



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**AISLAMIENTO, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA DE LOS
COMPONENTES TERPÉNICOS DE LA ESPECIE *Salvia lasiantha* Benth.**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. VICTORIA JACQUELINE VERGARA GUERRA

M. EN C. BALDOMERO ESQUIVEL RODRÍGUEZ
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO 2018



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.

Presidente: Dr. Leovigildo Quijano

Vocal: Dr. Manuel Jiménez Estrada

Vocal: Dr. Ricardo Reyes Chilpa

Vocal: Dra. Dra. María Yolanda Ríos Gómez

Secretario: Dra. María Isabel Aguilar Laurents

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio 2-9 del
Departamento de Productos Naturales del Instituto de
Química de la UNAM.

Fue presentado en la modalidad de cartel con el título:
“Contribución al estudio fitoquímico de *Salvia lasiantha* Benth”
En el Simposio Interno del Instituto de Química que se llevó a cabo el 15 y 16 de junio del
2017.

Tutor:

M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado durante mis estudios de maestría (No. becario 735831).

A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas por darme los elementos para fortalecer mi formación académica y profesional.

Al Instituto de Química por darme el espacio y los recursos necesarios para la realización de este proyecto de investigación.

A mi tutor, el M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez, por su asesoría y apoyo brindado a lo largo de este proyecto.

A los miembros del jurado, Dr. Leovigildo Quijano, Dr. Ricardo Reyes Chilpa, Dr. Manuel Jiménez Estrada, Dra. María Isabel Aguilar Laurents y Dra. Dra. María Yolanda Ríos Gómez por la revisión, comentarios y correcciones realizadas a este trabajo.

Al laboratorio de RMN de la UNAM: LURMN del Instituto de Química-UNAM, fundado por CONACYT-México (Proyecto 0224747).

A los técnicos académicos del Instituto de Química: Q.F.B. María del Rocío Patiño Maya, Dr. Francisco Javier Pérez Flores, M. en C. Ma. Teresa Ramírez Apan y Dra. Beatriz Quiroz García por la realización de los diferentes análisis requeridos para la culminación de este estudio.

A la Dra. Martha Martínez del Herbario FCME, UNAM por la determinación taxonómica del ejemplar botánico.

A mis padres Guillermo Vergara y Concepción Guerra por todo el amor y apoyo incondicional que siempre me han dado. A mis compañeras del Laboratorio 2-9 Norma A. Pérez y Gabriela V. Ríos por su invaluable amistad y la ayuda brindada.

Contenido

	Abreviaturas	VI
1	Introducción	1
2	Antecedentes	4
2.1	Familia Lamiaceae (Labiatae)	4
2.2	Género <i>Salvia</i>	5
2.3	<i>Salvia lasiantha</i> (Benth)	7
2.4	Terpenoides	10
2.5	Diterpenos	12
2.5.1	Diterpenos Tipo Clerodano	13
2.6	Triterpenos	14
2.7	Compuestos Fenólicos	15
2.8	Flavonoides	16
2.8.1	Flavonas	18
3	Justificación	20
4	Objetivos	21
5	Método	22

5.1	Colecta y Registro del Material Vegetal	22
5.2	Proceso de Extracción	24
5.3	Fraccionamiento Primario	24
5.4	Cromatografía	26
5.5	Elucidación	29
5.6	Actividad Citotóxica	30
6	Resultados y Análisis	31
6.1	Ácidos Oleanólico y Ursólico	31
6.1.1	Caracterización	32
6.1.2	Actividad Biológica	36
6.2	Eupatorina	38
6.2.1	Caracterización	39
6.2.2	Actividad Biológica	42
6.3	Lactona del Ácido Hautriwáico	43
6.3.1	Caracterización	44
6.3.2	Actividad Biológica	48
6.4	Ácido Hautriwáico	51
6.4.1	Caracterización	52
6.4.2	Actividad Biológica	57
6.5	Evaluación Biológica	58
6.6	Comparación Entre Ecotipos de <i>S. lasiantha</i> (Benth)	59

7	Conclusiones	64
8	Referencias	66
9	Anexos	71
A.1	Espectros Ácidos Oleanólico y Ursólico	72
A.1.1	IR	73
A.1.2	RMN- ¹ H	74
A.1.3	RMN- ¹³ C	75
A.1.4	HSQC	76
A.2	Espectros Eupatorina	77
A.2.1	IR	78
A.2.2	RMN- ¹ H	79
A.2.3	RMN- ¹ H + D ₂ O	80
A.2.4	RMN- ¹³ C	81
A.2.5	HSQC	82
A.2.6	HMBC	83
A.3	Espectros Lactona del Ácido Hautriwáico	84
A.3.1	IR	85
A.3.2	RMN- ¹ H	86
A.3.3	RMN- ¹³ C	87
A.3.4	HSQC	88
A.3.5	HMBC	89
A.4	Espectros Ácido Hautriwáico	90
A.4.1	IR	91
A.4.2	RMN- ¹ H	92
A.4.3	RMN- ¹³ C	93
A.4.4	HSQC	94
A.4.5	HMBC	95

Abreviaturas

ATR	Reflexión Total Atenuada (<i>Attenuated Total Reflection</i>)
AcOEt	Acetato de Etilo
C	Carbono
°C	Grados Celsius
CC	Cromatografía en Columna
CCD	Cromatografía en Capa Delgada
CCDP	Cromatografía en Capa Delgada Preparativa
CDCl ₃	Cloroformo Deuterado
COSY	Correlación Homonuclear (<i>Correlation Spectroscopy</i>)
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CHCl ₃	Cloroformo
cm	Centímetros
cm ²	Centímetros cuadrados, unidad de área.
cm ⁻¹	Número de Onda
<i>d</i>	Señal doble/doblete
<i>dd</i>	Señal doble de dobles
<i>dt</i>	Señal doble de triples
D ₂ O	Agua Deuterada
DART	Análisis Directo en Tiempo Real (<i>Direct Analysis in Real Time</i>)
EM	Espectrometría de Masas
FAB (+)	Bombardeo Rápido de Átomos en Modo positivo (<i>Fast Atom Bombardment positive mode</i>)
FT-IR	Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier

H	Átomo de Hidrógeno
HSQC	Correlación Heteronuclear Cuántica Simple (<i>Heteronuclear Simple Quantum Correlation</i>)
HMBC	Correlación Heteronuclear a través de Múltiples Enlaces (<i>Heteronuclear Multiple-Bond Correlation</i>)
IC ₅₀	Concentración Inhibitoria Máxima Media (<i>Half Maximal Inhibitory Concentraion</i>)
J	Constante de Acoplamiento
Kg	Kilogramos
msnm	Metros Sobre el Nivel del Mar
mm	Milímetros
m	Señal múltiple/multiplete
Me	Grupo Funcional Metilo
MeOH	Metanol
MIC	Concentración Inhibitoria Mínima (<i>Minimal Inhibitory Concentraion</i>)
MHz	Mega Hertz
mL	Mililitros
m/z	Relación masa/carga
g	Gramos
OMe	Grupo Funcional Metoxilo
p. f.	Punto de Fusión
ppm	Partes por Millón
q	Señal cuarteto /cuádruple
qd	Señal cuarteto de dobles
R. f.	Factor de Retención
RMN	Resonancia Magnética Nuclear

RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
<i>s</i>	Señal simple/singulete
<i>t</i>	Señal triple/ triplete
<i>td</i>	Señal triple de dobles
TMS	Tetrametilsilano
UV	Radiación Ultravioleta
UV-B	Radiación Ultravioleta, Onda Media.
δ	Desplazamiento Químico
λ	Longitud de Onda
μg	Microgramos
μL	Microlitros
μM	Micromolar

1 INTRODUCCIÓN

Existe una amplia y diversa variedad de sustancias químicas que son producidas por los organismos vivos a las que se les conoce como productos naturales, los cuales pueden presentarse en forma de metabolitos primarios o secundarios. Los metabolitos primarios se encuentran en todo el reino vegetal, mientras que los metabolitos secundarios sólo se encuentran en una especie o grupo de especies relacionadas.¹

Los metabolitos secundarios son compuestos orgánicos cuya función se sabe que en algunos casos es actuar como mecanismos de defensa contra depredadores o con fines de adaptación al entorno. Generalmente, no tienen una función directa en el crecimiento y desarrollo del organismo que las produce.²

En el caso de las plantas, pueden ser producidos en las hojas, el tallo, la raíz o la corteza, dependiendo del tipo de metabolito secundario y no están involucrados en los procesos de fotosíntesis, respiración, asimilación de nutrientes, síntesis de proteínas o en la formación de los metabolitos primarios tales como carbohidratos, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos.¹

Durante muchos años se desconoció la importancia adaptativa que cumplen la mayoría de los productos naturales. Se pensó que estos compuestos eran simplemente desechos metabólicos que carecían de función. Hoy en día se sabe que la capacidad de las plantas de competir y sobrevivir se ve profundamente afectada por las funciones ecológicas de sus metabolitos secundarios ya que:

- Protegen a las plantas del consumo de herbívoros y contra infecciones por patógenos microbianos.¹

- Sirven como atrayentes (olor, color, sabor) para los polinizadores y animales que dispersan las semillas.¹
- Proporcionan soporte estructural para la planta (como en el caso de la lignina).¹
- Funcionan como agentes alelopáticos (sustancias que influyen en la competencia entre diferentes especies de plantas) y simbiosis.¹

El estudio de productos naturales fue iniciado por químicos orgánicos desde la década de 1850, con lo que se impulsó así el desarrollo de técnicas de separación, nuevas metodologías sintéticas y avances en espectroscopia para elucidar estructuras que ahora constituyen el fundamento de la química orgánica contemporánea. El interés en los productos naturales no era puramente académico, sino que se debía a su gran utilidad como tintes, polímeros, fibras, pegamentos, aceites, ceras, agentes aromatizantes, perfumes y fármacos.²

Por otro lado, cuando se suministran estas sustancias en un organismo vivo distinto al que las generó, fue observado que podían provocar algún tipo de efecto específico, esto es, presentar actividad biológica. Por ejemplo, la nicotina, que se encuentra en el tabaco, fue uno de los primeros insecticidas utilizados por los seres humanos y sigue siendo uno de los más eficaces.² (**Imagen 1.**)

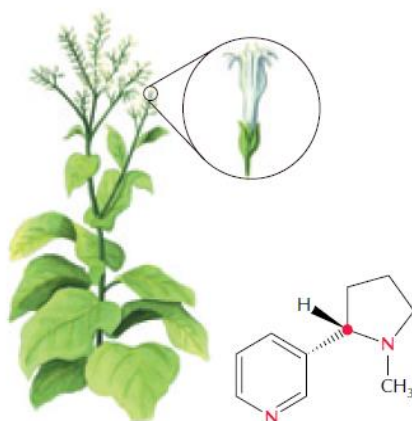


Imagen 1. *Nicotiana tabacum* y la estructura de la nicotina, donde el carbono asimétrico se encuentra marcado con un punto rojo.

(©2000, American Society of Plant Physiologists)

Es importante destacar que el reconocimiento de los muy diversos efectos biológicos producidos por los productos naturales ha llevado a una reevaluación de los posibles roles que estos compuestos juegan en las plantas, especialmente en el contexto de las interacciones ecológicas. Dichas propiedades han promovido el enfoque actual en este campo de la química, incitando la búsqueda de nuevos medicamentos, antibióticos, insecticidas y herbicidas.²

Así mismo, el estudio fitoquímico de las plantas, también es un valioso aporte para la clasificación taxonómica del ejemplar vegetal al determinar sus principales metabolitos secundarios responsables de sus propiedades a través de su perfil químico (que incluye su biosíntesis, extracción, identificación, cuantificación, elucidación estructural, propiedades físicas y químicas).¹

2 ANTECEDENTES

México cuenta con una vasta riqueza florística, siendo uno de los países más biodiversos ocupando el cuarto lugar a nivel mundial con 23 314 especies, después de Colombia (24 000 especies), China (29 000 especies) y Brasil (32 000 especies). También cabe destacar el alto nivel de endemismo de la flora de México con el 49.8%, ocupando el segundo lugar en América y el quinto lugar a nivel mundial, sólo por debajo de Sudáfrica con 20 000 especies nativas.³

2.1 FAMILIA LAMIACEAE (LABIATAE)

Lamiaceae (anteriormente Labiatae) es una de las familias de plantas con flores más vasta de la República Mexicana. Cuenta con 236 géneros y 7 173 especies, esto es, el 13.55% de los géneros y el 8.23% de las especies conocidas en el mundo, de las cuales, se registra un endemismo del 65.82%.⁴

Son generalmente hierbas anuales o perennes, pero también suelen ser plantas sufrútices (leñosas en la base y herbáceas en la zona superior, semejante a un arbusto) y rara vez árboles o bejucos, es común encontrarlos de manera silvestre.⁴ Las especies de esta familia, suelen ser plantas aromáticas, debido a las glándulas que se encuentran en sus células epidérmicas, que producen aceites ricos en terpenos que le confieren propiedades organolépticas y actividades biológicas diversas, tales como antimicrobiana, antioxidante, espasmódica, etc. razón por la cual han sido usadas desde tiempos ancestrales en la medicina tradicional de todo el mundo.⁵

Adicionalmente, es importante mencionar la gran importancia económica de esta familia, ya que muchas especies de sus géneros se usan como condimentos (*Origanum*, *Thymus*, *Mentha*), para obtener aceites esenciales (*Lavandula*, *Pogostemon*, *Salvia*) y/o como plantas ornamentales (*Coleus*, *Salvia*, *Scutellaria*).⁴

Su distribución es subcosmopolita (en casi todas las regiones del mundo), preferentemente en las zonas templadas y principalmente en áreas montañosas como el Eje Neovolcánico Transversal, el Mediterráneo y Asia central.⁴ Los géneros mejor representados de Lamiaceae en México son *Salvia*, *Scutellaria*, *Stachys* e *Hyptis*.⁴

2.2 GÉNERO *Salvia*

La palabra “*Salvia*” proviene del latín *salvare* que significa sanar o seguro y *salvus*, que significa salvo, intacto. Este nombre fue dado refiriéndose al valor medicinal de estas plantas.⁶ Varias especies de este género son notables por el color brillante de sus flores, las cuales son típicamente de rosa a rojo y de azul a morado.⁷

Las especies de *Salvia* se han usado desde la antigüedad en la medicina tradicional para tratar más de sesenta padecimientos diferentes que van desde dolores hasta epilepsia, pero principalmente para tratar resfriados, bronquitis, tuberculosis, hemorragias y trastornos menstruales.⁸ Algunas especies de *Salvia*, también tienen un valor agregado por su comercialización como condimento (*S. sclarea*), como conservador de alimentos, esencialmente para carne y queso debido a sus propiedades antioxidantes (*S. officinalis*) y en la industria de la perfumería y cosméticos (*S. pratensis*).^{7,8}

El género *Salvia* cuenta con cerca de 900 especies con distribución marcada en varias regiones del mundo incluyendo zonas templadas y cálidas en: América Central y del Sur (500 especies), Asia Central/Mediterráneo (250 especies) y Asia Oriental (90 especies).⁹ En

México, el género *Salvia* es el más diverso de la familia Lamiaceae en comparación con otras partes del mundo (**Imagen 2.**) con un registro de 306 especies de las cuales 236 endémicas.⁴

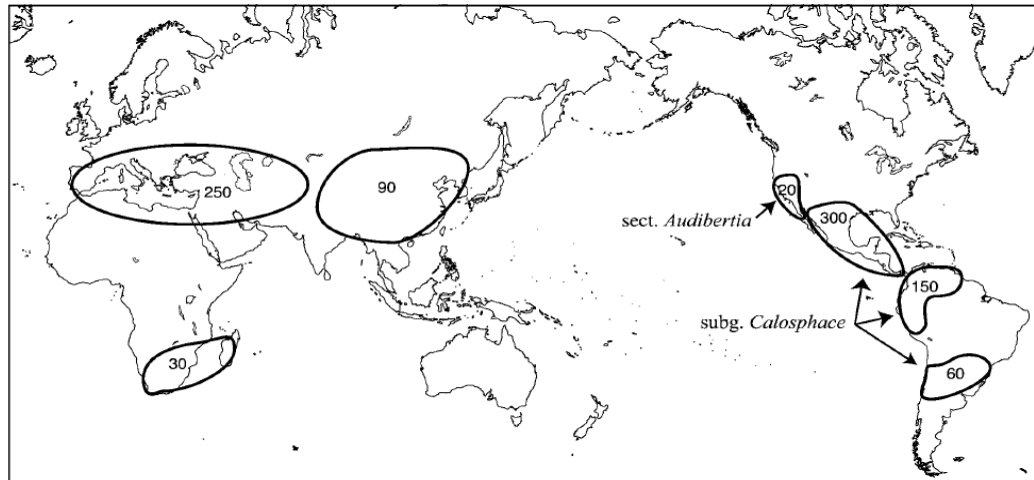


Imagen 2. Diversidad del género *Salvia* en el mundo. Los números indican el número aproximado de especies en cada área.

En 1876, George Bentham agrupó a las especies de este género en cuatro subgéneros: *Salvia*, *Sclarea*, *Leonia* y *Calosphace* (a veces también referido como *Jungia*). Las especies mexicanas de *Salvia* son incluidas dentro del subgénero *Calosphace*, con excepción de 3, pertenecientes al subgénero *Leonia* y alrededor de 20 bajacalifornianas que pertenecen a la sección *Audibertia*⁹ (**Imagen 2**).

Hasta el momento no se ha definido claramente a qué subgénero pertenece esta última sección, ya que está relacionada con especies del Viejo Mundo de los subgéneros *Leonia* y *Salvia*, pero también con las especies americanas del subgénero *Calosphace*. Posteriormente en 1939, Epling dividió al subgénero *Calosphace* en 106 secciones, de las que 61 se encuentran en México y 25 son endémicas del país.⁴

Los metabolitos secundarios más comunes del género *Salvia* son flavonoides, sesquiterpenos, triterpenos y sesterterpenos, sin embargo, los más diversos y característicos son los diterpenos, comúnmente con esqueletos de tipo abietano, icetexano y clerodano que

han mostrado tener actividades biológicas variadas tales como antioxidante, antialimentaria, antimutagénica, antiinflamatoria o propiedades citotóxicas.⁷

Hasta ahora un gran número de diterpenoides tipo abietano y abietanos transpuestos han sido descritos tanto para partes aéreas como raíces de especies de salvias europeas y asiáticas. Por otro lado, más de cien diterpenoides de origen clerodánico han sido aislados de partes aéreas de salvias americanas (subgénero *Calosphace*), así como diterpenoides de tipo abietano e icetexano, pero estos últimos en menor cantidad.¹⁰

Esteroles como el β -sitosterol y stigmasterol también han sido frecuentemente aislados de salvias. Triterpenos con esqueleto derivados del lupano, oleanano, damarano, ursano, lactonas sesquiterpénicas, algunos compuestos fenólicos y alcaloides igualmente han sido ampliamente descritos para este género.¹⁰

2.3 *Salvia lasiantha* (Benth)

Fue por primera vez colectada en la Real Expedición Botánica del Rey Carlos III de España iniciada en 1787, por Sessé y Mociño. Su descripción la realizó el Botánico George Bentham y publicada en su libro *Labiatarum Genera et Species* 276 en el año de 1833.¹¹

Salvia lasiantha es un arbusto de 2 a 3 m de alto, densamente ramificado cuyas ramas y tallos están cubiertos de tricomas. Las hojas son de 2 a 9 cm \times 1 a 5.5 cm de forma ovada o lanceolada. Presenta su época de floración de octubre a febrero con inflorescencias rosas como se observa en la **Imagen 3** e **Imagen 4**.¹¹

Crece en laderas rocosas secas y en selvas caducifolias a una altura entre 1300 y 2300 m sobre el nivel del mar. En México se distribuye en los estados de Chiapas, Colima, Durango Guerrero, Jalisco, Morelos, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Veracruz y Zacatecas.³ También ha sido encontrada en otras partes de América Central como Guatemala y Costa Rica.¹¹

Clasificación taxonómica:

Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Género	<i>Salvia</i>
Subgénero	Calosphace
Sección	Mitratae
Especie	<i>Salvia lasiantha</i>



Imagen 3. *Salvia lasiantha*. (©2014 By John Whittlesey)

En Chiapas es utilizada por grupos indígenas para tratar síndromes de afecciones culturales relacionados con la pérdida del espíritu, que afecta a las personas que han sufrido una fuerte impresión o susto.⁵



Imagen 4. *Salvia lasiantha*. Imagen a la izquierda muestra la ampliación de la flor y hojas (©Anne, CONABIO) mientras que a la derecha se observa el arbusto completo (©1991-2017 Flowers by the Sea.)

En cuanto al perfil químico de *S. lasiantha*, se ha aislado de las partes aéreas β -sitosterol (1), ácido oleanólico (2), lasiantina (3) y dos derivados de la lasiantina (4 y 5), estos tres últimos, diterpenoides de tipo neo-clerodano.^{12,13} Mientras que de las raíces ha sido encontrado salviasperanol (6), un icetexano diterpenoide y carioical (7), un seco-abietano diterpenoide, que fueron caracterizados ambos por comparación de sus propiedades físicas con muestras auténticas.¹⁴ (Figura 1.)

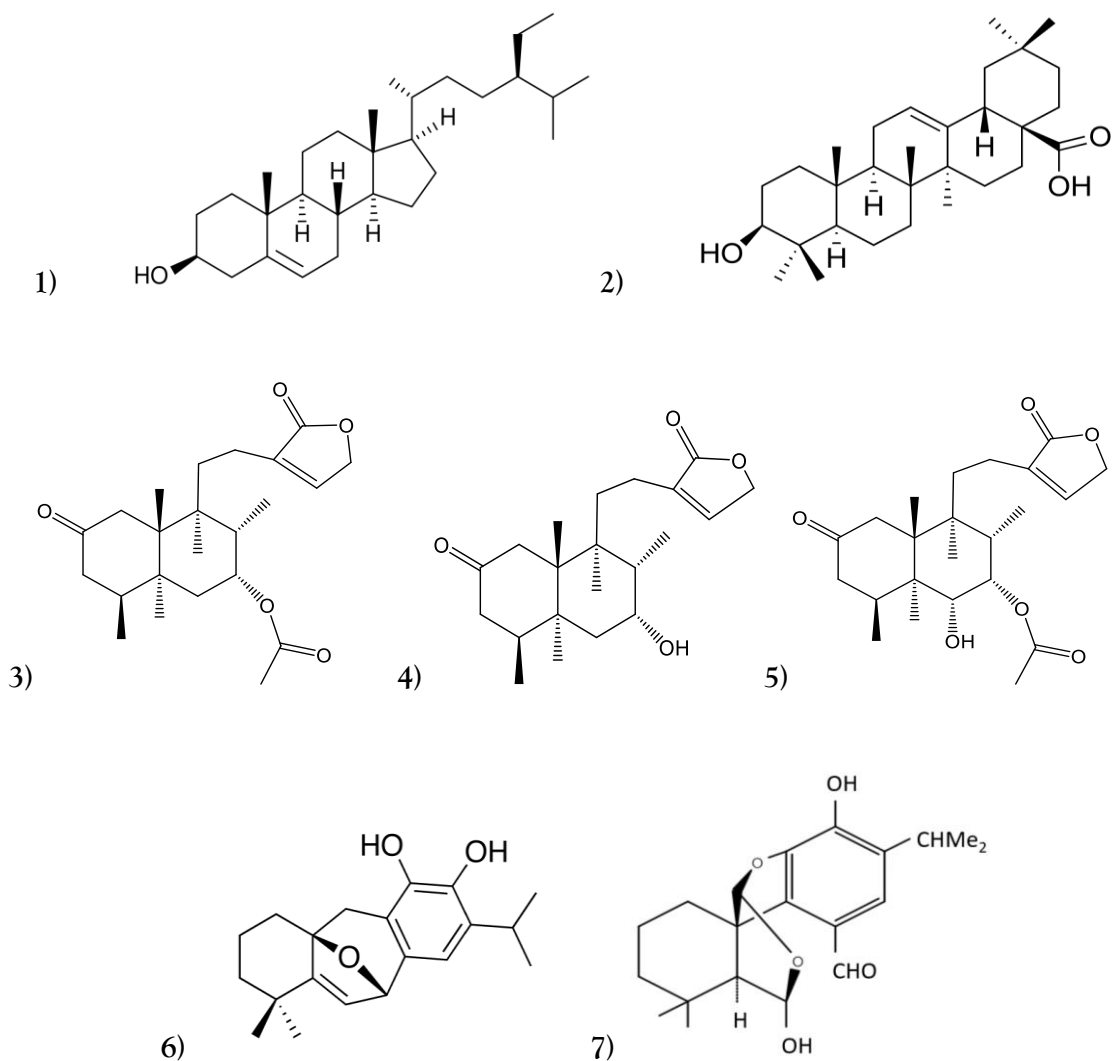


Figura 1. Metabolitos secundarios aislados de las partes aéreas y raíces de *S. lasiantha*. 1) β -sitosterol, 2) ácido oleanólico, 3) Lasiantina, 4) Derivado de lasiantina, 5) Derivado de lasiantina, 6) Salviasperanol y 7) Carioical.

2.4 TERPENOIDES

La palabra terpeno o terpenoide, se deriva del alemán "*terpentin*" cuyo significado en español es trementina o mejor conocido como aguarrás, por el hecho de que los primeros compuestos de esta clasificación de metabolitos secundarios se aislaron de dicha sustancia.²

Los terpenoides, son moléculas generalmente insolubles en agua que constituyen la clase más grande y variada estructuralmente de productos naturales vegetales. A pesar de su diversidad, tienen una característica en general que permite clasificarlos fácilmente y es conocida como la *regla de isopreno*, postulada por Otto Wallach en 1887.¹⁵

Esta regla describe que todos los terpenoides están constituidos a partir de la fusión repetitiva de unidades ramificadas de cinco carbonos, basadas en el esqueleto de isopentano.¹⁶ (**Figura 2.**) Los elementos estructurales básicos de los terpenos son denominados frecuentemente como unidades de isopreno ya que los terpenos pueden descomponerse a altas temperaturas para dar isopreno.¹ Son clasificados según el número de unidades de cinco átomos de carbono que contienen:

Hemiterpenos	5 átomos de C	1 unidad de isopreno
Monoterpenos	10 átomos de C	2 unidades de isopreno
Sesquiterpenos	15 átomos de C	3 unidades de isopreno
Diterpenos	20 átomos de C	4 unidades de isopreno
Sesterterpenos	25 átomos de C	5 unidades de isopreno
Triterpenos	30 átomos de C	6 unidades de isopreno
Carotenoides	40 átomos de C	7 unidades de isopreno



Figura 2. Esqueleto de isopentano (izquierda) e isopreno (derecha).

Existen dos rutas biosintéticas diferentes que producen el principal componente de los terpenos: el difosfato de isopentenilo (IPP). La primera ruta se denomina MEP (fosfato de metileritritol) o DOX (por la 1-desoxi-D-xilulosa 5-fosfato), en la cual, el IPP se forma en los plástidos. La segunda ruta se conoce como MVA (mevalonato) en donde el IPP es producido en el citosol.¹⁵ (Figura 3.)

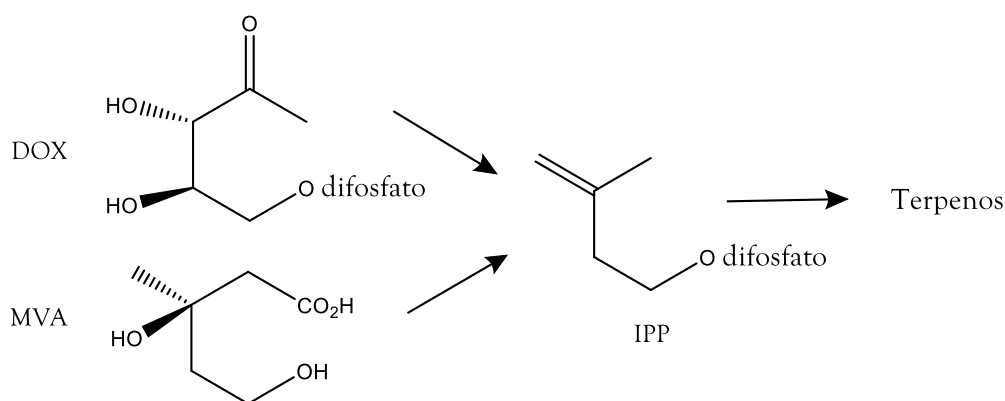


Figura 3. Origen biosintético de los terpenos.

Los terpenos desempeñan importantes papeles defensivos en el reino vegetal ya que a menudo muestran una gran actividad insecticida y/o antialimentaria para muchos insectos y herbívoros.¹⁶ Un ejemplo de esto, son los ésteres monoterpénicos llamados piretrinas, encontrados en las hojas y las flores de especies de *Chrysanthemum* (crisantemo), los cuales tienen un alto efecto insecticida y baja toxicidad para los mamíferos, por lo que son ingredientes comunes en la elaboración de diversos insecticidas comerciales.¹

Por otro lado, muchas plantas contienen en su follaje mezclas de monoterpénos volátiles y sesquiterpenos, llamados aceites esenciales, que se distinguen por tener un olor característico y que pueden ser extraídos mediante destilación. Comercialmente son usados en la perfumería y como saborizantes de alimentos. La hierbabuena, el limón, la albahaca y las salvas son ejemplos de plantas que contienen aceites esenciales.¹

2.5 DITERPENOS

Los diterpenos son un grupo muy variado de compuestos que tienen una estructura básica de 20 carbonos (cuatro unidades de isopreno). No se consideran aceites esenciales debido a sus puntos de ebullición más altos, por lo que se catalogan comúnmente como resinas, esto es, el material que queda después de la destilación del extracto de una planta.¹⁵

Se derivan a partir del difosfato de geranilgeranilo (GGPP), que se forma mediante la adición de una molécula de IPP adicional al difosfato de farnesilo (FPP) de la misma manera que se describe para los terpenoides inferiores.¹⁷ (Figura 4.)

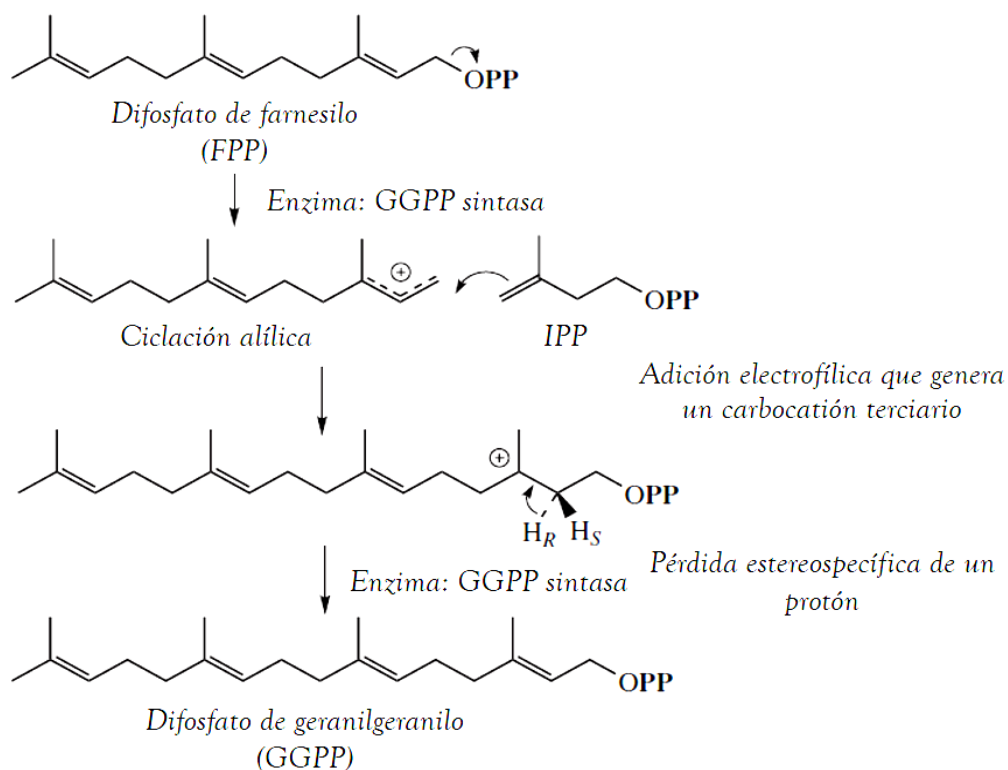


Figura 4. Formación del difosfato de geranilgeranilo (GGPP).

Tanto los diterpenos de tipo clerodano como abietano son formados por la ciclación ácido-catalizada del GGPP para dar estructuras labdánicas.

2.5.1 DITERPENOS TIPO CLERODANO

Los clerodanos son diterpenoides bicíclicos, su esqueleto básico se divide en dos fragmentos: un anillo de decalina (anillos A y B, de C-1 a C-10) unido a una cadena lateral de seis carbonos ramificada como un 3-metilpentilo en la posición 9 (de C-11 a C-16, con C-16 en la posición 13). Los cuatro carbonos restantes (C-17 a C-20) se encuentran como sustituyentes en las posiciones 4, 5, 8 y 9 respectivamente como se ilustra en la **Figura 5**.¹⁸

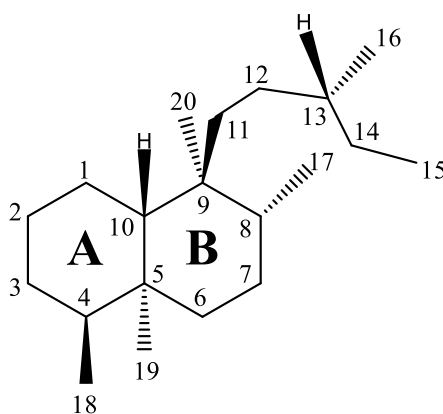


Figura 5. Esqueleto de diterpeno tipo clerodano y su numeración.

Estos compuestos han despertado mucho interés en los últimos años como resultado de las notables actividades biológicas que presentan, particularmente como agentes que modifican el comportamiento alimenticio de insectos considerados plagas fitófagas, como *Spodoptera exempta*, *S. littoralis*, *S. fugiperda*, *Tenebrio molitor*, etc. que causan importantes pérdidas económicas.¹⁹ Varios géneros de la familia de plantas Lamiaceae han sido identificados como abundantes fuentes de clerodanos con estas propiedades.¹⁸

Otro de los efectos más relevantes que presentan, son como los encontrados en la “salvinorina A”, un neo-clerodano diterpénico aislado de la salvia de origen mexicano *Salvia divinorum*, el cual es un potente y selectivo agonista natural *k*-opioides, no nitrogenado y que es considerado para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de

enfermedades como Alzheimer, lo que permite una mejor comprensión de los fenómenos mediados por los receptores opioides, así como proporcionar áreas adicionales para la investigación química.²⁰

Los diterpenos de tipo clerodano también pueden exhibir otras actividades farmacológicas, incluyendo actividad antitumoral, antifúngica, antibiótica, así como hipoglucémico, hipolipidémico y actividad inhibidora de la antitrombina.¹⁸

2.6 TRITERPENOS

Los triterpenos son compuestos comúnmente pentacíclicos cuya estructura base es de 30 carbonos (**Figura 5.**), esto es, seis unidades de isopreno y que se derivan del escualeno. Usualmente son sólidos incoloros de alto punto de fusión y están ampliamente distribuidos entre resinas vegetales, corcho y cutina. Existen varios grupos de triterpenos, incluyendo triterpenos comunes, esteroides, saponinas, esteroles y glicósidos cardíacos.¹⁵

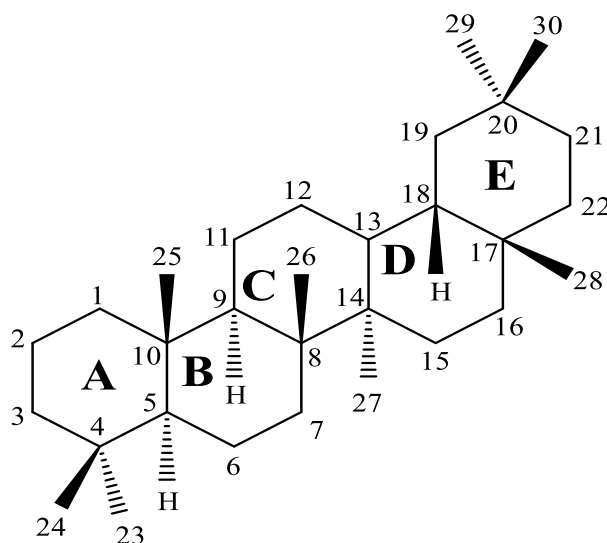


Figura 5. Esqueleto pentacíclico de triterpeno y su numeración.

Entre los triterpenoides más abundantes aislados en casi todas las especies de *Salvia* estudiadas, se encuentran el ácido betulínico, ácido ursólico y ácido oleanólico, correspondientes a los esqueletos de lupano, ursano y oleanano (**Figura 6.**), estos dos últimos, aislados por primera vez en este género de *S. officinalis* L.

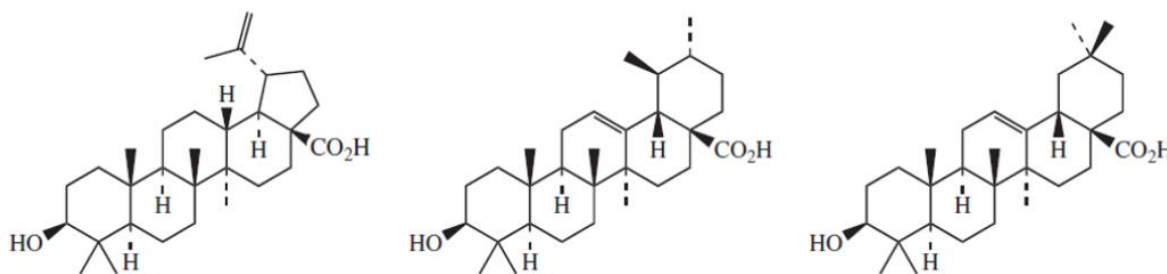


Figura 6. Estructuras del ácido betulínico, ácido ursólico y ácido oleanólico.

Tanto el ácido ursólico como oleanólico exhiben actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, hipolipidémica, antiulcerosa, hepatoprotectora, hipoglucémica y anticancerosa. Mientras que el ácido betulínico presenta actividad antitumoral contra melanoma humano, actividad antiinflamatoria, actividad inhibidora del VIH, entre otras.⁸

2.7 COMPUESTOS FENÓLICOS

Las plantas producen una gran variedad de metabolitos secundarios que contienen grupos fenol, esto es, grupos hidroxilo como sustituyentes en anillos aromáticos (alcoholes aromáticos). Son sintetizados a través de dos rutas metabólicas básicas: la vía del ácido shikímico y la vía del ácido malónico.¹

Existen numerosas categorías de estos compuestos, incluyendo los fenoles simples, fenilpropanoides, flavonoides, taninos y quinonas. Algunos son solubles sólo en disolventes

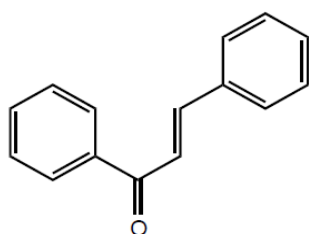
orgánicos, otros son solubles en medios acuosos en combinación con ácidos carboxílicos o glucósidos y otros son grandes polímeros insolubles.¹⁵

Muchos compuestos fenólicos de acuerdo con su diversidad química, tienen papeles importantes en las plantas como defensa contra herbívoros, hongos e insectos.²¹ Otros funcionan como atractores de polinizadores, en la absorción de la radiación ultravioleta perjudicial o en la inhibición del crecimiento de las plantas cercanas competidoras debido a la liberación de estos compuestos en el medio ambiente, a través de hojas y raíces, aumentando así su acceso a la luz, el agua y los nutrientes (alelopatía).²²

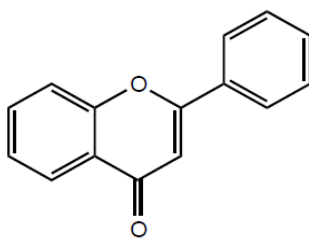
La alelopatía es actualmente de gran interés debido a sus potenciales aplicaciones agrícolas. Por ejemplo, compuestos como el ácido cafeico y el ácido ferúlico, cuando se encuentran en el suelo en cantidades apreciables, han demostrado que inhiben la germinación y el crecimiento de muchas plantas.²³

2.8 FLAVONOIDES

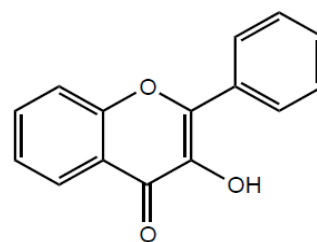
Los flavonoides constituyen una enorme clase de productos naturales fenólicos con gran diversidad estructural, actualmente, se conocen cerca de 3 000 de estos compuestos. Son generalmente solubles en agua y se dividen químicamente en diferentes grupos: chalconas, flavonas, flavonoles, flavanonas, antocianinas, isoflavonas, entre otros.²⁴ (Figura7.)



Chalcona



Flavona



Flavonol

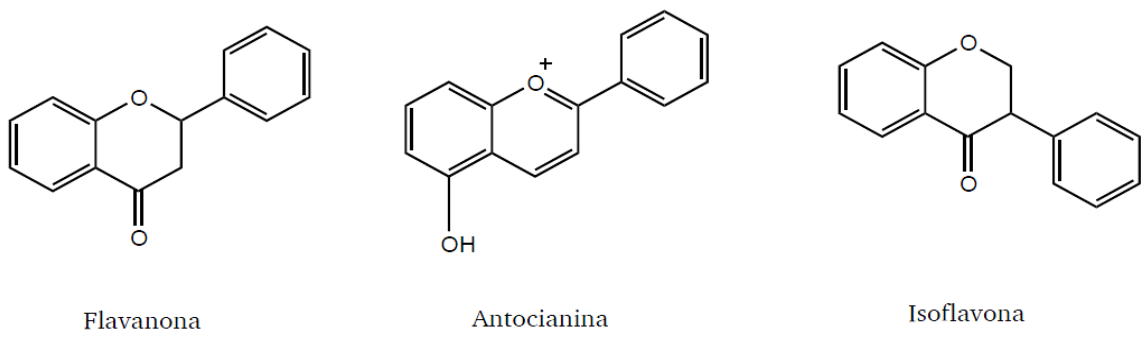


Figura 7. Esqueleto fundamental y clasificación de flavonoides.

El esqueleto básico de un flavonoide consta de 15 átomos de carbono dispuestos en dos anillos aromáticos conectados por un puente de tres carbonos. Esta estructura es el resultado de su origen biosintético mixto a través de la vía del ácido shikímico y la vía del ácido malónico.¹ (Figura 8.)

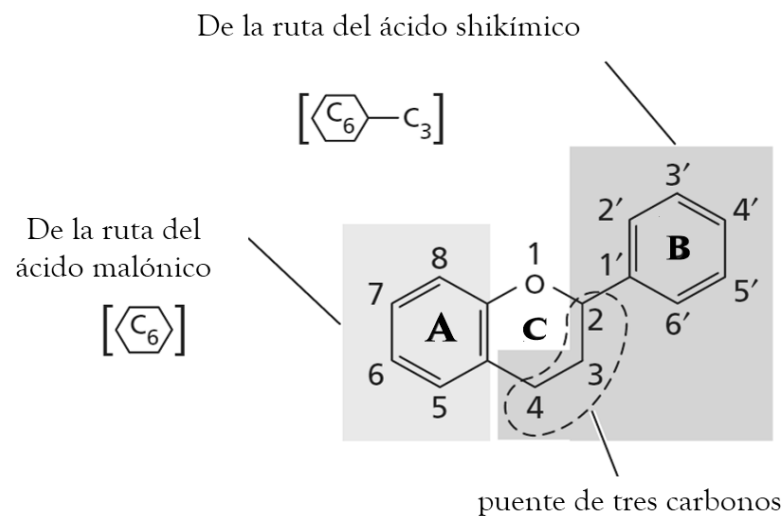


Figura 8. Esqueleto básico de un flavonoide, su numeración y origen biosintético.

Generalmente, los flavonoides se encuentran en las plantas como glicósidos o sustituidos por grupos hidroxilo, que usualmente ocupan las posiciones 3, 5 y 7, aunque también pueden encontrarse en otras posiciones. Otros sustituyentes comunes son grupos metoxilo o unidades isopentilo modificadas.¹

Los diversos sustituyentes les concede que desempeñen funciones diferentes en la planta, incluyendo pigmentación (entre más conjugadas se encuentren estas moléculas, presentarán colores más brillantes, por lo que pueden afectar la polinización estimulando o inhibiendo a los insectos) o como defensa al proporcionar sabores y olores característicos al material vegetal que son organolépticamente desagradables para los rumiantes e insectos (actividad antialimentaria).¹⁵

Muchos de los roles biológicos de estas moléculas están asociados con su capacidad de unirse a metales como hierro y cobre, los cuáles inducen la actividad antioxidante y resistencia a la luz UV. Además, se conoce que los flavonoides presentan actividad antifúngica, bactericida, antiinflamatoria, como agentes anticancerosos, antivirales, antitóxicos y hepatoprotectores.¹⁵

2.8.1 FLAVONAS

Las flavonas y flavonoles (palabras derivadas del latín *flavus*, que significa amarillo) son los compuestos responsables de los colorantes naturales amarillos y/o naranjas, generalmente su producción y acumulación en las plantas se encuentra en las hojas, flores y frutos (partes aéreas) ya que, al estar más expuestas al sol, favorece su síntesis.²⁶

Los flavonoides, suelen absorber la luz a longitudes de onda más cortas que las antocianinas, por lo que no son visibles para el ojo humano. Sin embargo, insectos como las abejas, cuya visión abarca el intervalo del ultravioleta del espectro electromagnético, pueden responder a flavonas y flavonoles como señales atrayentes visuales que presumiblemente les ayuda a localizar el polen y el néctar.²⁵ (**Imagen 5.**)



Imagen 5. *Rudbeckia sp.* (A la izquierda) Vista por los seres humanos, las flores tienen pétalos amarillos y un disco nectarífero café. (A la derecha) Vista como podría parecer a las abejas, las puntas de los pétalos color "amarillo claro", la parte interna de los pétalos "amarillo oscuro" y el disco nectarífero "negro". Se utilizó una iluminación especial para simular la sensibilidad espectral del sistema visual de las abejas. (©2015 Sinauer Associates Inc., by Thomas Eisner.)

Flavonas y flavonoles son dos clases de flavonoides que también protegen las células vegetales de la excesiva radiación UV-B ($\lambda=280-320$ nm) ya que se acumulan en las capas epidérmicas de hojas y tallos, absorbiendo fuertemente la luz en esta región del espectro mientras permiten que las longitudes de onda visibles ($\lambda=400-700$ nm) fotosintéticamente activas, pasen ininterrumpidamente.¹

3 JUSTIFICACIÓN

Estudiar el perfil químico de las plantas ha sido de gran importancia para apoyar la clasificación taxonómica existente. Dicha clasificación, anteriormente se realizaba únicamente de manera morfológica, esto es, a partir de la comparación entre especies de sus características físicas tales como tamaño, tipo de flor, hoja, tallo y raíz.

Por otro lado, los estudios fitoquímicos como el realizado en este trabajo, contribuyen con información valiosa a la quimiotaxonomía, la cual tiene la ventaja de que puede ser exactamente definida, a diferencia de la clasificación morfológica. Dichos estudios consisten en aislar los metabolitos secundarios de una especie vegetal para posteriormente caracterizarlos y con base en la comparación con los aislados de otra especie, determinar si existe una relación entre ambas.

Otro de los motivos que impulsa a la realización de este tipo de investigación, es la búsqueda de metabolitos secundarios que presenten cierto tipo de actividad biológica. El estudio de los productos naturales derivados de plantas utilizadas en la medicina tradicional, se basa en la necesidad de encontrar compuestos clave en el desarrollo de medicamentos que presenten mayor eficacia y disminuyan o anulen los efectos adversos de los que se encuentran actualmente en el mercado.

Si bien la especie *S. lasiantha* ya ha sido trabajada con anterioridad, los análisis llevados a cabo, se realizaron utilizando muestras de ejemplares colectados en distintas condiciones, tanto geográficas como temporales y dado que se ha demostrado que el metabolismo secundario de las plantas es dependiente de estos factores, se infiere que la composición química puede ser diferente.

4 OBJETIVOS

Objetivo general.

Contribuir al conocimiento químico del género *Salvia*, mediante el estudio fitoquímico de *S. lasiantha* proveniente de San Bartolo Teontepec, Puebla., al aislar mediante técnicas cromatográficas sus principales metabolitos secundarios.

Objetivos particulares.

Realizar aportes a la composición química de las salvias mexicanas a través del aislamiento de metabolitos secundarios que pudieran ser usados como indicadores quimiotaxonómicos del género *Salvia* y que ayuden a una clasificación sistemática de la especie *S. lasiantha*.

Identificar y establecer la estructura molecular de los compuestos obtenidos mediante técnicas espectroscópicas (RMN, FT-IR), espectrométricas (EM) y sus propiedades físicas (punto de fusión). En caso de que los compuestos aislados ya sean conocidos, se buscará contribuir a los parámetros de elucidación estructural publicados.

Efectuar una amplia búsqueda de información sobre la variedad de estudios de actividad biológica que existen para los componentes que se aislen y complementar la información existente con otros estudios no reportados.

Hacer por primera vez la comparación entre los metabolitos secundarios aislados de ejemplares de *S. lasiantha* originarios de diferentes regiones (encontrados en investigaciones previas), contra los resultados de este trabajo.

5 MÉTODO

5.1 COLECTA Y REGISTRO DEL MATERIAL VEGETAL

Los datos de la colecta se muestran en la siguiente ficha (**Figura 9.**), así como la ubicación en el mapa donde se realizó. (**Imagen 6.**)

Datos de la colecta			
Nombre científico:	<i>Salvia lasiantha</i>	Familia:	Lamiaceae
Región:	San Bartolo Teontepec, Puebla.	Altitud:	2020 msnm.
Ubicación:	Brecha 8 Km noreste de San Bartolo Teontepec, Puebla.		
Coordenadas:	Latitud 18° 28' 15.5" N Longitud 97° 35' 40.6" O		
Tipo de Vegetación:	Matorral de 2 a 3 m de alto, densamente ramificado.		
Color de Flor:	Rosa	Suelo:	Ladera rocosa
Abundancia:	Escasa	Tipo:	Perenne
Fecha colecta:	26 de septiembre del 2015.		
Nombre del colector:	M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez.		

Figura 9. Ficha de datos de la colecta para el Herbario FCME.



Imagen 6. Ubicación en el mapa del sitio de colecta del material vegetal. (©2017 DigitalGlobe, Google Earth.)

La preparación del herborizado, consistió en escoger un ejemplar que tuviese flores. Para eliminar el exceso de agua de la planta fue colocada entre dos hojas de papel periódico secas y dos cartones corrugados, con ayuda de un lazo se amarraron fuertemente para prensarlo.

Ya herborizado, el ejemplar seleccionado fue depositado en el Herbario FCME, UNAM. La determinación taxonómica de la especie *S. lasiantha* fue realizada por la Dra. Martha Juana Martínez Gordillo. Le fue asignado el No. de Registro 161518 (**Imagen 7**).

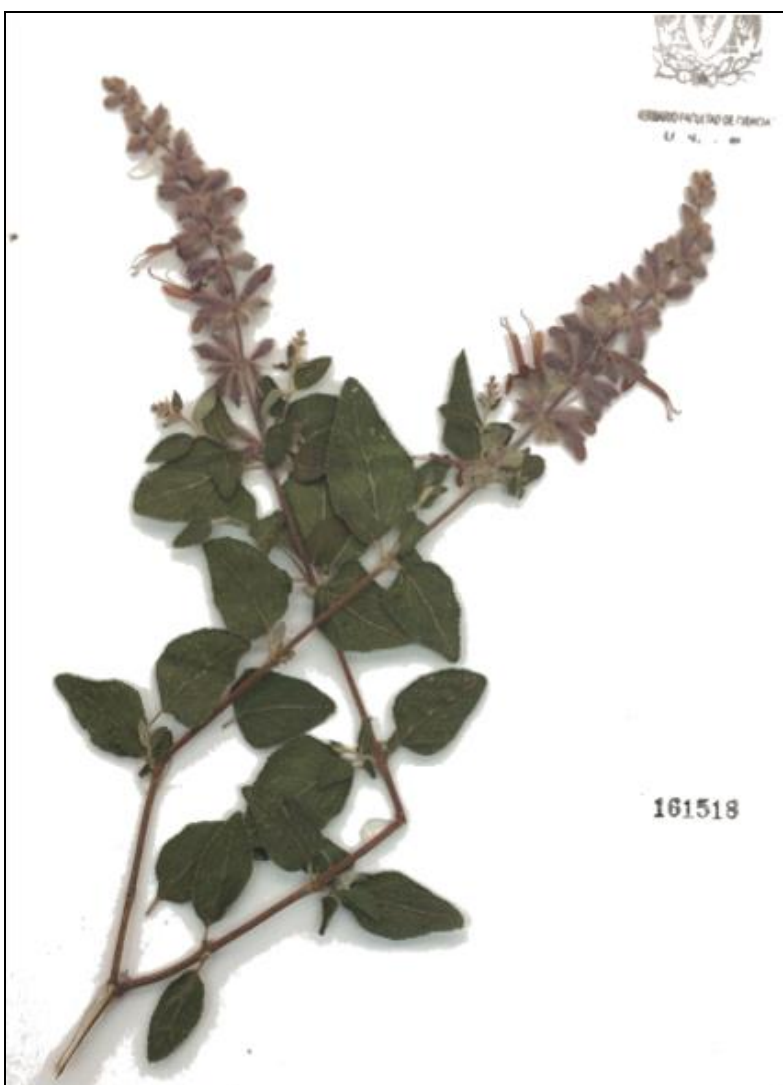


Imagen 7. Ejemplar depositado en el Herbario FCME, UNAM.

5.2 PROCESO DE EXTRACCIÓN

Una vez colectado el material vegetal, las partes aéreas de la planta fueron separadas en hojas y tallos. Posteriormente, se secó a temperatura ambiente y bajo la sombra durante 8 días obteniéndose 0.870 Kg de hojas y 1.52 Kg de tallos. Después se realizó una fragmentación manual y su almacenaje.

La extracción de los componentes de las hojas de *S. lasiantha* se efectuó mediante la maceración en acetona, tres veces consecutivas por 72 h cada una. Todos los disolventes utilizados para el desarrollo experimental fueron destilados previamente. El extracto acetónico se concentró por destilación a presión reducida hasta sequedad en un rotavapor BÜCHI R-210. Finalmente se obtuvieron 72.9 g de extracto seco en forma de un sólido color verde con aspecto de un polvo. (Imagen 8.)



Imagen 8. Maceración de las hojas de *S. lasiantha* en acetona (izquierda) y extracto seco (derecha).

5.3 FRACCIONAMIENTO PRIMARIO

Ya obtenido el extracto acetónico seco, se procedió a realizar un fraccionamiento primario que consistió en dos diferentes particiones (extracciones líquido-líquido).

Para la primera partición, se utilizó el total del extracto acetónico seco (79.2 g), el cual fue disuelto en 200 mL de una mezcla MeOH/H₂O en proporción 4:1. A continuación, fue vertido en un embudo de separación con capacidad de 1000 mL y se le añadieron 300 mL de hexano.

Se agitó vigorosamente y se observó la separación de la fase orgánica (constituida por hexano) de color verde oscuro y situada en la parte superior del embudo, la fase hidroalcohólica (conformada por MeOH/H₂O) de color marrón en la parte inferior y la formación de una interfase compuesta por un sólido de color verde con tonalidad pálida.

Se separaron las tres fases y se continuó extrayendo la fase acuosa con hexano hasta que el hexano dejara de presentar coloración. Se concentró cada una de las fases obtenidas mediante destilación a presión reducida hasta sequedad y se eliminó cualquier remanente de disolvente con una bomba de alto vacío BÜCHI V-700. Los pesos obtenidos pueden consultarse en el diagrama de la **Figura 10**.

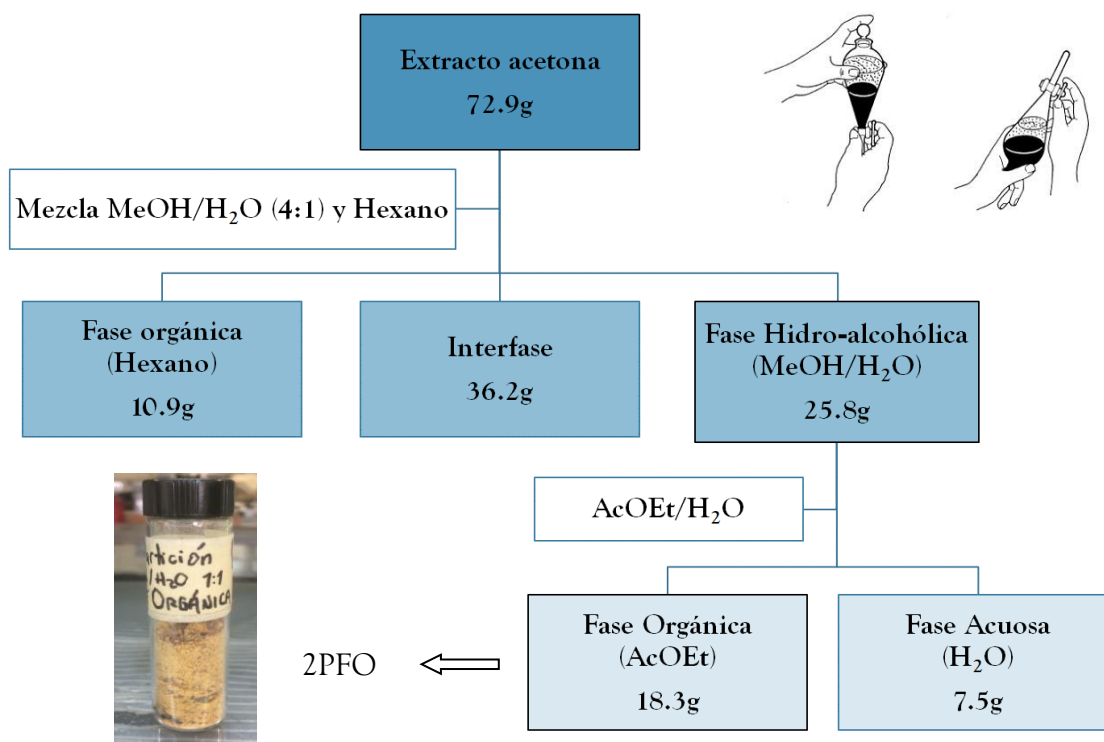


Figura 10. Diagrama del fraccionamiento primario del extracto acetónico de *S. lasiantha*. Aspecto físico de 2PFO

Para la segunda partición, se trabajó con los 25.8 g obtenidos de la fase acuosa de la primera partición, se solubilizó en 50 mL de H₂O (fase acuosa) presentando un color amarillo, después el contenido fue vertido en un embudo de separación y extraído con aproximadamente 400 mL de AcOEt (fase orgánica) tomando un color marrón.

Se continuó el mismo proceso hasta que el AcOEt fuera incoloro. Nuevamente, cada fase fue separada y concentrada a sequedad en rotavapor, obteniéndose un sólido color marrón que fue secado en bomba de alto vacío y pesado como se resume en la **Figura 10**.

En adelante, se continuó trabajando para el aislamiento y purificación de componentes terpénicos con los 18.3 g obtenidos de la fase orgánica (AcOEt) resultante de la segunda partición, a la que se le referirá como 2PFO. (**Figura 10**.)

5.4 CROMATOGRAFÍA

El aislamiento y purificación de los componentes terpénicos de *S. lasiantha* se llevó a cabo mediante diferentes tipos de cromatografía. Se mencionarán los materiales y métodos usados para esta técnica.

La cromatografía en columna (CC) se realizó usando el procedimiento descrito por W. Clark Still. *et al*,²⁶ la elección de la fase móvil adecuada se llevó a cabo por ensayos previos por cromatografía en capa delgada y la proporción de la mezcla se eligió ajustando el R.f. en un intervalo entre 0.2 y 0.25.²⁷

Como fases estacionarias se utilizaron Sephadex LH-20 (Lipophilic Sephadex LH-20, Bead size 25-100 μ) de la marca Sigma Aldrich o silica gel 60 Å 230/400 de la marca Macherey-Nagel. Para esta última, la aplicación de la muestra se realizó adsorbiendo previamente el extracto vegetal en silica gel del mismo tipo, en proporción 1:2. El montaje de cada CC se hizo siguiendo las instrucciones encontradas en la literatura.²⁸ **Imagen 9**.

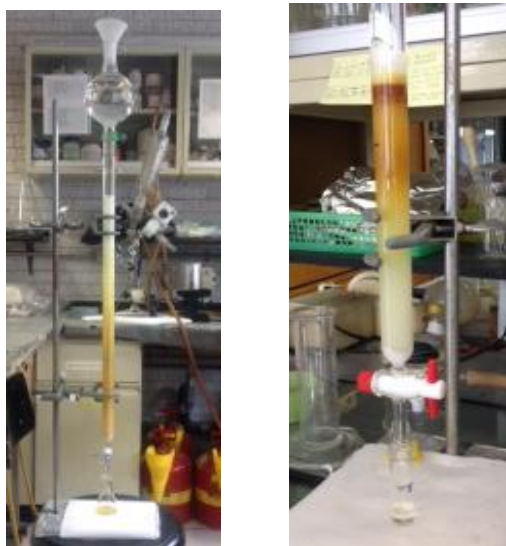


Imagen 9. Cromatografía en columna, imágenes representativas de la técnica.

Tanto para la elección de la fase móvil adecuada en cada CC, realizar su seguimiento y comprobar la pureza de los compuestos aislados, se hizo uso de cromatografía en capa delgada (CCD) empleando cromatofolios de sílica gel G UV254 de 0.25 mm de espesor, marca Macherey-Nagel.

El revelado de las CCD primero fue por medio de luz ultravioleta procedente de una lámpara portátil modelo ENF-260C (onda corta UV, $\lambda = 254$ nm) y posteriormente utilizando como reactivo cromogénico una solución preparada con de 12 g de sulfato cérico amoniacal y 22 mL de ácido sulfúrico concentrado en 350 g de hielo.

Las cromatografías en capa delgada preparativa (CCDP), se realizaron en placas de vidrio con sílica G-100 UV254, de 1.0 mm de espesor, y un tamaño de 20 cm x 20 cm de la marca Macherey-Nagel.²⁹

El diagrama mostrado en la **Figura 11.**, resume el procedimiento experimental para la purificación del extracto 2PFO (resultante del fraccionamiento primario) a través de 4 cromatografías en columna, los detalles de cada una de ellas se explican a continuación.

- **Columna 1.** Se usaron 4.8419 g de 2PFO. La separación se hizo en Sephadex utilizando una columna de 3 cm x 50 cm. El disolvente utilizado para disolver la muestra y eluir la columna fue MeOH. Se colectaron fracciones de 15 mL hasta llegar a un total de 16 fracciones.
- **Columna 2.** Realizada con las fracciones 9 y 10 de Columna 1. Se montó una columna de 2 cm x 25 cm con silica gel 230-400, se eluyó con Hexano/AcOEt en proporción (2:1), se tomaron fracciones de 5 mL hasta obtener un total de 60 fracciones.

Las fracciones 21 a 24 presentaron un sólido color blanco al que se le hicieron lavados con éter isopropílico para su purificación. Mientras que de las fracciones 42 a 50 fue notoria la formación de cristales en forma de agujas color amarillo.

- **Columna 3.** Elaborada con las fracciones 11 a 15 de Columna 1. Se usó una columna con Sephadex como fase estacionaria, de 3 cm x 50 cm, la muestra se disolvió con AcOEt y fue eluida con este disolvente. Se colectaron fracciones de 10mL hasta llegar a un total de 17 fracciones.
- **Columna 4.** Se usaron las fracciones 3 a 7 de Columna 3. Se hizo usando una columna de 2 cm x 45 cm y empacada con silica gel 230-400. Eluida con una mezcla de CH₂Cl₂/Acetona en proporción (9:1), se tomaron fracciones de 10 mL hasta un total de 29.

Se seleccionaron con base en CCD las fracciones 1 a 3 para su purificación, por medio de CCDP. Se usó un sistema de elución compuesto por Hexano/Acetona/Tolueno en proporciones (80:15:5).

Por otro lado, de las fracciones 18 a 28, se observó la formación de estructuras cristalinas blancas a las cuales únicamente se les realizaron lavados rápidos con el

mínimo acetona fría pues el producto de interés cristalizado mostró ser parcialmente soluble y la impureza altamente soluble.

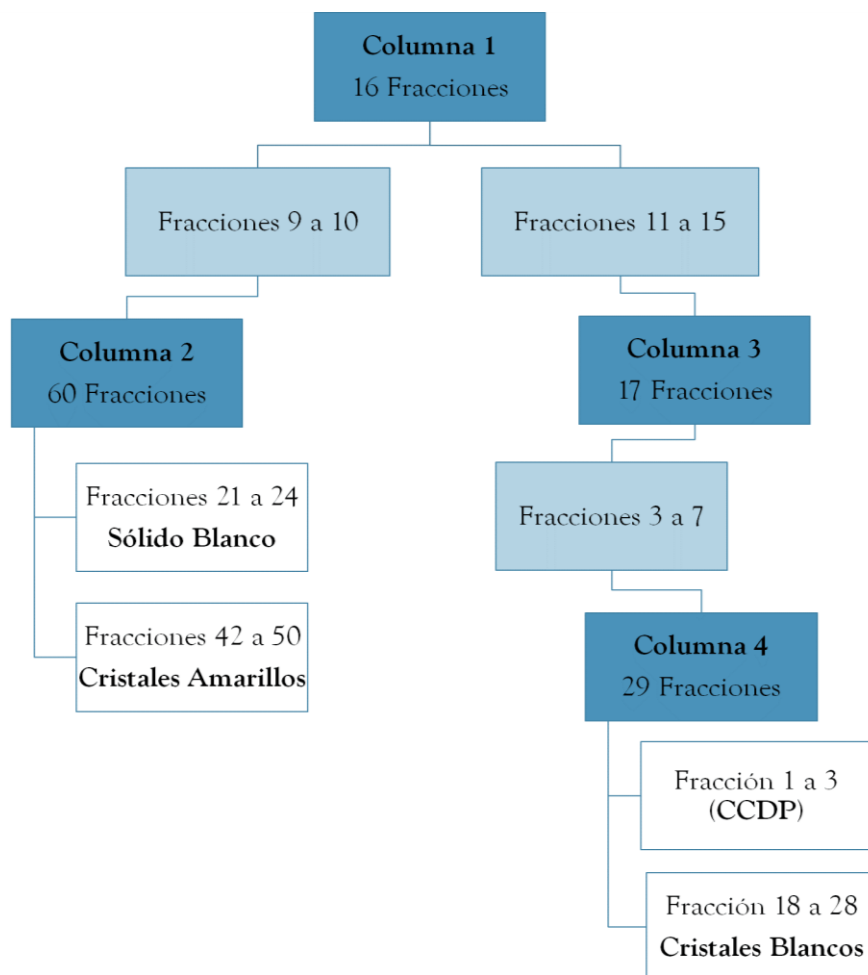


Figura 11. Diagrama experimental para el aislamiento y purificación de los componentes terpénicos de *S. lasiantha* mediante cromatografía en columna.

5.5 ELUCIDACIÓN

Preliminar a la purificación de los compuestos aislados y con fines de identificación, se obtuvieron espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) en un espectrómetro Bruker operado a 300 MHz para ^1H y 75 MHz para ^{13}C , utilizando como disolvente cloroformo deuterado (CDCl_3).

Una vez puros, los compuestos fueron caracterizados con ayuda de espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC y HMBC, realizados en un equipo Bruker Avance III HD 500 MHz y Bruker Avance III HD 700 MHz con una criosonda TCI 700 H-C/N-D. El software usado para el procesamiento de los espectros fue MestReNova versión 8.1.

Los espectros de IR y ATR se obtuvieron usando un espectrofotómetro FT-IR Bruker Tensor 27, tanto para las fracciones seleccionadas aún sin purificar como para los compuestos puros. Los espectros de EM, se determinaron en un equipo JEOL-JMStation 7000, usando la técnica de FAB⁺ y JEOL-The AccuTOF JMS-T100LC DART. La masa molecular se expresa como la relación masa/carga (m/z).

Finalmente, los puntos de fusión, se tomaron de los productos aislados una vez purificados y libres de cualquier disolvente, en un aparato MEL-TEMP II Laboratory Devices USA.

5.6 ACTIVIDAD CITOTÓXICA

La evaluación biológica, estuvo a cargo de los Técnicos académicos del Laboratorio de Pruebas Biológicas del Instituto de Química de la UNAM, quienes realizaron un “screening” primario siguiendo el protocolo de *Sulforodamina B*, descrito por el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos de Norteamérica, a una concentración 50 μM y utilizando como vehículo dimetilsulfóxido.

Las líneas celulares cancerosas que fueron probadas son:

U251 = glía de sistema nervioso central	PC-3 = próstata
K562 = leucemia	HTC-15 = colon
MCF-7 = mama	SKLU-1 = pulmón
FGH= Cultivo Primario de Fibroblastos Gingivales Humanos sanos (control).	

6 RESULTADOS Y ANÁLISIS

En el presente estudio de las hojas de *S. lasiantha*, se lograron aislar y purificar cuatro compuestos: una mezcla de naturaleza triterpenoide, una flavona y dos diterpenos de tipo clerodano. A continuación, se especifican los resultados obtenidos del procedimiento experimental descrito en el capítulo anterior (**Figura 11.**), se demuestra la identidad de cada uno de los metabolitos, así como los registros de su actividad biológica.

6.1 ÁCIDOS OLEANÓLICO Y URSÓLICO

Resulta como producto de las fracciones 21 a 24 de la “Columna 2” en forma de un sólido color blanco (**Figura 11.**) que, para su purificación se le realizaron lavados con éter isopropílico, con lo que se consiguió una buena separación de las impurezas con las que se encontraba mezclado, lo anterior se corroboró a través de CCD.

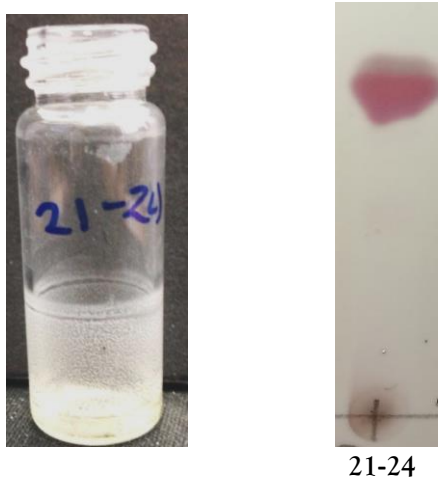


Imagen 10. Mezcla de ácidos oleanólico y ursólico. A la izquierda se observa el aspecto físico del “sólido color blanco” obtenido. A la derecha la CCD, el punto (21-24) muestra el compuesto de interés, eluido una vez en un sistema hexano/acetona en proporción (2:1).

Como puede apreciarse en la **Imagen 10.**, el compuesto de interés al ser revelado en CCD, era predominantemente no polar y presentaba dos bandas (una encima de otra) que revelaban ambas de color rosa y no se visualizaban bajo la luz UV.

En cuanto a sus propiedades físicas, presentó un alto punto de fusión tal que se descomponía antes de llegar a fundirse, alcanzando un valor de (247-249) °C. Por otro lado, fue soluble en acetona y AcOEt, parcialmente soluble en CH₂Cl₂ e insoluble en hexano y éter isopropílico.

Debido a las particularidades antes mencionadas, se dedujo que probablemente se trataba de la mezcla ácidos oleanólico y ursólico, ya que además son componentes muy habituales y abundantes en las salvas.

6.1.1 CARACTERIZACIÓN

Con base en la caracterización completa (ver **Anexo A1.**), se corroboró que era la mezcla de isómeros: ácido oleanólico y ácido ursólico (**Figura 12.**). Los siguientes parámetros espectroscópicos y espectrométricos, justifican estos resultados y se discuten a continuación.

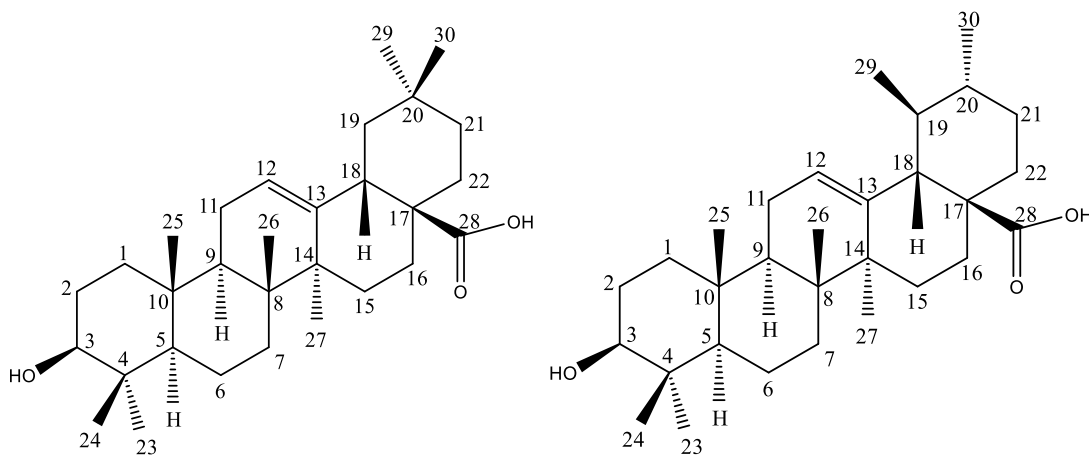


Figura 12. Estructuras del ácido oleanólico (izquierda) y ácido ursólico (derecha).

El espectro IR (**Anexo A.1.1**), que se realizó utilizando la técnica de disolución en CHCl_3 , mostró bandas en 3613 cm^{-1} y 3516 cm^{-1} características de las vibraciones de estiramiento O-H de dos diferentes grupos hidroxilo, una banda en 2934 cm^{-1} que indica el estiramiento asimétrico de C-H, así como otra banda en 2869 cm^{-1} del estiramiento simétrico de los mismos.

La presencia de grupos metilo se confirmó con la banda en 1386 cm^{-1} debida a la torsión simétrica y otra banda en 1461 cm^{-1} de torsión asimétrica que indica metilos y metilenos. También se observa una banda en 1698 cm^{-1} correspondiente a un grupo carbonilo de ácido.

Basado en las señales asignadas al grupo carbonilo y a los dos grupos hidroxilo, sugiere la existencia de dos diferentes ácidos carboxílicos que pudieran corresponder a cada uno de los isómeros, respaldando la teoría de que se encuentran en mezcla.

Por otro lado, en el espectro de RMN de ^1H (**Anexo A.1.2**), se observa que existen 7 señales simples cuya área bajo la curva corresponde a tres núcleos de H cada una y que, por su desplazamiento químico, son asociados a los siete grupos metilo presentes en la molécula de ácido oleanólico y ursólico (δ_{H} 0.76, 0.77, 0.90, 0.91, 0.93, 0.98, 1.13 ppm).

También, se identificó la señal del protón geminal al OH de la posición 3, el cual se observa como una señal ancha doble de dobles (*dd*) ancha, debido a la cercanía que tiene con el grupo hidroxilo, en donde existe intercambio molecular, lo que genera este efecto.

En cuanto a su multiplicidad *dd*, es causada por el acoplamiento de H-3 (α -axial), con cada uno de los protones diasterotópicos de la posición 2, que cusan el desdoblamiento en una señal doble con una constante $J_{\text{axial-axial}}$ de 11.20 Hz para el acoplamiento con H-2 (β -axial) y posteriormente, esa señal se desdobra a un *dd* por el acoplamiento con H-2 (α -ecuatorial) con una constante $J_{\text{axial-ecuatorial}}$ de 4.25 Hz a un desplazamiento de 3.22 ppm, como puede observarse en la **Figura 13**.

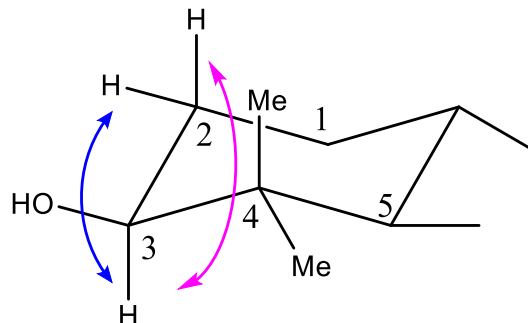


Figura 13. Muestra el anillo A del ácido oleanólico/ursólico, donde puede apreciarse el acoplamiento entre H-3 (α -axial) con H-2 (β -axial) en color rosa y con H-2 (α -ecuatorial) en color azul.

La otra señal *dd* en 2.28 ppm, se atribuye al H_(β)-18 por el acoplamiento con los dos H diastereotópicos de la posición 19 (de manera análoga a la mencionada en el párrafo anterior). Esta señal, es muy importante pues es indicativa que el producto mayoritario en la mezcla de isómeros, es el ácido oleanólico ya que, en el caso del ácido ursólico, no podría observarse con esa multiplicidad. (**Figura 14.**)

H 500 MHz, CDCl ₃	Multiplicidad, J (Hz).	δ_H ppm
H _(ω) -3	<i>dd</i> J= 11.20, 4.25	3.22
H-12	<i>t</i> J=3.61	5.28
H _(β) -18	<i>dd</i> J= 13.99, 4.99	2.28
H _(ω) -23	<i>s</i>	0.98
H _(β) -24	<i>s</i>	0.90
H _(β) -25	<i>s</i>	0.76
H _(β) -26	<i>s</i>	0.77
H _(ω) -27	<i>s</i>	1.13
H _(ω) -29	<i>s</i>	0.91
H _(β) -30	<i>s</i>	0.93

Figura 14. Desplazamientos químicos y asignaciones en RMN-¹H del Ácido Oleanólico.

Finalmente, el triplete ancho en 5.28 ppm se asignó a H-12 de la doble ligadura. La multiplicidad esperada para esta señal, es un *dd* por su acoplamiento con cada uno de los dos H diastereotópicos de la posición 11, pero dado que las constantes de acoplamiento con ambos protones tienen valores muy parecidos, la señal no alcanza a definirse y los dos dobles se empalman de manera que forman un *pseudo*-triplete ancho.

Cabe hacer la aclaración, que generalmente en los productos naturales, los protones de los metilenos en una molécula cíclica no son considerados como equivalentes, ya que su entorno químico, debido a su disposición espacial, es muy diferente para cada uno de ellos a pesar de que se encuentren enlazados a un mismo átomo de carbono, por lo que son diferenciables, es decir, son diastereotópicos.

El espectro de RMN de ^{13}C (**Anexo A.1.3**), mostró 30 señales evidenciando una estructura tipo triterpenoide. Se identificaron los carbonos correspondientes al grupo carbonilo (C-28) en 182.94 ppm y a la doble ligadura (C-12 y C-13) en 127.77 ppm y 143.73 ppm.

También logró confirmarse la presencia del C unido al oxígeno del alcohol secundario (C-3) en 79.20 ppm y los siete grupos metilo ($-\text{CH}_3$), cuyo desplazamiento químico se encuentra a campo alto. Todos los parámetros espectroscópicos se verificaron con los ya publicados y están de acuerdo con los de ácido oleanólico.³⁰

Cabe mencionar en las señales de la doble ligadura fue en donde se confirmó que efectivamente se tenía una mezcla de isómeros (ácido oleanólico y ursólico), ya que en el espectro se observan dos señales poco intensas correspondientes al C-12 y C-13 del ácido ursólico en 125.98 ppm y 138.08 ppm, el cual se encuentra como componente minoritario en la mezcla. **Figura 15.**

C 125 MHz CDCl ₃	δ _c ppm	C 125 MHz CDCl ₃	δ _c ppm	C 125 MHz CDCl ₃	δ _c ppm
C-1	38.56	C-11	23.11	C-21	33.95
C-2	27.32	C-12	122.77	C-22	33.21
C-3	79.20	C-13	143.73	C-23	28.25
C-4	38.90	C-14	41.17	C-24	15.70
C-5	55.37	C-15	27.83	C-25	15.47
C-6	18.45	C-16	23.55	C-26	17.23
C-7	32.58	C-17	46.66	C-27	26.08
C-8	39.42	C-18	41.77	C-28	182.94
C-9	47.78	C-19	46.03	C-29	32.58
C-10	37.23	C-20	30.83	C-30	23.72

Figura 15. Desplazamientos químicos y asignaciones en RMN-¹³C del Ácido Oleanólico.

La espectrometría de masas indicó una masa molecular de 456 g/mol, con fórmula molecular C₃₀H₄₈O₃ y 7 grados de insaturación, que corresponden con los ácidos oleanólico y ursólico.

6.1.2 ACTIVIDAD BIOLÓGICA

El ácido oleanólico y el ácido ursólico son triterpenoides comunes y abundantes en muchas plantas y pueden considerarse parte integral de la dieta humana. Se ha visto que los extractos vegetales, contienen uno o varias sustancias activas que, en conjunto, son más eficaces que un solo compuesto en la obtención de los efectos biológicos deseados.³¹

La mezcla de Ácido Oleanólico (AO) y Ácido Ursólico (AU), ha sido usada para el tratamiento de lesiones hepáticas, fibrosis hepática crónica y cirrosis. También se ha empleado en la quimioterapia combinada para ciertos tipos de tumores, actuando en diversas etapas del desarrollo del tumor, inhibiendo la iniciación y proliferación, así como para inducir la diferenciación de células tumorales y la apoptosis.³¹

Así mismo, se han encontrado que ambas sustancias poseen numerosas actividades cardiovasculares, incluyendo efectos antiarrítmicos, inmunomoduladores, vasodilatadores, hipolipidémicos, antiinflamatorios y antioxidantes.^{32,33}

También, debido a sus efectos hipoglucémicos, tienen una aplicación potencial para el manejo de Diabetes Mellitus Tipo 2 (T2DM), que generalmente está asociada con la obesidad, así como con el desarrollo de trastornos hepáticos, cardíacos y renales. Esto es de gran relevancia ya que la diabetes, es un trastorno metabólico crónico que, según estadísticas, en 2014 se estimó que alrededor del 9% de la población mundial adulta la padecía, de los cuales 90% se encontraba afectada por T2DM.³³

Otras de sus actividades biológicas que destacan, es su actividad antibacterial contra *Mycobacterium tuberculosis*, responsable de la tuberculosis (AO y AU), *Bacillus cereus*, causante de vómito y diarrea (AO y AU), *Streptococcus pneumoniae*, causante de enfermedades respiratorias (AO), *Streptococcus mutans* y *Streptococcus sobrinus*, asociadas a la iniciación y desarrollo de caries dental (AU), *Listeria monocytogenes*, que provoca enfermedades del sistema inmune (AO y AU) y microorganismos carcinogénicos del plancton (AO y AU).³⁴

Como puede apreciarse, los efectos farmacológicos reportados son demasiados para ser mencionados en detalle en este trabajo, pero definitivamente refleja el creciente interés en la investigación sobre estos triterpenoides naturales y su potencial para el desarrollo de nuevos tratamientos.

6.2 EUPATORINA

Surge como producto de las fracciones 42 a 50 de la “Columna 2” (**Figura 11.**), en las que se obtuvieron finos cristales en forma de aguja color amarillo pálido, los cuales, a través de CCD, se comprobó que se encontraban puros.

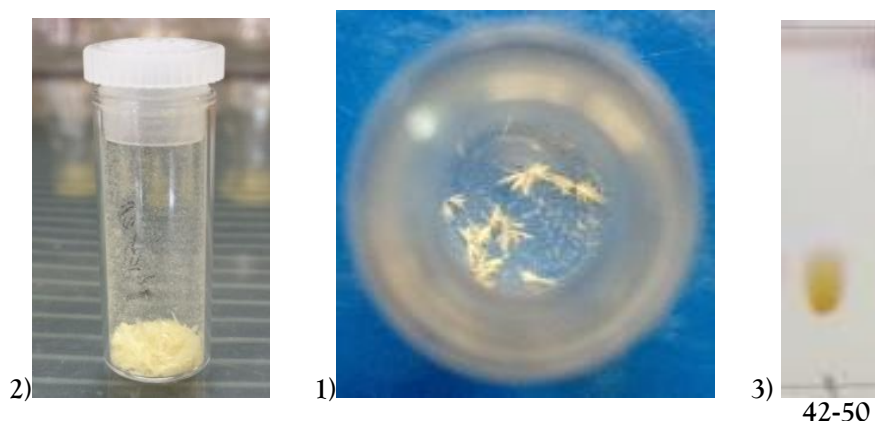


Imagen 11. Eupatorina 1) aspecto físico del compuesto color amarillo pálido 2) Cristales en forma de aguja 3) CCD de la fracción (42-50) eluida una vez en un sistema hexano/AcOEt en proporción (1:1).

Como puede verse en la **Imagen 11.**, el compuesto de interés al ser revelado en CCD, era predominantemente polar y presentaba una banda visible a simple vista color amarillo pálido que, al revelarse, el color se intensificaba y era muy notoria su visualización bajo la luz UV.

Con relación a sus características físicas, presentó un punto de fusión de (175-176) °C. Por otro lado, fue altamente soluble en acetona y AcOEt, parcialmente soluble en CH₂Cl₂ e insoluble en hexano.

Debido a las propiedades del compuesto antes mencionadas y sus características espectroscópicas, se dedujo que se trataba de una molécula tipo flavonoide, que al igual que los triterpenos, se encuentran de manera abundante en plantas del género *Salvia*.

6.2.1 CARACTERIZACIÓN

Con base en la caracterización completa (ver **Anexo A2.**), pudo confirmarse que el flavonoide aislado, era la 3',5-dihidroxi-4',6,7-trimetoxiflavona, “eupatorina” (**Figura 16.**), para la que se obtuvieron los siguientes parámetros espectroscópicos y espectrométricos.

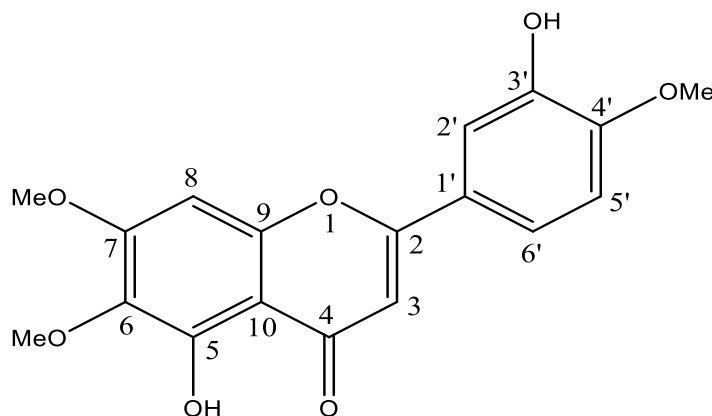


Figura 16. Estructura del flavonoide eupatorina.

El espectro IR (**Anexo A.2.1**), que se realizó utilizando la técnica de disolución en CHCl_3 , mostró una banda en 2939 cm^{-1} que indica el estiramiento asimétrico de C-H, así como otra banda en 2969 cm^{-1} del estiramiento simétrico de los mismos. También se localizó otra banda en 1461 cm^{-1} de torsión asimétrica que indica metilenos.

Se observan bandas en 1656 cm^{-1} , la cual es característica de un carbonilo de cetona conjugada, y señales intensas entre 1100 cm^{-1} y 1300 cm^{-1} , debidas a la torsión de grupos hidroxilo. Una banda en 1495 cm^{-1} debida al núcleo bencénico, y bandas en 2841 cm^{-1} y 1024 cm^{-1} correspondientes a los grupos metoxilos.

Por otro lado, en el espectro de RMN^{-1}H (**Anexo A.2.2**), se observan 3 señales simples, una en 3.92 ppm, 3.97 ppm y 3.99 ppm, proporcionales para 3 protones cada una, las cuales fueron asignadas a los tres grupos metoxilo de las posiciones 4', 6 y 7, respectivamente.

Adicionalmente, en 5.77 ppm y 12.75 ppm se observan 2 señales simples, anchas e intercambiables por D₂O (Anexo A.2.3), que integran para un protón, lo que indica que se tienen 2 grupos hidroxilo en la molécula. La señal más desplazada a campo bajo fue asignada al protón fenólico en posición 5 del anillo A, este desplazamiento es característico de este tipo de estructuras donde el protón del OH en C-5 presenta enlace de hidrógeno con el grupo carbonilo en posición 4.

La señal simple que se observa en 6.58 ppm es distintiva de un flavonoide tipo flavona y corresponde al protón H-3. El singulete en 6.55 ppm, fue asignado al protón de la posición 8. El protón en posición 5', se observa como una señal doble en 6.96 ppm con una J = 8.47 Hz, la cual se debe al acoplamiento *orto* con el protón en posición 6', la señal doble en 7.48 ppm (J=2.24 Hz) se asignó al protón H-2', por su acoplamiento *meta* con el protón 6'. Finalmente, la señal *dd* en 7.44 ppm (J=8.49, 2.27 Hz) se asignó al protón 6', por sus constantes de acoplamiento con el protón *orto* en 5' y en *meta* con H-2'. **Figura 17.**

H 500 MHz, CDCl ₃	Multiplicidad, J (Hz).	δ _H ppm
H-2'	<i>d</i> J= 2.24	7.48
H-3	<i>s</i>	6.58
H-5'	<i>d</i> J= 8.47	6.96
H-6'	<i>dd</i> J= 8.49, 2.27	7.44
H-8	<i>s</i>	6.55
OH-3'	<i>s</i>	5.77
OH-5	<i>s</i>	12.75
OCH ₃ -4'	<i>s</i>	3.99
OCH ₃ -6	<i>s</i>	3.92
OCH ₃ -7	<i>s</i>	3.97

Figura 17. Desplazamientos químicos y asignaciones en RMN-¹H de la Eupatorina.

El espectro de ^{13}C (**Anexo A.2.4**), muestra las 3 señales correspondientes a los grupos metoxilo en 56.30 ppm, 56.47 ppm, 61.03 ppm y la señal asignada al grupo carbonilo de la posición 4, muy desplazada a campo bajo, ubicada en 182.84 ppm. **Figura 18**.

Los datos espectroscópicos experimentales, fueron confirmados con los ya publicados y están de acuerdo con la estructura propuesta.³⁵

C 125 MHz CDCl_3	δ_c ppm	C 125 MHz CDCl_3	δ_c ppm
C-2	163.95	C-1'	124.64
C-3	104.67	C-2'	112.47
C-4	182.83	C-3'	149.70
C-5	153.18	C-4'	146.16
C-6	132.75	C-5'	110.83
C-7	158.90	C-6'	119.27
C-8	90.71	OCH_3 -4'	56.46
C-9	153.38	OCH_3 -6	61.02
C-10	106.32	OCH_3 -7	56.30

Figura 18. Desplazamientos químicos y asignaciones en RMN- ^{13}C de la Eupatorina.

La espectrometría de masas indicó una masa molecular de 344 g/mol, con fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_7$ y 11 grados de insaturación, que corresponden con la estructura del flavonoide eupatorina.

6.2.2 ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Los flavonoides son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal con actividades antioxidantes, antiinflamatorias, antitumorales, entre otros efectos biológicos bien conocidos y estudiados.

Se ha demostrado que la flavona eupatorina es un agente antiproliferativo y citostático activo contra varias líneas celulares de cáncer, incluyendo adenocarcinoma cervical humano (HeLa, IC_{50} = 5 μ g/mL), adenocarcinoma gástrico humano (MK-1, IC_{50} = 12 μ g/mL), melanoma murino (B16F10, IC_{50} = 5 μ g/mL), carcinoma de colon en un modelo murino (26-L5) o línea celular de cáncer de mama humano (MDA-MB-468, IC_{50} = 0.5 a 15 μ M). No tiene efectos citostáticos en la línea de células de mama humana normal (MCF-10A, IC_{50} = 50 μ M).^{36,37,38}

Estas observaciones sugieren que la eupatorina podría convertirse en un agente anticanceroso con la selectividad deseada entre el cáncer y las células normales. La capacidad de la eupatorina para inhibir inespecíficamente muchas proteínas quinasas ha sido probada y es la causa más probable de sus efectos celulares.³⁶

Adicionalmente, este compuesto posee alta actividad antiinflamatoria³⁹, se ha identificado como un compuesto vasodilatador⁴⁰, presenta propiedades anti-mitóticas⁴¹ y también se ha encontrado que posee actividad tripanocida contra epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, el parásito que causa la enfermedad de Chagas, provocando insuficiencia cardíaca (IC_{50} = 0.2 μ g/mL)⁴².

En el género *Salvia*, la eupatorina es un componente flavonoide muy común, que ha logrado ser aislado de diversas especies como *S. connivens*³⁹, *S. lavandulifolia*⁴³, *S. macrosiphon*⁴³, *S. mirzayana*⁴³, *S. moorcroftiana*⁴³, *S. plebeia*⁴³, *S. syriaca*⁴³, *S. urolepis*⁴⁴ y *S. thymoides*⁴⁵ (endémica de México).

6.3 LACTONA DEL ÁCIDO HAUTRIWÁICO

Se obtuvo como producto de las fracciones 1 a 3 de la “Columna 4” (**Figura 11.**), con apariencia de un sólido translúcido color amarillo pálido (**Imagen 12**). Para su purificación se realizó una CCDP utilizando como fase móvil una mezcla de Hexano/Acetona/Tolueno en proporciones (8:1.5:0.5), con lo que se logró una buena separación de las impurezas que contenía, esto se confirmó a través de CCD.

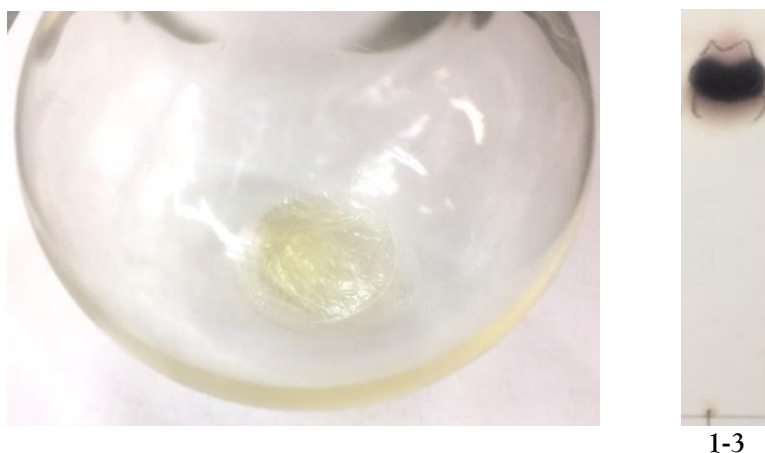


Imagen 12. Lactona del ácido hautriwáico. A la izquierda el aspecto físico del aceite translúcido color amarillo pálido. A la derecha se muestra la CCD de la fracción (1-3) sin purificar, eluida una vez en un sistema CH_2Cl_2 /Acetona en proporción (9:1).

Como puede notarse en la **Imagen 12.**, el compuesto de interés, al ser revelado en CCD, presentaba una banda color negro que era predominantemente no polar y también era posible visualizarlo bajo la luz UV.

En cuanto a sus características físicas, presentó un punto de fusión de (119-120) °C. Por otro lado, fue altamente soluble en CH_2Cl_2 y medianamente soluble en acetona y AcOEt .

6.3.1 CARACTERIZACIÓN

Con base en la caracterización completa (ver **Anexo A3.**) se determinó que el compuesto de interés era el diterpeno lactonizado del ácido hautriwáico (**Figura 19**). En seguida, se presentan los parámetros espectroscópicos y espectrométricos obtenidos que sustentan estos resultados.

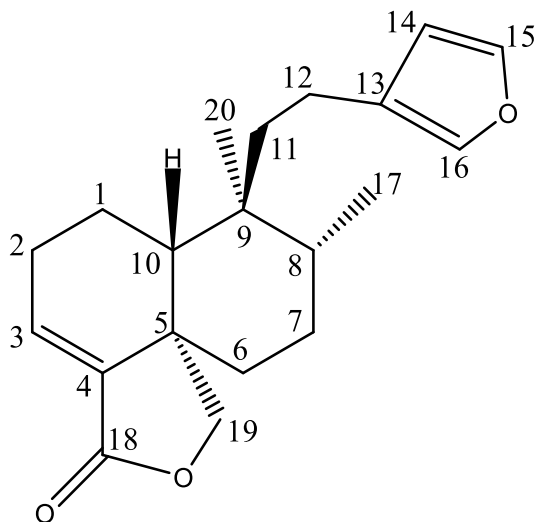


Figura 19. Estructura de la Lactona del Ácido Hautriwáico.

El espectro IR (**Anexo A.3.1**), que se realizó utilizando la técnica de película, mostró una banda en 2866 cm^{-1} del estiramiento simétrico de los mismos.

La presencia de grupos metilo se confirmó con la banda en 1379 cm^{-1} debida a la torsión simétrica y otra banda en 1452 cm^{-1} de torsión asimétrica que indica metilos y metilenos.

También se observa una banda intensa en 1764 cm^{-1} correspondiente a un grupo carbonilo característico de lactonas. Una banda en 1661 cm^{-1} característica de dobles ligaduras causadas por estiramientos C-C y las flexiones fuera del plano de los enlaces C-H.

En el espectro de RMN de ^1H (**Anexo A.3.2**), se distinguen tres señales de un sistema ABC asignados a los protones de las posiciones 14, 15 y 16 que se encuentran en el anillo de furano. En el caso del H-14 encontrado en 6.27 ppm, se acopla con H-15 generando una señal doble con $J=1.83$ Hz, que posteriormente se desdobla a un *dd* con $J=0.90$ Hz al acoplarse a larga distancia (a 4 enlaces) con H-16.

El protón H-15 desplazado a 7.36 ppm, también genera una señal *dd* por su acoplamiento con H-14 y H-16, pero ya que los valores de las constantes asociadas a estos dos acoplamientos presentan un valor muy similar, las dos señales dobles no se alcanzan a separar lo suficiente, de tal modo que se traslapan y generan un *pseudo-triplete* ancho con una constante de acoplamiento de 1.69 Hz.

Para H-16 encontrado en 7.22 ppm, nuevamente se espera una señal *dd* por su acoplamiento con H-14 y H-15, pero dado que sus constantes de acoplamiento con estos protones son muy pequeñas, la señal se observa como un singulete ancho.

Por otro lado, la señal simple que aparece desplazada a 0.61 ppm fue asignada a los protones del grupo metilo ubicado en la posición 20 ya que no se encuentra acoplado con ningún H, mientras que los protones del metilo de la posición 17 se encuentran como una señal doble por su acoplamiento con el H-8 (β -axial) a un desplazamiento de 0.87 ppm y una constante de acoplamiento de 6.72 Hz.

En cuanto a H-3 que se encuentra a un desplazamiento químico de 6.76 ppm, se observa como un *dd* por su acoplamiento con cada uno de los H diastereotópicos de la posición 2, lo que además indica que no hay sustituyentes en C-2.

Para la señal en 1.09 ppm del metileno en posición 1, sólo se observó la señal correspondiente a H-1 (α -axial). Dado que tiene dos protones axiales vecinos (H-2 y H-10) y al acoplamiento geminal con H-2 ecuatorial, se genera una señal cuádruple con constante de acoplamiento 12.45 Hz. Posteriormente, debido al acoplamiento con H-1 (β -ecuatorial), cada

una de las señales del cuarteto, se desdobra en un doble con una constante de 3.96 Hz, generando así la señal cuarteto doble que es proporcional para un núcleo de hidrógeno.

Los protones diastereotópicos de la posición 19, conforman un sistema AB característico de clerodanos, en el que la señal de H-19 *pro-S* encontrado en 3.93 ppm, se observa como una señal *dd* debido a su acoplamiento con el protón geminal H-19 *pro-R* ($J=8.07$ Hz) y al acoplamiento a larga distancia de tipo “W” con H-6 β -axial ($J=2.14$ Hz), lo que indica que el metileno de la posición 19 se encuentra orientado α -axial y que no existen sustituyentes en la posición 6- β axial. (Figura 20).

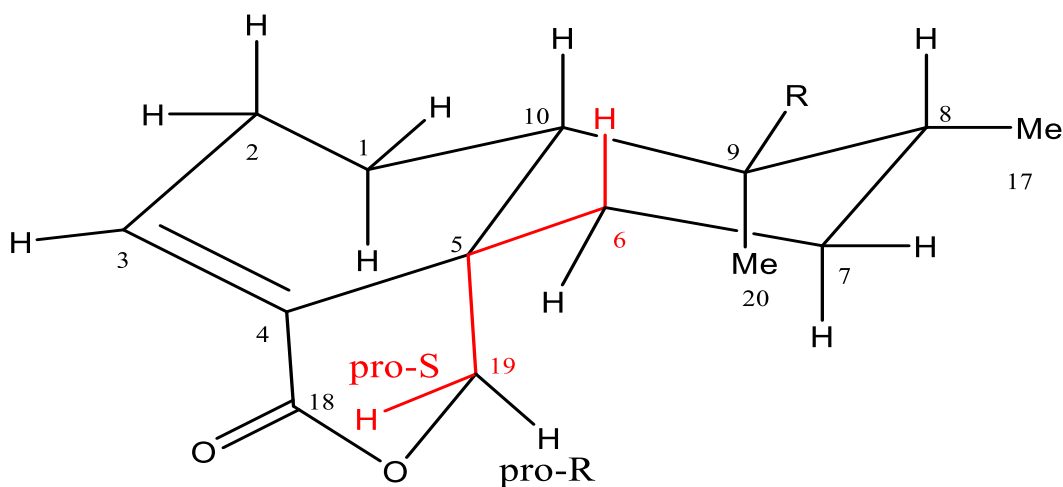


Figura 20. Lactona del Ácido Hautriwáico. Marcado en rojo, el acoplamiento tipo W.

Por otro lado, también se observa una señal doble asociada al protón diastereotópico H-19 *pro-R*, debido a su acoplamiento con el protón *pro-S* con una constante de acoplamiento de 8.00 Hz y que es proporcional para un núcleo de hidrógeno.

Finalmente, se localizó la señal correspondiente para el H-6 (α -ecuatorial) en 1.94 ppm, que se acopla con el protón diastereotópico geminal H-6 (β -axial), generando una señal doble con una constante de 13.07 Hz, que posteriormente se desdoblan a un *dd* por acoplamiento con H-7 (β -ecuatorial) y nuevamente se desdobla a un *ddd* por acoplamiento con H-7 (α -

axial), pero dado que estos dos últimos acoplamientos *ecuatorial-ecuatorial* y *ecuatorial-axial* tienen una constante con un valor similar, se traslapan sus señales generando así una señal doble de triples que es proporcional para un átomo de hidrógeno. (Figura 21.)

H 500 MHz, CDCl ₃	Multiplicidad, J (Hz).	δ _H ppm
H-1	<i>qd</i> J= 12.45, 3.96	1.09
H-3	<i>dd</i> J=7.50, 2.24	6.76
H-6	<i>dt</i> J= 13.07, 3.42	1.94
H-14	<i>dd</i> J= 1.83, 0.90	6.27
H-15	<i>t</i> J= 1.69	7.36
H-16	<i>m</i>	7.22
H-17	<i>d</i> J= 6.72	0.87
H-20	<i>s</i>	0.61
H-19	<i>dd</i> J= 8.07, 2.14	3.93
H-19	<i>d</i> J= 8.00	4.31

Figura 21. Desplazamientos químicos y asignaciones en RMN-¹H de la Lactona del Ácido Hautriwáico.

La RMN-¹³C (Anexo A.3.3), mostró 20 señales, sugiriendo una estructura diterpenoide. Se identificaron los carbonos correspondientes a un grupo carbonilo (C-18) en 169.60 ppm, a una doble ligadura (C-3 y C-4) en 136.82 y 138.60 ppm.

Fue notoria la presencia de 4 señales muy particulares, desplazadas a campo bajo y características de un furano (C-13 a C-16). Por otro lado, también se observó la señal correspondiente al carbono unido al oxígeno de la lactona (C-19) en 72.01 ppm y los dos grupos metilo (-CH₃) con desplazamientos químicos a campo alto. Figura 22.

Todos los parámetros espectroscópicos experimentales, así como sus respectivas asignaciones, fueron comparadas con los ya publicados⁴⁶ y se encontró que correspondían entre sí.

C 125 MHz CDCl ₃	δ _C ppm	C 125 MHz CDCl ₃	δ _C ppm
C-1	19.82	C-11	38.99
C-2	27.96	C-12	17.84
C-3	135.82	C-13	125.13
C-4	138.60	C-14	110.99
C-5	45.78	C-15	143.07
C-6	34.69	C-16	138.80
C-7	27.83	C-17	15.80
C-8	36.73	C-18	169.60
C-9	37.90	C-19	72.01
C-10	48.25	C-20	18.27

Figura 22. Desplazamientos químicos y asignaciones en RMN-¹³C de la Lactona del Ácido Hautriwáico.

La espectrometría de masas indicó una masa molecular de 314 g/mol, con fórmula molecular C₂₀H₂₆O₃ y 8 grados de insaturación, que corresponden con la estructura de la lactona del ácido hautriwáico.

6.3.2 ACTIVIDAD BIOLÓGICA

La lactona del ácido hautriwáico, es un diterpeno de tipo clerodano que fue aislado por primera vez en 1967 de las hojas de *Doddonea spp*⁴⁷ (de especies como *Doddonea viscosa*⁴⁶ y *Doddonea angustifolia*⁴⁸) pertenecientes a la familia Sapindaceae. También, ha sido aislado de

especies de la familia Asteraceae, como *Baccharis crispa*⁴⁹, *Baccharis dracunculifolia*⁵⁰, *Baccharis flabellata*⁵¹, *Chromolaena pulchella*⁵², *Heteropappus altatcus*⁵³ y *Pulicaria salviifolia*⁵⁴. No se tienen registros publicados de este diterpeno como un componente fitoquímico en plantas del género *Salvia*, por lo cual en esta tesis es la primera vez que se describe su aislamiento.

La principal actividad biológica que presenta este diterpeno, es su actividad antialimentaria, esto es, que inhibe el comportamiento normal de alimentación en algunos insectos, tales como *Tribolium castaneum*⁵¹ en su fase adulta o de *Tenebrio molitor*⁴⁹ en su etapa larval, ambos considerados como plagas de productos almacenados, particularmente harina y granos.

Investigaciones demuestran que las características estructurales esenciales para la actividad antialimentaria de este clerodano, es la presencia simultánea de un anillo de furano y una γ -lactona α, β -insaturada. Esta conclusión fue comprobada cuando la lactona del ácido hautriwáico se sometió a reducción con LiAlH_4 que, aunque el diol resultante tiene una cadena lateral de β -etilfurano en la posición 9, no mostró ninguna actividad antialimentaria.⁴⁹ (Figura 23.)

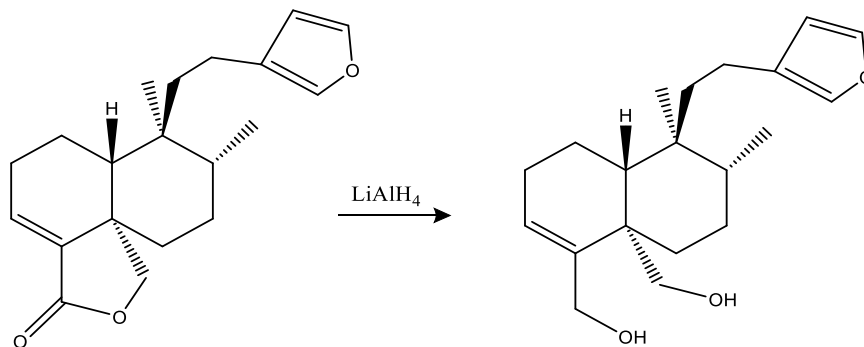


Figura 23. Reacción de reducción con LiAlH_4 de la lactona del ácido hautriwáico para dar un diol.

Otro tipo de actividad que presenta la lactona del ácido hautriwáico, es un gran potencial como antifúngico contra *Saccharomyces cerevisiae*⁴⁸ (con un valor de MIC $< 7.8 \mu\text{g}$ por cada caja Petri de 5 mm de diámetro y 2 mm de profundidad), que es una levadura muy utilizada en la industria y también presente en la microbiota humana. Entre las enfermedades asociadas o condiciones predisponentes a infecciones causadas por este hongo, destacan la

diabetes mellitus, la insuficiencia renal, el cáncer, malnutrición, la utilización de catéteres y los procedimientos quirúrgicos, provocando que los pacientes presenten fiebre como manifestación clínica.

También mostró una alta actividad contra *Leishmania donovani* ($IC_{50}=7.0 \mu\text{g/mL}$ y $IC_{90}=28.0 \mu\text{g/mL}$), un protozooario que causa la enfermedad leishmaniasis, considerada como un problema de salud pública importante ya que afecta a alrededor de 12 millones de personas en 80 países y causa morbilidad y mortalidad principalmente en regiones tropicales de África, Asia y América Latina.⁵⁰

Adicionalmente, este efecto también fue probado usando ácido hautriwáico, cuya estructura es muy similar a la lactona, difiriendo principalmente en los grupos funcionales de los C-4 y C-5, el cual resultó ser inactivo, lo que sugiere que el anillo pentacíclico de lactona entre estas posiciones puede mejorar la actividad contra leishmaniasis en estructuras tipo clerodano.⁵⁰

Así mismo, la lactona del ácido hautriwáico, mostró ser moderadamente activa contra *Plasmodium falciparum*, un protozooario que causa malaria, otra enfermedad tropical importante que tiene el potencial de afectar a casi el 40% de la población mundial y es responsable de 1 a 2 millones de muertes cada año.⁵⁰

Presentando valores de $IC_{50}= 0.8 \mu\text{g/mL}$ usando una variedad de *P. falciparum* "D6", proveniente de Sierra Leona y que era susceptible a cloroquina (fármaco usado para el tratamiento o prevención de la malaria) y un $IC_{50}= 2.2 \mu\text{g/mL}$ con una variedad "W2", originaria de Indochina, resistente a cloroquina.⁵⁰

Como puede apreciarse, las actividades biológicas más sobresalientes y conocidas de este diterpeno, son por sus efectos antialimentarios, pero definitivamente, este compuesto tiene un gran potencial para el desarrollo de nuevos tratamientos de algunas enfermedades, lo que se refleja en un creciente interés para la investigación de estos diterpenoides naturales.

6.4 ÁCIDO HAUTRIWÁICO

Aislado de las fracciones 18 a 28 de la “Columna 4” en las que se observó la formación de estructuras cristalinas blancas translúcidas (**Figura 11**). Para su purificación, únicamente se les realizaron lavados rápidos con la mínima cantidad de acetona fría, ya que el producto de interés, una vez cristalizado, mostró ser parcialmente soluble y la impureza color amarillo con la que estaba mezclado, era altamente soluble.

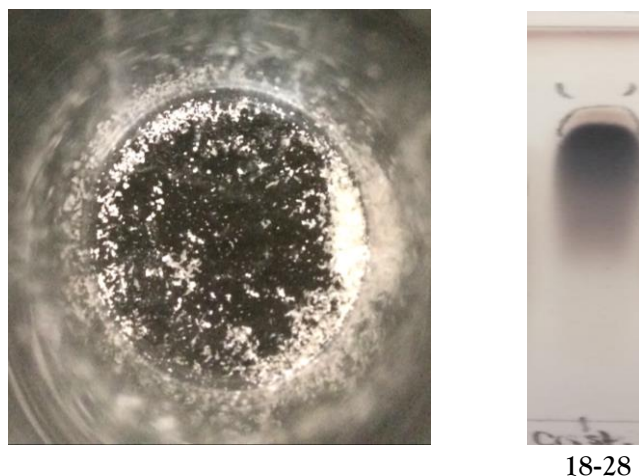


Imagen 13. Ácido hautriwáico. A la izquierda, aspecto físico del compuesto cristalino color blanco, estructuras cristalinas blancas translúcidas. A la derecha, CCD de la fracción (18-28) sin purificar, eluida una vez en un sistema CH_2Cl_2 /Acetona en proporción (9:1).

En la **Imagen 13.**, puede observarse que el compuesto de interés, al ser revelado en CCD, presentaba una banda color negro, con propiedades polares y presentaba un arrastre característico de ácidos carboxílicos. No era visible bajo la luz UV.

Con relación a sus características físicas, presentó un punto de fusión de (180-182) °C. Por otro lado, fue altamente soluble en disolventes como CH_2Cl_2 y medianamente soluble en acetona y AcOEt.

6.4.1 CARACTERIZACIÓN

Con base en la caracterización completa (ver **Anexo A4.**), se dedujo que el compuesto estudiado, se trataba del diterpeno tipo clerodano, ácido hautriwáico (**Figura 24.**). A continuación, se presentan los parámetros espectroscópicos y espectrométricos obtenidos que comprueban este resultado.

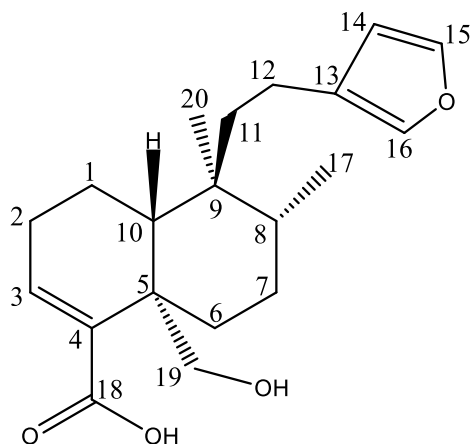


Figura 24. Estructura del Ácido Hautriwáico.

El espectro IR (**Anexo A.4.1**), realizado por la técnica de ATR con la muestra sólida, mostró una banda en 3145 cm^{-1} característica de las vibraciones de estiramiento O-H de un grupo hidroxilo, dos bandas en 2961 cm^{-1} y 2929 cm^{-1} que indican el estiramiento asimétrico de C-H, así como otra banda en 2869 cm^{-1} del estiramiento simétrico de los mismos.

La presencia de grupos metilo se confirmó con la banda en 1382 cm^{-1} debida a la torsión simétrica y otra banda en 1446 cm^{-1} de torsión asimétrica que indica metilos y metilenos. También se observa una banda muy intensa en 1659 cm^{-1} correspondiente a un grupo carbonilo de ácido. Una banda en 1624 cm^{-1} característica de dobles ligaduras causadas por estiramientos C-C y las flexiones fuera del plano de los enlaces C-H.

Por otro lado, en el espectro de RMN de ^1H (**Anexo A.4.2**), se distinguen tres señales de un sistema ABC asignados a los protones de las posiciones 14, 15 y 16 que se encuentran en

el anillo de furano. En el caso del H-14 encontrado a 6.24 ppm, se observa como una señal doble por su acoplamiento con H-15 ($J=1.01$ Hz) que, por falta de resolución en el análisis, no se alcanza a observar su segundo acoplamiento a larga distancia (a 4 enlaces) con H-16 y una constante de acoplamiento muy pequeña, lo que generaría así una señal *dd*.

El protón H-15 desplazado a 7.35 ppm, también genera una señal *dd* por su acoplamiento con H-14 y H-16, pero ya que los valores de las constantes asociadas a estos dos acoplamientos presentan un valor muy similar, las dos señales dobles no se alcanzan a separar lo suficiente, de tal modo que se traslapan y generan un *pseudo-triplete* ancho con una constante de acoplamiento de 1.67 Hz.

Para H-16, nuevamente se espera una señal *dd* por su acoplamiento con H-14 y H-15, pero dado que sus constantes de acoplamiento con estos protones son muy pequeñas, la señal se observa como una señal simple ancha.

La señal simple que aparece desplazada a 0.75 ppm fue asignada a los protones del grupo metilo ubicado en la posición 20 ya que no se encuentra acoplado con ningún H, mientras que los protones del metilo de la posición 17, se encuentran como una señal doble por su acoplamiento con el H-8 (β -axial) en un desplazamiento de 0.85 ppm.

En cuanto a H-3 que se encuentra en un desplazamiento químico de 6.76 ppm, se observa como una señal triple ancha ya que originalmente era un doble de dobles por su acoplamiento con cada uno de los H diastereotópicos de la posición 2, pero al no alcanzarse a separar, se superpusieron generando el triplete ancho. Esta señal, además indica que no hay sustituyentes en C-2.

Otra de las señales que se logró identificar, fue la de uno de los H del metileno ubicado en la posición 12, el cual se muestra como un triple de dobles proporcional para un núcleo de hidrógeno, en 2.13 ppm. Su multiplicidad se deriva de que tiene 2 átomos de hidrógeno

vecinos en la posición 11, lo que genera una señal triple que posteriormente la desdobra a un triple de dobles por el acoplamiento con el otro H diastereotópico de la posición 12.

Una de las principales diferencias que se observa en el espectro de RMN- ^1H entre el ácido hautriwáico y su derivado lactonizado, es que en el ácido ya no se tiene el acoplamiento tipo W entre H-6 (β -axial) y H-19 *pro-S*, ya que para poder observarlo, es necesario que la molécula presente cierta rigidez (como en el caso de la γ -lactona α, β -insaturada), pero como el grupo $-\text{CH}_2\text{OH}$ que sustituye a C-5 en el ácido hautriwáico presenta libre giro, este acoplamiento W no se observa. **Figura 25.**

De modo que las multiplicidades apreciadas para los protones diastereotópicos de la posición 19 es una señal doble para H-19 *pro-S* debido a su acoplamiento con H-19 *pro-R* a un desplazamiento químico de 3.79 ppm y otra señal doble para H-19 *pro-R* debido a su acoplamiento con H-19 *pro-S* a un desplazamiento químico de 4.22 ppm. Ambas señales proporcionales para un átomo de hidrógeno y constantes de acoplamiento de 10.0 Hz.

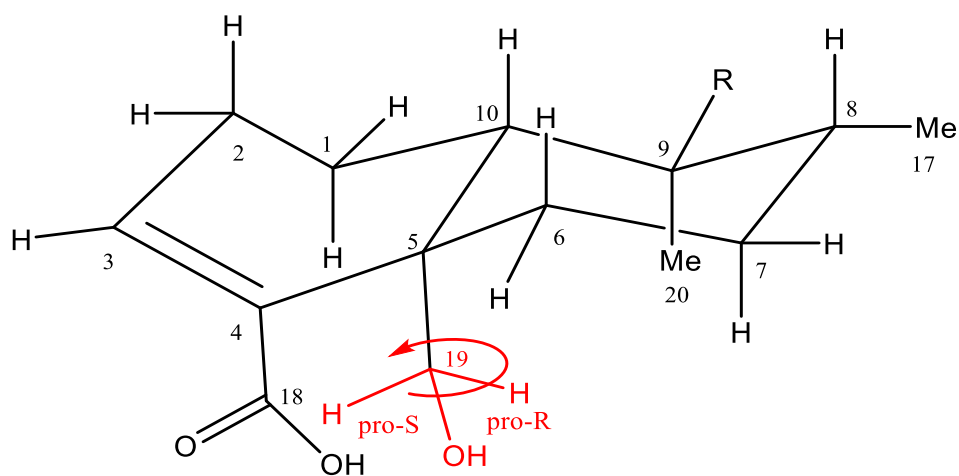


Figura 25. Ácido Hautriwáico. Marcado en rojo el grupo $-\text{CH}_2\text{OH}$ que sustituye a C-5 que presenta libre giro.

Finalmente, se identificaron ambas señales correspondientes a los protones diastereotópicos del metileno en la posición 6. El H-6 (β -axial), se acopla con ambos protones del metileno de la posición 7, resultando en una señal triple, que después se desdobra a un

triple de dobles por el acoplamiento con H-6 (α -ecuatorial), señal que es proporcional a un hidrógeno y se encuentra a un desplazamiento de 1.19 ppm.

El H-6 (α -ecuatorial) se acopla con el protón H-6 (β -axial), generando una señal doble, que posteriormente se desdobla a un dd por acoplamiento con H-7 (β -ecuatorial) y nuevamente se desdobla a un ddd por acoplamiento con H-7 (α -axial), pero dado que estos dos últimos acoplamientos *ecuatorial-eecuatorial* y *ecuatorial-axial* tienen una constante con un valor similar, se traslapan sus señales generando así una señal doble de triples ancha que es proporcional para un núcleo de hidrógeno a un desplazamiento de 2.44 ppm. (Figura 26.)

H 700 MHz, CDCl ₃	Multiplicidad, J (Hz).	δ_H ppm
H-3	<i>t</i> J= 3.69	6.76
H-6	<i>td</i> J=13.19, 4.35	1.19
	<i>dt</i> J= 13.42, 3.37	2.44
H-12	<i>td</i> J=12.95, 5.60	2.13
H-14	<i>d</i> J= 1.01	6.24
H-15	<i>t</i> J= 1.67	7.35
H-16	<i>s</i>	7.19
H-17	<i>d</i> J=6.83	0.85
H-19	<i>d</i> J=10.02	4.22
	<i>d</i> J=10.04	3.79
H-20	<i>s</i>	0.75

Figura 26. Desplazamientos químicos y asignaciones en RMN-¹H del Ácido Hautriwáico.

Por otro lado, el espectro de RMN-¹³C (Anexo A.4.3), mostró 20 señales sugerentes de una estructura diterpenoide. Se identificaron los C correspondientes a un grupo carbonilo de

ácido carboxílico (C-18) en 171.17 ppm y a una la doble ligadura (C-3 y C-4) en 139.70 ppm y 138.56 ppm respectivamente.

Nuevamente fue notoria la presencia de las 4 señales (C-13 a C-16) desplazadas a campo bajo características de furano. También, se encontró el pico correspondiente al carbono unido al oxígeno de un alcohol (C-19) en 66.12 ppm y dos grupos metilo (R-CH₃) con desplazamientos químicos a campo alto. **Figura 27.**

Todos los parámetros espectroscópicos experimentales, así como sus respectivas asignaciones, fueron comparadas con los ya publicados^{54,55,56} y se encontró que correspondían entre sí.

C 175 MHz CDCl ₃	δ _c ppm	C 175 MHz CDCl ₃	δ _c ppm
C-1	17.14	C-11	38.65
C-2	26.91	C-12	18.42
C-3	139.70	C-13	125.37
C-4	138.56	C-14	111.06
C-5	38.91	C-15	142.96
C-6	31.36	C-16	140.85
C-7	26.83	C-17	16.00
C-8	36.34	C-18	171.17
C-9	42.07	C-19	66.12
C-10	46.43	C-20	18.76

Figura 27. Desplazamientos químicos y asignaciones en RMN-¹³C del Ácido Hautriwáico.

La espectrometría de masas indicó una masa molecular de 332 g/mol, con fórmula molecular C₂₀H₂₈O₄ y 7 grados de insaturación, que corresponden con la estructura del ácido hautriwáico.

6.4.2 ACTIVIDAD BIOLÓGICA

El ácido hautriwáico, fue aislado por primera vez en 1936 por Kotake y Kuwata, quienes lo clasificaron como un ácido monohidrocarboxílico. Se obtuvo a partir de la resina que exudan las hojas de *Dodonea viscosa*, una planta ampliamente distribuida en Taiwán y popularmente conocida en Japón como “Hautriwa” del que se deriva su nombre común.⁴⁶ Se ha visto que cuando se calienta durante un periodo de 30 minutos a una temperatura de (180-190) °C, se transforma en su derivado lactonizado.⁴⁶

Este diterpeno, se encuentra principalmente en especies de plantas de la familia Sapindaceae (*Dodonea viscosa*^{46,57,58}, *Dodonea angustifolia*^{48,59}) y Asteraceae (*Baccharis heterophylla*⁵⁵, *Baccharis sarothroides*⁵⁵, *Baccharis uaccinoides*⁵⁵, *Baccharis dracunculifolia*⁵⁰, *Pulicaria salviifolia*⁵⁴, *Laennecia sophiifolia*⁶⁰). No se tienen registros publicados de este diterpeno como un componente fitoquímico en plantas del género *Salvia*, por lo cual en esta tesis es la primera vez que se describe su aislamiento.

Por otro lado, este clerodano posee diversos tipos de actividades biológicas, entre ellas, como agente hepatoprotector frente a hepatotoxicidad inducida por tetracloruro de carbono (CCl₄) en ratas⁵⁷ y actividad antiinflamatoria en modelos de edema en oreja de ratón, mostrando una inhibición del 87.1% a una dosis de 1 mg de ácido hautriwáico por ensayo⁵⁸.

El ácido hautriwáico también presentó una moderada actividad contra *Plasmodium falciparum* (protozooario causante de malaria), con valores de IC₅₀=3 µg/mL usando la variedad “D6” susceptible a cloroquina (fármaco usado para el tratamiento o prevención de malaria) y IC₅₀=2.6 µg/mL con la variedad “W2” resistente a cloroquina.⁵⁰

Así mismo, se ha encontrado que tiene bajos efectos como antibacterial contra *Staphylococcus aureus* con MIC < 250 µg por ensayo y *Bacillus pumilus* MIC < 150 µg por ensayo (cada ensayo realizado en cajas Petri de 5 mm de diámetro y 2 mm de profundidad).⁴⁸

Sus efectos antialimentarios, se han probado utilizando discos de hojas provenientes de plantas de chile o papa cortados de 1 cm² de área, cuya superficie superior fue cubierta con 10 µL de ácido hautriwáico a diferentes concentraciones, para los que resultó activo contra *Leptinotarsa decemlineata*⁶⁰ en su estado adulto (principal plaga en los cultivos de papa) a un valor de IC₅₀= 50 µg/cm², en larvas de *Spodoptera littoralis*⁶⁰ (plaga que afecta cultivos hortícolas), mostrando un valor de IC₅₀ < 0.5 µg/cm², en larvas de *Spodoptera frugiperda*⁶⁰ (plaga que ataca cultivos de maíz y algodón), con un valor de IC₅₀ < 28 µg/cm² y en *Tribolium castaneum*⁵¹ (plaga que infesta molinos de harina, almacenes y tiendas de comestibles).

6.5 EVALUACIÓN BIOLÓGICA

Debido a que los componentes terpénicos aislados de *S. lasiantha* ya estaban reportados en la literatura y sus efectos biológicos se encontraban ampliamente estudiados, se optó por complementar la información existente con estudios de citotoxicidad en líneas celulares cancerosas humanas, probando los dos diterpenos de tipo clerodano encontrados (ácido hautriwáico y su derivado lactonizado).

La evaluación citotóxica, fue efectuada por el Laboratorio de Pruebas Biológicas del Instituto de Química. Realizaron un screening primario siguiendo el protocolo *Sulforodamina B*, descrito por el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos de Norteamérica, a una concentración 50 µM y utilizando como vehículo dimetilsulfóxido. (Figura 28.)

Muestra	% de inhibición del crecimiento (antiproliferativo)						
	U251	PC-3	K562	HTC-15	MCF-7	SKLU-1	FGH
Ácido Hautriwáico	54.5	25.6	69.15	20.22	17.4	8.8	52.5
Lactona del Ácido Hautriwáico	45.6	34.57	79.3	30.7	8.9	35.0	53.8

Figura 28. Resultados del screening primario para citotoxicidad en líneas celulares cancerosas humanas. Líneas celulares: U251= glía de sistema nervioso central, PC-3= próstata, K56 = leucemia, HTC-15= colon, MCF-7= mama, SKLU-1 = pulmón, FGH= Cultivo Primario de Fibroblastos Gingivales Humanos sanos (control).

En los resultados obtenidos que se muestran en la tabla de la **Figura 28.**, el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento que se tuvo para ambos clerodanos, fue en las líneas celulares U251 (glía sistema nervioso central) y K562 (leucemia).

Sin embargo, es importante señalar que en cuanto FGH, esto es, el cultivo primario de fibroblastos gingivales (células humanas sanas), también hay una actividad inhibitoria importante de alrededor del 50%, lo que quiere decir que no solo inhibe el crecimiento de células cancerosas, sino que también ataca células sanas, un efecto no deseado.

Es por esta razón que desafortunadamente ninguno de los dos clerodanos es viable para este uso, ya que es un tratamiento muy agresivo a pesar de presentar efectos antiproliferativos selectivos.

6.6 COMPARACIÓN ENTRE ECOTIPOS DE *Salvia lasiantha* (Benth)

La heterogeneidad en el hábitat de los organismos vegetales debido a su distribución geográfica, condiciones climáticas, entre otros factores bióticos y abióticos, pueden estimular que se originen diferentes poblaciones de plantas dentro de una misma especie (ecotipos), los cuales son genéticamente distintos como resultado de esta adaptación.⁶¹

A continuación, se realiza la comparación entre ecotipos de *Salvia lasiantha* (Benth) que han sido estudiados hasta la fecha, incluyendo las aportaciones del presente trabajo.

El primer ecotipo estudiado, fue proveniente de la región de Tamazulapan, Oaxaca. Su colecta se realizó en el año de 1987 y fue aislada la lasiantina, un neo-clerodano diterpenoide en cantidad abundante, así como β -sitosterol y ácido oleanólico de las partes aéreas de la plata.¹² (ver sección 2.3, **Figura 1.**)

El segundo ecotipo analizado, fue dos años después, originario de San Cristóbal de las Casas, Chiapas. Su colecta fue realizada en noviembre de 1989 y nuevamente fue aislada de las partes aéreas la lasiantina y el ácido oleanólico, adicionalmente también se encontraron dos nuevos derivados de la lasiantina.¹³ (ver sección 2.3, **Figura 1.**)

En agosto de 1996, se estudiaron las raíces de otro ejemplar proveniente de Oaxaca (mismo ecotipo que el colectado en 1987), del que fueron aislados carioical, un seco-abietano diterpenoide y salviasperanol, un icetexano diterpenoide.¹⁴ (ver sección 2.3, **Figura 1.**)

De lo anterior, es importante destacar que el contenido de los metabolitos secundarios encontrados al estudiar las partes aéreas o de las raíces del material vegetal, es muy distinto a pesar de pertenecer al mismo ecotipo, esto es, que su producción cambia según el órgano vegetal que se estudie.

Por otro lado, cuando se comparan distintos ecotipos, tales como el originario de Chiapas *versus* el de Oaxaca, en donde estudiaron las partes aéreas para ambos casos, puede notarse una gran similitud en los compuestos aislados, lo que sugiere que, aunque la distribución de metabolitos es distinta a lo largo de la planta, si es característica de cada órgano vegetal que la conforma (raíces, hojas, flores o frutos).

En septiembre del 2012, se hizo el estudio de un tercer ecotipo de *S. lasiantha* colectado en el Valle de Tehuacán, Puebla. Se encontró un alto contenido de flavonoides, pero no se lograron aislar compuestos diterpénicos (comunicación personal), razón por lo cual, no existe algún registro publicado.

Sin embargo, ya que se realizó en el mismo grupo de trabajo dirigido por el M. en C. Baldomero Esquivel, se sabe que tanto el método de extracción como el fraccionamiento primario fue hecho de la misma forma en que el descrito en esta tesis en las secciones 5.2 y 5.3.

Por último, la aportación de este trabajo al estudio fitoquímico de *S. lasiantha*, se realizó con otro ecotipo originario de Puebla, pero de la región de San Bartolo Teontepec. Colectado en septiembre del 2015 y del cual fue aislado ácido hautriwáico, su derivado lactonizado y la mezcla de ácidos oleanólico, ursólico. También se observó que el extracto poseía un alto contenido flavonoide, como la eupatorina.

Se realizó una comparación a través de CCD del contenido de compuestos presentes en los extractos de las partes aéreas, posterior a su fraccionamiento primario (ver sección 5.2), de los dos ejemplares de *S. lasiantha* del mismo ecotipo de Puebla (años 2012 y 2015). Como puede observar se en la **Imagen 14.**, el ejemplar colectado en 2012, muestra notablemente menos componentes (bandas) que el del ejemplar colectado en 2015.

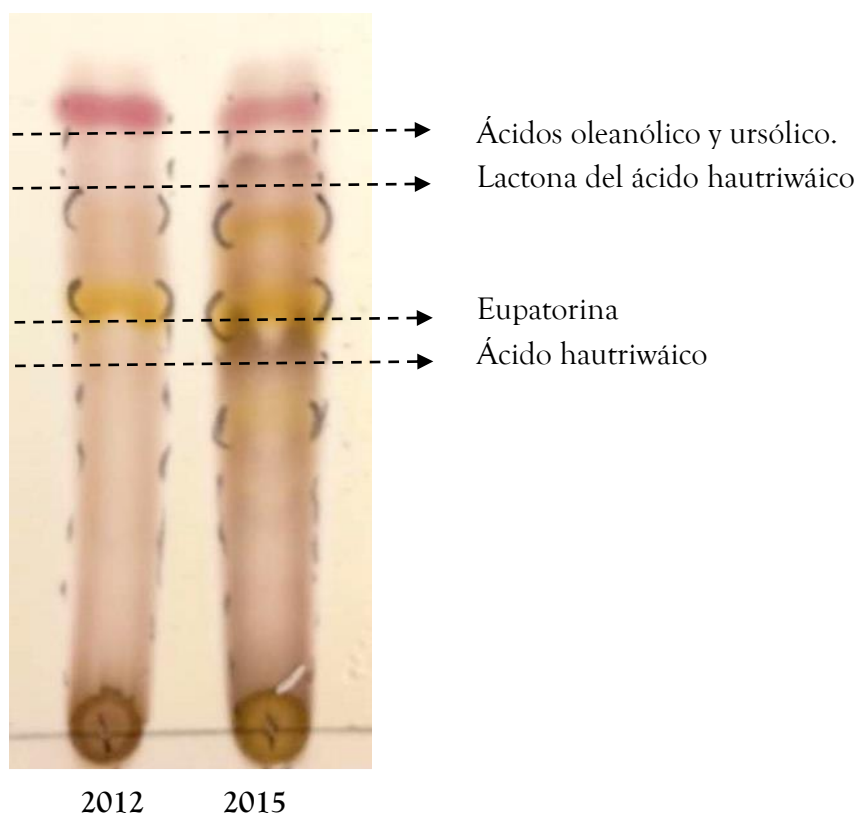


Imagen 14. CCD en la que se compara el contenido de los compuestos presentes en el extracto después de su fraccionamiento primario en dos ejemplares de *S. lasiantha* del mismo ecotipo proveniente de Puebla. A la izquierda el ejemplar colectado 2012 y a la derecha el ejemplar colectado en 2015. Placa eluida tres veces en un sistema Hexano/Acetona en proporción (2:1).

Entre sus similitudes, destaca el contenido flavonoide (bandas color amarillo) que, aunque se observa en menor cantidad para la muestra del 2012, la banda correspondiente a eupatorina se encuentra presente en ambos extractos y en proporción similar. Así mismo, la mezcla de los triterpenos ácidos oleanólico y ursólico (banda color rosa) se visualiza para las dos muestras en cantidad equivalente. **Imagen 14.**

Por otro lado, es muy marcada la diferencia respecto al contenido de compuestos diterpénicos (bandas que revelan color marrón) pertenecientes al ácido hautriwáico y su derivado lactonizado ya que, en el ejemplar del 2012, están prácticamente ausentes a pesar de que pertenecen al mismo ecotipo y fueron colectadas en la misma temporada. **(Imagen 14).**

Estos cambios en su composición química, pueden explicarse considerando a los metabolitos secundarios como sustancias que desempeñan un papel importante en la adaptación al medio ambiente y como defensa contra herbívoros o agentes patógenos.

Su producción y acumulación generalmente es baja (mejor al 1% del peso de la planta seca) y a menudo ocurre en plantas sometidas a condiciones de estrés provocadas por factores bióticos como lo son herbívoros, agentes patógenos tales como hongos y la actividad humana (como la tala o ganadería) y factores abióticos que están relacionados al clima y condiciones geográficas, como lo es la temperatura, altura, humedad, intensidad de la luz (cantidad de radiación UV), el suministro de agua, deficiencias de nutrientes (minerales), alcalinidad del suelo, la alta salinidad y cantidad de CO₂.⁶²

Dichas condiciones, pueden ser potencialmente dañinas o causar efectos adversos en el crecimiento y desarrollo de la planta, por lo que las concentraciones de los diversos productos naturales, dependen fuertemente de estos factores.⁶²

Específicamente, la comparación entre los dos ejemplares de *S. lasiantha* pertenecientes al ecotipo de Puebla, indica que la región de San Bartolo Teontepec, se encuentra más degradada en comparación con la zona cercana al Valle de Tehuacán, probablemente debido

a una mayor actividad humana en donde se colectó el material vegetal, favoreciendo así la producción de metabolitos secundarios en el ejemplar del año 2015. (Imagen 15.)



Imagen 15. Mapa que muestra los sitios de colecta de los dos ejemplares de *Salvia lasiantha* en los años 2012 y 2015, clasificados como el ecotipo de Puebla. (©2017 DigitalGlobe, Google Earth.)

Otra posibilidad, es que existiera una mayor presencia de herbívoros o plagas en San Bartolo Teontepec, lo que explicaría que los clerodanos aislados se distinguen por su gran potencial antialimentario.

Es por esto que a pesar de que *S. lasiantha* ya haya sido estudiada con anterioridad, es importante continuar su investigación ya que pueden realizarse nuevas aportaciones que sean de ayuda como indicadores quimiotaxonómicos del género *Salvia* o incluso que la producción de metabolitos secundarios pueda ser usada como señalizadores de que tan degradada se encuentra una región.

7 CONCLUSIONES

Se llevó a cabo el aislamiento, purificación y caracterización de cuatro diferentes compuestos a partir del extracto acetónico de *S. lasiantha* mediante técnicas cromatográficas. La estructura química de los metabolitos aislados, se dedujo a través de técnicas espectroscópicas (RMN, FT-IR), espectrométricas (EM), propiedades físicas (punto de fusión) y por comparación de estos parámetros con los ya publicados.

Se obtuvo una mezcla isomérica de triterpenos (ácidos oleanólico y ursólico) y también una flavona (eupatorina), sustancias que se encuentran frecuentemente en el género *Salvia* y que están ampliamente distribuidas en las plantas.

Se aislaron y purificaron dos metabolitos secundarios diterpénicos de tipo clerodano (ácido hautriwáico y su derivado lactonizado). Aunque los compuestos mencionados ya han sido reportados previamente, hasta el momento, únicamente se han descrito para la familia Asteraceae. Lo anterior, hace nuevas aportaciones a la composición fitoquímica de las salvias mexicanas y de la familia Lamiaceae.

Se realizó una amplia búsqueda de información sobre la variedad de estudios de actividad biológica que existen de las cuatro sustancias aisladas. Entre lo más relevante, se encontró que de los dos diterpenos, la lactona del ácido hautriwáico presentaba mayores efectos biológicos en comparación con su precursor, el ácido hautriwáico (poco activo), lo que daba pauta de que la presencia simultánea del anillo de furano junto con el anillo pentacíclico de γ -lactona α , β -insaturada situada entre las posiciones 4 y 5, mejoran la actividad biológica en estructuras de tipo clerodano.

Se complementó la información existente de ambos diterpenos aislados con la evaluación de la actividad citotóxica en líneas celulares cancerosas humanas. Encontrándose que desafortunadamente ninguno de los dos clerodanos era viable para este uso, ya que es un tratamiento muy agresivo para las células humanas sanas, a pesar de presentar altos efectos antiproliferativos y selectivos.

Finalmente, por primera vez se realizó una comparación entre distintos ecotipos de *S. lasiantha*, confirmándose que los metabolitos secundarios son característicos de cada una de las partes de la planta (raíces, hojas, flores y/o frutos) y que su síntesis y acumulación depende fuertemente de diversos factores bióticos y abióticos bajo las que se desarrolle el ejemplar vegetal.

Específicamente, al comparar los ejemplares del ecotipo de Puebla, se concluye que la zona de San Bartolo Teontepec está más degradada y posiblemente hay una mayor actividad humana y/o presencia de herbívoros, lo que explica que los clerodanos aislados se distingan por su gran potencial antialimentario.

8 REFERENCIAS

1. Taiz, L., Zeiger, E., MØller, I., Murphy, A., "Plant Physiology and Development.", sexta edición., Sinauer Associates Inc. (2015).
2. Croteau, R.; Kutchan, T.M.; Lewis, N.G., "Natural Products (Secondary Metabolites).", In: Buchanan, Gruissem, Jones, eds. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland, Estados Unidos. (2000). Cap. 24.
3. Villaseñor, J.L., "Checklist of the native vascular plants of Mexico.", Revista Mexicana de Biodiversidad, (2016), v. 87, pp. 559-902.
4. Martínez-Gordillo, M., "Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo.", Revista Mexicana de Biodiversidad, (2013), v. 84, pp. 30-86.
5. Domínguez-Vázquez, G., Castro-Ramírez, A.E., "Usos Medicinales de la Familia Labiatae en Chiapas, México.", Etnobiología, (2002), v. 2, pp. 19-31.
6. Clebsch, B., "The new book of salvias: sages for every garden.", Portland Oregon: Timber Press, (2008).
7. Wu, Y., Ni, Z., Shi, Q., "Constituents from Salvia Species and Their Biological Activities.", Chem. Rev., (2012), v. 112:11, pp. 597-6026.
8. Topçu, G., "Bioactive Triterpenoids from Salvia Species.", J. Nat. Prod., (2006), v. 69, pp. 482-487.
9. Jay, B., Walker, J., "Salvia (Lamiaceae) is not Monophyletic: Implications for the Systematics, Radiation, and Ecological Specializations of Salvia and Tribe Mentheae.", Am. J. Bot., (2004), v. 91:7, pp. 1115-1125.
10. Esquivel B., "Rearranged Clerodane and Abietane Derived Diterpenoids from American Salvia species.", Natural Products Communications, (2008), v. 3, pp. 989-1002.
11. Pool, A., Knapp, S., Davidse, G., Sousa, S., Chiang, F., "Lamiaceae.", Flora Mesoamericana, (2012), v. 4:2, pp. 1-195.
12. Sánchez, A.A., Esquivel, B., Pera, A., Cárdenas, J., Soriano-García, M., Toscano, A., Rodríguez-Hahn, L., "Lasianthine, a neo-cleroane diterpenoid from Salvia lasiantha.", Phytochemistry, (1987), v. 26, pp. 479.

13. Roque Villada, Estala. (1995). Estudio Fitoquímico de *Salvia lasiantha*. Disertación de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
14. Esquivel, B., Calderón, J.S., Arano, M.G., Hernández, P.M., Sánchez, A.A., “*Diterpenoids from the roots of Mexican Salvia species. Phytogeographical and evolutionary significance.*” Revista Latinoamericana de Química, (2005), v. 33, pp. 82-89.
15. Leland, J. C., et. al., “*Natural Products from plants.*”, segunda edición, Taylor and Francis group, EUA, (2006).
16. Gershenzon, J., McCaskill, D., Rajaonarivony, J., Mihaliak, C., Karp, F., Croteau, R., “*Isolation of secretory cells from plant glandular trichomes and their use in biosynthetic studies of monoterpenes and other gland products.*”, Anal Biochem., (1992), v. 200:1, pp. 130-138.
17. Dewick, M. P., “*Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach.*”, tercera edición, Wiley, Inglaterra, (2009).
18. Li, R., Morris-Natschkeb, S., Lee, K., “*Clerodane diterpenes: sources, structures, and biological activities.*”, Nat. Prod. Rep., (2016), v. 33, pp. 1166-1226.
19. Domínguez, M., Mossner, E., de la Torre, M., Rodríguez, B., “*Hemisynthesis of Some Biogenetically Anomalous 17 β -neoclerodane Diterpenoids.*”, Tetrahedron, (1998), v. 54:47, pp. 14377-14400.
20. Osamu, S., Kumi, N., Setsuko, S., “*Simple Preparative Isolation of Salvinorin A from the Hallucinogenic Sage, Salvia divinorum, by Centrifugal Partition Chromatography.*”, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, (2007), v. 30:8, pp. 1105-1114.
21. Andersen, Ø; Markham, K., “*Flavonoids. chemistry, biochemistry and applications.*”, Taylor & Francis. USA., (2006), pp. 1197.
22. Kruse, M., Strandberg, M., Strandberg, B., “*Ecological Effects of Allelopathic Plants—A Review.*”, National Environmental Research Institute (NERI) Technical Report, (2000), No. 315. Silkeborg, Denmark.
23. Inderjit, “*Plant phenolics in allelopathy.*”, Bot. Rev., (1996), v. 62:2, pp. 186-202.
24. Forkmann, G., “*Flavonoids as flower pigments: the formation of the natural spectrum and its extension by genetic engineering.*”, Plant Breeding, (1991), v. 106:1, pp. 1-26.
25. Lunau, K., “*A new interpretation of flower guide coloration—absorption of ultraviolet-light enhances color saturation.*”, Plant Systematics and Evolution, (1992), v.183, pp. 51-65.
26. Still, W.C.; Kahn, M.; Mitra, A., “*Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution.*”, J. Org. Chem., (1978), v. 43:14, pp. 2923-2925.

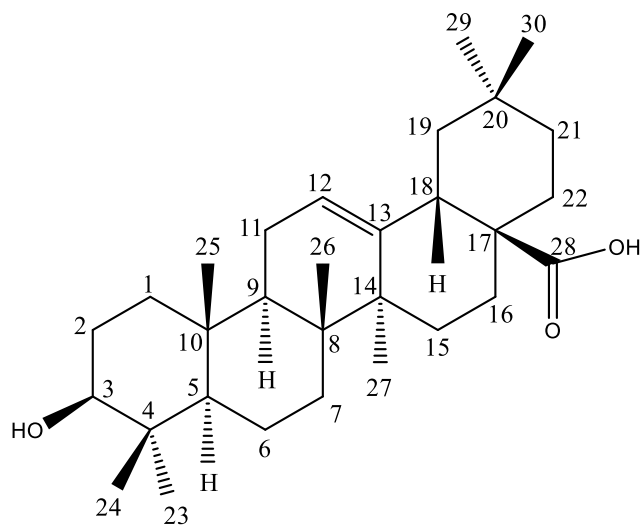
27. Ghisalberti E. L., Jeffries P. P., Mori T. A., Skeleton B. W., White A. H., "A new class of macrocyclic diterpenes from (*euphorbiaceae*)", *Tetrahedron*, (1985), 41, pp. 2517-2526.
28. Hans, Henke., "Preparative Gel Chromatography on Sephadex LH-20", Ed. Wiley (1999).
29. Still, W.C.; Kahn, M.; Mitra, A.; "Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution.", *J. Org. Chem.* (1978), v 43:14, pp. 2923-2925.
30. Seebacher, W., Simic, N., Weis, R., Saf, R., Kunert, O. "Spectral Assignments and Reference Data.", *Magn. Reson. Chem.* (2003) v.41: pp. 636-638.
31. Liu, J., "Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives.", *Journal of Ethnopharmacology*, (2005), v. 100, pp. 92-94.
32. Javadi, B., Sahebkar, A., "Natural products with anti-inflammatory and immunomodulatory activities against autoimmune myocarditis.", *Pharmacological Research*, (2017).
33. Silva, F., Oliveira, P., Duarte, M., "Oleanolic, Ursolic, and Betulinic Acids as Food Supplements or Pharmaceutical Agents for Type 2 Diabetes: Promise or Illusion?," *J. Agric. Food Chem.*, (2016), v. 64, pp. 2991-3008.
34. Barbieri, R., Coppoa, E., Marchese, A., Daglia, M., "Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity." *Microbiological Research*, (2017), v. 196, pp. 44-68.
35. Iinuma, M., Matsuura, S., and Kusuda K. "¹³C Nuclear magnetic resonance (NMR) spectral studies on polysubstituted flavonoids. I. ¹³C-NMR spectra of flavones.", *Chem. Pharm. Bull.* (1980), v. 28, pp. 708-716.
36. Dolečková, I., Rárová, L., Grúz, J., Vondrusová, M., Strnad, M., Kryštof, V., "Antiproliferative and antiangiogenic effects of flavone eupatorin, an active constituent of chloroform extract of *Orthosiphon stamineus* leaves.", *Fitoterapia* (2012) v. 83 pp. 1000-1007.
37. Nagao, T., Abe, F., Kinjo, J., Okabe, H., "Antiproliferative constituents in plants Flavones from the leaves of *Lantana montevidensis* Briq. and consideration of structure-activity relationship." *Biol Pharm Bull*, (2002), v. 25: pp. 875-9.
38. Androutsopoulos, V., Arroo, R.R., Hall, J.F., Surichan, S., Potter, G.A., "Antiproliferative and cytostatic effects of the natural product eupatorin on MDA-MB-468 human breast cancer cells due to CYP1-mediated metabolism." *Breast Cancer Res*, (2008), v.10:3, R39.
39. González-Chávez, M., Ramos-Velázquez, C., Serrano-Vega R., "Anti-inflammatory activity of standardized dichloromethane extract of *Salvia connivens* on macrophages stimulated by LPS.", *Pharmaceutical Biology*, (2017), v. 55:1, pp. 1467-1472.

40. Yama, M., Tan, C., Ahmad, M., Shibao, R., “Mechanism of vasorelaxation induced by eupatorin in the rats aortic ring.”, *European Journal of Pharmacology*, (2016), v. 789, pp. 27–36.
41. Salmela, A., Pouwelsa, J., Kukkonen-Macchia, A., “The flavonoid eupatorin inactivates the mitotic checkpoint leading to polyploidy and apoptosis.”, *Experimental cell Research*, (2012), v. 318, pp. 578–592.
42. UNIIQUIM. 2015. Eupatorina. Consultado el 22 de agosto del 2017 en: <https://uniquim.iquimica.unam.mx/compuesto-item/eupatorina-1187/>
43. Lu, Y., L.Yeap, F., “Polyphenolics of *Salvia*—a review.”, *Phytochemistry*, (2002), v. 59, pp. 117–140.
44. Sánchez, A., Esquivel, B., Rmamoorthy, T.P., Rodríguez-Hahn, L., “Clerodane Diterpenoids from *Salvia Urolepis*”, *Phytochemistry*, (1995), v. 38:1, pp. 171-174.
45. Bustos, C., “Estudio biodirigido de los componentes antiinflamatorios de *Salvia thymoides* Benth”. Disertación de Tesis para obtener el grado de Maestría. I.Q., UNAM.
46. Hsü, H., Chen, Y., Kakisawa, H., “Structure of *Hautriwaic Acid*.”, *Phytochemistry*, (1971), v. 10, pp. 2813-2814.
47. Jefferies, P., Payne, T., “Diterpenes of the cascarillin group from *Dodoneae ssp.*”, *Tetrahedron Letters*, (1967), v. 48, pp. 4777-4782.
48. Omosa, L., Amugune, B., Ndunda, B., Milugo, T., “Antimicrobial flavonoids and diterpenoids from *Dodonea angustifolia*.”, *South African Journal of Botany*, (2014), v. 91, pp. 58–62.
49. Sosa, M. E., “Insect antifeedant activity of clerodane diterpenoids.”, *Journal of Natural Products*, (1994), v. 7:9, pp. 1262-1265.
50. Da Silva Filho, A.A., Resende, D.O., Fukui, M.J., Santos, F.F., “In vitro antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of phenolics and triterpenoids from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae).”, *Fitoterapia*, (2009), v. 80, pp. 478–482.
51. Hikawczuk, V., López, M., Borkowski, E., Sosa, M.E., “Antifeedant activity of neo-clerodane diterpenes from *Baccharis flabellata* Hook & Arn var. *flabellate* toward *Tribolium castaneum* Herbst: structure–activity relationships.”, *Natural Product Research*, (2006), v. 20:9, pp. 813–819.
52. Gómez-Hurtado, M., Torres-Valencia, J., Manríquez-Torres, J., “Absolute configuration of labdanes and ent-clerodanes from *Chromolaena pulchella* by vibrational circular dichroism.”, *Phytochemistry*, (2011), v. 72, pp. 409–414.
53. Bohlmann, F., Zdero, C., Huneck, S., “Diterpenes from *Heteropappus altaicus*.”, *Phytochemistry*, (1985), v. 24:5, pp. 1027-1030.

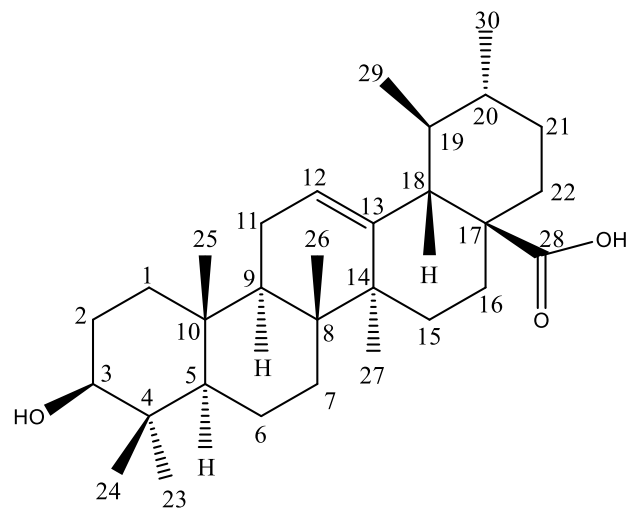
54. Eshbakova, K.A., Saidkhodzhaev, A.I., "*Hautriwaic Acid from Pulicaria salwiifolia.*", Chemistry of Natural Compounds, (2002), v. 38:4, pp. 326-327.
55. Arriaga-Giner, F., Wollenweber, E., Schober, I., Dostal, P., Braun, S., "*2 β -Hidroxyhautriwaic acid, a clerodane type diterpenoid and other terpenoids from three Baccharis species.*", Phutochemistry, (1986), v. 25:3, pp. 719-721.
56. Huang, Z., Jiangb, M., Zhou, Z., Xua, D., "*Two New Clerodane Diterpenes from Dodonaea viscosa.*", Z. Naturforsch. (2010), v. 65b, pp. 83-86.
57. Ali, H., Kabir, N., Muhammad, A., Shah, R., "*Hautriwaic acid as one of the hepatoprotective constituent of Dodonaea viscosa.*", Phytomedicine, (2014), v. 21, pp. 131- 140.
58. Salinas-Sánchez, D., Herrera-Ruiz, M., Pérez, S., "*Anti-inflammatory Activity of Hautriwaic Acid Isolated from Dodonaea viscosa Leaves.*", Molecules, (2012), v. 17, pp. 4292-4299.
59. Chinsembu, K., "*Tuberculosis and nature's pharmacy of putative anti-tuberculosisagents.*", Acta Tropica, (2016), v. 153, pp. 46-56.
60. González-Coloma, A., Guadaño, A., Tonn, C., "*Antifeedant/Insecticidal Terpenes from Asteraceae and Labiatae Species Native to Argentinean Semi-arid Lands.*", Z. Naturforsch., (2005), v. 60c, pp. 855-861.
61. Hufford, K. M., Mazer, S.J., Review "*Plant ecotypes: genetic differentiation in the age of ecological restoration.*", TRENDS in Ecology and Evolution, (2003), v. 18: 3, pp. 147-155.
62. Ramakrishna, A., Aswathanarayana Ravishankar G., "*Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants.*" Plant Signaling & Behavior, v. 6:11, pp. 1720-1731.

A.1	Espectros Ácidos Oleanólico y Ursólico	72
A.1.1	IR	73
A.1.2	RMN- ¹ H	74
A.1.3	RMN- ¹³ C	75
A.1.4	HSQC	76
A.2	Espectros Eupatorina	77
A.2.1	IR	78
A.2.2	RMN- ¹ H	79
A.2.3	RMN- ¹ H + D ₂ O	80
A.2.4	RMN- ¹³ C	81
A.2.5	HSQC	82
A.2.6	HMBC	83
A.3	Espectros Lactona del Ácido Hautriwáico	84
A.3.1	IR	85
A.3.2	RMN- ¹ H	86
A.3.3	RMN- ¹³ C	87
A.3.4	HSQC	88
A.3.5	HMBC	89
A.4	Espectros Ácido Hautriwáico	90
A.4.1	IR	91
A.4.2	RMN- ¹ H	92
A.4.3	RMN- ¹³ C	93
A.4.4	HSQC	94
A.4.5	HMBC	95

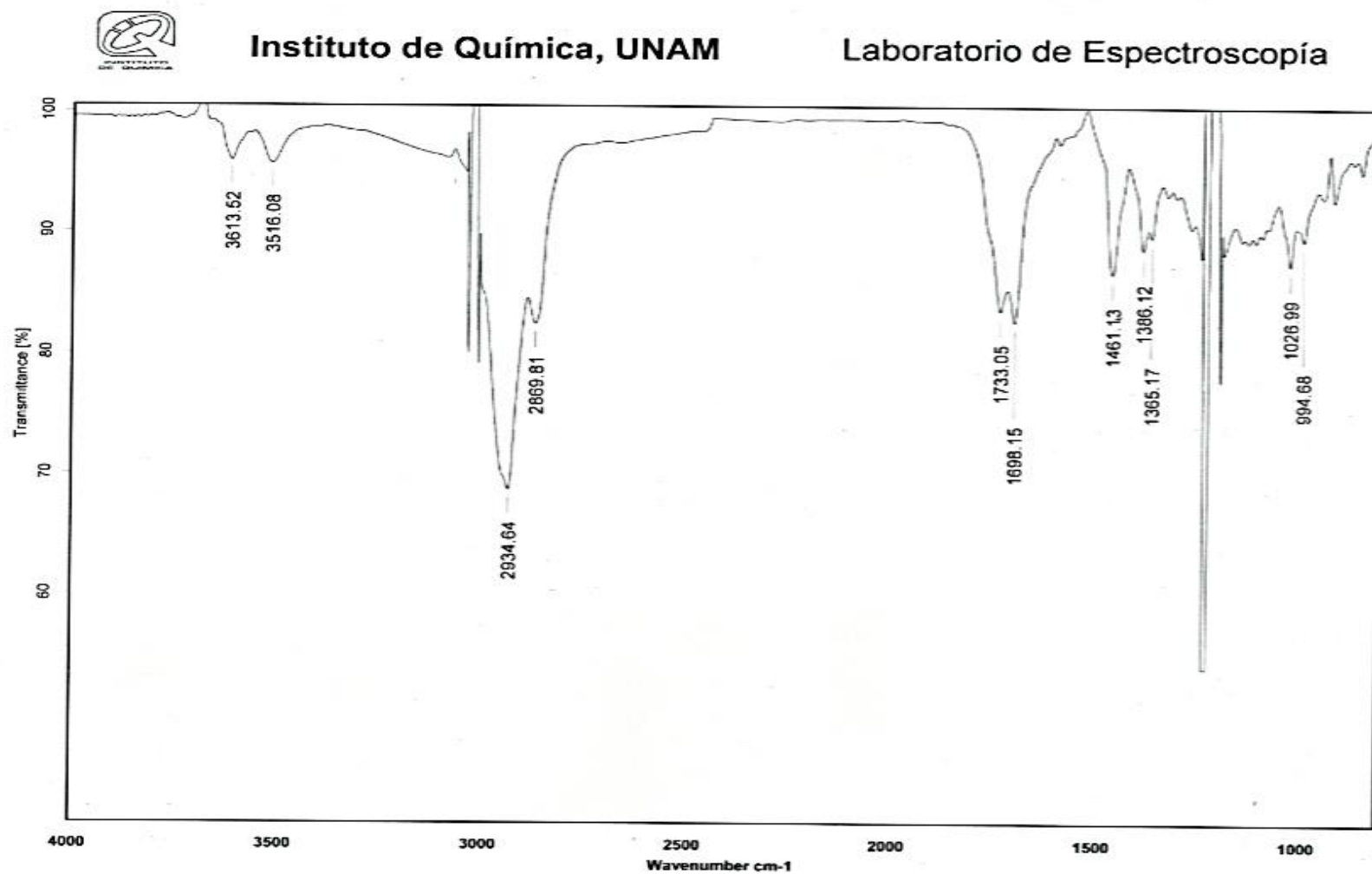
A.1. Ácidos Oleanólico y Ursólico

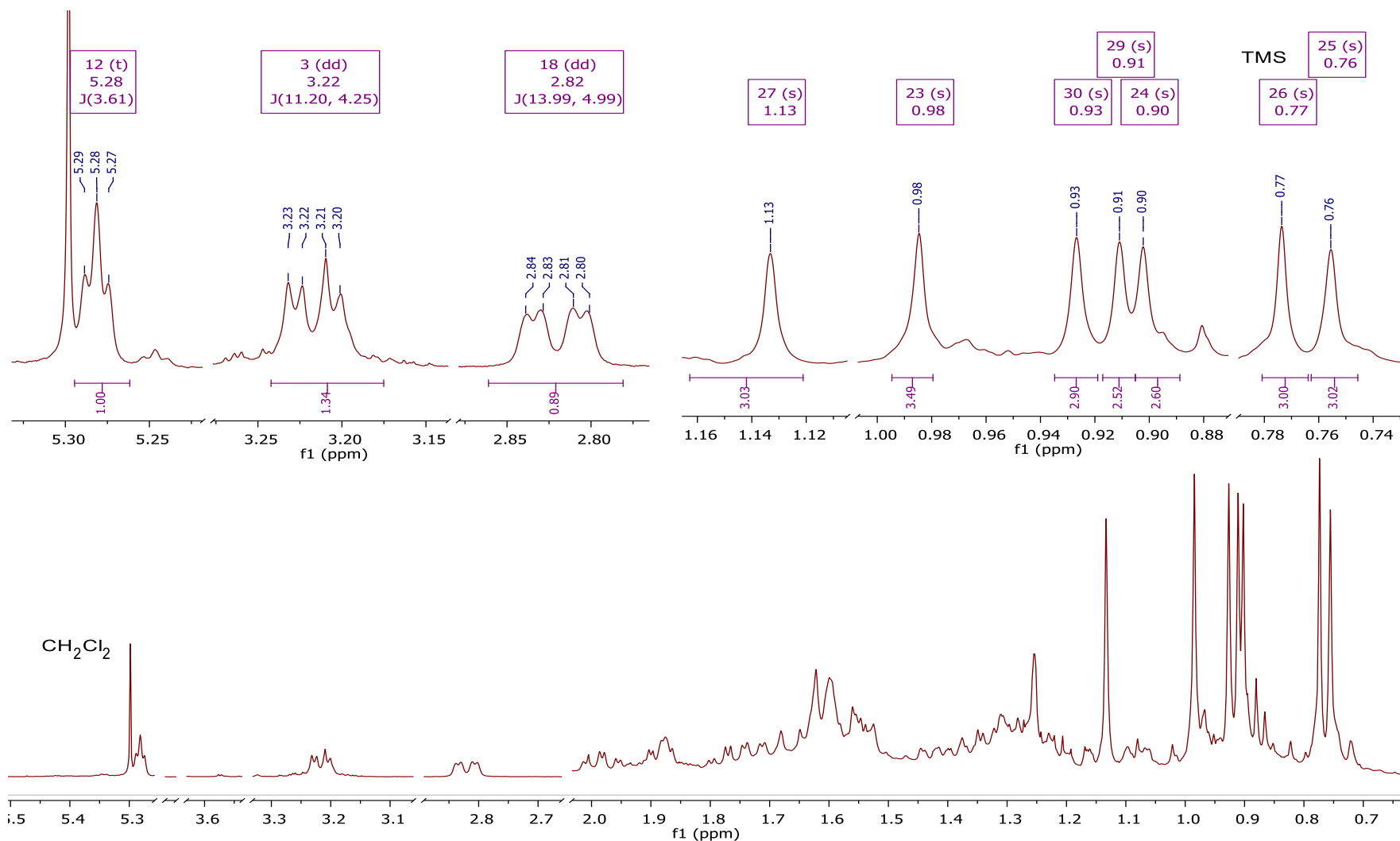


Ácido oleanólico



Ácido ursólico

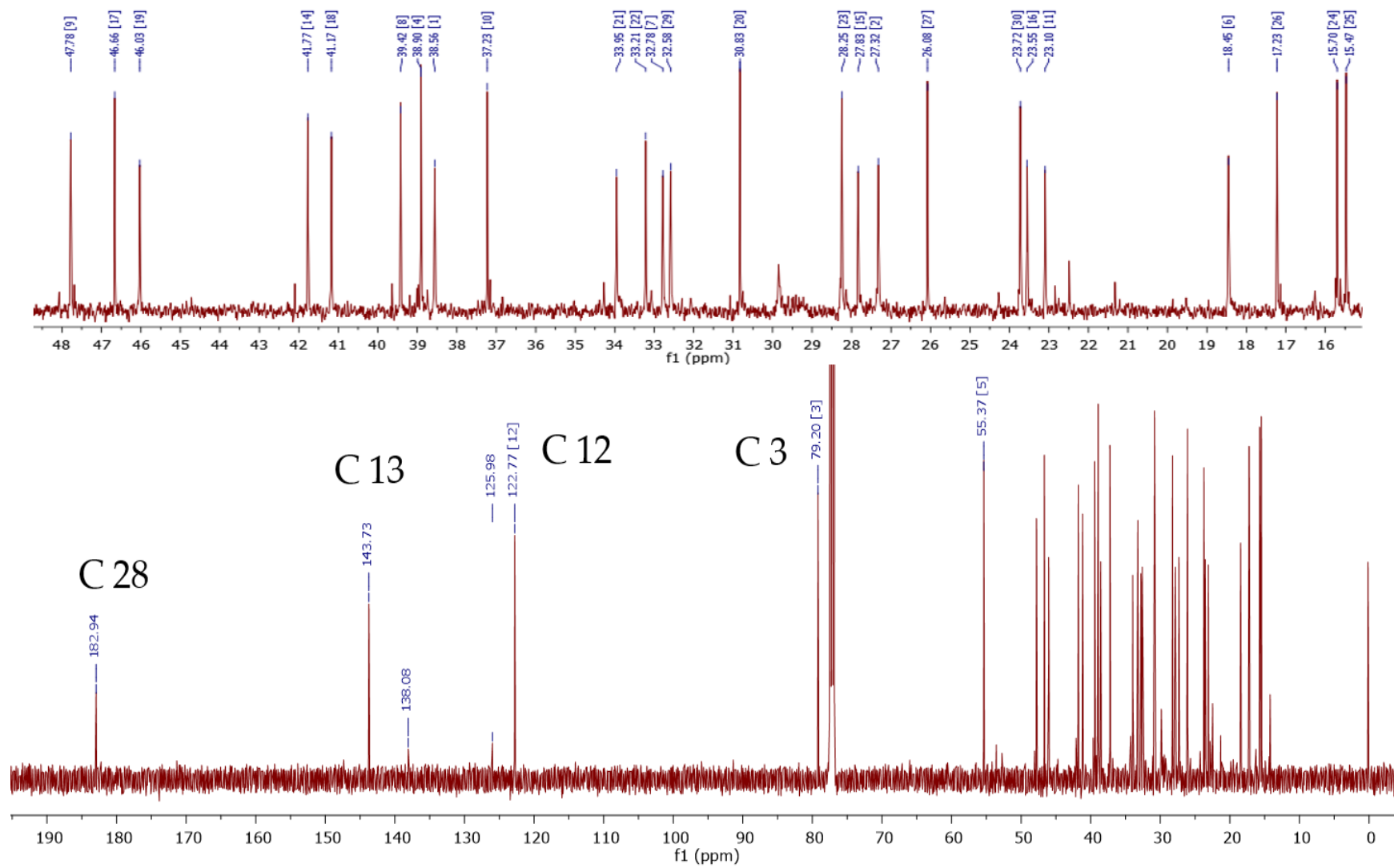


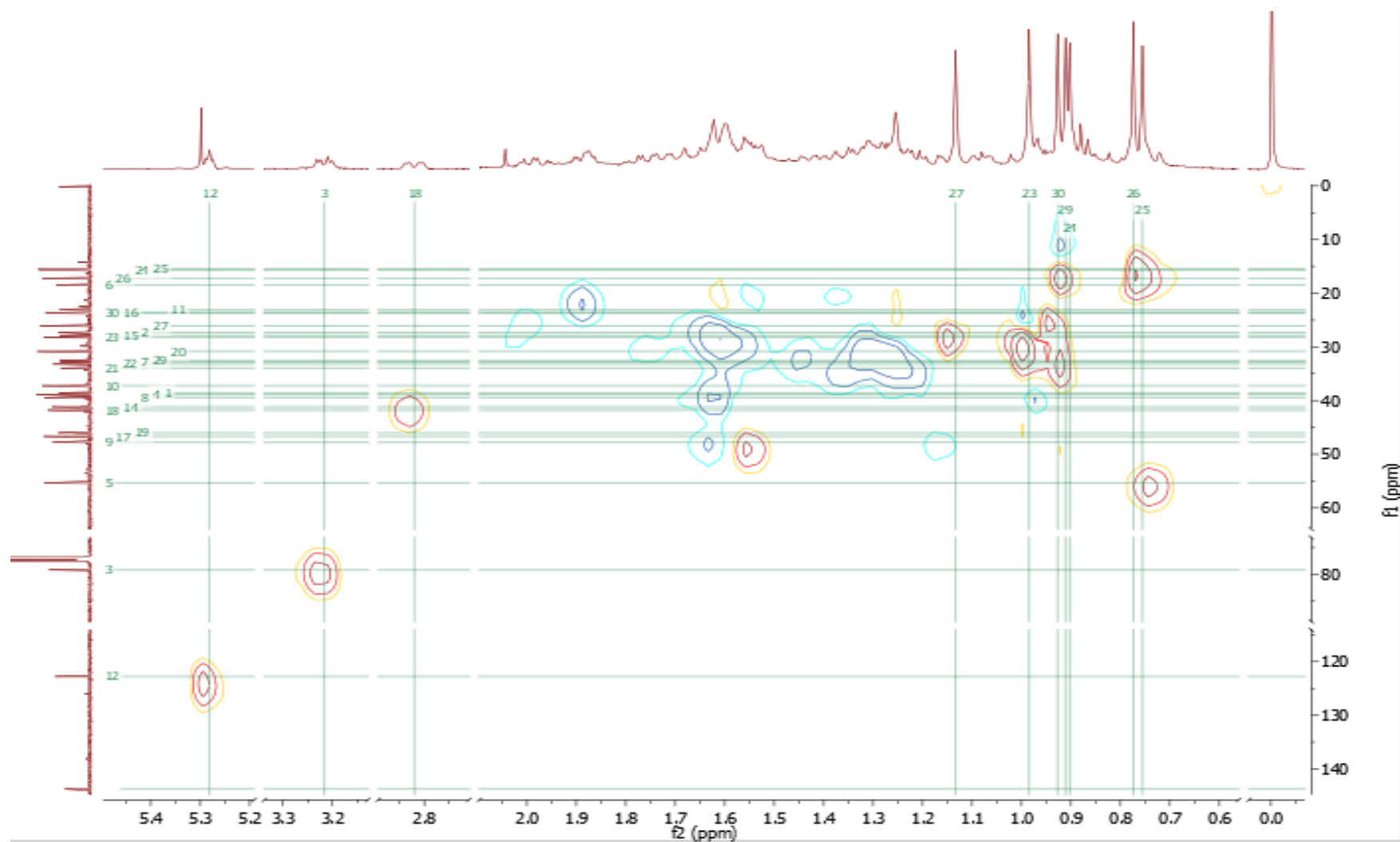


A.1.3 Ácidos Oleanólico y Ursólico

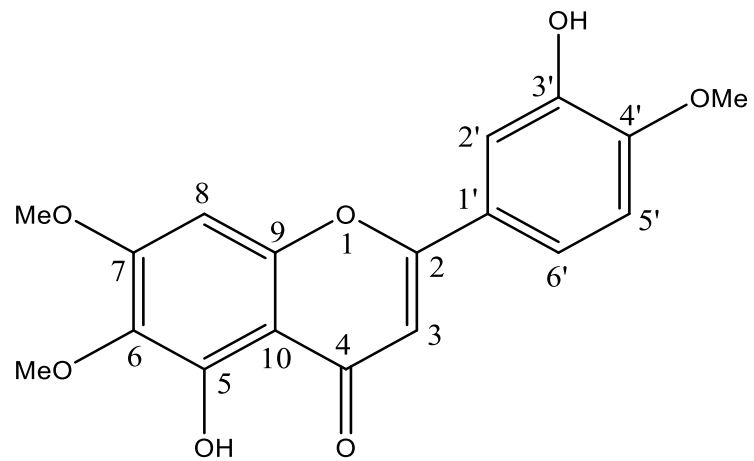
RMN-¹³C

125 MHz CDCl₃





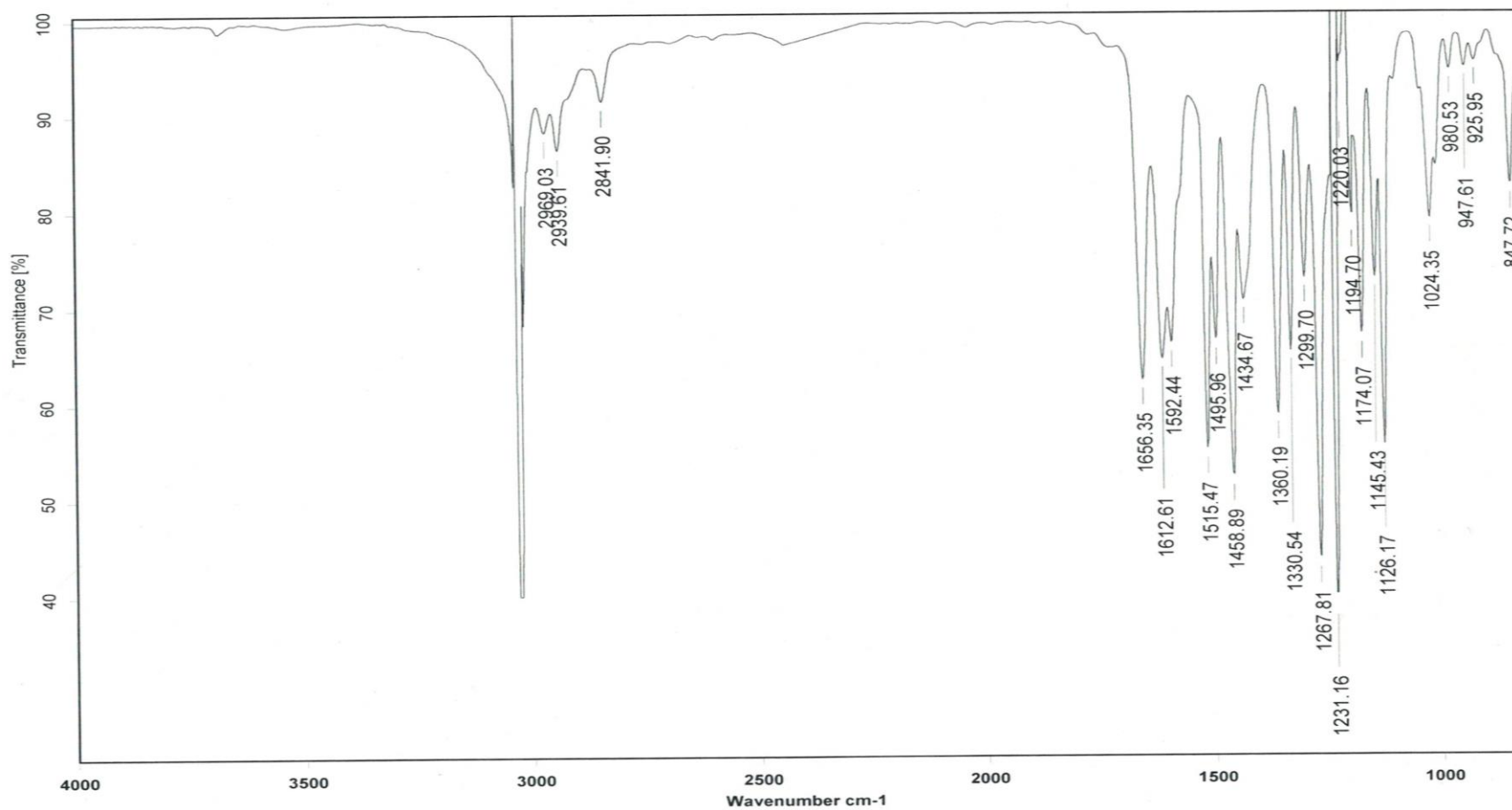
A.2. Eupatorina





Instituto de Química, UNAM

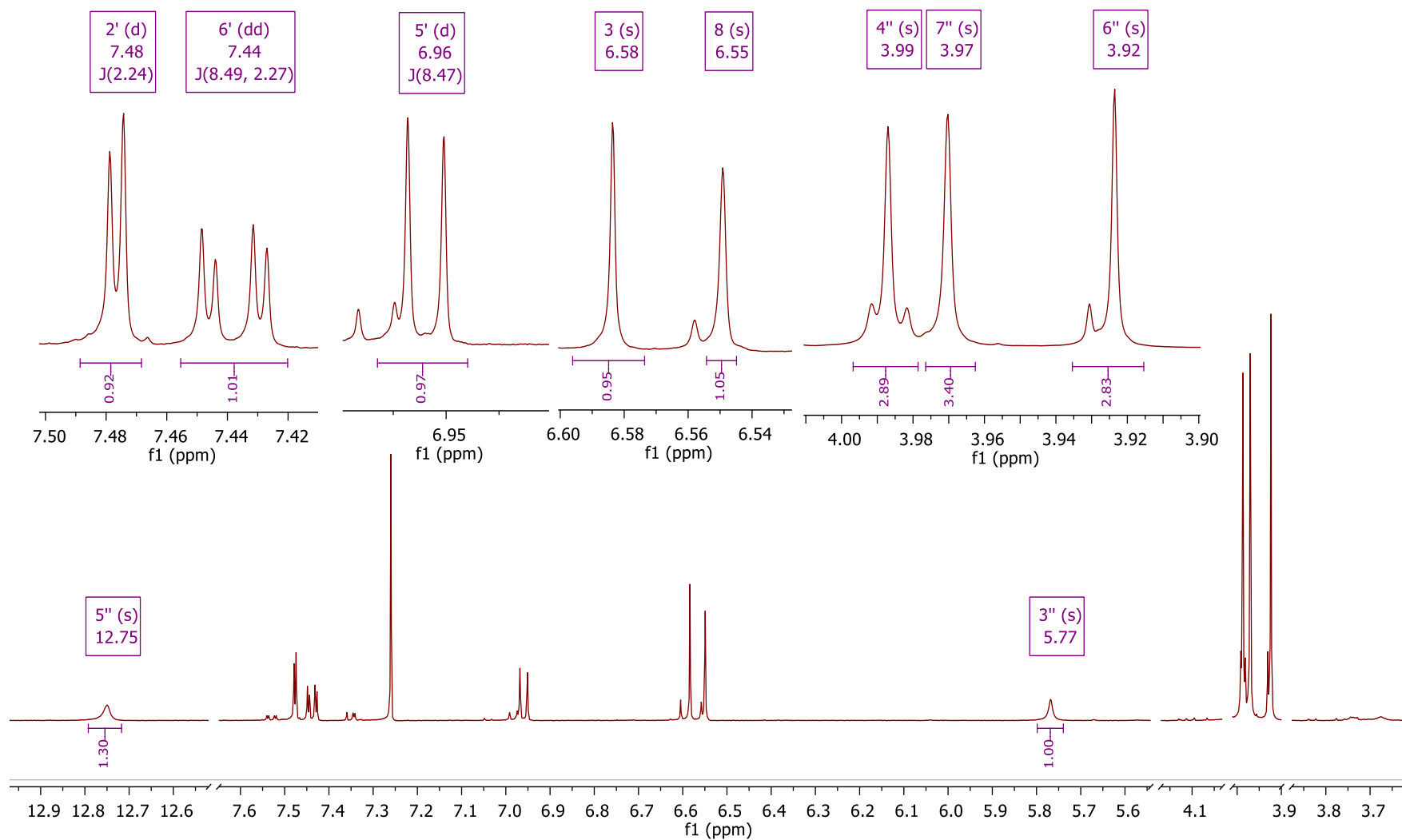
Laboratorio de Espectroscopía



A.2.2 Eupatorina

RMN-¹H

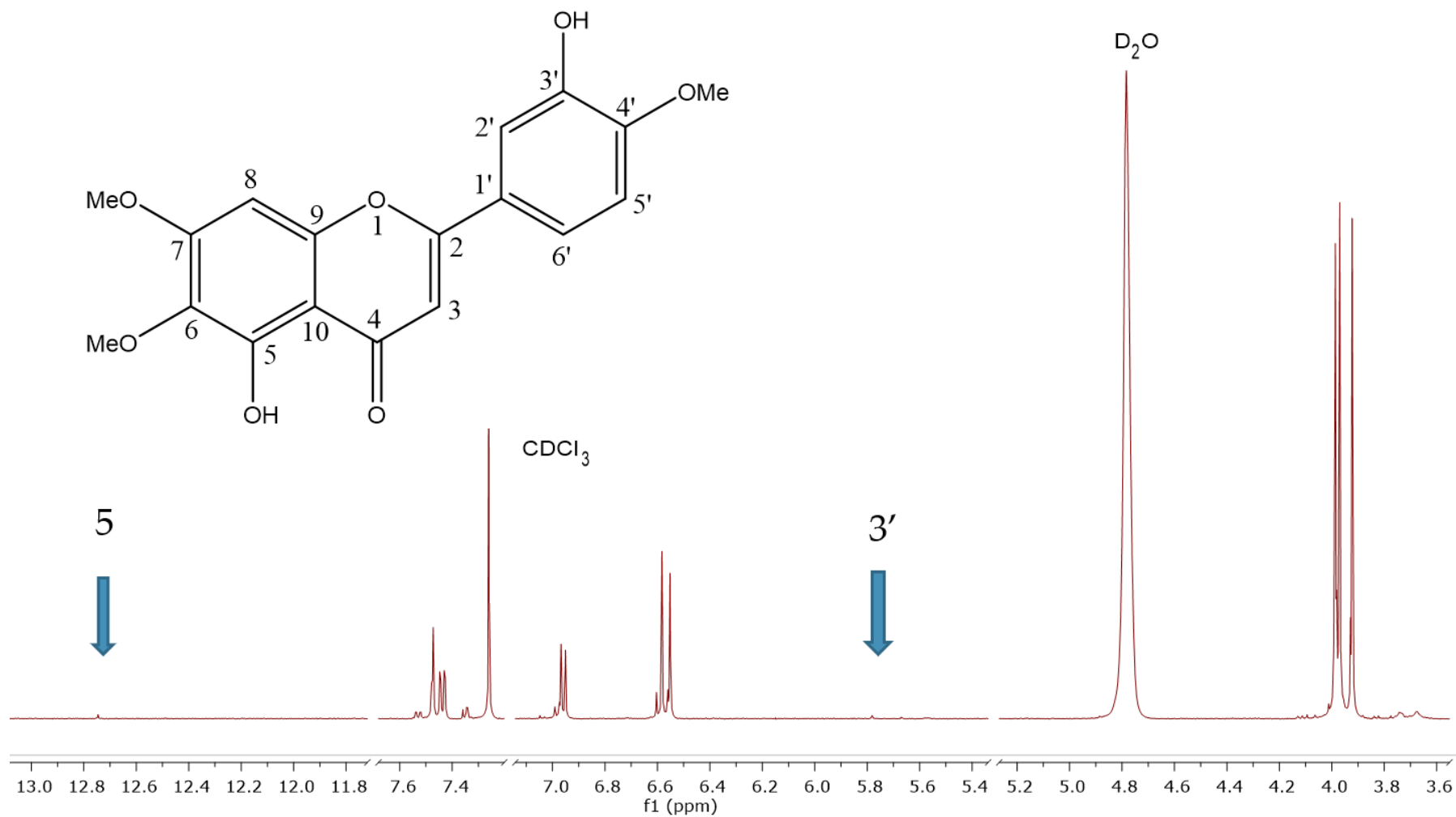
500 MHz CDCl₃

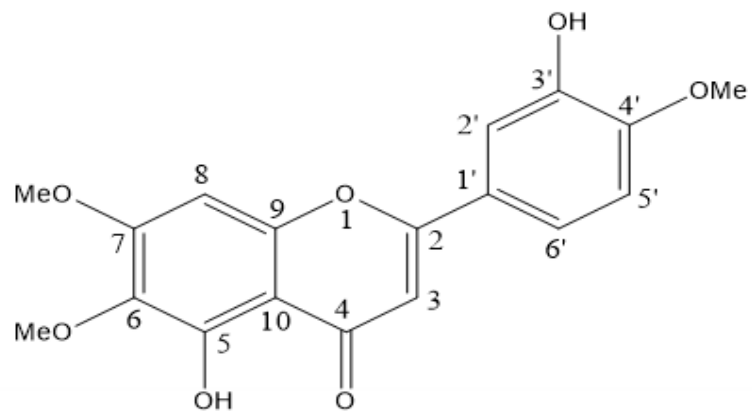


A.2.3 Eupatorina

RMN-¹H + D₂O

500 MHz CDCl₃





-OCH₃ 6

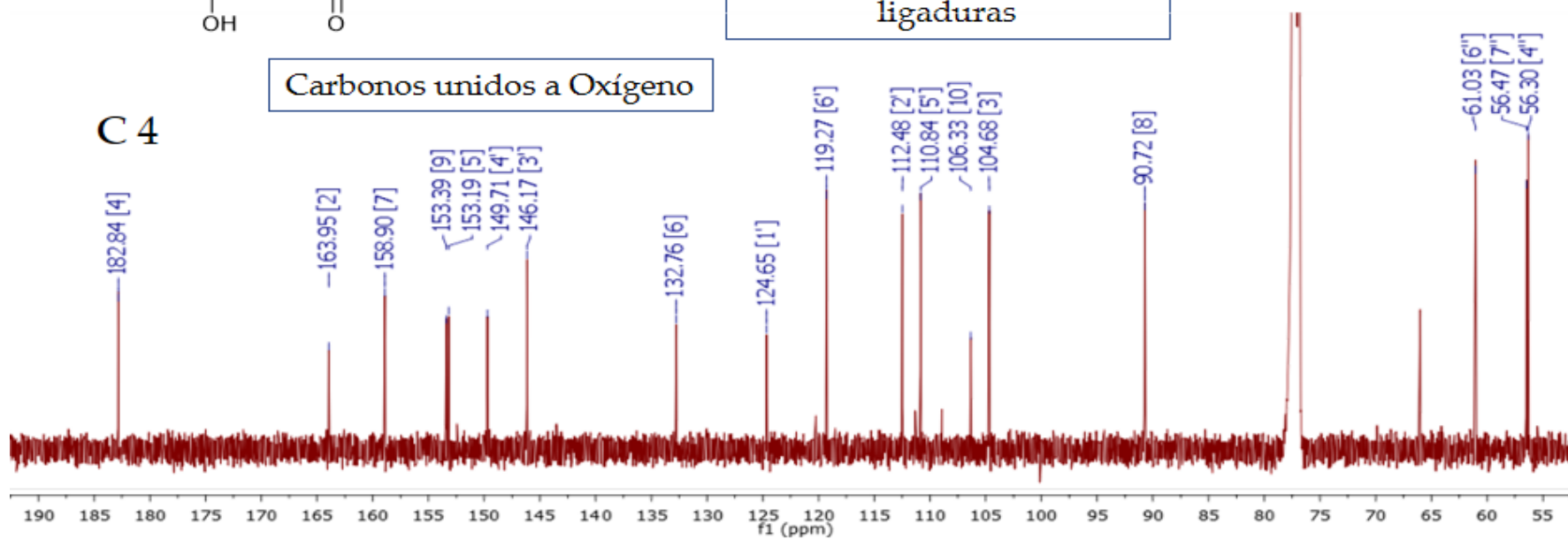
-OCH₃ 7

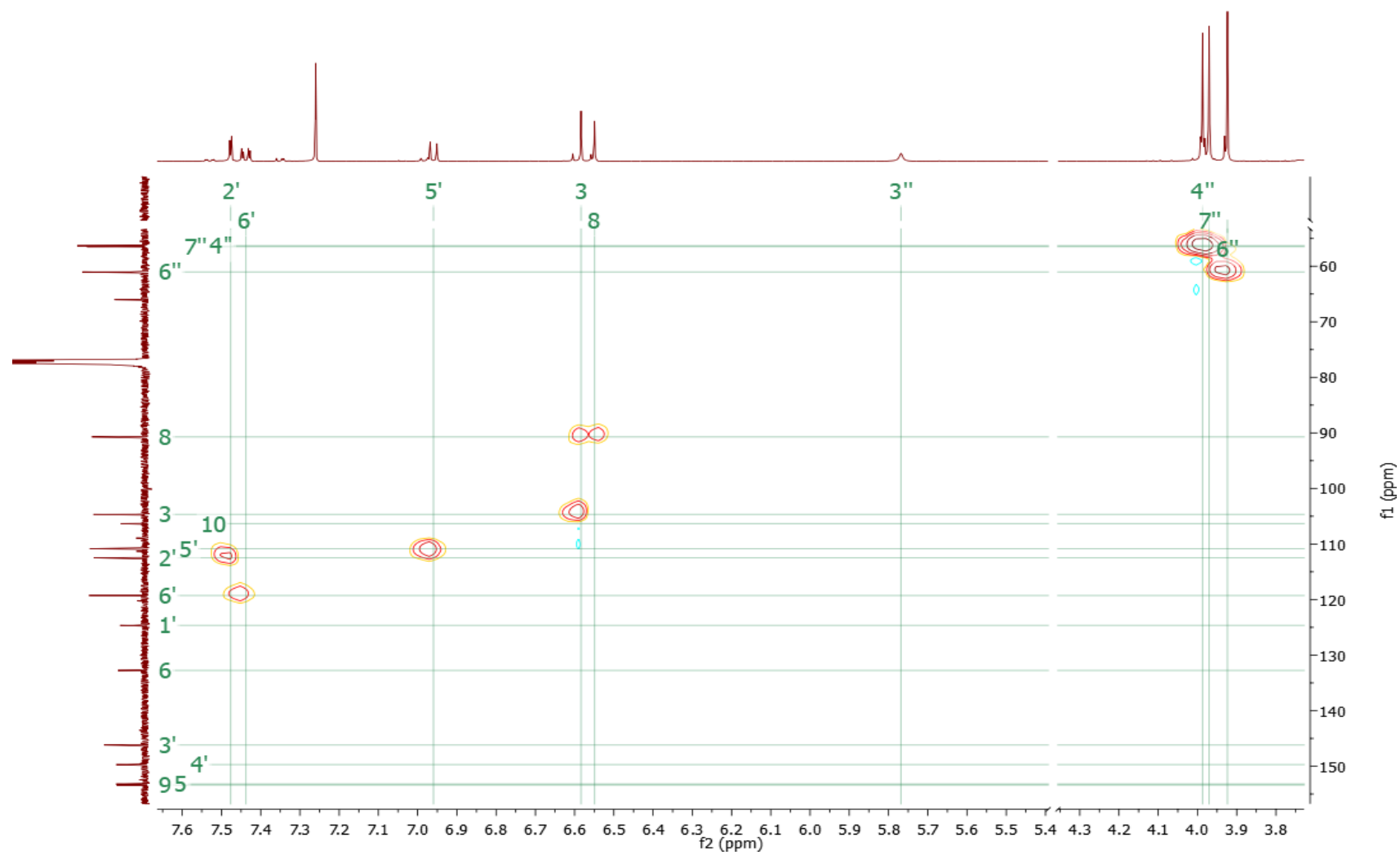
-OCH₃ 4'

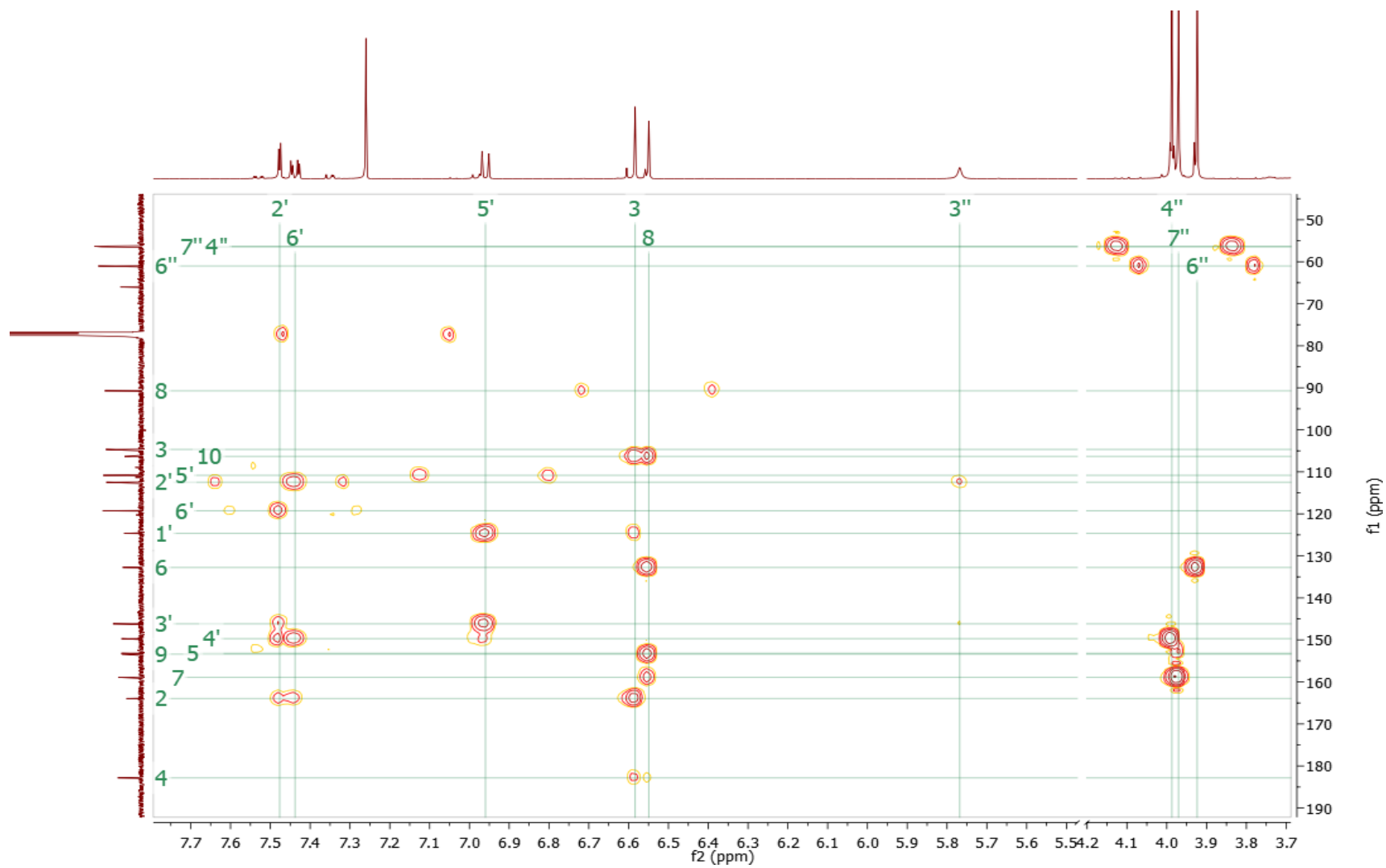
C aromáticos y dobles ligaduras

Carbonos unidos a Oxígeno

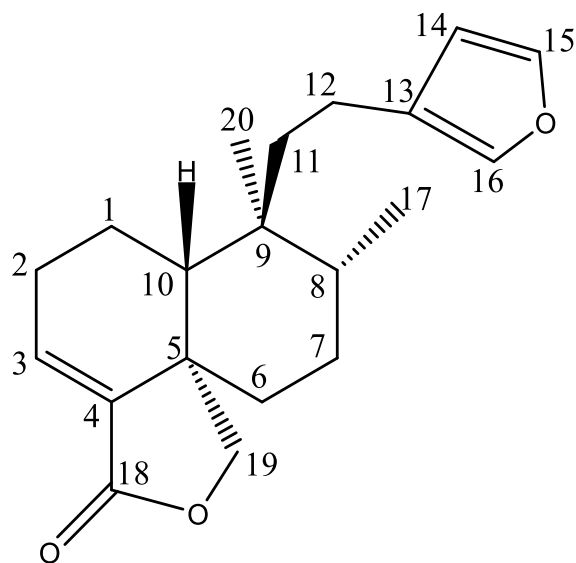
C 4







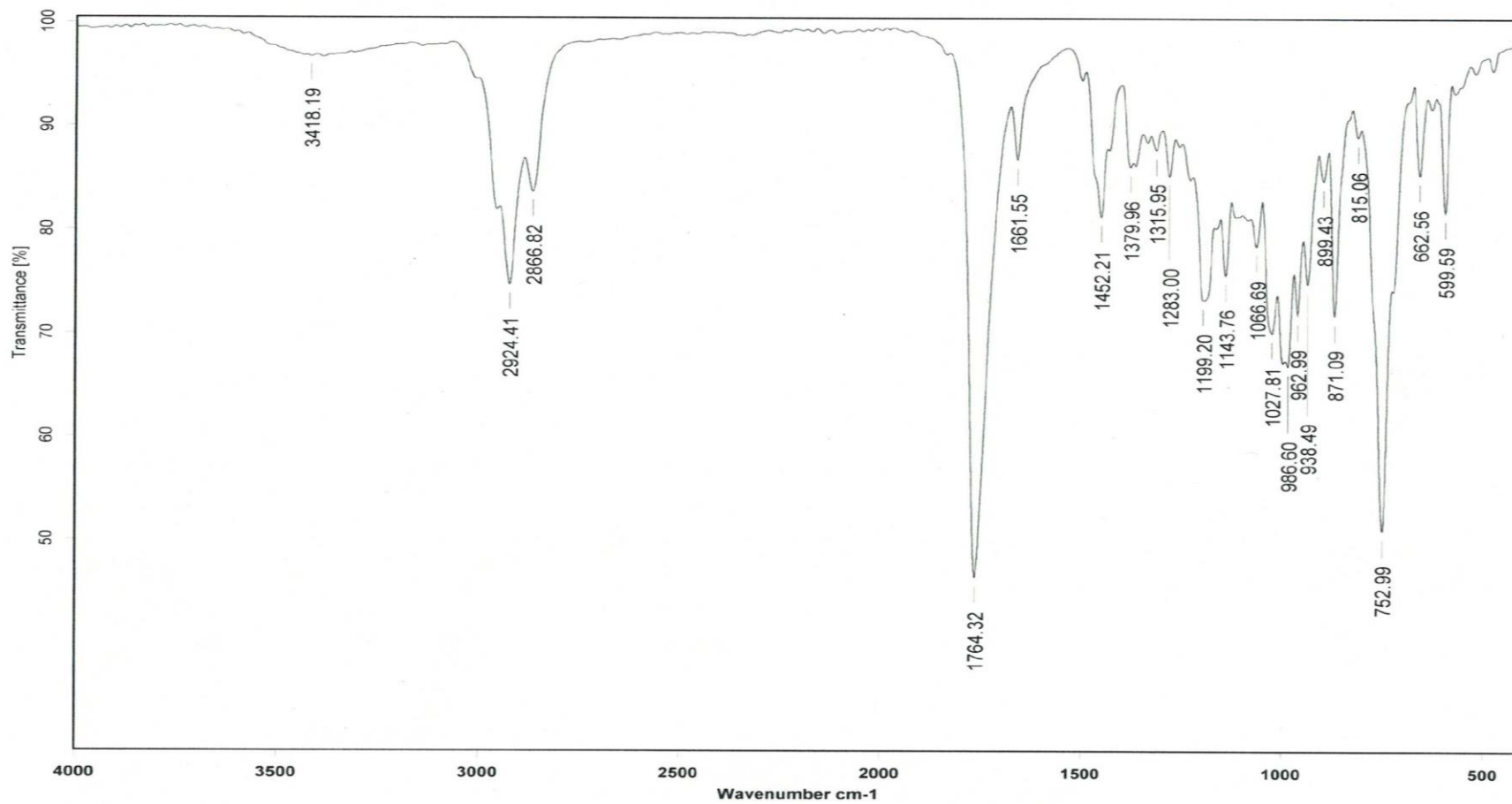
A.3. Lactona del Ácido Hautriwáico





Instituto de Química, UNAM

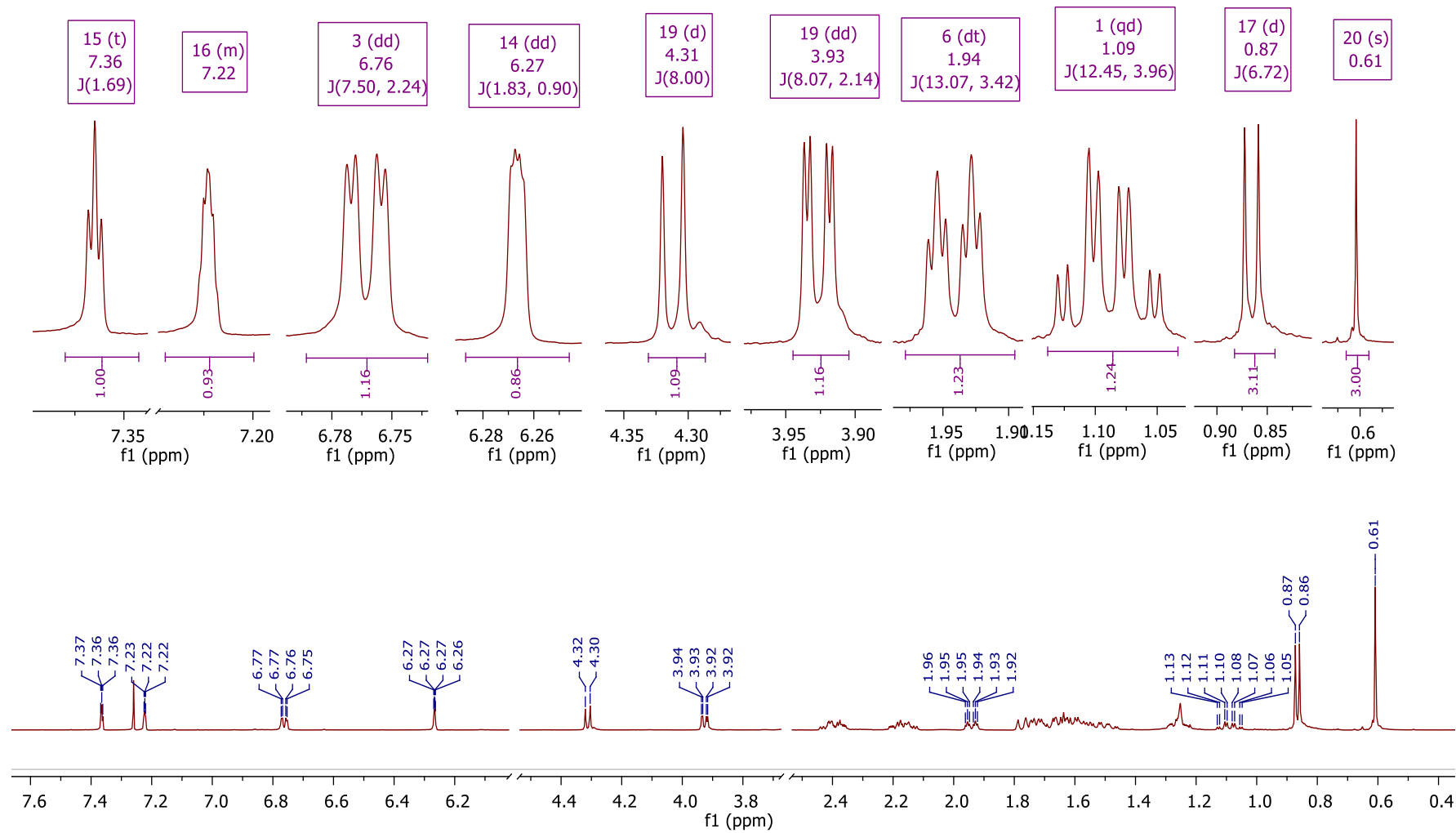
Laboratorio de Espectroscopía

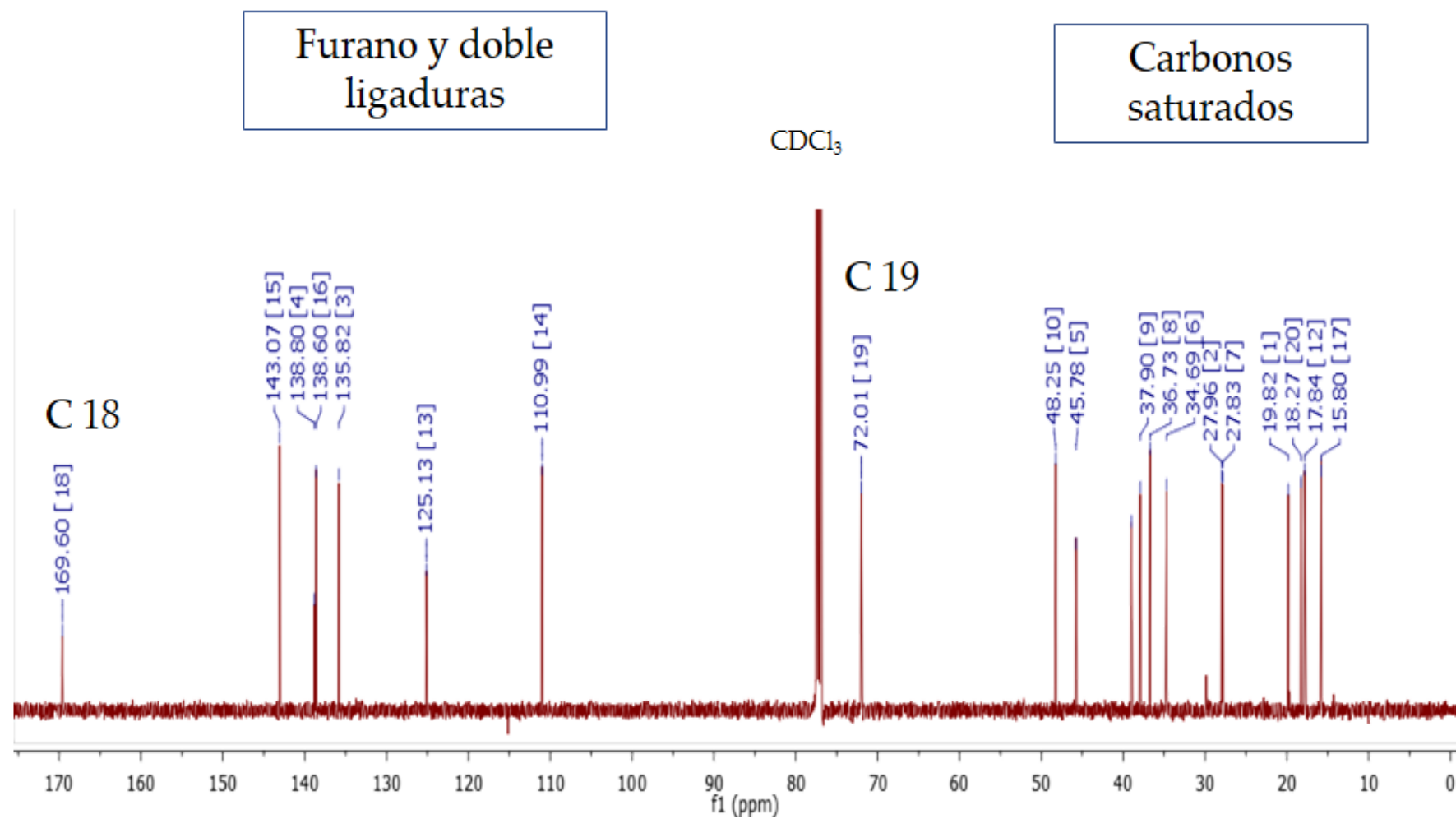


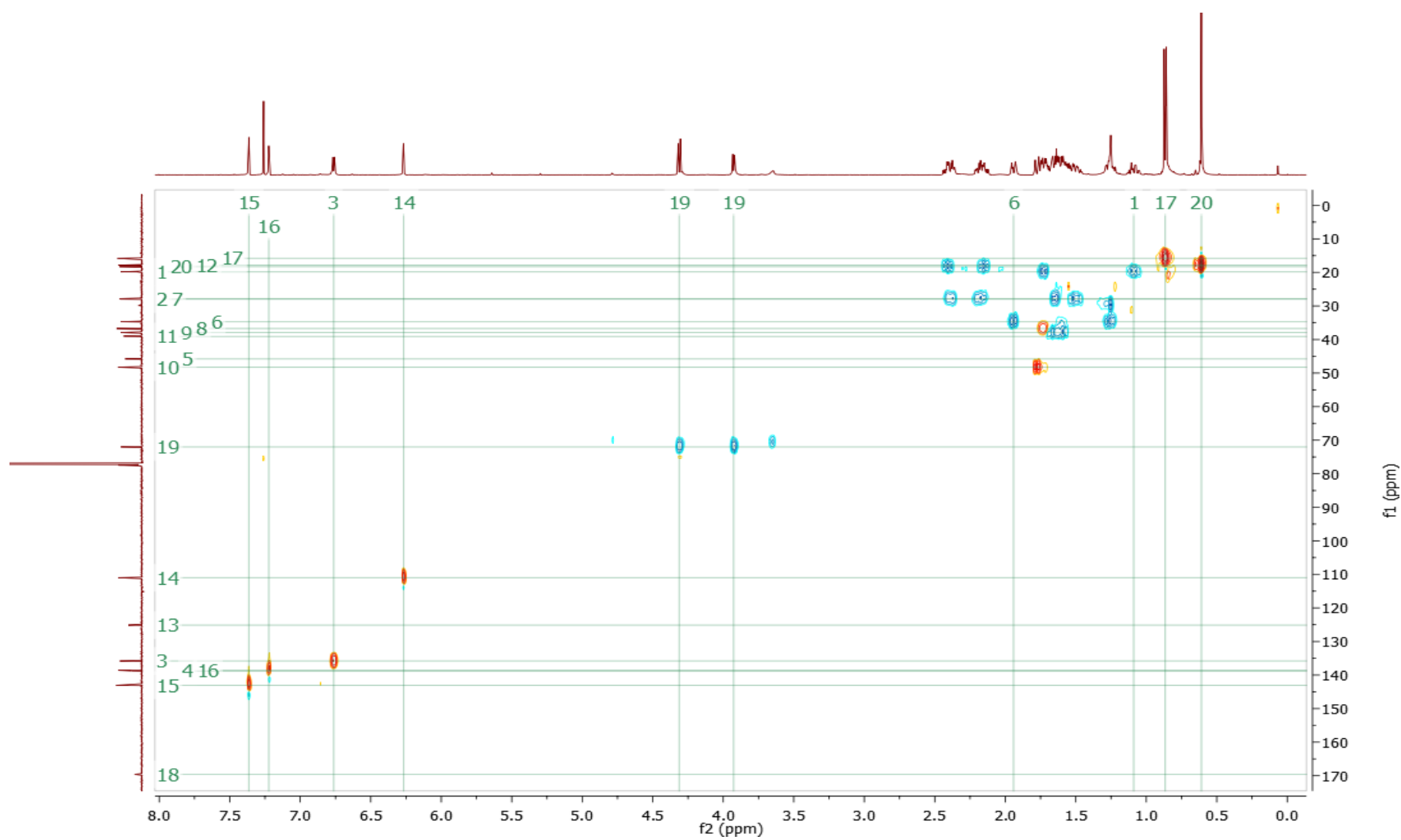
A.3.2 Lactona del Ácido Hautriwaíco

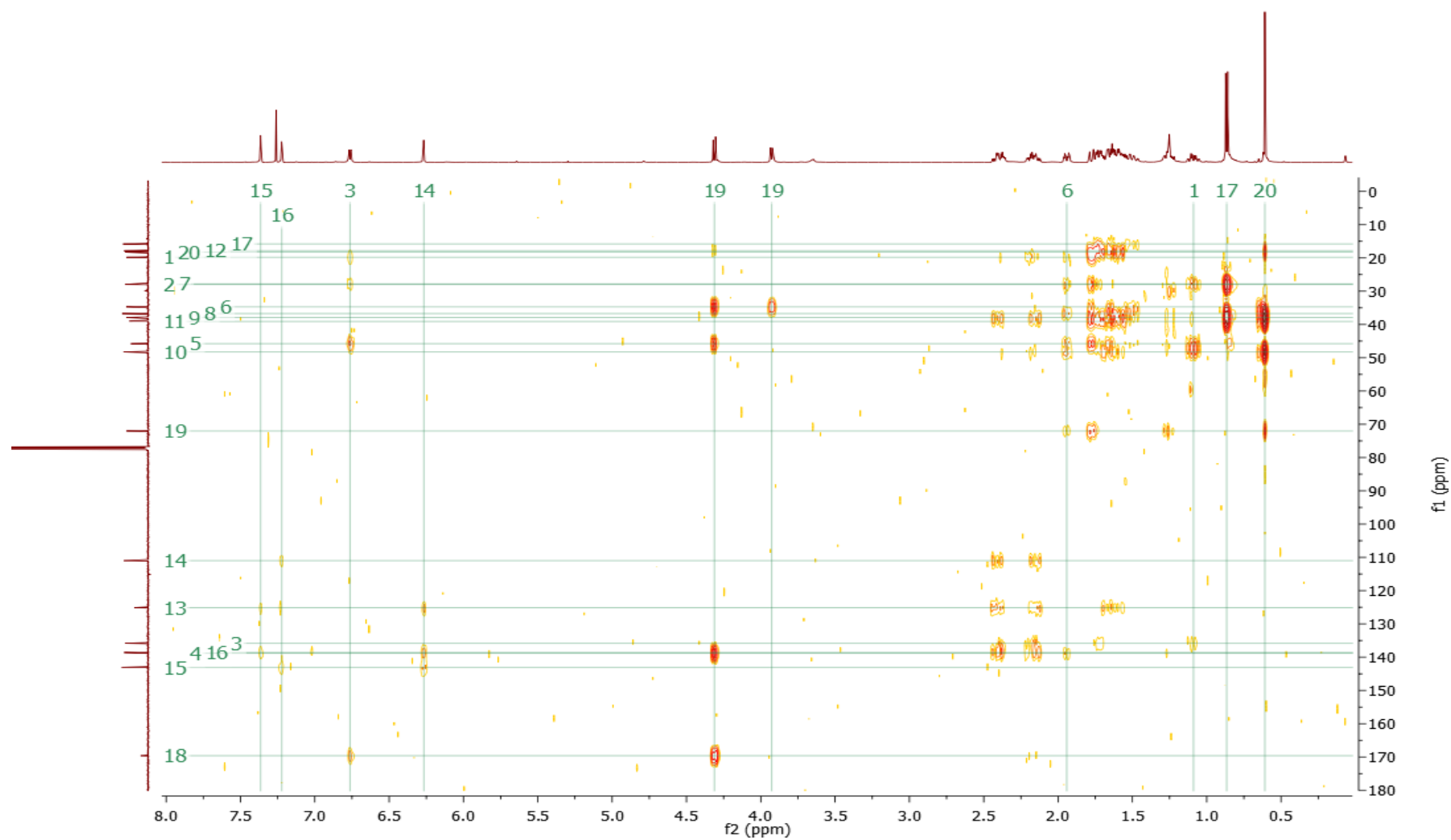
RMN-¹H

500 MHz CDCl₃

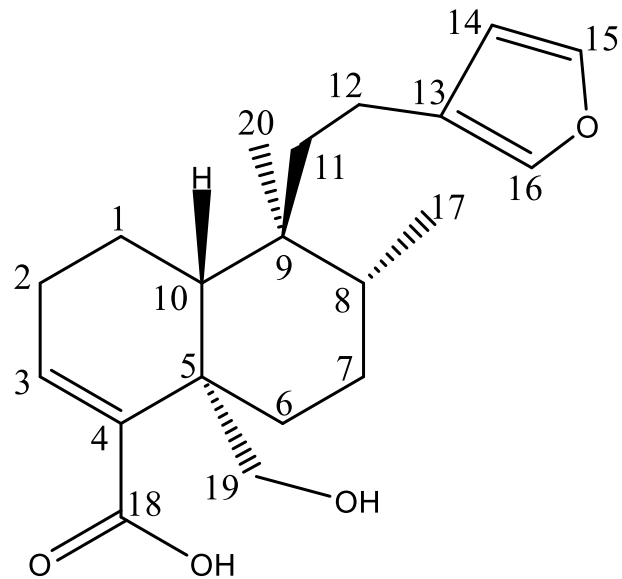








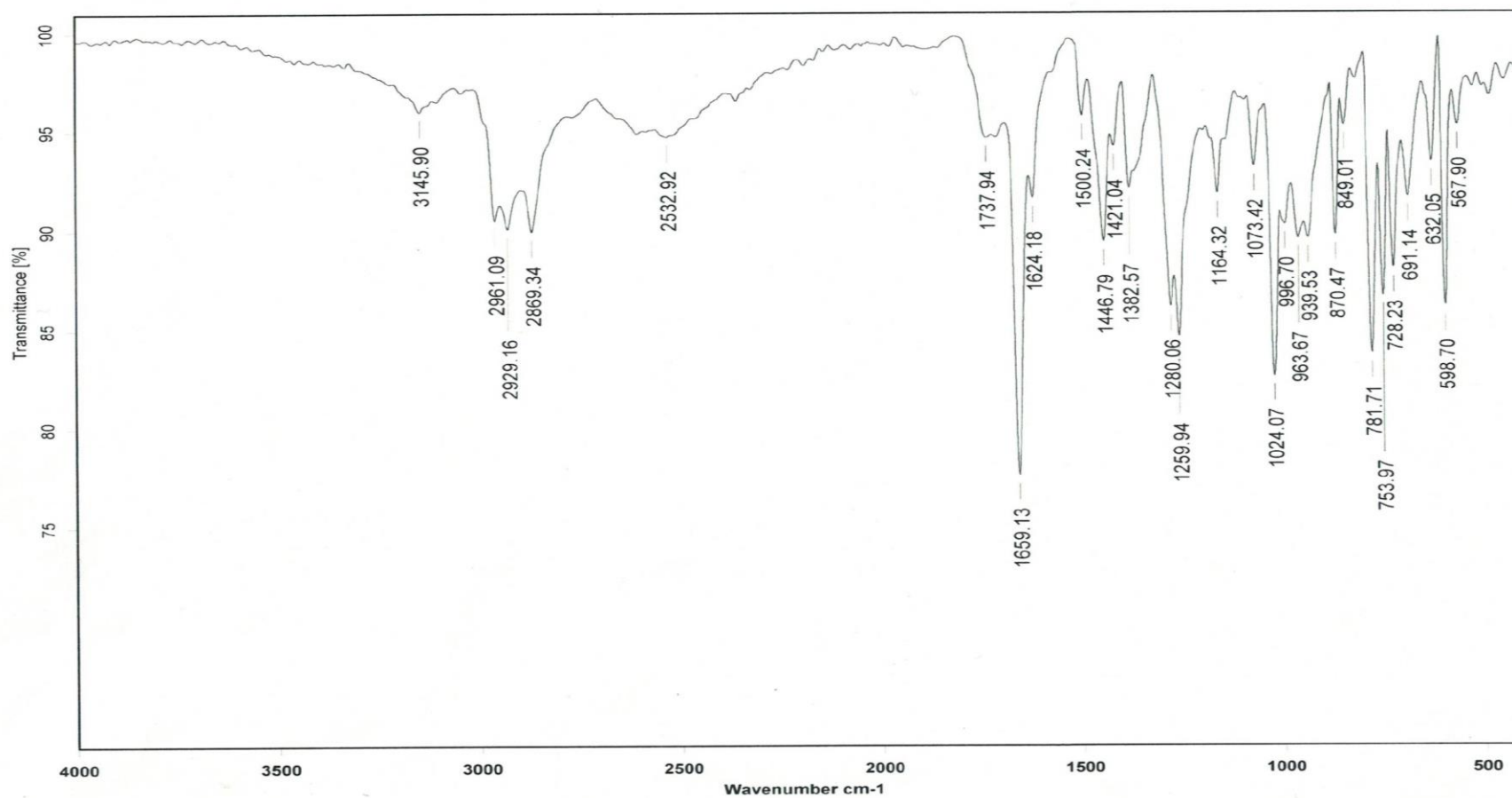
A.4. Ácido Hautriwáico





Instituto de Química, UNAM

Laboratorio de Espectroscopía



A.4.2 Ácido Hautriwaíco

RMN-¹H

700 MHz CDCl₃

