



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**AISLAMIENTO Y DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL DE
LOS METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES EN LAS
HOJAS DE *Salvia longispicata***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUIMICA

PRESENTA

MARIANA ELIUD LÓPEZ CABALLERO

DIRECTOR DE TESIS

DR. BALDOMERO ESQUIVEL RODRÍGUEZ



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: ESQUIVEL RODRÍGUEZ BALDOMERO**

VOCAL: **Profesor: ESTURAU ESCOFET NURIA**

SECRETARIO: **Profesor: REYES LÓPEZ ELIZABETH**

1er. SUPLENTE: **Profesor: GONZÁLEZ ANTONIO OSCAR**

2do. SUPLENTE: **Profesor: ROJO PORTILLO TANIA**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 2-6, Departamento de Productos Naturales del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

ASESOR DEL TEMA:

DR. BALDOMERO ESQUIVEL RODRÍGUEZ

SUPERVISOR TÉCNICO:

DRA. CELIA BUSTOS BRITO

SUSTENTANTE:

MARIANA ELIUD LÓPEZ CABALLERO

AISLAMIENTO Y DETERMINACIÓN ESTRUCTURAL
DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS PRESENTES
EN LAS HOJAS DE *Salvia longispicata*

El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Productos Naturales en el laboratorio 2-6 del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México UNAM, bajo la dirección del Dr. Baldomero Esquivel Rodríguez y el apoyo económico otorgado por el Sistema Nacional de Investigadores (SNI-CONACYT), como ayudante de Investigador Nivel III.

CONGRESOS

1. Estudio de la composición química de *Salvia polystachia*. Cartel.

Mariana Eliud López Caballero, Leovigildo Quijano, Baldomero Esquivel Rodríguez, Celia Bustos Brito. Presentado en la 14^a Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales del 22 al 25 de mayo de 2018 en Cuernavaca, Morelos. México.

2. Estudio de la composición química de *Salvia longispicata*. Cartel.

Mariana Eliud López Caballero, Leovigildo Quijano, Celia Bustos Brito, Baldomero Esquivel Rodríguez. Presentado en el Simposio Interno del Instituto de Química del 13 al 15 de junio de 2018. Ciudad de México.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, es un orgullo tener la oportunidad de formar parte de la máxima casa de estudios.

Al Instituto de Química, por los recursos y el espacio otorgados para la elaboración de este proyecto de investigación.

A mi tutor el Dr. Baldomero Esquivel y la Dra. Celia Bustos, por sus continuas revisiones, asesoría, apoyo y paciencia para culminar este proyecto.

Al Dr. Leovigildo Quijano, por darme la oportunidad de formar parte de su laboratorio y por la beca otorgada como ayudante de Investigador Nivel III SNI-CONACYT durante la realización de este trabajo.

A los miembros del Jurado, Dra. Nuria Esturau Escofet, Dra. Elizabeth Reyes López y Dr. Baldomero Esquivel por sus comentarios, revisiones y correcciones realizadas a este estudio.

Al Dr. Fernando Calzada por las determinaciones de actividad antiprotozoaria y antidiarreica.

Al personal técnico y académico del Instituto de Química de los laboratorios de Resonancia Magnética Nuclear, Espectroscopía Infrarroja y Espectrometría de Masas, por la realización de los diferentes análisis requeridos para la caracterización de los compuestos.

A mis amigos del Laboratorio 2-6, Rocío Aguilar, Valeria Vázquez, Ricardo Martínez, Eduardo Moreno, Enrique Serrano, Jaqueline Medina y Elizabeth Hernández, por ayudarme siempre y por los divertidos momentos que compartimos.

A mis padres David López Flores y María del Pilar Caballero Royacelli y mis hermanos David, Ernesto y Leticia gracias por creer en mí, por todo el apoyo y el esfuerzo que hicieron para ayudarme a cumplir esta difícil meta.

CONTENIDO

Lista de Abreviaturas

Lista de Figuras

Lista de Tablas

Lista de Compuestos

1.- INTRODUCCIÓN.....	1
2.- ANTECEDENTES.....	4
2.1 Medicina tradicional	4
2.2 Familia Lamiaceae	5
2.2.1 Lamiaceae en México	6
2.3 Género <i>Salvia</i>	7
2.3.1 <i>Salvia longispicata</i>	9
2.3.2 Descripción botánica y usos en medicina tradicional.....	9
2.3.3 Estudios preliminares de los componentes de <i>Salvia longispicata</i>	11
2.4 Principales componentes químicos del género <i>Salvia</i>	11
2.4.1 Terpenos.....	12
2.4.2 Diterpenos	15
2.4.3 Diterpenos tipo clerodano	16
2.4.4 Triterpenos.....	19
2.4.5 Compuestos Fenólicos	20
2.4.6 Ácidos fenólicos	21
2.4.7 Flavonoides	22
2.4.8 Flavanonas	24
2.4.9 Flavonas	25
3.- OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo general.....	26
3.2 Objetivos Particulares	26
4.- DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	27
4.1 Métodos cromatográficos.....	27
4.2 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.....	28
4.3 Colecta del material vegetal.....	28
4.4 Extracto de diclorometano.	29

4.5 Extracto de acetona.....	29
4.6 Aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios del extracto de DCM.....	30
4.6.1 Compuesto 1	30
4.6.2 Compuesto 2	31
4.6.3 Compuestos 3 y 4.....	31
4.6.4. Compuesto 5	32
4.7 Aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios del extracto de Acetona.....	33
4.7.1 Compuesto 6	33
4.7.2 Compuesto 7	33
4.8 Otros Compuestos	34
4.9 Actividad Biológica	35
5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
5.1 Estudio fitoquímico del extracto de diclorometano	37
Compuesto 1a Éster metílico del Ácido Hardwiickico	37
Compuesto 2 Cirsilineol	44
Compuesto 3 Salvileucalina	49
Compuesto 4 Salvigenólida	54
Compuesto 5 Salvisousólida.....	59
5.2 Estudio fitoquímico del extracto de acetona.....	65
Compuesto 6 Naringenina	65
Compuesto 7 Ácido Rosmarínico.....	70
5.3 Resultados de ensayos de Actividad Biológica.....	74
6.- CONCLUSIONES.....	75
7.- REFERENCIAS	76
8.- ANEXOS	81
A.1. Compuesto 1a Ester metílico del Ácido Hardwiickico	81
A.1.1 Espectro de Masas del éster metílico del ácido Hardwiickico.....	82
A.1.2 Espectro de Infrarrojo del éster metílico del ácido Hardwiickico	83
A.1.3 Espectro de ¹ H RMN, 700 MHz en CDCl ₃	84
A.1.4 Espectro de ¹³ C RMN, 175 MHz en CDCl ₃	85
A.1.5 Espectro DEPT 90, 175 MHz en CDCl ₃ del Compuesto 1a	86

A.1.6 Espectro DEPT 135, 175 MHz en CDCl ₃ del Compuesto 1a	87
A.1.7 HMBC, 700 MHz en CDCl ₃	88
A.1.8 COSY, 700 MHz en CDCl ₃	89
A.1.9 HSQC, 700 MHz en CDCl ₃	90
A.1.10 NOESY, 700 MHz en CDCl ₃	90
A.2. Compuesto 2 Cirsilineol	91
A.2.1 Espectro de Masas Cirsilineol	91
A.2.2 Espectro de Infrarrojo Cirsilineol	92
A.2.3 Espectro de ¹ H RMN, 700 MHz en CDCl ₃	93
A.2.4 Espectro de ¹³ C RMN, 175 MHz en CDCl ₃	94
A.2.5 Espectro DEPT 90, 175 MHz en CDCl ₃ del Compuesto 2	95
A.2.6 Espectro DEPT 135, 175 MHz en CDCl ₃ del Compuesto 2	95
A.2.7 HMBC, 700 MHz en CDCl ₃	96
A.3. Compuesto 3 Salvileucalina	97
A.3.1 Espectro de Masas Salvileucalina	98
A.3.2 Espectro de Infrarrojo Salvileucalina	99
A.3.3 Espectro de ¹ H RMN, 700 MHz en CDCl ₃	100
A.3.4 Espectro de ¹³ C RMN, 175 MHz en CDCl ₃	101
A.3.5 Espectro DEPT 90, 175 MHz en CDCl ₃ del Compuesto 3	102
A.3.6 Espectro DEPT 135, 175 MHz en CDCl ₃ del Compuesto 3	103
A.3.7 HMBC, 700 MHz en CDCl ₃	104
A.3.8 HSQC, 700 MHz en CDCl ₃	105
A.3.9 COSY, 700 MHz en CDCl ₃	106
A.4. Compuesto 4 Salvigenólida	107
A.4.1 Espectro de Masas Salvigenólida	108
A.4.2 Espectro de Infrarrojo Salvigenólida	109
A.4.3 Espectro de ¹ H RMN, 500 MHz en CDCl ₃	110
A.4.4 Espectro de ¹³ C RMN, 125 MHz en CDCl ₃	111
A.4.5 Espectro DEPT 90, 125 MHz en CDCl ₃ del Compuesto 4	112
A.4.6 Espectro DEPT 135, 125 MHz en CDCl ₃ del Compuesto 4	113
A.4.7 HSQC, 500 MHz en CDCl ₃	114
A.4.8 HMBC, 500 MHz en CDCl ₃	115

A.5. Compuesto 5 Salvisousólida	116
A.5.1 Espectro de Masas Salvisousólida	117
A.5.2 Espectro de Infrarrojo Salvisousólida	118
A.5.3 Espectro de ^1H RMN, 400 MHz en CDCl_3	119
A.5.4 Espectro de ^{13}C RMN, 100 MHz en CDCl_3	120
A.5.5 Espectro DEPT 90, 100 MHz en CDCl_3	121
A.5.6 Espectro DEPT 135, 100 MHz en CDCl_3	122
A.5.7 HSQC, 400 MHz en CDCl_3	123
A.5.8 HMBC, 400 MHz en CDCl_3	123
A.5.9 COSY, 400 MHz en CDCl_3	124
A.6. Compuesto 6 Naringenina	125
A.6.1 Espectro de Masas Naringenina	125
A.6.2 Espectro de Infrarrojo Naringenina	126
A.6.3 Espectro de ^1H RMN, 700 MHz en CD_3OD	127
A.6.4 Espectro de ^{13}C RMN, 175 MHz en CD_3OD	128
A.6.5 Espectro DEPT 90, 175 MHz en CD_3OD	129
A.6.6 Espectro DEPT 135, 175 MHz en CD_3OD	130
A.6.7 HSQC, 700 MHz en CD_3OD	131
A.6.8 HMBC, 700 MHz en CD_3OD	132
A.6.9 COSY, 700 MHz en CD_3OD	133
A.7. Compuesto 7 Ácido Rosmarínico	134
A.7.1 Espectro de Infrarrojo Ácido Rosmarínico	134
A.7.2 Espectro de ^1H RMN 500 MHz en CD_3OD	135
A.7.3 Espectro de ^{13}C RMN, 125 MHz en CD_3OD	136

ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
μM	Micromolar
AcOEt	Acetato de etilo
<i>c</i>	Concentración
C	Átomo de Carbono
CC	Cromatografía en Columna
CCDa	Cromatografía en Capa Delgada Analítica
CCDp	Cromatografía en Capa Delgada Preparativa
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CHCl ₃	Cloroformo
cm	Centímetros
cm ⁻¹	Número de onda
COSY	Correlación Homonuclear (Correlation Spectroscopy)
<i>d</i>	Señal doble
DART	<i>Direct Analysis in Real Time</i> Espectrometría de masas mediante Análisis Directo en Tiempo Real
DCM	Diclorometano
dd	Señal doble de doble
ddd	Señal doble de doble de doble
DEPT	Incremento de señal sin distorsión por transferencia de polarización
<i>dt</i>	Señal doble de triples
EM	Espectrometría de Masas
EM-ESI ⁺	Ionización por electrospray modo positivo
FAB (+)	<i>Fast Atom Bombardment positive mode</i> Bombardeo Rápido de Átomos en modo positivo
FT-IR	Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier
g	Gramos
H	Átomo de Hidrógeno
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i> Correlación Heteronuclear a través de Múltiples Enlaces ¹³ C- ¹ H
HSQC	<i>Heteronuclear Simple Quantum Correlation</i> Correlación Heteronuclear Cuántica Simple ¹³ C- ¹ H a un enlace
Hz	Hertz
IC ₅₀	Concentración Inhibitoria Máxima Media
J	Constante de Acoplamiento
Kg	Kilogramos
m/z	Relación masa/carga
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
MHz	Mega Hertz
mL	Mililitros
mm	Milímetros
OMe	Grupo Funcional Metoxilo

p.f.	Punto de Fusión
ppm	Partes por Millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN- ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13
RMN- ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de protón
<i>s</i>	Señal simple
<i>sa</i>	Señal simple ancha
<i>t</i>	Señal triple
<i>td</i>	Señal triple de dobles
UV	Radiación Ultravioleta
δ	Desplazamiento Químico
λ	Longitud de onda

FIGURAS

FIGURA 1. Distribución de la familia <i>Lamiaceae</i> en México	7
FIGURA 2. Especies de <i>Salvia</i> en México A. <i>S. iodantha</i> ; B. <i>S. purpurea</i> ; C. <i>S. fulgens</i> ; D. <i>S. sessei</i> ; E. <i>S. carnea</i> ; F. <i>S. elegans</i> ; G. <i>S. microphylla</i> ; H. <i>S. curviflora</i> ; I. <i>S. mexicana</i> J. <i>S. patens</i> ; K. <i>S. albo-caerulea</i>	8
FIGURA 3. Ejemplar de <i>S. longispicata</i>	9
FIGURA 4. Distribución de <i>S. longispicata</i> en México (GBIF.ORG, 2019).....	10
FIGURA 5. <i>S. longispicata</i> M. A) Arbusto; B) Tallo; C) Hoja; D) Flor	10
FIGURA 6. Estructura del Isopreno.....	12
FIGURA 7. Estructura del IPP y la de sus precursores	13
FIGURA 8. Estructura del Ácido mevalónico precursor de terpenos.....	14
FIGURA 9. Estructura de GGPP	15
FIGURA 10. Diferentes tipos de estructuras de diterpenos.....	16
FIGURA 11. Esqueleto base de un diterpeno tipo Clerodano y su numeración....	17
FIGURA 12. Clerodanos modificados aislados de especies del género <i>Salvia</i>	18
FIGURA 13. Estructura del Escualeno	19
FIGURA 14. Esqueleto pentacíclico de Triterpeno y su numeración.....	20
FIGURA 15. Estructura química de algunos Ácidos Fenólicos.....	21
FIGURA 16. Esqueleto fundamental y clasificación de Flavonoides	22
FIGURA 17. Esqueleto básico de un Flavonoide, su numeración y origen biosintético.....	23
FIGURA 18. Estructura básica de una Flavanona.....	24
FIGURA 19. Estructura básica y numeración de una Flavona	25
FIGURA 20. Ubicación en el mapa del sitio de colecta del material vegetal (2018 ©DIGITALGLOBE, GOOGLE EARTH)	29
FIGURA 21. CCDa de la fracción E, E = perfil cromatográfico de la muestra antes de esterificar y Ec = perfil cromatográfico después de esterificar con diazometano. Sistema de elución: Hexano/Acetato de etilo (8:2).....	30
FIGURA 22. A) CCDa de la fracción con la fase DCM/M ₁ en proporción (98:2), B) Aspecto del sólido obtenido	31
FIGURA 23. CCDa de la fracción 2 en un sistema de elución DCM/M ₁ en proporción (9:1)	32
FIGURA 24. A) CCDa de la fracción 13 en un sistema de elución de DCM/M ₁ en proporción (9:1) a partir de la fracción 9 a 14 se obtuvo el compuesto 5, B) Aspecto del sólido obtenido	32
FIGURA 25. CCDa de la fracción M comparado con Ma (Compuesto 6) aislado .	33
FIGURA 26. Estructuras del Ácido Ursólico (8a) y del Ácido Oleanólico (8b)	34
FIGURA 27. 9a) Estigmasterol, 9b) β-Sitosterol.....	34
FIGURA 28. Mecanismo de reacción de metilación del Ácido Hardwiickico (1)	37
FIGURA 29. Anillo de furano del Compuesto 1a.....	39
FIGURA 30. Esqueletos de Clerodano (a) y Labdano (b)	39
FIGURA 31. Estructura de Clerodano fusionado a un anillo de furano	39

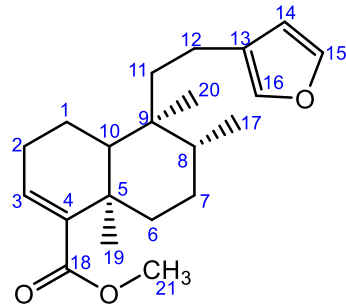
FIGURA 32. Estructura del Compuesto 1a que muestra las correlaciones claves HMBC y COSY	40
FIGURA 33. Estructura del éster metílico del Ácido Hardwiickico.....	41
FIGURA 34. Estructura básica de un Flavonoide.....	45
FIGURA 35. Formación de puente de hidrógeno entre el OH de la posición 5 y el carbonilo de la posición 4	45
FIGURA 36. Estructura parcial del Flavonoide.....	46
FIGURA 37. Estructuras posibles para la flavona aislada de <i>S. longispicata</i>	46
FIGURA 38. Correlaciones en el espectro HMBC para el Compuesto 2.....	47
FIGURA 39. Estructura del compuesto Cirsilineol.....	47
FIGURA 40. Correlaciones mostradas para el anillo de furano y la γ -lactona.....	50
FIGURA 41. Estructura parcial del Compuesto 3.....	50
FIGURA 42. A) Correlaciones HMBC y COSY del anillo A con C-10 y la γ -lactona, B) Correlación HMBC del sistema AB con C-10 y la γ -lactona, C) Correlación HMBC de C-10 con los anillos A y B, D) Correlación HMBC del metileno terminal con los anillos A y B y C-10.	51
FIGURA 43. Estructura de la Salvileucalina y su numeración.....	52
FIGURA 44. Estructura de la Salvigenólida y su numeración	56
FIGURA 45. Anillo de furano del Compuesto 5.....	60
FIGURA 46. Correlaciones mostradas para el anillo de furano y la cetona cíclica	61
FIGURA 47. Estructura de languidulano y su numeración	61
FIGURA 48. Correlación COSY y HMBC del anillo A con la γ -lactona.....	62
FIGURA 49. Marcado en rojo, el acoplamiento <i>W</i>	63
FIGURA 50. Estructura del Compuesto 5 conocido como Salvisousólida.....	63
FIGURA 51. Estructura básica y numeración de una Flavanona	66
FIGURA 52. A) Formación de puente de hidrógeno entre el OH de la posición 5 y el carbonilo de la posición 4, B) Estructura del Compuesto 6 conocido como Naringenina	68
FIGURA 53. Estructura y numeración del Ácido Rosmarínico	72

TABLAS

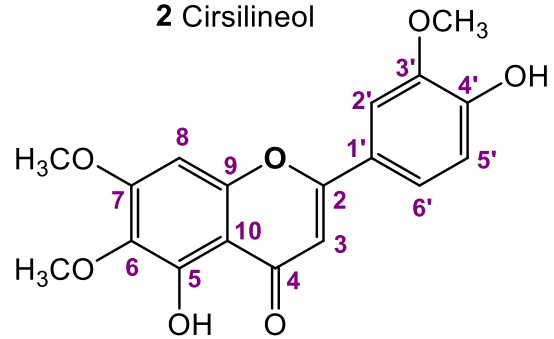
TABLA 1. Clasificación de Terpenos.....	13
TABLA 2. Datos de RMN ¹ H (700 MHz), RMN ¹³ C (175 MHz) en CDCl ₃ del éster metílico del Ácido Hardwiickico.....	43
TABLA 3. Datos de RMN ¹ H (700 MHz), RMN ¹³ C (175 MHz) en CDCl ₃ del compuesto Cirsilineol.....	48
TABLA 4. Datos de RMN ¹ H (700 MHz), RMN ¹³ C (175 MHz) en CDCl ₃ de la Salvileucalina.....	53
TABLA 5. Datos de RMN ¹ H (500 MHz), RMN ¹³ C (125 MHz) en CDCl ₃ de la Salvigenólida	58
TABLA 6. Datos de RMN ¹ H (400 MHz), RMN ¹³ C (100 MHz) en CDCl ₃ de la Salvisousólida.....	64
TABLA 7. Datos de RMN ¹ H (700 MHz), RMN ¹³ C (175 MHz) en CD ₃ OD de la Naringenina	69
TABLA 8. Datos de RMN ¹ H (500 MHz), RMN ¹³ C (125 MHz) en CD ₃ OD del Ácido Rosmarínico.....	73
TABLA 9. Resultados de la evaluación de la actividad Antiprotozoaria y Antidiarreica de los compuestos 3 y 5 aislados de las hojas de <i>S. longispicata</i>	74

COMPUESTOS

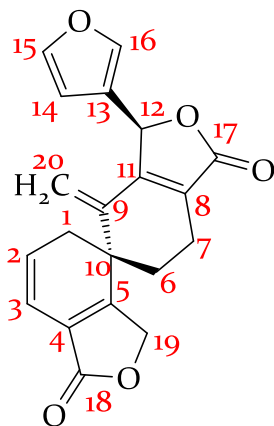
1a Éster metílico del Ácido Hardwiickico



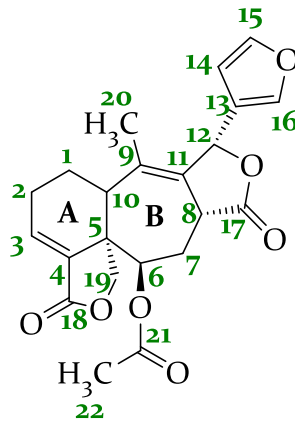
2 Cirsilineol



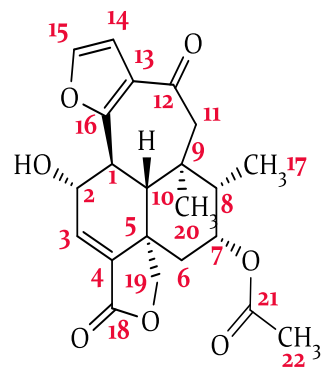
3 Salvileucalina



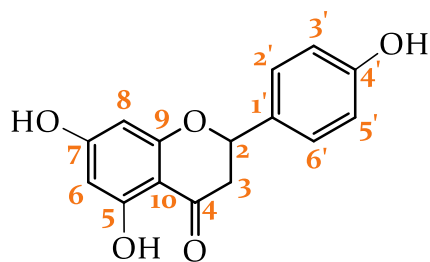
4 Salvigenólida



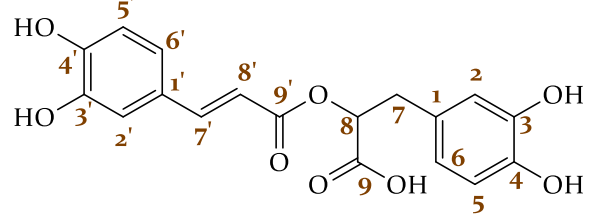
5 Salvisousólida



6 Naringenina



7 Ácido Rosmarínico



1.- INTRODUCCIÓN

En los organismos vivos, los compuestos químicos se sintetizan y degradan por medio de una serie de reacciones químicas, interviniendo una enzima determinada en cada una de ellas. Estos procesos se conocen colectivamente como *metabolismo* y comprenden el *catabolismo* o degradación y el *anabolismo* o síntesis. Todos los organismos poseen caminos metabólicos similares que sintetizan y utilizan ciertas especies químicas esenciales: azúcares, aminoácidos, ácidos grasos, nucleótidos y sus polímeros: polisacáridos, proteínas, lípidos, ARN y ADN; también conocidos como *metabolitos primarios* y son esenciales para el funcionamiento de toda materia viva, responsables de su estructura y de todas las reacciones necesarias para mantener el estado vital y posibilitar el crecimiento, el desarrollo y la reproducción.

La mayoría de los organismos utilizan también otros caminos metabólicos produciendo compuestos denominados *productos naturales* o *metabolitos secundarios*, y sus caminos de síntesis y utilización constituyen el *metabolismo secundario*.

Los metabolitos secundarios, son una respuesta de la adaptación del organismo a la supervivencia y los procesos biosintéticos secundarios, quizás solo se activan en etapas particulares del crecimiento y desarrollo, o durante periodos de estrés a causa de limitaciones nutricionales o ataques microbianos.

Los metabolitos secundarios no son productos de deshecho del metabolismo, algunos son vitales para la supervivencia de las especies, siendo más importantes en organismos inferiores o en organismos que ocupan nichos ecológicos precarios.

La línea divisoria entre el metabolismo primario y secundario no está definida, hay algunos aminoácidos que son metabolitos secundarios, mientras que muchos esteroides tienen un papel estructural esencial en la mayoría de los organismos y deben ser considerados metabolitos primarios. Además, los dos tipos de metabolismo están interconectados, puesto que el metabolismo primario origina

moléculas pequeñas que se utilizan como productos de partida en los procesos metabólicos secundarios.

El estudio de productos naturales se lleva a cabo en diferentes tipos de organismos como plantas, animales, organismos marinos, hongos, etc.; algunos productos naturales se encuentran en un único organismo (especie) o en número reducido de organismos muy relacionados entre sí (género) (Claramunt *et al*, 2013).

Los metabolitos se sintetizan y degradan mediante diferentes series de reacciones químicas (anabolismo y catabolismo), interviniendo diferentes tipos de enzimas. Las principales rutas biogénicas son:

- Acetato en forma de *acetilcoenzima A*, precursor de ácidos grasos, poliacetilenos, eicosanoides (prostaglandinas), policétidos, macrocíclicos aromáticos y terpenos.
- *Mevalonato* que da lugar a la familia de terpenos, esteroides y carotenoides.
- *Ácido Shikímico*, el precursor de muchos compuestos aromáticos, incluyendo los aminoácidos aromáticos, los ácidos cinámicos y ciertos polifenoles.
- *Aminoácidos* que originan alcaloides y antibióticos peptídicos como la penicilina.
- *DXP* (1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato) precursor del pirofosfato de isopentenilo (IPP), compuesto que se emplea como punto de partida para la biosíntesis de terpenos.

Los productos naturales han sido utilizados desde la antigüedad en la medicina tradicional para tratar diversos padecimientos; hoy en día, las plantas son una alternativa para el tratamiento de distintas enfermedades por lo que constituyen un amplio campo de investigación en la búsqueda de nuevas moléculas con actividad biológica.

Estos metabolitos secundarios aparentemente no tienen una función en el metabolismo básico de las plantas, pero a menudo tienen un rol ecológico, son atractores para la polinización ya que muchos son pigmentos que proporcionan

color a flores y frutos, jugando un papel esencial en la reproducción atrayendo a insectos polinizadores, o atrayendo a animales que van a utilizar los frutos como fuente de alimento, contribuyendo de esta forma a la dispersión de semillas; o sirven como defensa contra microorganismos, insectos, y aún contra otras plantas (aleloquímicos) actuando como repelentes, proporcionando a la planta sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas (Lock de Ugaz, **1987**).

La importancia de los productos naturales radica en la propia función biológica en la que son biosintetizados por ejemplo como agentes terapéuticos; pueden servir como modelos para la preparación de sustancias bioactivas, como materia prima para la síntesis de sustancias de interés farmacológico y/o interés industrial.

Muchos de los metabolitos secundarios también tienen un importante y significativo valor medicinal y económico, derivado este último de su uso en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica. Un gran número de estos productos naturales, que ya se usaban en la medicina antigua como remedios para combatir enfermedades, se utilizan en la actualidad como medicamentos, resinas, gomas, potenciadores de sabor, aromas y colorantes, entre otros.

En particular, las plantas han sido muy estudiadas desde el punto de vista de la química de los productos naturales, debido a que han sido utilizadas desde tiempos ancestrales con fines religiosos y medicinales, existiendo pruebas de su uso en un gran número de culturas como son la cultura China o las culturas de Mesoamérica. En la actualidad, debido a estas evidencias, las plantas son sujetos de estudios exhaustivos tratando de encontrar sustancias que puedan ser empleadas en beneficio de las personas como principios activos en medicamentos, herbicidas biodegradables o insecticidas naturales. México es un caso concreto de lo anterior, con una tradición en el uso de plantas con fines terapéuticos y con documentos que guardan esta información desde hace mucho tiempo (Ávalos, Pérez-Urría, **2009**).

2.- ANTECEDENTES

2.1 Medicina tradicional

Desde la antigüedad las plantas han sido consideradas un recurso invaluable para cuidar y preservar la salud, el ser humano ha encontrado curas o paliativos para las enfermedades que le aquejan en hojas, raíces, cortezas, semillas, frutos o flores de plantas silvestres, además de dar inicio a lo que se conoce como herbolaria o medicina tradicional (Lambert *et al.*, **1997**; Butler, **2004**; Mishra y Tiwari, **2011**). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la medicina tradicional se utiliza ampliamente y en un sistema sanitario que está creciendo rápidamente es de gran importancia económica. En África hasta un 80% de la población la utiliza para ayudar a satisfacer sus necesidades sanitarias y en China el 40%. En Latinoamérica, existen poblaciones que siguen utilizando la medicina tradicional como resultado de circunstancias históricas y creencias culturales, ya que la medicina tradicional ofrece una alternativa, ya sea oral o escrita, para mejorar la calidad de vida de la humanidad a través del uso de plantas (OMS, 2002).

México cuenta con una vasta riqueza florística, siendo uno de los países más biodiversos ocupando el quinto lugar a nivel mundial con 27 704 especies, después de Colombia (50 000 especies). China (30 000 especies) y Brasil (58 000). 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 (Villaseñor, **2016**).

En la medicina tradicional mexicana, se utilizan un gran número de plantas endémicas a manera de infusiones, tés, extractos acuosos o alcohólicos, como cataplasma, y generación de humos o evaporaciones, entre otras formas de uso para el tratamiento de enfermedades clínicas o “enfermedades culturales” (éstas últimas están relacionadas con creencias como p. ej. mal de ojo, aire, envidias, empacho, etc.). Dentro del grupo de plantas medicinales se encuentran las *Salvias* para la preparación de remedios y curaciones de padecimientos; algunos reportes bibliográficos de rescate del conocimiento tradicional destacan que ciertas especies

de *Salvia* se usan para curaciones como cáncer, fiebres, problemas gastrointestinales, del sistema nervioso, repelente contra insectos, resfriados, antiparasítico, contra diarrea y mordedura de víboras, entre otros. (Ramírez *et al*, 2016)

2.2 Familia Lamiaceae

La familia Lamiaceae, con 236 géneros y 7,173 especies conocidas, se encuentra en el sexto lugar por su riqueza a nivel mundial y es también una de las de mayor riqueza en México.

Las Lamiaceae tienen distribución cosmopolita y se encuentran en casi todos los ecosistemas terrestres, aunque son más abundantes en bosques de clima templado y en zonas montañosas. En el mundo existen seis regiones de alta diversidad: Mediterráneo y Asia Central, África y Madagascar, China, Australia, Sudamérica y Norteamérica (incluido México).

Lamiaceae es muy diversa en cuanto a su morfología y se distingue porque presenta hojas opuestas, tallos tetraangulares, inflorescencia generalmente compuesta de cimas. Con frecuencia las plantas están cubiertas de pelos y de glándulas que emiten fragancia, debido a que almacenan en sus hojas aceites esenciales que les confieren la característica de aromaticidad, por lo que son apreciadas desde el punto de vista culinario (albahaca, menta, tomillo, orégano, romero), medicinal (marrubio, menta, poleo, salvia, toronjil) y dentro de la industria de la perfumería (lavanda, pachuli). Además, debido a lo atractivo de su follaje y flores, se ha promovido su cultivo en muchas regiones del mundo. Adicionalmente a estos usos, es importante mencionar la utilización de estas plantas en la medicina tradicional, ya que han sido empleadas para el tratamiento de diversos trastornos, tales como epilepsia, bronquitis, tuberculosis, hemorragias, inflamación de la cavidad oral y desordenes menstruales (Villaseñor, 2016).

Algunos de los metabolitos secundarios aislados de esta familia han mostrado interesantes actividades biológicas, tales como, antivirales, antiinflamatorias, antibacterianas y antialimentarias contra insectos.

Los constituyentes químicos de la familia Lamiaceae han sido estudiados principalmente por su valor económico, el cual está estrechamente relacionado con su alto contenido en aceites esenciales, los cuales consisten principalmente de mono y sesquiterpenos volátiles. Además, estos estudios han llevado a aislar un gran número de metabolitos secundarios, tales como esteroides, flavonoides, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos y sesterterpenos.

2.2.1 Lamiaceae en México

México posee una gran riqueza florística, la cual es considerada como una de las más variadas y complejas del planeta, siendo Lamiaceae una de las familias más diversas e importantes (Villaseñor, **2016**), en la cual se pueden encontrar una gran variedad de plantas perennes y hierbas anuales, que han sido ampliamente utilizadas desde hace cientos de años, como condimentos, ornamentales y para la obtención de aceites esenciales, útiles en la industria cosmética y de perfumes. También tienen un gran interés farmacéutico, por su amplia utilización en la medicina tradicional debido a sus propiedades antimicrobianas y antifúngicas (Waller *et al*, **2017**).

En la República Mexicana, Lamiaceae presenta una riqueza considerable en la mayoría de sus tipos de vegetación; se ha adaptado muy bien a las regiones con climas templados y húmedos, aunque también existe un número significativo de especies que prosperan en zonas secas, con temperaturas relativamente altas. Se encuentra ampliamente distribuida, principalmente a lo largo de las zonas montañosas y de manera primordial en el eje neovolcánico transversal (Figura 1). Algunos de sus linajes son endémicos del país o se han diversificado en éste, lo que subyace a la representación amplia de la familia en México, en particular, la de *Salvia*.

2.3 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. 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 (Clebsch, 2008).

Villaseñor (2004) indica que *Salvia* es el segundo género más diverso en la República Mexicana; se estima que en el país se distribuyen aproximadamente 315 especies del género, 232 de ellas son endémicas. De acuerdo con la clasificación de Bentham (1876), el género *Salvia* se divide en 4 subgéneros: *Calosphace*, *Leonia*, *Salvia* y *Sclarea*. Las especies mexicanas de *Salvia* se incluyen dentro del subgénero *Calosphace*. (Ramamoorthy y Elliott, 1998; Martínez-Gordillo *et al.*, 2013).

Las especies de *Salvia* son arbustos perennes. Sus tallos son largos, angulares y erectos, alcanzan alturas de 50 a 180 cm, dependiendo de la especie y las condiciones ambientales. Un número de ramas (usualmente de 3 a 5) son producidas a partir de brotes laterales del tallo principal. Las hojas son opuestas, simples, ovaladas y pecioladas.



Figura 1. Distribución de la Familia Lamiaceae en México

La inflorescencia es una verticilada terminal que consiste en 4 a 10 flores cuyo color puede variar ya sea violeta, lila, rojo, azul, blanco, amarillo (Figura 2). Todas las partes aéreas están cubiertas por pelos glandulares que imparten un color plateado a plantas maduras.

La floración comienza desde julio a enero, dependiendo de las condiciones climáticas y dura alrededor de un mes. Las plantas tienden a crecer de nuevo con facilidad después de cortar, tanto en altura como en ramificación, especialmente después del segundo año de siembra (Kintzios, **2000**).

Este género además de su uso alimenticio y cosmético tiene un amplio rango de actividades biológicas, destacando como antibacterial (Bisio *et al*, **2015**), antioxidante, antiviral, citotóxica, antitumoral, antifúngica y como tratamiento para enfermedades cardiovasculares, cerebrales, artritis, diabetes (Medjahed *et al.*, **2016**), tuberculosis, bronquitis (Topçu, **2006**).



Figura 2. Especies de *Salvia* en México **A.** *S. iodantha*; **B.** *S. purpurea*; **C.** *S. fulgens*; **D.** *S. sessei*; **E.** *S. carnea*; **F.** *S. elegans*; **G.** *S. microphylla*; **H.** *S. curviflora*; **I.** *S. mexicana* **J.** *S. patens*; **K.** *S. albo-caerulea*

2.3.1 *Salvia longispicata*

De acuerdo con la base de datos de Tropicos.org de GBIF.org (*the Global Biodiversity Information Facility*, 2019) la clasificación taxonómica para *Salvia longispicata* (Figura 3) es la siguiente:

Reino: Plantae

Phylum: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Lamiales

Familia: *Lamiaceae*

Género: *Salvia*

Especie: *Salvia longispicata*



Figura 3. Ejemplar de *S. longispicata*

2.3.2 Descripción botánica y usos en medicina tradicional

Es un arbusto perenne nativo del suroeste de México (Figura 4). El epíteto "longispicata" se refiere a los grupos de pequeñas flores de un azul morado intenso que sobresalen y se asemejan a pequeñas mazorcas de maíz. Las inflorescencias de 12-16 centímetros en espirales apretados de flores no se elevan por encima del follaje como sucede en muchas otras especies de *Salvia*. Esta especie es de crecimiento rápido, alcanzando más de 1 metro de alto en una temporada. Es una especie que se encuentra en bosques cerca de cuerpos de agua, en algunas ocasiones se puede encontrar en bosques perturbados (Figura 5).

De acuerdo con el texto *Historia de las Plantas de Nueva España*, se describe a *S. longispicata* como una planta de tallos cuadrados, hojas con márgenes más o menos crenelados y flores en espigas, también es conocida como "cantueso" y se dice que es útil como estimulante y sudorífico.

En la medicina tradicional mexicana se utiliza el término “cantueso” para designar a un grupo de especies de *Salvias* que comparten algunas características morfológicas y/o aromáticas y propiedades curativas, tal es el caso de *Salvia lavanduloides* Kunth y *Salvia longispicata* Mart. and Gal. las cuales son utilizadas para tratar problemas respiratorios, malaria, disentería, etc. (Jenks A.A. and Seung-Chul, K., 2013).



Figura 4. Distribución de *S. longispicata* en México (GBIF.org, 2019)

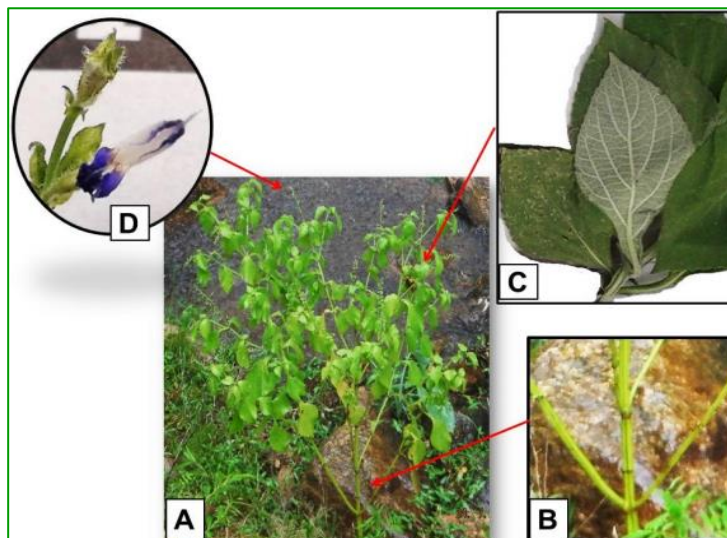


Figura 5. *S. longispicata* M. **A)** Arbusto; **B)** Tallo; **C)** Hoja; **D)** Flor

2.3.3 Estudios preliminares de los componentes de *Salvia longispicata*

Se han documentado algunos trabajos previos al estudio fitoquímico realizado, que describen los metabolitos secundarios aislados del extracto acuoso de hojas y tallos de *S. longispicata* recolectada en la localidad de Sierra Morena del Municipio de Villa Corzo (Chiapas) en donde se identificaron fenoles, flavonoides, glucósidos, saponinas, taninos y lactonas sesquiterpénicas (Nava J., (2016). *Actividad anticancerígena de extractos acuosos de Curatella americana L. (Dilleneaceae) y Salvia longispicata M. (Lamiaceae) en cultivos de la línea neoplásica de colon* (tesis de pregrado). Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas.

También se ha realizado el estudio del extracto de acetona de raíces y partes aéreas, en el que se describe el aislamiento y elucidación estructural de β -sitosterol, ácidos triterpénicos (ursólico y oleanólico), Naringenina y un compuesto identificado como un intermediario para la biogénesis de flavonoides y cumarinas (Paleo L. D., (2004). *Estudio Fitoquímico de Salvia longispicata* (tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de México.

2.4 Principales componentes químicos del género *Salvia*

Los metabolitos secundarios que han sido aislados de las especies de *Salvia* incluyen ácidos fenólicos (tales como el ácido cafeíco, rosmarínico, ferúlico, gálico y clorogénico), taninos, aceites esenciales (por ejemplo, cineol, alcanfor, tujona), flavonoides, diterpenos y triterpenos. La riqueza y diversidad fitoquímica aunada a la abundancia de especies de este género alrededor del mundo, ha alentado la búsqueda de compuestos con propiedades biológicas interesantes en plantas de este género.

Las partes aéreas de las *Salvias* por lo general contienen diterpenos, flavonoides, triterpenos y aceites esenciales con compuestos volátiles tales como los monoterpenos (Kintzios, **2000**).

2.4.1 Terpenos

Los terpenos, constituyen el grupo de productos naturales más numeroso; su nombre proviene de la trementina o resina de los pinos (en alemán *terpentin*). Pueden encontrarse en las partes aéreas de las plantas y también en animales, bacterias y hongos. La gran mayoría de estos compuestos se encuentran en las plantas, en forma de aceites esenciales. Además de su uso como aromas y fragancias en la industria de los alimentos y en perfumería, algunos tienen propiedades farmacológicas.

Los terpenos pueden clasificarse según el número de unidades de isopreno que incorporan en su estructura (Figura 6). A pesar de su diversidad, tienen una característica en general que permite clasificarlos fácilmente y es conocida como la regla del isopreno, postulada por Otto Wallach en 1887. Esta regla describe que todos los terpenos están constituidos a partir de la fusión repetitiva de unidades ramificadas de cinco carbonos, basadas en el esqueleto de isopentano. 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. Son clasificados según el número de unidades de cinco átomos de carbono que contienen (Tabla 1):

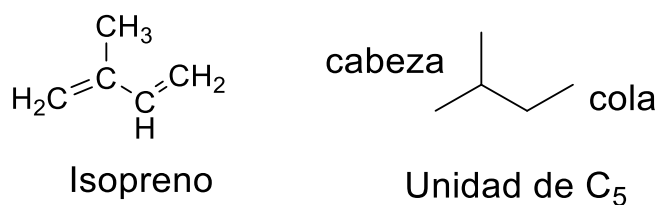


Figura 6. Estructura del isopreno

Tabla 1. Clasificación de terpenos

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

Desde que se observó la unidad repetitiva del isopreno en los terpenos, se trató de explicarlo mediante el estudio de las rutas metabólicas. La elucidación de la ruta metabólica del colesterol en los años sesenta por parte de Konrad Bloch y Feodor Lynen, sobre la base de los estudios realizados por John Cornforth y George Popjack, dio a conocer las reacciones químicas que explican por qué los terpenos están compuestos de unidades de cinco átomos de carbono. El compuesto de partida es el pirofosfato de isopentenilo (IPP por sus siglas en inglés) que, dependiendo del organismo o de la naturaleza química del terpeno final, puede obtenerse mediante dos vías diferentes (Figura 7). En animales y plantas superiores, el compuesto de partida es el ácido mevalónico (MVA por sus siglas en inglés), y algunas plantas, algas, bacterias y organismos patógenos, como el parásito de la malaria, lo sintetizan desde la 1-Desoxi-D-xilulosa-5-fosfato. Algunas bacterias utilizan los dos compuestos de partida indistintamente.

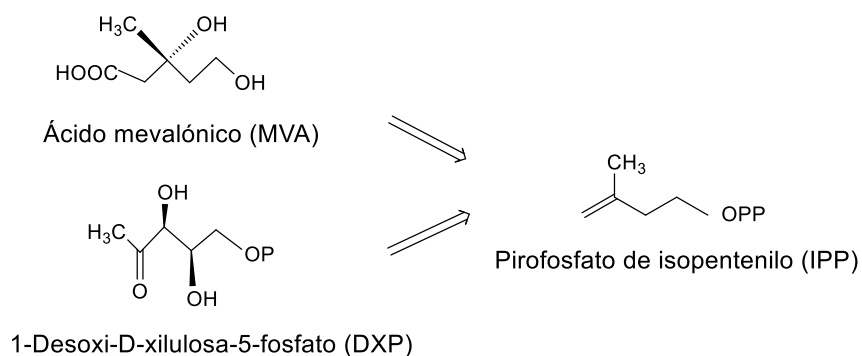


Figura 7. Estructura del IPP y la de sus precursores

Las bases bioquímicas para conocer y comprender la síntesis de los terpenos tuvo lugar a partir del aislamiento del ácido mevalónico como precursor de unidades de cinco átomos de carbono.

Esta ruta metabólica explica la obtención del alcohol dimetilalílico y su isómero el isopentenol, en forma de sus ésteres de pirofosfato considerados como los precursores fundamentales de todos los isoprenoides. De este modo, estas unidades de cinco átomos de carbono pueden incorporarse casi en cualquier número para producir la gran variedad de esqueletos terpenicos que se han encontrado en muchos de los ejemplares estudiados hasta la actualidad (Figura 8).

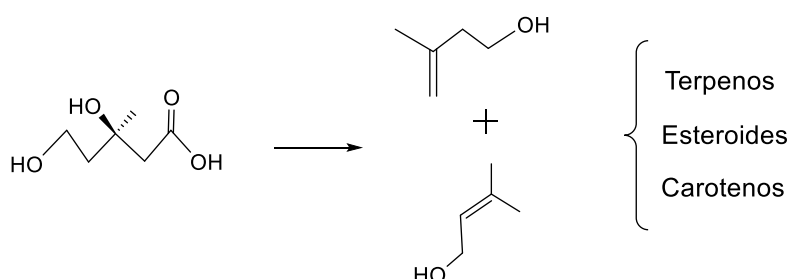


Figura 8. Estructura del ácido mevalónico precursor de terpenos

Los terpenos desempeñan importantes papeles defensivos en el reino vegetal ya que a menudo muestran una gran actividad insecticida y/o alimentaria para muchos insectos y herbívoros (Gershenzon *et al*, **1992**). Un ejemplo de esto, son las piretrinas, encontradas 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 (Taiz *et al*, **2015**).

Por otro lado, muchas plantas contienen en su follaje mezclas de monoterpenos 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 salvias son ejemplos de plantas que contienen aceites esenciales (Taiz *et al*, **2015**).

2.4.2 Diterpenos

Los diterpenos son compuestos de 20 átomos de carbono (cuatro unidades de isopreno) son bastante abundantes sobre todo en el mundo vegetal, aunque también existen en el mundo animal (Leland *et al*, **2006**).

El precursor clave es el pirofosfato de geranylgeranilo (GGPP por sus siglas en inglés) por lo general son sólidos cristalinos, mayoritariamente aislados de especies de las familias Asteraceae y Lamiaceae (Peters, **2010**). Atendiendo a su estructura química se pueden clasificar en lineales o cíclicos dependiendo de cómo se despliegue el GGPP (Figura 9), el sistema bicíclico que se forma inicialmente tendrá una configuración diferente de los estereocentros creados y dará lugar a diferentes esqueletos (Ruiz, **2002**).

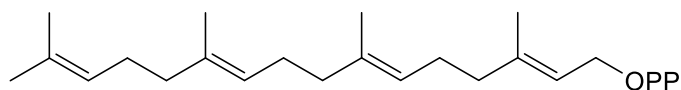


Figura 9. Estructura de GGPP

Los diterpenos son los principales componentes aislados de especies de *Salvia* y pueden ser de tipo abietano, abietano modificado, clerodano y clerodanos modificados (Figura 10). El contenido y tipo de diterpenos en especies del género *Salvia* está estrechamente relacionado con la distribución geográfica de las diferentes especies y con su agrupación taxonómica, es decir la sección a la que pertenecen. Los diterpenos aislados de especies del género *Salvia* norteamericanas poseen esqueletos de abietano y clerodano (Rodríguez-Hahn *et al*, **1992**). El interés farmacológico de los productos naturales de estructura terpénica ha ido en aumento en los últimos años.

Diversos estudios han destacado las distintas actividades biológicas, que incluyen propiedades antiinflamatorias, antibacterianas, antivirales, antifúngicas, citotóxicas, antitumorales y cardioprotectoras, (Chinou, **2005**; de las Heras *et al.*, **2009**; de las Heras *et al.*, **2003**; Dong *et al.*, **2011**; Ojha *et al.*, **2012**; Salminen *et al.*, **2008**).

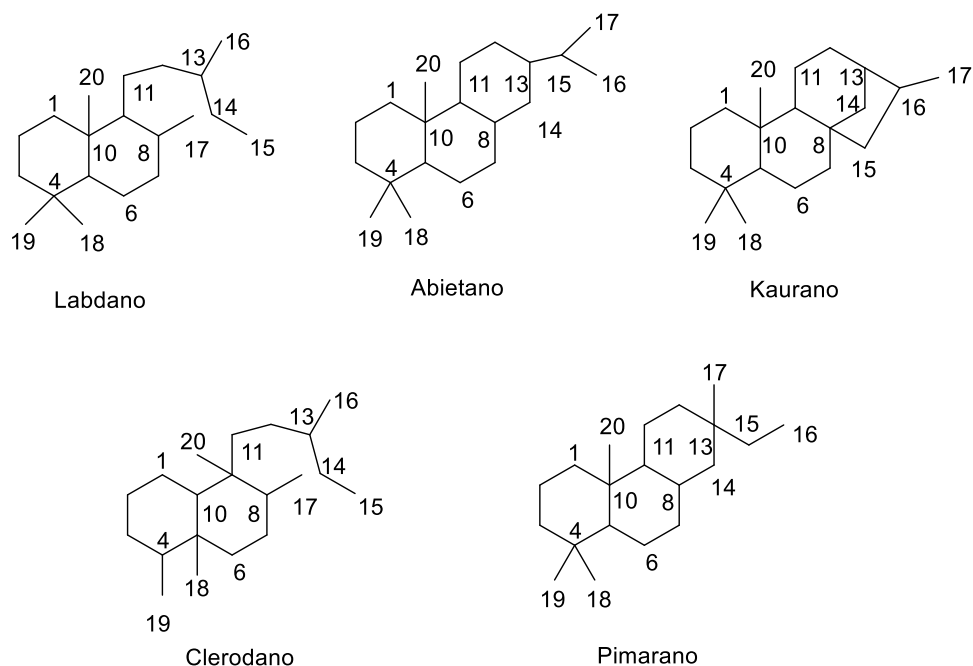


Figura 10. Diferentes tipos de estructuras de diterpenos

2.4.3 Diterpenos tipo clerodano

Los clerodanos son terpenos 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 en C-9 (C-11 a C-16, con C-16 unido a C-13, es decir, 3-metilpentilo). Los cuatro carbonos restantes (C-17 a C-20) están unidos a C-8, C-4, C-5 y C-9 respectivamente, en el sistema decalina como se ilustra en la Figura 11.

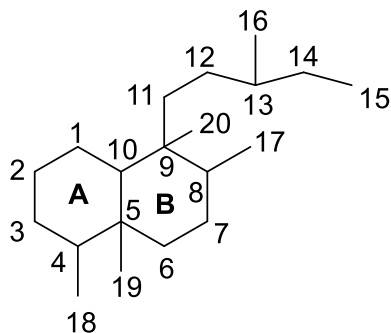


Figura 11. Esqueleto base de un diterpeno tipo clerodano y su numeración

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* y *S. littoralis* que causan importantes pérdidas económicas. Varios géneros de la familia de plantas Lamiaceae han sido identificados como abundantes fuentes de clerodanos con estas propiedades. Los diterpenos de tipo clerodano también pueden exhibir otras actividades farmacológicas, incluyendo actividad antitumoral, antifúngica, antibiótica, así como hipoglucémico, hipolipidémica y actividad inhibidora de la antitrombina (Li *et al*, 2016).

En lo que respecta a especies del género *Salvia* pertenecientes al subgénero *Calosphace*, aproximadamente el 80% de los diterpenos aislados posee un esqueleto de clerodano o clerodano modificado. Los diterpenos de tipo clerodano aislados de especies del género *Salvia* son casi exclusivamente *neo-clerodanos*, con algunas excepciones y pueden presentar las siguientes funcionalidades:

- 1) Una γ -lactona α , β -insaturada
- 2) Una α o β -butenólida en los metilos 20 y 17 sin oxidar
- 3) Una δ -lactona
- 4) Un grupo hidroxilo o acetoxi axial en C7.

Los clerodanos modificados poseen rearrreglos carbonados pocos comunes, dando origen a nuevos esqueletos. Los diterpenos cuyo esqueleto se origina a partir del clerodano son: languidulano, salvigenano y salvilanguidulano entre otros (Rodríguez-Hahn *et al*, 1996) (Esquivel B., 2008). Adicionalmente, en años recientes se han aislado otros clerodanos modificados, aumentando así el número de esqueletos carbonados que se originan a partir del clerodano, ellos son salvileucalano, tipo Salvileucalina B y tipo Salvileucalina C. La estructura de estos clerodanos modificados se muestra en la Figura 12.

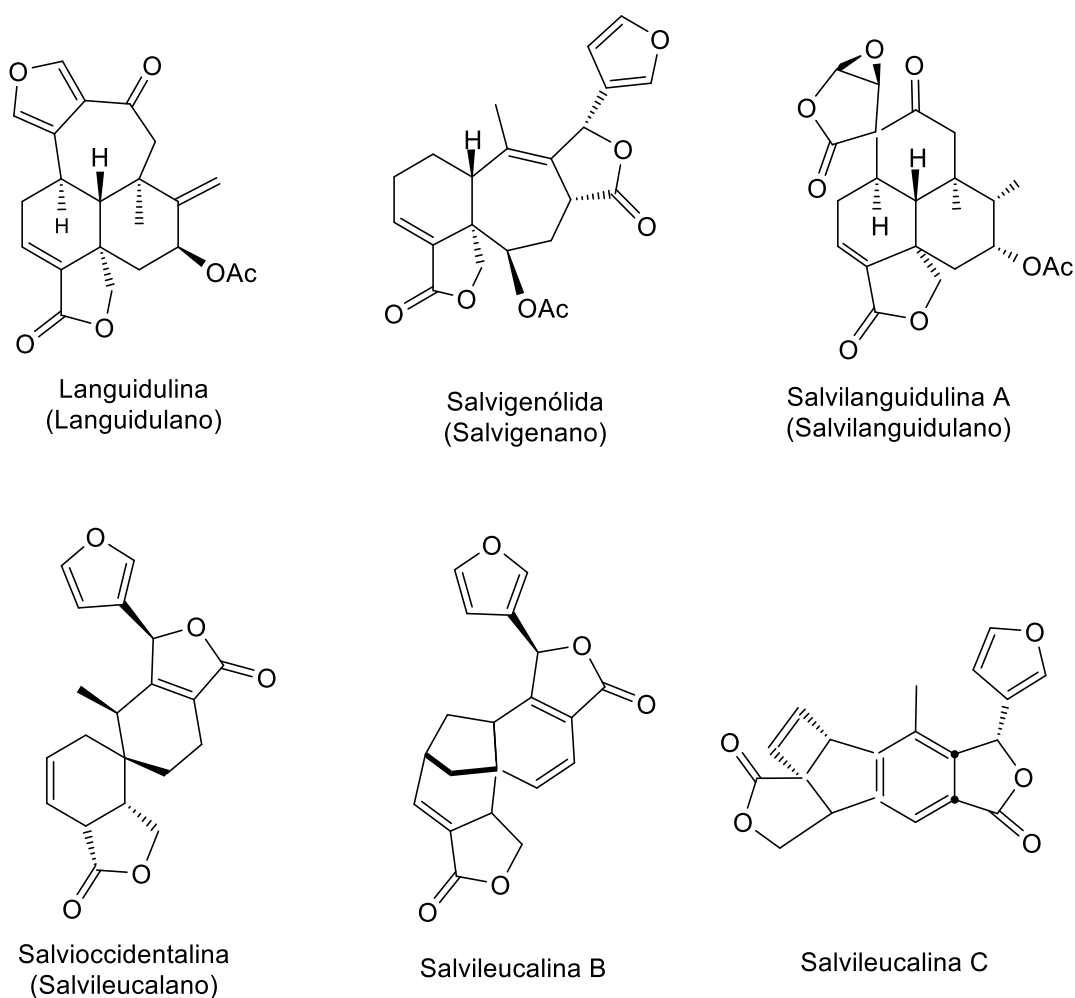


Figura 12. Clerodanos modificados aislados de especies del género *Salvia*

2.4.4 Triterpenos

Los triterpenos (30 átomos de carbono) contienen 6 unidades de isopreno en su esqueleto y constituyen un grupo muy amplio de compuestos naturales.

La unión cola-cola de dos moléculas de Farnesil-PP produce el escualeno que es el precursor de todos los triterpenos (Figura 13).

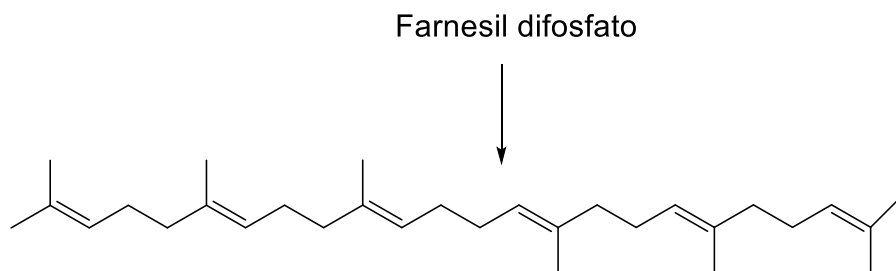


Figura 13. Estructura del Escualeno

Las estructuras de triterpenos más comunes detectados en las especies de *Salvia* son los ursano, oleanano y lupano, los cuales exhiben una gran variedad de actividades biológicas; de hecho, los ácidos ursólico y oleanólico se han encontrado en casi todas las *Salvias* estudiadas hasta el momento. Dichos ácidos exhiben actividades antimicrobianas, antiinflamatorias, antihiperlipidémicas, antiulcerosas, hepatoprotectoras, hipoglicémicas, anticarcinogénicas y antiangiogénicas, entre otras (Topçu, **2006**).

Los triterpenos son usualmente sólidos blancos de alto punto de fusión y están ampliamente distribuidos entre resinas vegetales, corcho y cutina; se han aislado en varias partes de las plantas tales como flores, hojas, corteza y madera. Existen varios grupos de triterpenos, incluyendo triterpenos comunes, esteroides, saponinas, esteroles y glicósidos cardíacos (Leland *et al*, **2006**).

Los triterpenos han mostrado diversas actividades farmacológicas como anticancerosa, antiinflamatoria, antimalárica, antihelmíntica, hipoglucemiantes, hipolipemiantes y hepatoprotectores (Cheng *et. al.*, **2010**), resaltando la importancia de este tipo de compuestos.

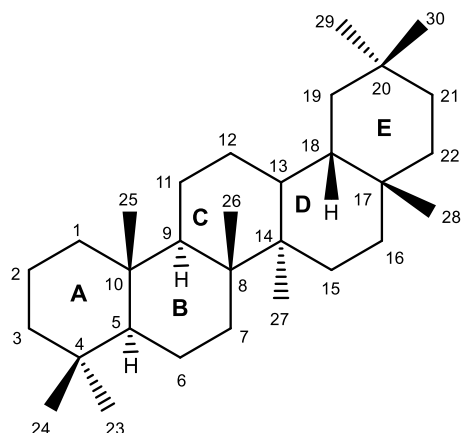


Figura 14. Esqueleto pentacíclico de triterpeno y su numeración

2.4.5 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 (Taiz *et al.*, **2015**).

Existen numerosas categorías de estos compuestos, incluyendo los fenoles simples, fenilpropanoides, ácidos fenólicos, flavonoides, taninos y quinonas. Algunos son solubles solo en disolventes orgánicos, otros son solubles en medios acuosos en combinación con ácidos carboxílicos o glucósidos y otros son grandes polímeros insolubles (Leland *et al.*, **2006**).

Muchos compuestos fenólicos de acuerdo con su diversidad química tienen papeles importantes en las plantas como defensa contra herbívoros, hongos e insectos (Andersen *et al.*, **2006**). Otros funcionan como atractores de polinizadores 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).

La *Salvia* es una rica fuente de polifenoles, algunos de los cuales son únicos en este género. Los compuestos fenólicos son conocidos por mostrar una serie de actividades farmacológicas como analgésicas, antialérgicas, anticancerosas, antiinflamatorias, antiespasmódicas, antiulcerosas y con mayor frecuencia probados como antioxidantes (Bonkanka T., **2006**) mostrando excelentes resultados.

2.4.6 Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos constituyen la mayor parte de compuestos solubles en agua. La mayoría de estos compuestos en las especies de *Salvia* son exclusivamente aquellos derivados de ácido cafeico. Los monómeros que están frecuentemente presentes en las especies de *Salvia* son el ácido cafeico y el ácido ferúlico. El ácido rosmarínico es el dímero cafeico más abundante en las especies de *Salvia*, también es el principal responsable de la alta actividad antioxidante (Lu & Foo, **2002**; Kamatou *et al*, **2010**). Las estructuras de algunos ácidos fenólicos se observan en la Figura 15.

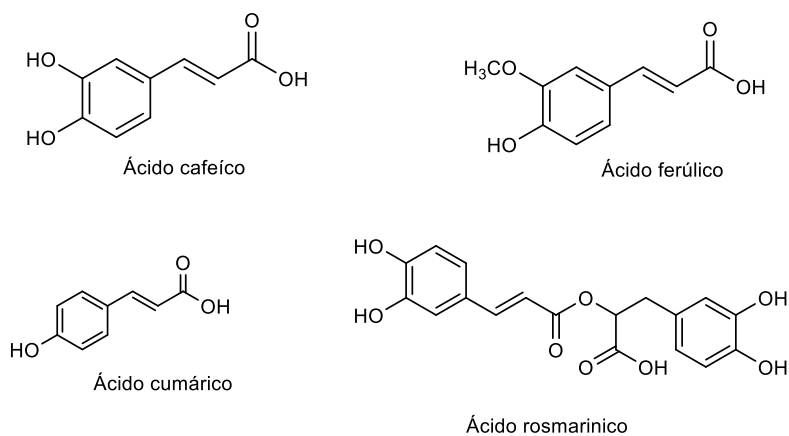


Figura 15. Estructura química de algunos ácidos fenólicos

2.4.7 Flavonoides

Los flavonoides constituyen una enorme clase de productos naturales con gran diversidad estructural, actualmente, se conocen cerca de 3000 de estos compuestos. Son generalmente solubles en agua y se dividen químicamente en diferentes grupos: chalconas, flavonas, flavonoles, flavanonas, antocianinas, isoflavonas, entre otros (Walter *et al*, 2009).

El esqueleto común a todos los integrantes del grupo consta de dos anillos de seis átomos de carbono (designados con las letras A y B) unidos mediante un puente de tres átomos de carbono que por lo común forma un tercer ciclo. Dependiendo del grado de oxidación del anillo central, se obtienen las diferentes estructuras de cada compuesto flavonoide en particular. Las estructuras básicas correspondientes a cada uno de estos grupos se muestran en la Figura 16.

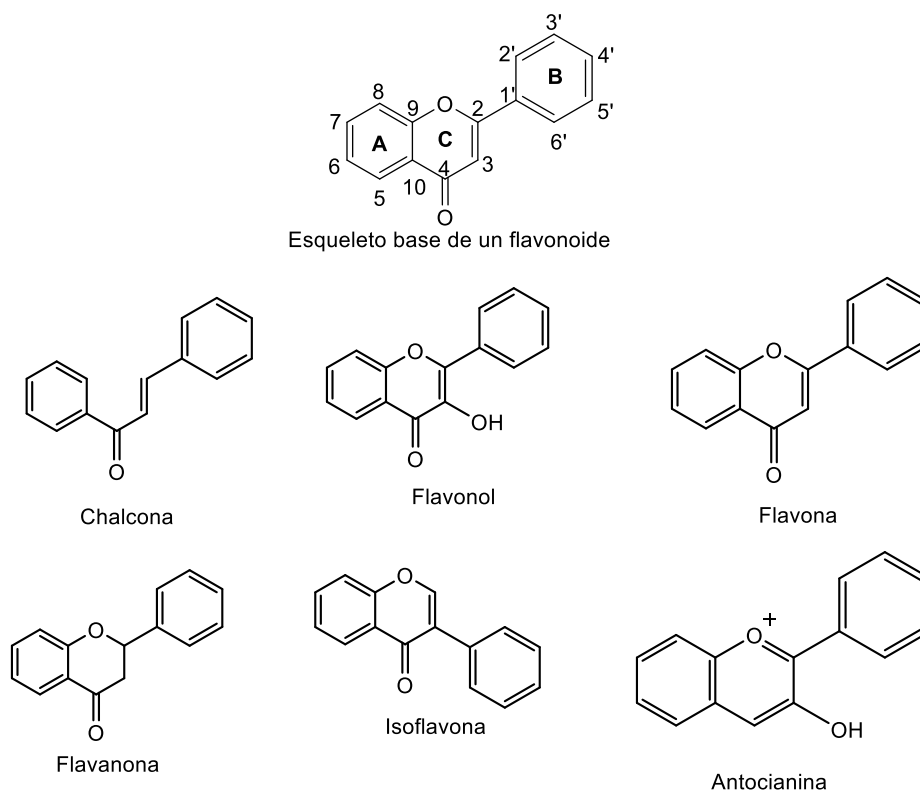


Figura 16. Esqueleto fundamental y clasificación de flavonoides

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.

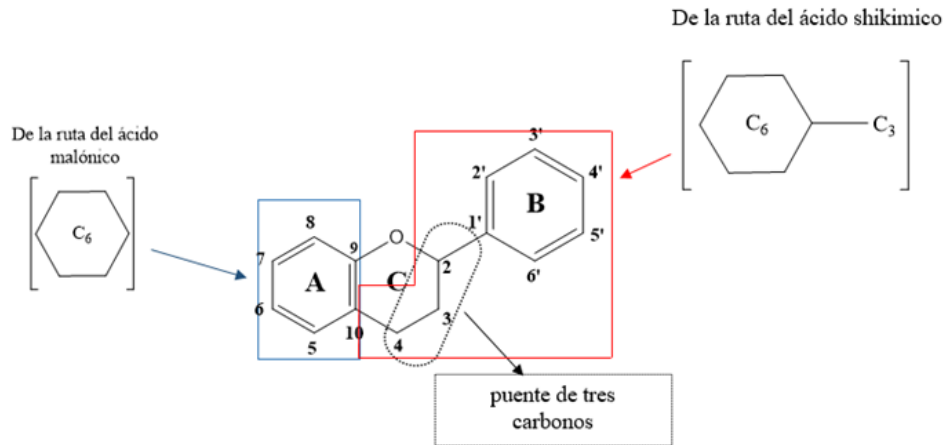


Figura 17. Esqueleto básico de un flavonoide, su numeración y origen biosintético

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 de isopentilo modificadas (Taiz *et al.*, 2015).

Los flavonoides están ampliamente distribuidos en las especies de Salvia, los principales están presentes como flavonas, flavonoles y sus glucósidos. Las flavonas hidroxiladas en la posición 6 se han reportado con importancia taxonómica para este género. Los flavonoides son responsables de la mayoría de los colores rojos, azules y amarillos que se observan en las flores debido a los diversos sustituyentes; entre más conjugadas se encuentren estas moléculas, presentaran colores más brillantes. Otra de las funciones que desempeñan es como defensa al proporcionar sabores y olores característicos al material vegetal que son organolépticamente desagradables para los rumiantes e insectos (actividad antialimentaria).

Muchos de los roles biológicos de estas moléculas están asociados con su capacidad de unirse a metales como hierro y cobre, los cuales inducen la actividad antioxidante. Además, se conoce que los flavonoides presentan actividad antifúngica, bactericida, antiinflamatoria, como agentes anticancerosos, antivirales, antitóxicos y hepatoprotectores (Leland *et al*, **2006**).

2.4.8 Flavanonas

Las flavanonas se caracterizan por la ausencia del doble enlace entre C2 y C3 y porque poseen un centro quiral en la posición 2. Su estructura base se puede observar en la Figura 18.

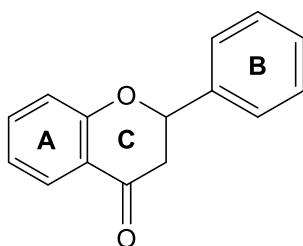


Figura 18. Estructura básica de una flavanona

Con relación a las flavonas y flavonoles, las flavanonas se encuentran menos distribuidas en la naturaleza. Las más encontradas son la naringenina y el eriodictol, relacionadas con la apigenina y la luteolina, respectivamente. Se conocen hasta ahora más de 350 agliconas de flavanonas (Iwashina, **2000**).

Por lo general, están glicosilados por un disacárido en la posición siete para formar glucósidos de flavanona. Al ser compuestos naturales, las flavanonas tienen una alta disponibilidad y un buen perfil farmacológico. Muestran muchas actividades biológicas por ejemplo antifúngica, antibacteriana, antimicrobiana, antioxidante, analgésica, antiinflamatoria y antitumoral (Murti & Mishra, **2014**).

2.4.9 Flavonas

Las flavonas contribuyen a la coloración de órganos vegetales tales como flores y frutos. De allí surge su relevancia en los procesos de polinización y dispersión de semillas.

Las flavonas se caracterizan por la presencia de un doble enlace entre C-2 y C-3 y por presentar sustituyentes en los anillos A y B. De las cerca de 400 agliconas de flavonas conocidas (Iwashina, **2000**), las más frecuentemente encontradas en plantas son la apigenina, la luteolina y la diosmetina. En plantas de las familias *Compositae*, *Lamiaceae* y *Umbelliferae*, estos compuestos aparecen, en general, como O y/o C-glucósidos (unidos en las posiciones 7, 6 y 8, respectivamente, como se presenta en la Figura 19) (Cuyckens & Claeys, **2004**).

Como pigmentos protectores, impiden o reducen el daño que produce la radiación UV sobre las plantas.

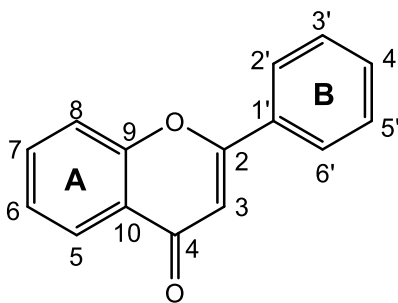


Figura 19. Estructura básica y numeración de una flavona

3.- OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Realizar el estudio fitoquímico de una población de *S. longispicata* colectada en el municipio de Xilitla Las Flores, San Luis Potosí a fin de contribuir al conocimiento químico de las especies del género *Salvia* de México.

3.2 Objetivos Particulares

- Aislar y purificar los metabolitos secundarios presentes en el extracto de diclorometano y acetona de las hojas de *Salvia longispicata* mediante diversas técnicas cromatográficas.
- Determinar la estructura química de los compuestos mediante el uso de técnicas espectroscópicas modernas como resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopia de Infrarrojo (IR) y espectrometría de masas (EM).
- Llevar a cabo estudios de actividad biológica para los metabolitos secundarios que se identifiquen en la planta.

4.- DESARROLLO EXPERIMENTAL

4.1 Métodos cromatográficos

Para el aislamiento y purificación de los compuestos se realizaron separaciones mediante cromatografía en columna (CC) usando como fase estacionaria sílica gel Malla 230-400 en una proporción de 1:20 por gramo de extracto; cromatografía a presión de aire o “flash” (CF) con soporte de sílica gel 230-400 (Macherey-Nagel), SEPHADEX (50 g en metanol) y octadecilsilicio (C18).

Durante el fraccionamiento se realizó el monitoreo constante por cromatografía en capa delgada analítica (CCDa) de gel de sílice 60G UV₂₅₄ ALUGRAM de marca MACHEREY NAGEL 20×20 cm y 0.20 mm de espesor.

Se utilizaron placas de vidrio ALUGRAM de marca MACHEREY NAGEL SIL G-100 UV₂₅₄, SIL G-50 UV₂₅₄, SIL G-25 UV₂₅₄ de 20×20 cm y 1 mm, 0.5 mm y 0.1 mm de espesor, en una relación de 100 mg, 50 mg, 10 mg respectivamente de extracto por placa (según el caso) para cromatografía en capa delgada preparativa (CCDp).

La detección por exposición a la luz UV se observó en una lámpara Spectroline CX-20 a dos longitudes de onda (365 nm y 254 nm) y el posterior revelado se hizo por aspersion con solución reveladora de “OLEUM” preparada con 200 mL de ácido acético, 10 mL de ácido sulfúrico y 40 mL de agua o solución de sulfato cérico preparada con 230 g de hielo, 12 g de sulfato cérico y 22.2 mL de ácido sulfúrico seguido de calentamiento en una parrilla en ambos casos.

Los disolventes que se emplearon para la extracción y separación de los metabolitos fueron hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona y metanol obtenidos de manera comercial y que se destilaron en el laboratorio, previo a su uso.

Para la concentración de los extractos y fracciones se utilizó un rotavapor marca BÜCHI modelo RE111, con su respectivo baño de agua BÜCHI 461. También se utilizó un rotavapor de alto vacío modelo BÜCHI R-215 bomba aspiradora V-700 y baño de agua B-491.

4.2 Determinación de las constantes físicas, espectroscópicas y espectrométricas.

Los espectros de infrarrojo (IR) se determinaron en un espectrofotómetro IR Bruker Tensor 27, utilizando la técnica de disolución en cloroformo (CHCl_3), película o pastilla de KBr.

Los experimentos de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) fueron realizados en un espectrómetro Bruker Avance III 400 MHz, en un Bruker Avance III HD 500 MHz y un Bruker Avance III HD 700 MHz. Se utilizaron como disolventes cloroformo (CDCl_3) y metanol (CD_3OD) deuterados. El programa utilizado para el procesamiento de los espectros fue MestReNova versión 8.1.

Los espectros de masas (EM) se obtuvieron por la técnica DART (*Direct Analysis in Real Time*) en un espectrómetro Jeol, The AccuTOF JMS-T100LC y por la técnica FAB+ (*Fast Atom Bombardment Positive mode*) en un espectrómetro de masas, The MStation JMS-700.

Finalmente, los puntos de fusión fueron determinados en un aparato de Fisher-Johns y no están corregidos. Los datos de rotación óptica (RO) fueron medidos en un polarímetro Perkin Elmer 343.

4.3 Colecta del material vegetal

El material vegetal fue colectado el 24 de mayo de 2017 en el Mpio. Xilitla Las Flores, San Luis Potosí (coordenadas Latitud $21^\circ 27' 16''\text{N}$, Longitud: $99^\circ 04' 12''\text{W}$, Altitud 1500 m), en un bosque mesófilo de montaña (Figura 20).

El material vegetal fue identificado por el M. en C. Ramiro Cruz Duran de la Facultad de Ciencias de la UNAM.

La planta se secó a temperatura ambiente y posteriormente se separó en hojas y tallos de manera manual.

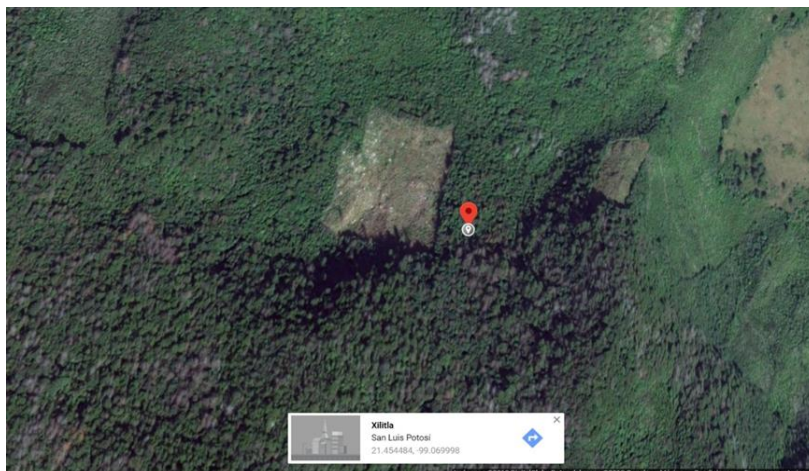


Figura 20. Ubicación en el mapa del sitio de colecta del material vegetal (2018 ©DigitalGlobe, Google Earth)

4.4 Extracto de diclorometano.

Para la preparación del extracto de diclorometano se emplearon 831.3 g de hojas secas y molidas de *S. longispicata*, las cuales se extrajeron por percolación con DCM; el extracto se concentró a presión reducida utilizando un rotavapor. Se obtuvieron 10.5 g de extracto.

4.5 Extracto de acetona.

Se preparó un segundo extracto nuevamente por percolación utilizando como disolvente acetona. El material vegetal empleado correspondió al material previamente extraído con DCM; el extracto acetónico se concentró hasta sequedad en un rotavapor. Se obtuvieron 4.7g de extracto seco.

El aislamiento y purificación de los compuestos se realizó empleando diferentes técnicas de separación como cromatografía en capa delgada preparativa (CCDp), cromatografía en columna (CC), columna flash (CF) y C18. La identificación y elucidación estructural de los compuestos se llevó a cabo mediante técnicas espectroscópicas, principalmente RMN, IR, EM.

4.6 Aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios del extracto de DCM

El extracto crudo se separó por cromatografía en columna (CC) en gel de sílice empleando un gradiente de elución con hexano/AcOEt (100:0-0:100). Se obtuvieron 126 fracciones primarias de 300 mL cada uno. Las fracciones se reunieron en 31 fracciones primarias (A-D') de acuerdo con la similitud que presentaron en cromatografía en capa delgada analítica (CCDa).

4.6.1 Compuesto 1

La fracción E (392 mg) se analizó mediante RMN ^1H en donde se observó una mezcla compleja donde el compuesto mayoritario correspondía al ácido Hardwiickico (**1**); además al realizar el monitoreo por CCDa se observó que no había separación de los componentes.

Debido a lo anterior, se procedió a purificar el ácido Hardwiickico mediante una reacción de metilación con diazometano empleando el procedimiento descrito en *Organic Syntheses*, Vol. 2, (1935). El diazometano se preparó *in situ* utilizando N-Nitrosometilurea como precursor. El producto de reacción (416.3 mg) se purificó mediante CC utilizando gel de sílice como soporte y una mezcla de hexano/acetona (9:1) como disolvente de elución. Se obtuvieron 12 fracciones (A-L). La fracción A (185.9 mg) se purificó nuevamente a través de una CCDp en donde se aisló el compuesto **1a** (50.8 mg) como un líquido aceitoso amarillento.

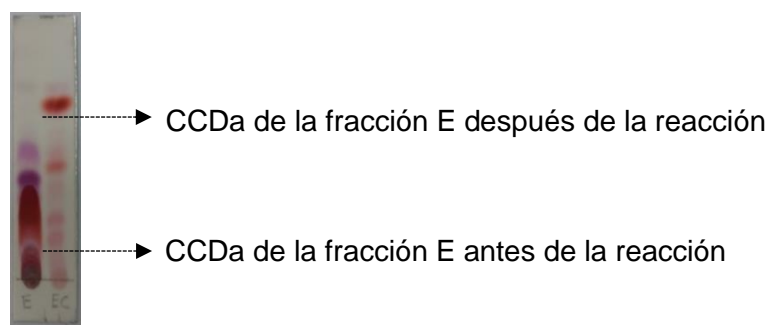


Figura 21. CCDa de la fracción E, E = perfil cromatográfico de la muestra antes de esterificar y EC = perfil cromatográfico después de esterificar con diazometano. Sistema de elución: hexano/acetato de etilo (8:2)

En la Figura 21 se observa que tanto antes como después de la metilación con diazometano predomina el compuesto **1** (franja roja en ambos casos) y que después de la reacción de metilación con diazometano hay una mejor separación.

4.6.2 Compuesto 2

El compuesto **2** se obtuvo de la fracción S a través de una columna cromatográfica utilizando 1.1677 g de muestra, sílica gel 230-400 como soporte y como fase móvil DCM/M₁ (98:2); M₁ consistió en una mezcla de acetato de etilo, metanol y agua en una proporción 200:16:7 respectivamente; de la CC se colectaron 30 fracciones de 125 mL cada una. El compuesto **2** se identificó en la fracción número 13 como un sólido cristalino de color verde con punto de fusión de 203-205°C.

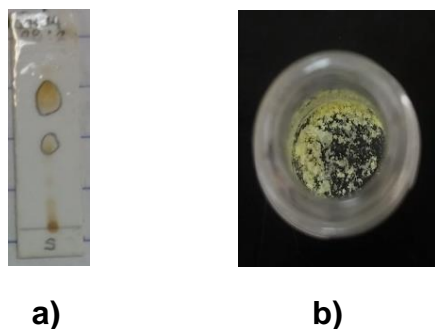


Figura 22. a) CCDa de la fracción con la fase DCM/M₁ en proporción (98:2), **b)** Aspecto del sólido obtenido

4.6.3 Compuestos 3 y 4

Los compuestos **3** y **4** fueron identificados en la fracción T. La fracción (432 mg) se separó mediante una cromatografía Flash empacada con sílica gel 230-400 como soporte en una columna de 20 cm de longitud y 5 cm de diámetro, 5 mL por minuto como velocidad de flujo y una mezcla de DCM/M₁ (9:1) como eluyente. Se obtuvieron 27 fracciones de 50 mL cada una. La fracción 2 (T2) se purificó por medio de una CCDp en placa de vidrio de 20×20 cm y 0.25 mm de espesor y como eluyente hexano/M₁ (6:4) para obtener el compuesto **3** (T2a) como un polvo ligeramente amarillo y el compuesto **4** (T2c) como un polvo incoloro.



Figura 23. CCDa de la fracción 2 en un sistema de elución DCM/M₁ en proporción (9:1)

4.6.4. Compuesto 5

El compuesto **5** se aisló de las fracciones más polares. Para esta fracción se utilizaron 534 mg de muestra, la cual se separó por medio de una cromatografía Flash empacada con sílica gel 230-400 como soporte de 20 cm de longitud y 5 cm de diámetro, 5 mL por minuto como velocidad de flujo y una mezcla de DCM/M₁ (9:1) como eluyente. Se colectaron 33 fracciones de 50 mL cada una; el compuesto **5** se obtuvo en las fracciones 9 a 14 como un polvo de color amarillo pálido y punto de fusión de 155-157°C.



a)



b)

Figura 24. a) CCDa de la fracción 13 en un sistema de elución de DCM/M₁ en proporción (9:1) a partir de la fracción 9 a 14 se obtuvo el compuesto **5**, **b)** Aspecto del sólido obtenido

4.7 Aislamiento y purificación de los metabolitos secundarios del extracto de Acetona

El extracto crudo se separó por cromatografía en columna abierta (CC) en gel de sílice 230-400 empleando un gradiente de elución con hexano/M₁ (M₁: AcOEt: MeOH: H₂O) (100:0-0:100). Se obtuvieron 147 fracciones primarias de 125 mL cada una.

Las fracciones se reunieron de acuerdo con la similitud que presentaron en cromatografía en capa delgada analítica (CCDa) en 24 (A-W).

4.7.1 Compuesto 6

La fracción M (60 mg) se separó por CCDp empleando como eluyente un sistema constituido por DCM/acetona (8:2) para obtener el compuesto **6** como un sólido cristalino de color verde claro y punto de fusión de 210-212°C.



Figura 25. CCDa de la fracción *M* comparado con *Ma* (compuesto **6**) aislado

4.7.2 Compuesto 7

La fracción T (416.9 mg) se sometió a una CC en C18, se empleó un sistema constituido por agua/metanol (95:5) en la fracción 3 se identificó el compuesto **7** como un sólido de color verde claro y punto de fusión de 168-173 °C.

4.8 Otros Compuestos

Además de los compuestos descritos, se identificaron las mezclas de triterpenos ácido ursólico (**8a**) y ácido oleanólico (**8b**) como se muestra en la Figura 26 en el extracto de diclorometano, para ello la fracción H (187.9 mg) se sometió a una columna cromatográfica SEPHADEX LH-20 (50 g) en metanol como eluyente y se colectaron 16 fracciones de 125 mL cada una, a partir de la fracción 8 se observó la formación de un sólido de color blanco.

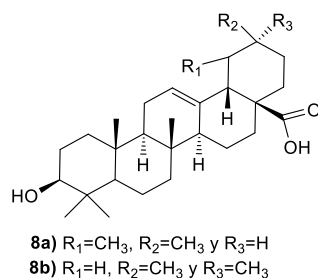


Figura 26. Estructuras del ácido ursólico (**8a**) y del ácido oleanólico (**8b**)

Los compuestos estigmasterol (**9a**) y β -sitosterol (**9b**) que se observan en la Figura 27 se identificaron en el extracto de diclorometano en la fracción F (354.9 mg) a través de una columna Flash empacada con sílica gel 230-400 como soporte de 20 cm de longitud y 5 cm de diámetro, 5 mL por minuto como velocidad de flujo y una mezcla de Hexano/M₁ (96:4) como eluyente. Se colectaron 12 fracciones de 50 mL cada una; se juntó de la fracción 1 a 5 debido a su perfil cromatográfico similar y se purificó por medio de una CCDp en placa de vidrio de 20x20 cm y 0.5 mm de espesor y como eluyente DCM/M₁ (9:1) para aislar la fracción mayoritaria que se identificó como la mezcla de estigmasterol y β -sitosterol.

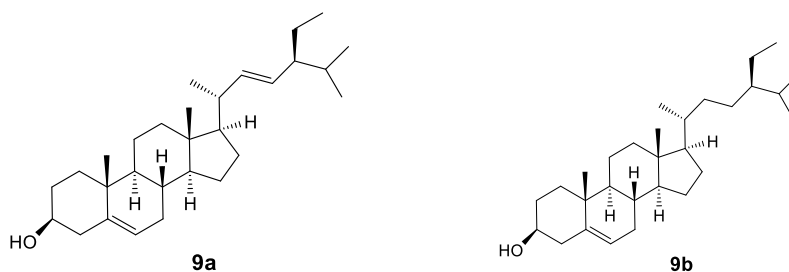


Figura 27. **9a)** Estigmasterol, **9b)** β -sitosterol

4.9 Actividad Biológica

Los ensayos de la actividad antiprotozoaria y antidiarreica se realizaron en el Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional "Siglo XXI" del IMSS, a cargo del Dr. Fernando Calzada.

▪ Ensayo Antiprotozoario

La cepa HM1-IMSS de *Entamoeba histolytica* utilizada en todos los experimentos se cultivó axénicamente (una sola especie microbiana) a 37°C en medio TYI-S-33 suplementado con 10% de suero bovino inactivado por calor. En el caso de *Giardia lamblia*, se cultivó la cepa IMSS: 8909:1 en medio modificado TYI-S-33 suplementado con 10% de suero bovino y bilis bovina. Los trofozoítos se mantuvieron axénicamente y para los ensayos se emplearon en la fase logarítmica del crecimiento.

Las pruebas de susceptibilidad *in vitro* se realizaron utilizando un método de subcultivo. Trofozoitos de *E. histolytica* (6×10^3) o *G. lamblia* (5×10^4) se incubaron durante 48 h a 37 °C en presencia de diferentes concentraciones (2.5 a 200 µg/mL) del extracto crudo o compuestos puros en dimetilsulfóxido (DMSO). Se utilizó metronidazol como fármaco amebicida y giardicida como estándar, un control (medio de cultivo más trofozoítos y DMSO) y un blanco (medio de cultivo). Después de la incubación, los trofozoítos se separaron por enfriamiento y se subcultivaron muestras de 50 µl de cada tubo en medio fresco durante otras 48 h. El número final de parásitos se determinó con un hemocitómetro y los porcentajes de inhibición del crecimiento de trofozoitos se calcularon por comparación con el cultivo control.

Los resultados se confirmaron mediante un método colorimétrico: los trofozoítos, se lavaron y se incubaron durante 45 min a 37 °C en solución salina buffer de fosfatos con MTT (3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio) y metosulfato de fenazina. El colorante producido (formazan) se extrajo y la absorbancia se determinó a 570 nm. Los experimentos se realizaron por duplicado para cada protozoario y se repitieron al menos tres veces.

▪ **Ensayo Antidiarreico**

Estos estudios se realizaron con la aprobación del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional "Siglo XXI" del IMSS (Número de aprobación: R-2012-3601-182) y de acuerdo con la norma oficial mexicana NOM 0062-ZOO-1999 titulada "Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio".

Ratas macho Sprague-Dawley (200-250 g) del bioterio del IMSS, se mantuvieron en ayuno durante la noche con disponibilidad de agua ad libitum, hasta el inicio de los experimentos.

El método descrito por Williamson y col. (1996) se adoptó para estudiar el efecto de los compuestos sobre hiperperistalsis en ratas. Los animales de prueba se dividieron en grupos de seis individuos para formar el grupo de control y el grupo de prueba. Las ratas se trataron por vía oral con cada compuesto (0.01, 0.1, 1.0, 10, 20, 40 mg/kg en 1 mL de una solución al 2% de dimetilsulfóxido (DMSO) en agua) o vehículo (1 mL de una solución de DMSO al 2% en agua) o clorhidrato de loperamida (Sigma) (0.1, 1.0, 10, 20, 40 mg/kg en 1 mL de una solución de DMSO al 2% en agua).

Después de 20 minutos, cada uno de estos animales recibió 1 mL de una suspensión de carbón al 10% en goma arábiga acuosa al 5%, por vía oral. Todos los animales se sacrificaron después de 30 minutos, se extrajo el estómago y el intestino delgado y se extendieron sobre una superficie de vidrio limpio. La distancia recorrida por la suspensión de carbón se midió y luego se expresó como el porcentaje de la distancia desde el píloro hasta el ciego.

Posteriormente, se construyó una gráfica del porcentaje de inhibición frente a la concentración, la mejor línea recta se determinó mediante análisis de regresión y se calcularon los valores de concentración inhibidora al 50% (IC50). Se calculó el coeficiente de regresión, su nivel de significación (p) y el coeficiente de correlación. Los experimentos se realizaron seis veces para cada concentración.

5.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Estudio fitoquímico del extracto de diclorometano

El extracto de diclorometano de las hojas de *Salvia longispicata* condujo al aislamiento e identificación de cinco compuestos: un flavonoide y cuatro diterpenos, su elucidación estructural se llevó a cabo mediante técnicas espectroscópicas, principalmente resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopia de infrarrojo (IR) y espectrometría de masas (EM). A continuación, se discuten los aspectos más relevantes de la determinación estructural de los compuestos antes mencionados.

Compuesto 1a Éster metílico del Ácido Hardwiickico

La fracción E del extracto de diclorometano se analizó por cromatografía en capa delgada analítica y se observaron bandas características de grupos funcionales ácidos que dificultan la separación en sílica gel por lo que se procedió a realizar una resonancia magnética nuclear de protón con el objetivo de definir qué tipo de compuestos constituían la mezcla. La RMN ^1H indicó que la muestra consistía en un compuesto ácido mayoritario (compuesto **1**) con características similares a uno ya aislado previamente en el laboratorio de otra especie de *Salvia*. Con el objetivo de purificar el compuesto y separarlo de los constituyentes minoritarios de la mezcla, se realizó una esterificación con diazometano, usando N-Nitrosometilurea como precursor. En la Figura 28 se muestra el mecanismo de reacción de metilación del compuesto **1**.

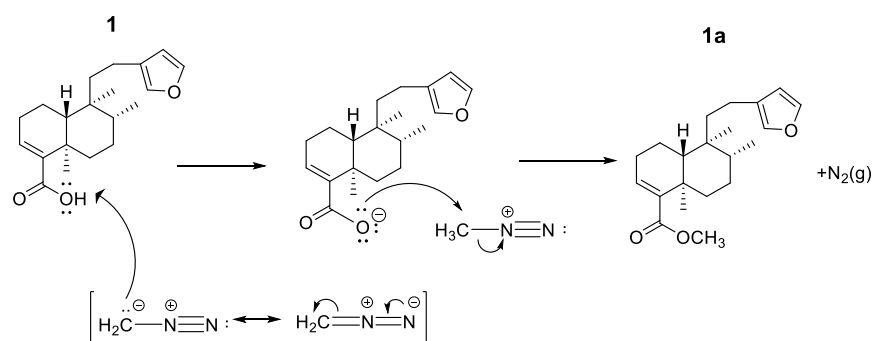


Figura 28. Mecanismo de reacción de metilación del Ácido Hardwiickico (**1**)

El compuesto **1a** (50.8 mg) se aisló como un líquido aceitoso amarillento y $[\alpha]_D^{20} - 249$ (c 0.001, CHCl_3) (Ver anexo A.1.). El espectro de masas mostró un ión molecular a m/z 331 $[\text{M}+\text{H}]^+$ correspondiente con la fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{30}\text{O}_3$ (Ver anexo A.1.1). En el espectro de infrarrojo (Ver anexo A.1.2) se observaron bandas de absorción características de anillo furánico β -sustituido en 1500.99 cm^{-1} y 873.49 cm^{-1} , una banda de estiramiento característica de un grupo carbonilo de un éster α , β insaturado en 1714.06 cm^{-1} y una banda de metil éster en 1162.72 cm^{-1} , además de una banda de absorción en 2953.77 cm^{-1} correspondiente a grupos metilo ($-\text{CH}_3$ con estiramiento asimétrico), una banda en 2870.11 cm^{-1} de metilos con estiramiento simétrico, una banda en 2923.47 cm^{-1} que corresponde a grupos metilenos ($-\text{CH}_2-$ con estiramiento asimétrico); otra banda en 1453.78 cm^{-1} de torsión asimétrica que indica metilos y en 1382.13 cm^{-1} se confirma la presencia de grupos metilo de torsión simétrica.

En el espectro de RMN ^{13}C (Ver Anexo A.1.4) se observaron 21 señales, cuatro de ellas correspondientes a grupos metilo, seis metilenos, seis metinos y cinco carbonos completamente sustituidos, de los cuales uno pertenece a un carbonilo, todos ellos asignados de acuerdo con el análisis del experimento DEPT 90 y DEPT 135 (Ver anexos A.1.5 y A.1.6).

En el espectro de RMN ^1H (Ver anexo A.1.3) en la región de los átomos de hidrógenos aromáticos se observan cuatro señales unidos a carbono sp^2 . Tres de ellas atribuibles a un anillo de furano mono sustituido (Figura 29). Con base en el desplazamiento y las constantes de acoplamiento observadas para los átomos de hidrógeno constituyentes del anillo, el furano debe estar sustituido en la posición β . Los átomos de hidrógeno en posición α al oxígeno a frecuencias más elevadas: el hidrógeno α' en δ 7.34 (t , 1.6 Hz) y el hidrógeno α en 7.19 ppm como una señal doble y el hidrógeno β en 6.25 ppm como una señal simple ancha. Los respectivos carbonos se observan en 142.7, 138.4 y 111.0 ppm de acuerdo con el espectro HSQC (Ver anexo A.1.9). El carbono beta al oxígeno del furano se asignó con base en su correlación con los metinos del anillo del furano observada en el espectro HMBC (Ver anexo A.1.7).

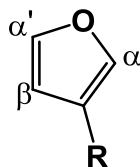


Figura 29. Anillo de furano del compuesto **1a**

Por otro lado, el perfil de señales entre 1 y 2.5 ppm del espectro de RMN ^1H sugiere que el compuesto **1a** presenta un esqueleto que podría corresponder a un labdano o un clerodano (Figura 30), sin embargo, se sabe que el esqueleto más usual en *Salvias americanas* es el clerodano, por lo que se consideró a éste como estructura de trabajo. El metilo de la posición 8 δ_{H} 0.83/ $\delta_{^{13}\text{C}}$ 15.98 se observó como una señal doble con una constante de acoplamiento de 6.8 Hz. El metilo 20 se observó como una señal simple en δ_{H} 0.76/ $\delta_{^{13}\text{C}}$ 18.4 y finalmente el metilo 19 en 1.27 δ_{H} / $\delta_{^{13}\text{C}}$ 20.9.

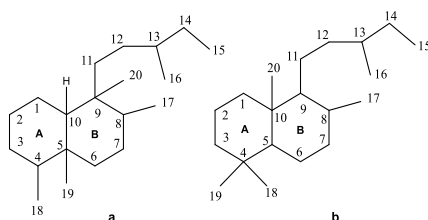


Figura 30. Esqueletos de clerodano (a) y labdano (b)

Algunos compuestos de tipo clerodano presentan un anillo de furano en la cadena lateral del esqueleto, esto aunado al análisis del espectro HMBC (Ver anexo A.1.7) donde se observa una correlación H-C a tres enlaces entre los metinos de las posiciones α y β del furano con un metileno, el cual debe corresponder al metileno de la posición 12, se sugirió la estructura parcial mostrada en la Figura 31.

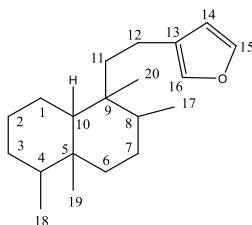
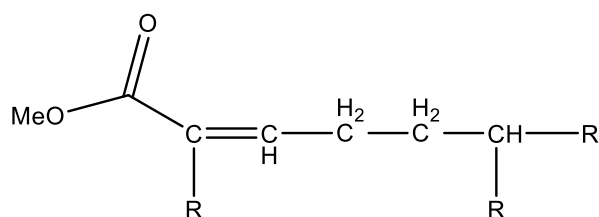


Figura 31. Estructura de clerodano fusionado a un anillo de furano

El análisis de los espectros de RMN llevó a la conclusión que se tenía un carbonilo α, β insaturado formando parte de la estructura; en la región de los carbonos de tipo sp^2 del espectro de RMN de ^{13}C de se observaron dos señales, una de ellas correspondiente a un metino en 137.0 ppm y una segunda señal en 142.6 ppm asignada a un carbono vinílico completamente sustituido. En el espectro HSQC se observó la correlación entre la señal en 137.0 ppm con una señal triple ancha en 6.59 ppm, $J = 2.49$, la cual mostró correlación en el espectro HMBC con la señal atribuida a un carbonilo, el cual, a su vez mostro correlación con el metilo de un éster metílico. El análisis del espectro COSY (A.1.8) mostró un sistema de spin como el que se presenta a continuación:



Con base en el análisis anterior, se propuso la siguiente estructura plana para el compuesto **1a**.

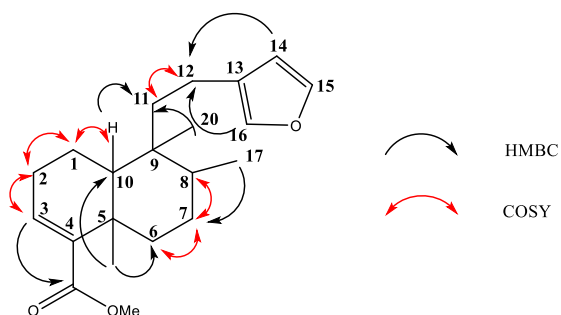


Figura 32. Estructura del Compuesto **1a** que muestra las correlaciones claves HMBC y COSY

La configuración de la fusión de los anillos A y B se determinó con base en el desplazamiento observado para los átomos de hidrógeno del metilo 20. Se ha documentado que cuando la fusión de los anillos es *cis*, el metilo 20 se observa entre 21 y 29 ppm. En cambio, cuando la fusión es *trans*, este metilo se observa entre 17 y 19 ppm (Shunichi Manabe & Chikao Nishino ,1986). En el caso del compuesto **1a**, este grupo se observa en 18.4 ppm lo que indica una fusión *trans* de los anillos, lo cual se corroboró analizando el espectro NOESY (Ver anexo A.1.10), donde no se observa la correlación entre los hidrógenos del metilo 20 y el hidrógeno en la posición 10. En el mismo experimento se observa la correlación entre los metilos 17, 19 y 20 y 17, lo que indicó que se encontraban del mismo lado sugiriendo la estructura mostrada en la Figura 33 o su enantiómero correspondiente.

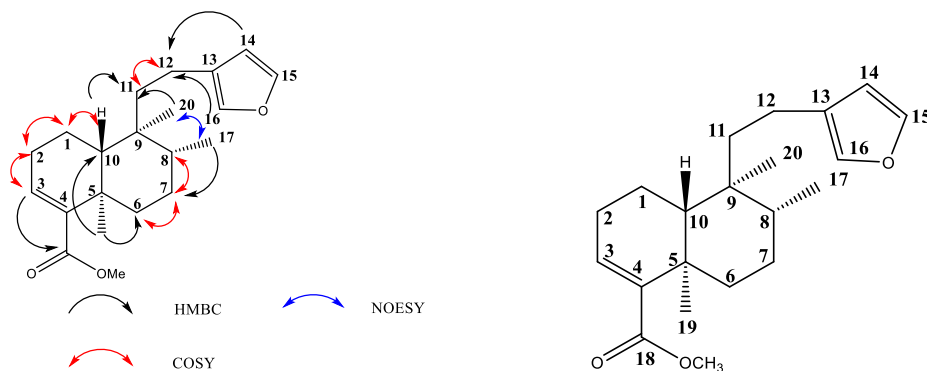


Figura 33. Estructura del éster metílico del ácido Hardwickico

El ácido Hardwickico es un diterpeno de tipo clerodano del que se han descrito los estereoisómeros (-)- y (+)- como productos naturales (Misra *et al.*, 1979, Costa *et al.*, 1998).

Este compuesto fue aislado por primera vez de *Hardwickia pinnata* en donde el valor de su rotación óptica lo identificó como (-)-Ácido Hardwickico al igual que su correspondiente derivado metil éster (R. Misra, R.C. Pandey, Sukh Dev., 1964).

En este trabajo se identificó el enantiómero (-)- éster metílico del ácido Hardwiickico debido al valor de RO obtenido de $[\alpha]_D^{20} - 249$ (c 0.001, CHCl₃) y por comparación con los datos ya publicados anteriormente, los espectros y las propiedades químicas podemos proponer que la estructura asignada que se muestra en la Figura 33 corresponde al (-)-éster metílico del ácido Hardwiickico.

En cuanto a la actividad biológica, McChesney, J. D. y Clark, A. M. (1991) documentaron que en el extracto de hexano de las raíces de *Croton Sonderianus* identificaron el (-)-ácido Hardwiickico el cual mostró actividad biológica antimicrobiana en ensayos cualitativos preliminares utilizando la bacteria Gram-positiva *Bacillus subtilis* y moderada actividad antimicrobiana contra la bacteria *Staphylococcus aureus*, no obstante contra la bacteria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* no se observó inhibición, contra la bacteria *Mycobacterium smegmatis* también mostró actividad antimicrobiana. Se hizo reaccionar el ácido Hardwiickico con diazometano para formar el éster metílico, sin embargo, el derivado resultó ser mucho menos potente.

También se probó la actividad antifúngica con los organismos *Candida albicans*, *Helminthosporium sp.* y *Trichophyton mentagrophytes* para el ácido Hardwiickico mostrando actividad inhibitoria moderada; mientras que para el derivado éster metílico se observó muy poca inhibición.

Los datos espectroscópicos experimentales de RMN ¹H y ¹³C del éster metílico del ácido Hardwiickico se muestran a continuación en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Datos de **RMN ¹H** (700 MHz), **RMN ¹³C** (175 MHz) en CDCl₃ del éster metílico del Ácido Hardwiickico

Posición	$\delta^{13}\text{C}$ ppm	Tipo	$\delta^1\text{H}$ ppm, J (Hz)
1	17.7	CH ₂	1.67, <i>m</i> 1.49, <i>m</i>
2	27.3	CH ₂	2.26, <i>m</i> 2.30, <i>m</i>
3	137.0	CH	6.59, <i>dd</i> (4.4, 2.6)
4	142.6	C	
5	37.7	C	
6	36.0	CH ₂	1.14, <i>td</i> (13.0, 4.0) 2.27, <i>m</i>
7	27.4	CH ₂	1.42, <i>q</i> (3.7) 1.47, <i>m</i>
8	36.4	CH	1.56, <i>d</i> (4.5)
9	38.9	C	
10	46.7	CH	1.38, <i>d</i> (11.2)
11	38.7	CH ₂	1.54, <i>m</i> 1.64, <i>dd</i> (12.9, 5.1)
12	18.3	CH ₂	2.31, <i>m</i> 2.16, <i>m</i>
13	125.7	C	
14	111.1	CH	6.25, <i>sa</i>
15	142.8	CH	7.34, <i>t</i> (1.6)
16	138.5	CH	7.19, <i>d</i>
17	16.1	CH ₃	0.83, <i>d</i> (6.8)
18	168.0	C	
19	20.9	CH ₃	1.27, <i>s</i>
20	18.4	CH ₃	0.76, <i>s</i>
21	51.3	CH ₃	3.68, <i>s</i>

Compuesto 2 Cirsilineol

El compuesto **2** (61.9 mg) se aisló como un sólido cristalino de color verde con punto de fusión de 203-205°C. El espectro de masas mostró un ión molecular a m/z 345 $[M+H]^+$ correspondiente con la fórmula molecular $C_{18}H_{16}O_7$ (Ver anexo A.2.1).

En el espectro de IR (Ver anexo A.2.2) se observa una banda de absorción a 3011.80 cm^{-1} correspondiente a bandas de vibración de estiramiento C-H en compuestos aromáticos, bandas de vibración de torsión fuera del plano entre 1400 y 1600 cm^{-1} debidas al núcleo bencénico; comúnmente es un grupo de 2 a 4 señales y debido al tipo de sobretonos se observa que hay señales que corresponden a una sustitución aromática en posición *orto* en 752.31 cm^{-1} .

También en el espectro se identificaron señales intensas entre 1100 cm^{-1} y 1300 cm^{-1} , debidas a la torsión de grupos hidroxilo y una banda en 1202.81 cm^{-1} asignada al estiramiento de un enlace C-OH. Una banda en 1748.55 cm^{-1} característica del estiramiento de un carbonilo de una cetona cíclica de 6 átomos y en 1655.83 cm^{-1} una banda que pertenece a un doble enlace. Además, se identificaron bandas de estiramiento en 2845.15 cm^{-1} correspondientes a grupos CH_3-O-R (metoxilos), en 1439.25 cm^{-1} bandas de torsión asimétrica del CH_3 y en 1364.27 cm^{-1} de torsión simétrica de metilos.

En el espectro de RMN ^{13}C (Ver anexo A.2.4) se observaron 18 señales, tres de ellas correspondientes a grupos metilo, cinco metinos y diez carbonos completamente sustituidos, de los cuales uno pertenece a un carbonilo (182.8 ppm), todos ellos asignados de acuerdo con el análisis del experimento DEPT 90 y DEPT 135 (Ver anexos A.2.5 y A.2.6).

Se sabe que el desplazamiento químico establece la naturaleza de los átomos de hidrógeno y las constantes de acoplamiento determinan la presencia de protones adyacentes. Los acoplamientos *orto* y *meta* en un anillo aromático presentan rangos de 6.5-9.0 Hz y 1.5-2.5 Hz respectivamente y son importantes para establecer el patrón de sustitución del anillo.

El perfil que presenta el espectro en la RMN ^1H indica que se trata de un compuesto de tipo flavonoide. En la región de 6.0-8.0 ppm del espectro de RMN ^1H (Ver anexo A.2.3) se observan señales correspondientes a átomos de hidrógeno atribuibles a anillos aromáticos que podrían ser asignables a hidrógenos de una estructura tipo flavonoide (Figura 34).

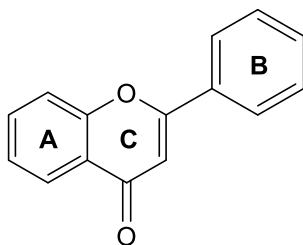


Figura 34. Estructura básica de un flavonoide

En 12.75 ppm se observa una señal simple que integra para un átomo de hidrógeno, este desplazamiento es característico cuando este tipo de estructuras presenta un grupo hidroxilo en la posición 5 de la molécula, el cual forma un enlace de hidrógeno con el grupo carbonilo de la posición 4 (Figura 35).

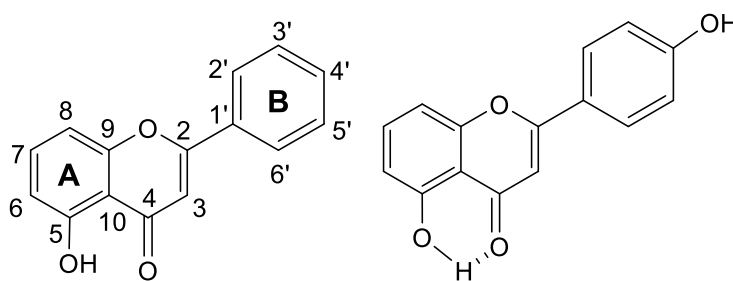


Figura 35. Formación de puente de hidrógeno entre el OH de la posición 5 y el carbonilo de la posición 4

A mayor desplazamiento, se observa un sistema aromático trisustituido 1, 2, 4 como un sistema ABX. Se observa una señal doble en 6.96 ppm con una $J=8.50$ Hz, la cual se debe al acoplamiento con un átomo de hidrógeno que debe estar en posición *orto* dicho hidrógeno *orto* se encuentra en un desplazamiento de 7.44 ppm como una señal doble de doble (*dd*) con constantes de acoplamiento (J) de 8.47 y 2.21

Hz, el segundo acoplamiento (2.21 Hz) que presenta esta señal es debido a la interacción que tiene con un hidrógeno ubicado en la posición meta que se observa como una señal doble en 7.48 ppm con la misma constante de acoplamiento.

Este sistema aromático (Figura 35) debe corresponder al anillo B de una estructura de tipo flavonoide ya que se ha observado en la literatura que los protones correspondientes a este anillo son los más desplazados. Esto permitió proponer la estructura parcial mostrada en la Figura 36.

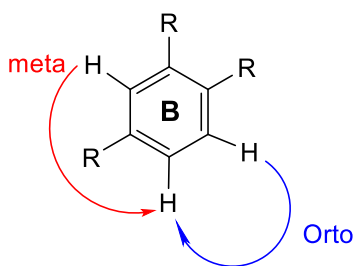


Figura 36. Estructura parcial del flavonoide

En la región de los protones aromáticos se observan dos señales simples que integran para un hidrógeno. Esta observación permitió sugerir una estructura de tipo flavona para el flavonoide, en la Figura 37 se muestran las dos estructuras probables para la flavona.

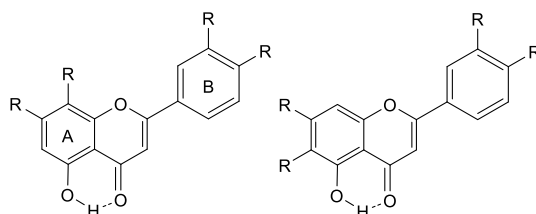


Figura 37. Estructuras posibles para la flavona aislada de *S. longispicata*

En el espectro de RMN ^1H se observa una señal en 5.76 ppm que integra para un átomo de hidrógeno, que no muestra correlaciones en el espectro HSQC, esta señal se asignó al átomo de hidrógeno de un segundo grupo hidroxilo.

Por otro lado, en el espectro de RMN ^1H se observan 3 señales simples, una en 3.92 ppm, otra en 3.97 ppm y finalmente una en 3.99 ppm que integran para 3 protones cada una lo cual evidenció la presencia de tres grupos metoxilos en la molécula. De acuerdo con la literatura en los compuestos con estructura de tipo flavona es común que exista sustitución en las posiciones 6 y 7 del anillo A.

El análisis de las correlaciones observadas en el espectro HMBC (Ver anexo A.2.7) (Figura 38) condujo a la conclusión que los metoxilos se ubican en las posiciones 3', 6 y 7 respectivamente y que el grupo hidroxilo debe ubicarse en la posición 4'.

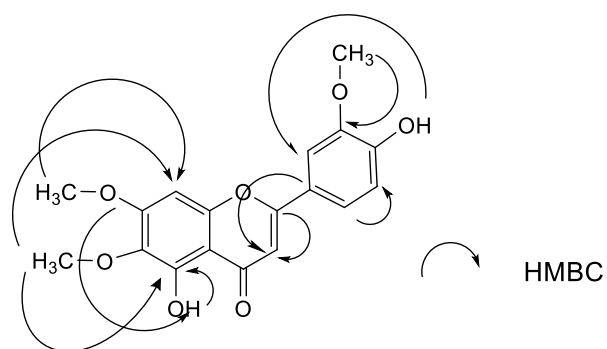


Figura 38. Correlaciones en el espectro HMBC para el compuesto **2**

El compuesto **2** es un flavonoide que ha sido aislado previamente de otras especies como *Salvia judaica* Boiss (Mahmoud A. Al-Qudah, *et al.*, **2019**) *Salvia palaestina* Benth y *Salvia syriaca* L. (Hala I. Al-Jaber *et al.*, **2012**) y es conocido con el nombre de Cirsilineol, los datos espectroscópicos experimentales de RMN de ^1H y ^{13}C del Cirsilineol se muestran a continuación en la **Tabla 3**.

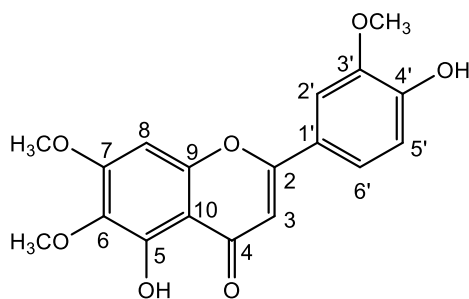


Figura 39. Estructura del compuesto Cirsilineol

Tabla 3. Datos de **RMN ¹H** (700 MHz), **RMN ¹³C** (175 MHz) en CDCl₃ del compuesto Cirsilineol

Posición	$\delta^{13}\text{C}$ ppm	Tipo	$\delta^1\text{H}$ ppm, J (Hz)
2	164.0	C	
3	104.7	CH	6.58, s
4	182.8	C	
5	153.2	C	
OH-5			12.75, s
6	132.8	C	
7	153.4	C	
8	90.7	CH	6.55, s
9	158.9	C	
10	106.3	C	
1'	124.7	C	
2'	112.5	CH	7.48, <i>d</i> (2.20)
3'	149.7	C	
4'	146.2	C	
OH-4'			5.76, <i>sa</i>
5'	110.8	CH	6.96, <i>d</i> (8.5)
6'	119.3	CH	7.44, <i>dd</i> (8.5, 2.21)
OCH₃-3''	56.5	CH ₃	3.99, s
OCH₃-6''	61.0	CH ₃	3.92, s
OCH₃-7''	56.3	CH ₃	3.97, s

Compuesto 3 Salvileucalina

El espectro de masas del compuesto **3** mostró un ión molecular a m/z 337 $[M+H]^+$ determinado por la técnica de DART, correspondiente con la fórmula molecular $C_{20}H_{16}O_5$ (Ver anexo A.3.1). En el espectro de infrarrojo se observaron bandas de absorción debidas a las vibraciones de estiramiento C-H para un anillo de furano arriba de 3000 cm^{-1} y bandas que se deben a las vibraciones de estiramiento del anillo C-C de un furano en 1455.95 cm^{-1} y 1378.36 cm^{-1} y vibraciones de deformación fuera del plano de C-H para un furano en 875.64 cm^{-1} y 807.48 cm^{-1} . En 1735.49 cm^{-1} se observa una banda de estiramiento de un carbonilo perteneciente a una γ -lactona α, β insaturada y una banda debida a la vibración de estiramiento de C-O de γ -lactona en 1237.75 cm^{-1} . Las bandas de metilenos con estiramiento simétrico se observaron en 2852.39 cm^{-1} y los $-CH_2-$ con estiramiento asimétrico en 2922 cm^{-1} . Por último, se observaron bandas características de grupos aromáticos en 1082.10 cm^{-1} y 1019.39 cm^{-1} debidas a la deformación de las vibraciones C-H aromáticas fuera del plano y en 1158.37 cm^{-1} de una monosustitución en el anillo aromático (Ver anexo A.3.2).

En el espectro de RMN ^{13}C (Ver anexo A.3.4) se observaron 20 señales que concuerdan con lo observado en la espectrometría de masas, cinco de los carbonos observados corresponden a grupos metilenos, un sp^2 (118.6 ppm) cuatro sp^3 (68.8, 34.5, 31.8 y 16.8 ppm), uno de ellos unido a un átomo de oxígeno (68.8 ppm). Se observan también seis metinos de los cuales uno corresponde a un metino geminal a un átomo de oxígeno (74.6 ppm) y cinco sp^2 (144.3, 141.7, 127.6, 117.3 y 108.3 ppm) y nueve carbonos completamente sustituidos, de los cuales dos corresponden a grupos carbonilo en concordancia con los carbonilos observados en el espectro de IR, un sp^3 (40.1 ppm) y el resto corresponden a carbonos metilénicos sp^2 de acuerdo con el análisis del experimento DEPT 90 y DEPT 135 (Ver anexo A.3.5 y A.3.6)

Al igual que en el caso del compuesto **1**, en el espectro de RMN 1H (Ver anexo A.3.3) se observan las señales asignables a un anillo de furano β sustituido, lo que permitió sugerir que al igual que el compuesto **1**, podría tratarse de un compuesto de tipo clerodano.

En $\delta 6.04$ ($t, 2.4$ Hz) se observa una señal que de acuerdo al espectro HMBC (Ver anexo A.3.7) muestra correlación con los hidrógenos del furano, así como a un carbonilo (171.5 ppm) y a dos carbonos vinílicos completamente sustituidos (153.7 y 127.3 ppm). Una característica usual en los diterpenos tipo clerodano es la presencia de un carbonilo de lactona en el carbono 17 del esqueleto, lo que permitió sugerir una γ -lactona α, β insaturada como la que sugiere el espectro de IR, esto permitió proponer la estructura parcial mostrada en la Figura 40.

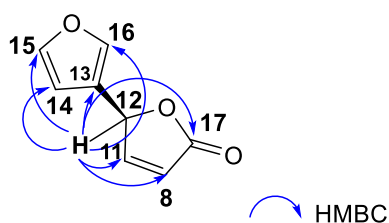


Figura 37. Correlaciones mostradas para el anillo de furano y la γ -lactona

En el espectro de RMN ^1H se observa un sistema AB en 4.83 ppm y 4.76 ppm con una constante de acoplamiento de 18.2 Hz, característico de sistemas con un carbono spiro en C-10 y una lactona γ -lactona entre el doble enlace de las posiciones 4 y 5 (Figura 41) (Aoyagi, Y. *et al.*, **2008**) (Narukawa, Y. *et al.*, **2006**).

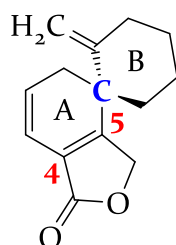


Figura 38. Estructura parcial del compuesto **3**.

En el espectro de RMN ^1H se observan otros cuatro protones en la región de los protones vinílicos, la señal más desplazada (6.31 ppm, d , $J = 10.1$ Hz) mostró una correlación en el espectro HMBC con uno de los carbonilos (171.1 ppm), el cual a su vez mostro correlación en el mismo espectro con el sistema AB ya descrito, además de correlaciones en el mismo espectro con dos carbonos vinílicos

completamente sustituidos (159.8 y 126.8 ppm) y el análisis del espectro COSY (Ver anexo A.3.9) permitió establecer el sistema de spin mostrado en la Figura 42 a); el cual indica que la señal vinílica observada en el espectro de RMN de ^1H a δ 5.91, *dt*, $J = 9.2, 4.2$ Hz, está vecina al hidrógeno cuya señal se observa en 6.31 ppm. Finalmente, las otras dos señales vinílicas que se observan como simples (5.22 ppm y 5.09 ppm) mostraron correlación en el espectro HSQC (Ver anexo A.3.8) con el mismo carbono (118.6 ppm), lo que indica se trata de un metileno terminal. El análisis del espectro HMBC mostró que la olefina terminal esta acoplada con el metileno del anillo A, los carbonos sp^2 de la lactona en C-17, y el carbono spiro (40.1 ppm) Figura 42 d). A su vez, el carbono spiro mostró correlación en el espectro HMBC con un metileno del anillo A, el metileno terminal de anillo B, uno de los protones vinílicos del anillo A y dos metilenos adicionales, lo que permitió establecer la estructura mostrada en la Figura 42 c) para el compuesto 3.

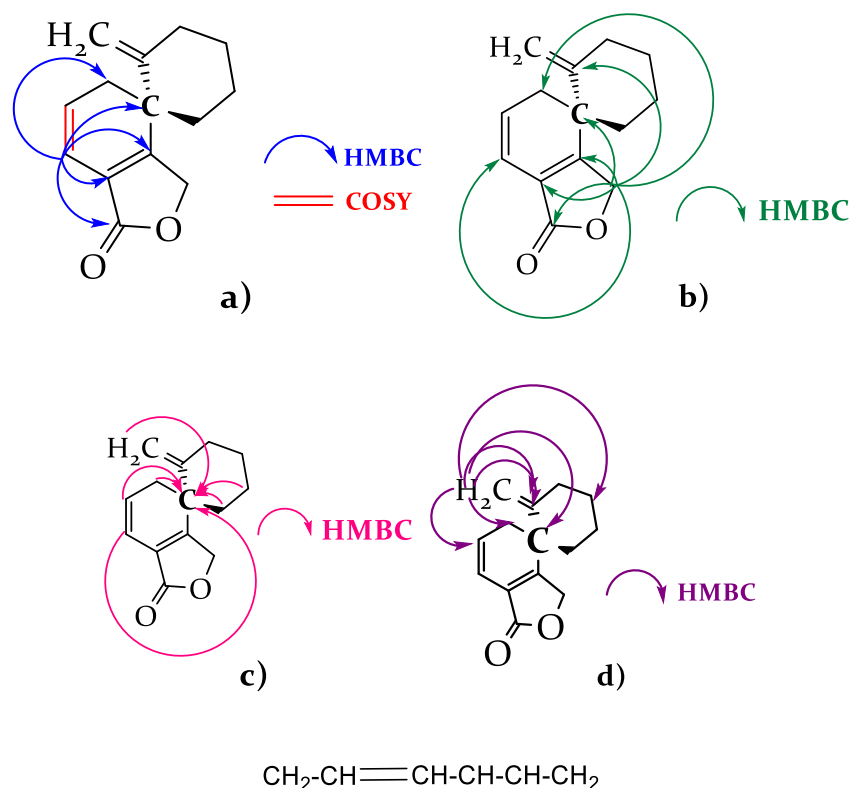


Figura 39. a) Correlaciones HMBC y COSY del anillo A con C-10 y la γ -lactona, b) Correlación HMBC del sistema AB con C-10 y la γ -lactona, c) Correlación HMBC de C-10 con los anillos A y B, d) Correlación HMBC del metileno terminal con los anillos A y B y C-10.

La estructura del compuesto **3** descrita en la literatura se conoce como Salvileucalina y posee un esqueleto de salvileucalano, ha sido aislada de otras fuentes como *Salvia leucantha* CAV. (Narukawa, Y. *et al.*, **2006**) (Figura 43).

Los datos espectroscópicos experimentales de RMN de ^1H y de ^{13}C de la Salvileucalina concuerdan con los descritos en la literatura y se muestran en la **Tabla 4**.

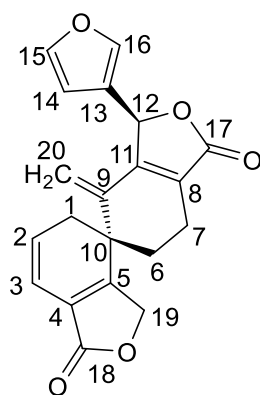


Figura 40. Estructura de la Salvileucalina y su numeración

Tabla 4. Datos de **RMN ¹H** (700 MHz), **RMN ¹³C** (175 MHz) en CDCl₃ de la Salvileucalina

Posición	$\delta^{13}\text{C}$ ppm	Tipo	$\delta^1\text{H}$ ppm, J (Hz)
1	34.5	CH ₂	a:2.50, <i>m</i> b:2.53, <i>m</i>
2	127.5	CH	5.91, <i>dt</i> (9.2, 4.2, 4.2)
3	117.2	CH	6.31, <i>d</i> (10.1)
4	126.8	C	
5	159.8	C	
6	31.8	CH ₂	a:1.92, <i>m</i> b:2.06, <i>m</i>
7	16.8	CH ₂	a:2.62, <i>m</i> b:2.64, <i>m</i>
8	127.3	C	
9	136.5	C	
10	40.1	C	
11	153.7	C	
12	74.6	CH	6.04, <i>t</i> (2.4)
13	120.9	C	
14	108.3	CH	6.21, <i>sa</i>
15	144.3	CH	7.41, <i>m</i>
16	141.7	CH	7.48, <i>sa</i>
17	171.5	C	
18	171.1	C	
19	68.8	CH ₂	a:4.76, <i>d</i> (18.3) b:4.83, <i>d</i> (18.2)
20	118.6	CH ₂	a:5.09, <i>s</i> b:5.22, <i>s</i>

Compuesto 4 Salvigenólida

El compuesto **4** se aisló como un líquido de aspecto aceitoso e incoloro y $[\alpha]_D^{20} - 100.8$ (c 0.001, CHCl_3) (Ver anexo A.4.). El análisis espectroscópico de este compuesto indica que se trata de un diterpeno con esqueleto transpuesto.

El peso molecular determinado por espectrometría de masas de alta resolución obtenido a través de la técnica DART, mostró un ión molecular a m/z 399 $[\text{M}+\text{H}]^+$ que corresponde con la fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{O}_7$ y 12 grados de insaturación (Ver anexo A.4.1).

El espectro de infrarrojo (Ver anexo A.4.2), presenta bandas en 3146.90 cm^{-1} (banda de estiramiento C-H), 1504.00 cm^{-1} (banda de vibración de estiramiento C=C) y 874.20 cm^{-1} (banda de vibración de deformación fuera del plano de C-H) que indican la presencia de un anillo de furano. En 1770.87 cm^{-1} se observa una banda de estiramiento de un carbonilo perteneciente a una γ -lactona α, β insaturada. La banda de vibración de estiramiento C-O de la γ -lactona se observa en la región 1371.96 cm^{-1} y 1159.35 cm^{-1} . En el espectro también se aprecian bandas de estiramiento de CO-O de un acetato en 1231.11 cm^{-1} , en 1435.20 cm^{-1} debido a la deformación asimétrica y estiramiento de un CH_3 del acetato, en 1022.82 cm^{-1} la banda de vibración de balanceo del CH_3 y en 664.70 cm^{-1} la banda de vibración de deformación del C=O del acetato. Finalmente, las bandas de metilenos con estiramiento asimétrico se observan en 2928.13 cm^{-1} y los $-\text{CH}_2-$ con estiramiento simétrico en 2856.70 cm^{-1} .

Los espectros de RMN de ^{13}C y ^1H confirman la presencia de un anillo de furano β -sustituido al igual que en los diterpenos descritos previamente. La presencia de un furano β -sustituido es muy común en compuestos diterpénicos del tipo clerodano.

En el espectro de RMN ^{13}C (Ver anexo A.4.4) se observaron 22 señales, dos de ellas correspondientes a grupos metilo, cuatro a grupos metilenos, ocho metinos y ocho carbonos completamente sustituidos, tres de los cuales pertenecen a grupos carbonilo, todos ellos asignados de acuerdo con el análisis del experimento DEPT 90 y DEPT 135 (Ver anexo A.4.5 y A.4.6).

Se ha documentado en la literatura que, en algunas especies de *Salvia* los diterpenos tipo clerodano presentan una modificación en el anillo B del sistema de decalina, es decir el anillo B es de 7 miembros. Además, presentan una fusión con una lactona entre las posiciones 18 y 19 (Rongtao Li *et al*, **2016**).

En el espectro de RMN ^1H (Ver anexo A.4.3) se observa una señal doble de doble en 7.12 ppm, que se asigna por desplazamiento químico, al átomo de hidrógeno β de una γ -lactona α, β insaturada. La multiplicidad de esta señal (*dd*, $J=8.0$ y 2.7 Hz) indica que se encuentra acoplado a un metileno. Asimismo, se observó en este espectro un sistema AB en 3.71 ppm y 3.97 ppm con $J=9.2$ Hz que se asigna a los átomos de hidrógeno de un metileno unido a un átomo de oxígeno y a un átomo de carbono totalmente sustituido. Estos datos sugieren la presencia de una γ -lactona entre las posiciones 18 y 19, conjugada con un doble enlace entre las posiciones 3 y 4.

La señal que se observa en 5.34 ppm (*t*, 3.09 Hz) se asignó al átomo de hidrógeno de la posición 6 y el sistema AB a los átomos de hidrógeno del metileno de la posición 19. El espectro de RMN ^{13}C confirma las señales en 134.4, 48.3, 168.5 y 69.0 ppm correspondientes a los átomos de carbono C-4, C-5, C-18 y C-19 respectivamente (Figura 44).

En la literatura se describe frecuentemente que uno de los átomos de hidrógeno de la posición 19 presenta un acoplamiento a larga distancia de tipo "W" con el átomo de hidrógeno β de la posición 6. El requisito estructural común a todos los diterpenos que presentan este fenómeno es que en C-19 tenga una orientación α -axial y la ausencia de sustituyentes en la posición 6β . En la mayoría de los casos este

fenómeno se observa en clerodanos con fusión de anillos A/B *trans*, pero no es exclusivo de ellos (*Esquivel B. Tesis de Maestría, 1986*).

En el caso del compuesto **4**, ninguno de los átomos de hidrógeno del metileno de la posición 19 presenta acoplamiento a larga distancia, lo cual indica que la posición 6β se encuentra sustituida por un grupo acetato, ya que se observan señales características en RMN ^1H para este sustituyente en 2.07 ppm (señal simple para tres átomos de hidrógeno) y en RMN ^{13}C se observa una señal en 169.0 ppm que se asignó al grupo carbonilo del acetato y en 21.1 ppm al átomo de carbono del metilo.

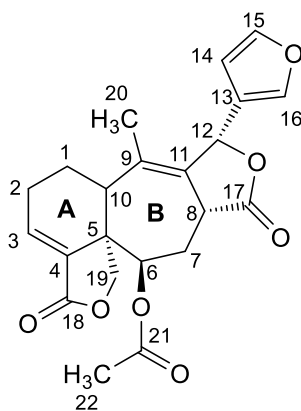


Figura 41. Estructura de la Salvigenólida y su numeración

En el espectro de RMN ^1H se observa también un triplete en 5.34 ppm ($J=3.1$ Hz), el cual se asigna por desplazamiento químico al átomo de hidrógeno de H-6 (geminal a un grupo acetato). La multiplicidad de la señal de este protón indica que se encuentra acoplado a un metileno. Las señales para este metileno (C-7) se observan como un doble de triples centrado en 2.45 ppm ($J=15.1, 3.1, 3.1$) para H- 7β y para H- 7α se observa como una señal compleja sobrepuesta con otras señales en 1.99 ppm de acuerdo con el experimento HSQC (Ver anexo A.4.7).

La señal simple ancha que se observa en 6.03 ppm se asignó al protón del metino de la posición 12. Como ya se había mencionado se trata de un átomo de hidrógeno alílico unido a un átomo de carbono enlazado a una función oxigenada por ejemplo

una γ -lactona saturada localizada entre las posiciones 12 y 17 lo que está de acuerdo con lo observado en el espectro de IR.

El espectro de RMN ^{13}C presenta señales en 176.7 (C-17), 140.8 (C-8) y 75.2 ppm (C-12) que están de acuerdo para dicho grupo funcional.

También en el espectro de RMN ^1H se observó una señal en 3.45 ppm (*dd*, $J=13.4$, 4.1 Hz) que se asignó al átomo de hidrógeno del metino de la posición 10, el desplazamiento químico se puede explicar si se considera que es alílico. Para los átomos de hidrógeno del metileno de la posición 1 se asignaron las señales en 2.07 ppm y 2.43 ppm que se observan como señales complejas sobrepuestas con otras señales y para la posición 2 en 1.38 ppm (*dd*, $J=13.3$, 3.3 Hz) y una señal múltiple en 1.86 ppm, de acuerdo con el análisis del experimento HSQC y HMBC (Ver anexo A.4.7 y A.4.8).

El análisis estructural del compuesto **4**, condujo a su identificación como Salvigenólida, un compuesto aislado previamente de *Salvia fulgens* (Esquivel, B. *et al.*, **1986**) y *Salvia xalapensis* (Esquivel, B. *et al.*, **2005**).

La actividad biológica que presenta este diterpeno es su actividad antialimentaria, además ha demostrado ser útil para mantener la población de plagas (*Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni*) por debajo de lo económicamente perjudicial. Este compuesto causa una reducción drástica del porcentaje de aparición (63% a 1.2 nmol/L) de insectos adultos de la etapa pupal y una reducción significativa de la proporción hembra/macho (1 a 2) en comparación con el control (3 a 1). Este compuesto puede alterar el desarrollo normal del insecto y con menos adultos y más machos que hembras, la reproducción es limitada (Esquivel, B. *et al.*, **2000**).

Los datos espectroscópicos experimentales de RMN de ^1H y ^{13}C del compuesto Salvigenólida se muestran a continuación en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Datos de **RMN ¹H** (500 MHz), **RMN ¹³C** (125 MHz) en CDCl₃ de la Salvigenólida

Posición	$\delta^{13}\text{C}$ ppm	Tipo	$\delta^1\text{H}$ ppm, J (Hz)
1	25.0	CH ₂	a:2.07, <i>m</i> b:2.43, <i>m</i>
2	25.6	CH ₂	a:1.38, <i>dd</i> (13.3, 3.3) b:1.86
3	39.3	CH	3.81, <i>d</i> (13.2)
4	134.4	C	
5	48.3	C	
6	71.3	CH	5.34, <i>t</i> (3.1, 3.1)
7	30.1	CH ₂	a:1.99 b:2.45 <i>dt</i> (15.1, 3.1, 3.1)
8	140.8	CH	7.12, <i>dd</i> (8.0, 2.7)
9	133.2	C	
10	39.2	CH	3.45, <i>dd</i> (13.4, 4.1)
11	133.4	C	
12	75.2	CH	6.03, <i>s</i>
13	124.1	C	
14	108.3	CH	6.29, <i>dd</i> (1.9, 1.0)
15	145.0	CH	7.48, <i>t</i> (1.7)
16	140.9	CH	7.47, <i>sa</i>
17	176.7	C	
18	168.5	C	
19	69.0	CH ₂	a:3.97, <i>d</i> (9.2) b:3.71, <i>d</i> (9.2)
20	16.0	CH ₃	1.65, <i>s</i>
21 (Ac)	169.0	C	
22 (Me)	21.1	CH ₃	2.07, <i>s</i>

Compuesto 5 Salvisousólida

Con base en el análisis de los espectros realizados, se logró determinar que el compuesto **5** se trata de una molécula *neo*-clerodánica con un esqueleto de languidulano, denominada 2 α -hidroxi-7-*epi*-8 β -dihidrolanguidulina, también conocida como Salvisousólida.

El compuesto **5** (45.7 mg) se aisló como un polvo amarillento y $[\alpha]_D^{20} - 419$ (c 0.001, CHCl₃) (Ver anexo A.5.) y con punto de fusión de 155-157 °C. El espectro de masas mostró un ión molecular a m/z 401 [M+H]⁺ correspondiente con la fórmula molecular C₂₂H₂₄O₇ (Ver anexo A.5.1).

El espectro de IR (Ver anexo A.5.2), presenta bandas en 1530.24 cm⁻¹ (banda de vibración de estiramiento C=C) 924.00 cm⁻¹ y 876.91 cm⁻¹ (banda de vibración de deformación fuera del plano de C-H) que indican la presencia de un anillo de furano disustituido. En 1773.75 cm⁻¹ se observan vibraciones de estiramiento de un carbonilo perteneciente a una γ -lactona α , β insaturada; la banda de vibración de torsión C-O de la γ -lactona se produce en la región 1365.52 cm⁻¹ y en 1156.88 cm⁻¹ una vibración de estiramiento C-O. También en 1668.41 cm⁻¹ se identificó una banda de vibración de estiramiento para un carbonilo de una cetona α , β insaturada y en 1742.59 cm⁻¹ una banda de un carbonilo de éster. Además, se identificó una señal en 3602.76 cm⁻¹ que corresponde a una banda de vibración de estiramiento de un grupo hidroxilo y sus correspondientes sobretonos en 1601.69 cm⁻¹ y 1008.78 cm⁻¹.

En el espectro también se aprecian bandas de estiramiento de CO-O de un acetato entre 1200 cm⁻¹, en 1434.90 cm⁻¹ una señal que corresponde a la deformación asimétrica y estiramiento de un CH₃ del acetato, en 1095.72 cm⁻¹ la banda de vibración de balanceo del CH₃. Finalmente, las bandas de metilenos con estiramiento asimétrico se observan en 2910.74 cm⁻¹ y las bandas de estiramiento asimétrico de -CH₃- en 2947.64 cm⁻¹ y en 2888.70 cm⁻¹ una vibración de estiramiento simétrico.

En el espectro de RMN ^{13}C (Ver anexo A.5.4) se observaron 22 señales, tres de ellas correspondientes a grupos metilo, tres a grupos metilenos, ocho metinos y ocho carbonos completamente sustituidos, de los cuales tres pertenecen a grupos carbonilo, todos ellos asignados de acuerdo con el análisis del experimento DEPT 90 y DEPT 135 (Ver anexo A.5.5 y A.5.6).

El espectro de RMN ^1H (Ver anexo A.5.3) obtenido para este compuesto mostró señales similares a las descritas para un anillo de furano α , β disustituido de un diterpeno con estructura de languidulano. Con base en el desplazamiento observado para los átomos de hidrógeno constituyentes del anillo, el furano debe estar disustituido en las posiciones α y β . La señal del átomo de hidrógeno en posición α al oxígeno se ubicó en $\delta 7.46$ y el átomo de hidrógeno β en 6.78 ppm ambas señales se observan como dobles. Los respectivos carbonos se observan en 143.4 ppm y 109.5 ppm de acuerdo con el espectro HSQC (Ver anexo A.5.7). El espectro de RMN ^{13}C mostró señales a $\delta 124.6$, 109.5, 143.4 y 157.5 correspondientes al anillo de furano α , β sustituido (Figura 45).

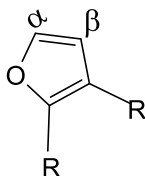


Figura 42. Anillo de furano del compuesto 5

En el espectro de RMN de ^{13}C se observó una señal en 192.4 ppm que se asignó a un grupo carbonilo que corresponde a una cetona cíclica de 7 miembros confirmando la presencia de este grupo funcional en el espectro de infrarrojo. El espectro de RMN de ^{13}C presenta, además de la señal asignada al carbonilo, señales en 56.7 ppm, 37.5 ppm, 52.0 ppm y 45.4 ppm que se atribuyen a la cetona cíclica.

Estos datos se corroboraron mediante el experimento HSQC (A.5.7), HMBC (A.5.8) y COSY (A.5.9), de la misma manera se confirmó que las posiciones del furano α y β están sustituidas con la cetona cíclica (Figura 46).

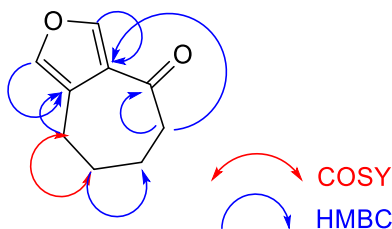


Figura 43. Correlaciones mostradas para el anillo de furano y la cetona cíclica

Estudios previos del género *Salvia* refieren que se han aislado diterpenos con esqueletos de carbono diferentes a los ya reportados en la literatura y que podrían derivarse de un precursor clerodánico común. En 1999 Esquivel, B. y colaboradores aislaron un nuevo *cis*-languidulano diterpeno llamado Salvimexicanolida; aislado de las partes aéreas de *S. mexicana* var. *major*. Sus espectros de RMN de ^1H y de ^{13}C indicaron la presencia de un anillo de furano disustituido conjugado a un grupo funcional cetona en la posición C-12 y se propuso por primera vez la fusión del anillo A/B *cis* (Figura 47).

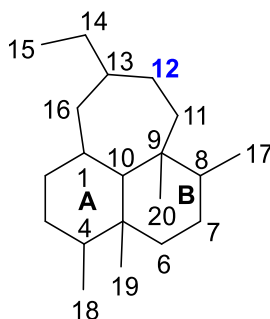


Figura 44. Estructura de languidulano y su numeración

Las características espectroscópicas descritas anteriormente concuerdan con un diterpeno con estructura de languidulano. La fusión de los anillos A y B en esta molécula se propone que sea **trans** de acuerdo con la información proporcionada

por el espectro de RMN ^{13}C . Se ha visto que los clerodanos con fusión de anillos A/B *cis* presentan la señal de resonancia del carbono metílico 20 por arriba de 20 ppm, mientras que los *trans* presentan esta señal entre 15 y 19 ppm. Este valor concuerda con el obtenido para C-20 del compuesto **5** (14.2 ppm) y apoya esta proposición.

Con el experimento COSY y HMBC fue posible establecer la siguiente secuencia de spin que se atribuyó al anillo "A" conjugado con los átomos de hidrógeno del metileno 19 de la γ -lactona en 4.96 ppm ($J=8.4$ Hz) y en 4.10 ppm ($J=8.4, 2.1$ Hz); también en el espectro de RMN ^{13}C se observa una señal en 167.4 ppm que fue asignada al carbonilo de un éster cíclico, asimismo las correlaciones que se observan en el experimento HMBC confirman lo anterior (Figura 48).

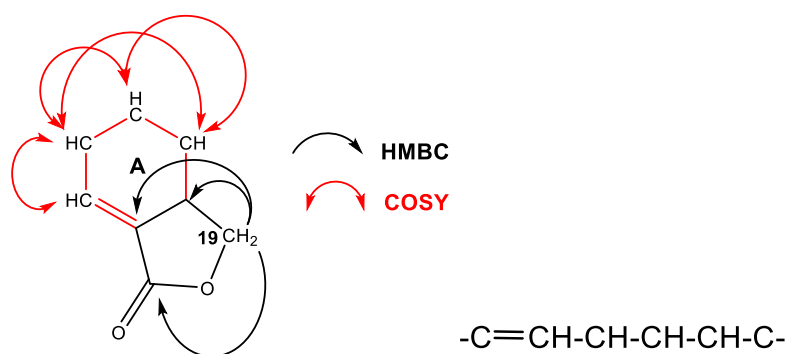


Figura 45. Correlación COSY y HMBC del anillo A con la γ -lactona

Los átomos de hidrógeno de la posición 19 (γ -lactona), conforman un sistema AB característico de clerodanos, en el que la señal de H-19 encontrado en 4.10 ppm, se observa como una señal doble de doble ($J=8.4, 2.1$ Hz) debido a su acoplamiento con el átomo de hidrógeno geminal H-19 en 4.96 ppm ($J=8.4$ Hz). También se observó que el átomo de hidrógeno H-19 (4.10 ppm) tiene acoplamiento a larga distancia de tipo "W" (Figura 49) con el átomo de hidrógeno en 2.37 ppm de la posición H-6 ($J=15.0, 2.5$ Hz).

En el espectro de RMN ^{13}C observamos una señal correspondiente a un grupo carbonilo en 169.8 ppm que pertenece a un acetato asignado a la posición C-21.

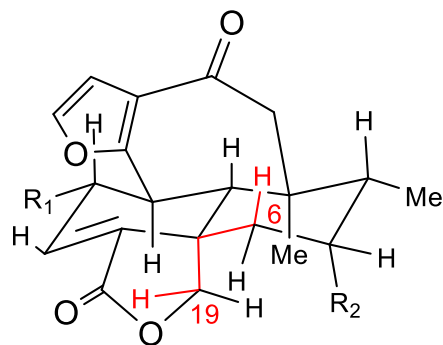


Figura 46. Marcado en rojo, el acoplamiento *W*

En el espectro de RMN ^1H se observó una señal en 4.70 ppm (*dd*, $J=8.7, 1.2$ Hz) que se asignó al átomo de hidrógeno del metino de la posición 2.

La señal que se observó en 2.26 ppm ($J=9.9$ Hz) en el espectro de RMN ^1H se asignó al átomo de hidrógeno del metino de la posición 10 y la señal triple en 3.10 ppm ($J=9.3, 9.3$ Hz) al átomo de hidrógeno del metino de la posición 1.

También en el espectro de RMN ^1H se observó un sistema AB en 3.03 ppm y 2.53 ppm ($J = 15.1$ Hz) que se asignó a los protones del metileno de la posición 11.

En la **Tabla 6** se muestran los datos espectroscópicos de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto **5**. El compuesto Salvisousólida (Figura 50) se ha aislado previamente de *S. sousae* y *S. karwinskii* y los datos espectroscópicos obtenidos experimentalmente concuerdan con los descritos en la literatura (Esquivel, B. *et al.*, 1997).

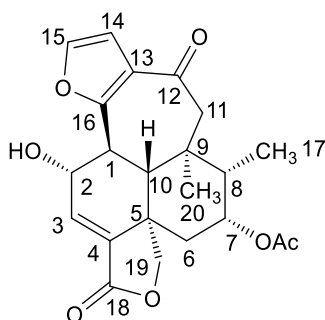


Figura 47. Estructura del compuesto **5** conocido como Salvisousólida

Tabla 6. Datos de **RMN ¹H** (400 MHz), **RMN ¹³C** (100 MHz) en CDCl₃ de la Salvisousólida

Posición	$\delta^{13}\text{C}$ ppm	Tipo	$\delta^1\text{H}$ ppm, J (Hz)
1	45.4	CH	3.10, <i>t</i> , (9.3)
2	75.3	CH	4.70, <i>dd</i> (8.7,1.2)
3	139.6	CH	6.67, <i>d</i> (1.3)
4	137.2	C	
5	46.5	C	
6	37.1	CH ₂	α :2.37, <i>dd</i> (15.0, 2.5) β :1.53, <i>ddd</i> (14.9, 3.6, 2.2)
7	71.8	CH	5.29, <i>s</i>
8	44.8	CH	1.67, <i>dq</i> (6.9,4.4, 4)
9	37.5	C	
10	52.0	CH	2.26, <i>d</i> (9.9)
11	56.7	CH ₂	α :2.53, <i>d</i> (15.1) β :3.03, <i>d</i> (15.1)
12	192.4	C	
13	124.6	C	
14	109.5	CH	6.78, <i>d</i> (2)
15	143.4	CH	7.45, <i>d</i> (2)
16	157.5	C	
17	12.3	CH ₃	1.08, <i>d</i> (6.9)
18	167.4	C	
19	70.8	CH ₂	α :4.10, <i>dd</i> (8.4, 2.1) β :4.96, <i>d</i> (8.4)
20	14.2	CH ₃	0.88, <i>s</i>
21 (Ac)	169.8	C	
22 (Me)	21.3	CH ₃	2.11, <i>s</i>

5.2 Estudio fitoquímico del extracto de acetona

El extracto de acetona de las hojas de *Salvia longispicata* condujo al aislamiento e identificación de dos compuestos: un flavonoide y un ácido fenólico, su elucidación estructural se llevó a cabo mediante técnicas espectroscópicas, principalmente resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopia de infrarrojo (IR) y espectrometría de masas (EM). A continuación, se discuten los aspectos más relevantes de la determinación estructural de los compuestos antes mencionados.

Compuesto 6 Naringenina

El compuesto **6** se aisló como un sólido cristalino de color verde oscuro y punto de fusión de 210-212°C. El peso molecular determinado por espectrometría de masas de alta resolución obtenido a través de la técnica DART, mostró un ión molecular a m/z 273 $[M+H]^+$ correspondiente con la fórmula molecular $C_{15}H_{13}O_5$ y 10 grados de insaturación (Ver anexo A.6.1).

En el espectro de infrarrojo (Ver anexo A.6.2) se observa una banda de absorción a 3032.70 cm^{-1} correspondiente a bandas de vibración de estiramiento C-H en compuestos aromáticos, bandas de vibración de torsión fuera del plano entre 1494.56 cm^{-1} y 1516.50 cm^{-1} debidas al núcleo bencénico, comúnmente es un grupo de 2 a 4 señales; por otro lado las bandas observadas en 1154.59 cm^{-1} y 1176.70 cm^{-1} sugieren una sustitución aromática en posición *orto* y *para* además de los correspondientes sobretonos en 829.72 cm^{-1} y 730.18 cm^{-1} .

Adicionalmente, el espectro IR mostró una banda de estiramiento en 3271.49 cm^{-1} que son características de grupos OH, señales intensas entre 1154.59 cm^{-1} y 1308.91 cm^{-1} debidas a la torsión de grupos hidroxilo y una banda en 1245.29 cm^{-1} asignada al estiramiento de un enlace C-OH. Además, una banda en 1596.35 cm^{-1} correspondiente al estiramiento de un carbonilo de cetona conjugada.

Finalmente, en 2920.13 cm^{-1} se observan señales que se asignan a bandas de estiramiento asimétrico de metilenos y en 2847.91 cm^{-1} bandas de estiramiento simétrico.

En el espectro de RMN ^{13}C (Ver anexo A.6.4) se observaron 15 señales, una de ellas corresponde a un grupo metileno, siete a grupos metino y siete a carbonos completamente sustituidos, de los cuales uno pertenece a un carbonilo, todos ellos asignados de acuerdo con el análisis del experimento DEPT 90 y DEPT 135 (Ver anexo A.6.5 y A.6.6).

En el espectro de RMN ^1H (Ver anexo A.6.3) del compuesto **6**, se observan tres señales dobles de doble que integran para un átomo de hidrógeno en 5.34 ppm, 3.11 ppm y 2.69 ppm respectivamente y que se encuentran correlacionadas entre sí formando un sistema ABX. La señal en 5.34 ppm muestra constante de acoplamiento de 12.9 y 2.9 Hz, debido a su desplazamiento químico, la señal corresponde a un protón geminal a un átomo de oxígeno.

En el espectro de RMN ^1H se observó una señal en 3.11 ppm con constante de acoplamiento de 17.1 y 13.0 Hz que se asignó a uno de los átomos de hidrógeno del metileno de la posición 3 y la señal en 2.69 ppm que tiene constante de acoplamiento de 17.1 y 3.0 Hz se asignó al otro átomo de hidrógeno del metileno de la posición 3. Ambas señales están situadas en el mismo átomo de carbono y forman la parte AB del sistema ABX; además el valor de la constante de acoplamiento de 17.1 Hz entre ambas señales implica que el acoplamiento entre los dos protones es geminal.

Las señales observadas en 3.11 ppm y 2.69 ppm se atribuyeron a los átomos de hidrógeno de las posiciones H-2 y H-3 del anillo C de un flavonoide del tipo de las flavanonas (Figura 51).

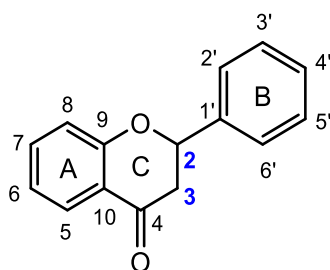


Figura 48. Estructura básica y numeración de una Flavanona

En la zona de los protones aromáticos para el anillo A se observa un sistema AB asignable a los protones H-6 y H-8, como dos señales dobles con un acoplamiento meta ($J=2.1$ Hz).

Los átomos de hidrógeno del anillo B del compuesto **6** se observan como un sistema AA'BB', característico de una sustitución aromática 1-4, siendo AA' los protones H-2' y H-6' en 7.31 ppm (d , $J=8.5$ Hz) y por otro lado BB' los protones H-3' y H-5' que se observan en menor desplazamiento en 6.82 ppm (d , $J=8.6$ Hz). Las señales atribuidas a 2' y 6' muestran acoplamiento en el experimento HSQC (Ver anexo A.6.7) con las señales observadas en 129.03 ppm y 116.32 ppm.

En el espectro de RMN ^{13}C (A.6.4) se observa una señal en 197.7 ppm característica de un carbonilo de cetona conjugada que se asigna al átomo de carbono 4. También se observa una señal en 80.5 ppm que se asigna a C-2 y otra señal en 44.04 ppm que se asigna a C-3.

El resto de las señales corresponde a los carbonos aromáticos de los anillos A y B. Dentro de éstas, se pueden distinguir señales correspondientes a los carbonos aromáticos en posición *orto* al grupo hidroxilo: C-8 (97.1 ppm), C-6 (96.2 ppm) y C-3', C-5' (116.32 ppm). Las señales que se observaron en 131.1 ppm y en 103.3 ppm se asignaron a los átomos de carbono cuaternarios C-1' y C-10 respectivamente.

Adicionalmente en el espectro de RMN ^1H determinado en CDCl_3 se observó una señal en 12.05 ppm (intercambiable por CD_3OD) que integra para un átomo de hidrógeno, lo que confirma que se tiene un grupo hidroxilo en la molécula. El desplazamiento de esta señal fue asignada al átomo de hidrógeno 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 (Figura 52).

El análisis del compuesto **6** llevó a la conclusión de que se trata de una molécula con estructura de flavanona conocida como Naringenina.

Los datos espectroscópicos experimentales de RMN de ^1H y ^{13}C del Compuesto Naringenina se muestran a continuación en la **Tabla 7** y fueron comparados con los ya reportados en la literatura (Muhammad Kamran Khan, *et al.*, **2010**); están de acuerdo con la estructura propuesta.

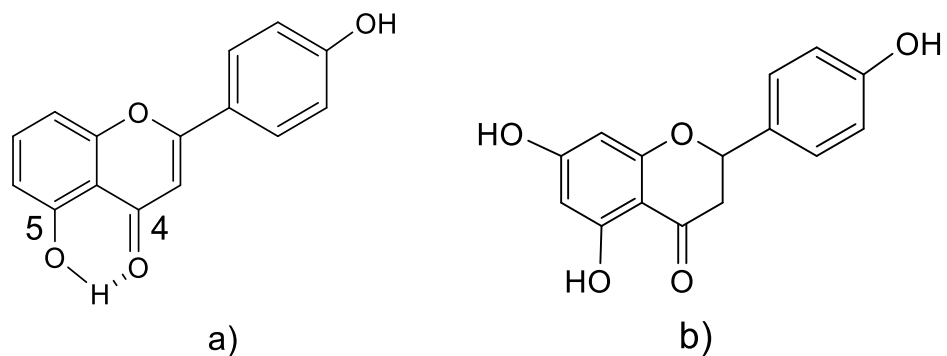


Figura 49. a) Formación de puente de hidrógeno entre el OH de la posición 5 y el carbonilo de la posición 4, **b)** Estructura del compuesto **6** conocido como Naringenina

Tabla 7. Datos de **RMN ¹H** (700 MHz), **RMN ¹³C** (175 MHz) en CD₃OD de la Naringenina

Posición	$\delta^{13}\text{C}$ ppm	Tipo	$\delta^1\text{H}$ ppm, J (Hz)
2	80.5	CH	5.34, <i>dd</i> (12.9, 2.9)
3a 3b	44.04	CH ₂	3.11, <i>dd</i> (17.1, 13.0) 2.69, <i>dd</i> (17.1, 3.0)
4	197.7	C	
5	165.4	C	
6	96.2	CH	5.88, <i>d</i> (2.1)
7	168.6	C	
8	97.1	CH	5.89, <i>d</i> (2.1)
9	164.8	C	
10	103.3	C	
1'	131.1	C	
2'	129.03	CH	7.31, <i>d</i> (8.5)
3'	116.32	CH	6.82, <i>d</i> (8.6)
4'	159.03	C	
5'	116.32	CH	6.82, <i>d</i> (8.6)
6'	129.03	CH	7.31, <i>d</i> (8.5)

Compuesto 7 Ácido Rosmarínico

El compuesto **7** se aisló como un sólido amorfo de color verde claro y punto de fusión de 168-173 °C.

En el espectro de infrarrojo (Ver anexo A.7.1), se observó una banda de estiramiento a 3354.00 cm^{-1} que corresponde a grupos -OH, una señal en 1444.72 cm^{-1} que se debe a vibraciones de flexión C-O-H y una banda en 1254.57 cm^{-1} asignada al estiramiento de un enlace C-O. Además, una banda en 1710.63 cm^{-1} correspondiente a una banda de estiramiento de un grupo carbonilo de un grupo funcional ácido carboxílico y en 1602.72 cm^{-1} una banda de estiramiento de otro grupo carbonilo α , β insaturado.

Adicionalmente, se observan señales correspondientes a bandas de vibración de estiramiento C-H en compuestos aromáticos en 1515.85 cm^{-1} , una banda de vibración de flexión fuera del plano en 979.71 cm^{-1} debida al núcleo bencénico; por otro lado, al observar las señales en 854.97 cm^{-1} y 813.68 cm^{-1} podemos afirmar que corresponden a una sustitución aromática 1,4 (posición *para*).

Finalmente, en 2923.86 cm^{-1} y 2853.14 cm^{-1} se observan bandas de estiramiento asimétrico y simétrico de grupos metileno.

En el espectro de RMN ^{13}C (Ver anexo A.7.3) se observan 18 señales que corresponden a nueve grupos metino, un metileno y ocho carbonos cuaternarios, de los cuales dos de ellos pertenecen a grupos carbonilo todos ellos asignados de acuerdo con el análisis del experimento de RMN de ^{13}C APT (A.7.3).

En el espectro de RMN ^1H (Ver anexo A.7.2) para el compuesto **7** se observan señales entre 6 y 8 ppm que son características de átomos de hidrógeno aromáticos, así como en la zona de átomos de hidrógeno alifáticos se observan señales entre 2 y 3 ppm. En la zona aromática se aprecia una señal doble a 7.55 ppm que integra para un átomo de hidrógeno, con una constante de acoplamiento de 15.9 Hz, característica para un acoplamiento tipo *trans* de una olefina.

El segundo átomo de hidrógeno, que exhibe una constante de acoplamiento *trans* de 15.9 Hz, se observa como una señal doble a 6.27 ppm, por encontrarse adyacente a un átomo de carbono carbonílico. Ambas señales indican pues, la presencia de una olefina adyacente a un átomo de carbono carbonílico, en la que los protones se encuentran en una configuración *trans* (Xiao-Mei Wei, *et al.*, **2004**).

Siguiendo el análisis de las señales presentes en la zona aromática, puede observarse una señal doble a 7.05 ppm que integra para un protón y presenta una constante para un acoplamiento *meta* de 1.8 Hz. Se observa otra señal a 6.95 ppm, como doble de doble y que integra para un protón con constante de acoplamiento de 8.2 Hz y 1.8 Hz, que son características de acoplamientos *orto* y *meta*. A 6.78 ppm se observa una señal doble que integra para un protón y tiene una constante de 8.2 Hz, atribuido a un acoplamiento tipo *orto*. Por otra parte, se observa a 6.75 ppm una señal doble que integra para un protón con una constante de acoplamiento de 1.9 Hz, característica para un segundo acoplamiento *meta*. A 6.70 ppm se observa una señal doble que integra para un protón y tiene una constante de acoplamiento de tipo *orto* de 8.0 Hz. Finalmente, a 6.61 ppm se observa una señal doble de doble, con constantes de acoplamiento de 8.1 Hz y 2.1 Hz, características de acoplamientos tipo *orto* y *meta*.

En el espectro de RMN ^1H , pueden observarse las señales de átomos de hidrógeno sobre átomos de carbono alifáticos, que corresponden a un acoplamiento de un sistema ABX. En 5.19 ppm se observa una señal doble de doble, con constante de acoplamiento de 8.4 Hz y 4.3 Hz, asignable a la parte X del sistema ABX, es decir, al protón ubicado sobre un átomo de carbono quiral (C-8), que presenta acoplamientos vecinales con los protones ubicados sobre el carbono adyacente a éste (C-7). Por otro lado, se observan las señales que corresponden a la parte AB del sistema ABX asignables a los átomos de hidrógeno del metileno de la posición C-7, en 3.10 ppm ($J=14.3$ Hz y 4.3 Hz para H-7a) y en 3.01 ppm ($J=14.3$ Hz y 8.4 Hz para H-7b) estos acoplamientos están geminales al átomo de hidrogeno del carbono quiral C-8.

En el espectro de RMN ^{13}C (A.7.3) se observa un total de dieciocho señales. A 173.5 ppm y 168.4 ppm se observan las señales características para átomos de carbonos de grupos carbonilo para las funciones ácido carboxílico y éster, respectivamente. Entre 149.7 ppm y 145.2 ppm se observan 5 señales asignadas a los átomos de carbono aromático sobre los que se ubican los grupos catecol, (149.7 ppm, 147.7 ppm, 146.1 ppm, 145.2 ppm), así como también un átomo de carbono olefínico (146.8 ppm). Entre 129.2 ppm y 115.2 ppm se observan señales correspondientes a átomos de carbonos del tipo aromático, y una señal para un segundo átomo de carbono olefínico se observa a 114.4 ppm. En 74.6 ppm y 37.9 ppm se observan las señales atribuibles a los átomos de carbono alifático.

Debido a las evidencias espectroscópicas observadas para el compuesto aislado en el extracto de acetona, se concluye que el compuesto en cuestión es el ácido rosmarínico (Figura 53).

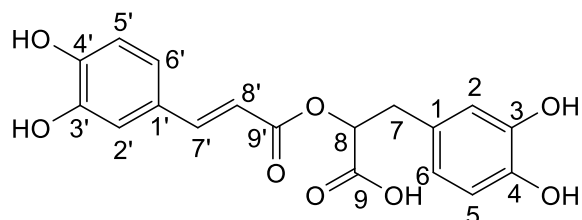


Figura 50. Estructura y numeración del Ácido rosmarínico

Este compuesto ha mostrado actividad biológica significativa como antiviral, antibacteriano, antiinflamatorio y antioxidante. Se ha descrito que en las plantas este compuesto tiene un rol en las funciones de defensa contra herbívoros (Petersen, M. **2013**).

A continuación, en la **Tabla 8** se muestran los datos espectroscópicos experimentales de RMN de ^1H y ^{13}C del Ácido Rosmarínico.

Tabla 8. Datos de **RMN ¹H** (500 MHz), **RMN ¹³C** (125 MHz) en CD₃OD del Ácido Rosmarínico

Posición	$\delta^{13}\text{C}$ ppm	Tipo	$\delta^1\text{H}$ ppm, J (Hz)
1	129.2	C	
2	117.6	CH	6.75, <i>d</i> (1.9)
3	146.1	C	
4	145.2	C	
5	116.3	CH	6.70, <i>d</i> (8.0)
6	121.8	CH	6.61, <i>dd</i> (8.1, 2.1)
7	37.9	CH ₂	7a: 3.10, <i>dd</i> (14.3, 4.3) 7b: 3.01, <i>dd</i> (14.3, 8.4)
8	74.6	CH	5.19, <i>dd</i> (8.4, 4.3)
9	173.5	C	
1'	127.6	C	
2'	115.2	CH	7.05, <i>d</i> (1.8)
3'	147.7	C	
4'	149.7	C	
5'	116.5	CH	6.78, <i>d</i> (8.2)
6'	123.2	CH	6.95, <i>dd</i> (8.2, 1.8)
7'	146.8	CH	7.55, <i>d</i> (15.9)
8'	114.4	CH	6.27, <i>d</i> (15.9)
9'	168.4	C	

5.3 Resultados de ensayos de Actividad Biológica

Considerando que algunos diterpenos aislados de otras especies de *Salvia* mostraron tener actividad antidiarreica (Calzada, F. *et al.*, 2015) los compuestos **3** y **5** se evaluaron como inhibidores de actividad protozoaria empleando el modelo de subcultivos, tomando a *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* como organismos de prueba y como antidiarreicos en el ensayo de inhibición de la hiperperistalsis. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Resultados de la evaluación de la actividad antiprotozoaria y antidiarreica de los compuestos **3** y **5** aislados de las hojas de *S. longispicata*.

Compuesto	Actividad antiprotozoaria ^a		Actividad antidiarreica ^b
	CI ₅₀ μM (CI)	CI ₅₀ μM (CI)	DI ₅₀ μmol/kg ± SD
	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Giardia lamblia</i>	Inhibición de hiperperistalsis
Salvileucalina (3)	48.6 (51.8 - 47.3)	81.4 (84.2 - 78.6)	8.99 ± 0.040
Salvisousólida (5)	40.3 (45.35 - 35.4)	55.3 (57.7 - 52.8)	7.55 ± 0.056
Emetina^d	2.18 (2.2 - 2.14)	0.83 (0.87 - 0.82)	-
Metronidazol^d	0.23 (0.58 - 0.17)	1.22 (1.57 - 0.81)	-
Quercetina^d	-	-	1.1 ± 0.001
Loperamida^d	-	-	0.2 ± 0.001

a) Los resultados están expresados como el promedio de n = 6, CI = intervalo de confianza del 95%,

b) Los resultados están expresados como el promedio de n=6 ± SD donde SD es la desviación estándar.

d) Controles positivos

En cuanto a los resultados de la actividad biológica, los compuestos Salvisousólida y Salvileucalina presentan actividad antiprotozoaria y antidiarreica moderada.

6.- CONCLUSIONES

Del extracto de diclorometano de las hojas de *Salvia longispicata* se aislaron e identificaron espectroscópicamente los siguientes metabolitos secundarios: un diterpeno con estructura de clerodano conocido como éster metílico del ácido Hardwiickico (**1a**), un compuesto con estructura de tipo flavona llamado Cirsilineol (**2**), tres diterpenos con estructura de clerodano modificados: un salvileucalano (Salvileucalina, **3**), un salvigenano (Salvigenólida, **4**) y un languidulano (Salvisousólida, **5**). En cuanto al extracto acetónico, se aislaron e identificaron a través de técnicas espectroscópicas y espectrométricas dos metabolitos secundarios: una flavanona (Naringenina, **6**) y el ácido rosmarínico (**7**).

Todos los compuestos aislados han sido identificados y descritos en otras especies de *Salvia*, siendo ésta la primera vez que se describen en *S. longispicata*.

Además de los compuestos descritos, se identificó la mezcla de ácido ursólico y ácido oleanólico en el extracto de diclorometano; estos triterpenos son muy comunes en las *Salvias*. También se identificaron los esteroides β -sitosterol y estigmasterol ampliamente distribuidos en el reino vegetal.

En cuanto a la evaluación de la actividad biológica, los compuestos **3** y **5** representan entidades químicas con actividad antiprotozoaria y/o antidiarreica moderada.

Los resultados presentados en este trabajo contribuyen al conocimiento fitoquímico y biológico del género *Salvia* y ratifica la importancia que tiene el estudio de las plantas, desde las aportaciones que se puedan realizar en cuanto al perfil químico de la especie hasta identificar los compuestos con potencial actividad biológica.

7.- REFERENCIAS

- Aguilar Vázquez, Rocío. (2015). Aislamiento e Identificación de Metabolitos aislados de Hojas y Tallos de *Cordia dodecandra*. Disertación de Licenciatura. Facultad de Ciencias Químicas, Universidad La Salle.
- Andersen, Markham, K., Flavonoids, chemistry, biochemistry and applications., Taylor & Francis., (2006), pp. 1197.
- Aoyagi, Y., Yamazaki, A., Nakatsugawa, C., Fukaya, H., Takeya, K., Kawachi, S., Izumi H. (2008) Salvileucalin B, A Novel Diterpenoid with an Unprecedented Rearranged Neoclerodane Skeleton from *Salvia leucantha* CAV. *Org. Lett.* Vol. 10, No. 20 4429-4432.
- Ávalos García A., Pérez-Urria E. C. (2009) Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal.* 2 (3): 119-145.
- Bisio, A., Schito, A., Nejad, S., Hamburger, M., Mele, G., Piatti, G., Romussi, G., Dal Piaz, F., De Tommasi, N. (2015) Antibacterial compounds from *Salvia adenophora* Fernald (Lamiaceae). *Phytochemistry* 110:120-132.
- Bonkanka T., C.X., (2006) Evolución farmacológica de terpenos y flavonoides de origen vegetal, Universidad de la Laguna.
- Bustos Brito, Celia. (2011). Estudio Biodirigido de los componentes antiinflamatorios de *Salvia thymoides* Benth. Disertación de Tesis para obtener el grado de Maestría. I.Q., UNAM.
- Butler, M.S. (2004) The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of Natural Products* 67: 2141-2153.
- Calzada, F., Bautista E., Yépez-Mulia, L., García-Hernández, N., Ortega, A. (2015) Antiamoebic and Antigiardial Activity of Clerodane Diterpenes from Mexican *Salvia* Species Used for the Treatment of Diarrhea, *Phytother. Res.* 29: 1600–1604.
- Cheng Chun-Ru, Yue Qing-Xi, Wu Zhi-Yuan, Song Xiao-Yi, Tao Si-Jia, Wu Xiao-Hui, Xu Ping-Ping, Liu Xuan, Guan Shu-Hong, Guo De-An (2010) “Cytotoxic triterpenoids from *Ganoderma lucidum*.”, *Pytochemistry*, 71:1579-1585.
- Chinou I (2005). Labdanes of natural origin-biological activities, *Curr. Med. Chem.* 1211: 1295-1317.
- Claramunt, R. M., Farrán, M., López, C., Pérez, M., & Santa María, D. (2013). Química bioorgánica y Productos Naturales. Universidad Nacional de Educación a Distancia.
- Clebsch, B., The new book of salvias: sages for every garden., Portland Oregon: *Timber Press*, (2008).
- Costa, M., Tanaka, M. A., Imamura, P. M., Marsaioli A. J. (1999) Isolation and synthesis of a new clerodane from *Echinodorus grandiflorus*, *Phytochemistry*, 50 pp. 117-122.

- Cuesta R. O., Márquez H. I., Campo F. M., Introducción a la Caracterización Estructural de Flavonoides primera edición, Ecuador, Universidad Técnica de Machala, 2015.
- Cuyckens H, Claeys M. (2004) Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. *J. Mass Spectrom.* 39:1-15.
- De las Heras B, Hortelano S (2009) Molecular basis of the anti-inflammatory effects of terpenoids. *Inflamm Allergy Drug Targets* 81: 28-39.
- De las Heras B, Rodríguez B, Bosca L, Villar AM (2003) Terpenoids: sources, structure elucidation and therapeutic potential in inflammation. *Curr Top Med Chem* 32: 171-185.
- Dong Y, Morris-Natschke SL, Lee KH (2011) Biosynthesis, total syntheses, and antitumor activity of tanshinones and their analogs as potential therapeutic agents. *Nat Prod Rep* 283: 529-542.
- Esquivel B., Ramírez-Dávalos N., Espinosa-Pérez G. (1999). A CIS-LANGUIDULANE DITERPENOID FROM *SALVIA MEXICANA* VAR. *MAJOR* (LABIATAE), HETEROCYCLES, Vol. 51, No. 7, pp. 1647-1651.
- Esquivel B., Sánchez A. A., Aranda E., *Natural Products of Agrochemical Interest from Mexican Labiatae*, pág. 371-385.
- Esquivel Rodríguez, Baldomero. (1986). Estudio Quimiotaxonómico de la sección Fulgentes del género *Salvia* (Labiatae). Disertación de Tesis para obtener el grado de Maestría. UNAM.
- Esquivel Rodríguez, Baldomero. (2017). Contribución al Estudio Químico Sistemático del Género *Salvia* (Lamiaceae) en México. Disertación de Tesis para obtener el grado de Doctorado. I.Q., UNAM.
- Esquivel, B. (2008) Rearranged Clerodane and Abietane Derived Diterpenoids from American *Salvia* Species, *Natural Product Communications*, Vol. 3 No. 6, pp. 989 -1002.
- Esquivel, B., Calderón, J.S., Sánchez A. A., Zarate, M., Sánchez, L. (1997) Neo-clerodane and languidulane diterpenoids from *Salvia sousae* and *S. karwinskii*, *Phytochemistry* Vol. 45, No. 4, pp. 781-783.
- Esquivel, B., Cárdenas, J., Toscano, A., Soriano-García M., & Rodríguez-Hahn, L. (1985) Structure of salvigenolide, a novel diterpenoid with a rearranged neo-clerodane skeleton from *Salvia fulgens*, *Tetrahedron* Vol. 41, No 16. pp. 3213 -3217.
- Esquivel, B., Domínguez, R. M., Hernández-Ortega, S., Toscano, R. A., & Rodríguez-Hahn, L. (1994) Salvigenane and Isosalvipuberulan Diterpenoids from *Salvia leucantha*, *Tetrahedron* Vol. 50, No. 40, pp. 11593-11600.
- Esquivel, B., Tello, R., & Sánchez A. A. (2005) Unsaturated Diterpenoids with a Novel Carbocyclic Skeleton from *Salvia xalapensis*, *J. Nat. Prod.* 68, 787-790.
- Gershenzon, J., McCaskill, D., Rajaonarivony, J., Mihaliak, C., Karp, F., Croteau, R., Isolation of secretory cell from plant glandular trichomes and their use in biosynthetic studies of monoterpenes and other gland products (1992) *Anal Biochem.*, v. 200:1, pp.130-138.

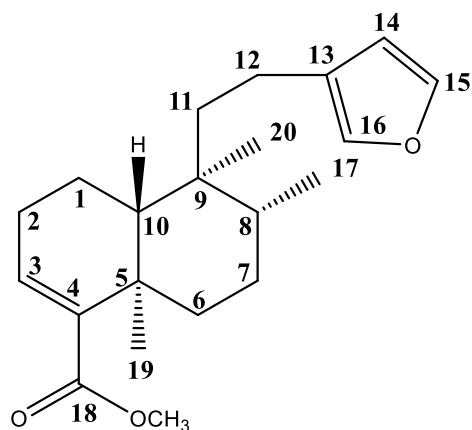
- Gros, Eduardo G; Pomilio, Alicia B., et. al. Introducción al estudio de los productos naturales OEA, Series Química, (1985).
- Hala I. Al-Jaber, Khadeja K. Abrouni, Mahmud A. Al-Qudah & Musa H. Abu Zarga (2012) New terpenes from *Salvia palaestina* Benth. and *Salvia syriaca* L. growing wild in Jordan, *Journal of Asian Natural Products Research*, 14:7, 618-625.
- Hernández Alonso, Luis Manuel. (1988). Contribución al estudio fitoquímico de *Salvia Melissodora* Lag. Disertación de Licenciatura. Facultad de Química Farmacobiológica, Universidad Veracruzana
- Iwashina T. (2000) The structure and distribution of the flavonoids in plants. *J. Plant R.* 113:287-99.
- Jenks A.A. and Seung-Chul, K. (2013). *Journal of Ethnopharmacology*, 146, 214-224.
- Kamatou, G.P.P., Viljoen, A. M., Steenkamp, P. (2010) Antioxidant, antiinflammatory activities and HPLA analysis of South African *Salvia* Species. *Food Chemistry*, 119, pp. 684-688.
- Kintzios SE. (2000) Sage: the genus *Salvia*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers
- Kruse, M., Strandberg, M., M., Strandberg, B. (2002) Ecological Effects of Allelopathic Plants-A Review., National Environmental Research Institute (NERI) Technical Report, No. 315. Silkeborg, Denmark.
- Lambert, J., Srivastava, J. y Vietmeyer, N. (1997) Medicinal Plants: Rescuing a Global Heritage. *World Bank*.
- Leland, J. C., et al., Natural Products from plants., segunda edición, Taylor and Francis group, EUA, (2006).
- Li, R., Morris-Natschke, S., Lee, K. (2016) Clerodane diterpenes: sources, structures and biological activities., *Nat. Prod. Rep.*, v. 33, pp. 1166-1226.
- Lock de Ugaz, O. (1987). Productos Naturales: Importancia y Perspectiva. *Revista de Química*, N° 1, pp.49-54.
- Lopresti L. A., (2016) *Salvia* (Sage): A Review of its Potential Cognitive-Enhancing and Protective Effects. *Drugs R.D.* 17:53-64.
- Lu, Y., Foo L., (2002) Polyphenolics of *Salvia*- a review. *Phytochemistry*, 59, pp. 117-140.
- Mahmoud A. Al-Qudah, Hasan I. Tashtoush, Ethar F. Khlaifat, Sahar O. Ibrahim, Ayman M. Saleh, Hala I. Al-Jaber, Musa H. Abu Zarga & Sultan T. Abu Orabi (2019) Chemical constituents of the aerial parts of *Salvia judaica* Boiss. from Jordan, *Natural Product Research*.
- Martínez-Gordillo, M., Fragoso-Martínez, I., García-Peña, M.R. y Montiel, O. (2013). Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 84, 30-86.
- McChesney, J. D., Clark, A. M. (1991) Antimicrobial Diterpenes of *Croton sonderianus*, 1. Hardwickic and 3,4-secotrachylobanoic acids, *Journal of Natural Products*, Vol.54, No. 6, pp. 1625-1633.

- Medjahed, F., Merouane, A., Saadi, A., Bader, A., Cioni, P., Flamini, G. (2016) Chemical profile and antifungal potential of essential oils from leaves and flowers of *Salvia algeriensis* (Desf.): A comparative study. *Chilean Journal of Agricultural Research* 76(2): 195-200.
- Mishra, B.B. y Tiwari, V. K. (2011) Natural products: an envolving role in future drug discovery. *European Journal of Medicinal Chemistry* 46(10): 4769-4807
- Narukawa Y., Hatano, K., Takeda, T. (2006) A novel diterpenoid with a rearranged neoclerodane skeleton from *Salvia leucantha* CAV. *J. Nat. Med* 60:206-209.
- Ojha SK, Bharti S, Joshi S, Kumari S, Arya DS (2012) Protective effect of hydroalcoholic extract of *Andrographis paniculata* on ischaemia-reperfusion induced myocardial injury in rats. *Indian J Med Res* 135: 414-421.
- Paleo González, Ehecatl Luis David. (2004). Estudio Fitoquímico de *Salvia longispicata*. Disertación de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- Peters, R.J. (2010) Two rings in them all: the labdane-related diterpenoids. *Nat Prod Rep* 2711: 1521-1530
- Petersen, M. (2013). Rosmarinic acid: new aspects. *Phytochemistry Reviews*, 12 (1), 207-227.
- Ramamoorthy, T. P., Elliot, M. (1998) Lamiaceae de México: diversidad, distribución, endemismo y evolución. In *Diversidad biológica de México: orígenes y distribución*, T. P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot y J. Fa (eds.). Instituto de Biología, UNAM, México, D.F., pp. 501-526.
- Ramírez Z. G., Chávez Servia J. L., Archundia Garduño E., López Hernández V. (2016) *Salvias* del Estado de México una perspectiva general. México. ICAMEX
- Rodríguez-Hahn, L., Esquivel, B., Cárdenas, J. (1992) New terpenoid skeletons of clerodanic origin from Mexican *Salvia* Species, *Trends in Organic Chemistry*, 3, 99-111.
- Rodríguez-Hann, L., Esquivel, B., Cárdenas, J. (1996) Abietane and icetexane diterpenoids from Mexican *Salvia* Sp.; Secondary metabolites from Mexican plants: Chemistry and biological properties, 19-29.
- Rongtao Li, Susan L. Morris-Natschke, & Kuo-Hsiung Lee (2017) Clerodane diterpenes: sources, structures, and biological activities, *Nat Prod Rep*. 33(10): 1166–1226.
- Roth, B.L., Baner, K., Westkaemper, R., Siebert, D. Rice, K.C., Steinberg, S., Ernsberger, P., and Rothman, RB. (2002) Salvinorin A: A Potent Naturally Occurring Nonnitrogenous Kappa Opioid Selective Agonist. *PNAS*. 99(18): 11934-11939.
- Ruíz, PG (2002) Terpenos. In: *Productos naturales*, Navarra, UPd (ed), pp 116-141.
- Salminen A, Lehtonen M, Suuronen T, Kaarniranta K, Huuskonen J (2008) Terpenoids: natural inhibitors of NF-kappaB signaling with anti-inflammatory and anticancer potential. *Cell Mol Life Sci* 6519: 2979-2999.

- Sánchez A. A., Esquivel, B., Ramamoorthy, T. P. (1995) Clerodane diterpenoids from *Salvia urolepis*, *Phytochemistry* Vol. 38, No. 1, pp. 171-174.
- Shunichi Manabe & Chikao Nishino (1986) Stereochemistry of Cis-clerodane diterpenes, *Tetrahedron* Vol. 42, No. 13, pp. 3461-3470.
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I., Murphy, A., *Plant Physiology and Development sexta edición*, Sinauer Associates Inc. (2015).
- Takahiko Isobe, Matsumi Doe, Yoshiki Morimoto, Kumiko Nagata, and Ayumi Ohsaki (2006) The Anti-Helicobacter pylori Flavones in a Brazilian Plant, *Hyptis fasciculata*, and the Activity of Methoxyflavones, *Biol. Pharm. Bull.* 29 (5) 1039-1041.
- Topçu, G. (2006) Bioactive Triterpenoids from *Salvia* Species. *Journal of Natural Products* 69(3): 482-487.
- Tram Ngoc Ly, Makoto Shimoyamada & Ryo Yamauchi (2006) Isolation and Characterization of Rosmarinic Acid Oligomers in *Celastrus hindsii* Benth Leaves and Their Antioxidative Activity., *J. Agric. Food Chem.*, 54, 3786-3793.
- Valenzuela A., Ronco A. M., (2004) Fitoesteroles y fotoestanoles: aliados naturales para la protección de la salud cardiovascular, *Revista Chilena de Nutrición*, 21(1): 161-169.
- Vázquez Heredia, Valeria Juliana (2018). Aislamiento, Determinación Estructural y Evaluación de la Actividad Biológica de Metabolitos Secundarios Provenientes de *Ageratina glabrata*. Disertación de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- Vergara Guerra, Victoria Jacqueline (2018). Aislamiento, Caracterización y Evaluación Biológica de los componentes terpénicos de la especie *Salvia lasiantha* Benth. Disertación de Tesis para obtener el grado de Maestría. I.Q., UNAM.
- Villaseñor, J.L., (2016) Checklist of the native vascular plants of México, *Revista Mexicana de Biodiversidad*, v. 87, pp. 559-902.
- Xiao-Mei Wei, Jie-Kai Cheng, Dong-Liang Cheng & Li-Ming Gao (2004) Chemical Constituents from *Clinopodium urticifolium*, *Journal of the Chinese Chemical Society*, 51, 1043-1049.
- Yi-Bing Wu, Zhi-Yu Ni, Qing-Wen Shi, Mei Dong, Hiromasa Kiyota, Yu-Cheng Gu, & Bin Cong (2012) Constituents from *Salvia* Species and Their Biological Activities, *Chem. Rev.*, 112, 5967-6026.
- Yogesh Murti and Pradeep Mishra, (2014) Flavanone: A Versatile Heterocyclic Nucleus, *International Journal of ChemTech Research*, Vol.6, No.5, pp 3160-3178.

8.- ANEXOS

A.1. Compuesto 1a Ester metílico del Ácido Hardwiickico



INSTITUTO DE QUÍMICA

UNAM

Muestra: ML-Sp-DCM-Ec

Investigador: Dr. Leovigildo Quijano

Disolvente: cloroformo

Concentración: 1 mg/1 mL

Longitud de celda: 1 dm

Tiempo de integración: 5 s

α : **-0.249**

Observaciones: _____

Operador: Q. Mary Paz Orta Pérez

No. de registro: 242

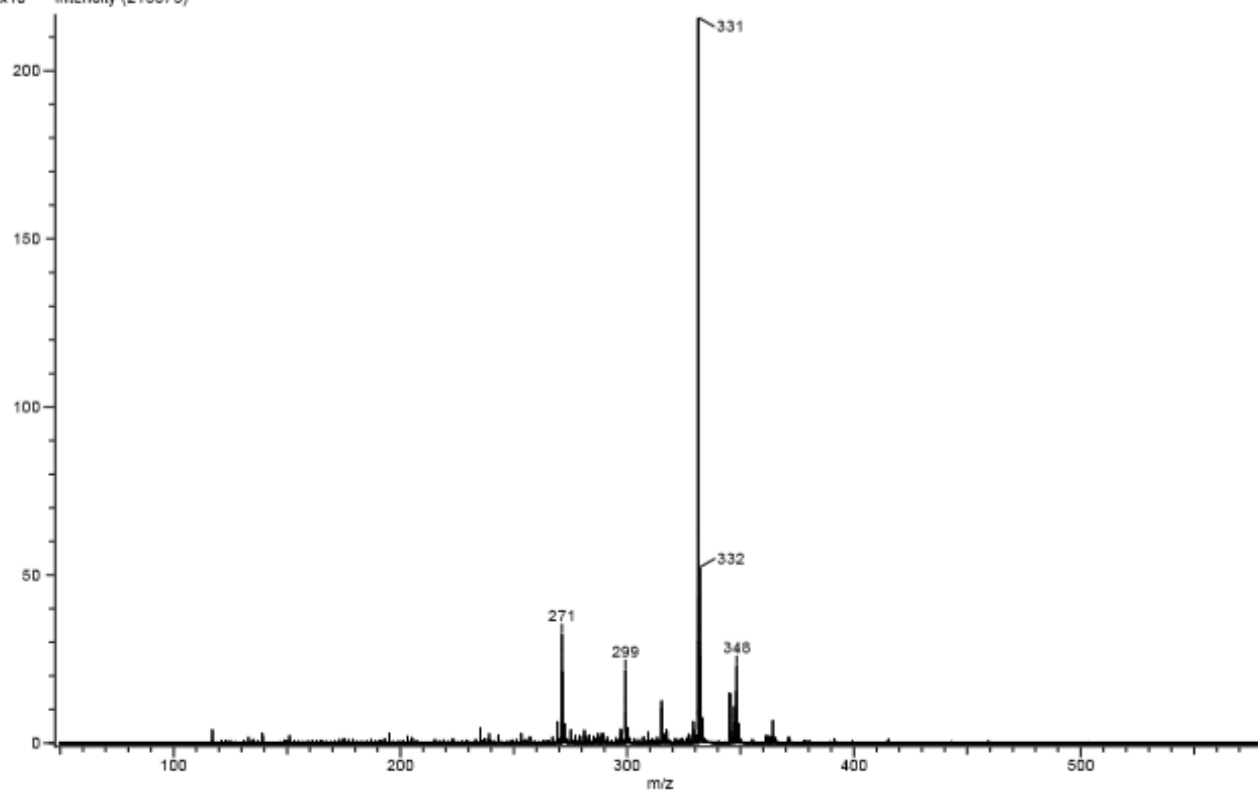
Fecha: 22-02-2018

A.1.1 Espectro de Masas del éster metílico del ácido Hardwiickico

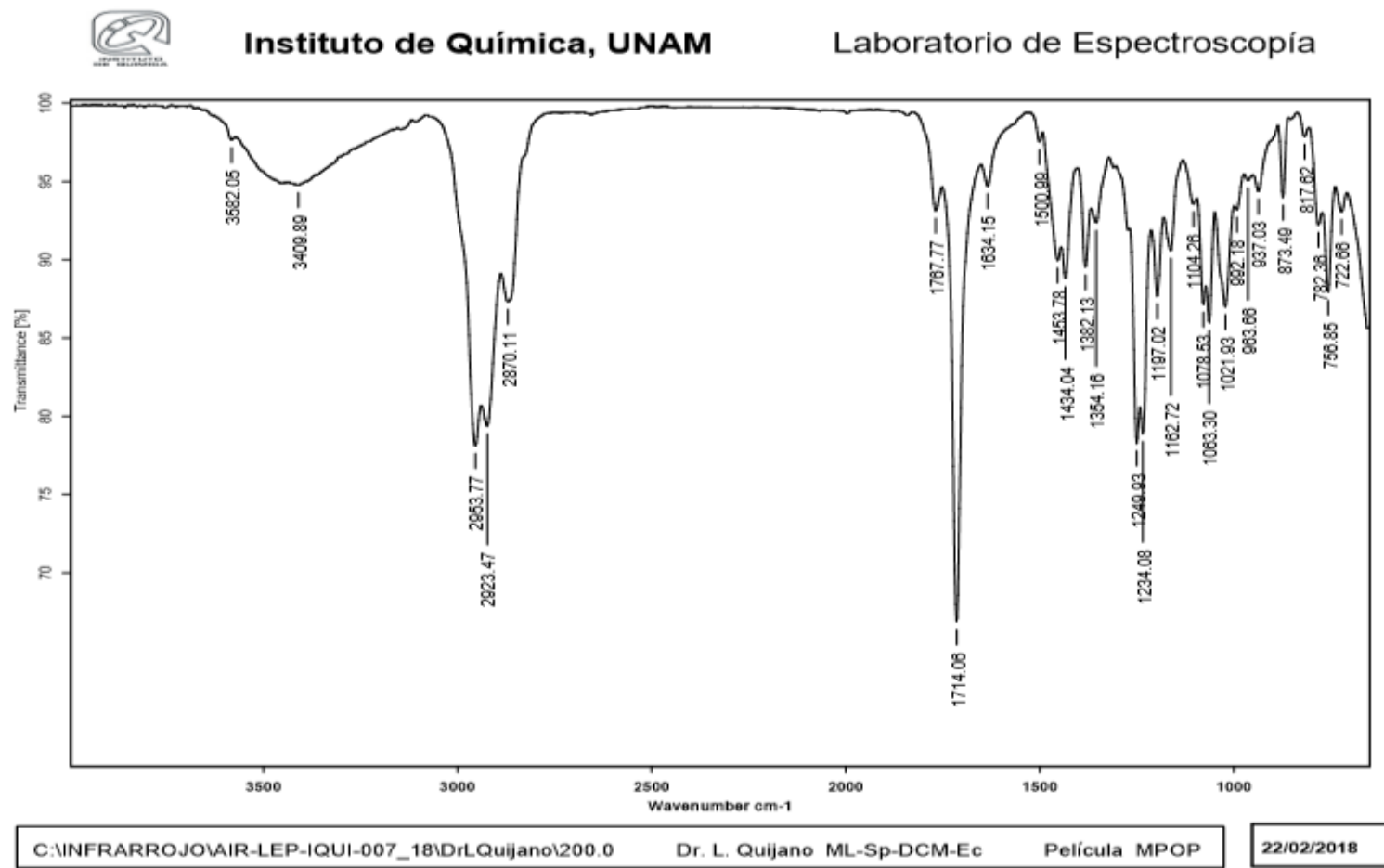
INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM
LABORATORIO DE ESPECTROMETRIA DE MASAS

Acq. Data Name: 619 ML-SL-Ac-Ec
Creation Parameters: Average(MS1) Time:1..1
Dr Quijano Leovigildo / Operador: Carmen Garcia-Javier Perez
x10³ Intensity (215678)

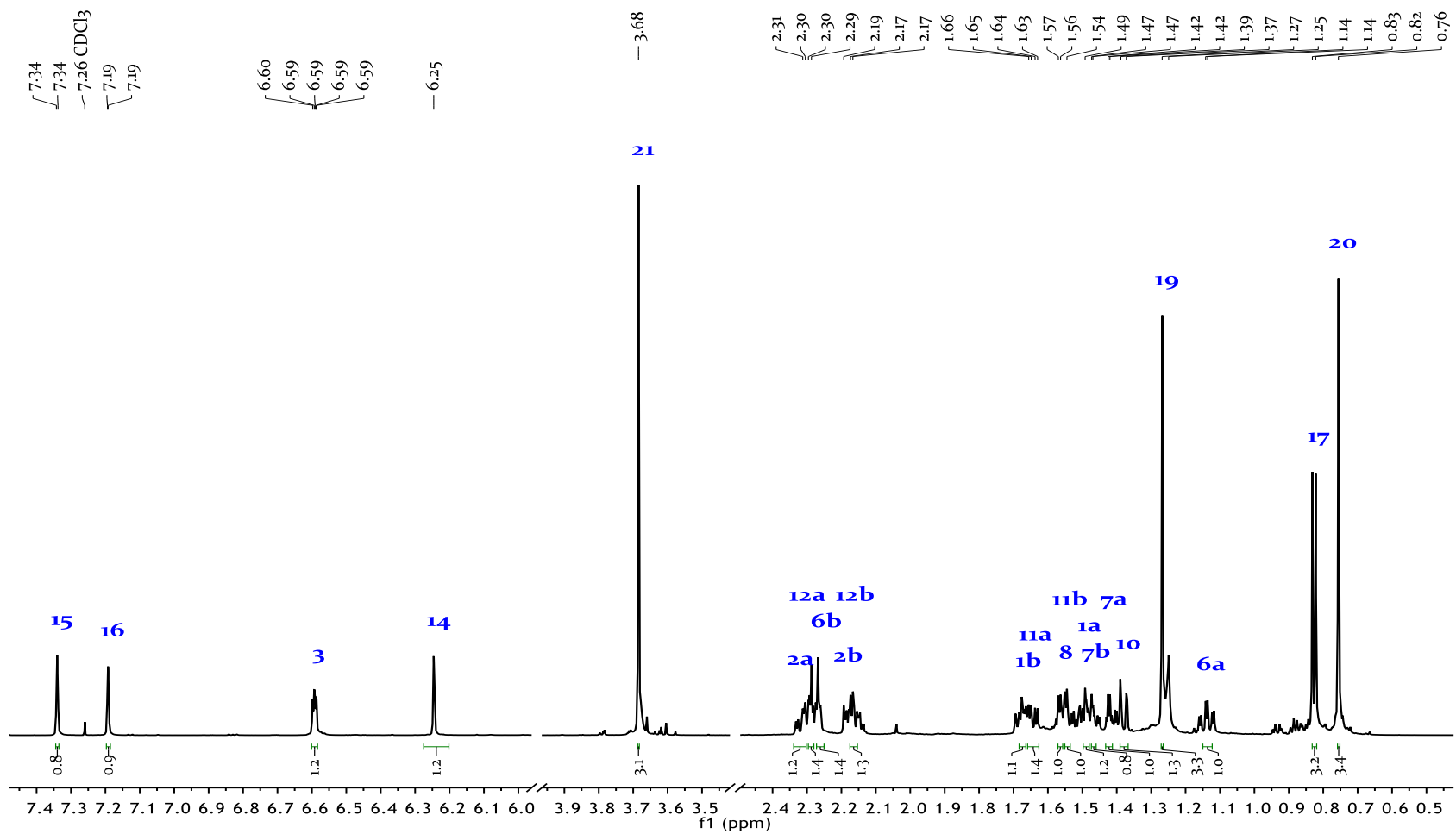
Experiment Date/Time: 4/1/2019 4:56:11 PM
Instrument : JEOL The AccuTOF : JMS-T100LC
Ionization Mode: DART+



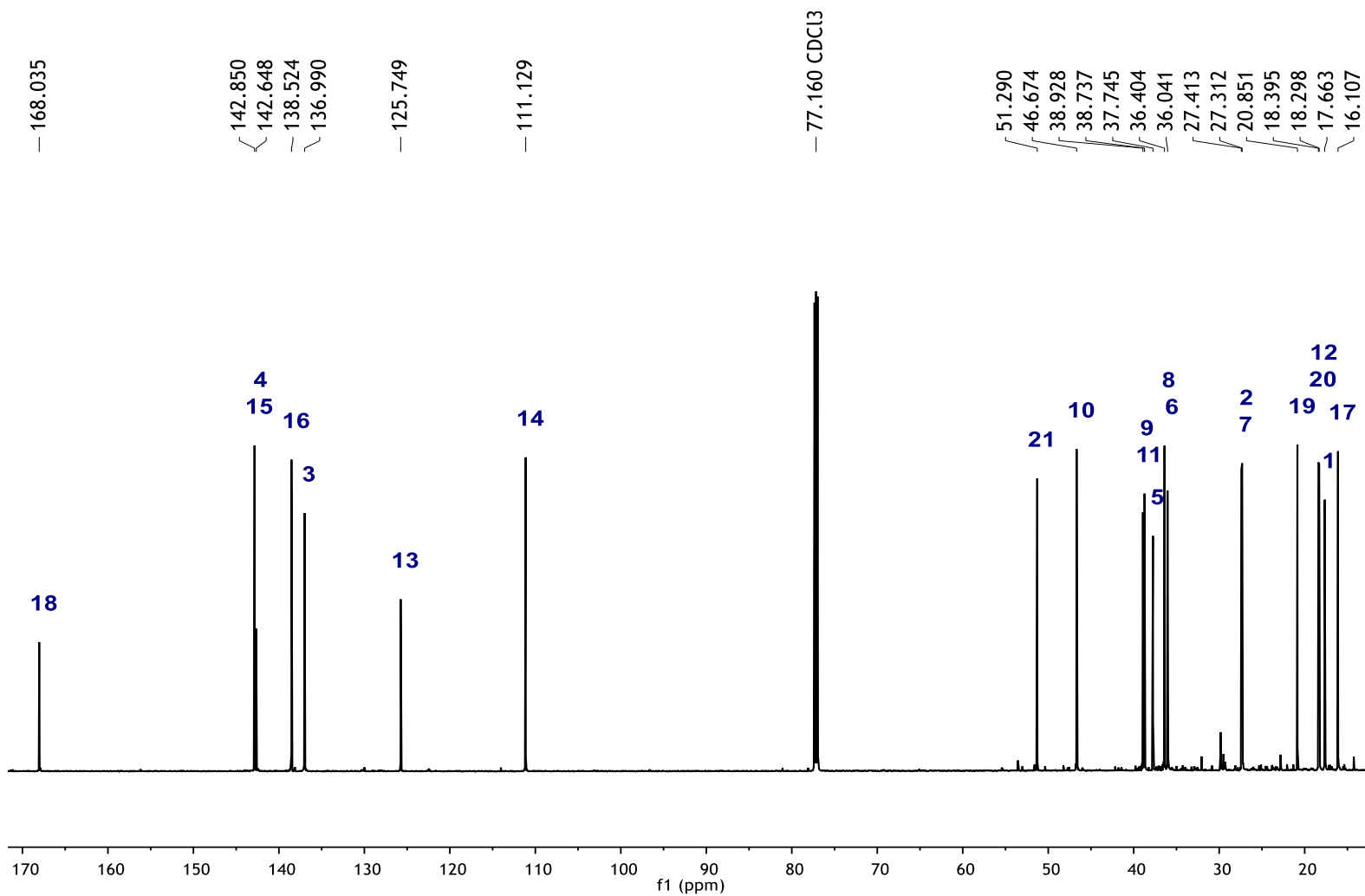
A.1.2 Espectro de Infrarrojo del éster metílico del ácido Hardwiickico



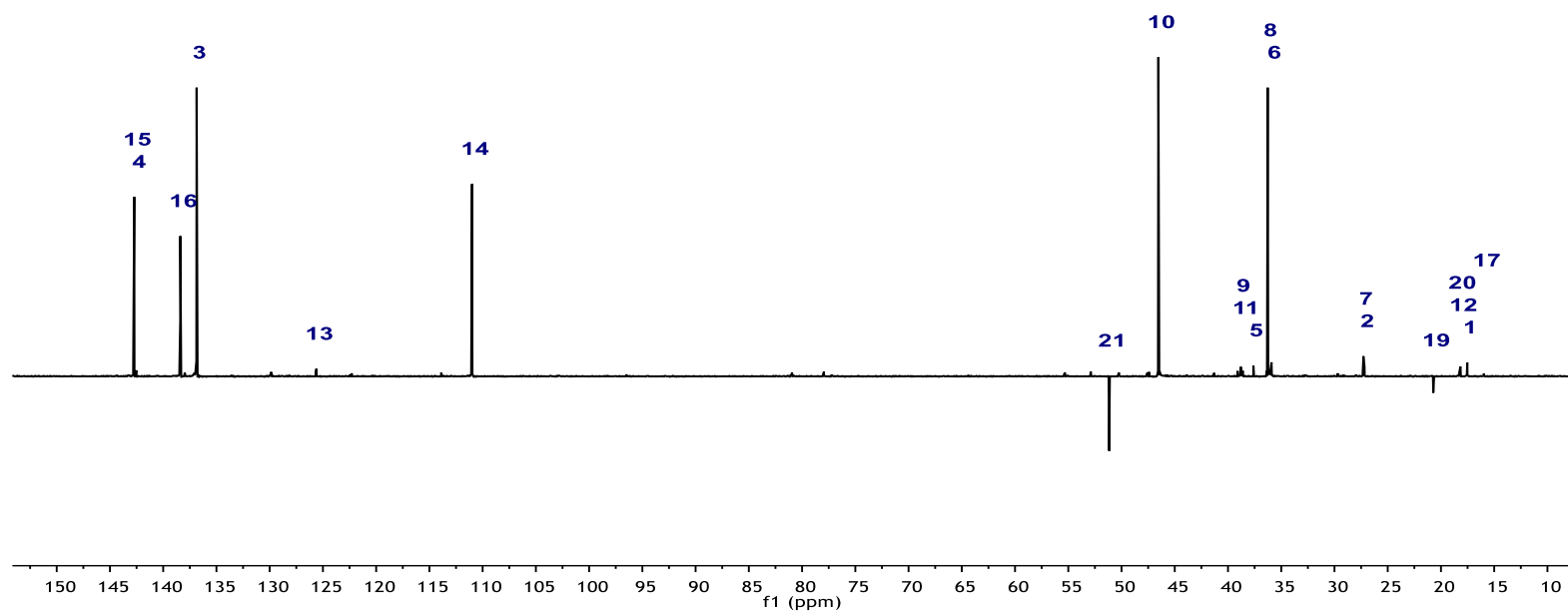
A.1.3 Espectro de ^1H RMN, 700 MHz en CDCl_3



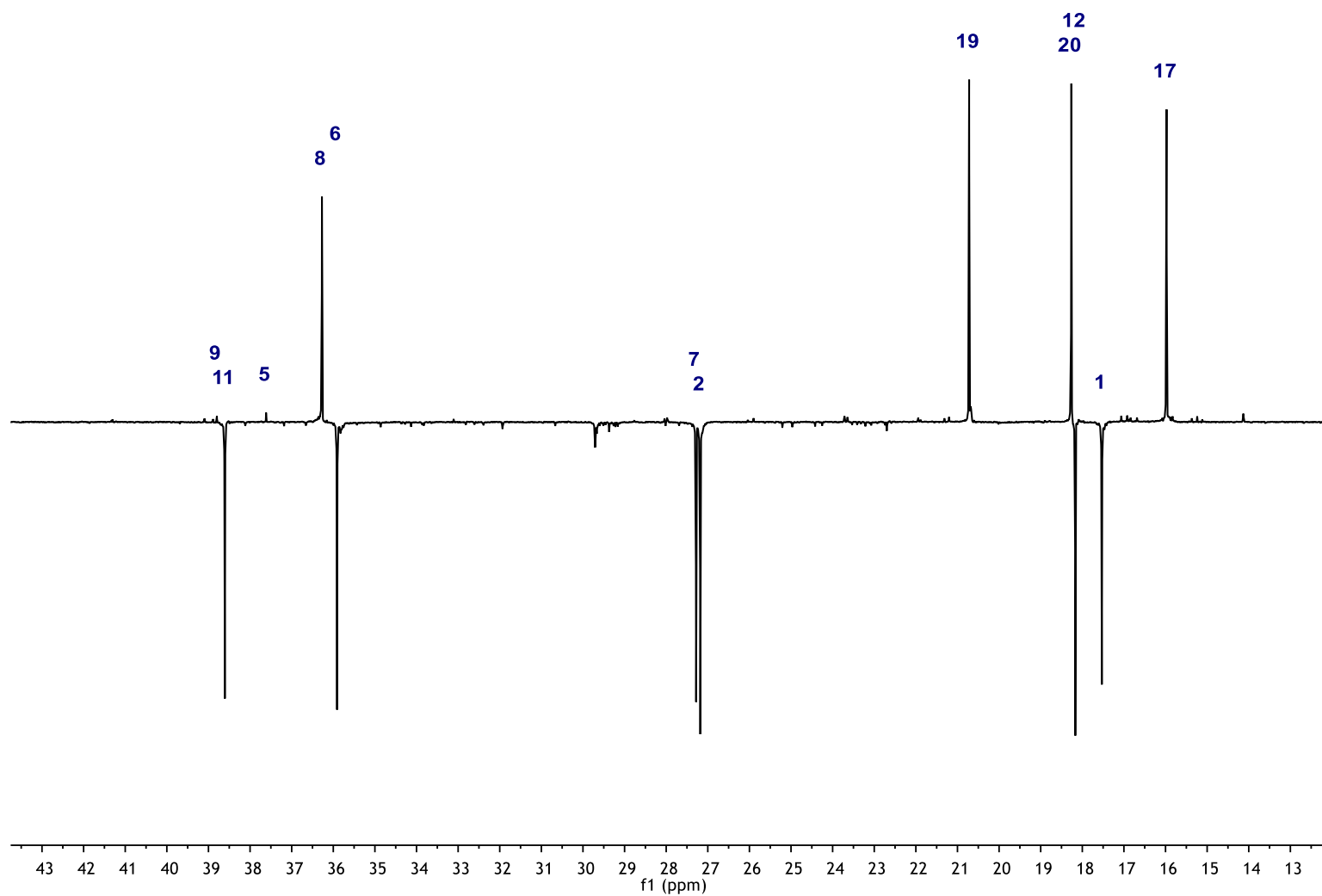
A.1.4 Espectro de ^{13}C RMN, 175 MHz en CDCl_3



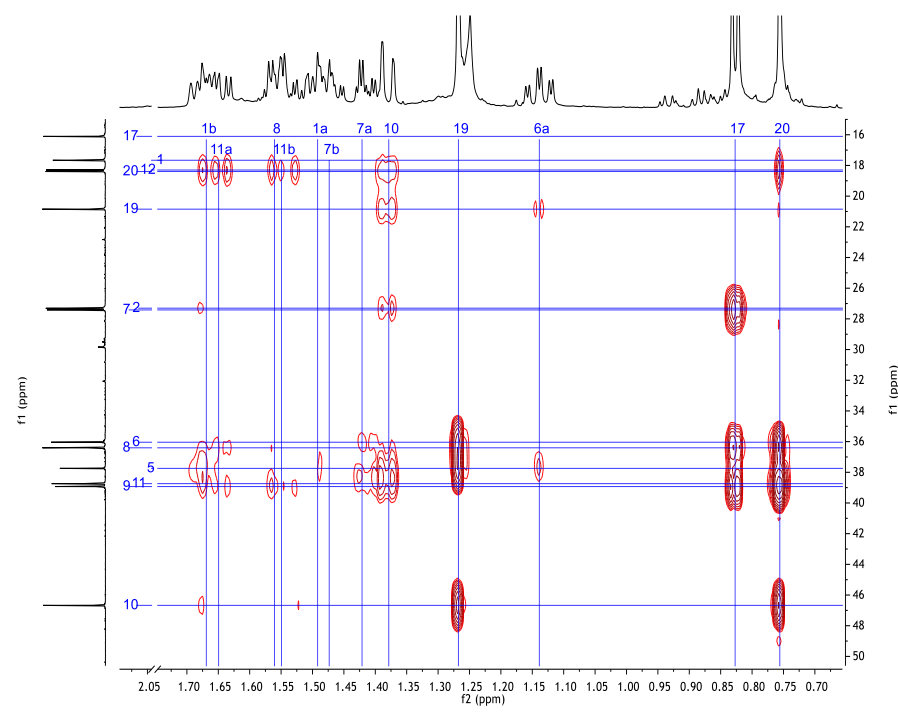
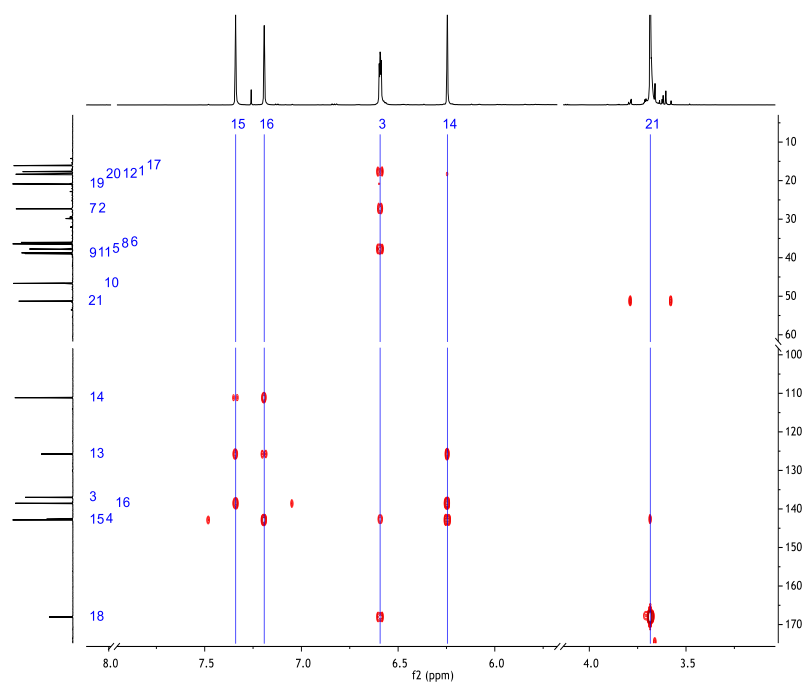
A.1.5 Espectro DEPT 90, 175 MHz en CDCl_3 del Compuesto 1a



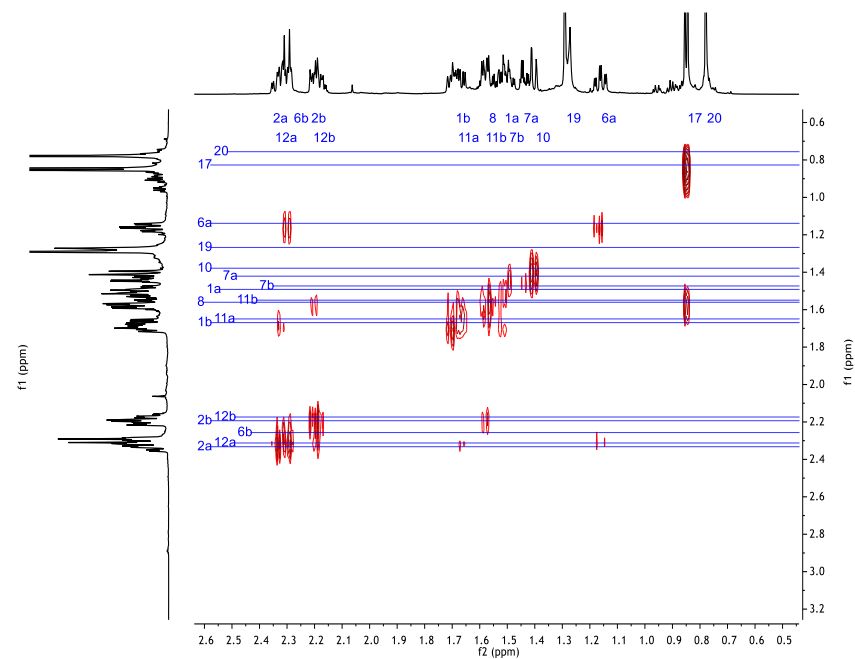
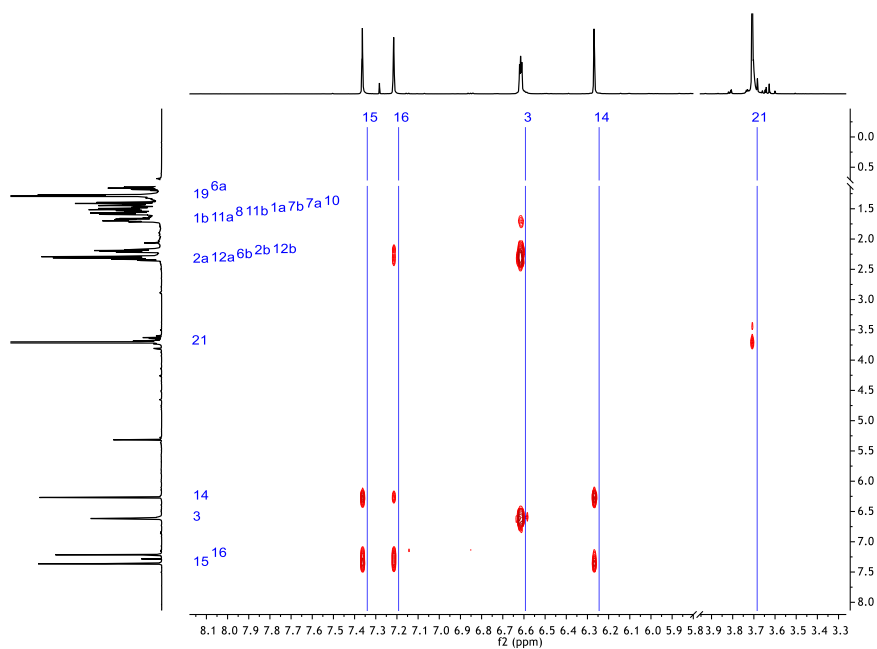
A.1.6 Espectro DEPT 135, 175 MHz en CDCl_3 del Compuesto 1a



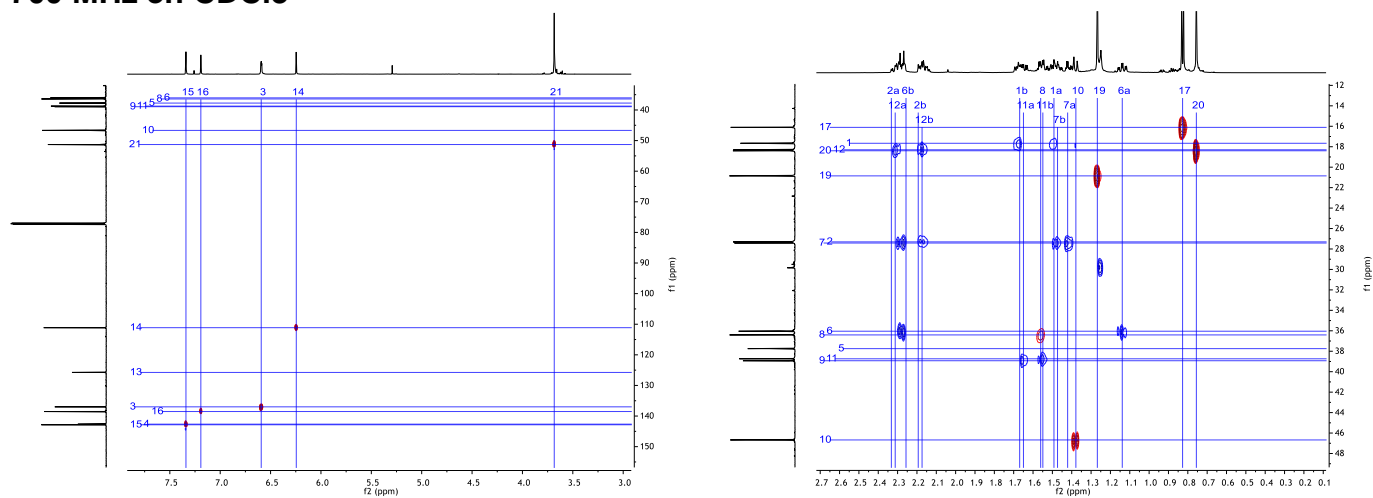
A.1.7 HMBC, 700 MHz en CDCl₃



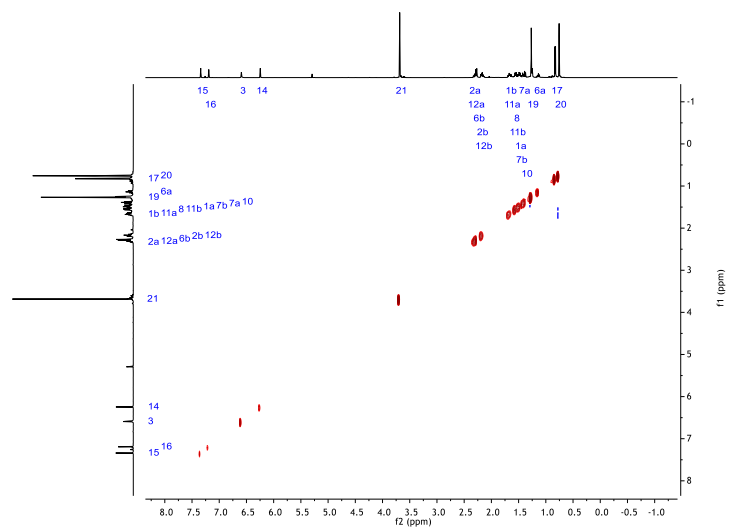
A.1.8 COSY, 700 MHz en CDCl₃



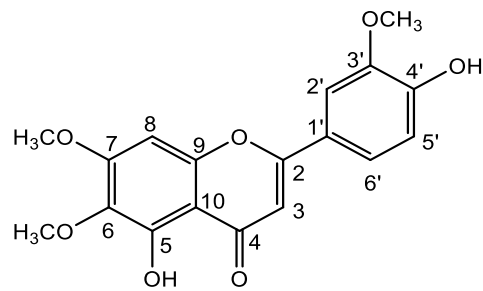
A.1.9 HSQC, 700 MHz en CDCl₃



A.1.10 NOESY, 700 MHz en CDCl₃

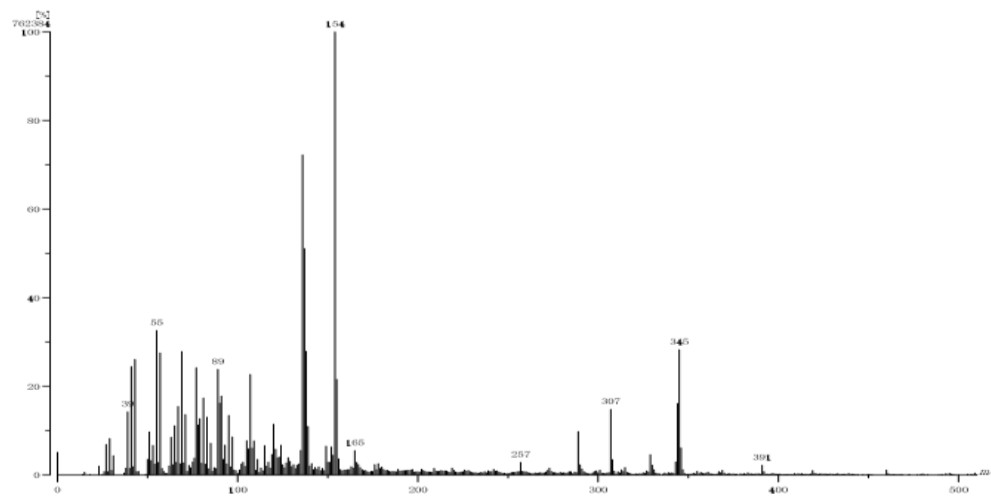


A.2. Compuesto 2 Cirsilineol

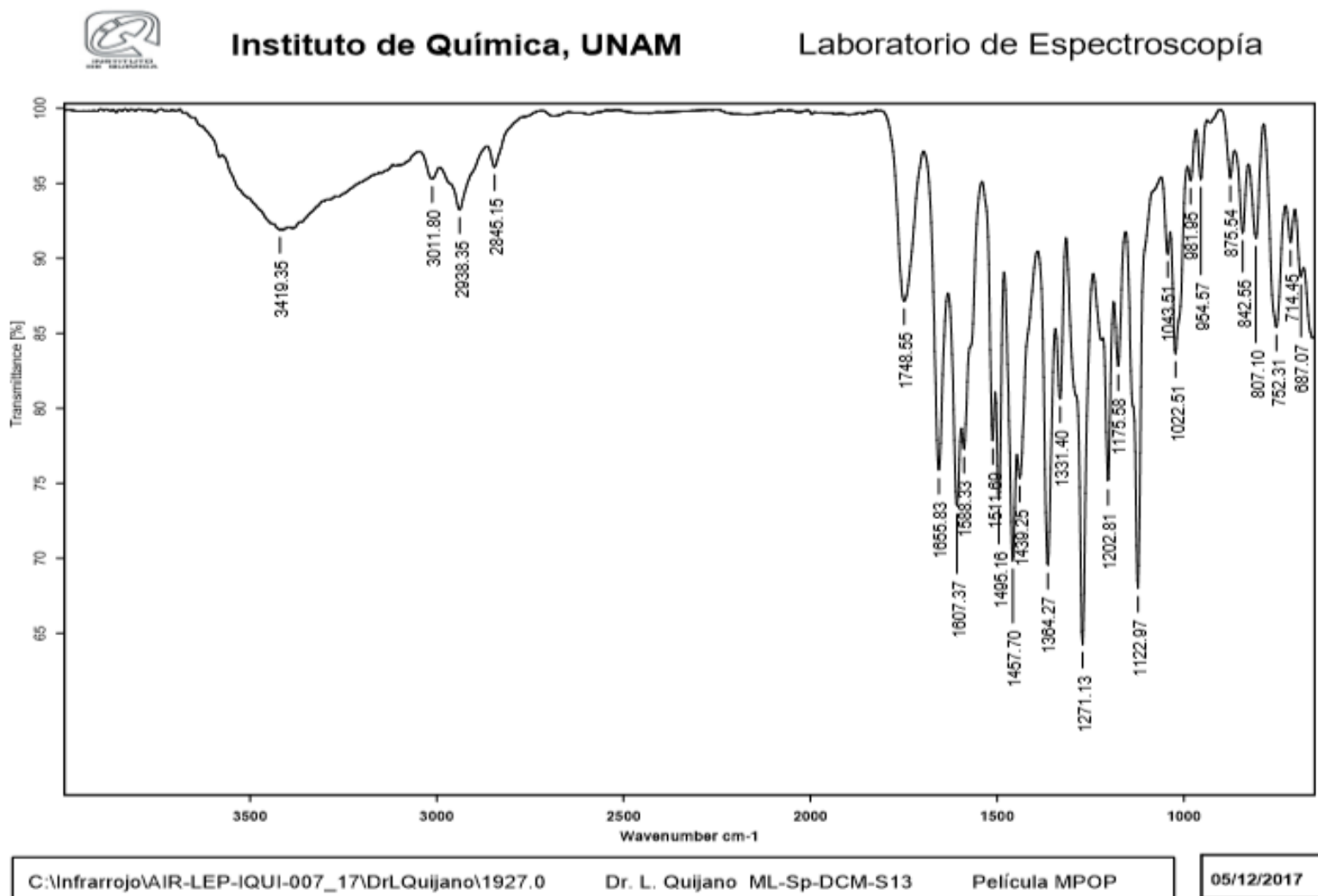


A.2.1 Espectro de Masas Cirsilineol

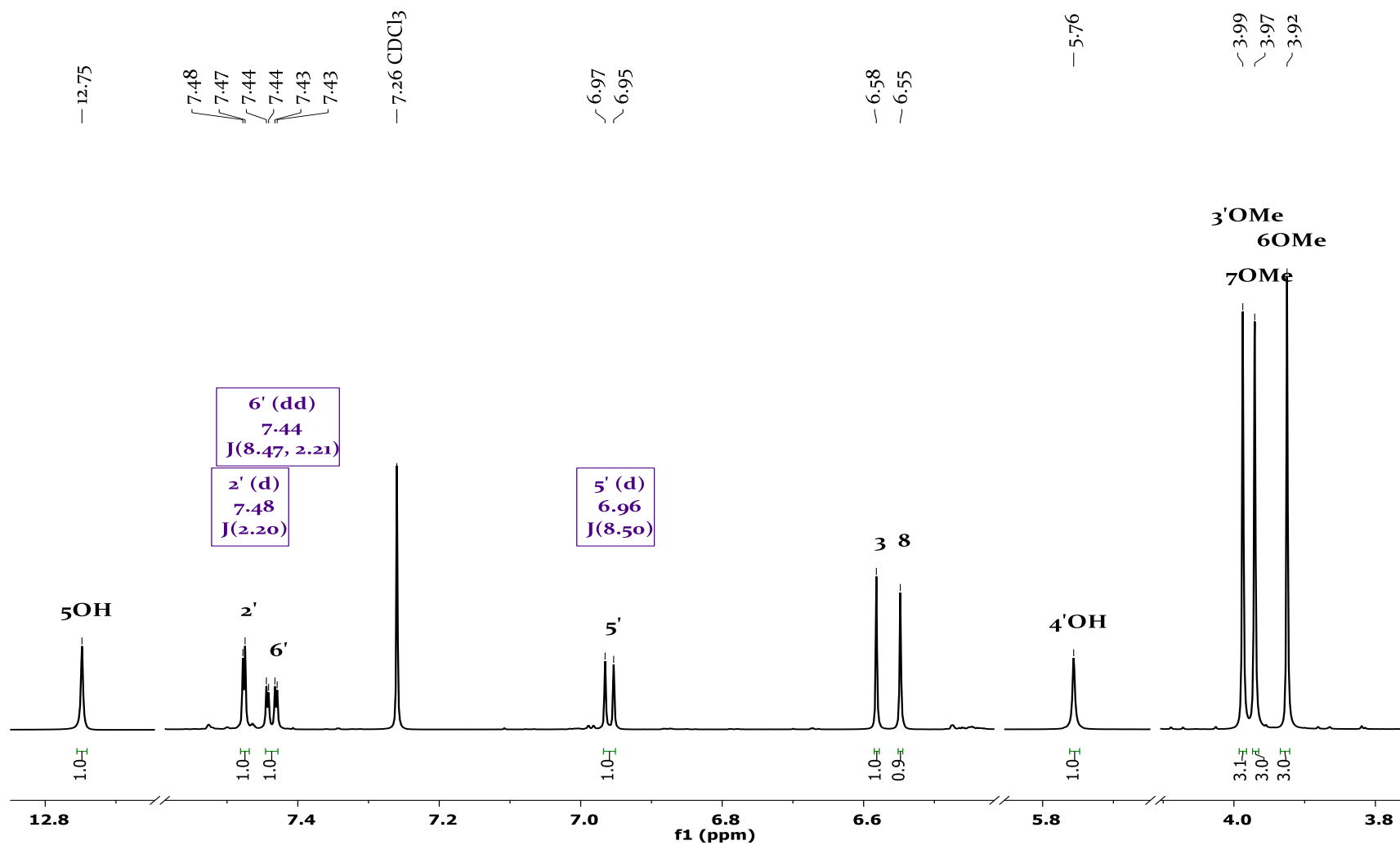
[Mass Spectrum]
Date: Di Leirovillo Quijano078 Date: 27-Nov-2017 16:28
Instrument: MStation
Sample: 2704 ML-Op-DCM-013
Note: Luis Valasco
Inlet: Direct Ion Mode: FAB+
Spectrum Type: Normal Ion [MF-Linax]
RT: 0.45 min Scan# : (4.7)
BP: m/z 154 Rel. : 72.71 (72316)
Output m/z range: 0 to 510 Cut Level: 0.00 %



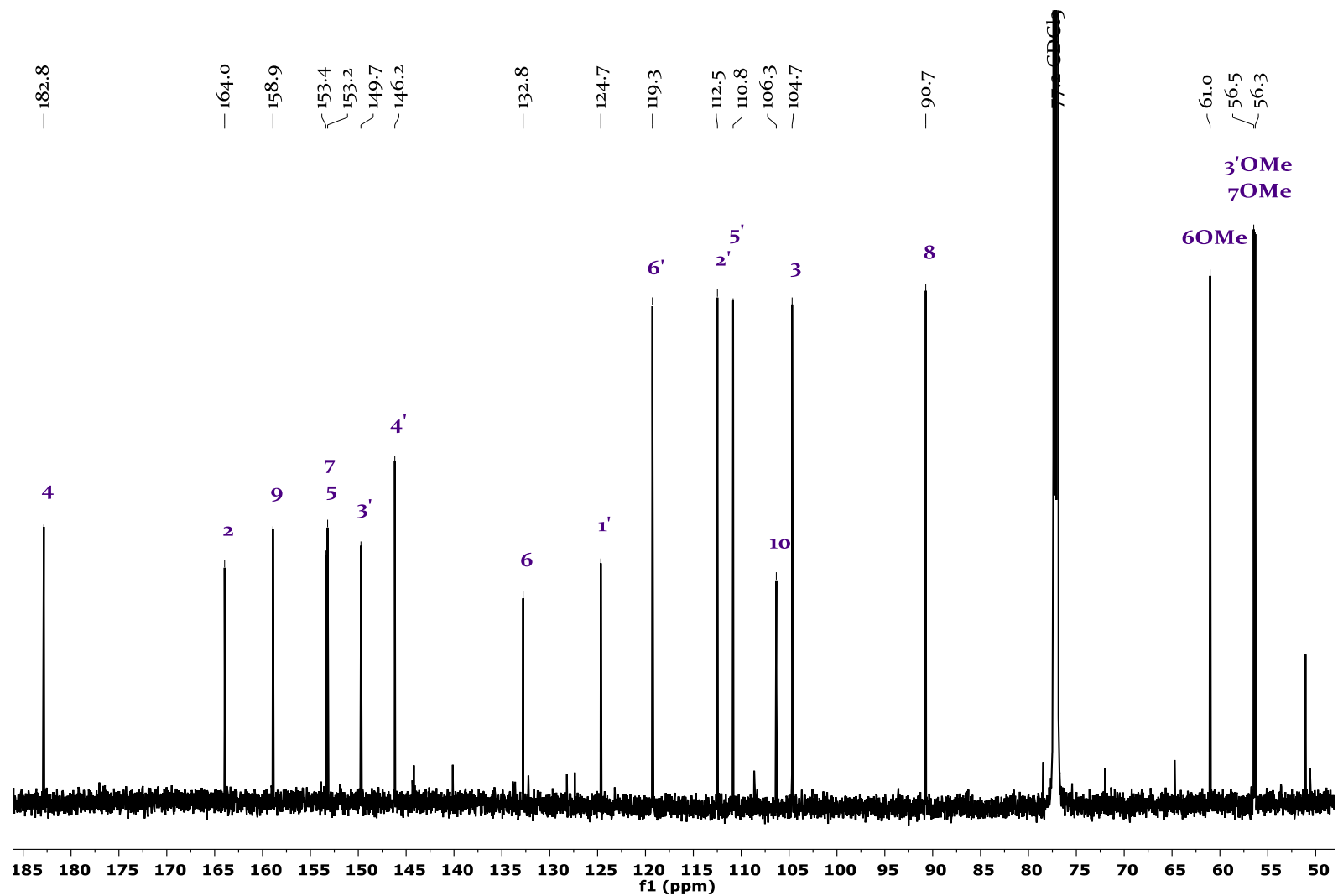
A.2.2 Espectro de Infrarrojo Cirsilineol



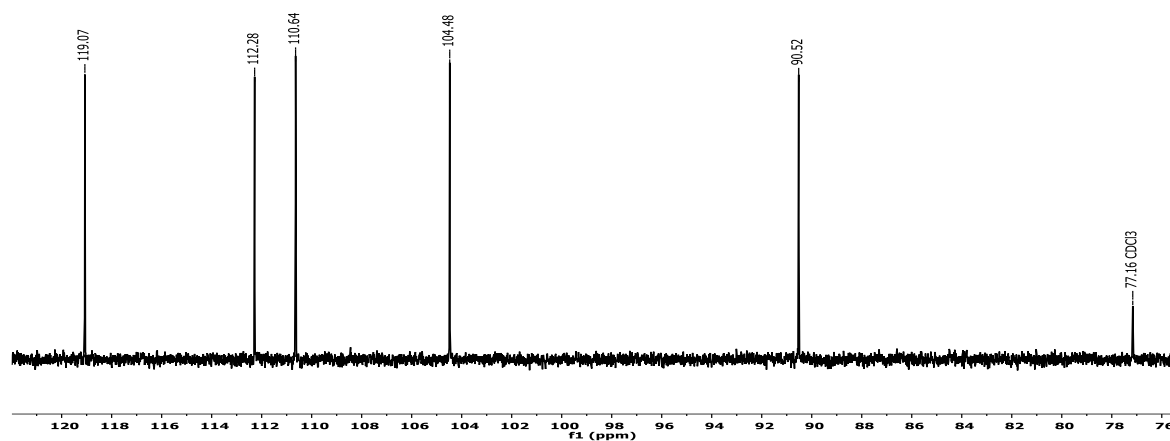
A.2.3 Espectro de ^1H RMN, 700 MHz en CDCl_3



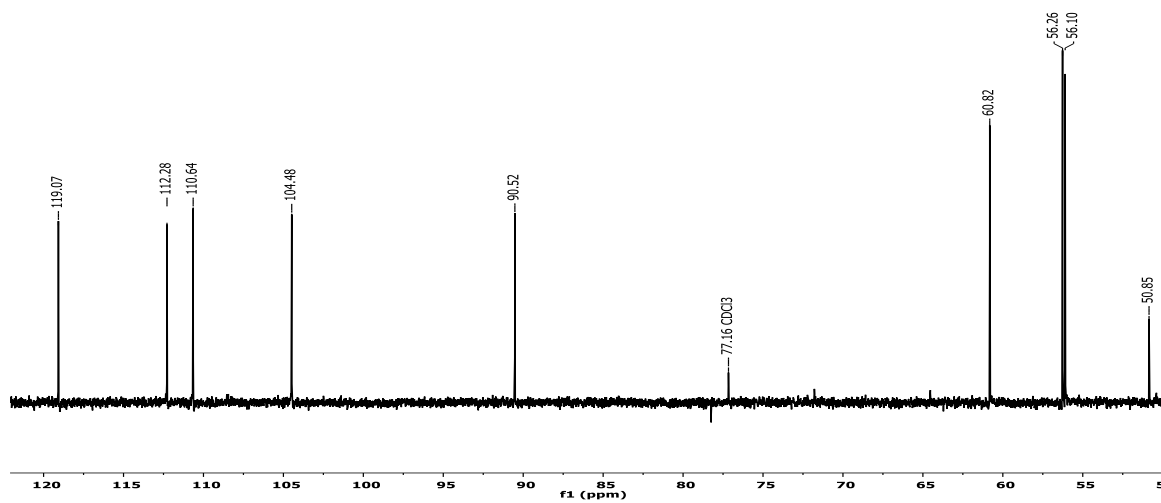
A.2.4 Espectro de ^{13}C RMN, 175 MHz en CDCl_3



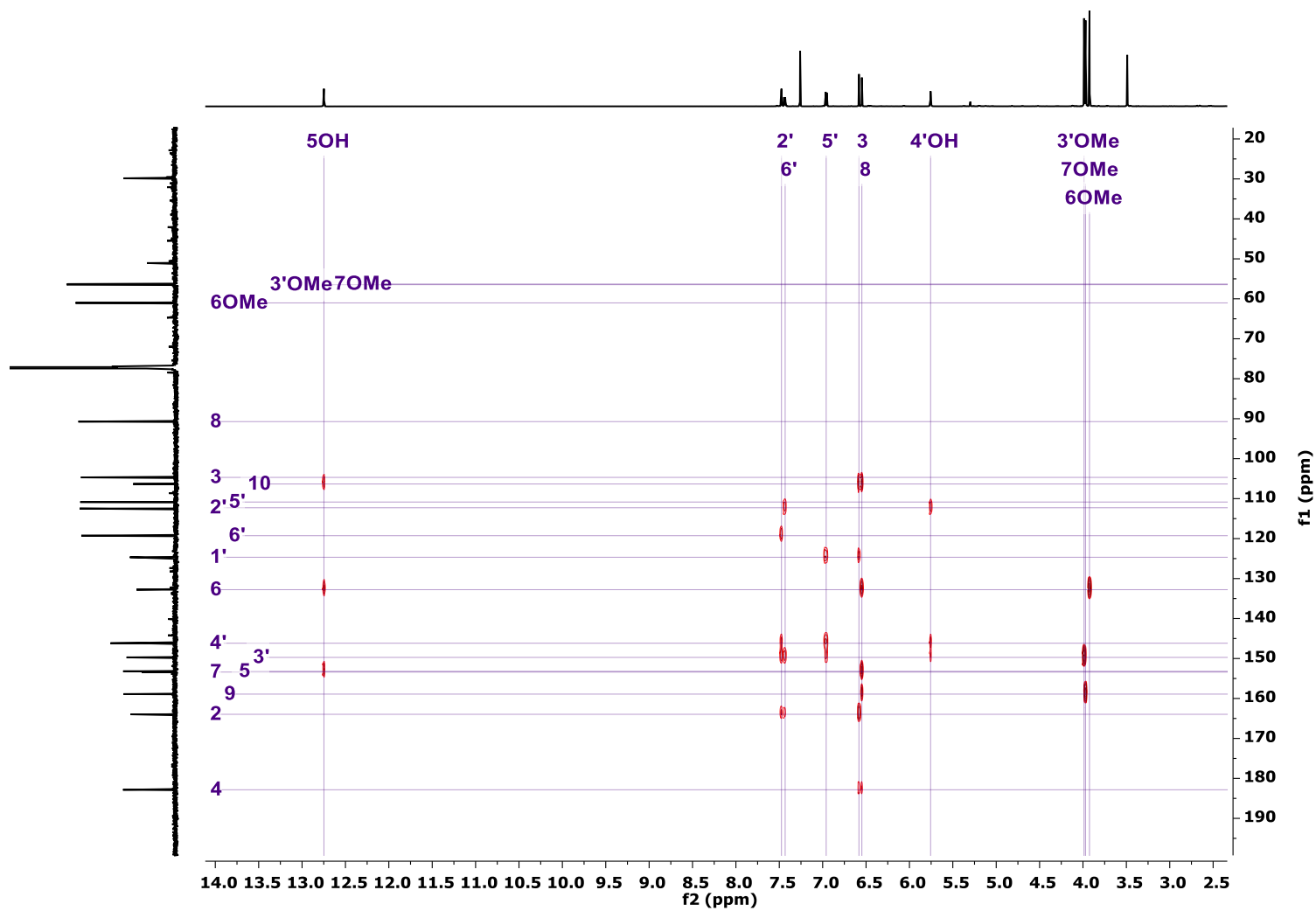
A.2.5 Espectro DEPT 90, 175 MHz en CDCl_3 del Compuesto 2



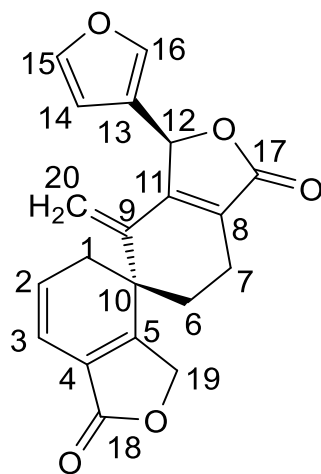
A.2.6 Espectro DEPT 135, 175 MHz en CDCl_3 del Compuesto 2



A.2.7 HMBC, 700 MHz en CDCl₃



A.3. Compuesto 3 Salvileucalina



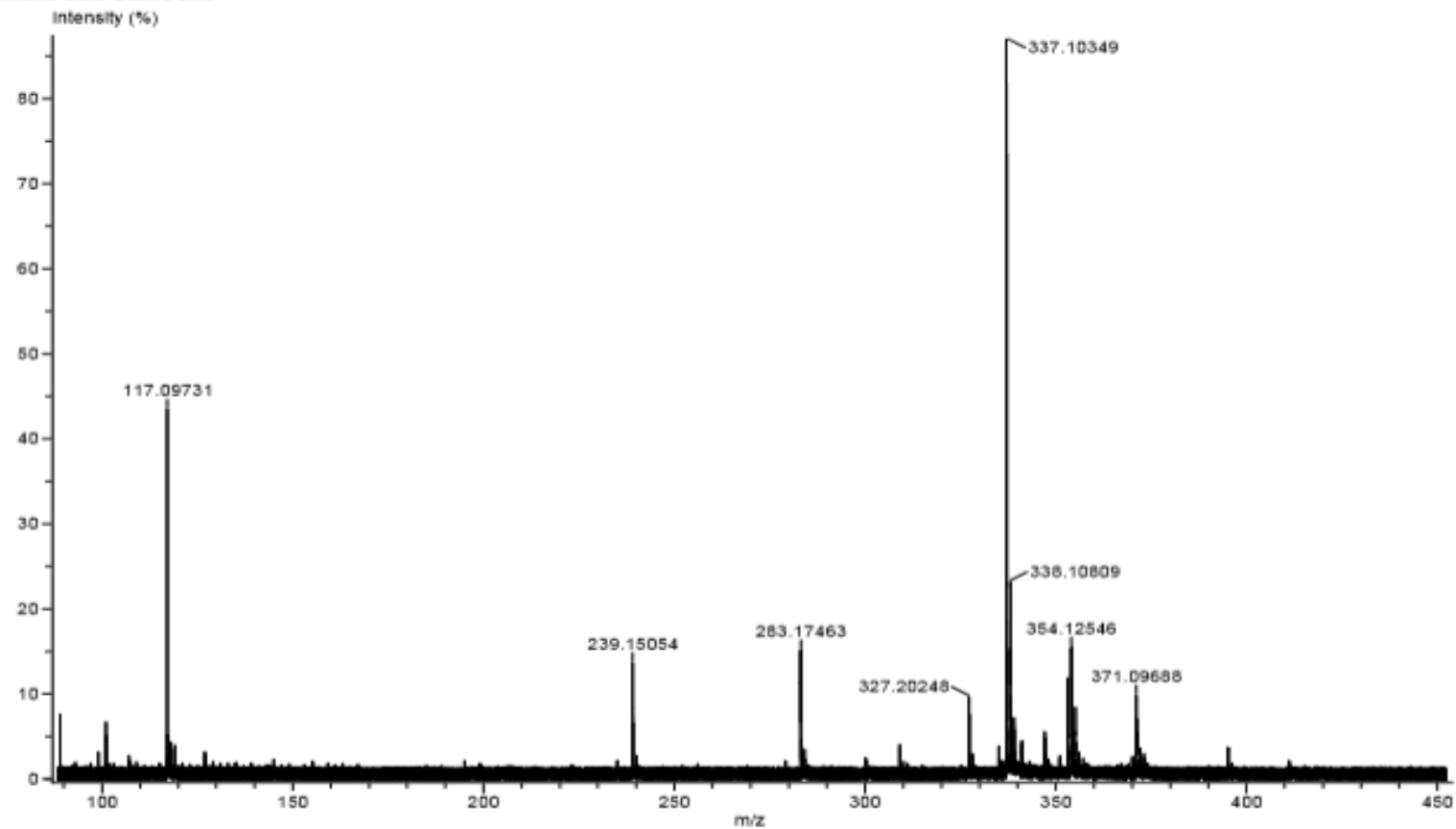
A.3.1 Espectro de Masas Salvileucalina

INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM
LABORATORIO DE ESPECTROMETRIA DE MASAS

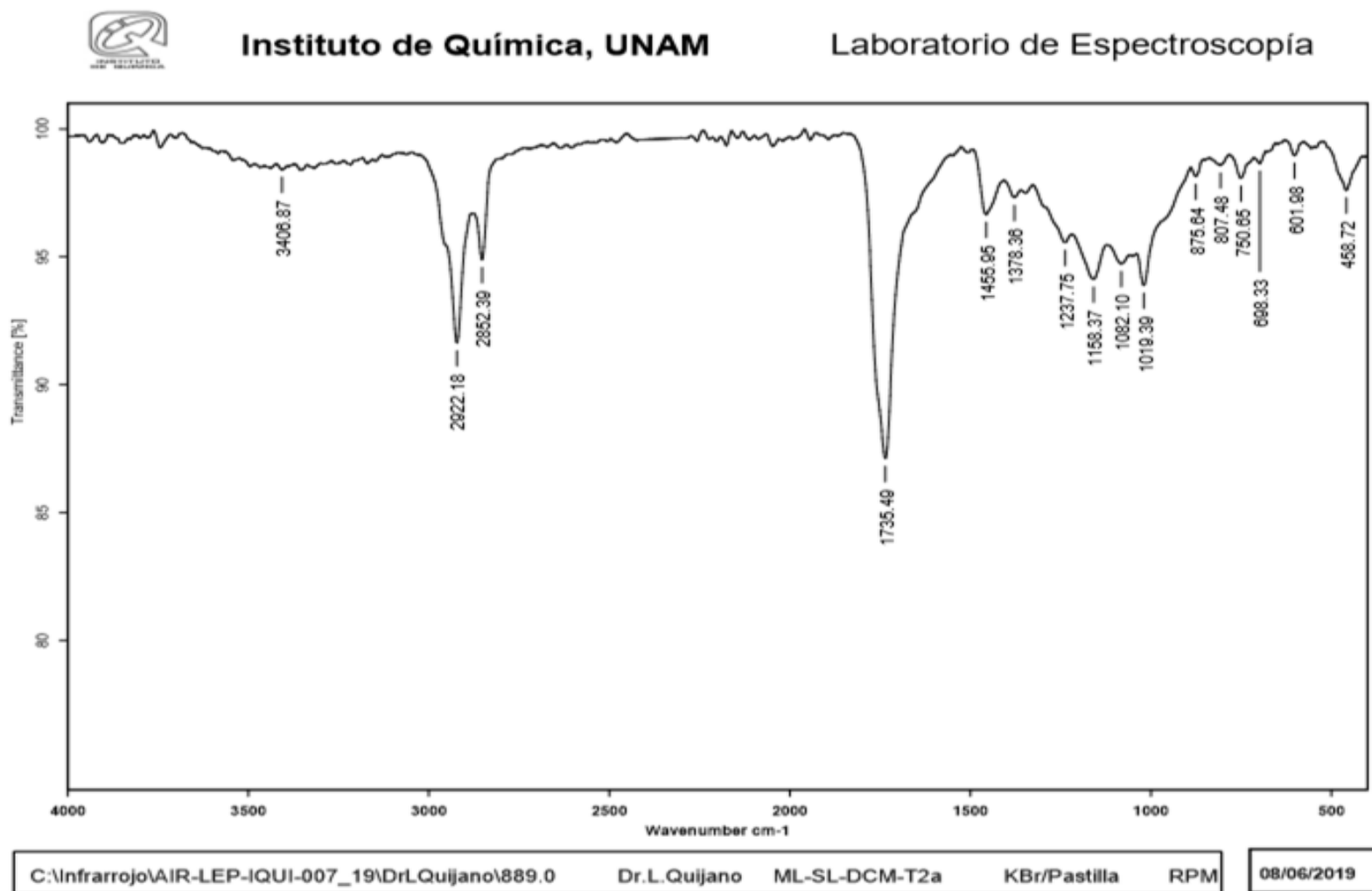
Experiment Date/Time: 10/16/2017 10:18:31 AM
Creation Parameters: Average(MS[1] Time:1..1)
Comment: Celia Bustos Brito

Acq. Data Name: U-2086-MLT2a
Ionization Mode: DART +

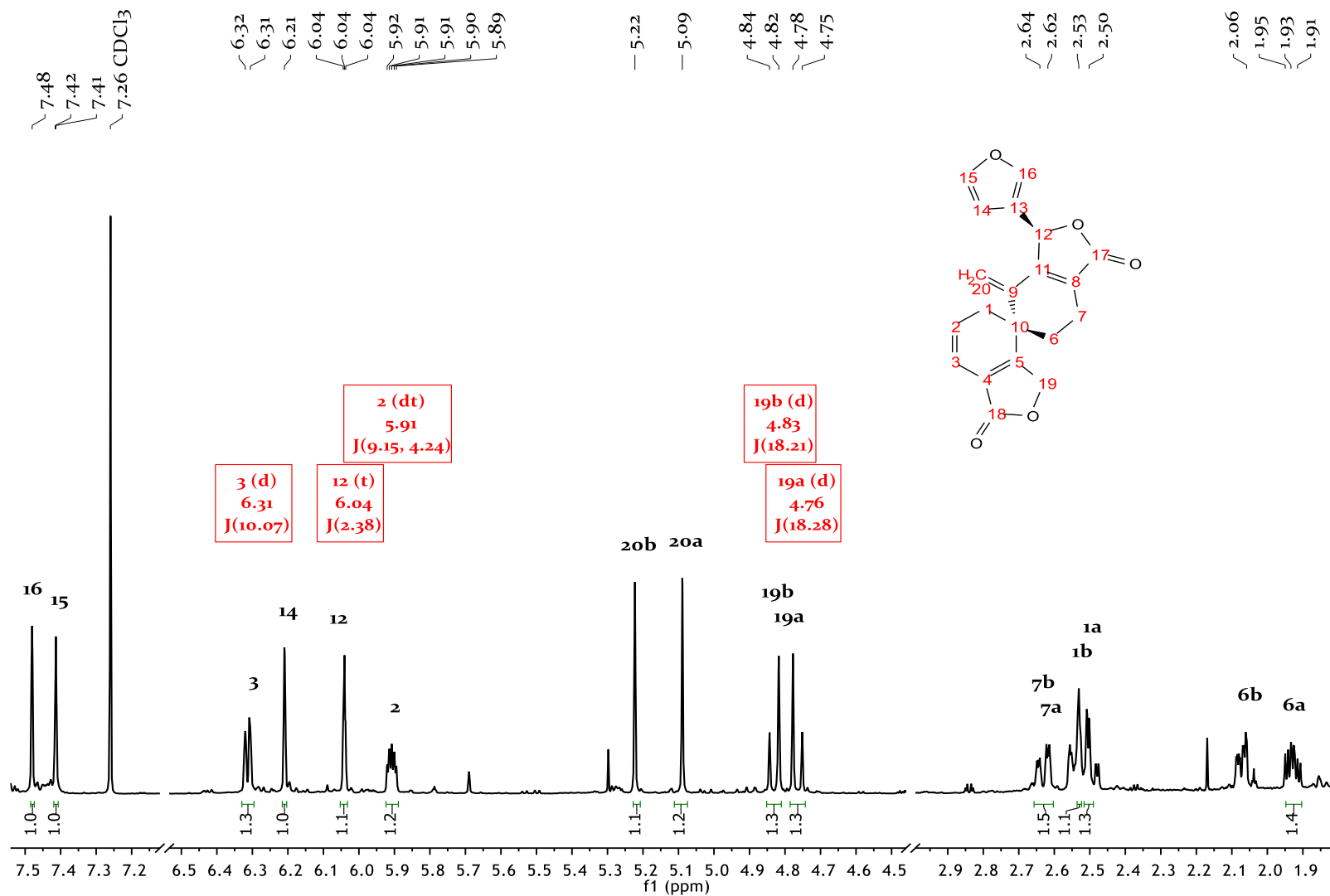
Operator Name: Carmen Garcia-Javier Perez: AccuTOF
Instrument: JEOL The AccuTOF: JMS-T100LC



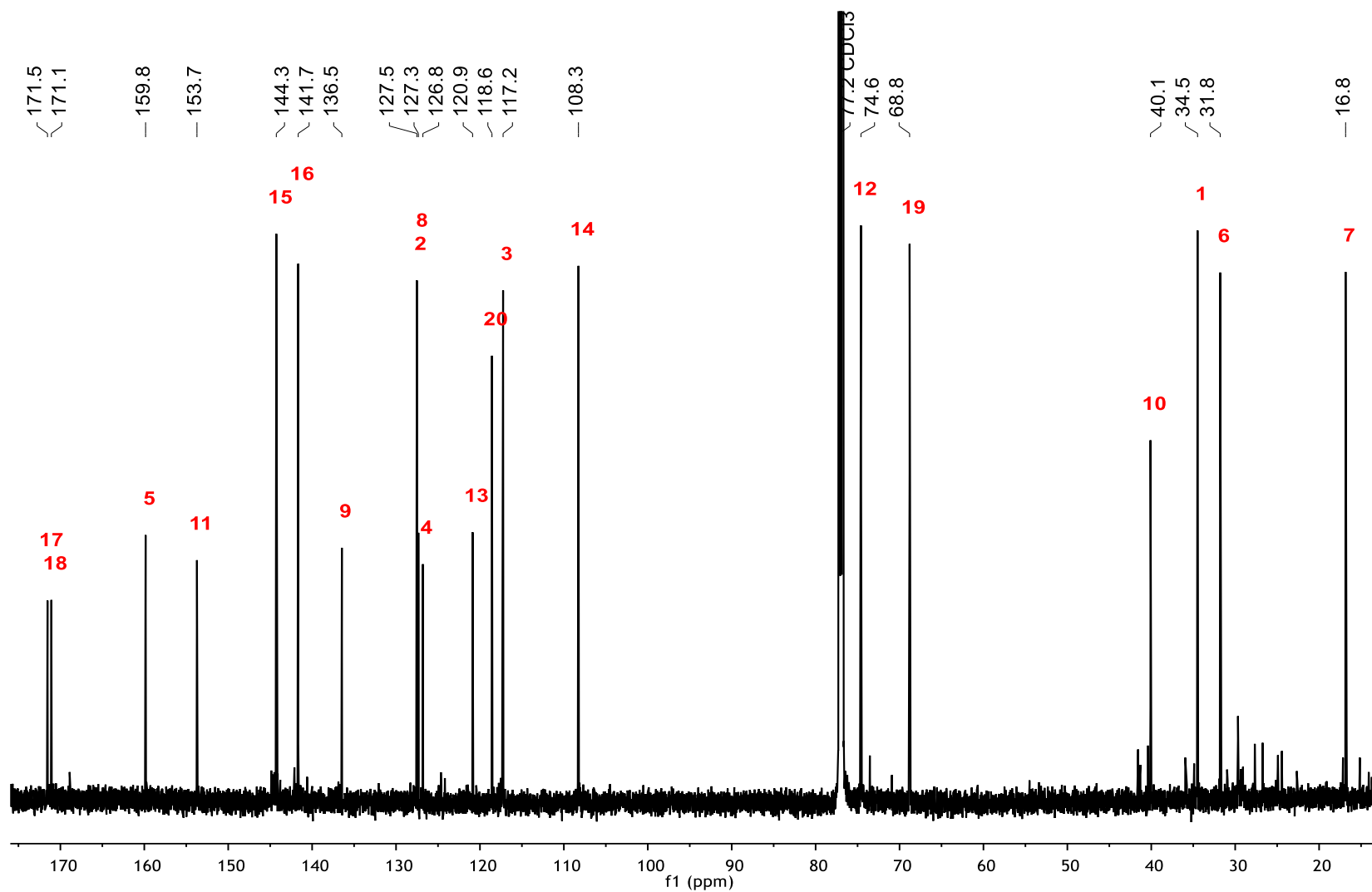
A.3.2 Espectro de Infrarrojo Salvileucalina



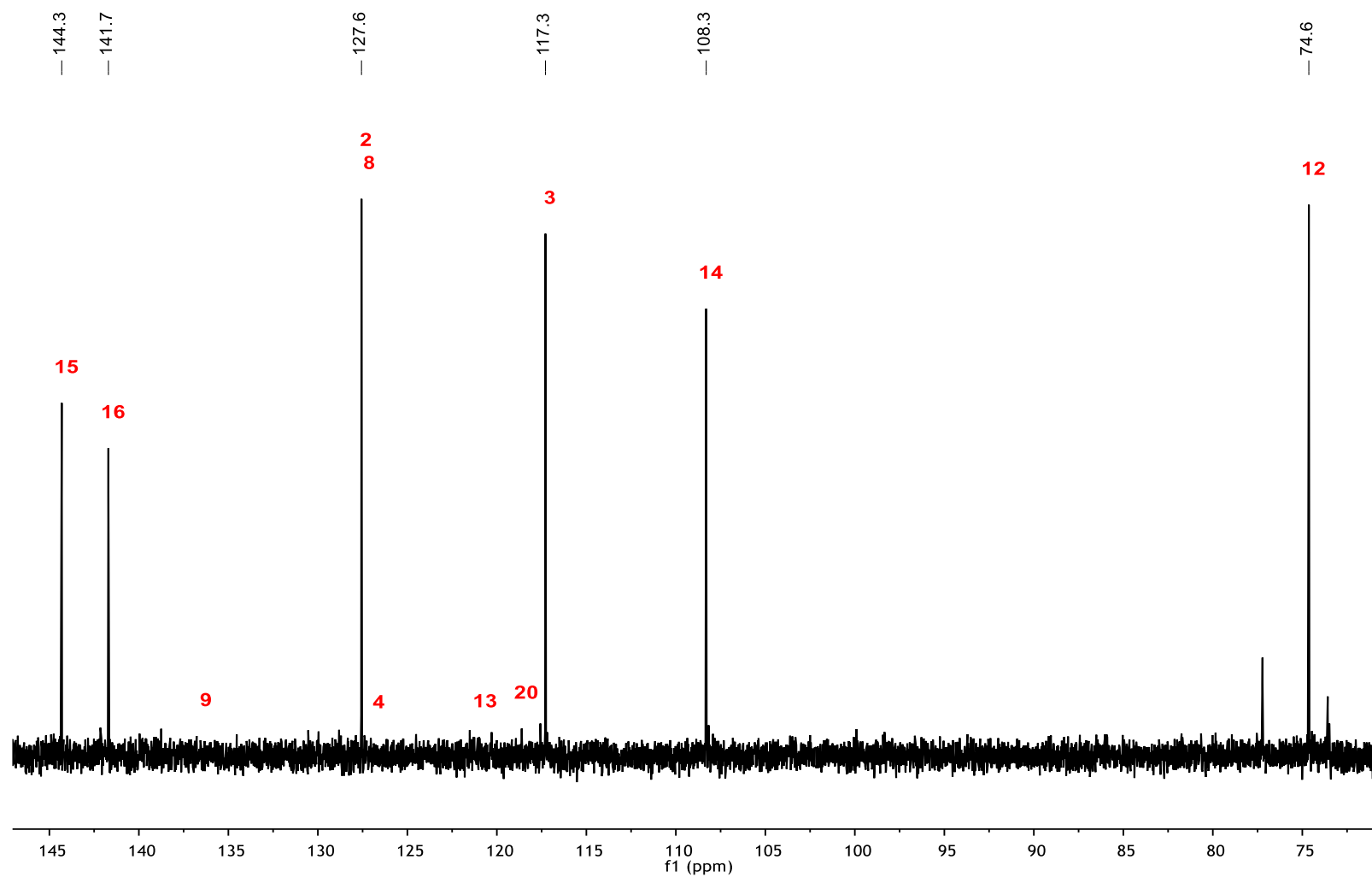
A.3.3 Espectro de ^1H RMN, 700 MHz en CDCl_3



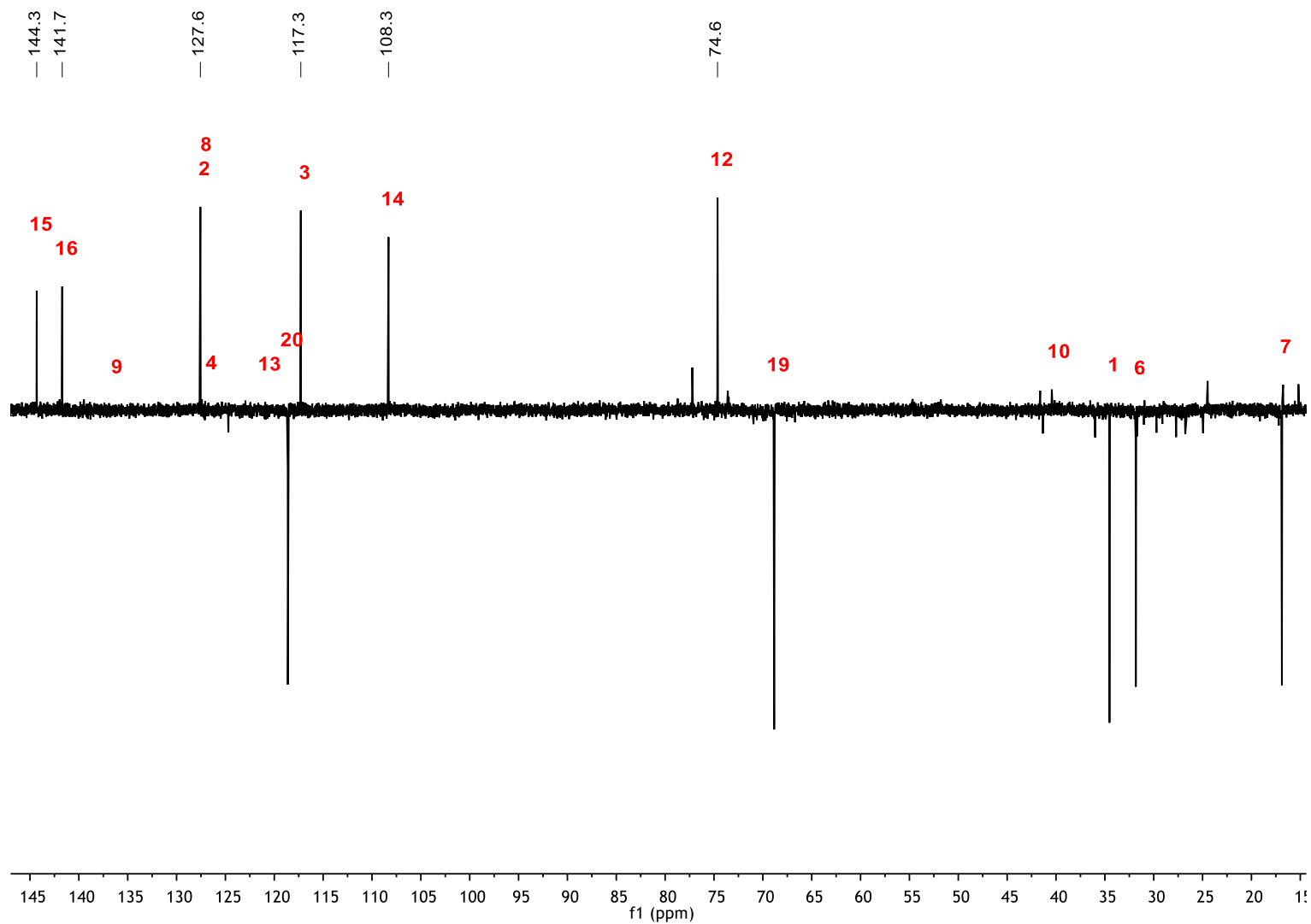
A.3.4 Espectro de ^{13}C RMN, 175 MHz en CDCl_3



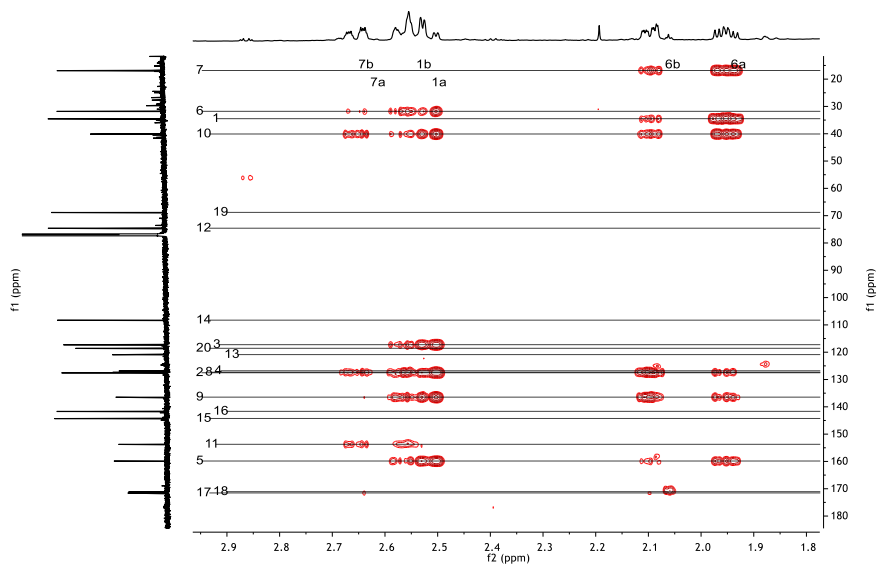
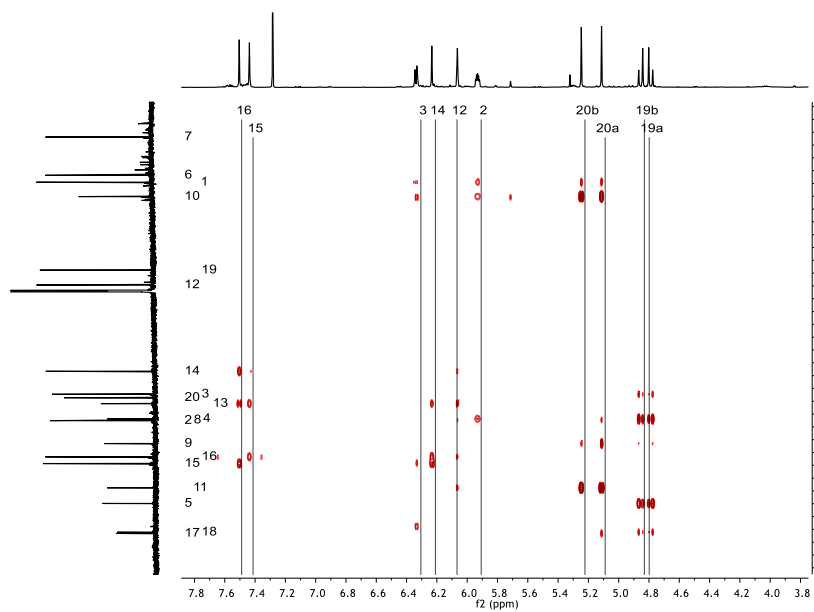
A.3.5 Espectro DEPT 90, 175 MHz en CDCl₃ del Compuesto 3



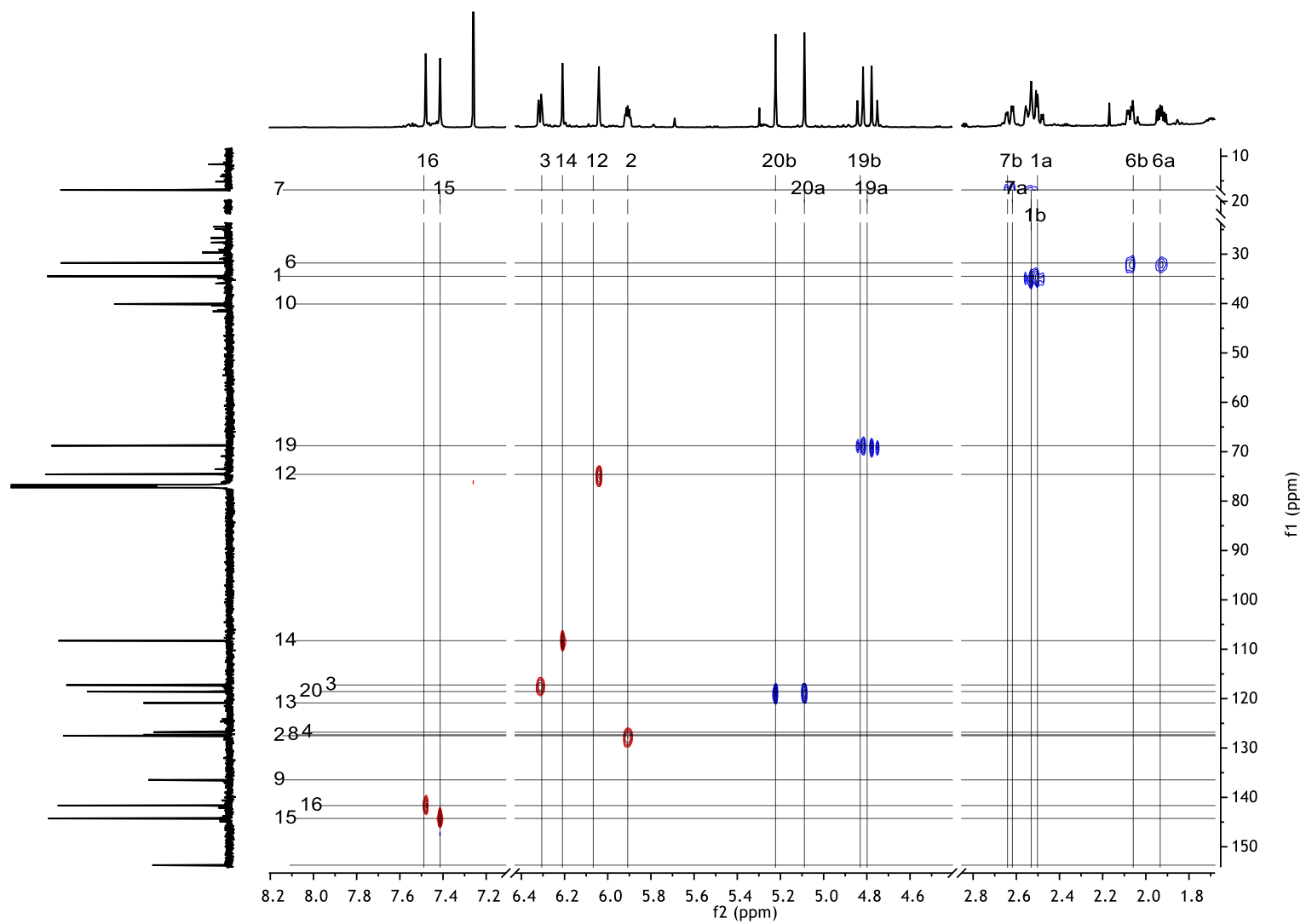
A.3.6 Espectro DEPT 135, 175 MHz en CDCl_3 del Compuesto 3



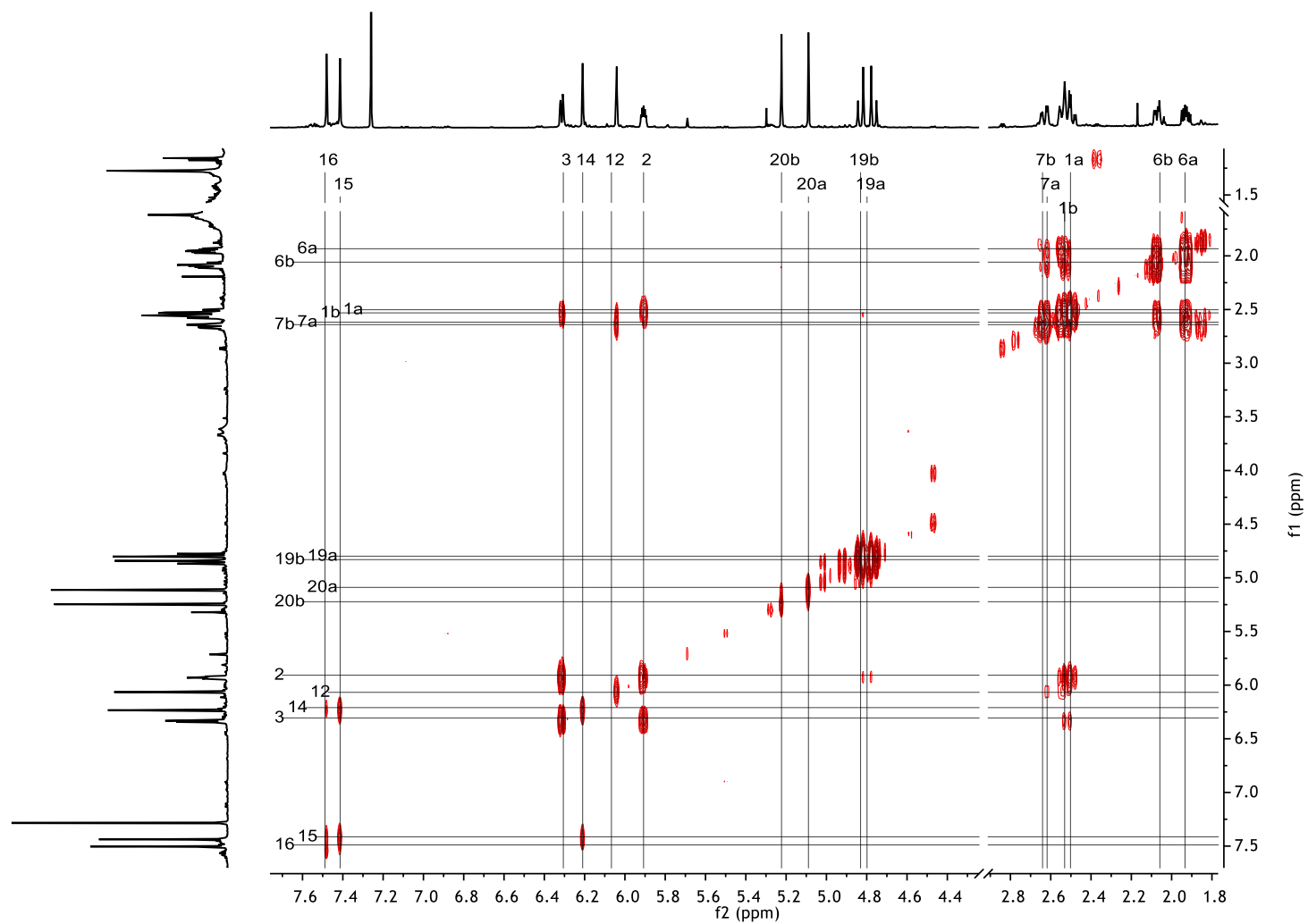
A.3.7 HMBC, 700 MHz en CDCl₃



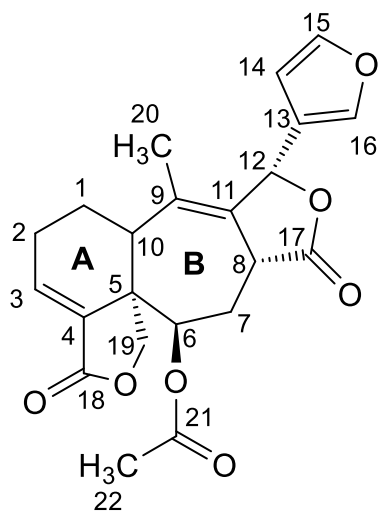
A.3.8 HSQC, 700 MHz en CDCl₃



A.3.9 COSY, 700 MHz en CDCl₃



A.4. Compuesto 4 Salvigenólida



INSTITUTO DE QUÍMICA

UNAM

Muestra: ML-Sp-T2c

Investigador: Dr. Leovigildo Quijano

Disolvente: CHCl₃

Concentración: no especificada *2.4 mg/2 mL*

Longitud de celda: 1 dm

Tiempo de integración: 5 s

$\alpha: -0.121$

$[\alpha]_D^{20} - 100.8^\circ$

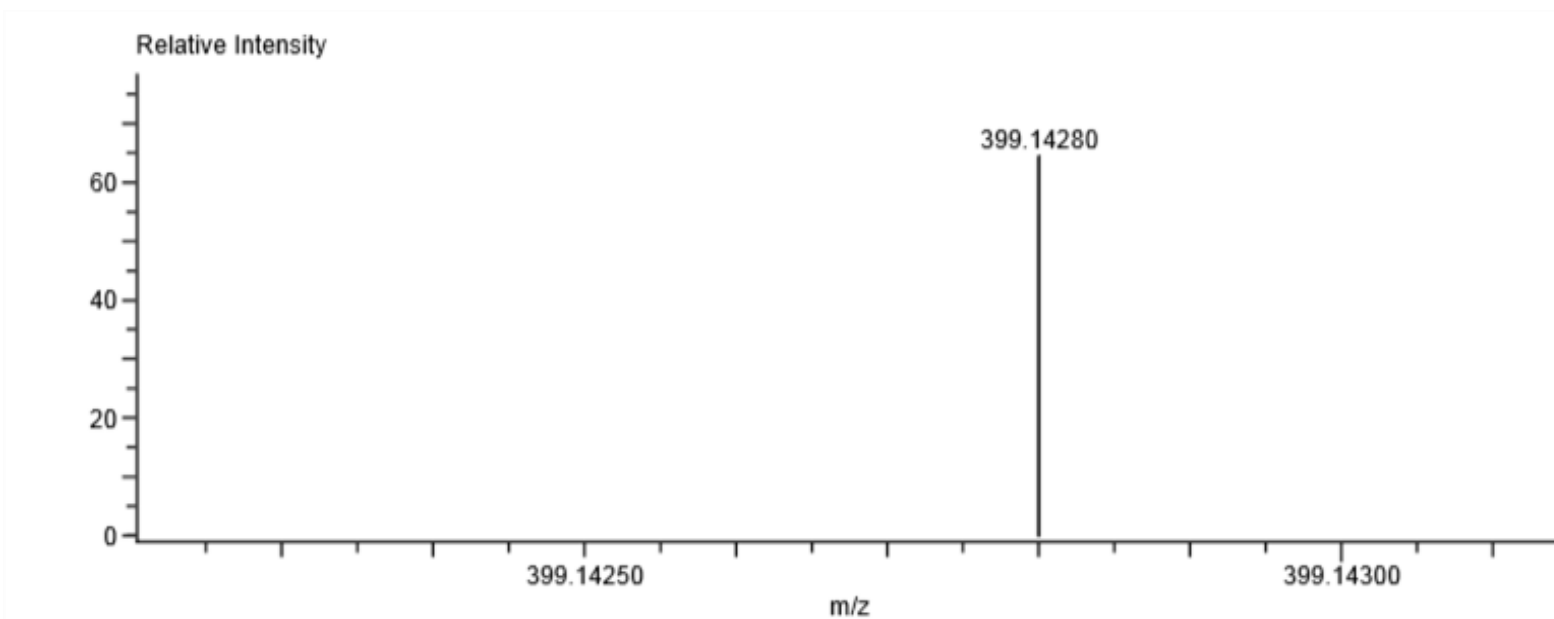
Observaciones: _____

Operador: Q. Mary Paz Orta Pérez

No. de registro: 1758

Fecha: 25-10-2017

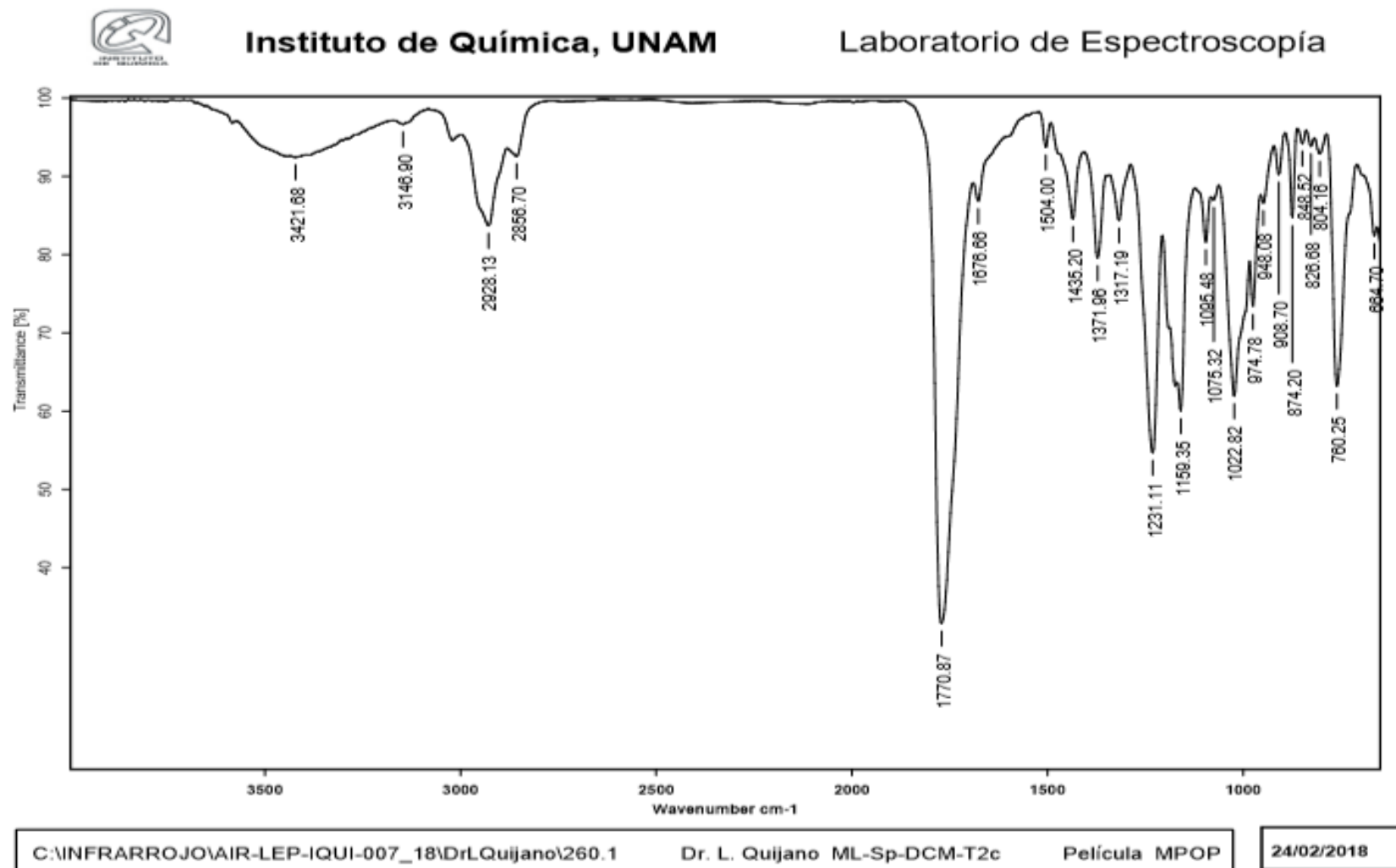
A.4.1 Espectro de Masas Salvigenólida



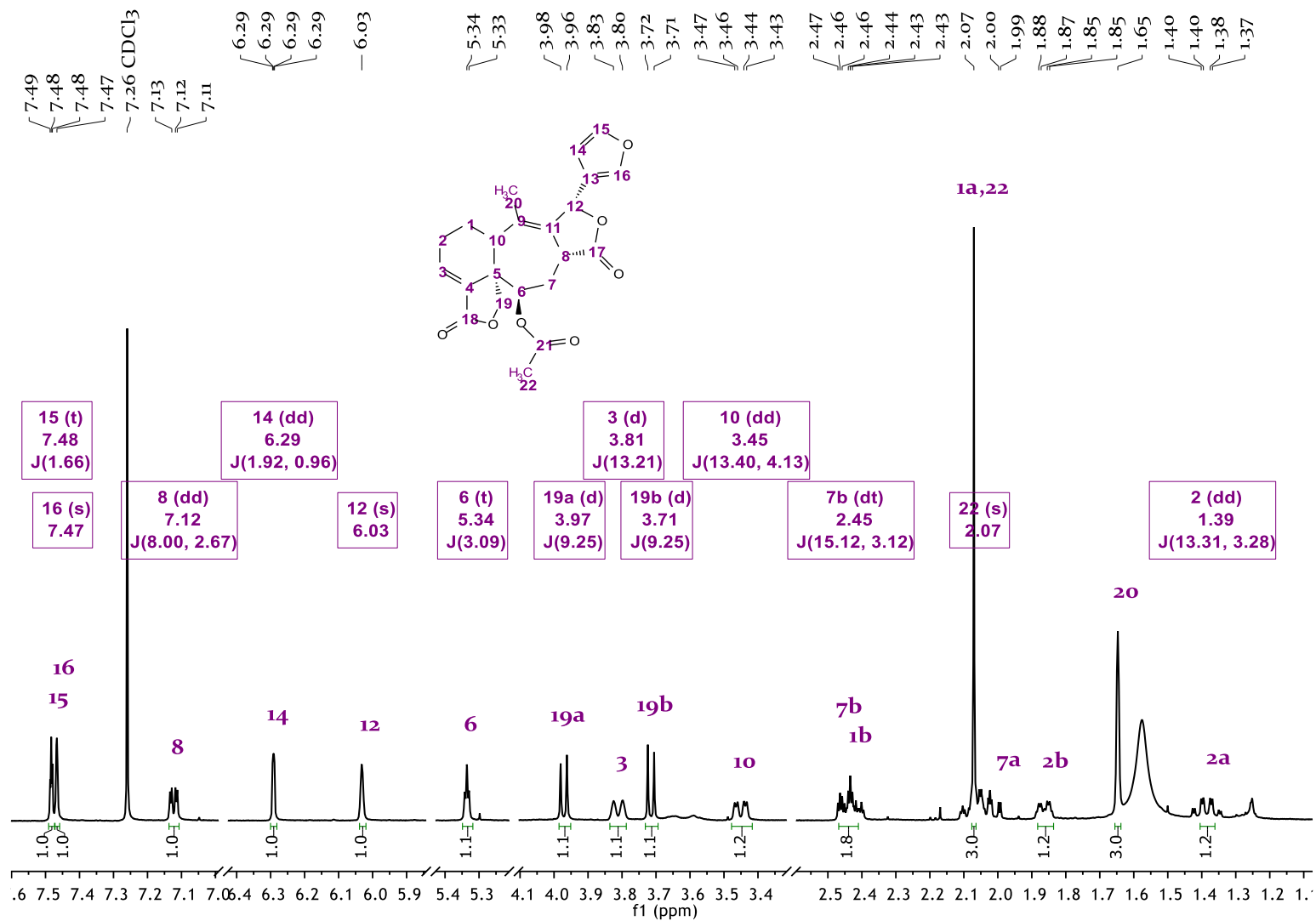
Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula
399.14280	227156.66	399.14438	-1.58	-3.95	$^{12}\text{C}_{22}^{1}\text{H}_{23}^{16}\text{O}_7$

Unsaturation Number
11.5

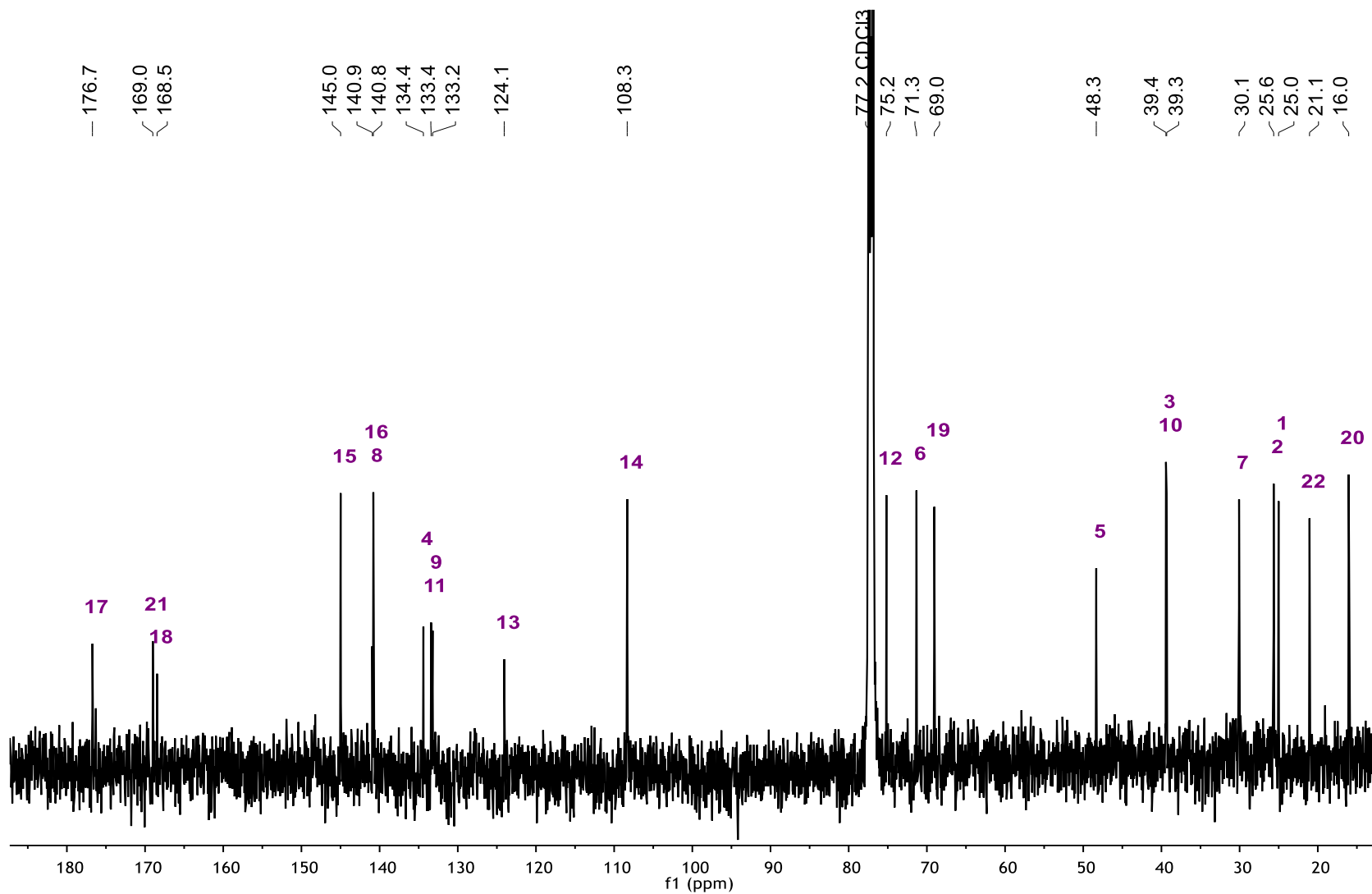
A.4.2 Espectro de Infrarrojo Salvigenólida



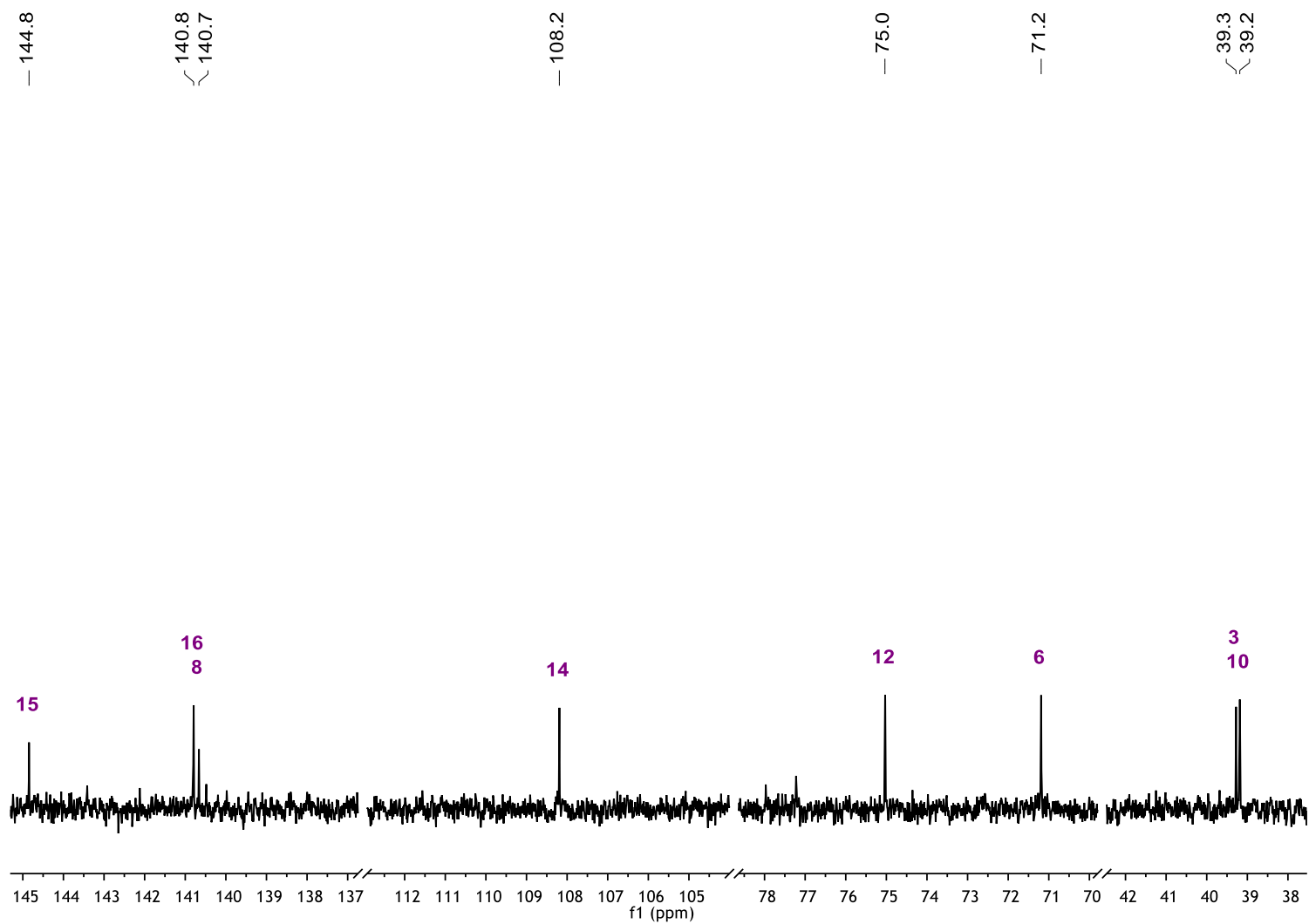
A.4.3 Espectro de ^1H RMN, 500 MHz en CDCl_3



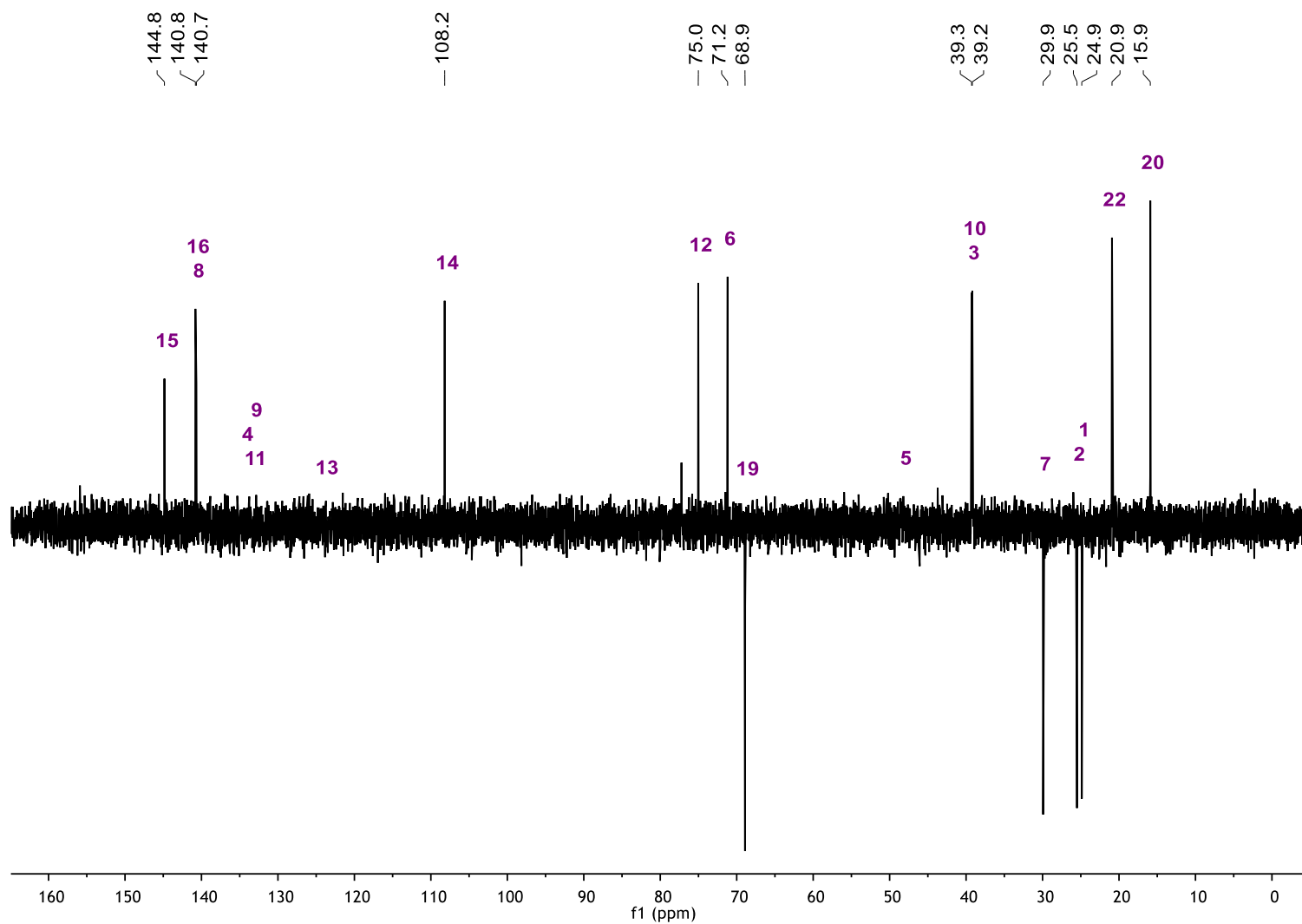
A.4.4 Espectro de ^{13}C RMN, 125 MHz en CDCl_3



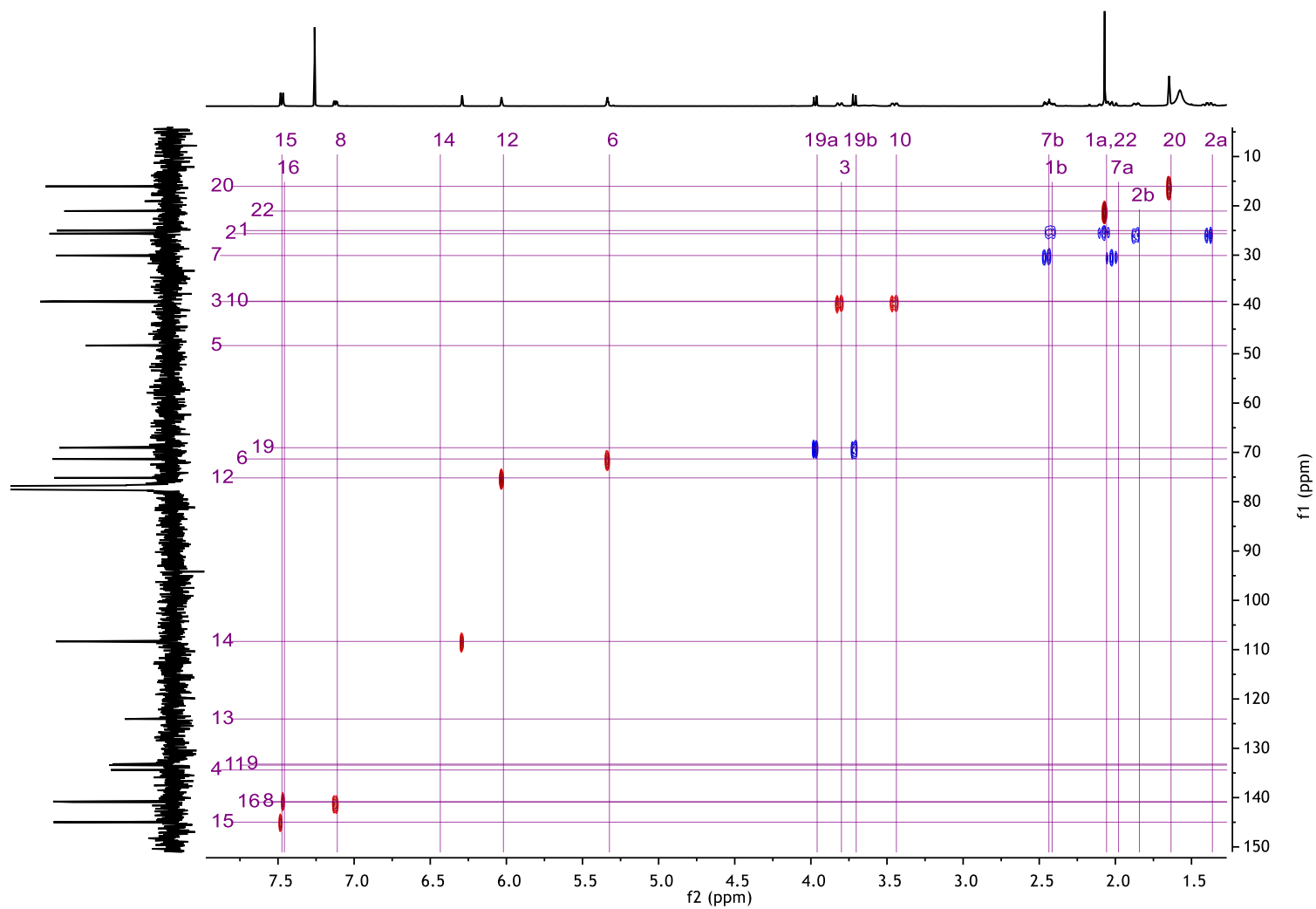
A.4.5 Espectro DEPT 90, 125 MHz en CDCl₃ del Compuesto 4



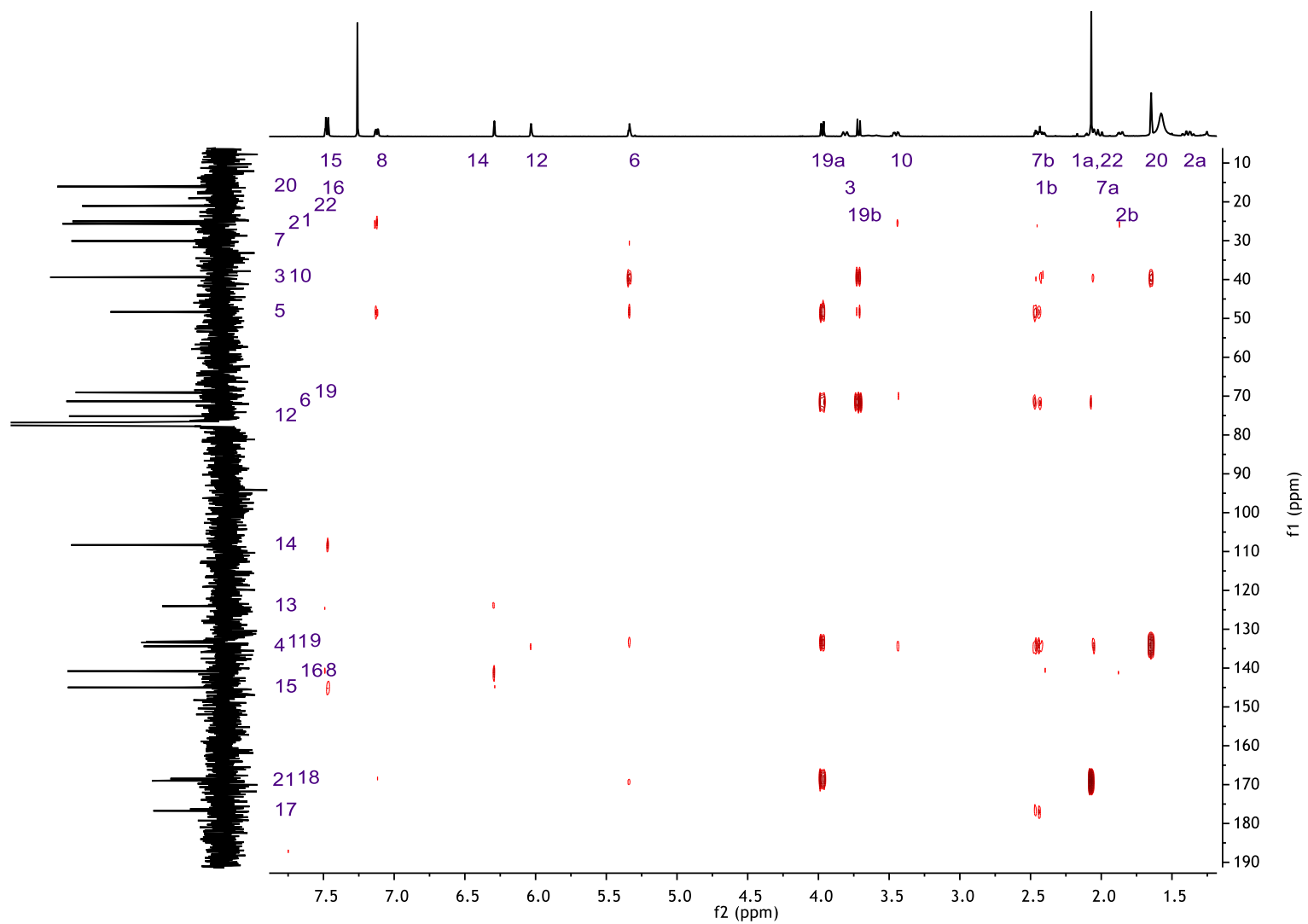
A.4.6 Espectro DEPT 135, 125 MHz en CDCl_3 del Compuesto 4



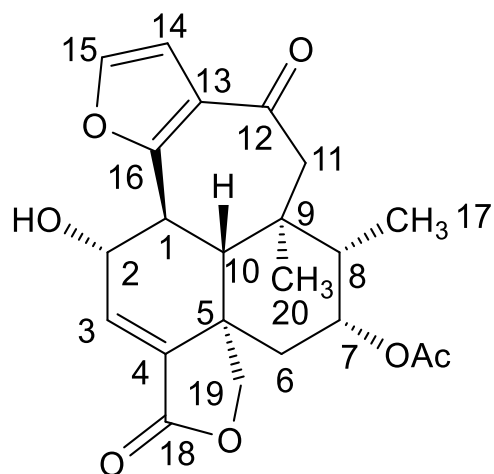
A.4.7 HSQC, 500 MHz en CDCl₃



A.4.8 HMBC, 500 MHz en CDCl₃



A.5. Compuesto 5 Salvisousólida



INSTITUTO DE QUÍMICA

UNAM

Muestra: ML-KY-11

Investigador: Dr. L. Quijano

Disolvente: CHCl₃

Concentración: 1 mg/mL

Longitud de celda: 1 dm

α : -0.419

Tiempo de integración: 5 s

Observaciones: _____

Operador: Eréndira García

No. de registro: 1614

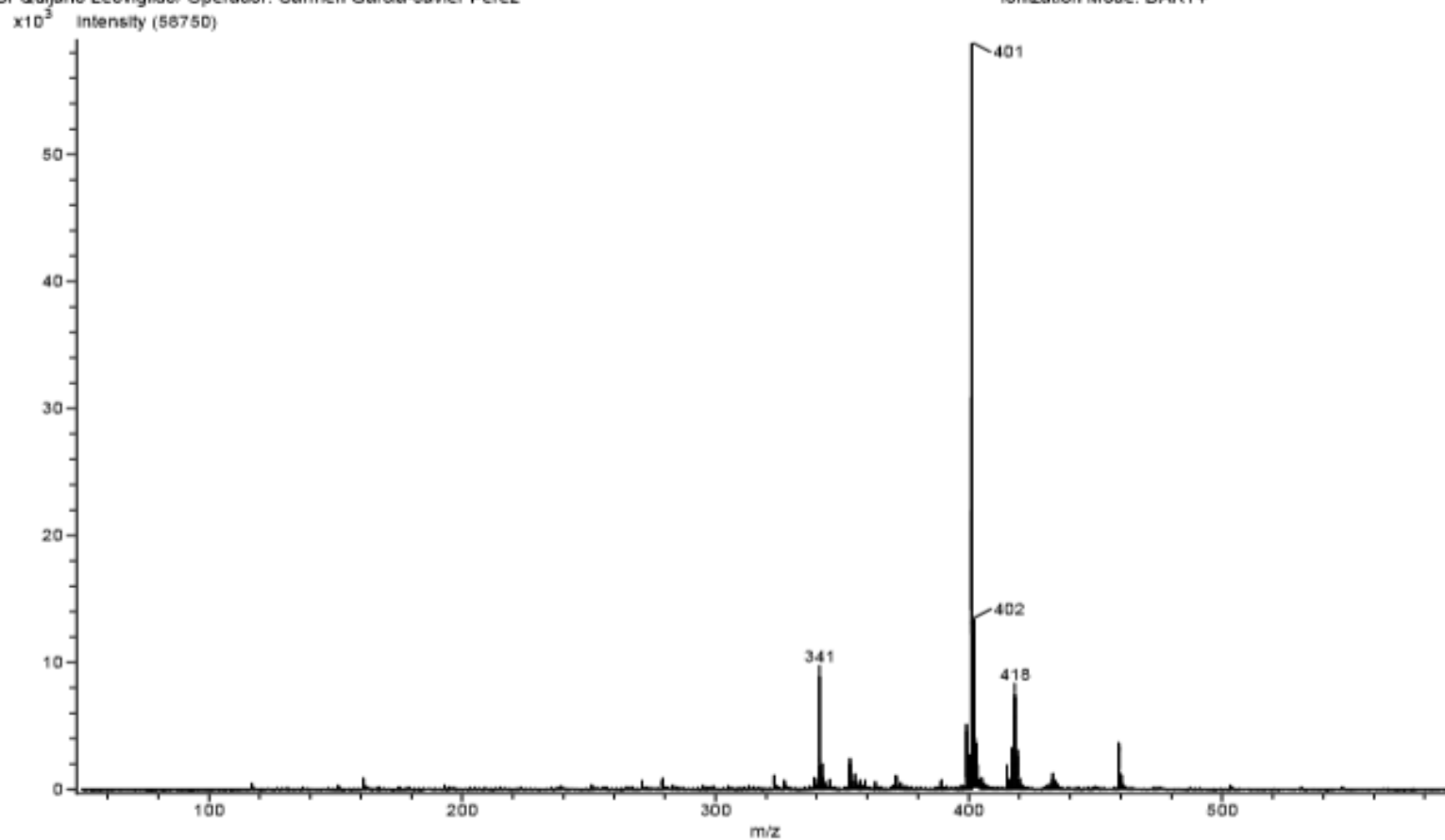
Fecha: 04-10-2017

A.5.1 Espectro de Masas Salvisousólida

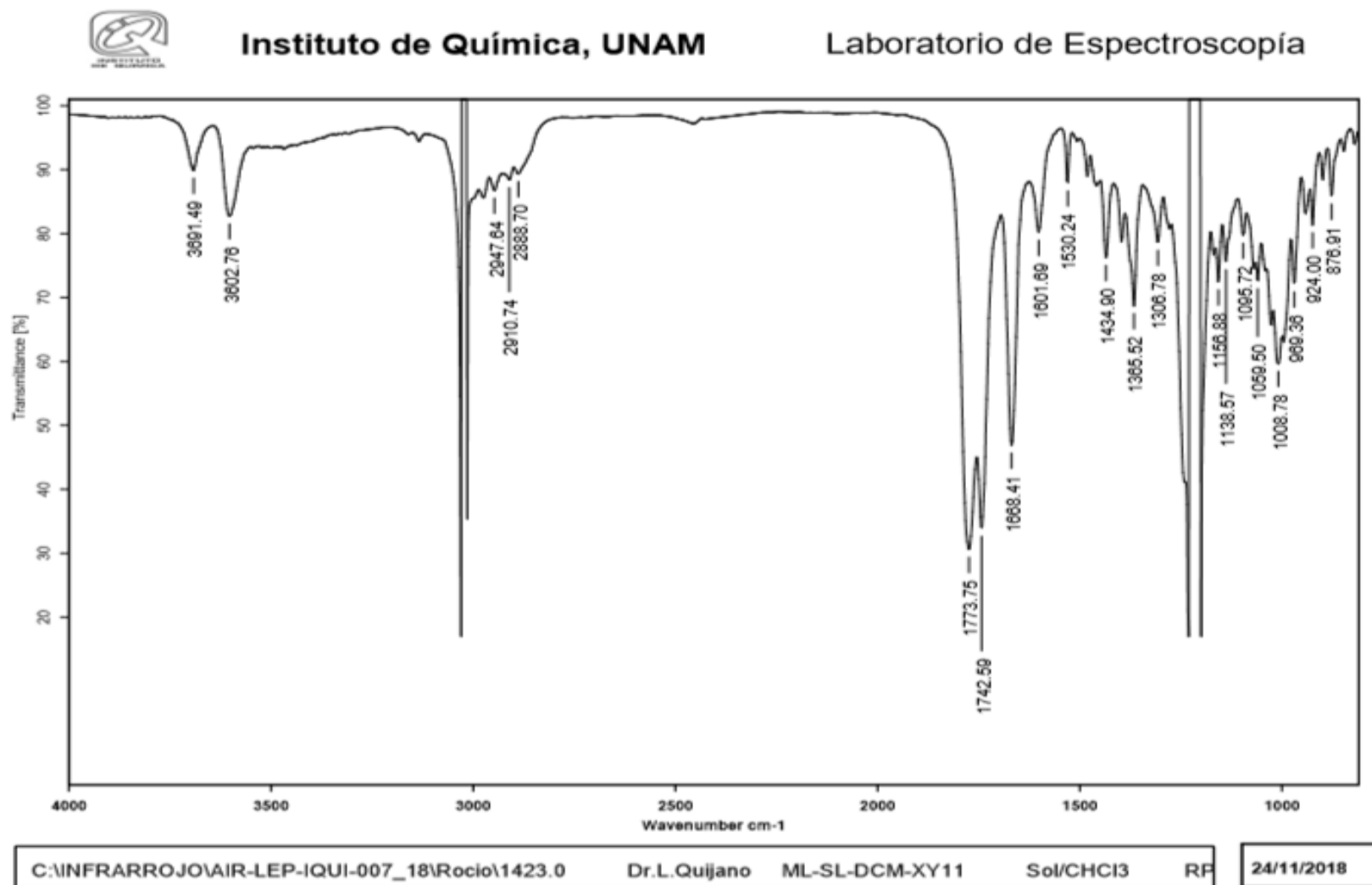
INSTITUTO DE QUIMICA, UNAM
LABORATORIO DE ESPECTROMETRIA DE MASAS

Acq. Data Name: 2513 ML-SL-DCM-XY11
Creation Parameters: Average(MS[1] Time:1..1)
Dr Quijano Leovigildo/ Operador: Carmen Garcia-Javier Perez

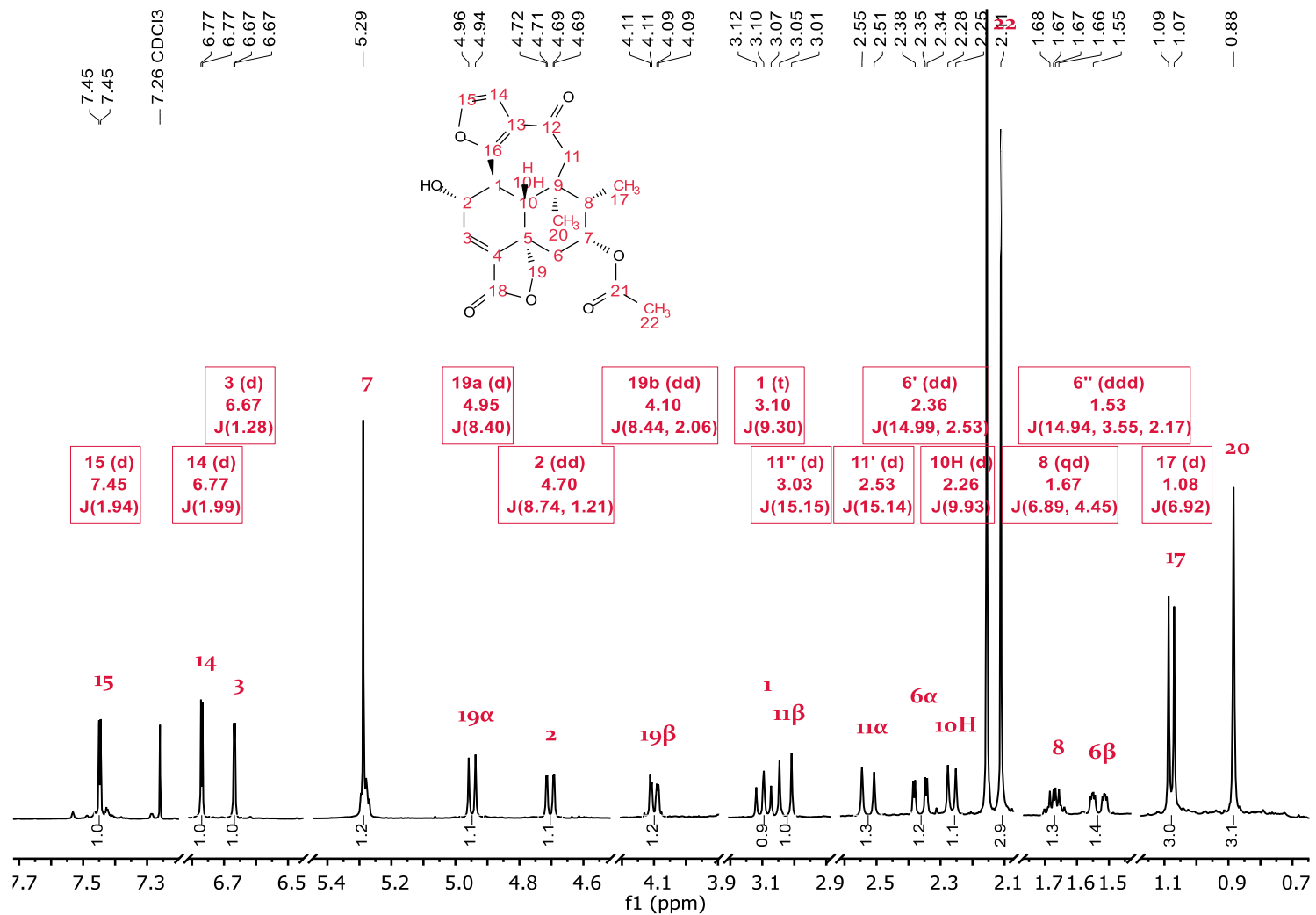
Experiment Date/Time: 11/22/2018 2:20:08 PM
Instrument : JEOL The AccuTOF : JMS-T100LC
ionization Mode: DART+



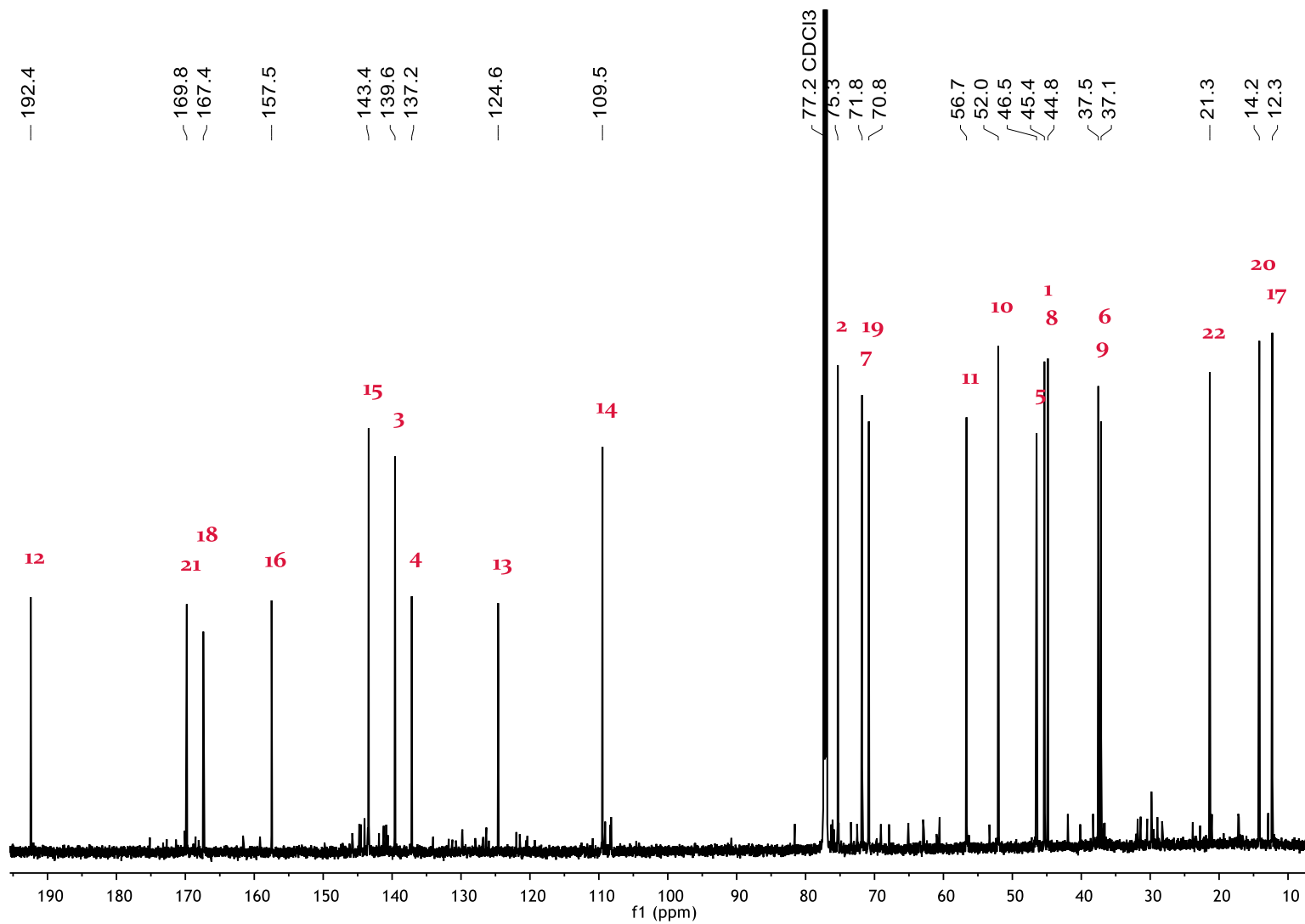
A.5.2 Espectro de Infrarrojo Salvisousólida



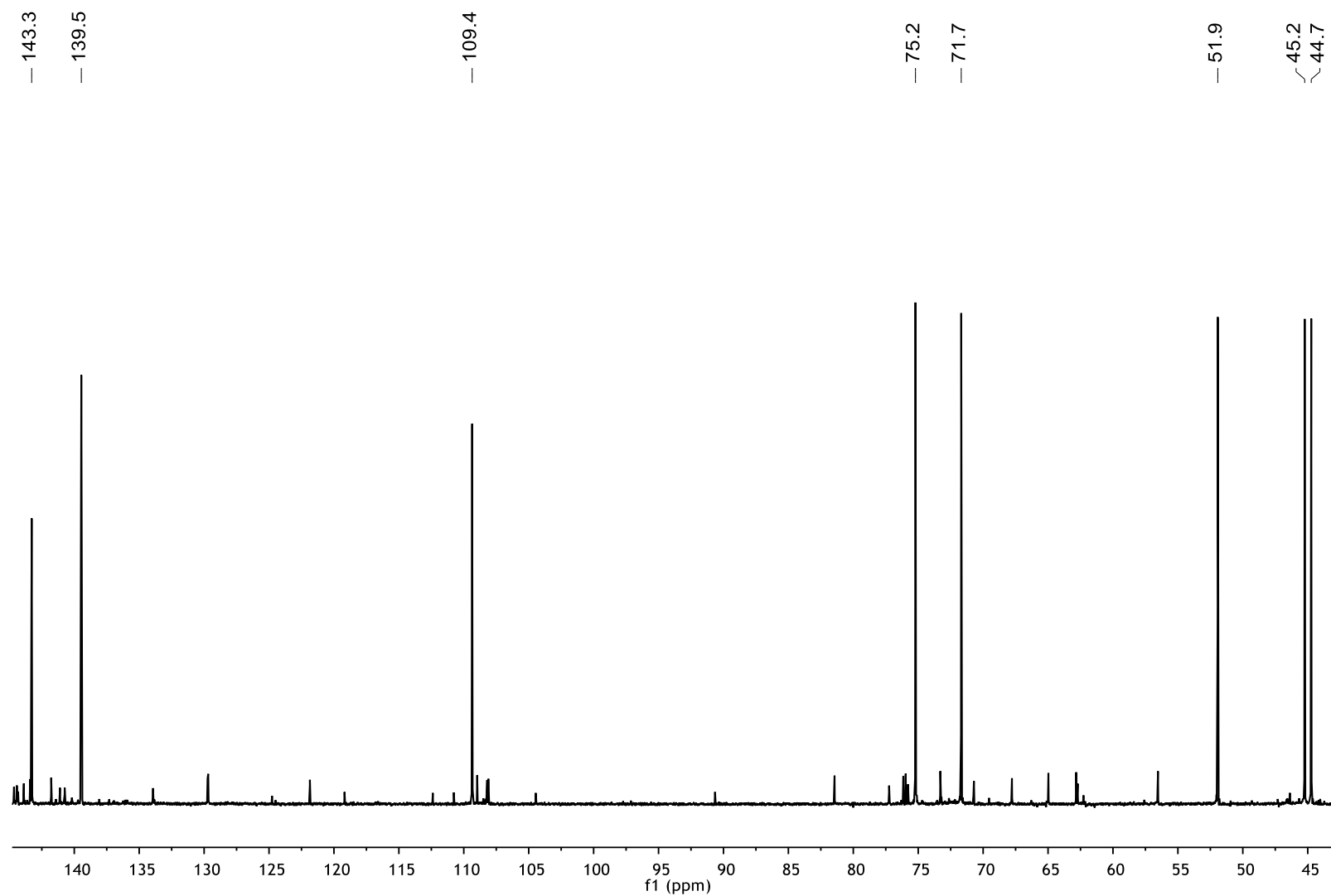
A.5.3 Espectro de ^1H RMN, 400 MHz en CDCl_3



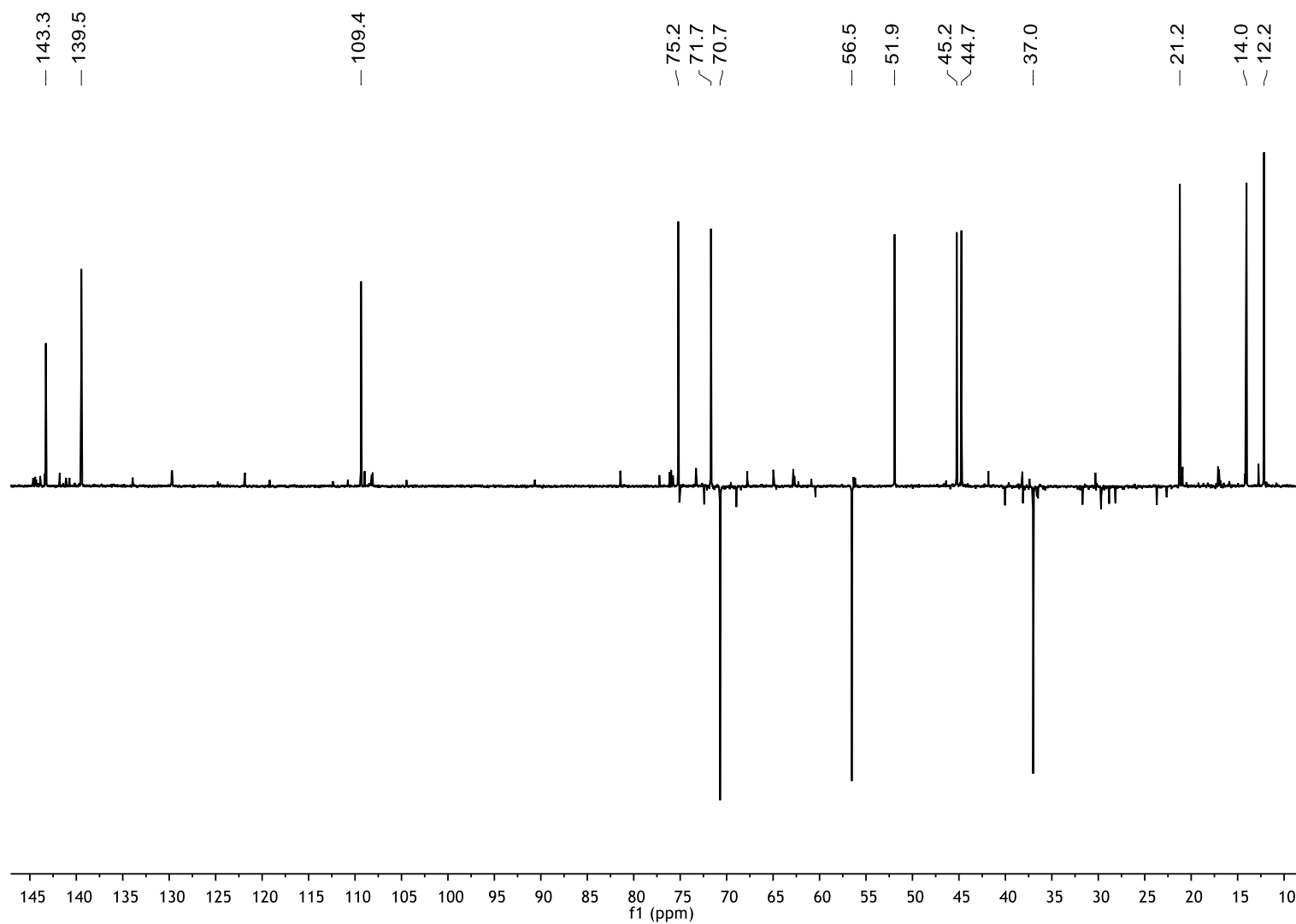
A.5.4 Espectro de ^{13}C RMN, 100 MHz en CDCl_3



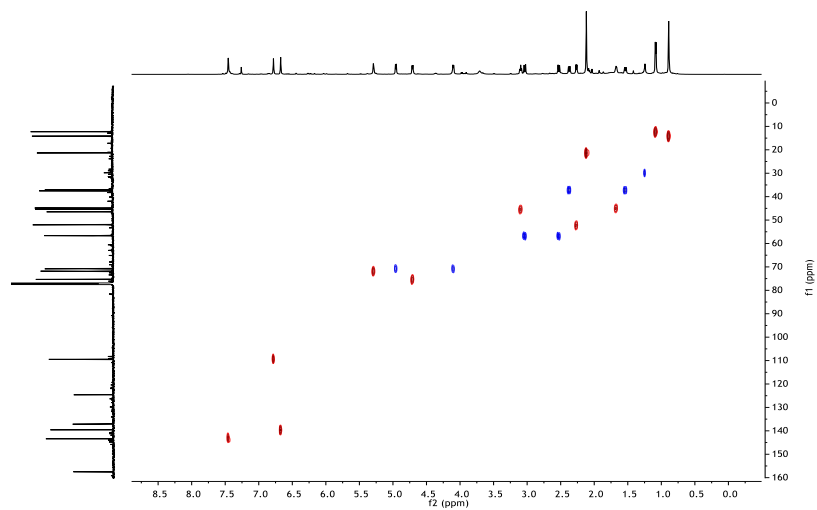
A.5.5 Espectro DEPT 90, 100 MHz en CDCl₃



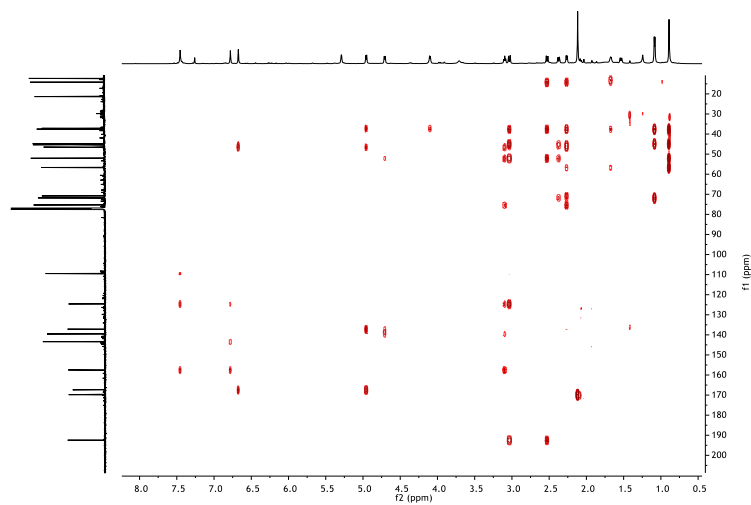
A.5.6 Espectro DEPT 135, 100 MHz en CDCl₃



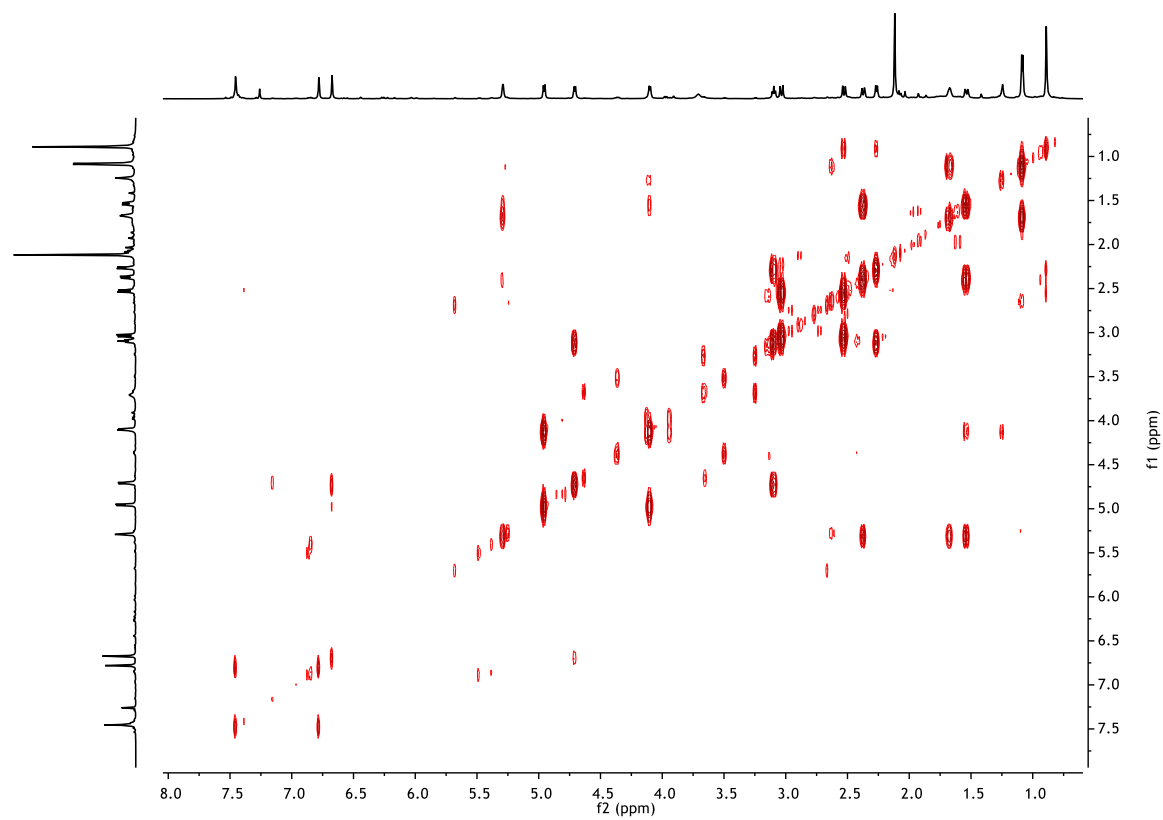
A.5.7 HSQC, 400 MHz en CDCl₃



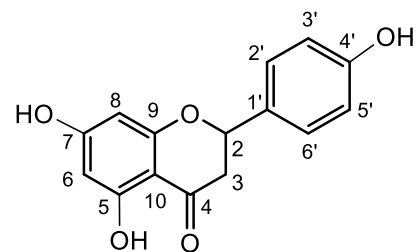
A.5.8 HMBC, 400 MHz en CDCl₃



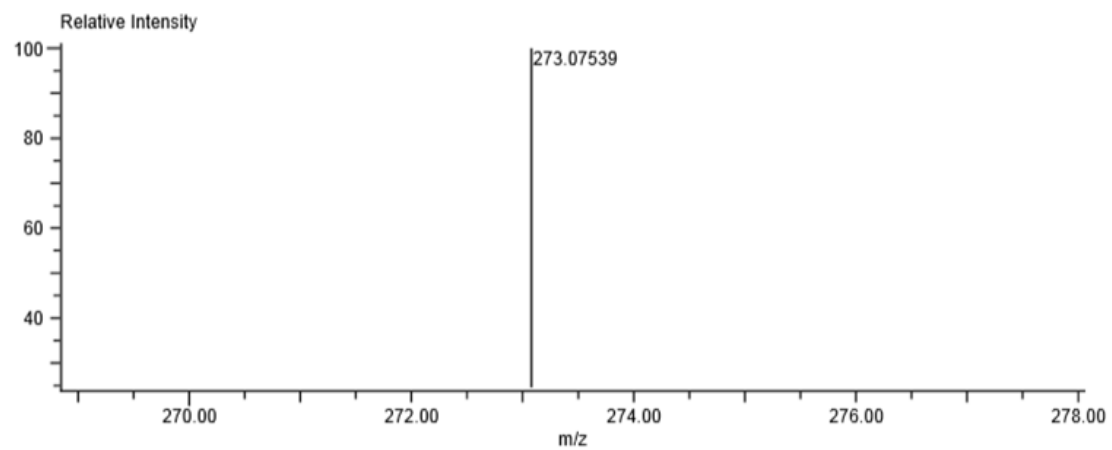
A.5.9 COSY, 400 MHz en CDCl₃



A.6. Compuesto 6 Naringenina

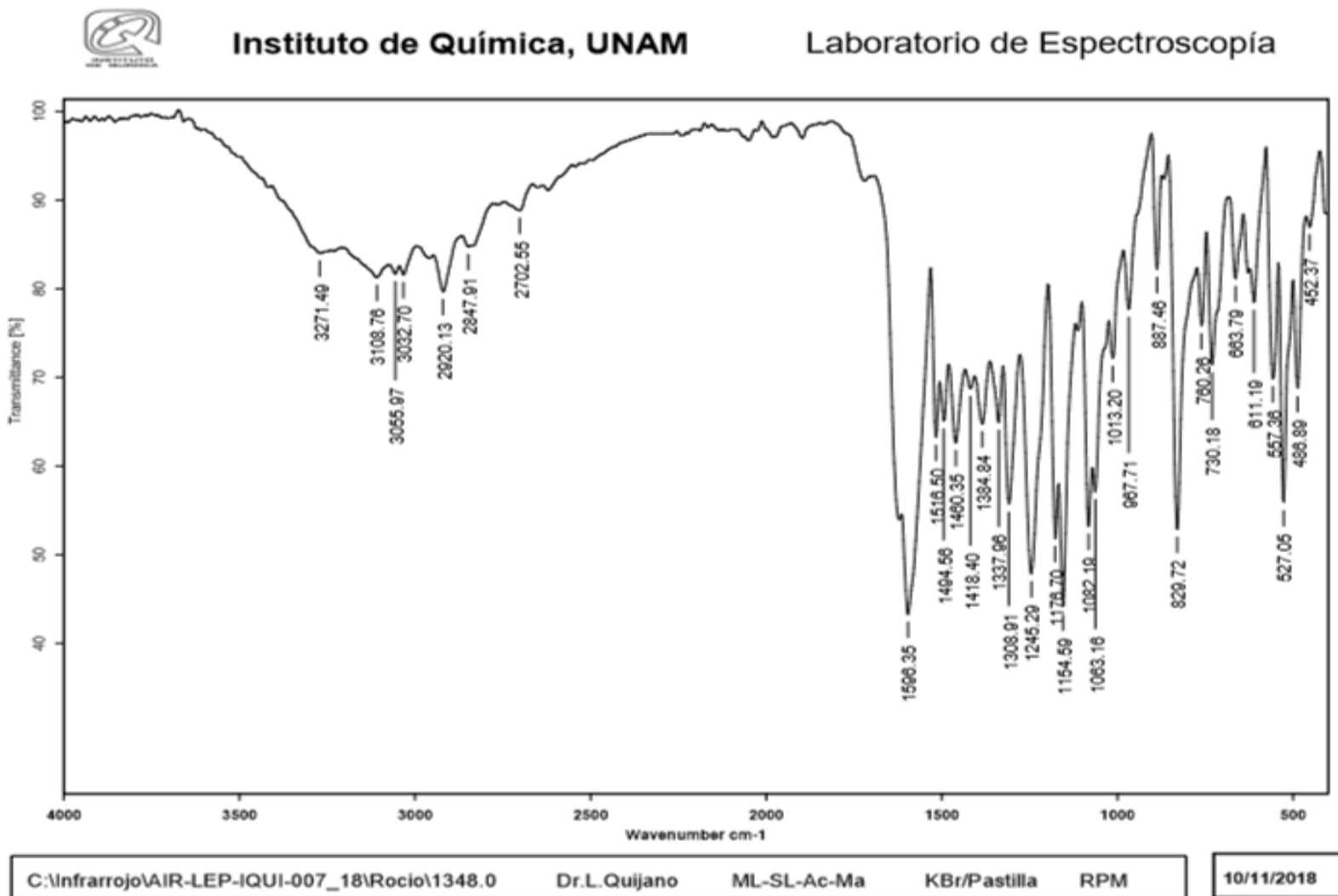


A.6.1 Espectro de Masas Naringenina

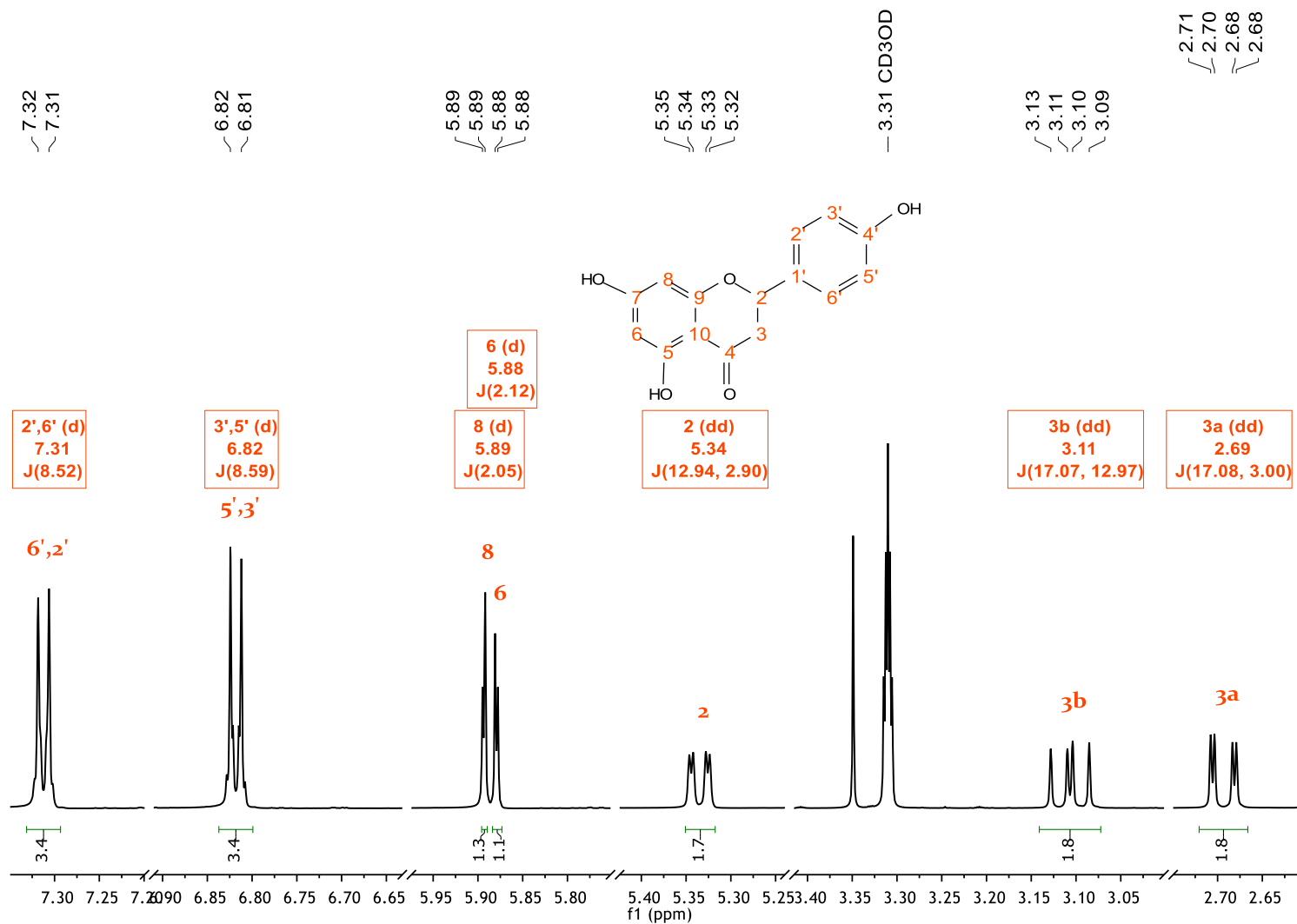


Mass	Intensity	Calc. Mass	Mass Difference (mmu)	Mass Difference (ppm)	Possible Formula	Unsaturation Number
273.07539	529514.90	273.07630	-0.91	-3.34	$^{12}\text{C}_{15}\text{H}_{13}\text{O}_5$	9.5

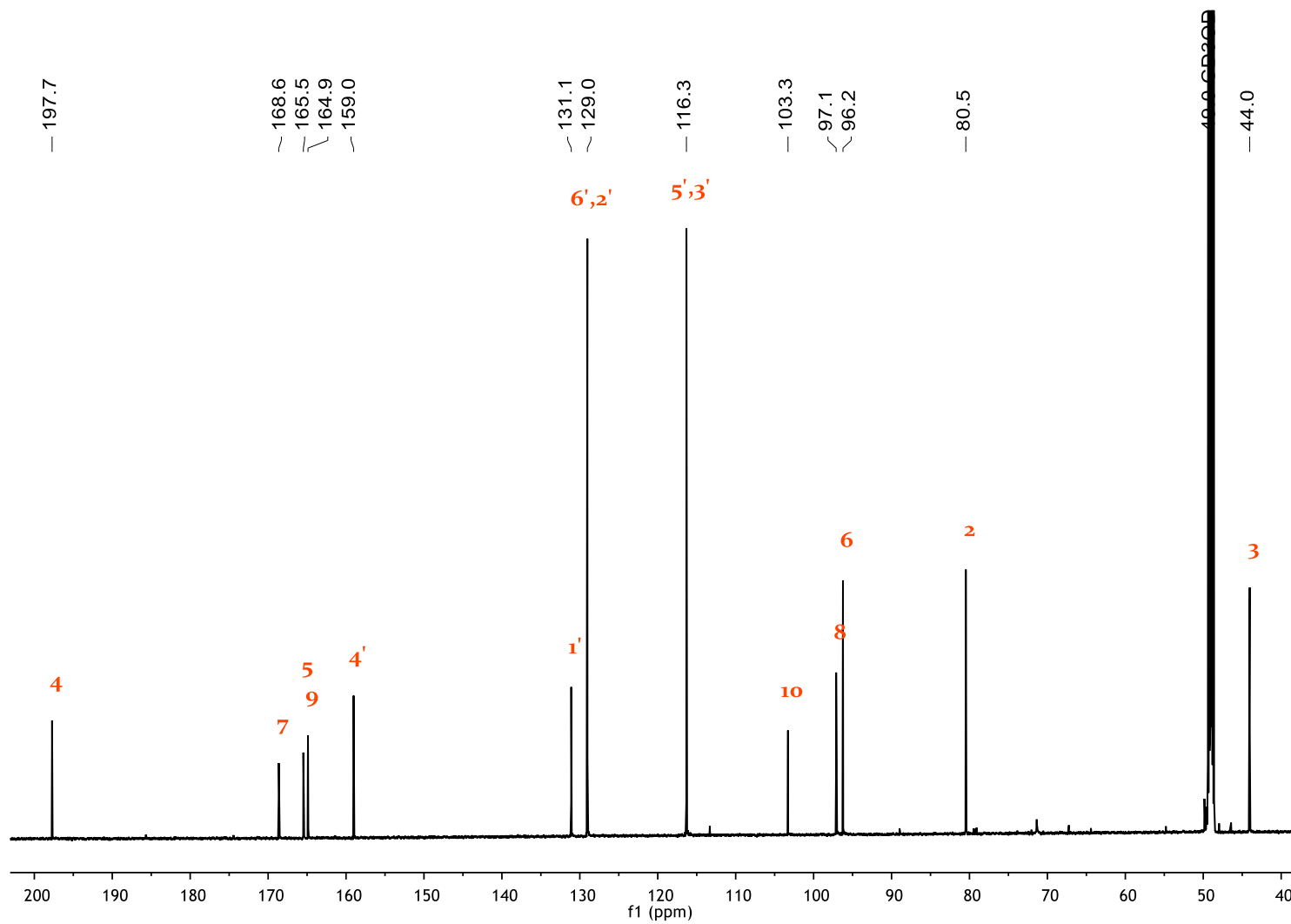
A.6.2 Espectro de Infrarrojo Naringenina



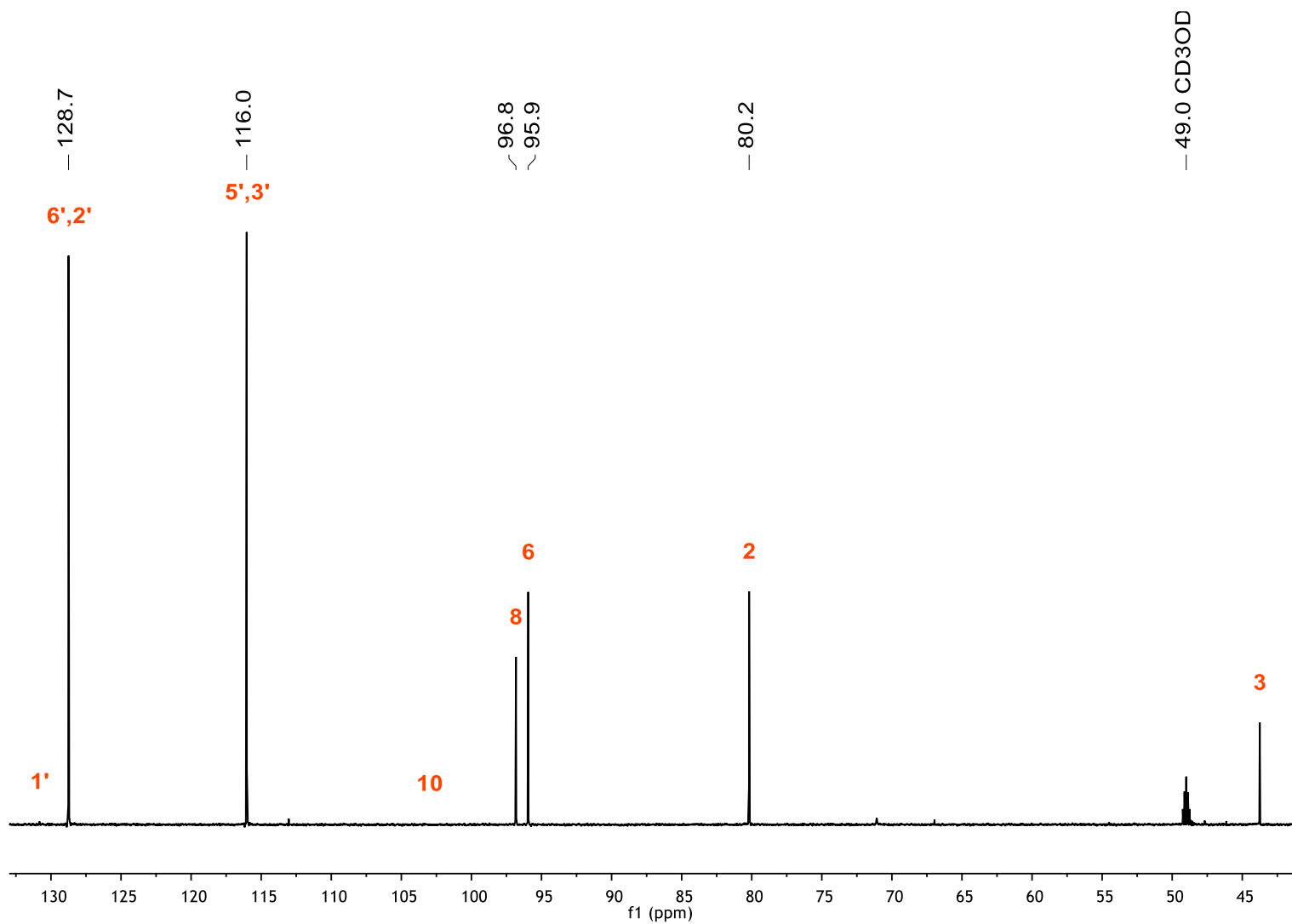
A.6.3 Espectro de ^1H RMN, 700 MHz en CD_3OD



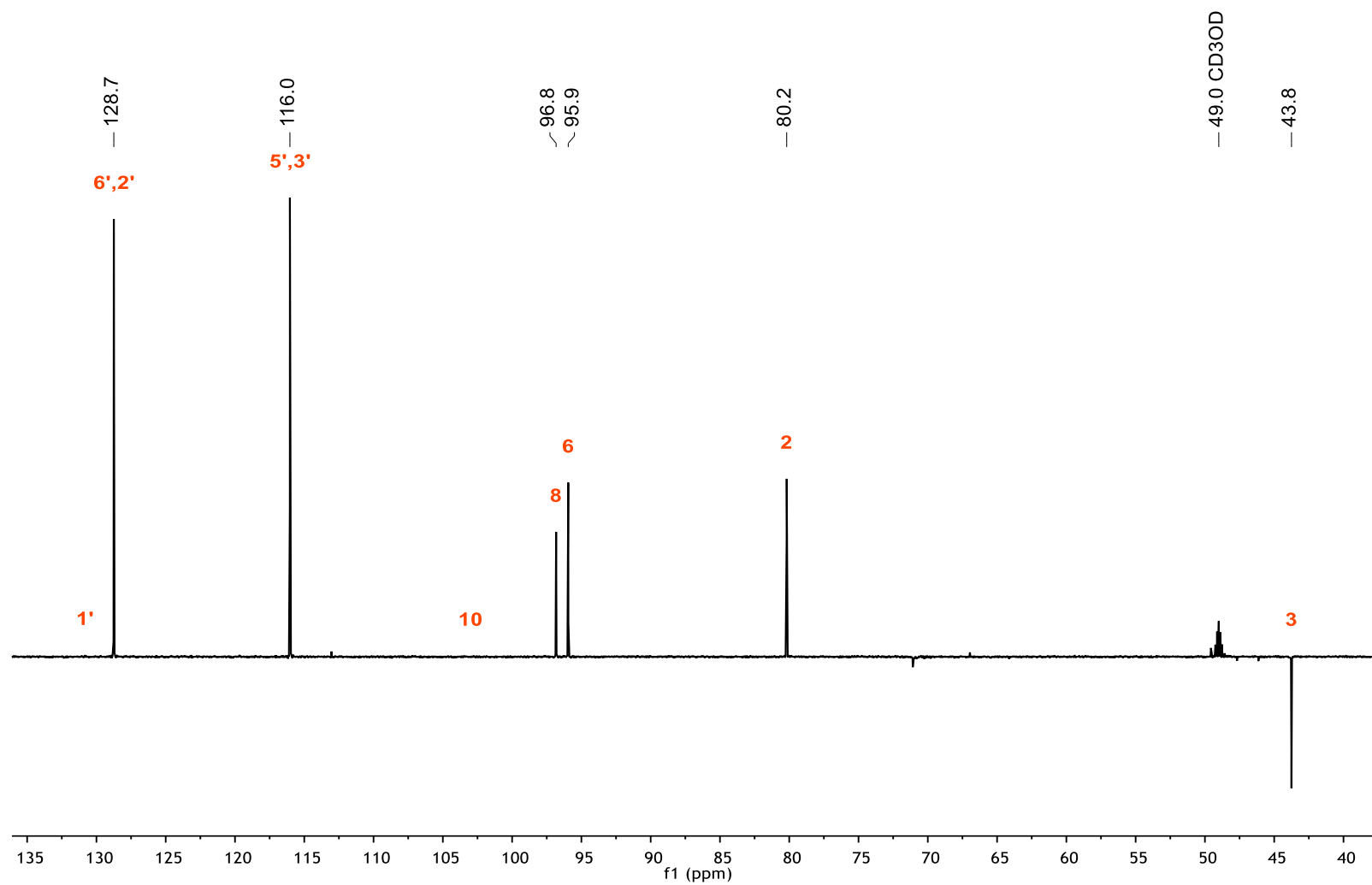
A.6.4 Espectro de ^{13}C RMN, 175 MHz en CD_3OD



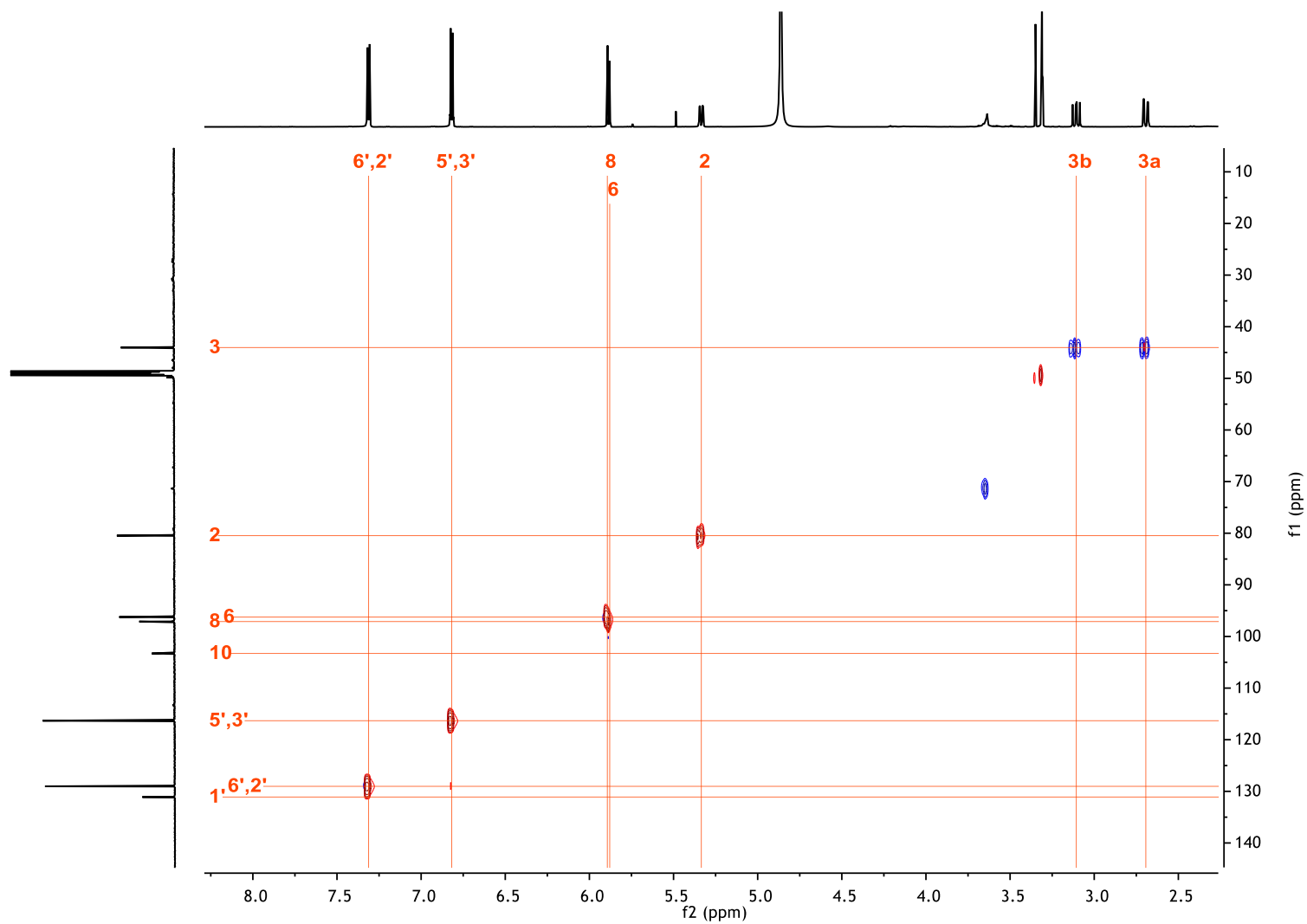
A.6.5 Espectro DEPT 90, 175 MHz en CD₃OD



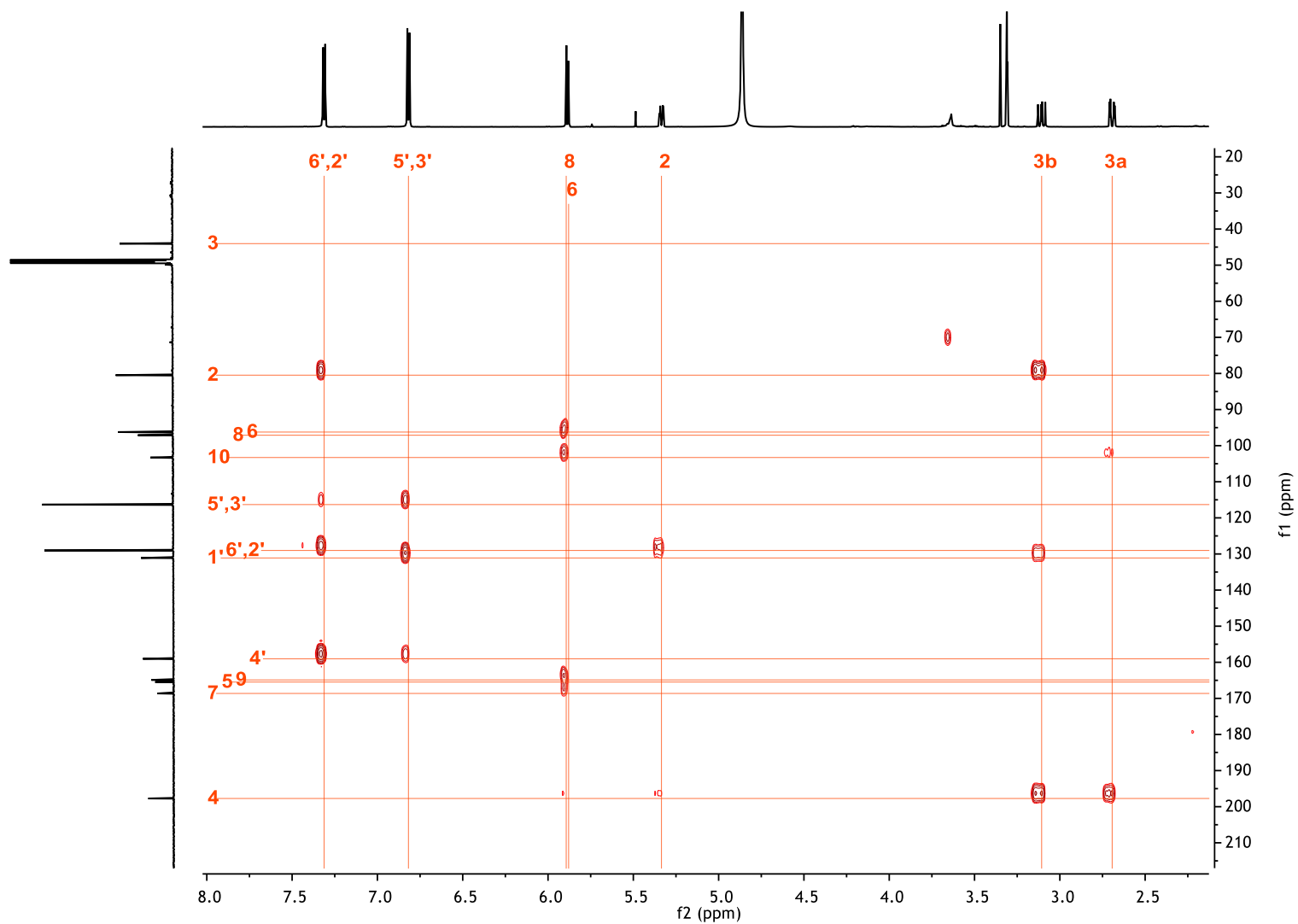
A.6.6 Espectro DEPT 135, 175 MHz en CD₃OD



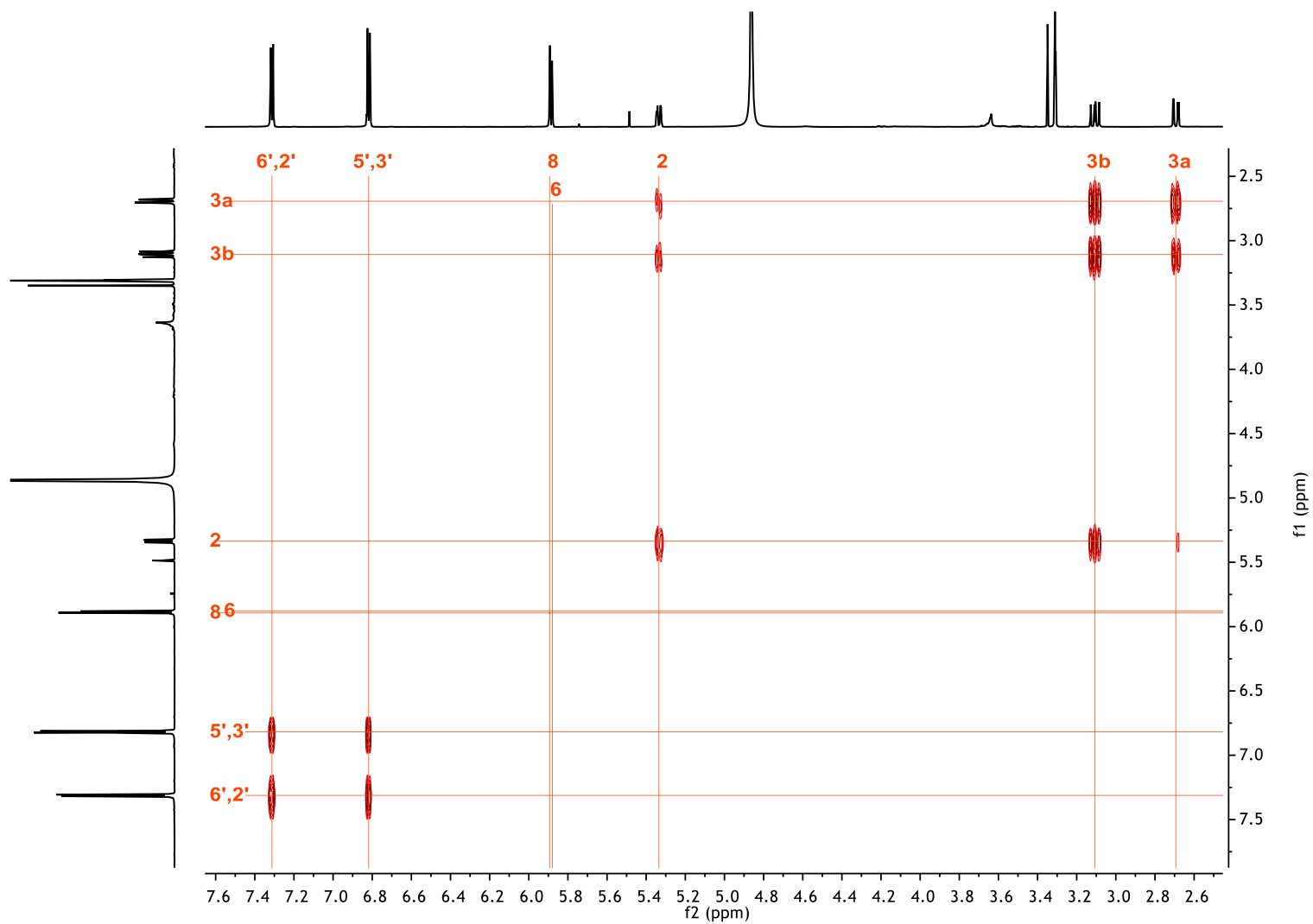
A.6.7 HSQC, 700 MHz en CD₃OD



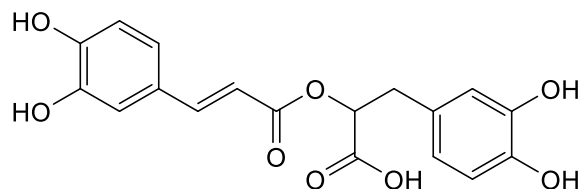
A.6.8 HMBC, 700 MHz en CD₃OD



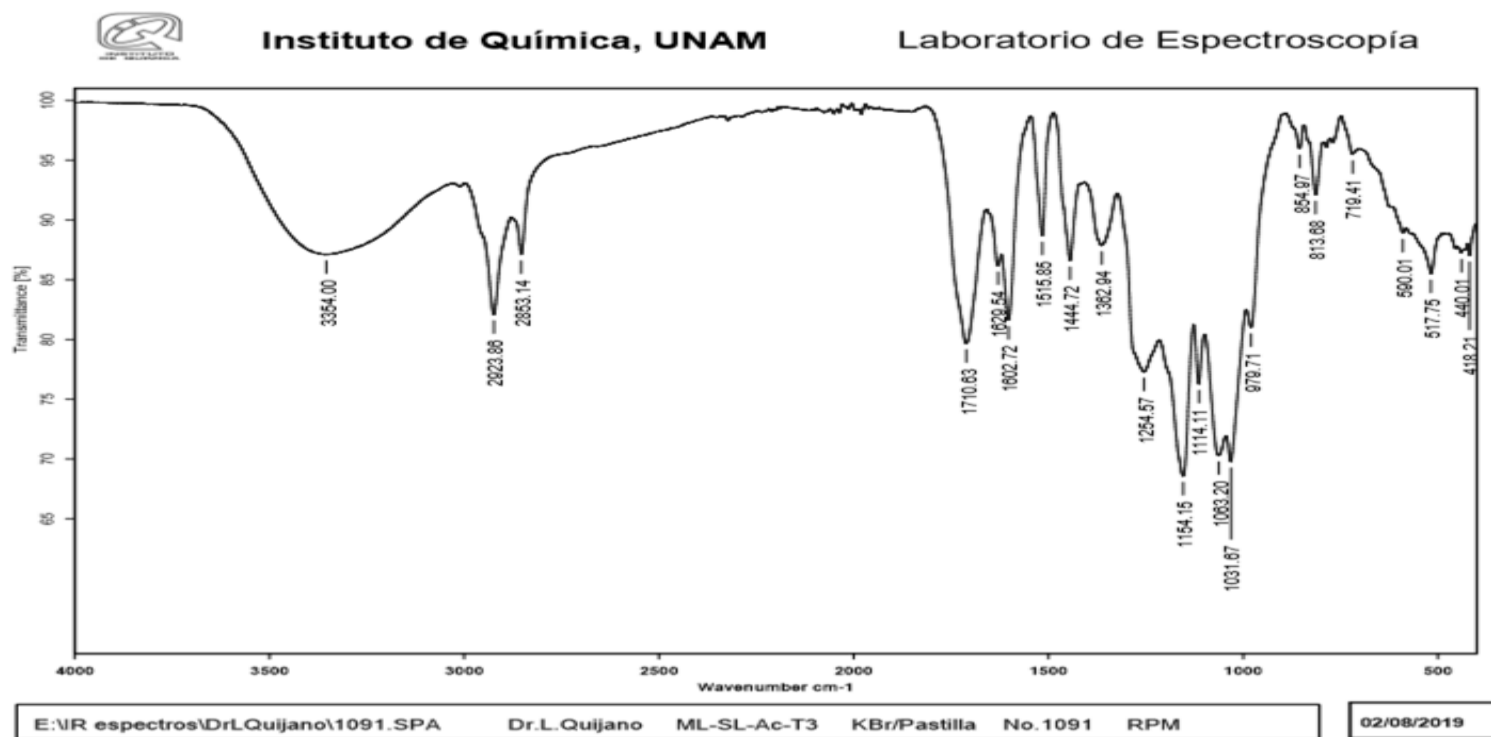
A.6.9 COSY, 700 MHz en CD₃OD



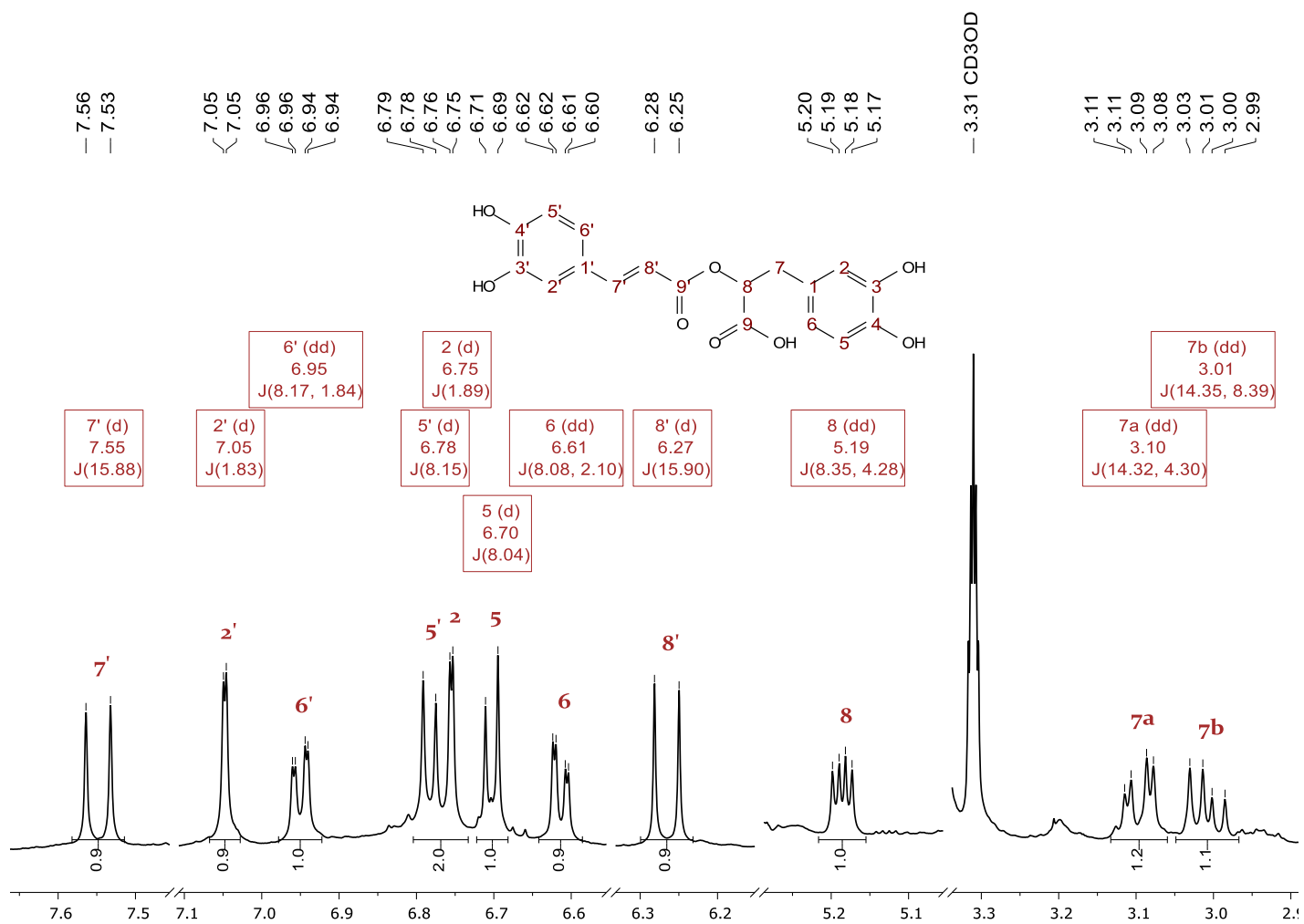
A.7. Compuesto 7 Ácido Rosmarínico



A.7.1 Espectro de Infrarrojo Ácido Rosmarínico



A.7.2 Espectro de ^1H RMN 500 MHz en CD_3OD



A.7.3 Espectro de ^{13}C RMN, 125 MHz en CD_3OD

