carbonos unida al ciclopentilo y posteriormente, los anillos de la molécula se van fragmentando. El pico base de esta molécula se encuentra en 43 m/z lo que significa que todas las moléculas de este compuesto, se fragmentaron hasta formar iones propilo. Este compuesto no se ha reportado en la literatura, aunque puede ser uno de los productos de reducción del stigmasterol.

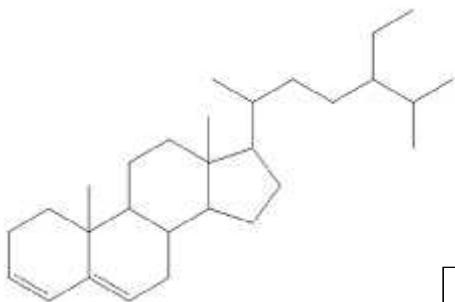


Figura 39: Estructura del stigmastano 3,5-dieno

7) -Tocoferol:

En el espectro de este compuesto, se observa una señal con un m/z de 430 que corresponde al fragmento del -tocoferol. Esta señal también corresponde al pico base del espectro. La señal que tiene un m/z 165 representa al fragmento de la cadena alifática que se encuentra unida al anillo de pirano. Finalmente se encuentra una señal con 43 m/z lo que indica que al final de la fragmentación se formó un ion propilio a partir del fragmento de la cadena alifática del fragmento de tocofenol.

El -tocoferol forma parte de la vitamina E, el rol fisiológico de la vitamina E consiste en inhibir la peroxidación de lípidos *in vivo*, se ha observado que todos los 8 componentes de la vitamina E presentan actividad antioxidante casi en la misma proporción. Debido a lo anterior, se cree que este compuesto presenta actividad antioxidante considerable (Halliwell et. al. 2015).

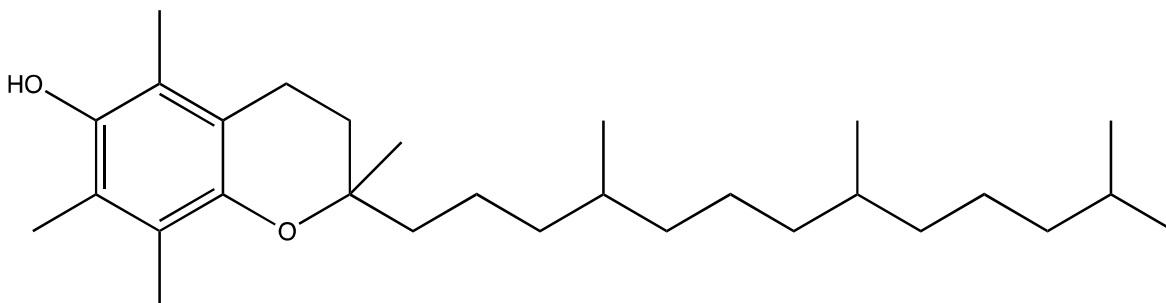


Figura 40: Estructura del α -tocoferol

8) [1ar-(1a , 4a , 7 , 7a , 7b)]-1H-ciclopropilazuleno-7-ol, decahidro-1,1,7-trimetil-4-metileno (espatulenol)

En el espectro de masas de esta molécula, se encuentra la señal del ion molecular con un m/z de 220. Se observa una señal con un m/z 205 lo que indica que se perdió el grupo metilo que probablemente sea uno de los que se encuentra unido al anillo de 5 carbonos. Finalmente, la señal a la que se le asocia un m/z de 43 corresponde a la señal del pico base indica que al final de la fragmentación, las moléculas terminaron siendo un grupo propilio.

El compuesto se encuentra en el aceite esencial de *Salvia leucantha* el cual ha mostrado actividad antialimentaria en contra de dos especies de mosquitos, además de ser altamente tóxico para *A. quadrimaculatus* (Ali et. al. 2015). Este compuesto también se ha encontrado en el aceite esencial obtenido de las partes aéreas de *Salvia bracteata* proveniente de Iran (Sedfikon et. al. 2007). Se ha encontrado también en los aceites esenciales de *Salvia deserta* y *Salvia verticillata* (Korolyuc et. al. 2002) y en los aceites esenciales de muchas otras especies del género *Salvia* como por ejemplo en *Salvia canariensis* y *Salvia moldavica* por mencionar algunas (Balkova et. al. 2002).

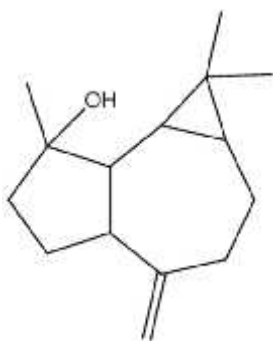


Figura 41: Estructura del espatulenol

9) (4aS-trans)-6-acetoxi-3,4,4 ,9,10,10 -hexahidro-1,1,4 -trimetil-7-(1-metiletil)-(2H)-fenantreno.

En el espectro de esta molécula se observa a la señal que corresponde al ion molecular en 342 m/z sin embargo se observa una señal en 300 m/z lo que indica que durante la fragmentación se perdió el grupo acetato que formaba al grupo éster en la molécula, dejando al fragmento que proporciona al oxígeno de un

alcohol con un hidrógeno adicional, esta señal también representa al pico base por lo tanto, todas las moléculas correspondientes al compuesto perdieron este fragmento. Por último, la señal que está en 43 m/z muestra que al final de la fragmentación se formaron fragmentos correspondientes al grupo propilio. Esta molécula se ha encontrado en el aceite esencial de *Salvia officinalis* (Zhao et. al. 2007).

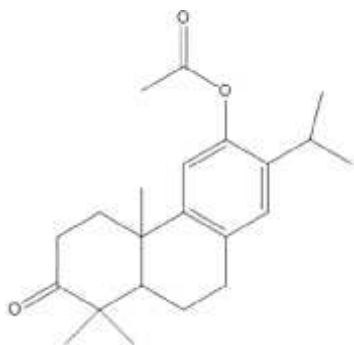


Figura 42: Estructura del (4aS-trans)-6-acetoxi-3,4,4 α ,9,10,10 α -hexahidro-1,1,4 α -trimetil-7-(1-metiletil)-(2H)-fenantreno.

10) -Amirina.

Se observa la señal correspondiente al ion molecular el cual presenta un m/z de 426. La señal que corresponde a un fragmento con un m/z de 218 surgió debido a que probablemente la molécula se partió en dos de tal forma que en cada fragmento quedaron dos anillos con sus respectivos sustituyentes alquilo, un fragmento contiene al grupo hidroxilo y el otro contiene al fragmento del anillo que tiene el doble enlace en la molécula original. La señal que corresponde a un fragmento con un m/z de 69 indica que al final de la fragmentación, se formó un ion de un isobutileno.

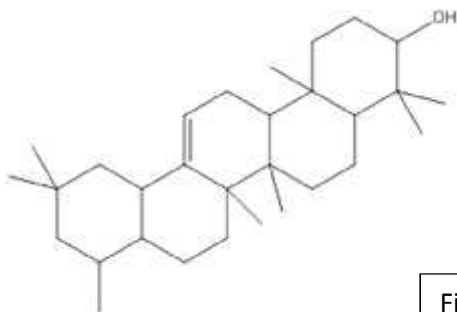


Figura 43: Estructura de la α -amirina

11) Lupeol

En el espectro se puede observar a la señal que corresponde al ion molecular a m/z 426. Se observa una señal que corresponde a un fragmento con m/z de 411 lo que indica que durante la fragmentación se perdió un grupo metilo. Finalmente, la señal correspondiente a un fragmento con un m/z de 43 muestra que al final el fragmento resultante fue un ion propilio. Esta señal también corresponde al pico base lo que indica que todas las moléculas se fragmentaron hasta formar un ion propilio, Este compuesto ha sido encontrado en *Salvia cabulica* (Yasmeen et. al. 2001)

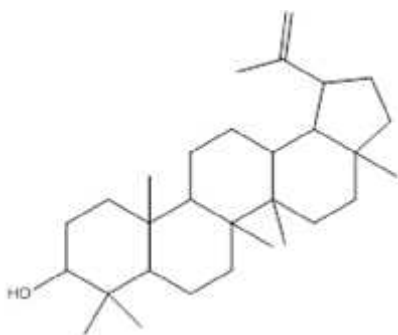


Figura 44: Estructura del lupeol.

12) Estigmastano-4-en-3-ona.

En el espectro de la molécula se observa la señal correspondiente al ion molecular la cual genera un m/z de 412. La señal con m/z 398 muestra que durante la fragmentación se perdió un grupo metilo. La señal que representa un fragmento con un m/z de 43 indica que los fragmentos más pequeños que se formaron fueron grupos propilo. Este compuesto se ha encontrado en las raíces de *Salvia blepharochlaena*, el compuesto mostró muy poca actividad antimicrobiana en contra de una variedad de bacterias (Kolak et. al. 2005).

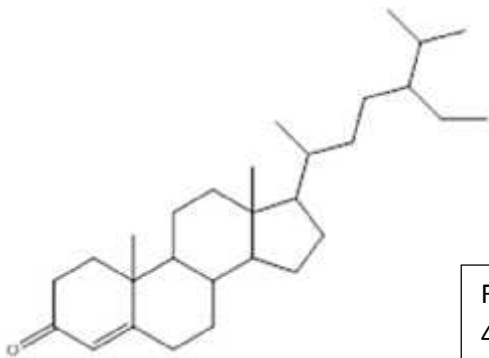


Figura 45: Estructura del Estigmastano-4-en-3-ona

A continuación, se presenta la interpretación de los espectros del compuesto que se obtuvo a partir de la separación de la fracción esterificada con diazometano disuelto en éter etílico:

Espectroscopía de infrarrojo:

Se observa una serie de bandas de mediana intensidad que se encuentran entre 800 cm^{-1} y 1300 cm^{-1} que surgen debido al estiramiento de los enlaces sencillos carbono-carbono. Se observa una señal intensa que se encuentra en 1027.83 cm^{-1} , esta señal se presenta debido al estiramiento del enlace C-O del grupo hidroxilo y del enlace C-O del éster. La señal pequeña que se encuentra 1644.94 cm^{-1} se presenta debido al estiramiento de un doble enlace carbono-carbono, lo que indica que en la molécula hay una insaturación. Se observa una pequeña señal que se encuentra en 1723.61 cm^{-1} , esto debido a la presencia del grupo carbonilo del grupo éster. Se observan dos señales intensas, una en 2868.22 cm^{-1} y otra en 2928.72 cm^{-1} debido al estiramiento de los enlaces C-H. Se encuentra una señal aproximadamente arriba de 3000 cm^{-1} debido al estiramiento C-H en donde el carbono forma parte de un doble enlace, la banda de absorción que se encuentra centrada en 3352.22 cm^{-1} corresponde al estiramiento del enlace H-O de un grupo hidroxilo.

Espectrometría de masas:

En el espectro no se observa la señal correspondiente al ion molecular, sin embargo, se puede observar que hay una señal muy pequeña correspondiente a un fragmento con un m/z de 455, lo cual se debe a que, durante la fragmentación,

el ion molecular perdió un grupo metileno (CH_2). La señal que representa a un fragmento con un m/z de 442 se pudo haber generado debido a que mediante un arreglo de McLafferty, el ion molecular perdió a una molécula de etileno. La señal que es producida por un fragmento con m/z 411 se debe a que hubo iones moleculares que perdieron al fragmento (COOCH_3). En el espectro también se pueden observar algunas señales correspondientes a fragmentos que sufren rupturas como $\text{C}_n\text{H}_{2n-1}$ $\text{C}_n\text{H}_{2n-2}$ lo cual es característico de rupturas de compuestos cíclicos. La señal que representa a un fragmento con 43 m/z indica que al final, se formó un ion propilio.

Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear.

De acuerdo a lo observado en el espectro de RMN se puede decir lo siguiente:

El multiplete que se encuentra en 0.88 ppm se debe al protón que apunta hacia atrás, que pertenece a uno de los carbonos que se encuentran entre los anillos A y B (C5). El singulete que se encuentra en 1.05 ppm es atribuido a la resonancia de los protones de un grupo metilo que se encuentra apuntando hacia delante y está unido a un carbono que une al anillo B y C (C26). El mutiplete que se encuentra en 1.24 ppm se atribuye a los protones de los grupos metilo que se encuentran unidos a un mismo carbono en el anillo A (C23). El multiplete que se encuentra en 1.50 ppm puede ser atribuido a uno de los dos protones unidos a un carbono del anillo B del ácido oleanólico (C7). El multiplete que se encuentra en 1.83 ppm puede ser atribuido a un protón unido a un carbono del anillo E en el ácido oleanólico (C19). Finalmente, el singulete de gran intensidad que se encuentra en 3.44 ppm se debe a la resonancia de los núcleos de los protones del grupo metilo que forma al éster metílico (Seebacher et. al. 2003).

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede afirmar que el sólido que precipitó después de haber esterificado esta fracción corresponde a una mezcla de ésteres metílicos de los ácidos ursólico y oleanólico.

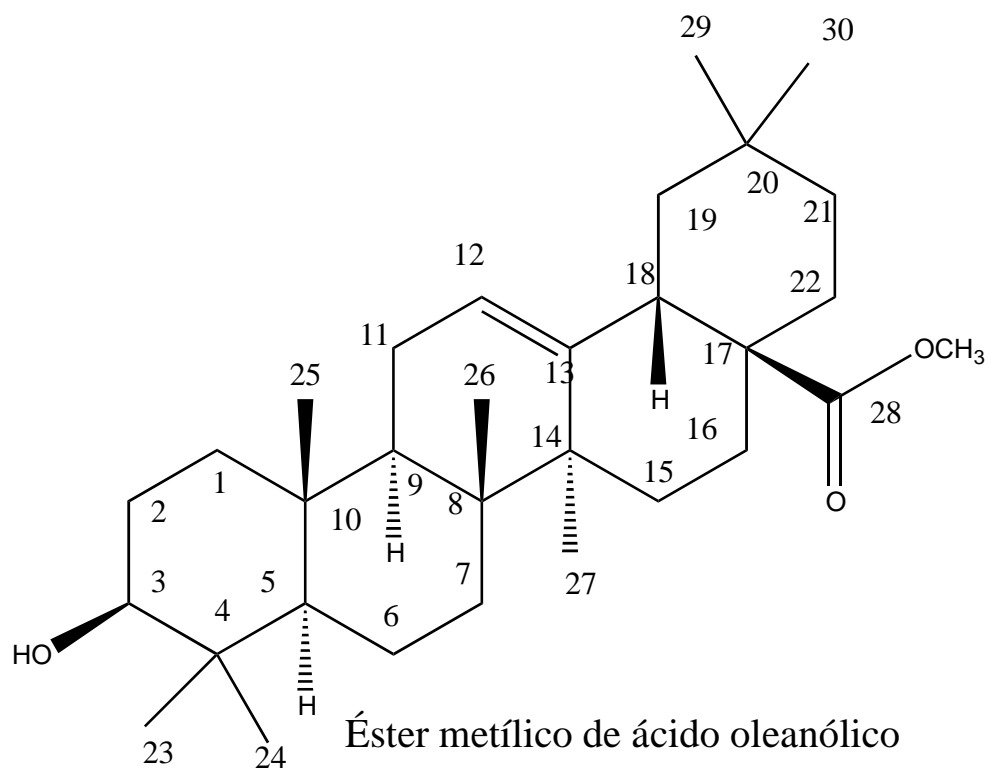


Figura 46: Estructura del éster metílico del ácido oleanólico.

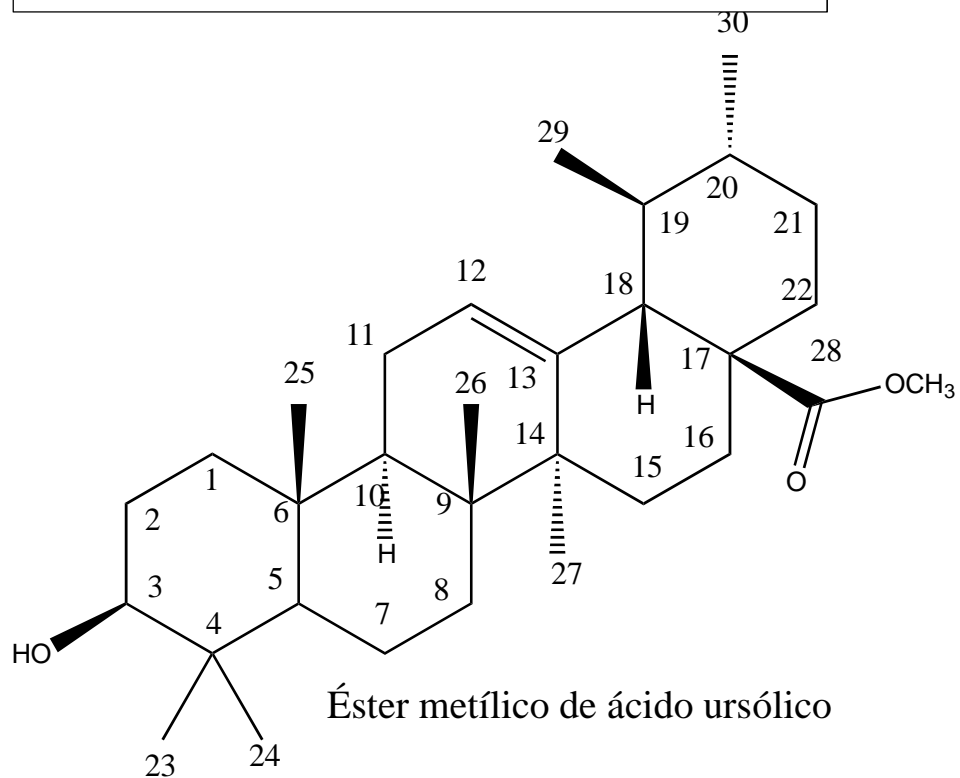


Figura 47: Estructura del éster metílico del ácido ursólico

En cuanto a la determinación de actividad biológica, para los extractos y las fracciones analizadas con este fin, se observa que el extracto de las partes aéreas de la planta presenta una leve actividad antiinflamatoria, lo cual se puede atribuir a la presencia de -Amirina, de ácido ursólico y de ácido oleanólico, compuestos con actividad antiinflamatoria.

En las pruebas para determinar actividad antioxidante se obtienen diversos resultados. Mediante la prueba de atrapamiento del radical DPPH se observa que el extracto presenta poca actividad (a las concentraciones de 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$, el extracto reduce al radical DPPH en un 9.51% y en 57.12% respectivamente), mientras que en la prueba de peroxidación de lípidos de cerebro de rata utilizando al radical TBARS, se obtuvieron resultados bastante favorables debido a que los porcentajes de inhibición resultantes fueron 95.27 % y 96.17 % con las respectivas concentraciones del extracto de 10 y 100 $\mu\text{g/mL}$. De acuerdo con estos resultados, es posible suponer que la presencia de actividad antioxidante no está tan relacionada con la capacidad de las moléculas con esta propiedad para donar un átomo de hidrógeno, sino que se debe a la capacidad del antioxidante para detener al radical utilizado para inducir la reacción de peroxidación de ácidos grasos polinsaturados (como el ácido araquidónico) y de esta forma evitar la formación del malonadehído (MDA), que se forma a partir de la peroxidación de lípidos con cadenas de ácidos grasos polinsaturados con más de dos dobles enlaces (Okhawa et. al. 1979, Herman et. al. 1991) y así, la formación del complejo entre el MDA y el ácido tiobarbitúrico (Herman et. al. 1991, Halliwell et. al. 2015).

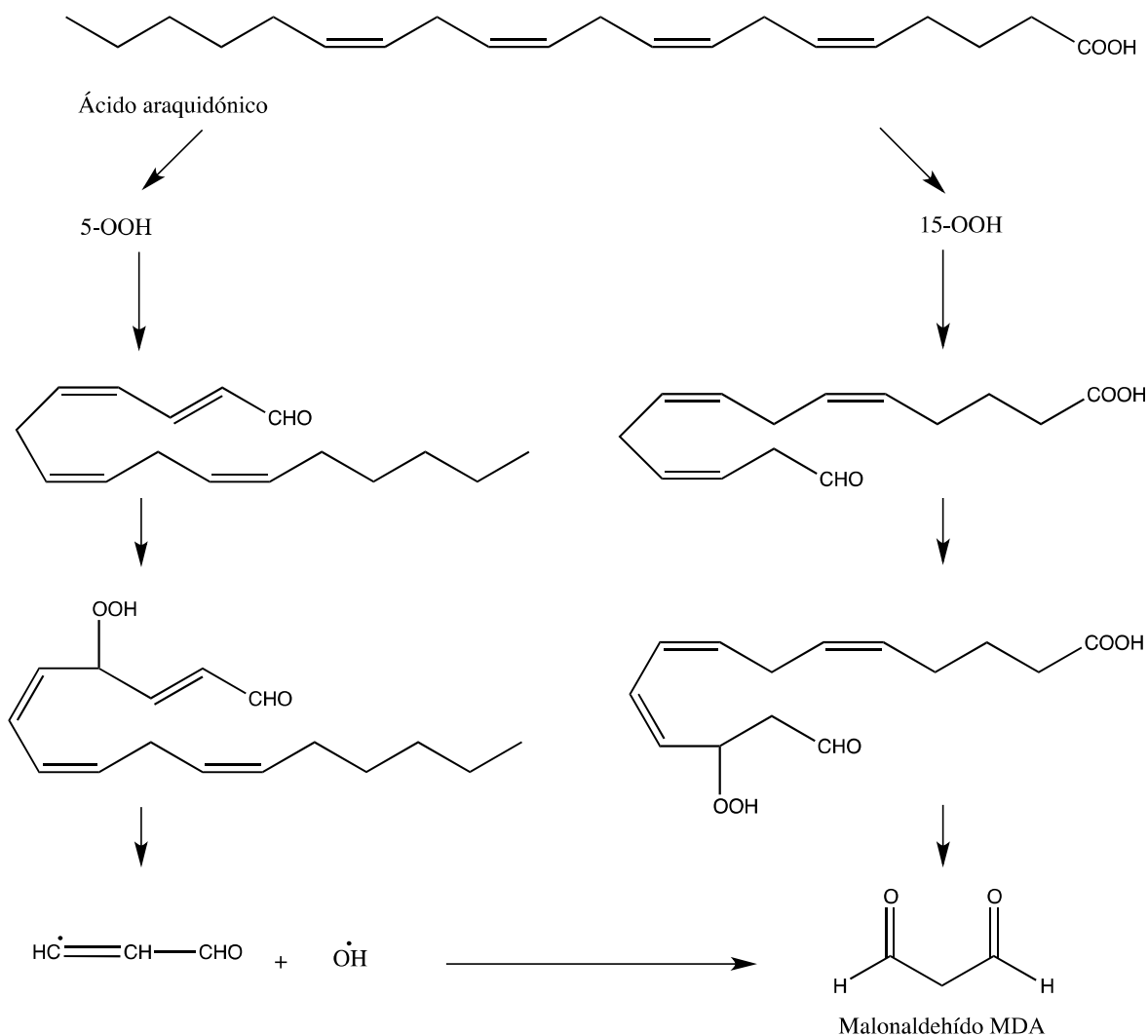


Figura 48: Formación del malonaldehído MDA mediante la peroxidación del ácido araquidónico.

Si se comparan los resultados obtenidos en las pruebas de peroxidación de lípidos en cerebro de rata que se obtuvieron para los extractos de las partes aéreas con los que se obtuvieron para las fracciones de distinta polaridad se observa que estos últimos no fueron tan favorables como en el caso del extracto, sin embargo, no fueron despreciables. Se obtuvo un porcentaje de inhibición 12.90 % y 94.01 % para la fracción obtenida en el fraccionamiento primario con hexano-AcOEt 95:5 a las concentraciones de 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente y un porcentaje de inhibición de 12.70% y 87.94% para la fracción más polar obtenida en el fraccionamiento primario a las concentraciones de 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

respectivamente. Esto nos lleva a pensar que la actividad antioxidante que presenta esta planta se debe a un efecto sinérgico. La presencia de actividad antioxidante en la fracción poco polar se debe a que en esta fracción se encuentran compuestos como el óxido de α -cariofileno, 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol y del α -tocoferol, esto ha sido reportado para la especie *E. odoratum* (Venkata et. al. 2012). Se piensa que la actividad antioxidante observada en el extracto y en una fracción poco polar del extracto acetónico de la planta se debió principalmente a la presencia del α -tocoferol.

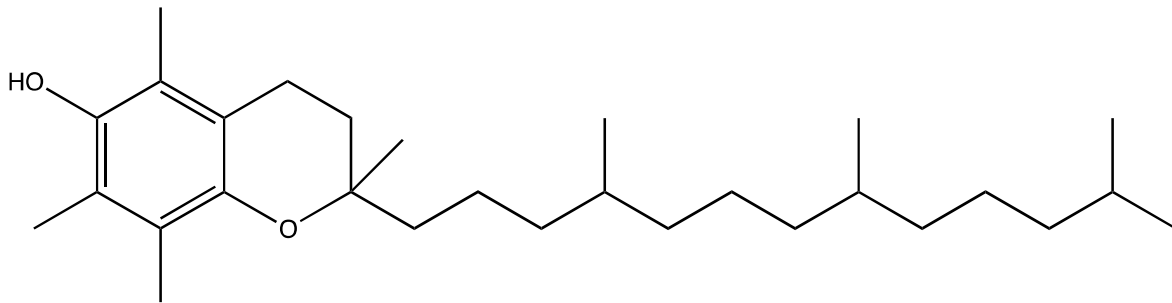


Figura 49: α -tocoferol el principal antioxidante de una fracción poco polar del extracto acetónico de la planta.

Conclusiones:

Al realizar el estudio fitoquímico de la especie *Salvia pannosa* Fernald se pudieron identificar tipos de compuestos que han sido encontrados en especies emparentadas como algunos diterpenoides de tipo abietano como el ferruginol y el (4aS-trans)-6-acetoxi-3,4,4,9,10,10-hexahidro-1,1,4-trimetil-7-(1-metiletil)-(2H)-fenantreno además de diversos triterpenoides de tipo lupano como el lupeol, dammarano como β -amirina, ursano como el ácido ursólico, y oleanano como el ácido oleanólico. Sin embargo, también se observa que la composición química de esta planta es un poco similar a la de una especie de la familia Asteraceae, debido a que se han encontrado compuestos similares en *E. odoratum*.

En cuanto a la actividad biológica de los extractos y las fracciones se puede afirmar que la planta presenta una leve actividad antiinflamatoria debido a la presencia de β -amirina y ácido oleanólico. Tanto el extracto de las hojas de la planta como una de las fracciones poco polares y la fracción más polar obtenidas durante el fraccionamiento primario presentaron actividad antioxidante significativa lo que se debe a un grupo de compuestos que están distribuidos en las fracciones poco polares y polares del extracto acetónico de la planta, si bien, se desconoce cuáles fueron los compuestos con actividad antioxidante que están en las fracciones polares, debido a que quedó fuera del alcance de este estudio, el compuesto al que se le atribuye principalmente la actividad antioxidante observada en la fracción poco polar es al α -tocoferol.

El presente trabajo constituye el primer estudio fitoquímico de la especie *Salvia pannosa* Fernald con lo cual, se aportan datos al perfil quimiotaxonómico de la sección Scorodonia del subgénero Calosface.

Bibliografía:

- Ahkila A., Psni K., Takur R. S., 1991, Biosynthesis of the clerodane furano-diterpene lactone skeleton in *Thinospora cordifolia*, *Phytochemistry*, vol 30, num. 8, 2573-2576.
- Alam N., Bristi M. J., Raffiquzzaman, 2013, Review on in vitro and in vivo methods evaluation of antioxidant activity, *Saudi Pharmaceutical Journal* 21, rev, 9 pags.
- Ali A., Tabanca N., Demirci B., Blythe E. K., Ali Z., Baser J., a. i. Kahan, 2015, Chemical composition and Biological activity of four *Salvia* essential oils and individual compounds against two species of mosquitoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63 (2), 447-456.
- Baikova. Korolyuk E. A., Tkachev A. V., 2002, Compositions of essential oils from some species of *Salvia* L. cultivated in Novosibirsk (Russia), *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 1, 37-42.
- Catchpole O. J., Kramp J. C. von-, Grey J. B., 1997, Extraction of squalene from shark liver oil in a packed column using supercritical carbon dioxide, *Ind. Eng. Chem. Res.* 1997, 36, 4318-4324.
- Cornejo G., Ibarra G., 2011, Diversidad y distribución del Género *Salvia* (Lamiaceae) en Michoacán México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 82 1279-1296.
- Cuevas G., Collera O., García F., Cárdenas J., Maldonado E., Ortega A., 1987, Diterpenes from *Salvia breviflora*, *Phytochemistry*, Vol. 26, No. 7, 2019-2021.
- Dewick P., 2002, *Medicinal Natural Products a Biosynthetic Approach*, 2° edición, Reino Unido, John Willey & Sons, Ltd.
- Esquivel B. Cárdenas J., Ramamoorthy T. P., Rodríguez Hahn L., 1986, Clerodane diterpenoids of *Salvia lineata*, *Phytochemistry*, Vol. 25, No. 10, 2381-2384.

- Esquivel B., Hernández L. M., Cárdenas J., Ramamoorthy T. P., Rodríguez Hahn L., 1989, Further ent-clerodane diterpenoids from *Salvia melissodora*, *Phytochemistry*
- Esquivel B., Méndez A., Ortega A., Soriano García M., Toscano A., Rodríguez Hahn L., 1985, Neo-clerodane type diterpenoids from *Salvia keerlii*, *Phytochemistry*, Vol. 24, No. 8, 1769-1772.
- Esquivel B., Sánchez A. A., Aranda E., 2000, Natural products of agrochemical interest from Mexican Labiatae, *México D. F.*, cap.34, 371-384.
- Esquivel B., Vallejo A., Gaviño R., Cárdenas J., Sánchez A. A., Ramamoorthy T. P., and Rodríguez Hahn L., 1988, Clerodane diterpenoids from *S. melissodora.*, *Phytochemistry* 27, 2903-2905.
- Esterbahuer H., Schaur R. J., Zollner H., 1991, Chemistry and Biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehyde, *Free Radicals in Biology and Medicine*, rev, vol. 11, 37 pags.
- Floyd R. A., 1999, Antioxidants, oxidative stress and degenerative neurological disorders, Copyright © 1999 by the society on Experimental Biology and Medicine, 236-245.
- Halliwell B. Gutteridge J. M. C., 2015, *Free Radicals in Biology and Medicine*, 5^o edición, Oxford University Press.
- Hamilton H. J., Kalu C., Prisck E., Padley F. B., Plerce H., 1997, Chemistry of free radicals in lipids, *Food Chemistry*, vol. 60, Num. 2, 193-199.
- Kashyap D., Singh H., Sharma A., 2016, Ursolic acid (UA): A metabolite with promising therapeutic potential, *Life Science* 146, rev, 13 pags.
- Klein Gebbink E.A., Jansen A., Groot A., 2002, Insect antifedant activity of clerodane diterpenes and related model compounds, *Phytochemistry* 61, rev, 33 pags.

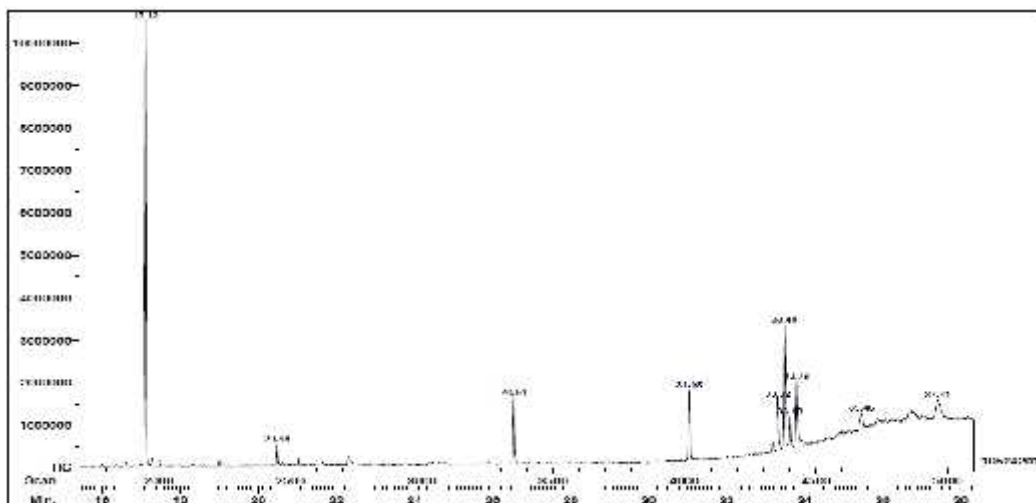
- Kolak, Ufuk, Topcu, Guelacti, Birteksoez, Seher, Oetuek, Guelten, Ulubelen, Ayhan, 2005, Terpenoids and steroids from the roots of *Salvia blepharochlaena*, Turkish Journal of Chemistry, vol. 29, Num. 2, 177-186.
- Korolyuk E. A., Koenig W., Tkachev A. V., 2002, Composition of essential oil of 2 species of the genus *Salvia* L. (*Salvia deserta* Schang and *Salvia verticillata* L.) from the Altai region (Russia), Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya, 1, 43-48.
- Kuzma, Lukasz, Skrzypek, Zuzanna, Wysokinska, Halina, 2006, Diterpenoids and triterpenoids in hairy roots in *Salvia sclarea*, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, vol. 84, num. 2, 171-179.
- Liu J., 1995, Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid, Journal of Ethnopharmacology 49, rev, 12 pags.
- Okhawa H. Ohishi N., Yagi K., 1979, Assay for lipid peroxides in animal tissues by tiobarbituric acid reaction, Analytical Biochemistry, 95, 351-358.
- Ramamoorthy T. P., Eliot M., 1993, Mexican Labiatae evolution, distribution and endemism in biological diversity of México origins and distribution, edited by T. P. Ramamoortthy R. Bye., A. Lot. and J. Fa. Oxford University Press.
- Raman V., La S., Saradhi P., Rao N., Kishna N. V., Sudhakar M., Radhakrishnan, 2012, Antibacterial antioxidant activity and GS-MS analysis of *Eupatorium odoratum*, Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, vol. 5 supp 2, 99-106.
- Reza A., Zare S., Firuzi O., Xiao J., 2015, Bioactive phytochemicals from shoots and roots of *Salvia* species, CrossMark, Phytochem rev.,39 pags..
- Rodríguez Hahn L., García A., Esquivel B., Cárdenas J., 1987, Structure of kerlinic acid from *S. keerlii* chemical correlation with melisodoric acid. Canadian Journal Chemistry 65 2687-2690.
- Santos R.M., Tesis, Estudio Fitoquímico de *Salvia tenorioi* Ramamoorthy, 1996.

- Seebacher W., Simic N., Weis R., Sat R., Kunert O., 2003, Spectral assignments and referens data, complete assignments of RMN-¹H and RMN-¹³C resonances of oleanolic acid, 18 -oleanolic acid, usrolic acid and their 11-oxo derivatives, Magnetic Resonance in Chemistry, vol. 41, 636-638.
- Sefidkon F., Hooshidary F., Hamzad Z., 2007, Chemical variation in the esential oil of *Salvia breacteata* Banks & Soland from Iran, Journal of Essential Oil Bearing Plants, vol. 10, num. 4, 265- 272.
- Silverstein R. M., Webster F. X., Kiemle D. J., 2005, Spectrometric identification of organic compounds, 7 edición, State University of New Yorck, Jonh willey & sons, lid.
- Simonds M. S. J., Blaney W. M., Esquivel B., Rodríguez Hahn L., 1996, Efect of clerodane type diterpenoids isolated from *Salvia* sp. on the feeding behavior of *Spodoptera litoralis*, Pestic. Sci., 47, 17-23.
- Turner B. L., 2009, Resension of the mexican species of *Salvia* (Laminaceae), section *Scorodonia*, Phytologia (August 2009), 91 (2), 256-269.
- Xu, Gang; Yang, Jing, wang, Yuan-yuan, Peng, Li-yan; Yang, Xiang-Wen, Pan, Zheng-Hong, Liu, En- De; Li, Yan; Zaho, Qin-Shi, 2010, Diterpenoid constituents of the roots of *Salvia digitaloides*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, vol. 58 (23), 12157-12161.
- Yasmeen, Shazia, All, Akbar, Zahid, Muhamad, Tareen, Rasool, Bakhsh, Ahmad, Viqar, Uddin, 2001, Chemical constituents of *Salvia cabulica*, Journal of the Chemical Society of Pakistan, vol. 23 (4), 240-242.
- Zhao, Wenjun; Wu, Gao X., Lin; Xiang, Yingmei, 2007, Extration and component analysis of essential oil from *Salvia officinalis*, Zhongcaoyao, vol. 38, num. 1, 28-30.

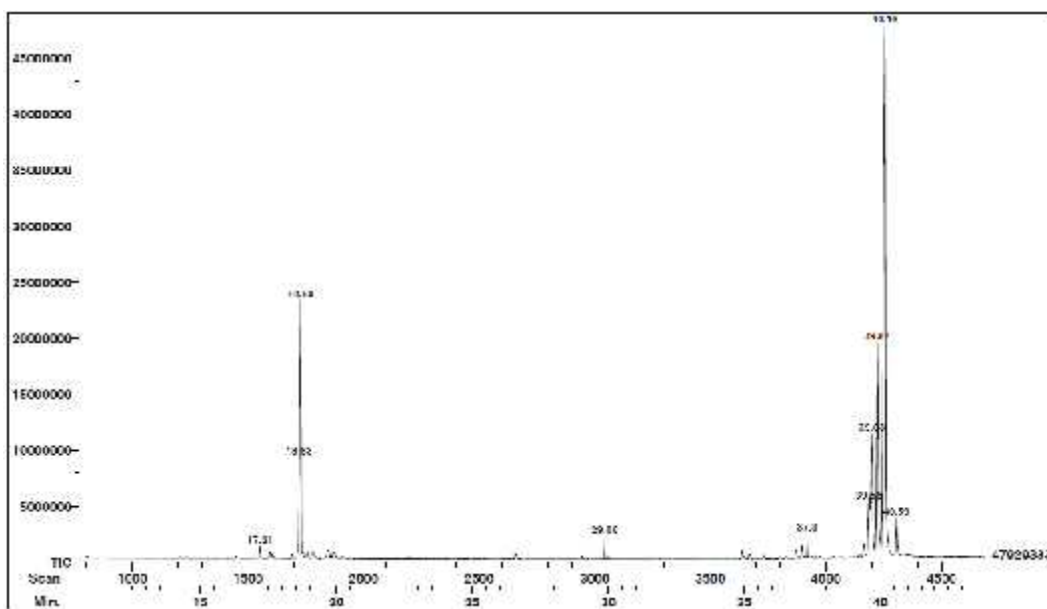
Cromatogramas y espectros.

A continuación, se presentan los cromatogramas obtenidos al analizar a las fracciones por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas:

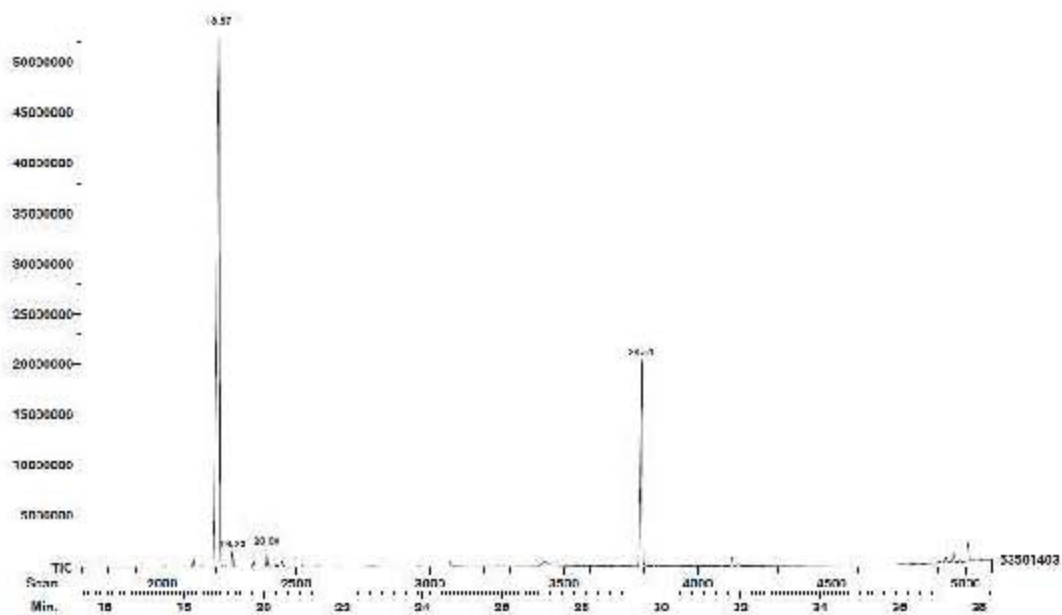
Cromatograma 1: Fracción obtenida con hexane-AcOEt 95:5 en la columna principal:



Cromatograma 2: Fracción obtenida con hexano-AcOEt 9:1 en la columna principal.

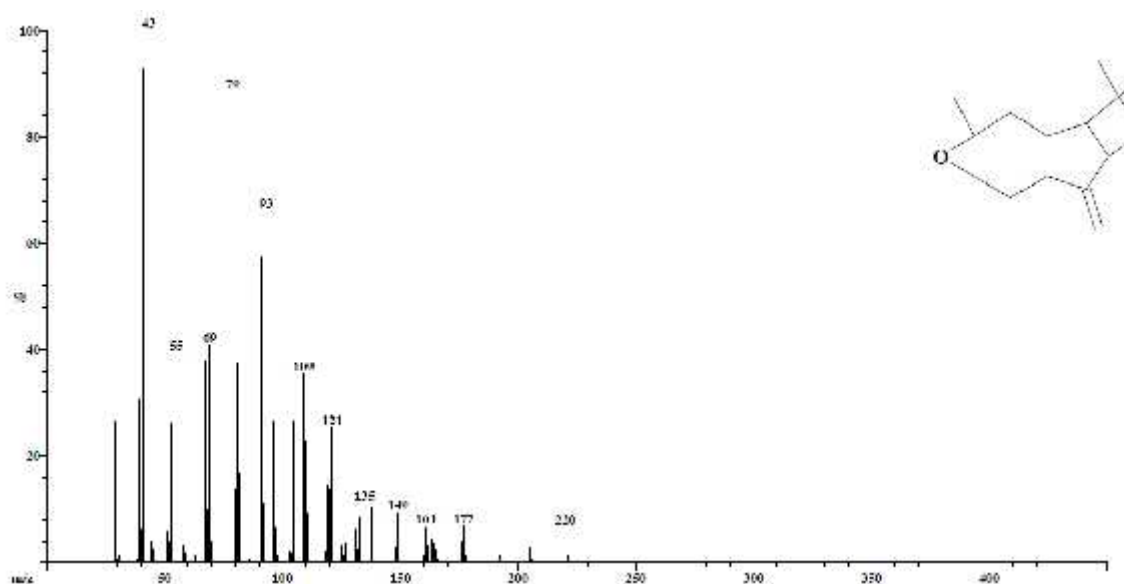


Cromatograma 3: Fracción obtenida con hexano-Et₂O 97:3 obtenida en la separación por cromatografía en placa preparative, de la fracción formada por hexano-AcOEt 95:5 en la columna principal:

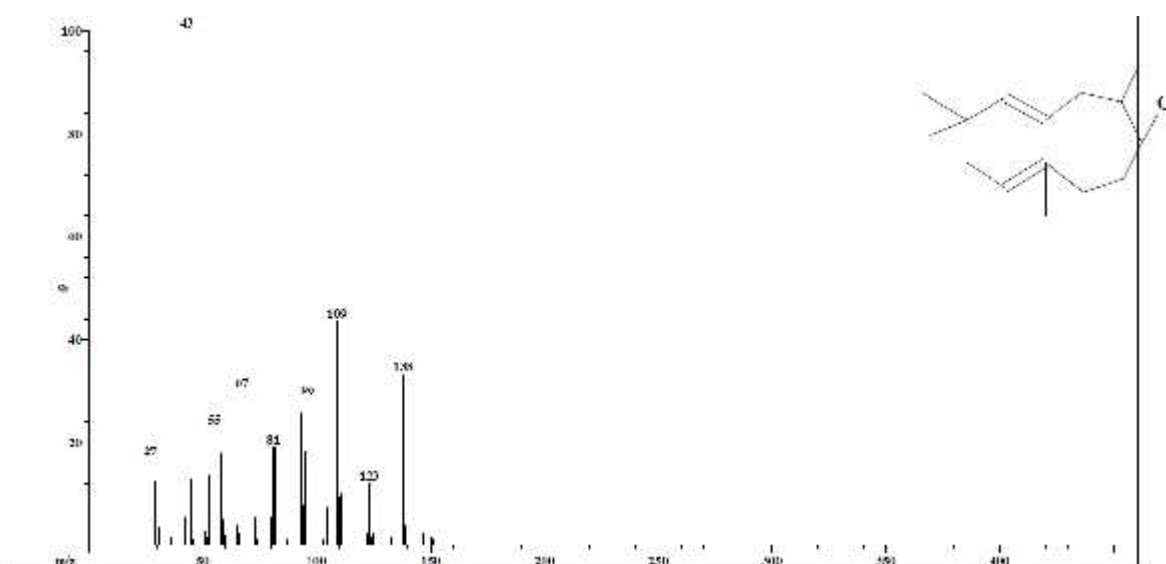


A continuación, se presentan los espectros de masas obtenidos de los compuestos identificados de las fracciones analizadas por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas.

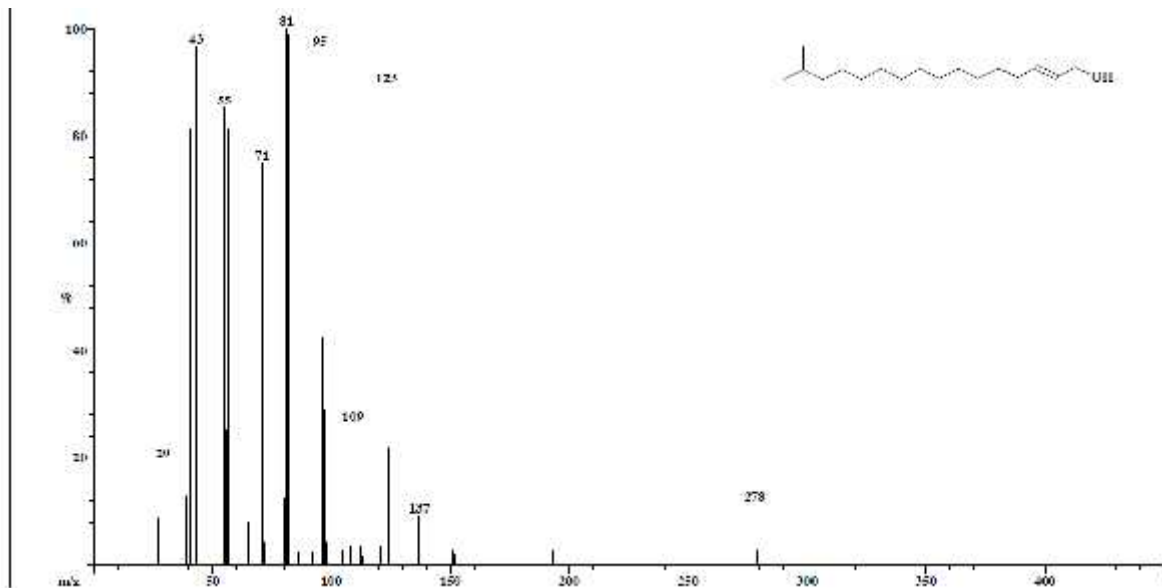
Espectro 1: Espectro de masas de óxido de cariofileno:



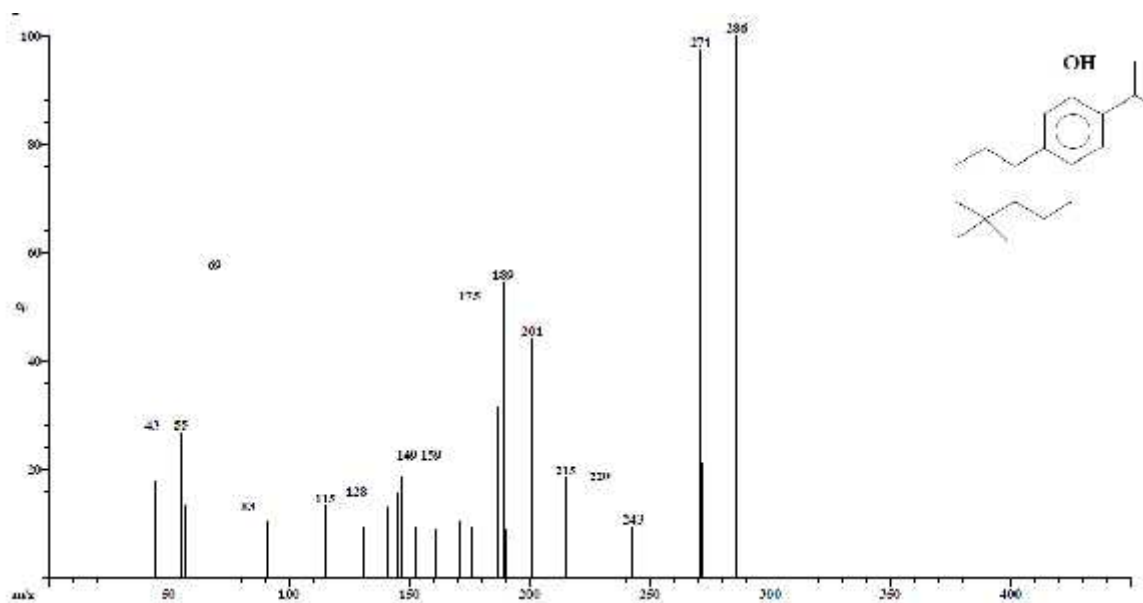
Espectro 2: Espectro de masas de [1R-(1R*,3E,7E,11R*)]-12-oxabicyclo-1,5,5,8-tetrametil-[9, 1,0]-dodeca-3,7-dieno (epóxido de humeleno):



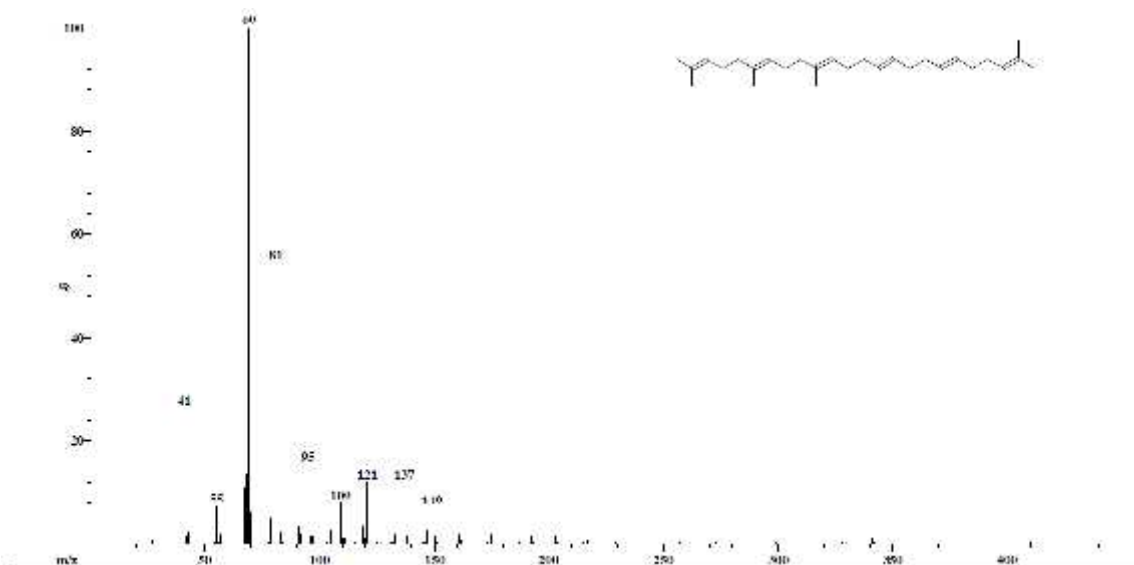
Espectro 3: Espectro de masas de 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol:



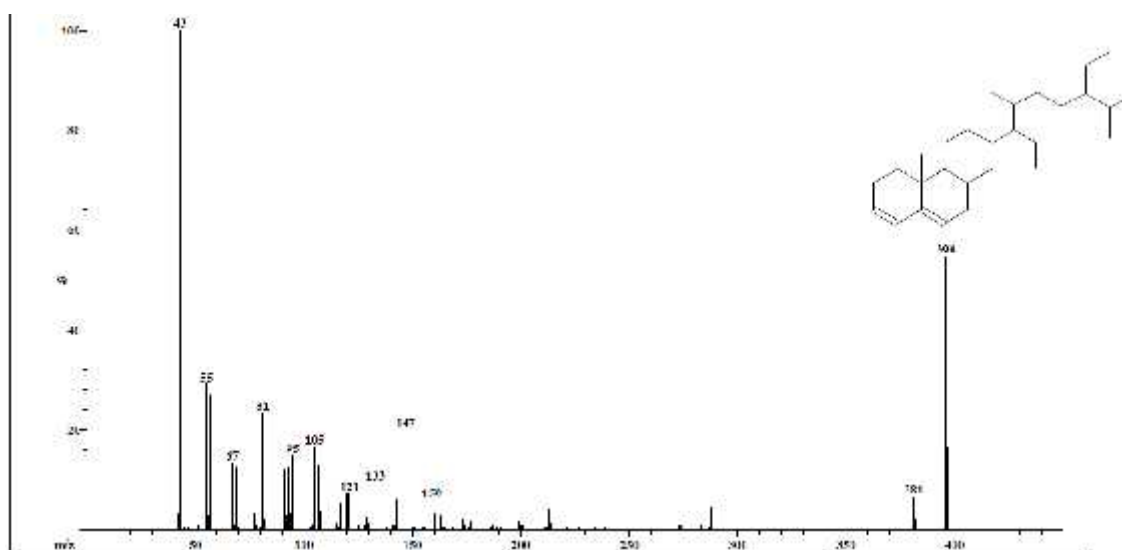
Espectro 4: Espectro de masas del ferruginol:



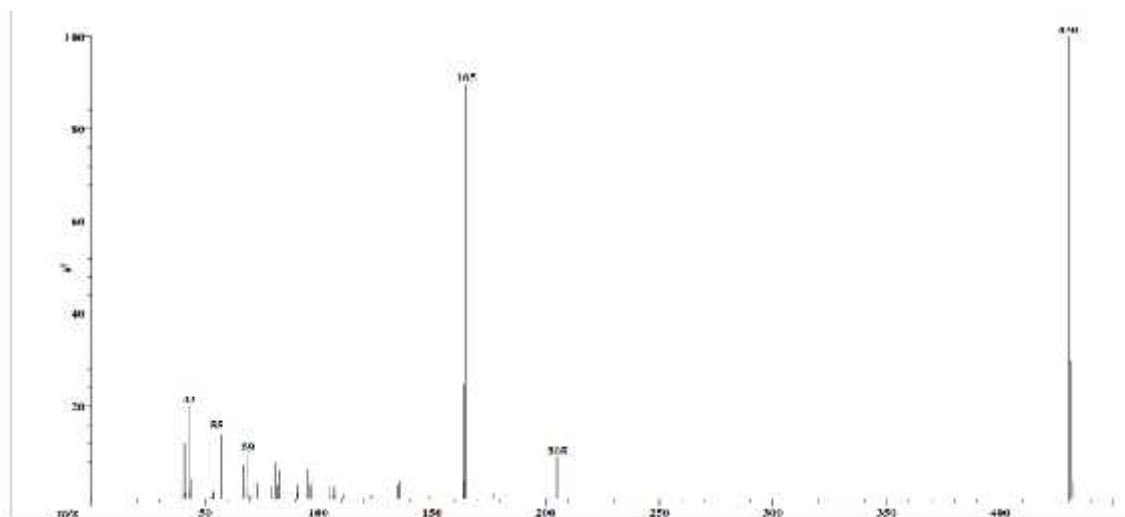
Espectro 5: Espectros de masas del escualeno:



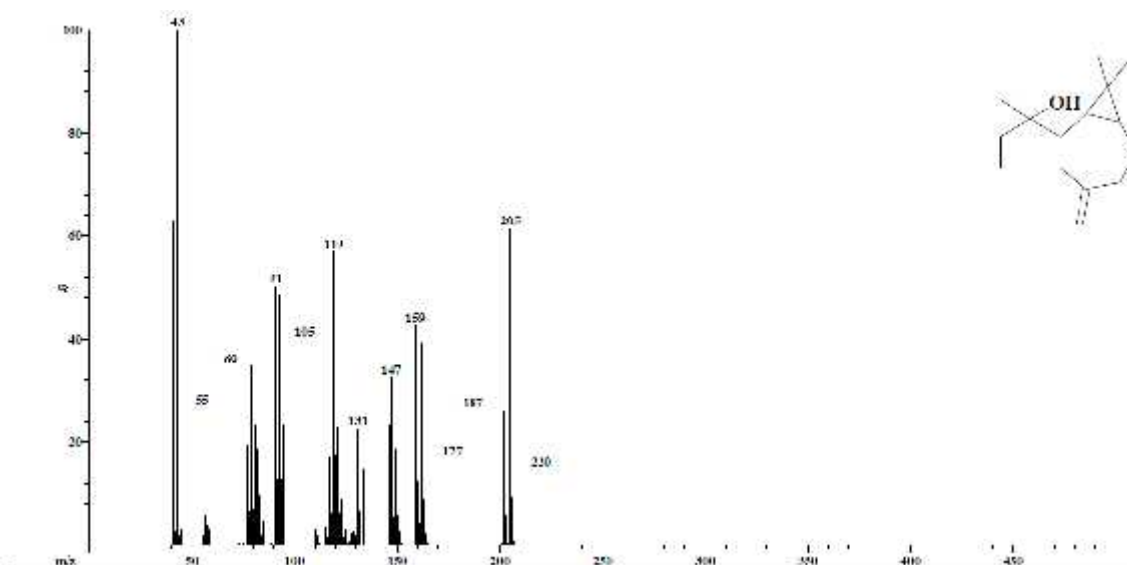
Espectro 6: Espectro de masas de Stigmastano-3,5-dieno:



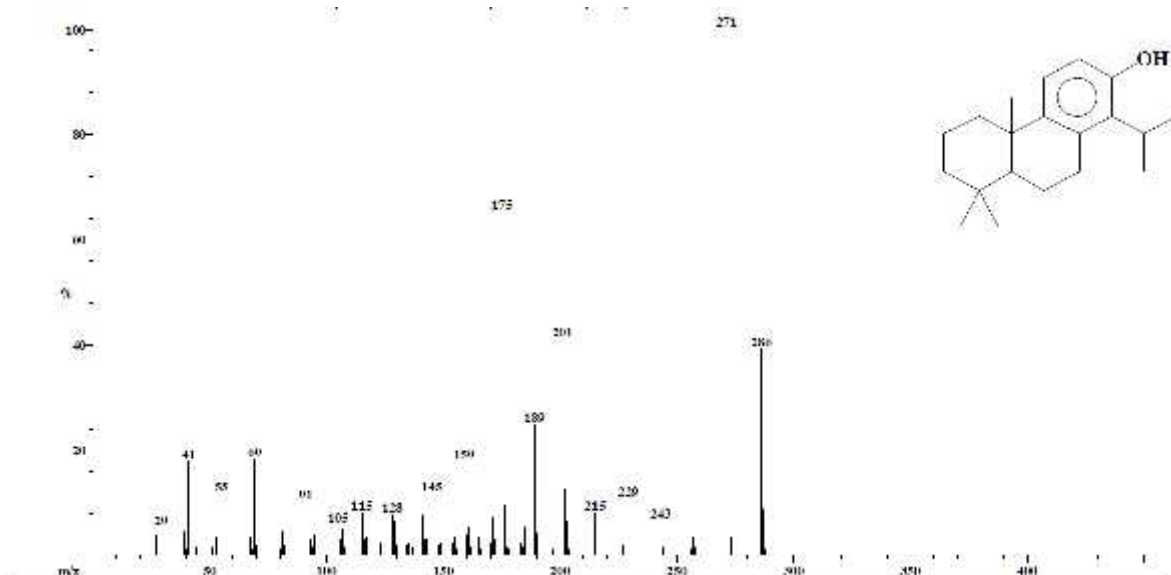
Espectro 7: Espectro de masas del α -tocoferol.



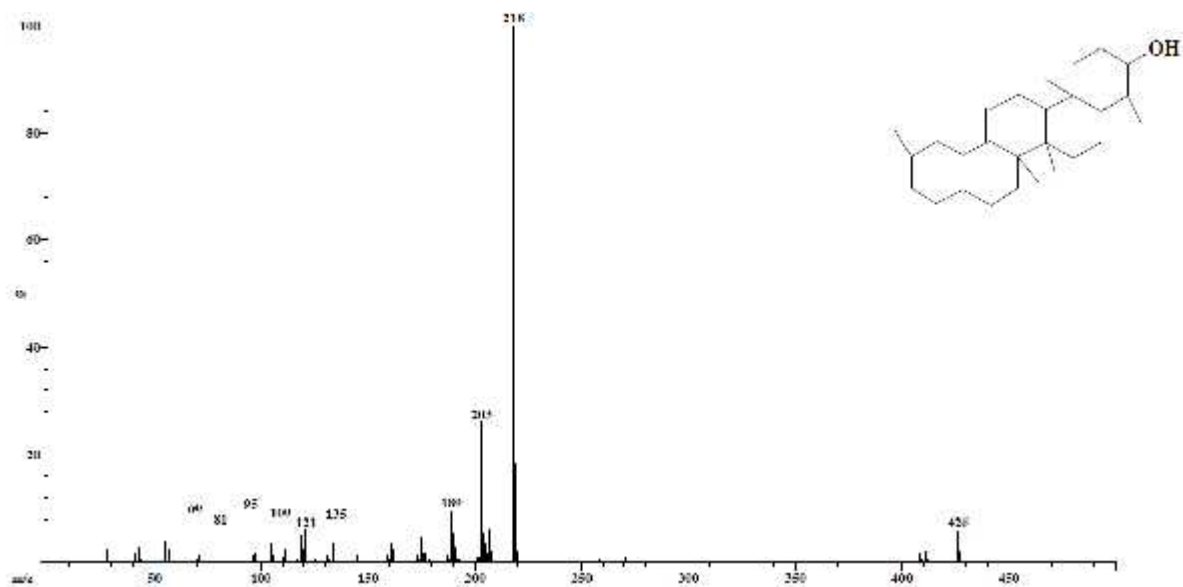
Espectro 8: Espectro de masas del espatulenol



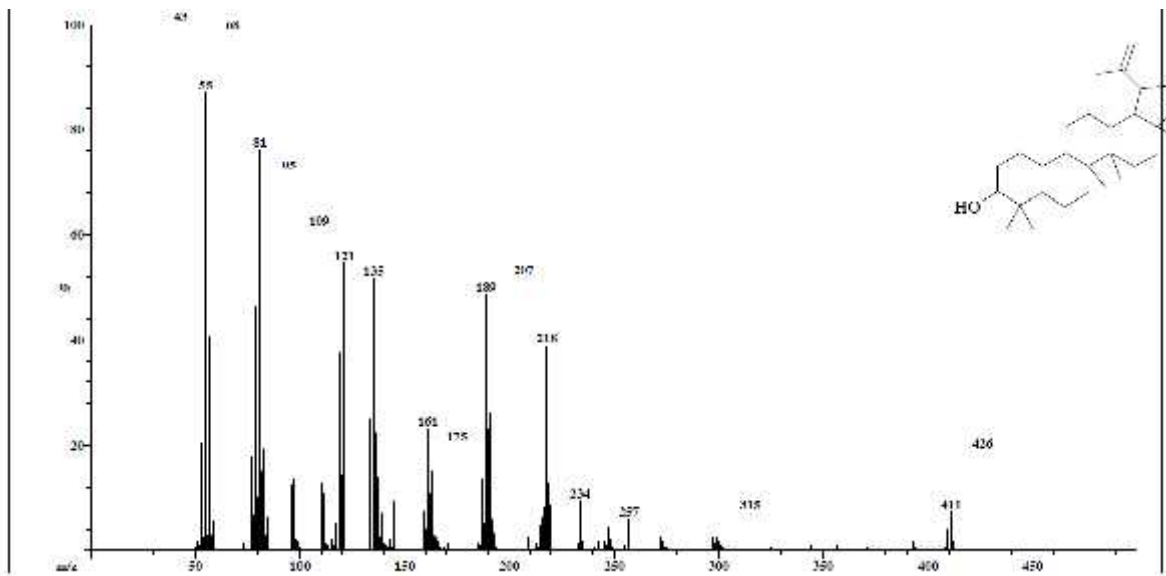
Espectro 9. Espectro de masas de (4a*S*-*trans*)-6-acetoxi-3,4,4a,9,10,10^a-hexahidro-1,1,4^a-trimetil-7-(1-metiletil)-(2*H*)-fenantreno:



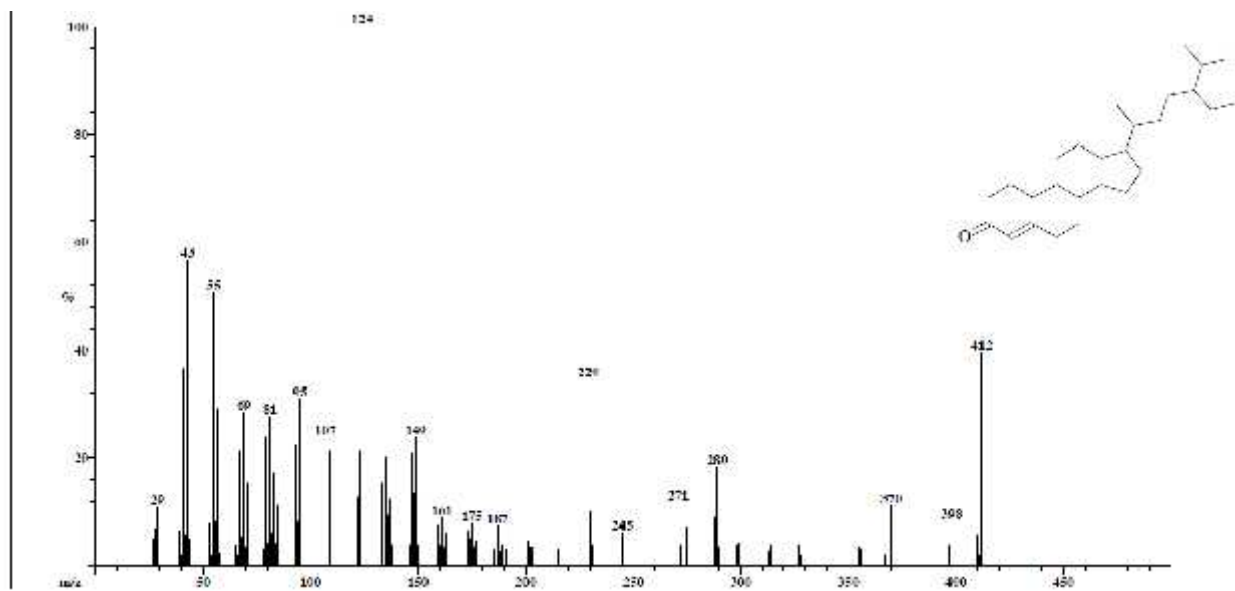
Espectro 10: Espectro de masas de -amirina:



Espectro 11: Espectro de masas de maeas de lupeol:



Espectro 12 Espectro de masas de Estigmastano-4-en-3-ona:



A continuación, se presentan los espectros de IR, RMN-¹H y espectro e masas obtenido para identificar a la mezcla formada por ácido ursólico y ácido oleanólico:

Espectr 15: Espectro de masas obtenido para la mezcla de ácido ursólico/ ácido oleanólico:

