



---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ESTUDIO DEL PERFIL DE COMPUESTOS  
BIOLÓGICAMENTE ACTIVOS EN SALVIAS NATIVAS  
DE MÉXICO**

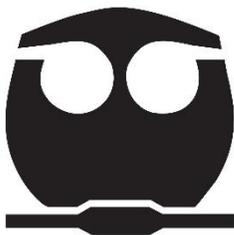
**T E S I S**

**Que para obtener el título de  
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

**Presenta**

**ELIZABETH ANACLETO CAAMAÑO**

**Asesor. Arturo Navarro Ocaña**



**CDMX**

**2020**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: Marcos Francisco Baez Fernández

**VOCAL:** Profesor: Navarro Ocaña Arturo

**SECRETARIO:** Profesor: Ruiz Terán Francisco

**1ER. SUPLENTE:** Profesor: Pineda Loperana Jazmín

**2° SUPLENTE:** Profesor: Camacho Lara Michelle Monserrath

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:** Departamento de Biotecnología y Alimentos, Facultad de Química, UNAM, Conjunto E, Laboratorio 321.

**ASESOR DEL TEMA:** Dr. Navarro Ocaña Arturo

**SUPERVISOR TÉCNICO:** M. en C. Torres Alcalá Andrea

**SUSTENTANTE:** Anacleto Caamaño Elizabeth

# AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

A la Facultad de Química.

Al apoyo económico otorgado del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica PAPIIT-IN202318.

Al profesor Arturo Navarro Ocaña por su confianza, consejos y apoyo para la realización de este proyecto.

A la M. en C. Andrea Torres Alcalá por compartir sus conocimientos y todo su apoyo en la parte experimental de este proyecto.

Al profesor Francisco Basurto por su apoyo para la obtención de muestras de salvias del Jardín Botánico.

Al jurado por la revisión de este trabajo y la retroalimentación con el fin de mejorarlo.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

Gracias Dios por todas tus bendiciones que me hacen cumplir una de mis metas.

A mis padres Dionicio y Carmelita por todo su apoyo incondicional y amor a lo largo de mi vida, porque sus esfuerzos y sacrificios diarios siempre me impulsaron a dar lo mejor de mí, sin ustedes todo lo que soy hoy y he logrado no sería posible.

A mis hermanas Nohemi y Sarahi por todo su amor y acompañarme en mi día a día, haciendo la vida más divertida. A ti Nohemí por siempre guiarme con tu ejemplo, y a ti Sari por siempre estar a mi lado, en las buenas y en las malas, sin ustedes yo no lo hubiera logrado.

A mis amigos de la facultad Isa, Magaly, Chabe, Vero, Yunuen, Roy y Daniel por estar conmigo a lo largo de estos años y brindarme su amistad y ayuda, por todos los momentos de diversión y risas, pero aún más por estar ahí en los momentos más difíciles de la carrera. Gracias por el tiempo que compartimos en laboratorios, clases, pasillos y horas de estudio para exámenes, que ahora son maravillosos recuerdos de la FQ, sin ustedes la estadía en la facultad hubiera sido gris.

A todos mis profesores que he conocido a lo largo de mi vida de estudiante, por todo el conocimiento y enseñanzas de vida que me llevaron a enamorarme de la química y me impulsaron a esforzarme a cumplir esta meta.

A mis compañeros del laboratorio 321 de química, Marco, Andrea, Estefanía, Ceci, Pau, Mary, por todo su apoyo y compañía que hicieron agradable la estadía en el laboratorio.

# ÍNDICE

ÍNDICE .....	4
ÍNDICE DE TABLAS .....	7
ÍNDICE DE FIGURAS .....	8
ÍNDICE DE GRÁFICAS .....	11
1. Introducción .....	12
Planteamiento del problema .....	13
Hipótesis.....	13
Objetivo general .....	14
Objetivos particulares.....	14
2. Marco teórico.....	16
2.1. Familia <i>Lamiaceae</i> .....	16
2.2. Salvias .....	17
2.2.1. Historia .....	17
2.2.2. Definición y distribución.....	18
2.2.3. Importancia de las salvias en México.....	18
2.2.4. Usos de las salvias en México y el mundo.....	19
2.3. Actividad biológica de salvias .....	23
2.3.1. Anti-Alzhéimer y mejorador de la capacidad cognitiva.....	23
2.3.2. Efectos hipolipemiantes e hipoglicemiantes.....	24
2.3.4. Actividad anticancerígena y citotóxica .....	25
2.3.5. Actividad antimicrobiana .....	25
2.3.6. Actividad antioxidante .....	26
2.4. Aplicaciones de salvias en alimentos. ....	29
2.5. Compuestos bioactivos en salvias .....	31
2.5.1. Terpenos .....	31
2.5.1.1. Ácido ursólico y oleanólico.....	32
2.5.1.3. Esteroles .....	34
2.5.1.4. Carotenoides .....	34
2.5.2. Fenoles.....	35

2.5.2.1. Flavonoides .....	36
2.5.3. Antocianinas .....	37
2.5.3. Antocianinas como colorantes de origen natural para alimentos .....	38
2.5.3.1. Factores que afectan la estabilidad de las antocianinas en alimentos .....	39
2.5.3.2. Estabilización de antocianinas .....	42
2.5.4. Ácidos fenólicos .....	43
2.5.4.1. Ácido rosmarínico.....	45
2. Metodología.....	47
Etapa 1. Recolección y preparación de las muestras.....	49
Etapa 2. Elección del disolvente de extracción.....	49
Etapa 3. Cuantificación de fenoles, flavonoides y antocianinas .....	50
Etapa 4. Análisis cualitativo de compuestos bioactivos por cromatografía en capa fina.....	51
Etapa 5. Cuantificación de ácido rosmarínico en salvias por HPLC .....	53
Etapa 6. Evaluación del mejor método de extracción de ácido rosmarínico	54
Etapa 7. Prueba de estabilización de antocianinas con ácido rosmarínico .	58
2. Resultados y discusión .....	60
Etapa 1. Recolección y preparación de muestras .....	60
Etapa 2. Elección del disolvente de extracción.....	62
Etapa 3. Cuantificación de fenoles, flavonoides y antocianinas .....	66
Fenoles totales .....	66
Flavonoides totales.....	68
Antocianinas totales .....	70
Etapa 4. Análisis cualitativo de compuestos bioactivos .....	71
Ácidos fenólicos .....	71
Flavonoides.....	75
Antocianinas .....	79
Terpenos y esteroides.....	80
Carotenos.....	84
Etapa 5. Cuantificación de ácido rosmarínico en salvias por HPLC .....	88
Preparación de muestras .....	88

	Obtención del estandar de ácido rosmarínico.....	89
	Cuantificación de ácido rosmarínico en muestras de salvas.....	90
	Etapa 6. Evaluación del mejor método de extracción de ácido rosmarínico	93
	Etapa 7. Prueba de estabilización de antocianinas con ácido rosmarínico .	99
	Prueba de resistencia al calor de antocianinas con ácido rosmarínico .....	99
	Aplicación de ácido rosmarínico en una bebida .....	101
3.	Conclusiones .....	104
4.	Bibliografía.....	106
	ANEXOS .....	114
	I. Curva patrón de fenoles.....	114
	II. Curva patrón de flavonoides .....	114
	III. Ecuación para el cálculo de antocianinas totales.....	115
	IV. Análisis estadístico de la elección del disolvente de extracción 116	
	V. Cromatogramas de HPLC de muestras para la cuantificación de ácido rosmarínico.....	119

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies de salvias para uso ornamental y extracción de aceite esencial .....	19
Tabla 2. Usos medicinales de diferentes especies de Salvias en el mundo. ....	20
Tabla 3. Usos medicinales y ornamentales de algunas especies de salvias originarias de México.....	21
Tabla 4. Compuestos aislados de especies de salvias con su actividad biológica	27
Tabla 5. Aplicaciones de salvias en alimentos. ....	30
Tabla 6. Eluyentes empleados para CCF de los compuestos.....	52
Tabla 7. Gradiente de elución en HPLC para la identificación de ácidos fenólicos y antocianinas .....	53
Tabla 8. Condiciones de extracción de ácido rosmarínico probados .....	55
Tabla 9. Datos de muestras estudiadas de salvias .....	60
Tabla 10. Resultados de fenoles totales en cada salvia y órgano.....	66
Tabla 11. Resultados de fenoles totales en cada salvia y órgano.....	68
Tabla 12. Valores de Rf obtenidos experimentalmente en la detección de ácidos fenólicos .....	73
Tabla 13. Compuestos de ácidos fenólicos identificados por CCF en cada órgano y especie de salvia.....	74
Tabla 14. Valores de Rf experimentales para flavonoides. ....	77
Tabla 15. Compuestos de flavonoides identificados en cada especie y órgano de salvias.....	78
Tabla 16. Rf experimentales para terpenos y esteroides .....	82
Tabla 17. Compuestos de terpenos y esteroides identificados en cada especie y órgano de salvias .....	83
Tabla 18. Rf experimentales y reportados de carotenos. ....	86
Tabla 19. Carotenos identificados en cada muestra de salvia .....	86
Tabla 20. Muestras de salvias analizadas por HPLC .....	90
Tabla 21. Concentración de ácido rosmarínico en los 6 métodos probados. ....	94
Tabla 22. Concentraciones de ácido rosmarínico obtenidas en muestra de romero comercial .....	97
Tabla 23. Datos de ECAR en flores de <i>S. polystachya</i> .....	98

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Salvia polystachya</i> y <i>Salvia mexicana</i> .....	19
Figura 2. Resumen de compuestos y actividad biológica de especies de salvias.	29
Figura 3. Estructura química ácido ursólico (AU) y ácido oleanólico (AO) .....	32
Figura 4. Estructura química de algunos terpenoides de Salvias.....	33
Figura 5. Estructura química de $\alpha$ y $\beta$ amirina, ácido betulínico y ácido carnósico	33
Figura 6. Estructura química de fitoesteroles .....	34
Figura 7. Estructura química de algunos carotenoides .....	35
Figura 8. Estructura base de los flavonoides.....	36
Figura 9. Estructura de flavonoides: Luteolina, luteolina-7-glucósido, quercetina, kaempferol, apigenina. ....	36
Figura 10. Estructura química y sustituyentes de las diferentes antocianinas. ....	37
Figura 11. Estructura de una antocianina acilada (cianidina-3-O-(6-p-cumaroil) glucósido .....	38
Figura 12. Transformaciones estructurales de antocianina (cianidina-3-glucosido) en soluciones acuosas dependiente del pH. ....	41
Figura 13. Ácidos fenólicos característicos del género <i>Salvia</i> .....	44
Figura 14. Estructura química del ácido rosmarínico .....	45
Figura 15. Esquema general de la metodología.....	47
Figura 16. Esquema de método de extracción de ácido rosmarínico (Método 1-3).....	56
Figura 17. Esquema de método de extracción de ácido rosmarínico (Método 3-6).....	57
Figura 18. <i>Salvia mexicana</i> .....	61
Figura 19. <i>Salvia fruticulosa</i> .....	61
Figura 20. <i>Salvia tiliifolia</i> .....	61
Figura 21. <i>Salvia polystachya</i> .....	61
Figura 22. <i>Salvia purpurea</i> .....	61
Figura 23. <i>Salvia microphylla</i> .....	61
Figura 24. <i>Salvia sp.</i> .....	61
Figura 25. <i>Salvia leucantha</i> .....	61
Figura 26. <i>Salvia amarissima</i> .....	62
Figura 27. <i>Salvia hispánica</i> .....	62
Figura 28. CCF revelada con $\text{FeCl}_3$ para la identificación de ácido rosmarínico y cafeico en cada muestra de salvia.....	71
Figura 29. CCF revelada con DPPH para la identificación de ácido rosmarínico y cafeico en cada muestra de salvia.....	72

Figura 30. CCF revelada con FeCl <sub>3</sub> para la identificación de ácido clorogénico en cada muestra de salvia.....	73
Figura 31. CCF para la identificación de quercetina, luteolina, kaempferol en cada muestra de salvia.....	75
Figura 32. CCF revelada con FeCl <sub>3</sub> para la identificación de rutina en cada muestra de salvia. ....	76
Figura 33. CCF de antocianinas en flores de salvias. ....	80
Figura 34. CCF para la identificación de terpenos y esteroides presentes en muestras de salvias.....	81
Figura 35. CCF para la identificación de carotenos presentes en muestras de salvias.....	85
Figura 36. CCF para la identificación de carotenos presentes en muestras de salvias.....	85
Figura 37. Cromatograma de HPLC a 320 nm del extracto semipurificado de flores de <i>S. mexicana</i> .....	88
Figura 38. Fracciones y compuestos de la extracción líquido-líquido. ....	89
Figura 39. Cromatograma HPLC masas del estándar de ácido rosmarínico.....	90
Figura 40. Cromatograma de HPLC a 320 nm de extractos concentrados enriquecidos en ácido rosmarínico a partir de extracto de agua .....	95
Figura 41. Cromatogramas de HPLC a 320 nm de extractos concentrados enriquecidos en ácido rosmarínico a partir del extracto de acetona....	96
Figura 42. Soluciones para la prueba de copigmentación antes de tratamiento térmico.....	99
Figura 43. Soluciones para la prueba de copigmentación después de tratamiento térmico.....	99
Figura 44. Soluciones para la prueba de copigmentación después de 4 días de	100
Figura 45. Soluciones para la prueba de copigmentación después de 5 días de tratamiento térmico.....	100
Figura 46. Soluciones para la prueba de copigmentación después de 6 días de tratamiento térmico.....	100
Figura 47. Bebidas después de tratamiento térmico, día 1 .....	102
Figura 48. Bebidas día 2 .....	102
Figura 49. Bebidas día 2 .....	103
Figura 50. Bebidas día 4 .....	103
Figura 51. Bebida día 7 .....	103
Figura 52. Bebida día 76 condiciones ideales .....	103
Figura 54. Cromatograma de HPLC a 320 nm de hojas de <i>S. polystachya</i> .....	119
Figura 55. Cromatograma de HPLC a 320 nm de hojas de <i>S. amarissima</i> .....	119
Figura 56. Cromatograma de HPLC a 320 nm de hojas de <i>S. fruticulosa</i> .....	120
Figura 57. Cromatograma de HPLC a 320 nm de tallos de <i>S. polystachya</i> .....	120
Figura 58. Cromatograma de HPLC a 320 nm de tallos de <i>S. fruticulosa</i> .....	120

Figura 59. Cromatograma de HPLC a 320 nm de tallos de <i>S. purpurea</i> .....	121
Figura 60. Cromatograma de HPLC a 320 nm de flores de <i>S. polystachya</i> .....	121
Figura 61. Cromatograma de HPLC a 320 nm de flores de <i>Salvia sp.</i> .....	121
Figura 62. Cromatograma de HPLC a 320 nm de flores de <i>S. mexicana</i> .....	122

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Extracción de fenoles con diferentes disolventes para <i>Salvia sp.</i> .....	63
Gráfica 2. Extracción de flavonoides con diferentes disolventes en flores de <i>Salvia sp.</i> .....	64
Gráfica 3. Extracción de antocianinas en flores de <i>Salvia sp.</i> .....	65
Gráfica 4. Concentración de antocianinas determinadas en flores de salvias.....	70
Gráfica 5. Contenido de ácido rosmarínico en extracto concentrado de salvias ...	91
Gráfica 6. Contenido de ácido rosmarínico en muestras de salvias.....	92

# 1. Introducción

En los últimos años los productos naturales han tomado gran importancia en el ámbito científico; muchas investigaciones se han centrado en plantas medicinales, que desde la antigüedad en diversas partes del mundo se conocen y se han empleado para el tratamiento de diversas enfermedades y síntomas. Incluso, muchas de estas plantas además de este fin han sido utilizadas como especias por sus propiedades saborizantes en la preparación de alimentos. Estas propiedades les son conferidas por la gran diversidad y riqueza en compuestos biológicamente activos, como terpenos, compuestos fenólicos, alcaloides, entre otros, algunas de estas moléculas son las responsables de efectos benéficos a la salud, por sus propiedades antioxidantes, anticancerígenos, antimicrobianos, antiinflamatorios, entre muchos más. Considerando lo antes mencionado las nuevas investigaciones se centran en identificar la composición de plantas medicinales, para el diseño de nuevas aplicaciones en la industria farmacéutica, de cosméticos y alimentos.

El interés por los productos naturales ha llegado a los consumidores de alimentos que en la actualidad tienen preferencia por alimentos de origen natural o se enfocan en adquirir alimentos que no solamente satisfagan su necesidad nutricional, sino que además les brinden compuestos para mejorar su salud, por esto la industria alimentaria busca el añadir a sus productos compuestos que ofrezcan un beneficio a la salud de sus consumidores. Los compuestos que ejercen un beneficio para la salud más allá del valor nutricional reciben por nombre compuestos bioactivos, haciendo referencia a compuestos esenciales y no esenciales que ejercen un efecto beneficioso en la salud de quien lo consume, se ha demostrado que estos compuestos pueden ayudar a reducir el riesgo a ciertas enfermedades.

Las salvias son un género de plantas de la familia *Lamiaceae* y se encuentra ampliamente distribuido en diversas partes del mundo, siendo México el país que alberga la mayor cantidad de especies con cerca del 30% de la totalidad, y un buen número de estas son endémicas de nuestro país. Este género botánico ha sido ampliamente estudiado debido a su composición fitoquímica rica en compuestos

bioactivos, como compuestos polifenólicos y terpenoides, numerosos estudios han demostrado que estos compuestos presentan beneficios antioxidantes, anticancerígenos, antibacterianos, por mencionar algunos.

## **Planteamiento del problema**

México es uno de los países con una gran riqueza en conocimiento de medicina tradicional, específicamente un buen número de plantas medicinales se han empleado para el tratamiento de muchos padecimientos, en algunos estados de nuestro país el uso de la herbolaria se continúa empleando, sin embargo, en las últimas décadas el conocimiento sobre el tema se ha ido perdiendo. Frente a esta situación es necesario rescatar toda esta información además de realizar investigación científica sobre la composición fitoquímica de las especies botánicas empleadas en nuestro país. (Muñetón, 2009; Figueroa, 2009)

Las plantas del género *Salvia* han despertado gran interés en su composición fitoquímica por todas las propiedades que han sido encontradas en diversas investigaciones científicas. América central y Sudamérica son una de las regiones en donde más se distribuyen estas plantas, y específicamente México es la región con mayor abundancia de este género en el mundo, con cerca del 30% del total de la cual cerca del 75 % son endémicas de nuestro país (Cornejo, 2011). A lo largo del mundo existen numerosos estudios sobre la composición de salvias de distintos países, sin embargo, la información que se tiene sobre la composición de fitoquímicos de las salvias mexicanas es limitado.

## **Hipótesis**

Se ha estudiado la composición de varias especies de salvias alrededor del mundo entre las más estudiadas son *S. officinalis* y *S. miltiorrhiza*, todas las especies presentan semejanzas en cuanto a su composición, entre las que destaca las altas

concentraciones de ácido rosmarínico y se han observado en diversos estudios que una alta concentración de fenoles está relacionado con un alto contenido de ácido rosmarínico, por lo tanto se espera que la muestra de salvia de origen mexicano con mayor concentración de fenoles sea la que presente un mayor contenido de ácido rosmarínico.

## **Objetivo general**

Determinar el potencial de ciertas salvias mexicanas como fuente de compuestos bioactivos, al analizar la composición del perfil de los principales compuestos, pero más específicamente el ácido rosmarínico. Así como realizar la extracción de ácido rosmarínico para una aplicación en alimentos.

## **Objetivos particulares**

1. Encontrar el disolvente para extraer una mayor concentración de fenoles, flavonoides y antocianinas en muestras de hojas, tallos y flores de salvias de origen mexicano
2. Determinar el contenido de fenoles, flavonoides y antocianinas totales en las hojas, tallos y flores de 10 especies de salvias de origen mexicano.
3. Identificar cualitativamente los principales compuestos que se han encontrado en plantas de este género (ácidos fenólicos, flavonoides, terpenos, esteroides y carotenos), así como identificar el perfil de antocianinas de las flores de las salvias.
4. Cuantificar ácido rosmarínico en las muestras de salvias con una mayor concentración de fenoles.

5. Evaluar las mejores condiciones de extracción para la obtención de un extracto enriquecido en ácido rosmarínico
6. Probar un extracto enriquecido en ácido rosmarínico como copigmento de antocianinas.
7. Elaborar una bebida utilizando como colorante un extracto de antocianinas enriquecido en ácido rosmarínico.

## 2. Marco teórico

### 2.1. Familia *Lamiaceae*

La familia *Lamiaceae* es la sexta más grande de las familias de plantas, con 236 géneros, y más de 7000 especies (Frezza, 2019; Martínez, 2013). Anteriormente esta familia se conocía con el nombre de *Labiatae* haciendo referencia a una característica particular de las flores de las plantas de esta familia, que presentan un par de labios en los pétalos. (CONABIO, 2016). Dentro de ésta familia existen una gran cantidad de plantas utilizadas desde la antigüedad por sus propiedades saborizantes para la elaboración de comida en diferentes partes del mundo, dentro de las especies más conocidas se encuentran albahaca (*Ocimum spp.*), lavanda (*Lavandula angustifolia Mill.*), toronjil (*Melissa officinalis L.*), mejorana (*Origanum majorana L.*), orégano (*Origanum vulgare L.*), menta (*Mentha piperita L.*), romero (*Rosmarinus officinalis L.*), salvia (*Salvia officinalis L.*) y tomillo (*Thymus vulgaris L.*). (Carovic, 2016; Sik, 2019).

Estas especies además de los usos culinarios también se han usado en medicina tradicional desde la antigüedad para el tratamiento de diversas enfermedades y síntomas, como por ejemplo dolores gastrointestinales, tos, asma, bronquitis, laringitis, amigdalitis además pueden actuar como agentes carminativos y diuréticos, también se ha reportado para el tratamiento de heridas, estrés, depresión, y Alzheimer (Hamdy, 2013; Sik, 2019).

Ahora en la actualidad con diversas investigaciones se ha demostrado que el efecto sobre el tratamiento de estas enfermedades y síntomas es consecuencia de que tiene compuestos con actividad antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, antialérgica, anticancerígena, antiinflamatoria, astringente, espasmolítica, sedante, expectorante, antipirético; entre muchas más. (Milevskaya, 2017; Sik, 2019; Shaifi, 2018; Forés, 1997).

Las plantas de esta familia están distribuidas en todo el mundo, pues se adaptan a diversos climas, aunque son más abundantes en zonas de bosques templados o

zonas montañosas. En el mundo existen diversas áreas con una mayor diversidad, como el mediterráneo, Asia Central, África y Madagascar, China, Australia, Sudamérica y Norteamérica, pero existen ciertas especies que son endémicas de una región en particular (Martínez, 2017; Frezza, 2019).

Esta familia tiene gran importancia económica en varias partes del mundo, ya que como se mencionó anteriormente muchas especies son empleadas con fines culinarios como especias (*Origanum, Thymus, Mentha, Rosmarinus*), así como para la obtención de aceites esenciales (*Lavandula, Pogostemon, Salvia*) importantes para la industria de la perfumería, y/o como plantas ornamentales (*Coleus, Salvia, Scutellaria*). El cultivo de estas plantas para usos industriales y no industriales ha ido en aumento por las investigaciones que se han desarrollado, en las que cada vez se descubren nuevas propiedades de estas plantas con posibles aplicaciones para la industria de alimentos, farmacéutica y cosmética. (Hamdy, 2013; Martínez, 2013; Martínez, 2017).

## **2.2. Salvias**

### **2.2.1. Historia**

Las salvias son un conjunto de plantas pertenecientes al género *Salvia*, las antiguas civilizaciones la utilizaban para curar diversas enfermedades y precisamente de esta cualidad proviene su nombre, la palabra salvia deriva del latín *salvare* que significa curar; incluso existe un viejo proverbio que dice "De qué podrá morir el hombre que tenga salvia en su huerto." (Sánchez, *et al*, 2005; Forés, 1997). Este género botánico perteneciente a la familia *Lamiaceae*, es uno de los más abundantes en el mundo con cerca de 900 especies distribuidas en todo el mundo, es por esto que en diversas partes del mundo se ha utilizado en diversas culturas en medicina tradicional. En la región mediterránea la especie más conocida es *Salvia officinalis*, (sage) mientras que en China es *Salvia miltiorrhiza*, utilizada para el tratamiento de diversas enfermedades, mientras que en Latinoamérica *Salvia hispánica* (Chía) es conocida desde la antigüedad por la población de Mesoamérica, los mayas y

aztecas lo consumían como un alimento altamente nutritivo, para aumentar la resistencia al trabajo bajo condiciones extremas. (Martínez, 2017; Fan, 2019)

### **2.2.2. Definición y distribución.**

El género *Salvias* es el género más extenso en el mundo de la familia *Lamiaceae* con más de 900 especies que se encuentran ampliamente distribuidas en regiones con climas templadas, subtropicales y tropicales alrededor de todo el mundo, en las regiones Centro y Sur de América (con cerca de 500 especies), Asia Central, la región mediterránea (aproximadamente 250 especies), y Asia oriental (con 90 especies), es decir, son plantas cosmopolitas. Algunas de las especies se cultivan en todo el mundo, como *S. officinalis* que es de las especies más cultivadas como planta aromática y ornamental; pero algunas de ellas son endémicas y solo crecen en ciertas regiones del mundo. (Sharifi *et al.*, 2018).

La forma de crecimiento de las salvias es de plantas herbáceas anuales y perenes, arbustos, las flores presentan cáliz y corona bilabiadas. La característica que las distingue de otras flores de la familia *Lamiaceae* es que sus flores presentan 2 estambres. Estas flores son muy visitadas por colibríes y abejas por sus colores azules y/o moradas, lilas y rojas, por lo que estas plantas son importantes para los polinizadores. (Cornejo e Ibarra, 2011; Martínez, 2017).

### **2.2.3. Importancia de las salvias en México**

México es una de las regiones con mayor diversidad del género *Salvia* en el mundo con 307 especies, de las cuales 232 especies, es decir, el 75% de ellas son endémicas. De estas especies endémicas el 33% son microendémicas, termino con el que se refiere a aquellas que están restringidas a un estado (Martínez, 2013; Martínez, 2017). Crecen principalmente en las zonas montañosas de la región centro y sur del país (Cornejo e Ibarra, 2011). Los trabajos de Martínez de 2017 mencionan que las especies endémicas de México con áreas de distribución más amplias son *Salvia prunelloides* Kunth, *S. mexicana* L., *S. elegans* Vahl, con un

registro en 25, 23 y 20 estados de la República, respectivamente. Algunas las especies mexicanas son *S. leucantha*, *S. mexicana*, *S. amarissima*, *S. polystachya*, *S. hispánica*, siendo ésta la más conocida por su semilla, la chía, *S. purpurea*, entre muchas más (Figura 1).



Figura 1. *Salvia polystachya* y *Salvia mexicana*  
CONABIO

#### 2.2.4. Usos de las salvias en México y el mundo.

Las especies de salvias se han utilizado como ya lo hemos mencionado anteriormente en medicina tradicional, a lo largo de todo el mundo, pero también tienen otros usos como ornamental, para la extracción de aceite esencial, culinario como condimento en la preparación de alimentos, en la Tabla 1 se presentan algunas especies de salvias utilizadas de forma ornamental y para la extracción de aceite esencial.

Tabla 1. Especies de salvias para uso ornamental y extracción de aceite esencial

Salvias ornamentales	Salvias para extracción aceite esencial
<i>S. officinalis</i>	<i>S. officinalis</i>
<i>S. splendens</i>	<i>S. lavandulifolia</i>
<i>S. glutinosa</i>	<i>S. sclarea</i>

Los usos más documentados que hay sobre las diferentes especies de salvias en el mundo son los usos medicinales que se les han dado en diversas regiones, un listado de algunas especies y sus usos en medicina tradicional en ciertos países se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Usos medicinales de diferentes especies de Salvias en el mundo.

<b>Especie</b>	<b>País</b>	<b>Uso</b>	<b>Referencia</b>
<i>S. fruticosa</i>	Turquía	Anti-diarreica, dolor de estómago, antiséptico, vaginitis, anti-tos	Sharifi, 2018
<i>S. glutinosa</i>	Italia	Dolores abdominales	
<i>S. lavandulifolia</i>	España	Desordenes digestivos	Martínez, 2014
<i>S. moorcroftiana</i>	India	Enfermedades de la piel	Sharifi, 2018
<i>S. ochranta</i>	Ecuador	Infecciones gastrointestinales	
<i>S. sagittata</i>	Bolivia	Bronquitis	
<i>S. verticillata</i>	Serbia, Bulgaria, Turquía	Infecciones de la cavidad bucal, dolor abdominal	Jaric, 2015
<i>S. sclarea</i>	Irán	Diurético, antiséptico, enfermedades de los ojos	Fakir, 2009
<i>S. miltiorrhiza</i>	China	Para el tratamiento de enfermedades coronarias y cerebrovasculares, para promover la circulación sanguínea analgésico, alivia el estrés	Su, 2015 Qiangqiang, 2019
<i>S. officinalis</i>	Mediterráneo y en todo el mundo	Estimulante del sistema circulatorio, curar heridas, antiespasmódica, astringente, antibacteriana, para tratar gingivitis, para mejorar la memoria, dolor de muelas, infecciones, acidez estomacal, dolor de estómago, cólicos, gingivitis, infecciones de garganta, infecciones urogenitales, tos, amigdalitis	Barnes, 2005; Sharifi, 2018; Abdelkader, 2014

Tabla 2. Continuación

Especie	País	Uso	Referencia
Especies de <i>Salvia</i> general	África	Tuberculosis, infecciones bacterianas, influenza, ataques febriles	Kamatou, 2008
<i>S. pratensis</i>	Italia, Bosnia Herzegovina	Dolor abdominal, y de estómago, enfermedades de la piel	Idolo, 2010

Las especies de mayor importancia económica son cultivadas por sus metabolitos secundarios usados en la industria y son *S. fruticosa*, *S. verbanaca*, *S. miltiorrhiza*, mientras que *S. officinalis*, *S. lavadulifolia* y *S. sclarea*, tienen una producción anual de 50 a 100 toneladas de aceite esencial, (Sharifi, 2018).

Las especies de salvias en nuestro país también han sido empleadas en medicina tradicional, para el tratamiento de diversos dolores y para el tratamiento de muchas enfermedades en diferentes estados. En la Tabla 3 se muestran los usos medicinales y no medicinales que se les da algunas especies en particular de *Salvias*, además se especifica si es una especie nativa, haciendo referencia a una especie que se encuentra dentro de su área de distribución natural u original; y/o endémica, aquella especie que se encuentra restringida a una región, en particular. (CONABIO, 2012)

Tabla 3. Usos medicinales y ornamentales de algunas especies de salvias originarias de México.

Nombre científico	Nombre común	Origen	Uso	Referencia
<i>S. mexicana</i>	Tlacote	Nativa y endémica	Ornamental Dolor de estómago, diarrea, problemas de riñón, heridas	Andrade, 2009
<i>S. leucantha</i>	Cordoncillo	Nativa	Enfermedades gastrointestinales, mal de aire, diabetes, enfermedades respiratorias	Jacobo, 2016; Juárez, 2013; Andrade, 2005; Alonso, 2011

Tabla 3. Continuación

Nombre científico	Nombre común	Origen	Uso	Referencia
<i>S. purpurea</i>	Moradita	Nativa	Ornamental Diarrea, dolor de muela, baños postparto	Domínguez, 2002; Gonzales, 2014.
<i>S. microphylla</i>	Mirto	Nativa y endémica	Ornamental Dolor de estómago, diarrea, empacho, susto, indigestión,	Jensk, 2013; Pinzón, 1994
<i>S. polystachya</i>	Chía de campo	Nativa	Contra la acides gástrica, contra la disentería, dolor de cabeza, cólicos y emoliente	Maldonado, 2000
<i>S. amarissima</i>	Insulina	Nativa y endémica	Se ha utilizado como antimicrobiano, para tratar la diabetes y contra helmintos (lombrices)	Bautista, 2016; López, 2010
<i>S. tiliifolia</i>	Chía cimarrona	Nativa	Enfermedades respiratorias como bronquitis y tos, antipirético	Domínguez, 2002
<i>S. coccinea</i>	Mirto	Nativa	Enfermedades inflamatorias, diarrea, dolor de estómago	Alonso, 2011, Andrade, 2009
<i>S. fruticulosa</i>	Mirto	Nativa	Anticancerígena, antimicrobiana	Rodríguez, 1989
<i>S. hispánica</i>	Chía	Nativa	Dolor de estómago y para tratar la obesidad, desinflamante, para controlar colesterol	Alonso, 2015; Jiménez, 2012
<i>Salvia sp.</i>	Mirto	Nativa	Espasmos	Lara, 2019

Algunas especies de salvias también han tenido importancia en ceremonias religiosas mesoamericanas, tal es el caso de *S. divinorium* es una especie endémica de Oaxaca, también conocida como “hoja de la Pastora” que ha sido empleada desde la antigüedad en rituales de chamanes mazatecos, es conocida por sus

efectos alucinógenos, según lo mencionado por Díaz en 2014 “para los chamanes mesoamericanos, los contenidos mentales que surgen por medio del consumo ceremonial de una planta sagrada son el principal objetivo del ritual porque, según su concepción, a través de la comunión con esta planta un espíritu del consumidor entra en contacto con la figura sincrética y santificada”. En la actualidad los indígenas mazatecos cultivan *Salvia divinorum* para emplearla en rituales de adivinación. (Ahuatzin, 2014; Jolanta, 2013).

### **2.3. Actividad biológica de salvias**

La gran riqueza de compuestos fitoquímicos presentes en las salvias ha tomado gran relevancia en la búsqueda de compuestos farmacéuticos y para la preservación de alimentos, por sus propiedades antimicrobianas y antioxidantes. (Sharifi-Rad *et al.*, 2018). Algunas de las varias propiedades que se han estudiado son algunas muy novedosas como anti-alzhéimer y para mejorar capacidades cognitivas, así como otras más conocidas como sus efectos sobre enfermedades cardiovasculares por sus propiedades hipolipemiantes e hipoglicemiantes; antibacterianas, y últimamente se han realizado estudios en los que se ha observado que puede tener efectos anticancerígenos por sus propiedades citotóxicos.

#### **2.3.1. Anti-Alzhéimer y mejorador de la capacidad cognitiva.**

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por pérdida neural, y una acumulación anormal extracelular del péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ). Varios componentes derivados de *S. miltiorrhiza* se han propuesto como objetivo terapéutico para la enfermedad anti-Alzheimer a través de su participación en la inhibición de la producción, agregación y eliminación de  $A\beta$ . El ácido salvianólico B ha sido reportado como el compuesto responsable de este efecto (Zhang, 2016).

Se ha reportado que la administración de aceite esencial de *S. officinalis* y *S. lavadulaefolia* mejora la atención y memoria en personas sanas jóvenes, con lo que se demuestra que las salvias tienen un potencial para mejorar capacidades cognitivas como la memoria y el tratamiento de Alzheimer. (Sharifi, 2018).

### **2.3.2. Efectos hipolipemiantes e hipoglicemiantes**

Las enfermedades cardiovasculares están íntimamente relacionadas con síndromes metabólicos, como hipertensión, dislipidemias, obesidad, diabetes, y constituyen en la actualidad un problema de salud a nivel mundial. En este ámbito en China el uso de *Salvia miltiorrhiza* es muy popular para el tratamiento de estas enfermedades, incluso se venden tabletas comerciales de la raíz de esta especie. En nuestro país la chía (semillas de *S. hispánicas*) se recomiendan para bajar los niveles de triglicéridos, y existen estudios científicos que demuestran su efectividad. En el estudio de Guevara, 2012 se preparó una dieta con 4 g de chía, aceite de palma, avena y soya en polvo en 250 ml de agua consumido 2 veces al día, durante un periodo de 2 meses muestra una disminución de triglicéridos y una disminución de la resistencia a la insulina, es decir beneficiando al tratamiento de diabetes tipo 2.

El efecto hipoglucémico de *S. officinalis* se probó en un estudio por 12 semanas, en 80 pacientes diabéticos tipo II, con una edad media de 52 años. Los resultados de este estudio revelaron que una tableta de 150 mg de *S. officinalis*, tres veces al día reduce azúcar en la sangre y colesterol. (Sharifi, 2018)

La inhibición de enzimas claves en estas enfermedades es más efectiva para su tratamiento, en el caso de la diabetes Mellitus se trata de la amilasa y glucosidasa, mientras que las lipasas para el caso de la obesidad. Se ha comprobado el efecto inhibitorio sobre estas enzimas con extractos de especies de salvias como *S. blepharochlaena*, *S. euphratica* y *S. verticillata*, este efecto inhibitorio de enzimas explica el efecto hipoglicemiante de las especies de salvias (Zengin, 2018).

#### **2.3.4. Actividad anticancerígena y citotóxica**

Existen una gran cantidad de estudios que demuestran que el consumo de plantas ricas en polifenoles, como las salvias, tiene un papel preventivo contra varios tipos de cáncer, al interactuar con vías de señalización implicadas en el cáncer. En los últimos años, se ha reconocido el uso potencial de salvias como un nuevo agente anticancerígeno (Jiang, 2016). Pero también se han hecho estudios *in vivo* probando la actividad citotóxica, de compuestos específicos aislados de salvias en diversos tipos de cáncer, por ejemplo, Salvileucalina B, un diterpenoide de partes aéreas de *S. leucantha* ejerció actividad citotóxica contra células tumorales A549 y HT-29 (Sharifi, 2018).

En la revisión de Ghorbani, de 2017 menciona que el ácido rosmarínico en un estudio con modelos animales fue capaz de prevenir la formación de tumores en la piel y prevenir metástasis ósea por carcinoma de mama, la inhibición que ejerce puede ser explicada por la inhibición de la actividad mitógena de la proteína quinasa, así como factores de señalización, además de la supresión de especies reactivas de oxígeno, y la reducción de la expresión inflamatoria de cicloxigenasa-2.

#### **2.3.5. Actividad antimicrobiana**

El aceite esencial de diversas especies de salvias, así como de extractos alcohólicos de las mismas han demostrado tener efecto antimicrobiano sobre varios microorganismos como hongos, levaduras y bacterias de interés por ser causantes de infecciones y enfermedades. Se han probado el efecto por medio de la técnica de difusión en disco y se ha visto que el aceite esencial de diferentes especies de salvias provoca interesantes halos de inhibición sobre *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, al ser comparados con controles de diversos agentes fungicidas. (Sharifi, 2018)

La ciencia en los últimos años ha visto los principios activos de plantas como una forma de neutralizar la resistencia antimicrobiana y por eso las plantas del género salvia han tomado importancia en investigación antibacteriana. (Sharifi, 2018). El aceite esencial de *S. officinalis* ha sido probado contra *Agrobacterium tumefaciens*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella enteritidis*, *E.coli* y *Bacillus cereus*, Además se ha probado la efectividad de este aceite sobre bacterias aisladas de infecciones urinarias presentan valores superiores al 75% de efectividad sobre *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *Enterobacter aerogenes* y *Klebsiella oxytoca*. (Pereira, 2004).

Los extractos de salvias con otros disolventes como etanol, acetona, hexano, cloroformo, acetato de etilo también han sido probados contra algunas bacterias como *S. aureus*, *P. aureuginosa*, *Shigella flexneri*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. cereus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter*. Sin embargo, al comparar el efecto de los extractos y aceite esencial sobre una bacteria en específico se ha visto que el aceite esencial logra tener un mejor efecto. En general se ha observado que salvias, en forma de extractos o aceite esencial logran tener efecto antibacteriano sobre bacterias Gram positivas y Gram negativas.

### **2.3.6. Actividad antioxidante**

El estrés oxidativo juega un papel muy importante en el inicio y desarrollo de diversas enfermedades cardiovasculares y neurológicas, así como el cáncer y diabetes. El estrés oxidativo se genera con la formación de especies reactivas de oxígeno en el proceso de respiración celular en la mitocondria de las células, la célula cuenta con enzimas encargadas de eliminar estas especies reactivas de oxígeno, como por ejemplo la catalasa, glutatión oxidasa y superóxido dismutasa, sin embargo es necesario el consumo de antioxidantes de fuentes naturales, que ayudan a las células a protegerse de estas especies tan reactivas, y así evitar el estrés oxidativo, por eso se recomienda el consumo de alimentos ricos en antioxidantes. La actividad antioxidante de las salvias es ampliamente conocida por

la gran cantidad de compuestos fenólicos que contienen, los principales compuestos antioxidantes son el ácido rosmarínico y ácido cafeico (Ghorbani, 2017; Lu, 2002).

En la Tabla 4 se muestran algunos de los compuestos aislados de ciertas especies específicas de salvias en todo el mundo y la actividad biológica reportada.

Tabla 4. Compuestos aislados de especies de salvias con su actividad biológica

<b>Especie de salvia</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Actividad</b>	<b>Referencia</b>
<i>S. officinalis</i>	Ácido oleanólico Ácido ursólico	Actividad antimicrobiana Antioxidante	Wu, 2012; Ghorbani, 2017; Lu, 2002, Jiang, 2016
	Tanshinona I	Actividad anticancerígena	
	7 $\alpha$ -metoxirosmanol	Receptor benzodiazepina	
	Ácido salvianólico K Sagecumarina Luteolin 7-glucósido Apigenina 6.8-di-C-glucoside Ácido rosmarínico	Actividad antioxidante	
	Saficinolida Sageona	Actividad antiviral	
	Ácido carnósico	Inhibidor de la absorción de lípidos	
<i>S. divinorium</i>	Salvinorina A	Receptor $\kappa$ -opioide	Wu, 2012
	1 $\beta$ ,2 $\alpha$ ,3 $\beta$ ,11 $\alpha$ tetradidroxirus-12-ene	Actividad citotóxica	
<i>S. leucantha</i>	Salvileucalina B	Actividad citotóxica	
<i>S. sclarea</i>	Salvipisona Aetiopinona	Resistencia antibióticos y actividad anti-biofilm	Wu, 2012, Jassbi, 2016
<i>S. hispánica</i>	Hispanina A-J	Efecto cardioprotector	Fan, 2019
<i>S. amarissima</i>	Amarisinas A-C	Actividad citotóxica	Bautista, 2016
		Modulador de la resistencia a fármacos	

Tabla 4. Continuación

<b>Especie de salvia</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Actividad</b>	<b>Referencia</b>
<i>S. miltiorrhiza</i>	Tashinona I	Inhibidor de acetilcolinesterasa	Wu, 2012; Su, 2015
	Sibiriquinona	Antitumoral	
	Ácido litospérmico	Efecto en enfermedades cardiovasculares	
	Ácido litospérmico B	Anti daño renal	
	crisotanchinona	Anticancerígena Anti daño hepático Anti daño neurofático antiinflamación	
	Tanshinona IIIB	Actividad neuroprotectora	
<i>S. palestina</i>	Cirsimaritina Esclareol	Actividad antibacterial	Wu, 2012
<i>S. yunnanensis</i>	Ácido salvianólico N Ácido salvianólico A	Actividad anti VIH	

Las actividades farmacológicas listadas en la Figura 2 es un sintetizado resumen de los compuestos más frecuentes en la composición de este género, y cabe resaltar la gran mayoría de los compuestos identificados en las salvias presentan actividad antioxidante, tantos fenoles ácidos, flavonoides, terpenos, carotenos y esteroides, sin embargo, existen aún un buen número de propiedades que no se mencionan aquí, como por ejemplo anti-VIH, anti-protozoaria, anti-malaria, anti-leishmanica, anti-trombotica, efecto en la memoria y capacidad cognitiva, anti-tuberculosa, anticonceptiva (Jassbi, 2017; Jiang, 2010, Xavier, 2016; Lu, 2002, Ghorbani, 2016).

Además, se conocen actividades farmacológicas de extractos de varias salvias, con múltiples efectos beneficiosos para el tratamiento de enfermedades, sin embargo, no se conoce el compuestos o compuestos en específico que tiene ese efecto.

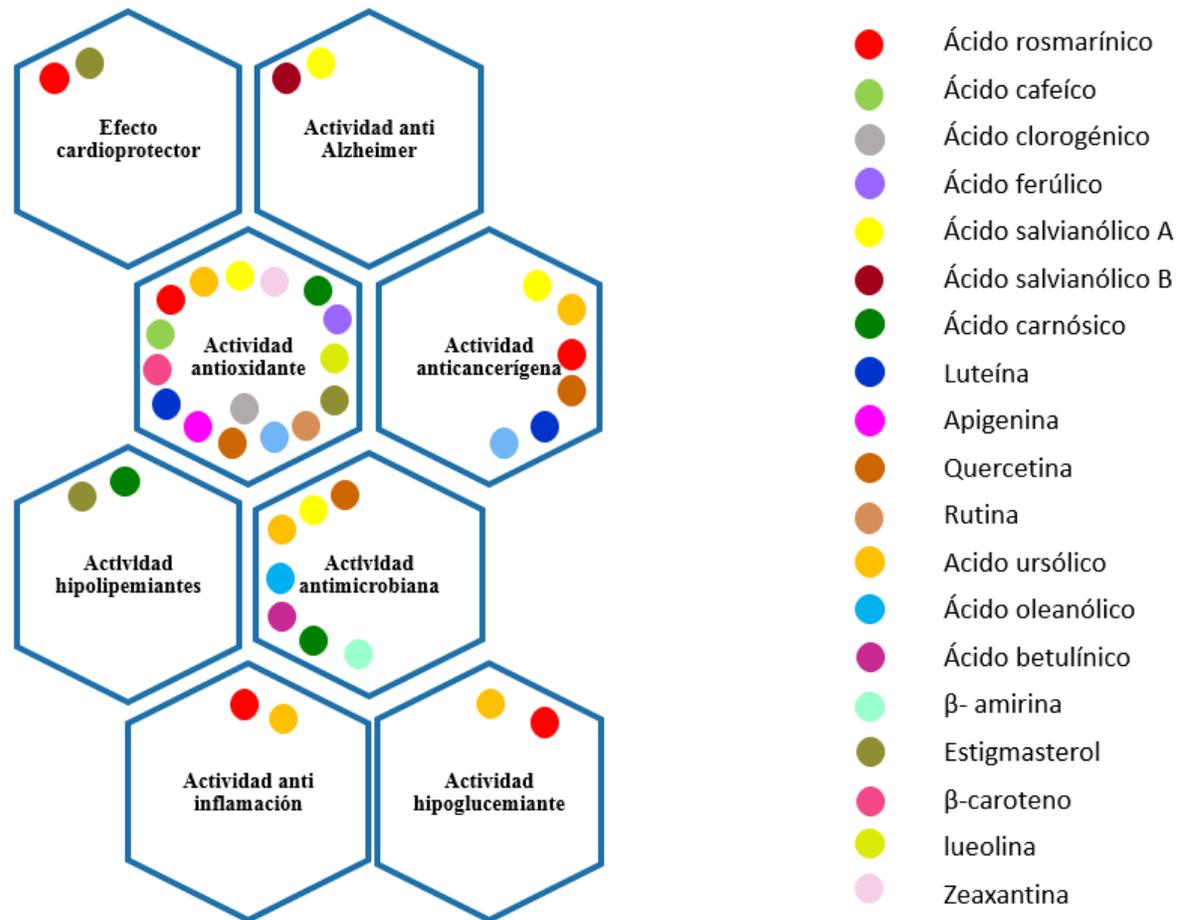


Figura 2. Resumen de compuestos y actividad biológica de especies de salvias.

## 2.4. Aplicaciones de salvias en alimentos.

Además del uso culinario como especia las salvias también pueden ser añadidas a alimentos con el fin de obtener un beneficio de las múltiples propiedades que presentan, el aceite esencial, las oleorresinas (libre de solventes) y extractos naturales (incluidos los destilados) de las especies de *S. officinalis*, *S. fruticosa*, *S. lavandulaefolia* y *S. sclarea* son aditivos generalmente reconocido como seguro (GRAS) por la Food and Drug Administration (FDA) en Estados Unidos. (Sharifi, 2018). En la Tabla 5 se presentan algunas de las aplicaciones en alimentos que se les ha dado a las salvias, que principalmente son antioxidantes y antimicrobianas.

Tabla 5. Aplicaciones de salvias en alimentos.

Uso	Forma	Efectos	Referencias
Antioxidante	Aceite esencial	Se ha observado valores superiores del poder antioxidante (IC <sub>50</sub> ) evaluado por DPPH) comparado con BHA, Vitamina C	Abdelkader, 2014
		El 3% de aceite reduce la oxidación de carne cruda y cocida de cerdo o res, bajo refrigeración durante 1-12 días	Fasseas, 2008
		El uso del aceite presenta actividad antioxidante sobre aceite de soya disminuyendo a 1 mg/ml	Tepe, 2005
		El empleo de aceite esencial disminuye la rancidez oxidativa en mayonesa monitoreada durante 2 meses.	Pop, 2016
Antioxidante	Hojas de secas	El uso de 1g/100g de pechuga de pollo tratado bajo altas presiones <i>hidrostáticas</i> , disminuye la oxidación del producto almacenado durante 2 semanas.	Mariutti, 2008
Antimicrobiana	Aceite esencial	El aceite esencial demostró tener efecto antimicrobiano mayor que algunos conservadores utilizados en la industria alimentaría sobre varios microorganismos de importancia en alimentos ( <i>B. cereus</i> , <i>E. coli</i> O:157:H7, <i>L monocytogenes</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. typhymurium</i> ).	López, 2013
		El uso del aceite de <i>S. officinalis</i> en carne molida de res con proteína de soya reduce la concentración microbiana durante 7 días de almacenamiento a 4°C.	Ahmed, 2010
		El aceite de <i>S. officinalis</i> sobre queso feta, logra disminuir 2 ciclos logarítmicos de <i>E. coli</i> O157:H7 durante 14 días de almacenamiento a 7°C	Selim, 2011
Antioxidante y antimicrobiana	Hojas secas	El uso de <i>S. officinalis</i> en albóndigas de pavo mostro una disminución de compuestos producto de oxidación de lípidos, así mismo hay una disminución de bacterias aeróbicas en almacenamiento por 9 días en refrigeración.	Ganter, 2018

## **2.5. Compuestos bioactivos en salvias**

Todas las salvias presentan una composición química compleja con abundantes compuestos bioactivos, es decir, compuestos esenciales (por ejemplo, vitaminas) o no esenciales en la nutrición que ejercen un beneficio a la salud (Biesalski, 2009); como por ejemplo se ha demostrado que el consumo de antioxidantes en la dieta ejerce un efecto de prevención contra algunas enfermedades (Serrano, *et al.*, 2006). La composición de las salvias ha sido ampliamente investigada en diversas partes del mundo, y se han logrado identificar más de 750 compuestos, según la revisión de Wu, 2012.

Las diferentes clases metabolitos secundarios son los que le confieren los múltiples efectos en la salud, entre estos fitoquímicos se encuentran principalmente terpenos (di y triterpenos) y abundantes compuestos fenólicos: flavonoides, ácidos fenólicos y sus derivados. Los metabolitos secundarios de las especies de salvias pueden dividirse en dos, según su solubilidad en liposolubles: terpenos y ácido carnósico, e hidrosolubles: ácidos fenólicos y flavonoides (Ortega, 2002; Carovic, 2016; Fotovvat, 2019).

Dentro de la amplia gama de actividades farmacológicas, se incluyen anticancerígenas, antiinflamatorias, anticonceptivas, antioxidantes, antimicrobianos, hipoglucemiantes, hipolipemiantes, efectos de mejora de la memoria, antialérgicas, antimutagénicas, potenciadores de la función gastrointestinal, antifúngica, antiviral (Sharifi, 2018; Carovic, 2016; Ghorbani, 2017).

### **2.5.1. Terpenos**

El género de salvias se ha caracterizado desde un punto de vista fitoquímico por la producción de terpenos principalmente diterpenoides y triterpenoides (Wu, *et al.*; 2012). Los terpenos son compuestos que tienen como precursor al isopreno y dependiendo del número de unidades recibe el nombre de mono-, di- y triterpenos, estos compuestos son de naturaleza volátil y se encuentran principalmente en

hojas, flores, frutos y en menor medida en tallos de las plantas. (Ormeño, 2012). Estos compuestos son los principales constituyentes del aceite esencial de las salvias, llegando a representar hasta el 90% del aceite (Santana, *et al*, 2012), son moléculas de naturaleza aromática por lo que se han usado en perfumería, y como saborizantes en la industria de alimentos, además de sus propiedades farmacológicas.

### 2.5.1.1. Ácido ursólico y oleanólico

El ácido ursólico y su isómero el ácido oleanólico es un compuesto triterpénico pentacíclico que se encuentra presente en una gran cantidad de plantas, fundamentalmente en las plantas de la familia *Lamiaceae*, por lo regular siempre se encuentran ambos isómeros. (Serrano, 2016).

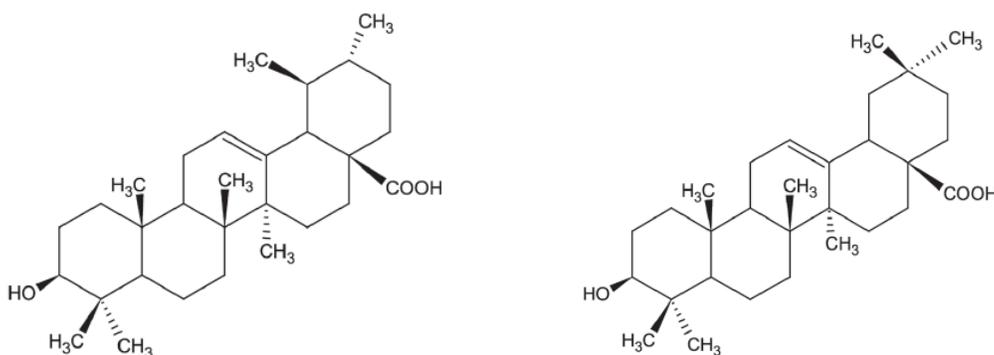


Figura 3. Estructura química ácido ursólico (AU) y ácido oleanólico (AO)

Además de los ácidos ursólico y oleanólico se han reportado numerosos triterpenos presentes en el aceite esencial de las plantas del género *Salvia*, algunos han mostrado interesantes propiedades farmacológicas que se siguen estudiando hasta la fecha, en la Figura 4 se muestran algunos encontrados, e incluso se puede ver que en algunos compuestos su nombre deriva de la palabra *salvia*.

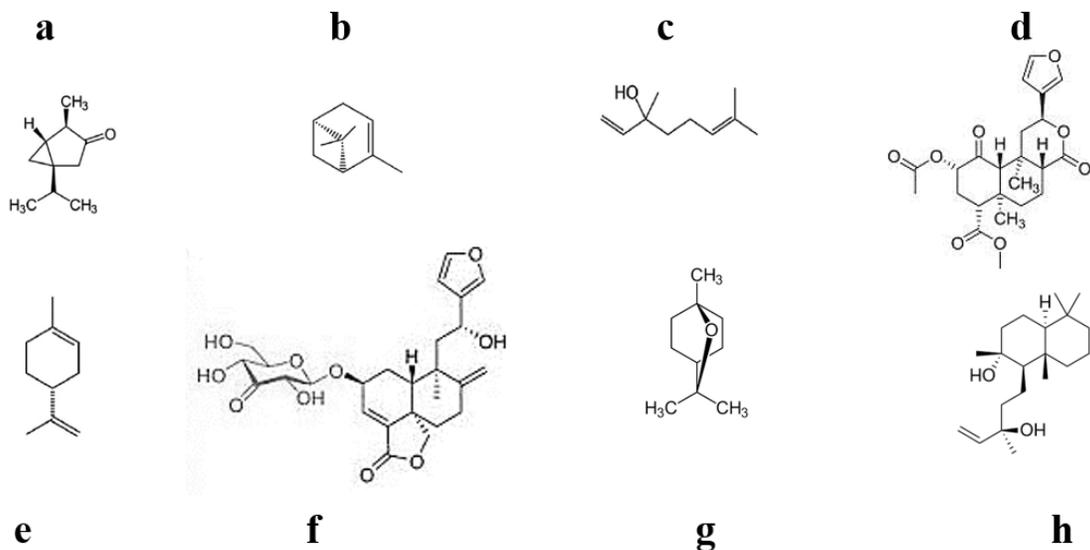


Figura 4. Estructura química de algunos terpenoides de *Salvias*

a:  $\beta$ -tuyona; b:  $\alpha$ -pineno; c: linalool; d: salvinorina A; e: limoneno; f: salvihispin A; g: 1,8-cineol; h: esclareol

Además de los terpenoides que se han encontrado en salvias, también se han encontrado otros compuestos de esta misma familia de metabolitos secundarios que se encuentran distribuidos en un buen número de plantas medicinales, y a los cuales también se le atribuyen actividades farmacéuticas, como por ejemplo ácido betulínico, ácido carnósico,  $\alpha$ - y  $\beta$ -amirina. (Fontanay, 2008). (Figura 5).

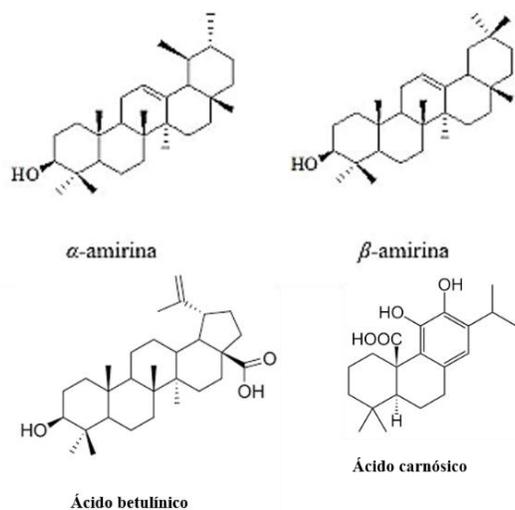


Figura 5. Estructura química de  $\alpha$  y  $\beta$  amirina, ácido betulínico y ácido carnósico

### 2.5.1.3. Esteroles

Los esteroles o específicamente fitoesteroles, refiriéndonos a los de origen vegetal, se encuentran distribuido en una gran cantidad de plantas, son compuestos de 28 o 29 átomos de carbono, son derivados del ciclopentano perhidrofenantreno, diferenciándose en la cadena hidrocarbonatada lateral de 9 o 10 carbonos conformando el  $\beta$ -sitoesterol y campesterol, respectivamente, algunos también presentan dobles enlaces como el estigmasterol. (Muñoz, 2011). La estructura química de estos compuestos se puede observar en la Figura 6.

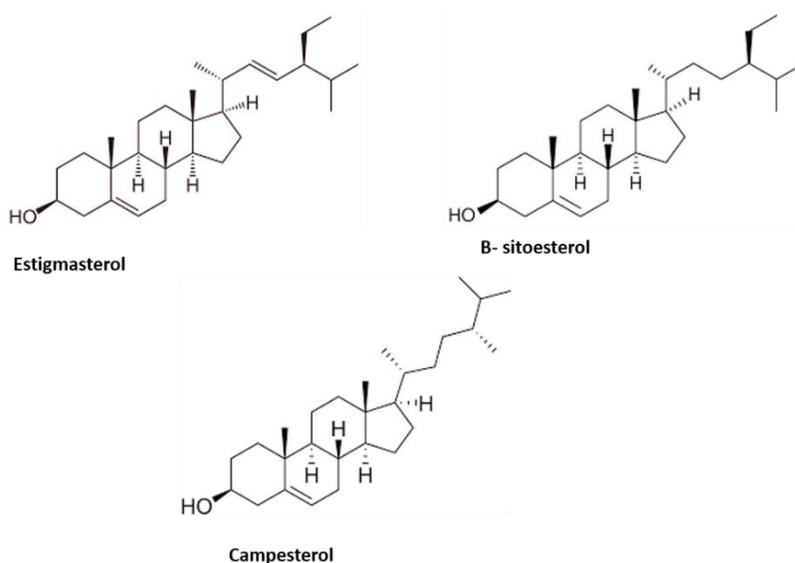


Figura 6. Estructura química de fitoesteroles

### 2.5.1.4. Carotenoides

Los carotenoides son pigmentos liposolubles y se encuentran de forma natural en algas, plantas, frutos, flores y microorganismos, estos compuestos son responsables de la gran mayoría de los colores verdes, anaranjados o rojos presentes en algunos vegetales y también animales. Se dividen en dos grandes grupos: los carotenos y las xantófilas. Los primeros están formados por átomos carbono e hidrógeno, dentro de este grupo se encuentran el  $\beta$ -caroteno,  $\alpha$ -caroteno, licopeno y criptoxantina. (Figura 7). Mientras que las xantófilas tienen además átomos oxígeno, algunos ejemplos son la luteína, zeaxantina, capsantina y

astaxantina (Figura 7), pigmentos que le dan la coloración amarillenta, roja y anaranjada (Barreiro, 2018; Quintana, 2018).

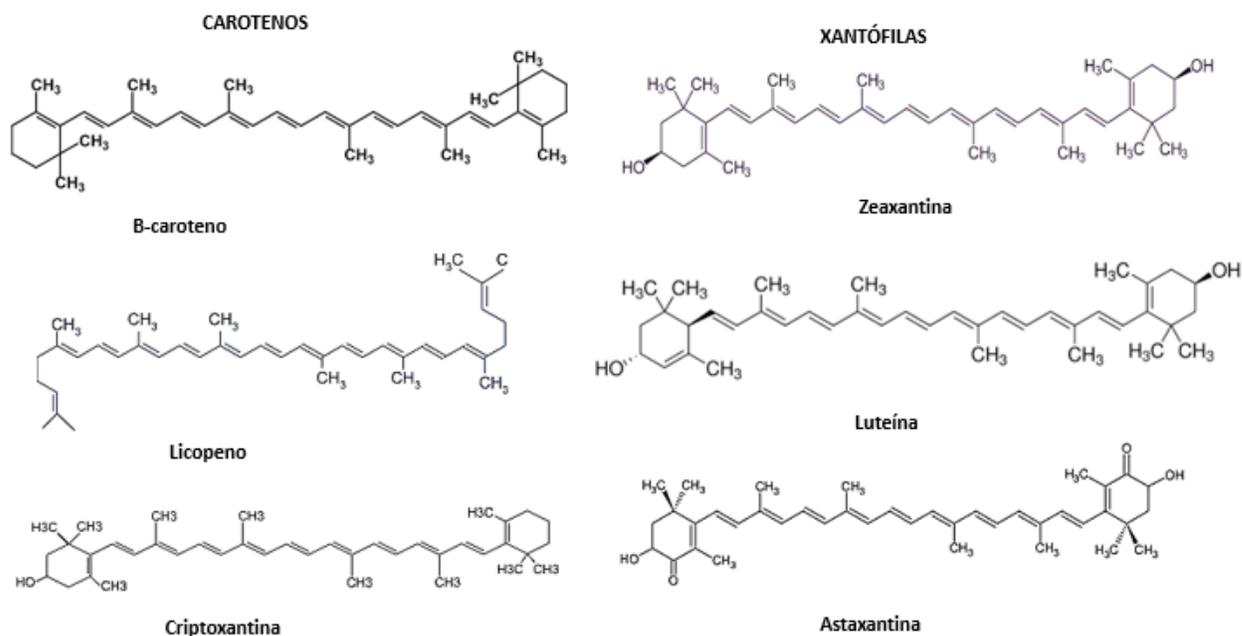


Figura 7. Estructura química de algunos carotenoides

## 2.5.2. Fenoles

Los fenoles o polifenoles, es otro de los grupos de metabolitos secundarios con mayor diversidad en las salvas, son un conjunto heterogéneo de moléculas que tienen en común uno o más anillos fenólicos, estos compuestos son solubles en agua y se caracterizan por su actividad antioxidante, debido al número de grupos hidroxilos que presentan. Este grupo puede dividirse en dos subgrupos: fenoles ácidos y flavonoides. (Wu, 2012). Las plantas, los sintetizan como producto de su metabolismo secundario, algunos de estos tienen funciones fisiológicas vegetales, mientras que otros participan en funciones de defensa ante situaciones de estrés y estímulos diversos (hídrico, luminoso, etc.) (Quiñones, 2012).

### 2.5.2.1. Flavonoides

Los flavonoides se caracterizan por tener una estructura de tres anillos formada de dos centros aromáticos y un heterociclo central oxigenado (Figura 8).

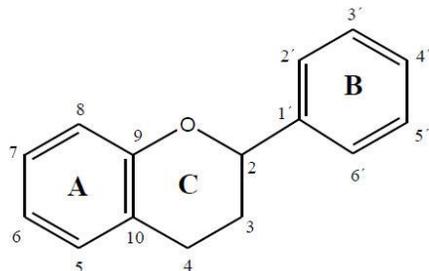


Figura 8. Estructura base de los flavonoides

Dentro de los flavonoides se incluyen a las flavonas, flavanonas, catequinas; este grupo es de los compuestos polifenólicos mejor estudiados. (Serrano, 2006; Wang, 2018). Se ha reportado que los flavonoides presentes en las salvias son flavonas principalmente de luteolina y apigenina, flavonoles como kaempferol, quercetina, así como sus respectivos derivados hidroxilados en el C-6, que son característicos de este género. (Lu, 2002). Los flavonoides pueden encontrarse en su forma libre o de forma glicosilada, se sabe que la presencia de azúcares aumenta la solubilidad, en medios acuosos, por lo tanto, se encuentran mayoritariamente en su forma glicosilada. (Kocak, 2016; Quiñones, 2012). En la Figura 9 se encuentran algunas de las estructuras de flavonoides característicos en especies de *Salvia*.

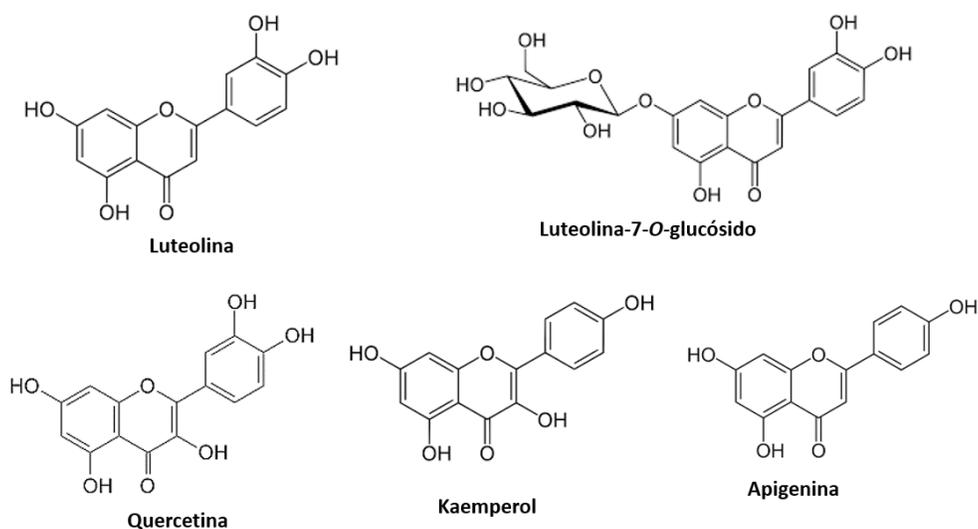


Figura 9. Estructura de flavonoides: Luteolina, luteolina-7-glucósido, quercetina, kaempferol, apigenina.

### 2.5.3. Antocianinas

Las antocianinas son pigmentos hidrosolubles con tonalidades que van del azul, morado y rojo, estos pigmentos son responsables del color en las flores de las plantas del género *Salvia* (Ishikawa, *et al.*,1999). Químicamente las antocianinas son glucósidos de las antocianidinas, es decir, están constituidas por una molécula de antocianidina, que es la aglicona, a la que se le une un azúcar por medio de un enlace  $\beta$ -glucosídico. (Mendoza, *et al.*, 2017). La antocianidina está formada por dos anillos aromáticos A y B unidos por una cadena de 3 carbonos, las variaciones estructurales del anillo B resultan en seis antocianidinas conocidas (Figura 10).

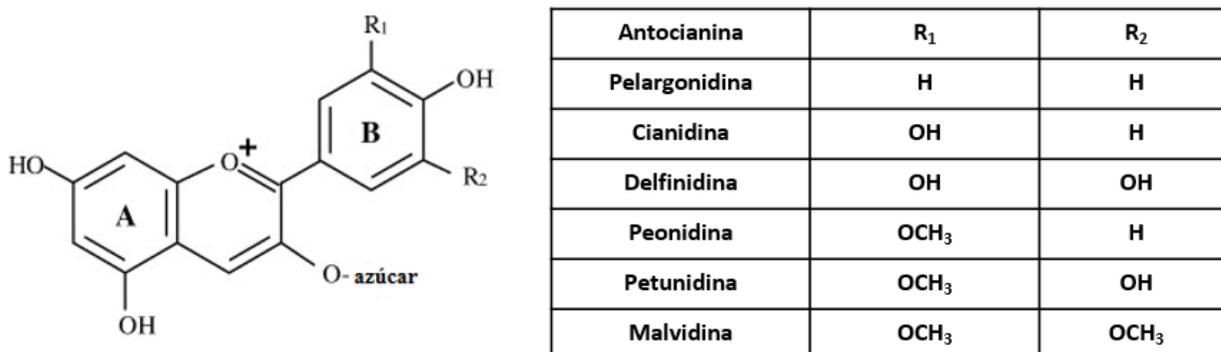


Figura 10. Estructura química y sustituyentes de las diferentes antocianinas.

En la naturaleza, las antocianinas siempre presentan sustituciones glicosídicas en las posiciones 3 y/o 5 con mono, di o trisacáridos que incrementan su solubilidad. Dentro de los sacáridos glicosilantes se encuentran la glucosa, galactosa, xilosa, ramnosa, arabinosa, etc. Otra posible variación en la estructura es la acilación de los residuos de azúcares de la molécula con ácidos orgánicos. Los ácidos orgánicos pueden ser alifáticos, tales como: malónico, acético, málico, succínico u oxálico; o aromáticos: p-coumárico, cafeico, ferúlico, sináptico, gálico, o p-hidroxibenzóico. (Figura 11) (Garzón, 2008)

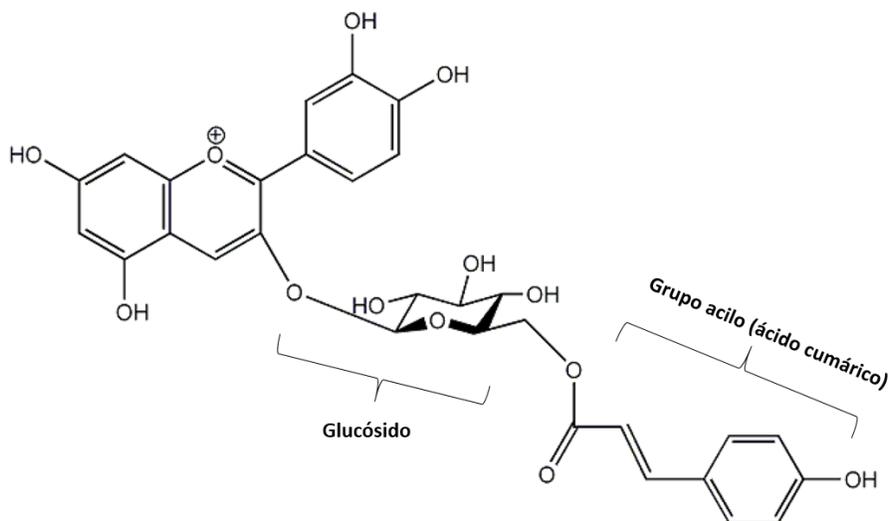


Figura 11. Estructura de una antocianina acilada (cianidina-3-O-(6-p-cumaroil) glucósido)

### 2.5.3. Antocianinas como colorantes de origen natural para alimentos

El color es uno de los atributos visuales más importantes en los alimentos debido a que el consumidor relaciona el color de este con la calidad del producto, por esto la industria alimentaria invierte en tener productos con colores apreciados y llamativos en sus productos, ya que la percepción visual es determinante en la compra o no de un producto. En los últimos años existe una tendencia de los consumidores por preferir cosas de origen natural frente a las sintéticas, y esto se ha trasladado a los ingredientes y aditivos empleados en la elaboración de un producto, esto principalmente por cuestiones psicológicas en la que el consumidor relaciona los aditivos de origen natural como más saludable y a los de origen sintético como tóxicos (Gould, 2009).

Debido a lo anteriormente mencionado la industria se ha visto interesada en reemplazar los colorantes sintéticos por naturales con el fin de adaptarse a las tendencias de los consumidores y satisfacer sus necesidades, además de atraer a más consumidores en un mercado cada vez más competitivo como lo es la industria alimentaria. Las antocianinas actualmente se utilizan en la elaboración de productos, la fuente principal de estas antocianinas son las extraídas de la uva y de

frutos rojos. Las antocianinas han despertado gran interés además de su uso como colorantes de origen natural porque se ha demostrado que estos compuestos tienen un papel benéfico a la salud, como la reducción de enfermedades coronarias, cáncer, diabetes y muchas otras (Garzón, 2008).

Por lo tanto, además de su función como colorantes las antocianinas tienen un beneficio en la salud, es decir además de colorantes son compuestos bioactivos, y representan un potencial para generar productos que además del aporte nutricional brinden compuestos que ofrezcan un beneficio a la salud de los consumidores. No obstante, a pesar de las ventajas que tienen estos compuestos existen factores que limitan sus aplicaciones debido a su baja estabilidad durante el almacenamiento y procesamiento (Garzón, 2008; Wrolstad, 2000).

#### **2.5.3.1. Factores que afectan la estabilidad de las antocianinas en alimentos**

La estabilidad y color de las antocianinas depende de una combinación de varios factores como la estructura y concentración de la antocianina, pH, temperatura, y la presencia de agentes copigmentadores (polifenoles o metales) (Mazza, 1990), así como la luz, oxígeno, enzimas, azúcares, ácido ascórbico, sulfitos (Rodríguez, 2019).

##### **Efecto del pH**

El pH tiene efecto en la estructura y la estabilidad de las antocianinas. (Figura 12). La acidez tiene un efecto protector sobre la molécula, en soluciones acuosas a valores de pH <2, la antocianina se encuentra en su forma más estable catión flavilio ( $AH^+$ ) de color rojo intenso. A valores de pH más altos ocurre una pérdida del protón y adición de agua en la posición 2, dando lugar a un equilibrio entre la base carbinol (B) y la forma chalcona (C), o de cadena abierta. Tanto la base carbinol como la chalcona, son bastante inestables y con una coloración incolora y amarilla, respectivamente. A valores de pH superiores a 7 se presentan las formas

quinoidales (A, A<sup>-</sup>) de color púrpura que se degradan rápidamente por oxidación con el aire (Gould, 2009; Garzón, 2008).

### **Efecto de la temperatura**

Incrementos de temperatura superiores a 40°C resultan en la degradación de las antocianinas por dos mecanismos la hidrólisis de enlace glucosídico con la eventual pérdida del azúcar, principalmente en la posición 3 de la molécula o bien por la ruptura hidrolítica generando la apertura de anillo con la consecuente producción de chalconas (Garzón, 2008; Castañeda, 2015).

### **Otros factores**

La luz de igual forma se ha visto que acelera la degradación de las antocianinas, Castañeda (2015) reporta que las antocianinas que presentan sustituyentes en el hidroxilo del carbono 5' son más susceptibles a la degradación por la luz.

El oxígeno de igual forma afecta la estabilidad de las antocianinas juntamente con el ácido ascórbico dado que la oxidación del ácido ascórbico provoca una pérdida de las antocianinas, una posible explicación es que el ácido favorece una condensación entre el ácido y las antocianinas. Por otro lado, incrementos en la actividad de agua del medio causan degradación de las antocianinas probablemente debido a una mayor interacción entre el agua y el catión flavilio para formar la base carbinol. (Garzón, 2008).

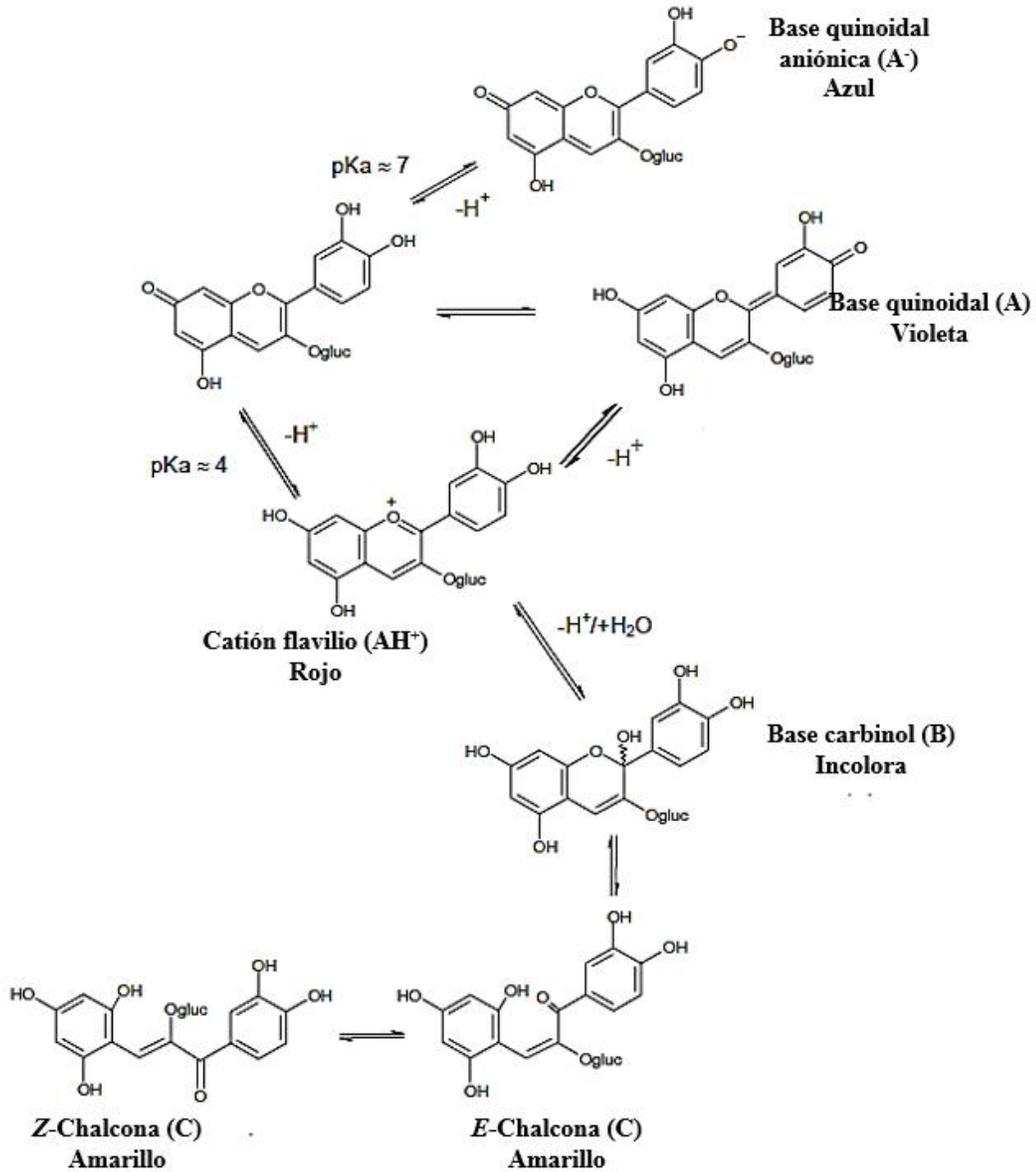


Figura 12. Transformaciones estructurales de antocianina (cianidina-3-glucosido) en soluciones acuosas dependiente del pH. (Traducción de Gould, 2009)

## Estructura química

Como se mencionó anteriormente en cuanto a la estructura de estos pigmentos, pueden existir antocianinas aciladas o no, y se ha estudiado y demostrado que las antocianinas aciladas presentan varias ventajas en cuanto a su estabilidad frente a las no aciladas. La acilación del glicósido de las antocianinas puede mejorar la resistencia a una variedad de factores fisicoquímicos y bioquímicos (enzimas

digestivas), como por ejemplo calor, luz, cambios de pH, peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), y digestión gastrointestinal y pancreática; estando de forma natural, o durante el procesamiento y almacenamiento como lo explica en su revisión Chang (2017):

- Durante el procesamiento y almacenamiento las antocianinas aciladas de col roja fue más estable al calentamiento a  $80^{\circ}C$  que las mismas antocianinas no aciladas presentes en uvas rojas.
- En cuanto a su resistencia a la luz, las aciladas presentaron una mayor estabilidad que las no aciladas presentes en jugos de frutas.
- La respuesta de las antocianinas aciladas con respecto al pH, es que son más estables a valores más altos de pH que las no aciladas, que solo permanecen estables a pH en el que domina el catión flavilio.
- Al evaluar la estabilidad de las aciladas a la digestión pancreática después ser absorbida por animales, se observa que también son más estables que las no aciladas.

Con lo antes mencionado observamos que la acilación de antocianinas juega un papel clave en la estabilidad del color de las antocianinas. (Gould, 2009).

### **2.5.3.2. Estabilización de antocianinas**

Como se mencionó anteriormente existen muchos factores que afectan la estabilidad de estos colorantes para poder emplearlos como colorantes naturales en la elaboración de alimentos, por lo que existen numerosos estudios para lograr una mejor estabilización de estos colorantes y favorecer su posible uso, las modificaciones probadas han sido glicosilación y acilación de antocianinas empleando enzimas, la encapsulación de antocianinas así como el uso de agentes copigmentadores que al estar en contacto con la antocianina puede estabilizarla.

### ***Copigmentación de antocianinas***

La copigmentación de antocianinas con otros componentes (copigmentos) es el mecanismo de estabilización de color en las plantas. (Gauche, 2010). Un copigmento solo es por lo regular incoloro, pero al ser añadido a una solución con antocianinas mejora en gran manera el color de la solución. El copigmento puede ser un flavonoide, alcaloides, aminoácidos, ácidos orgánicos, nucleótidos, polisacáridos, metales o mismas antocianinas (Bakowska, 2003); y puede ocurrir de forma intramolecular e intermolecular. En las primeras el copigmento se une covalentemente a un cromóforo de antocianina, mientras que en las intermoleculares los flavonoides incoloros u otros compuestos fenólicos se relacionan con la antocianina con fuerzas hidrófobas débiles (Eiro, 2002).

La copigmentación intramolecular más específicamente consiste en el apilamiento de moléculas del copigmento sobre las antocianinas, y como estos tienen electrones que pueden asociarse con el ion flavilio, proporcionan protección de un ataque nucleofílico del agua. El ataque del agua conduce a la formación de la base carbinol y chalcona, que tienen como consecuencia la pérdida del color. (Aubert, 2001; Bakowska, 2003). Como consecuencia se presentan dos efectos en las antocianinas, un aumento en la intensidad del color, conocido como efecto hiperacrómico, y el efecto batocrómico, que es un aumento en la longitud de onda de absorbancia máxima dentro del espectro visible de la antocianina-copigmento al ser comparada con la antocianina libre. (Eiro, 2002)

#### **2.5.4. Ácidos fenólicos**

Los ácidos fenólicos constituyen la mayor parte de los compuestos solubles en agua de las salvia, existen un gran número de compuestos de este grupo identificados, la mayoría de los ácidos fenólicos presentes en las salvia son exclusivos de este género como los ácidos salvianólicos A-K, y además de otros derivados del ácido cafeico, este juega un papel muy importante en la bioquímica de la familia

*Lamiaceae*, es el bloque de construcción para una variedad de metabolitos producto de la condensación de este ácido, dando lugar a dímeros, trímeros, y tetrameros. El más destacado, que se encuentra distribuido en todas las plantas de esta familia es un dímero, el ácido rosmarínico. (Lu, 2002).

Los ácidos salvianólicos son oligómeros del ácido cafeíco, por ejemplo, el ácido salvianólico A, es un trímero, mientras que el salvianólico B es un tetramero, y ambos compuestos han presentado interesantes propiedades antioxidantes, antitumorales y efectos de protección cardiovascular. (Fotovvat, 2019). Además de los ácidos característicos de las salvias también contienen ácidos distribuidos en una gran cantidad de plantas como el ácido ferúlico y ácido clorogénico (Lu, 2002). En Figura 13 se observan las estructuras químicas de los ácidos fenólicos más abundantes en las salvias.

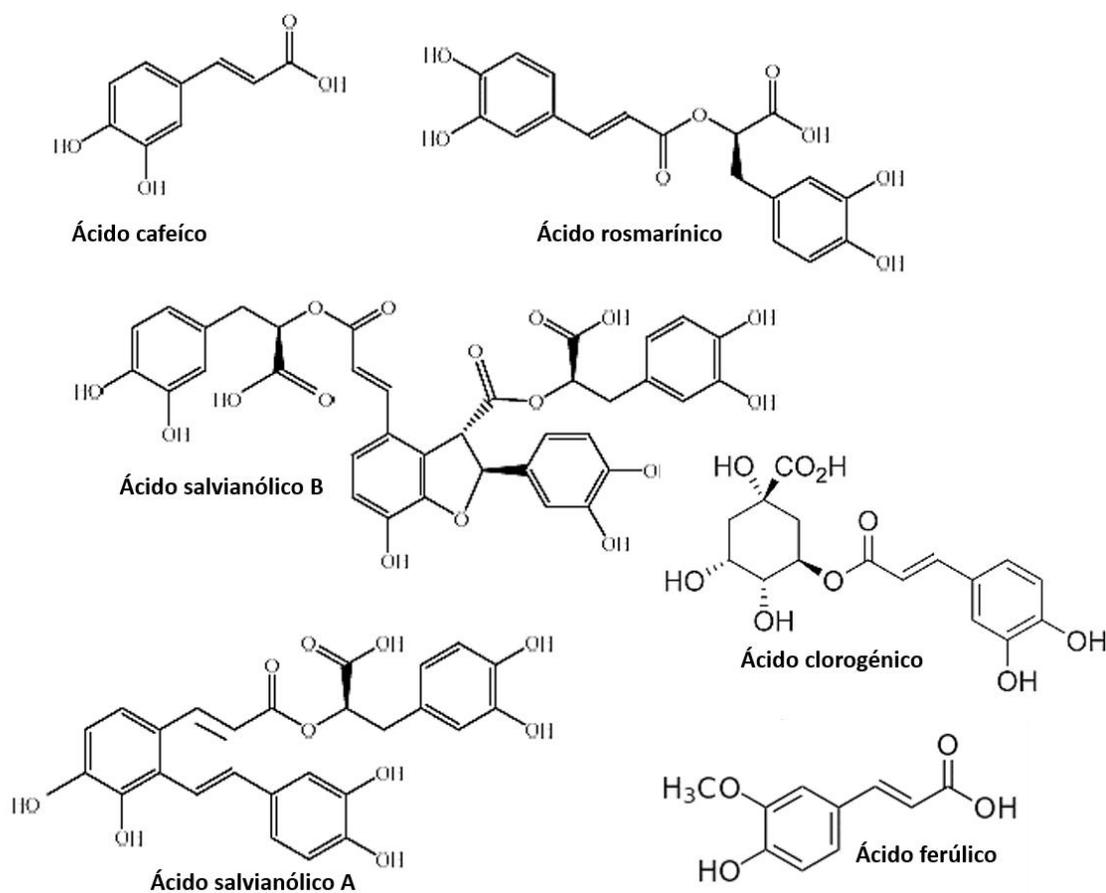


Figura 13. Ácidos fenólicos característicos del género *Salvia*

### 2.5.4.1. Ácido rosmarínico

El ácido rosmarínico es un ácido fenólico que también se conoce como ácido labiaténico, por ser encontrado en las plantas de la familia *Lamiaceae* (antes *Labiatae*) como *Melissa officinalis*, *Rosmarinus officinalis* y *Salvia officinalis*. (Ngo, *et al.*, 2018), desde un punto de vista químico, RA (fórmula molecular:  $C_{18}H_{16}O_8$ , masa molecular: 360.3 g/mol es un éster de ácido cafeíco y ácido 3,4-dihidroxifeniláctico. (Figura 14). Este compuesto se aisló por primera vez en 1958 por Scarpi y Oriente de *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae), por lo tanto, el nombre deriva del de la planta.

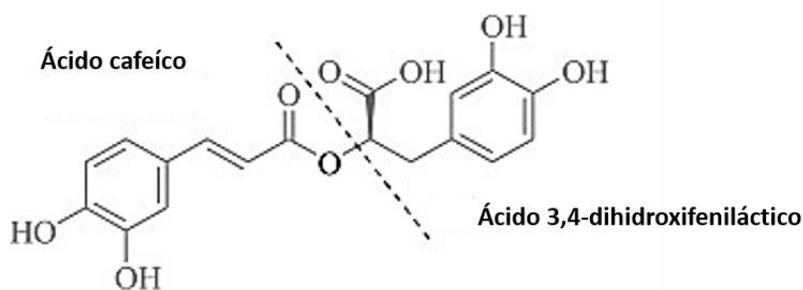


Figura 14. Estructura química del ácido rosmarínico

El ácido rosmarínico es un polvo cristalino amarillo-blanco con un punto de fusión de 174°C, es un compuesto soluble en disolventes orgánico y un poco menos soluble en agua, Abdelkarim 2016 y Zibetti, 2016 reportan que es más soluble en acetato de etilo, metanol y etanol. La extracción de AR de plantas se realiza con disolventes orgánicos polares como metanol, etanol, acetona, agua y mezclas de estos, también se han reportado extracciones con cloroformo y acetato de etilo (Silk, 2019).

Según lo reportado, este ácido es el mayor responsable de la capacidad antioxidante del aceite esencial de romero que ya es utilizado en la industria alimentaria con este propósito. (Ávila *et al.*, 2011). Y en salvias también es considerado el antioxidante fenólico más importante de estas plantas (Wu, 2012).

Las actividades biológicas que se ha encontrado y que más interés han tenido en la industria alimentaria, nutraceútica y cosmética han sido como antioxidante y por sus propiedades contra la diabetes, en estudios se ha demostrado que este ácido puede ser inhibidor de la enzima  $\alpha$ -amilasa y  $\beta$ -glucósidasas enzimas implicadas en el aumento de la glucosa en sangre, por lo que se ha comprobado su uso retrasando la absorción de glucosa en la diabetes tipo 2 (Ngoa, 2018).

## 2. Metodología



Figura 15. Esquema general de la metodología

A continuación, se presentan un listado de las muestras empleadas, así como los equipos e instrumentos, reactivos y disolventes que se emplearon para la realización de este trabajo.

### **Muestras vegetales**

- Salvias: *S. mexicana*, *S. fruticulosa*, *S. tiliifolia*, *S. polystachya*, *S. purpurea*, *S. microphylla*, *Salvia sp*, *S. amarissima*, *S. leucantha*, *S. hispánica*
- Romero (*Rosmarinus officinalis*): Romero residual de la extracción de aceite esencial de romero, romero comercial marca Terana®, Lote 19F40992
- Extractos de antocianinas de alache (*Anoda cristata*)

### **Equipos e instrumentos**

- Molino para café casero marca KRUPS GX 4100
- Sonificador Brason 3510 potencia: 100W, 42Hz
- Rotavapor R-215, con baño de calentamiento B-491, controlador de vacío V-850, Bomba de vacío V-700. Marca Büchi.
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución HPLC: Auto inyector waters 2707, bomba Waters 1525, detector UV Waters 2478 y desgasificador. Software Empower
- Columna Hypersil GOLD 250x4.6mm, 5µm. Thermo Scientific
- Espectrofotómetro GBC-CintraI
- Lámpara UV como revelador (254nm-366nm), CAMAG
- Cromatoplasmas de Silica gel 60 F<sub>254</sub>

### **Reactivos y disolventes**

- Estándares de ácido ferúlico, ácido clorogénico, ácido cafeíco, ácido cumárico, luteolina, kaempferol, quercetina, rutina, ácido ursólico/ácido oleanólico, esteroides
- Reveladores: anisaldehído, cloruro ferrico, DPPH

- Disolventes: etanol, metanol, cloroformo, acetato de etilo, hexano, diclorometano, acetona, tolueno, butanol, agua desionizada, acetonitrilo grado HPLC

## **Etapa 1. Recolección y preparación de las muestras**

### ***Salvias***

La recolección de salvias se realizó en tres lugares diferentes; Ciudad Universitaria, Cd. de México: de la sección de plantas medicinales del Jardín Botánico del Instituto de biología de la UNAM, cerca de la Facultad de Química y una especie de Nopala, Hidalgo. El secado de las salvias se realizó a temperatura ambiente, cubriéndolas de la luz del sol. Una vez secas se separaron en 3 órganos de la planta: hojas, tallos y flores; cada una se molió y almacenó en recipientes cerrados hasta su uso para las determinaciones.

### ***Romero (Rosmarinus officinalis)***

La muestra de romero residual de la extracción de aceite esencial fue secada en estufa a una temperatura de 60°C y la muestra comercial de romero ya seca, fueron molidas y guardadas en frascos para su posterior determinación.

## **Etapa 2. Elección del disolvente de extracción**

La extracción de los compuestos de interés se realizó empleando 3 mezclas de disolventes, metanol:agua:ácido acético (80:19:1), etanol:agua:ácido acético (80:19:1) y acetona:agua:ácido acético (40:60:1) para determinar el de mayor rendimiento de extracción de los compuestos de interés (fenoles, flavonoides y antocianina totales). Se pesó 0.4g de la muestra de las flores de la *Salvia sp.* en un matraz Erlenmeyer de 50 mL y se agregaron 8 mL del disolvente, esta relación de

1:20 de muestra:disolvente se utilizó en todas las determinaciones en función de la cantidad de muestra. La muestra se sonicó por 20 min. a temperatura ambiente. El extracto se filtró al vacío y se almacenó.

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente con una prueba de análisis de varianza (ANOVA) de un factor, a un nivel de confianza de 95 %, y posteriormente para determinar con que disolvente existía diferencia se realizó la prueba Tukey al 95 % de confianza (Anexo IV).

### **Etapa 3. Cuantificación de fenoles, flavonoides y antocianinas**

#### ***Fenoles***

La determinación de fenoles totales se determinó por el método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu. Colocando 100  $\mu$ L del extracto de acetona de cada salvia, al que se añadió 2 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (2%), después de 2 min. se agregó 100  $\mu$ L del reactivo de Folin: Ciocalteu (diluido 1:1); pasados 30 min se leyó la absorbancia en el espectrofotómetro a 760 nm, con un blanco de metanol. El contenido de fenoles se calculó empleando una curva patrón de ácido gálico. ( $y=2.4511x-0.0047$ ,  $r^2=0.9974$ , Anexo I). Expresando el resultado como mg de ácido gálico/ g de muestra seca (mg EAG/g (BS)).

#### ***Flavonoides***

Los flavonoides de igual forma se determinaron con el método espectrofotométrico reportado por Khanam y Oba en 2013. Colocando 100  $\mu$ L del extracto de acetona de cada salvia, al que se añadió 140  $\mu$ L de  $\text{H}_2\text{O}$  y 30  $\mu$ L de  $\text{NaNO}_2$  (5%), después de 5 min. se agregaron 30  $\mu$ L de  $\text{AlCl}_3$  (10% en etanol), 200  $\mu$ L de  $\text{NaOH}$  (1M) y 500  $\mu$ L de  $\text{H}_2\text{O}$ . La absorbancia fue leída en el espectrofotómetro a 415 nm, con un blanco de  $\text{H}_2\text{O}$ . El contenido de flavonoides se obtiene empleando una curva patrón

de catequina. ( $y=1.5404x-0.0071$ ,  $r^2=0.9983$ , Anexo II). Expresando el resultado como mg de catequina/ g de muestra seca (mg EC/g (BS)).

### ***Antocianinas***

El contenido de antocianinas se determinó por el método de pH diferencial AOAC 2005.02. en el que se añaden 200  $\mu$ L del extracto metanólico y 1800  $\mu$ L de buffer de acetatos (pH 4.5, 0.4M) y otra con el mismo procedimiento agregando buffer de cloruro (pH 1, 0.025M). Ambas muestras se leen a una absorbancia de 510 nm y 700 nm. Expresando el resultado como mg de cianidina-3-glucósico/ g de muestra seca (mg C3G/g (BS)). Los cálculos para determinar este contenido se muestran el anexo III.

Nota: Cada una de estas tres determinaciones de cada muestra fue realizada por triplicado, y se hicieron las diluciones pertinentes para que cada muestra tuviera una lectura adecuada en el espectrofotómetro. Los datos obtenidos se trataron estadísticamente obteniendo la media, la desviación estándar de las 3 determinaciones y el coeficiente de variación establecido entre cada medición fue de máximo 10 %.

### **Etapa 4. Análisis cualitativo de compuestos bioactivos por cromatografía en capa fina**

Se realizó la identificación por cromatografía en capa fina (CCF) en los extractos obtenidos con acetona de cada parte y especie de salvia de los siguientes fenoles ácidos: ácido rosmarínico, ácido cafeico, ácido clorogénico; y los flavonoides identificados fueron: rutina, quercetina, kaempferol, y luteolina.

De un extracto con Metanol:Diclorometano (1:1) de cada salvia se identificaron carotenos al igual que terpenos: ácido ursólico y ácido oleanólico, ácido betulínico, y  $\beta$ - amarina; y para el caso de los esteroides con el extracto anterior se identificó estigmasterol.

En la identificación del perfil de antocianinas se realizó únicamente en las flores empleando el extracto de metanol, y sin colocar estándares, se determinó el perfil según el valor del factor de retención (Rf).

La fase estacionaria en cada cromatografía fue una placa de sílice 60F, la fase móvil se modificó según la polaridad de los compuestos y se muestran en la Tabla 6. Se colocaron los estándares comerciales de los compuestos de interés y los extractos de las salvias para la identificación de cada grupo de compuestos y se eluyeron juntamente para su identificación.

*Tabla 6. Eluyentes empleados para CCF de los compuestos.*

<b>Grupo</b>	<b>Compuesto</b>	<b>Eluyente</b>
Fenoles	Ácido rosmarínico	Cloroformo:Acetato de Etilo:Acetona:Ácido fórmico (40:30:20:10)
	Ácido cafeico	
	Ácido clorogénico	Acetato de etilo: H <sub>2</sub> O: ácido acético (3:2:1)
Flavonoides	Quercetina	Acetato de Etilo:Ácido acético:Ácido fórmico:H <sub>2</sub> O:Tolueno (100:10:10:25:20:30)
	Luteolina	
	Kaempferol	
	Rutina	Acetato de Etilo:Ácido acético:Ácido fórmico:H <sub>2</sub> O (100:10:10:25:20)
Antocianinas		Butanol:Ácido acético:H <sub>2</sub> O (6:1:3)
Triterpenos Esteroles Carotenos	Ácido ursólico	Hexano:Acetato de etilo (7:3) con gotas de ácido acético
	Ácido oleanólico	
	Ácido betulínico	
	β-amirina	

## Etapa 5. Cuantificación de ácido rosmarínico en salvias por HPLC

### **Método de HPLC**

La identificación por HPLC fue por el método reportado por Torres, 2016 para ácidos fenólicos se realizó empleando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 320 nm, en donde se utilizó una columna Hipersil-Gold C18 (250x4.5 mm, 5µm), 20 µL de inyección, flujo de 1.2 mL/min; las fase móviles que se utilizaron fueron A:H<sub>2</sub>O/ácido fórmico/acetonitrilo (90:10:01) y B:acetonitrilo (100) con el siguiente gradiente de elución (Tabla 7).

Tabla 7. Gradiente de elución en HPLC para la identificación de ácidos fenólicos y antocianinas

<b>Tiempo</b>	<b>% A</b>	<b>% B</b>
0-45	97	3
45-47	75	25
47-56	70	30
56-60	97	3

### **Preparación de muestras**

Primeramente, se preparó una muestra como lo descrito en la etapa 2, con 1 g de muestra, empleando la mezcla de acetona como disolvente, obteniendo un extracto crudo el cual se semipurificó para poder obtener un extracto concentrado enriquecido en los compuestos de interés.

### **Semipurificación del extracto**

El extracto crudo obtenido se semipurificó según la metodología propuesta por M. en C. Andrea Torres Alcalá como se menciona a continuación, evaporando la acetona y a la fracción acuosa se le realizó lavados con aproximadamente 20 ml de hexano (7 ml x3), la fase acuosa resultante de este primer lavado posteriormente se lavó con 45 ml de acetato de etilo (15 ml x 3); se conservó la fase orgánica y se concentró a sequedad obteniéndose un extracto concentrado (EC). El EC se pesó

y se disolvió con metanol a una concentración conocida, se filtró con una membrana de 0.45 µm PTFE, y finalmente se inyectó en el equipo.

### ***Obtención del estándar de ácido rosmarínico***

El estándar de ácido rosmarínico se aisló y purificó de romero (*Rosmarinus officinalis*), de la siguiente forma: Se utilizó 2 g de tallos de romero residual de la extracción de aceite esencial previamente secado y molido, y se realizó una extracción con acetona como lo mencionado en la etapa 2, y la semipurificación antes descrita. El EC se disolvió en metanol y se realizó una cromatografía en capa fina semipreparativa, en una placa de sílice 60 F<sub>254</sub>, empleando como eluyente cloroformo:acetato de etilo:acetona:ácido fórmico (40:30:20:10), la fracción del ácido rosmarínico fue extraída con metanol y concentrada a sequedad. La identidad del sólido obtenido se comprobó por HPLC-masas. Con este estándar obtenido se realizó la curva patrón para la cuantificación de ácido rosmarínico.

### ***Cuantificación de ácido rosmarínico en Salvias***

La cuantificación de ácido rosmarínico se realizó en nueve especies de salvias únicamente, que sobresalieron en contenido de fenoles, el método empleado para la preparación de las muestras fue la semipurificación del extracto, y empleando el método para HPLC antes descrito.

## **Etapa 6. Evaluación del mejor método de extracción de ácido rosmarínico**

En esta etapa se evaluaron 6 condiciones de extracción y semipurificación de ácido rosmarínico para la obtención de un concentrado rico en ácido rosmarínico (ECAR) en muestras de romero residual de la extracción de aceite esencial. Se probaron 2

condiciones de extracción con dos distintos disolventes: agua y acetona:agua:ácido acético (40:60:0.1). y 2 condiciones de semipurificación: extracción líquido- líquido, como se describe en la etapa de preparación de semipurificación del extracto, guardando las relaciones de volumen y masa. Así como una extracción sólido-líquido utilizando como fase sólida Amberlite 7 XAD (5 g), y la desabsorción de esta misma probando 2 disolventes: etanol y acetato de etilo, dando un total de 6 métodos diferentes (Tabla 8), se explica de una manera más clara en las Figura 16 y 17 cada uno de los métodos, así como sus condiciones.

Tabla 8. Condiciones de extracción de ácido rosmarínico probados

<b>Condiciones</b>			
<b>Extracción</b>	<b>Semipurificación</b>	<b>Disolvente</b>	<b>Abreviación del método</b>
Agua caliente	Extracción líquido-líquido	Acetato de etilo	<b>1:</b> H <sub>2</sub> O/liq-liq/AcEt
	Extracción sólido-líquido	Etanol	<b>2:</b> H <sub>2</sub> O/sol-liq/EtOH
		Acetato de etilo	<b>3:</b> H <sub>2</sub> O/sol-liq/AcEt
Acetona: H <sub>2</sub> O: ácido acético	Extracción líquido-líquido	Acetato de etilo	<b>4:</b> Acet/liq-liq/AcEt
	Extracción sólido-líquido	Etanol	<b>5:</b> Acet/sol-liq/EtOH
		Acetato de etilo	<b>6:</b> Acet/sol-liq/AcEt

Además de utilizar romero residual, se probaron los 2 mejores métodos (método 3 y 4) para la obtención del extracto enriquecido ahora con muestras de 50 g romero comercial para cada uno. Después de comprobar el mejor método este se probó con la muestra de salvia con un mayor contenido de AR, las proporciones de volumen y masa se respetaron según lo establecido en cada metodología.

## Extracción con agua

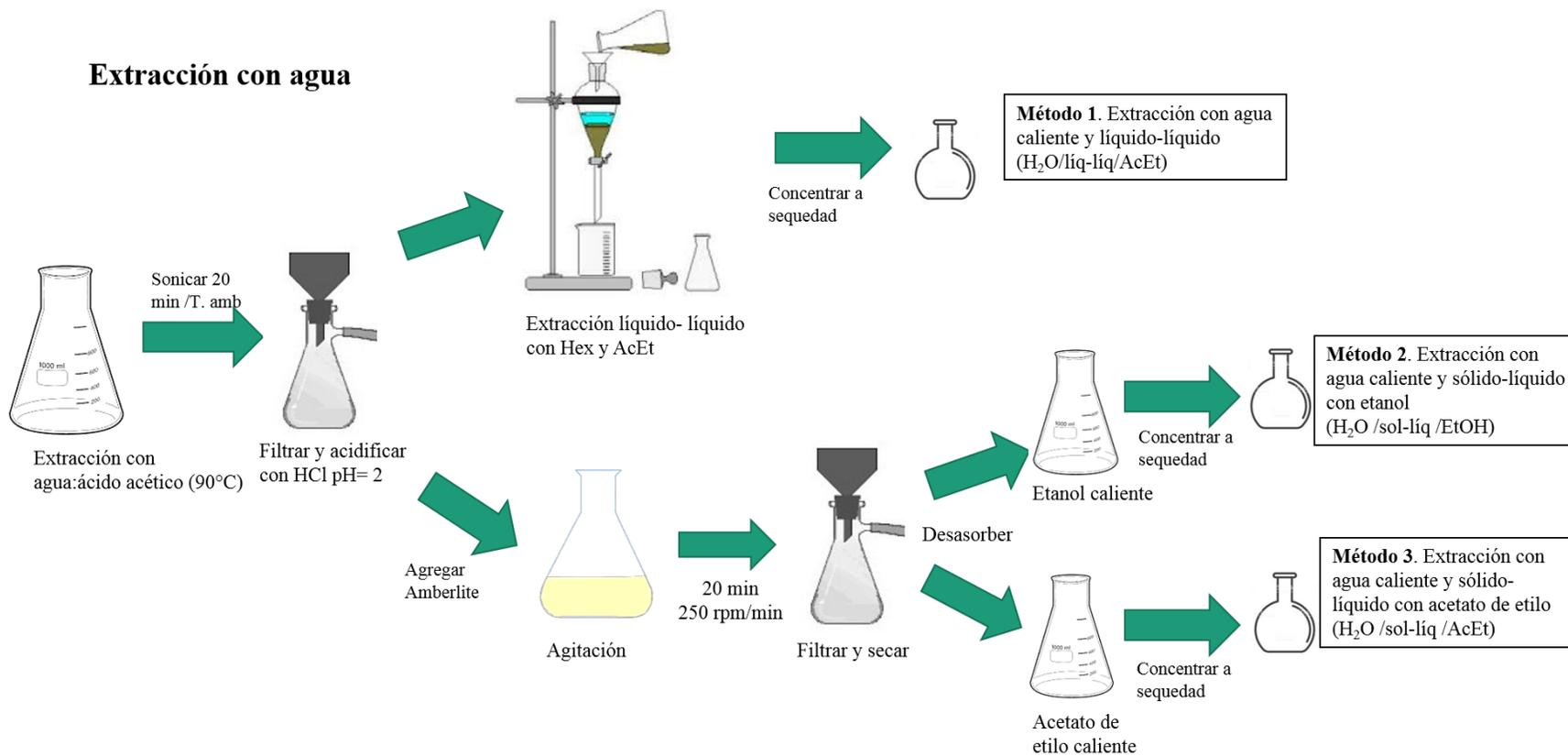


Figura 16. Esquema de método de extracción de ácido rosmarínico (Método 1-3)

## Extracción con acetona

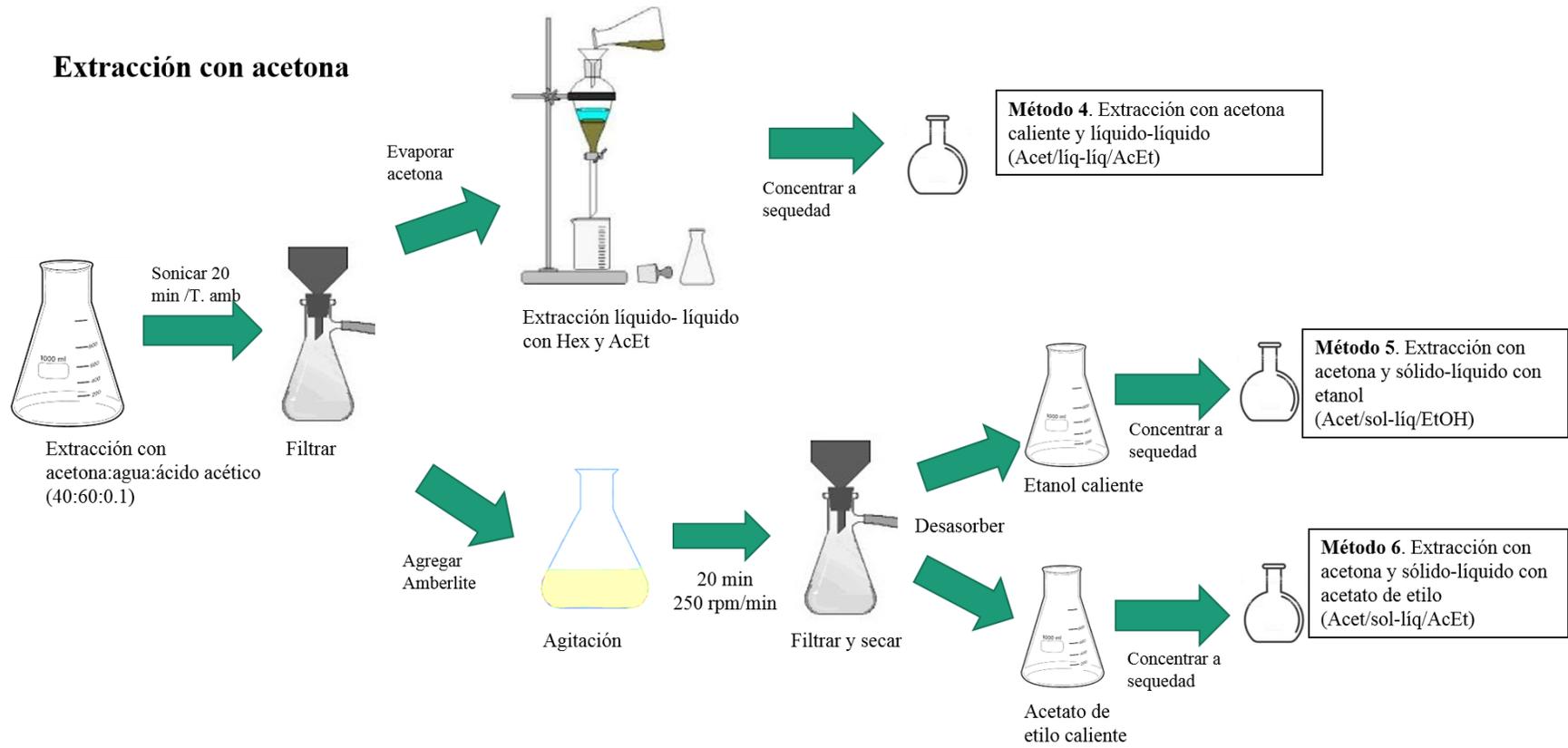


Figura 17. Esquema de método de extracción de ácido rosmarínico (Método 3-6)

## **Etapa 7. Prueba de estabilización de antocianinas con ácido rosmarínico**

### ***Prueba de resistencia al calor de antocianinas con ácido rosmarínico***

Se realizó una prueba de estabilización por copigmentación de antocianinas aislada de flores de alache (*Anoda cristata*) proporcionado por Cecilia Romero en la investigación de su tesis en proceso, en este extracto la antocianina mayoritaria es definidina-3-rutinosido ya purificada. Esta antocianina fue la que se mezcló con un extracto enriquecido en ácido rosmarínico (agente copigmentador), se realizó a una relación de 1 mg de antocianina con 10 mg del extracto concentrado que contenía 3 mg de ácido rosmarínico, en 5 ml de solución acuosa de pH 2 con ácido láctico, la solución se colocó en viales de vidrio transparentes cerrados y se colocaron en un baño a 60 °C por 60 min. Así mismo, se colocó un control en el que solo se añadió la antocianina sin el agente copigmentador, cada extracto se realizó por duplicado, teniendo un total de cuatro muestras.

Posterior al tratamiento térmico los cuatro viales con soluciones fueron colocados en una ventana en contacto directo con la luz de sol. Se realizaron observaciones cualitativas del color que presentaba las soluciones control y copigmentado antes y después del tratamiento térmico, así como con el paso de los días, hasta la pérdida de color.

### ***Aplicación de ácido rosmarínico en una bebida***

Se elaboro una bebida con el fin de probar una posible aplicación del ácido rosmarínico como agente copigmentador de antocianinas para aportar color a la bebida. La bebida se preparó con los siguientes ingredientes: agua, azúcar, ácido láctico, saborizante artificial sabor fresa, y el colorante elaborado con antocianina de origen natural y extracto de romero extraído con acetona:agua:ácido acético (40:60:1), a la cual se le evaporo la acetona quedando únicamente con la fracción acuosa de romero. Se prepararon un total de 4 bebidas a dos pH diferentes, 2 bebidas con un pH 3 y 2 con pH>3, todas las bebidas fueron sometidas a un proceso

térmico de pasteurización a 85 °C/15 min y envasada en frascos de vidrio en caliente, previamente esterilizados para generar el vacío. Las bebidas fueron colocadas en 2 circunstancias ambientales diferentes, cerca de una ventana en donde estaba en contacto con los rayos del sol y a temperatura ambiente, y en refrigeración (4 °C), en cada una de las condiciones se colocaron 2 bebidas, una bebida de pH 3 y una de pH>3. Las bebidas fueron monitoreadas por el cambio de color de manera visual con el paso de los días.

## 2. Resultados y discusión

### Etapa 1. Recolección y preparación de muestras

Se recolectaron un total de 10 especies de salvias, las cuales fueron secadas y separadas en hojas, tallos y flores; cada parte fue molida, etiquetada y almacenada a temperatura ambiente. En la Tabla 9 se muestra la especie, así como fecha y el lugar donde fue recolectada.

Tabla 9. Datos de muestras estudiadas de salvias

<b>Especie</b>	<b>Lugar de recolección</b>	<b>Fecha de recolección</b>
<i>Salvia mexicana</i>	Ciudad Universitaria UNAM	Octubre 2018
<i>Salvia fruticulosa</i>	Jardín Botánico del Instituto de Biología UNAM	Octubre 2018
<i>Salvia tiliifolia</i>	Jardín Botánico del Instituto de Biología UNAM	Octubre 2018
<i>Salvia polystachya</i>	Jardín Botánico del Instituto de Biología UNAM	Octubre 2018
<i>Salvia purpurea</i>	Jardín Botánico del Instituto de Biología UNAM	Octubre 2018
<i>Salvia microphylla</i>	Jardín Botánico del Instituto de Biología UNAM	Octubre 2018
<i>Salvia sp.</i>	Nopala Hidalgo	---
<i>Salvia amarissima</i>	Jardín Botánico del Instituto de Biología UNAM	Octubre 2018
<i>Salvia leucantha</i>	Jardín Botánico del Instituto de Biología UNAM	Octubre 2018
<i>Salvia hispánica</i>	Sembrada individualmente de chía comercial	Junio 2018
<i>Salvia polystachya 2</i>	Facultad de Química UNAM	Noviembre. 2018



Figura 18. *Salvia mexicana*  
CONABIO



Figura 19. *Salvia fruticulosa*



Figura 20. *Salvia tiliifolia*



Figura 21. *Salvia polystachya*



Figura 22. *Salvia purpurea*



Figura 23. *Salvia microphylla*



Figura 24. *Salvia* sp.  
CONABIO



Figura 25. *Salvia leucantha*



Figura 26. *Salvia amarissima*



Figura 27. *Salvia hispánica*  
CONABIO

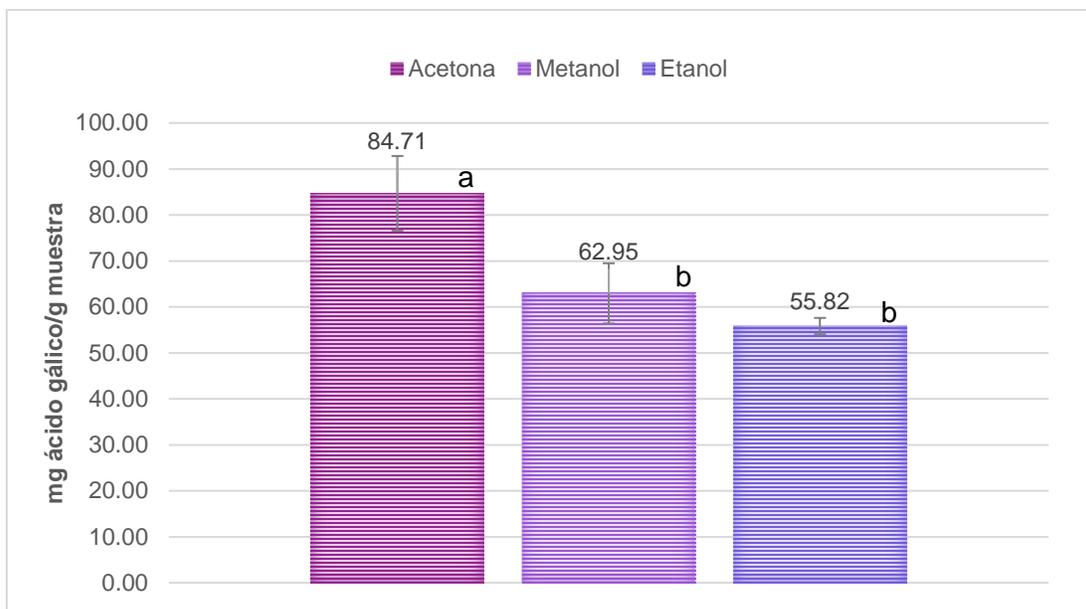
De las diferentes muestras y la separación en los tres órganos de las 11 salvias diferentes se obtuvieron un total de 31 muestras diferentes que se estudiaron, a causa de que de la especie de *S. hispánica* se contó únicamente con las hojas y tallos, mientras que en *Salvia sp.* solamente se estudió flores y tallos; de las demás especies si se contó con las hojas, tallos y flores de cada una.

## Etapa 2. Elección del disolvente de extracción

En esta etapa las flores de la *Salvia sp.* fue la que se tomó como modelo para determinar que disolvente es el más adecuado para la extracción de los compuestos bioactivos de nuestro interés (fenoles, flavonoides y antocianinas totales), la mezcla de disolventes: agua, etanol, metanol y acetona se utilizan comúnmente en la extracción de fenoles de plantas de la familia *Lamiaceae*, (Sun y Ho, 2005), por lo tanto, con estos se probó la eficiencia de extracción en las muestras de salvias. los resultados se muestran en las Gráficas 1-3.

### Fenoles

Los fenoles determinados en flores de *Salvia sp* empleando cada uno de los diferentes disolventes: acetona, metanol y acetona se observan en la Gráfica 1, los resultados están expresados en mg de ácido gálico/g muestra base seca.

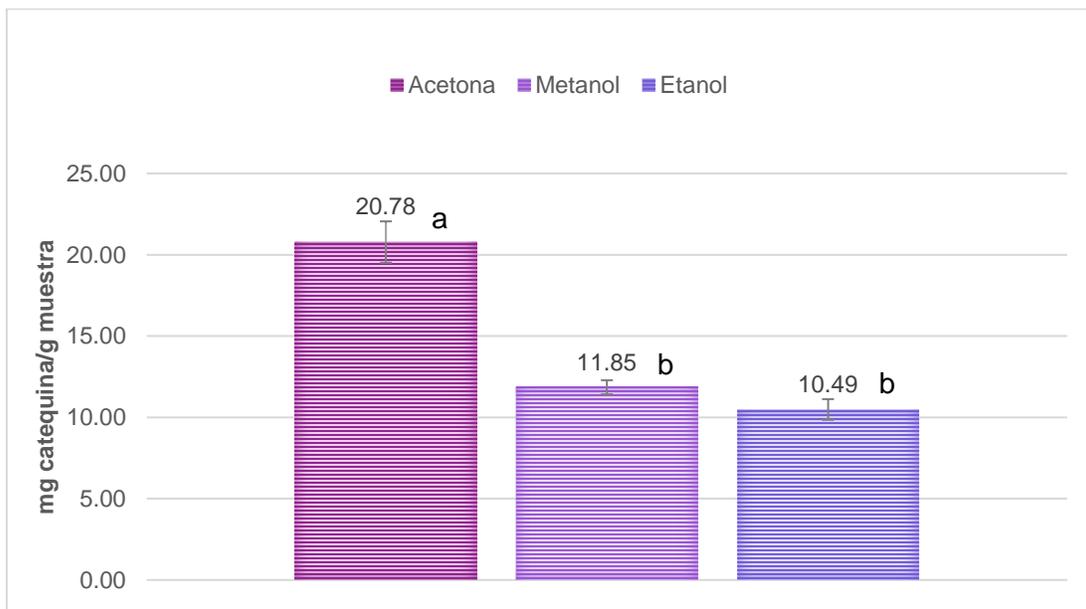


Gráfica 1. Extracción de fenoles con diferentes disolventes para *Salvia sp*  
 Los valores con diferentes letras fueron significativamente diferentes con Tukey al 95 %.

En la Gráfica 1 se observa que se obtuvieron una mayor concentración de fenoles utilizando la mezcla de acetona:H<sub>2</sub>O, en comparación con los alcoholes, es decir una mayor polaridad de la mezcla del disolvente favorece una mejor extracción (Tapia *et al.*, 2014). Pues esta mezcla al tener una mayor proporción de agua hace que el disolvente sea más polar y favorece la extracción. Los fenoles aumentan su extracción un 34 % más con acetona al comparar el contenido de ácido gálico con etanol y de un 21 % más cuando se utiliza metanol. Al observar el análisis estadístico se observa que entre metanol y etanol no existe diferencia significativa, mientras que al comparar lo obtenido con acetona se observa que si existe una diferencia significativa ya que con este disolvente los valores de fenoles son mucho mayores. Estos resultados coinciden con lo reportado por Zengin, *et al.*, en 2018, trabajo en el que el agua es un disolvente en el que obtiene mayor extracción de fenoles en muestras de salvias. Además, en un trabajo publicado por Sun y Ho en 2005 encontraron un mayor rendimiento con acetona para la extracción de fenoles, es decir la mezcla de estos dos disolventes favorece considerablemente el rendimiento de extracción y por lo tanto exhibe mayores valores en el contenido de fenoles.

## Flavonoides

Los flavonoides fueron cuantificados por medio de un método espectrofotométrico empleando una curva patrón de catequina y las cantidades obtenidas de la extracción con los 3 disolventes probados se muestran en la Gráfica 2.

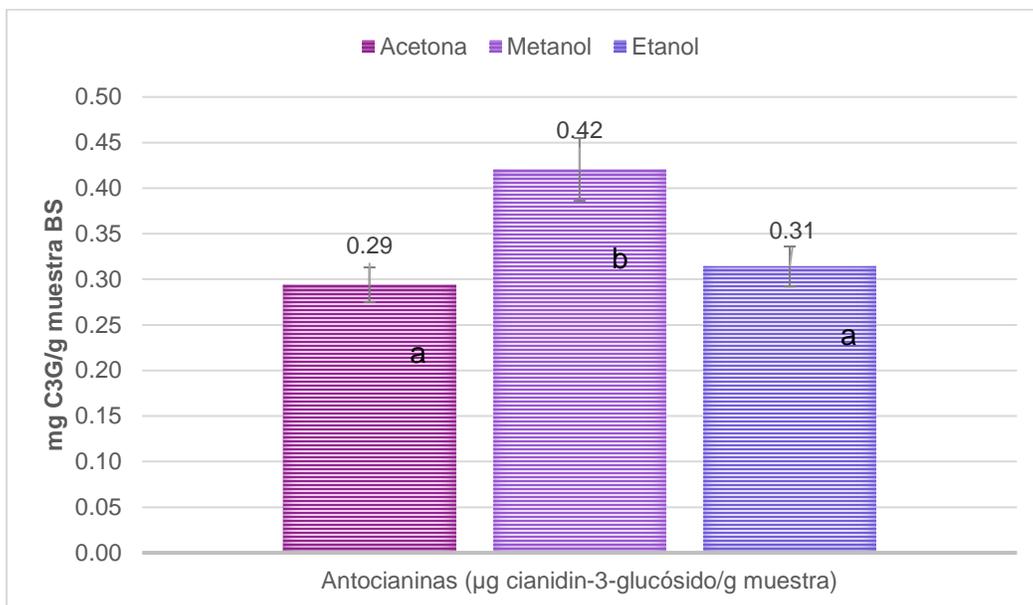


Gráfica 2. Extracción de flavonoides con diferentes disolventes en flores de *Salvia sp.*  
Los valores con diferentes letras fueron significativamente diferentes con Tukey al 95 %.

En la Gráfica 2 se observa el mismo comportamiento que en fenoles, el empleo de acetona como disolvente favorece considerablemente el rendimiento de extracción de los flavonoides con un aumento del 43 % y 49 % al ser comparado con los resultados obtenidos con metanol y etanol, respectivamente, lo antes mencionado se comprueba estadísticamente por medio de los grupos obtenidos mediante la prueba Tukey en donde se encuentra que existe diferencia significativa entre acetona y metanol, así como acetona y etanol, pero no existe diferencia entre metanol y etanol, ya que al ser ambos alcoholes su comportamiento es muy similar. Lo cual está íntimamente relacionado pues al existir una mayor cantidad de flavonoides el valor de los fenoles aumenta, considerando que en la cuantificación de fenoles están incluidos estos compuestos.

## Antocianinas

Las flores de *Salvia sp.* contienen antocianinas como responsables de la coloración de la flor, la extracción de estos colorantes fue probado con los disolventes metanol, acetona y etanol, después fueron cuantificados por el método de pH diferencial para antocianinas expresando el contenido como mg de cianidina-3-glucósido/g muestra base seca como se observa en la Gráfica 3.



Gráfica 3. Extracción de antocianinas en flores de *Salvia sp.*  
Los valores con diferentes letras fueron significativamente diferentes con Tukey al 95 %.

En cuanto a lo encontrado en antocianinas, se obtiene una mayor extracción utilizando metanol con un 30 % y un 26 % más en comparación con acetona y etanol, respectivamente, esto estadísticamente se puede observar en que acetona y metanol no tienen diferencia significativa, pero al ser comparado con metanol si existe diferencia, demostrando que el metanol favorecen la extracción de las antocianinas porque ayudan a una mejor solubilización, además comprobando lo mencionado en la literatura, que el metanol es de los disolventes más empleados para el estudio de estos pigmentos debido a un mejor rendimiento de extracción (Gould, 2009).

Por lo tanto, se determinó emplear acetona como disolvente para las determinaciones de fenoles y flavonoides, ya que exhibieron un mejor rendimiento

y estadísticamente existe una diferencia al emplearse acetona; y la utilización de metanol para la extracción y posterior determinación de antocianinas.

### Etapa 3. Cuantificación de fenoles, flavonoides y antocianinas

#### Fenoles totales

A continuación, se muestran los resultados de fenoles obtenidos por el método espectrofotométrico en cada una de las flores, tallos y hojas de cada salvia se presentan en la Tabla 10.

Tabla 10. Resultados de fenoles totales en cada salvia y órgano.

Especie	Fenoles (mg ácido gálico/ g muestra BS)		
	Órgano		
	Flores	Tallos	Hojas
<b><i>S. mexicana</i></b>	87.74 ± 2.37	56.66 ± 2.37	73.67 ± 1.05
<b><i>S. fruticulosa</i></b>	51.24 ± 1.49	59.96 ± 1.92	75.70 ± 0.96
<b><i>S. tiliifolia</i></b>	49.10 ± 4.21	28.51 ± 1.15	80.18 ± 5.87
<b><i>S. polystachya</i></b>	75.79 ± 3.54	69.08 ± 2.29	74.34 ± 1.22
<b><i>S. purpurea</i></b>	34.86 ± 3.50	36.98 ± 1.76	33.36 ± 1.14
<b><i>S. microphylla</i></b>	34.17 ± 3.27	30.04 ± 1.11	51.73 ± 1.86
<b><i>Salvia sp.</i></b>	84.71 ± 8.11	32.13 ± 2.16	-
<b><i>S. amarissima</i></b>	45.51 ± 4.65	33.95 ± 2.15	141.39 ± 3.41
<b><i>S. leucantha</i></b>	50.32 ± 2.52	29.52 ± 2.31	41.02 ± 0.74
<b><i>S. polystachya 2</i></b>	65.51 ± 4.65	34.43 ± 3.39	69.99 ± 1.41
<b><i>S. hispánica</i></b>	-	32.08 ± 1.44	54.12 ± 4.32

Los valores que se obtuvieron nos indica que las especies de salvias en general contienen de  $28.51 \pm 1.15$  a  $141.39 \pm 3.41$  mg ácido gálico/g correspondiendo a los tallos de *S. tiliifolia* y hojas de *S. amarissima*, respectivamente. Analizando la parte de la planta se observa que en general existe una mayor concentración de fenoles en hojas con valores de  $33.36 \pm 1.14$  mg/g en *S. purpurea* a  $141.39 \pm 3.41$  mg/g de *S. amarissima*. Las flores de salvias también sobresalen en cuanto al contenido de fenoles las especies de *S. mexicana*, *S polystachya*, *Salvia sp.*, y *S. leucantha* representan la mayor concentración al ser comparadas con los valores obtenidos en hojas y tallos. En trabajos previos se han encontrado concentraciones de 22-119 mg EAG/g B.S (Gezek, *et al.*, 2019), y de 13-97mg/g extracto seco (Zengin, *et al.*, 2018) en diversas especies de salvias estudiadas en previos trabajos, lo cual nos da una idea de la cantidad de compuestos que se han reportado en otras especies de salvias de otras regiones del mundo, estos fueron los valores tomados como referencias ya que no existen publicaciones sobre fenoles de especies de salvias mexicanas, sin embargo los valores obtenidos coinciden con los rangos de fenoles publicados previamente. Las flores de *Salvia mexicana* con  $87.74 \pm 2.37$  mg/g y hojas de *Salvia amarissima* con  $141.39 \pm 3.41$  son la que presenta un mayor contenido de fenoles mg/g.

Los valores obtenidos en tallos de las especies de salvias son menores al compararlos con hojas y flores, con valores que van de  $29.52 \pm 2.31$  mg/g en *S. hispánica* y  $69.08 \pm 2.29$  en *S. polystachya*, sin embargo, aquí la función fisiológica que tiene el tallo es de soporte de la planta, por lo que la mayor cantidad de su peso está constituido principalmente por polisacáridos estructurales, teniendo en cuenta esta consideración las concentraciones de fenoles obtenidas en tallos pueden representar una buena fuente para la obtención de fenoles.

## Flavonoides totales

La concentración del total de flavonoides encontrado en cada salvia expresado como mg de catequina/g de muestra en base seca se pueden observar en la Tabla 11.

Tabla 11. Resultados de fenoles totales en cada salvia y órgano

Especie	Flavonoides (mg catequina/g muestra BS)		
	Flores	Tallos	Hojas
<i>S. mexicana</i>	39.60 ± 2.82	19.36 ± 1.91	45.95 ± 3.21
<i>S. fruticulosa</i>	21.33 ± 1.80	36.82 ± 2.10	61.56 ± 3.68
<i>S. tiliifolia</i>	29.49 ± 0.86	16.42 ± 0.98	46.46 ± 1.01
<i>S. polystachya</i>	50.35 ± 0.52	41.12 ± 3.09	48.87 ± 3.66
<i>S. purpurea</i>	24.24 ± 2.60	9.16 ± 0.55	20.23 ± 1.87
<i>S. microphylla</i>	17.84 ± 6.39	18.11 ± 1.86	32.43 ± 0.66
<i>Salvia sp.</i>	20.78 ± 1.27	16.69 ± 2.02	0.00 ± 0.00
<i>S. amarissima</i>	37.87 ± 3.53	24.88 ± 2.02	70.12 ± 1.11
<i>S. leucantha</i>	8.60 ± 0.58	15.45 ± 0.39	28.41 ± 1.34
<i>S. polystachya 2</i>	42.05 ± 2.64	17.99 ± 2.05	49.88 ± 3.25
<i>S. hispánica</i>	0.00 ± 0.00	13.55 ± 0.61	19.50 ± 1.60

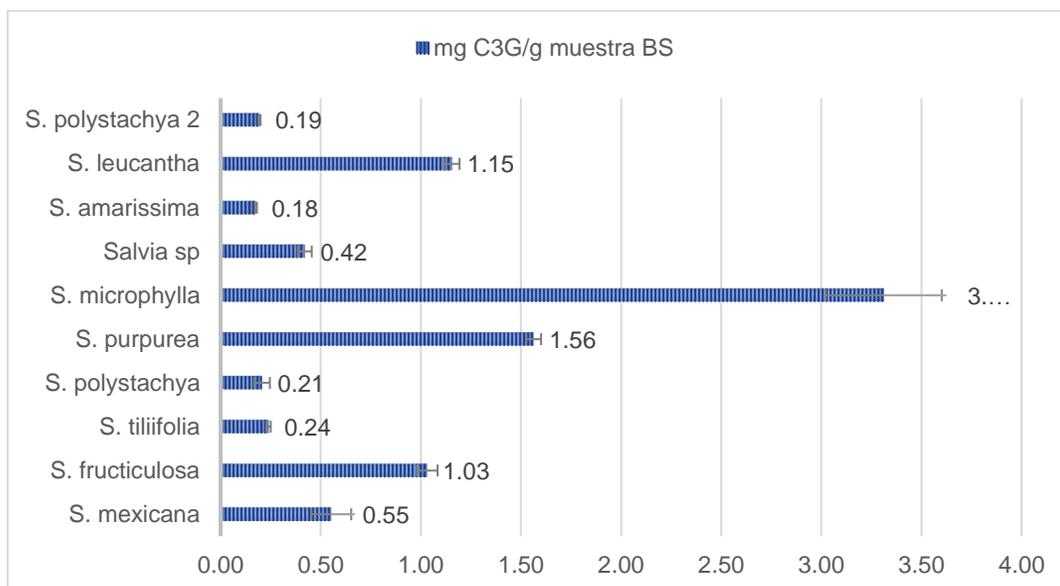
Las determinaciones de flavonoides muestran concentraciones que van de 8.60±0.58 a 70.12±1.11 mg catequina/g, en las flores de *S. leucantha* y en las hojas de *S. amarissima*, respectivamente, al igual que en fenoles existe una mayor concentración de flavonoides en las hojas y en las flores. Se puede mencionar que el órgano que presenta un mayor contenido de flavonoides son las hojas de las salvias. En especies de salvias se han reportado valores de 18 mg catequina/g BS en *S. officinalis* (Abdelkader, 2014), de 16-60 mg quercetina/g BS (Bahadori, 2015) en especies de salvias de Irán, tomando como referencia estos valores comprobamos que el contenido total de flavonoides determinado en este estudio se asemeja a valores reportados. Analizando el contenido de fenoles y flavonoides

observamos que las concentraciones de flavonoides representan más del 30% de su totalidad.

Las concentraciones de fenoles y a su vez de flavonoides en las plantas son sintetizadas en gran cantidad como producto de su metabolismo secundario, su función radica en su participación en la fisiología y el metabolismo celular, morfología, crecimiento, reproducción, defensa contra plagas, depredadores, y procesos germinativos, (Jurado, 2016). Otros participan en funciones de defensa ante situaciones de estrés y estímulos diversos (hídrico, luminoso, etc.) (Quiñones *et al*, 2012). Por lo tanto, las concentraciones de estos compuestos dependen de la etapa de crecimiento de la planta, así como las condiciones ambientales. Se observó que las hojas y flores de las salvias en general tienen un mayor contenido de estos compuestos. En general la salvia que exhibió un mayor contenido de fenoles y a su vez de flavonoides fue las hojas de *S. amarissima*.

## Antocianinas totales

Las antocianinas se determinaron únicamente en las flores debido a que es la única parte de las plantas que se sabe están presentes estos pigmentos, en un extracto metanol:agua:ácido, la concentración obtenida expresado como mg cianidin-3-glucósido/g muestra base seca (mg C3G/g muestra BS) están en la Gráfica 4.



Gráfica 4. Concentración de antocianinas determinadas en flores de salvias.

Las concentraciones determinadas de estos pigmentos son de  $0.18 \pm 0.005$  a  $3.31 \pm 0.29$  mg C3G/g. La mayor concentración corresponde a las flores de *S. microphylla*, *S. purpurea* y *S. leucantha*, con valores mayores a 1 mg mientras que en las demás flores las cantidades son inferiores a 0.55 mg una explicación de los bajos es debido a que el extracto empleado es un extracto crudo, en el que existe la presencia de una gran cantidad de otros compuestos como carotenos, clorofilas, flavonoides, además de que se empleó la flor en su totalidad, es decir con la parte de sépalo, parte de la flor que no contiene antocianinas, pero si representa un porcentaje del peso total de la muestra y al haberse empleado una pequeña cantidad de muestra para su extracción estos compuestos no se hayan extraído en su totalidad, así como factores propios de las flores, como la etapa de maduración.

## Etapa 4. Análisis cualitativo de compuestos bioactivos

El análisis cualitativo se realizó con cromatografía en capa fina (CCF), que nos permitió identificar el perfil de compuestos presentes en las salvia al compararlos con los estándares de las moléculas que se esperaba encontrar. En cada imagen en la parte inferior se indica de que órgano de la salvia se trata (H: hojas; T: tallos; F: flores) y en el siguiente renglón la especie de la que se trata.

### Ácidos fenólicos

Se realizó la identificación de ácido rosmarínico, ácido cafeico, ácido clorogénico, de los extractos obtenidos para la cuantificación de fenoles y flavonoides; para una mejor identificación de estos compuestos se utilizó cloruro férrico y DPPH como revelador de las cromatoplasmas que se muestran en las Figuras 28 y 29.

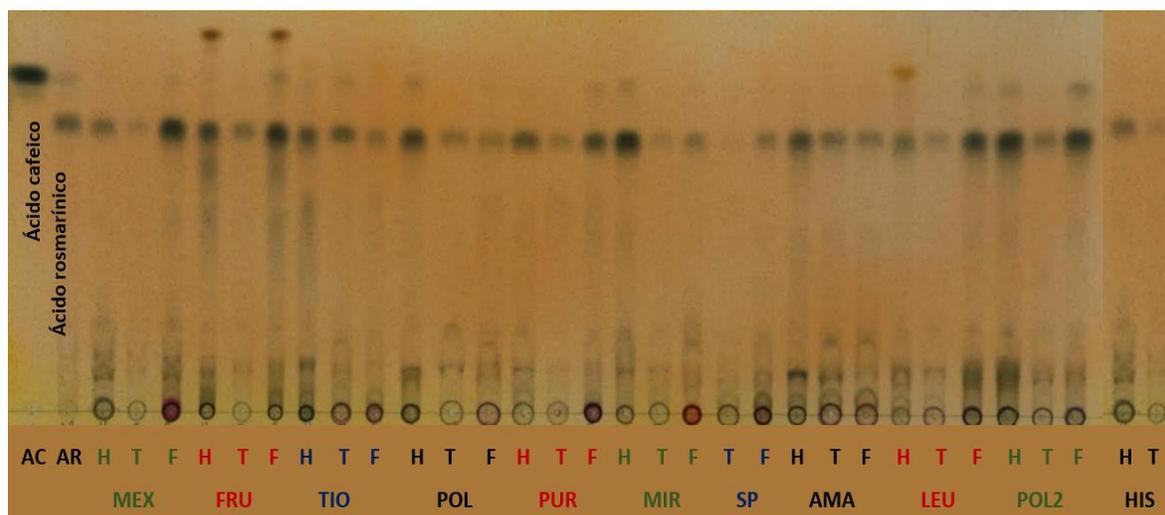


Figura 28. CCF revelada con  $FeCl_3$  para la identificación de ácido rosmarínico y cafeico en cada muestra de salvia.

AC: ácido cafeico; AR: ácido rosmarínico; MEX: *S. mexicana*; FRU: *S. fruticulosa*; TIO: *S. tiliifolia*; POL: *S. polystachya*; PUR: *S. purpurea*; MIR: *S. microphylla*; SP: *Salvia sp.*; AMA: *S. amarissima*; LEU: *S. leucantha*; POL2: *S. polystachya 2*; HIS: *S. hispánica*. H: hojas; T: tallos; F: flores. Fase móvil: Cloroformo:Acetato de Etilo:Acetona:Ácido fórmico (40:30:20:10)

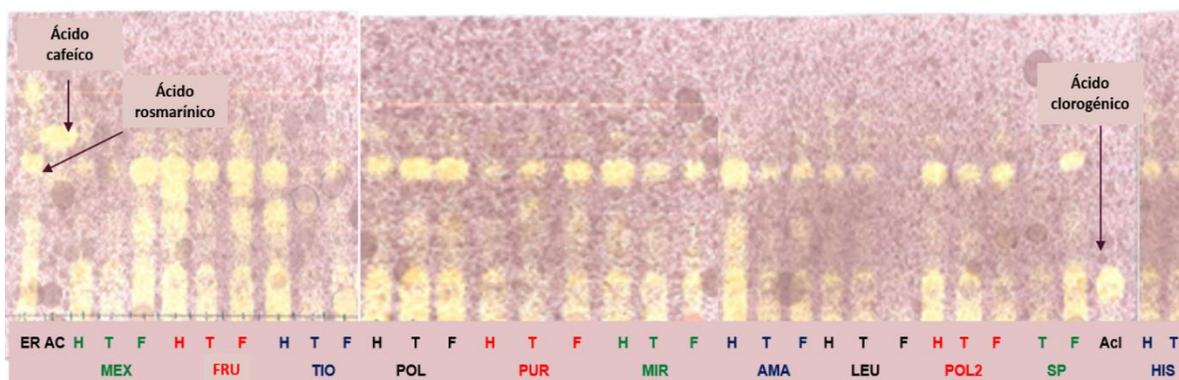


Figura 29. CCF revelada con DPPH para la identificación de ácido rosmarínico, cafeico y clorogénico en cada muestra de salvia

AC: ácido cafeico; AR: ácido rosmarínico; ACI: ácido clorogénico; MEX: *S. mexicana*; FRU: *S. fruticulosa*; TIO: *S. tiliifolia*; POL: *S. polystachya*; PUR: *S. purpurea*; MIR: *S. microphylla*; SP: *Salvia* sp.; AMA: *S. amarissima*; LEU: *S. leucantha*; POL2: *S. polystachya* 2; HIS: *S. hispánica*. H: hojas; T: tallos; F: flores. Fase móvil: Cloroformo:Acetato de Etilo:Acetona:Ácido fórmico (40:30:20:10)

En las Figuras 28 y 29 se muestran las cromatografías en capa fina se observa que se logró identificar el ácido rosmarínico en la mayoría de los extractos de cada parte de las salvias, el factor de retención ( $R_f$ ) de este compuesto fue de 0.65 (Tabla 12) que es muy similar a lo reportado por la literatura de 0.6 (Islas, 2013). Las flores y hojas de la mayoría de las especies son las que presentan una mayor intensidad, de modo que indica una mayor concentración de este compuesto. Este ácido es el mayor componente identificado en muestras de salvias (Hamdy, *et al.*, 2013; Kocak, *et al.*, 2016; Zengin, *et al.*, 2018); por lo tanto, se comprobó la presencia de este compuesto característico.

En cuanto al ácido cafeico se observa un menor número de muestras en que se pudo identificar, en especies como *S. mexicana*, *S. polystachya* y *S. tiliifolia* se logra identificar más claramente, no obstante, se observa una notable disminución de la intensidad de la mancha del compuesto con respecto al ácido rosmarínico, lo cual nos sugiere una menor concentración. Además de poder identificar estos compuestos en la Figura 29 que esta revelada con DPPH se puede ver que el extracto posee capacidad antioxidante.

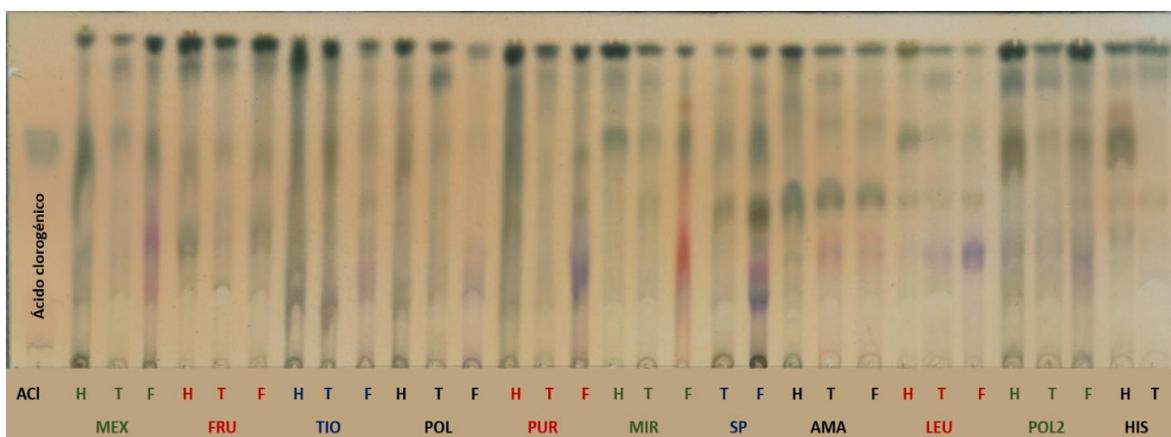


Figura 30. CCF revelada con  $FeCl_3$  para la identificación de ácido clorogénico en cada muestra de salvia. ACI: ácido clorogénico; MEX: *S. mexicana*; FRU: *S. fruticulosa*; TIO: *S. tiliifolia*; POL: *S. polystachya*; PUR: *S. purpurea*; MIR: *S. microphylla*; SP: *Salvia sp.*; AMA: *S. amarissima*; LEU: *S. leucantha*; POL2: *S. polystachya* 2; HIS: *S. hispánica*. H: hojas; T: tallos; F: flores. Acetato de etilo:  $H_2O$ : ácido acético (3:2:1)

El ácido clorogénico se logra identificar en la CCF de la Figura 30 de manera clara en la mayoría de las salvias, las que presentan una mayor intensidad son *S. hispánica*; *S. polystachya* y *S. microphylla*. Estos compuestos también han sido identificados en otras muestras de salvias, sin embargo, no es un compuesto tan característico de las salvias como los son los derivados del ácido cafeico y la concentración de este es notablemente menor. (Hamdy, *et al.*, 2013; Kocak, *et al.*, 2016).

Tabla 12. Valores de Rf obtenidos experimentalmente en la detección de ácidos fenólicos

Compuesto	Rf
Ácido rosmarínico <sup>a</sup>	0.65
Ácido cafeico <sup>a</sup>	0.71
Ácido clorogénico <sup>b</sup>	0.60

Fase móvil: <sup>a</sup> Cloroformo:Acetato de Etilo:Acetona:Ácido fórmico (40:30:20:10); <sup>b</sup> Acetato de etilo:  $H_2O$ : ácido acético (3:2:1).

En la Tabla 13 se muestra en cuales especies y órgano de cada salvia se logró la identificación de cada uno de los ácidos fenólicos.

Tabla 13. Compuestos de ácidos fenólicos identificados por CCF en cada órgano y especie de salvia.

Salvia/Parte	Ácido rosmarínico <sup>a</sup>	Ácido cafeico <sup>a</sup>	Ácido clorogénico <sup>b</sup>
<b><i>S. mexicana</i></b>			
Hojas	*	**	***
Tallos	*	*	**
Flores	***	*	***
<b><i>S. fruticulosa</i></b>			
Hojas	***	**	***
Tallos	**	*	**
Flores	***	***	**
<b><i>S. tiliifolia</i></b>			
Hojas	**	**	***
Tallos	*	n.i	*
Flores	**	**	*
<b><i>S. polystachya</i></b>			
Hojas	***	*	**
Tallos	***	*	***
Flores	***	*	***
<b><i>S. purpurea</i></b>			
Hojas	**	*	**
Tallos	**	*	*
Flores	***	*	**
<b><i>S. microphylla</i></b>			
Hojas	***	*	**
Tallos	**	*	*
Flores	*	*	*
<b><i>Salvia sp.</i></b>			
Hojas	***	*	***
Tallos	***	n.i	*
<b><i>S. amarissima</i></b>			
Hojas	***	*	***
Tallos	*	n.i	*
Flores	**	*	*
<b><i>S. leucantha</i></b>			
Hojas	***	*	**
Tallos	*	*	*
Flores	n.i	n.i	n.i

Tabla 13. Continuación

Salvia/Parte	Ácido rosmarínico	Ácido cafeico	Ácido clorogénico
<b>S. polystachya 2</b>			
Hojas	***	**	***
Tallos	***	n.i	**
Flores	***	*	*
<b>S. hispánica</b>			
Hojas	**	n.i	***
Tallos	*	n.i	n.i

Fase móvil: <sup>a</sup> Cloroformo:Acetato de Etilo:Acetona:Ácido fórmico (40:30:20:10); <sup>b</sup> Acetato de etilo: H<sub>2</sub>O: ácido acético (3:2:1)

\*Baja intensidad, \*\*Moderada intensidad, \*\*\*Alta intensidad de las manchas del compuesto; n.i: no identificado.

## Flavonoides

Los flavonoides que se determinaron por CCF, fueron quercetina, luteolina, kaempferol, rutina, son solo algunos de los que se han reportado como compuestos presentes en especies de salvias. Las cromatoplasmas fueron reveladas con cloruro férrico para lograr una mejor identificación. Las Figuras 31 y 32 muestran lo obtenido de estos compuestos bioactivos.

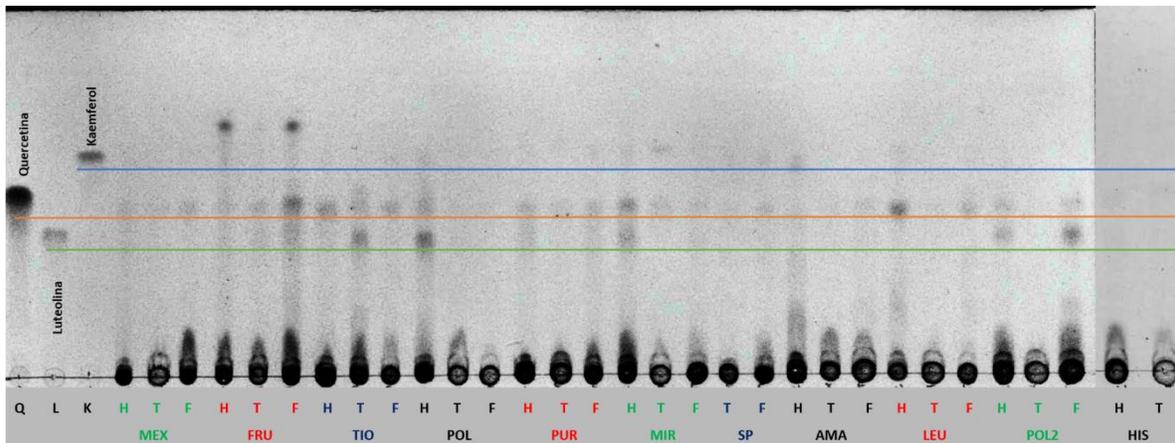


Figura 31. CCF para la identificación de quercetina, luteolina, kaempferol en cada muestra de salvia. Q: quercetina; L: luteolina; K: kaempferol; MEX: *S. mexicana*; FRU: *S. fruticulosa*; TIO: *S. tiliifolia*; POL: *S. polystachya*; PUR: *S. purpurea*; MIR: *S. microphylla*; SP: *Salvia* sp.; AMA: *S. amarissima*; LEU: *S. leucantha*; POL2: *S. polystachya* 2; HIS: *S. hispánica*; H: hojas; T: tallos; F: flores. Fase móvil: Acetato de Etilo:Ácido acético:Ácido fórmico:H<sub>2</sub>O:Tolueno (100:10:10:25:20:30)

Luteolina y quercetina son los dos flavonoides que se pudieron observar con mayor claridad en las muestras por CCF (Figura, 31), quercetina es el flavonoide con mayor distribución dentro de las muestras analizadas, las flores de *S. fruticulosa* sobresale en el contenido de quercetina seguido de las hojas de *S. microphylla* y *S. leucantha*, por presentar una mayor intensidad de la mancha, *S. polystachya* y *S. tiliifolia* fueron las que sugieren un mayor contenido de luteolina en hojas, tallos y flores.

Kaempferol fue difícil de identificar en las muestras estudiadas, se logra identificar ligeramente en las hojas de *S. amarissima* y *S. polystachya*, este flavonoide si se ha logrado identificar en pequeñas concentraciones en algunas muestras de salvias en trabajos previos por medio de HPLC, método que presenta una mayor sensibilidad, además de que gran parte de los flavonoides identificados en salvias en la literatura corresponde a flavonoides glicosilados (Kocak, *et al.*, 2016) y en esta CCF sólo se realizó la identificación de los flavonoides en su forma libre, para la identificación de los flavonoides glicosilados es necesario un nuevo sistema de elución y estándares de referencia como el trabajo reportado por Jesionek, *et al.*, 2015.

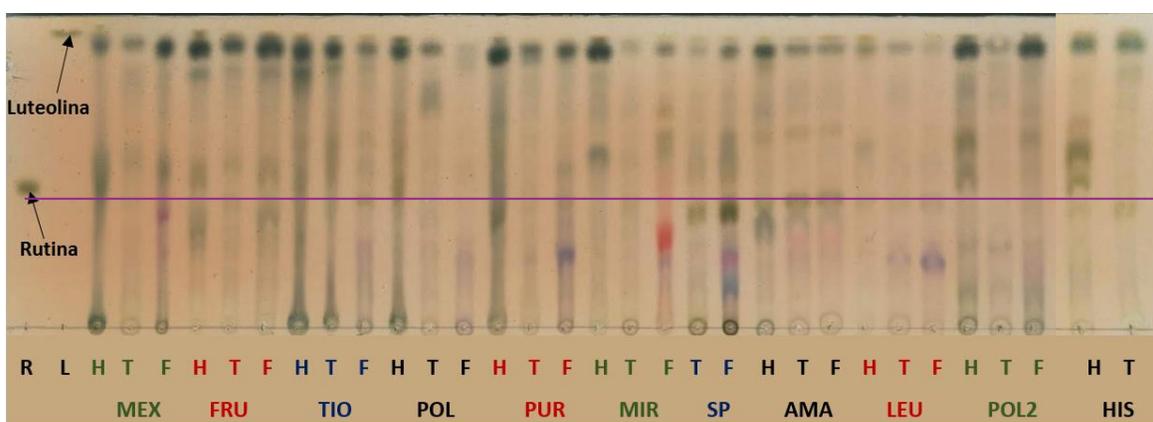


Figura 32. CCF revelada con  $FeCl_3$  para la identificación de rutina en cada muestra de salvia.  
R: rutina; L: luteolina; MEX: *S. mexicana*; FRU: *S. fruticulosa*; TIO: *S. tiliifolia*; POL: *S. polystachya*; PUR: *S. purpurea*; MIR: *S. microphylla*; SP: *Salvia sp.*; AMA: *S. amarissima*; LEU: *S. leucantha*; POL2: *S. polystachya* 2; HIS: *S. hispánica*; H: hojas; T: tallos; F: flores. Fase móvil: Acetato de Etilo:Ácido acético:Ácido fórmico:H<sub>2</sub>O (100:10:10:25:20)

Para el caso de rutina fue uno de los que menos se logró identificar por CCF (Figura 32), las flores de la *Salvia sp.* y hojas de *S. polystachya* son las que presentan una mayor separación y se logra identificar un compuesto al mismo Rf de la referencia de rutina, la baja identificación de este flavonoide coincide con el trabajo de Kocak, *et al*, 2016, en el que no fue posible la identificación de este flavonoide en una muestra de *S. cadmica*. Así como en el trabajo de Zengin, *et al.*, 2018.

Cada uno de los flavonoides que se buscaron en las salvias fue corroborado con el Rf de los estándares, los valores calculados se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Valores de Rf obtenidos experimentalmente en la detección de flavonoides.

Compuesto	Rf
Quercetina <sup>a</sup>	0.51
Luteolina <sup>a</sup>	0.40
Kaempferol <sup>a</sup>	0.62
Rutina <sup>b</sup>	0.44

Fase móvil: <sup>a</sup> Acetato de Etilo:Ácido acético:Ácido fórmico:H<sub>2</sub>O:Tolueno (100:10:10:25:20:30); <sup>b</sup> Acetato de Etilo:Ácido acético:Ácido fórmico:H<sub>2</sub>O (100:10:10:25:20).

Si comparamos la cantidad de compuestos que se pudieron identificar de ácidos fenólicos y flavonoides por CCF observamos que fueron identificados más ácidos que flavonoides. Esto debido a que los ácidos fenólicos identificados se encuentran en mayores concentraciones en las muestras de salvias que los flavonoides, aunado a que la mayoría de los flavonoides que se han logrado identificar en muestras de salvias se encuentran glicosilados. El resumen de cada uno de estos compuestos identificados se muestra en la Tabla 15.

Tabla 15. Compuestos de flavonoides identificados en cada especie y órgano de salvias.

Salvia/Parte	Quercetina <sup>a</sup>	Luteolina <sup>a</sup>	Kaempferol <sup>a</sup>	Rutina <sup>b</sup>
<b><i>S. mexicana</i></b>				
Hojas	n.i	**	n.i	n.i
Tallos	n.i	*	n.i	n.i
Flores	*	**	n.i	n.i
<b><i>S. fruticulosa</i></b>				
Hojas	*	n.i	n.i	*
Tallos	*	n.i	n.i	n.i
Flores	**	*	n.i	n.i
<b><i>S. tiliifolia</i></b>				
Hojas	*	n.i	n.i	n.i
Tallos	*	**	n.i	n.i
Flores	*	n.i	n.i	n.i
<b><i>S. polystachya</i></b>				
Hojas	*	**	*	*
Tallos	n.i	n.i	n.i	n.i
Flores	n.i	n.i	n.i	n.i
<b><i>S. purpurea</i></b>				
Hojas	*	n.i	n.i	n.i
Tallos	*	n.i	n.i	n.i
Flores	*	n.i	n.i	n.i
<b><i>S. microphylla</i></b>				
Hojas	**	**	n.i	n.i
Tallos	*	n.i	*	n.i
Flores	n.i	n.i	n.i	n.i
<b><i>Salvia sp.</i></b>				
Hojas	n.i	*	n.i	n.i
Tallos	*	n.i	n.i	n.i
<b><i>S. amarissima</i></b>				
Hojas	n.i	n.i	*	n.i
Tallos	n.i	n.i	n.i	**
Flores	n.i	n.i	n.i	*
<b><i>S. leucantha</i></b>				
Hojas	**	n.i	*	n.i
Tallos	n.i	n.i	n.i	n.i
Flores	*	n.i	n.i	n.i

Tabla 15. Continuación

Salvia/Parte	Quercetina	Luteolina	Kaempferol	Rutina
<b>S. polystachya 2</b>				
Hojas	*	*	n.i	**
Tallos	n.i	n.i	n.i	n.i
Flores	*	**	n.i	n.i
<b>S. hispánica</b>				
Hojas	n.i	n.i	n.i	**
Tallos	n.i	n.i	n.i	n.i

Fase móvil: <sup>a</sup> Acetato de Etilo:Ácido acético:Ácido fórmico:H<sub>2</sub>O:Tolueno (100:10:10:25:20:30); <sup>b</sup> Acetato de Etilo:Ácido acético:Ácido fórmico:H<sub>2</sub>O (100:10:10:25:20).

\*Baja intensidad, \*\*Moderada intensidad, \*\*\*Alta intensidad de las manchas del compuesto; n.i: no identificado.

## Antocianinas

El extracto de metanol obtenido de antocianinas fue el empleado en CCF para elucidar el perfil de antocianinas que tiene las flores de las salvias estudiadas, el extracto crudo fue el que se empleó y no fue necesario revelar esta placa debido a que estos compuestos ya presentan su color característico y se puede observar la separación en las diferentes antocianinas de cada muestra.

En la Figura 33 se puede observar el perfil de las antocianinas de las muestras de salvias, para su identificación se empleó únicamente los extractos de las flores, debido a que es poca la disponibilidad de estándares de antocianinas, aunado a que en cada muestra existe una gran diversidad de antocianinas glicosiladas, aciladas con una gran cantidad de posibles moléculas. Lo que se utilizó para poder identificarlas fue la coloración de las manchas y el R<sub>f</sub> de las mismas, ya que se logra diferenciar entre antocianinas glicosiladas y aciladas por el valor del factor de retención según lo reportado por Fernández en 2014. Se observa que en la mayoría de las salvias hay coloraciones moradas y azules que son características de cianidina, malvidina y delphinidina, respectivamente. (Haque, *et al.*, 1981). En *S. microphylla* es la única en la que se observan antocianinas con tonalidades rojas. Según lo reportado para antocianinas por Fernández en 2014, el R<sub>f</sub> de estos compuestos

indica que se tratan de antocianinas aciladas que tienen un Rf menor a 0.52, lo que indica que para todas las antocianinas elucidadas en las salvias corresponde a este grupo. En CCF en la parte superior quedan los compuestos con un peso molecular menor, pues al ser más pequeñas eluyen con mayor facilidad, y en este caso al tratarse de antocianinas aciladas que generalmente son glicosiladas, son moléculas con un alto peso molecular por lo que se quedan en la parte media o inferior de la placa.

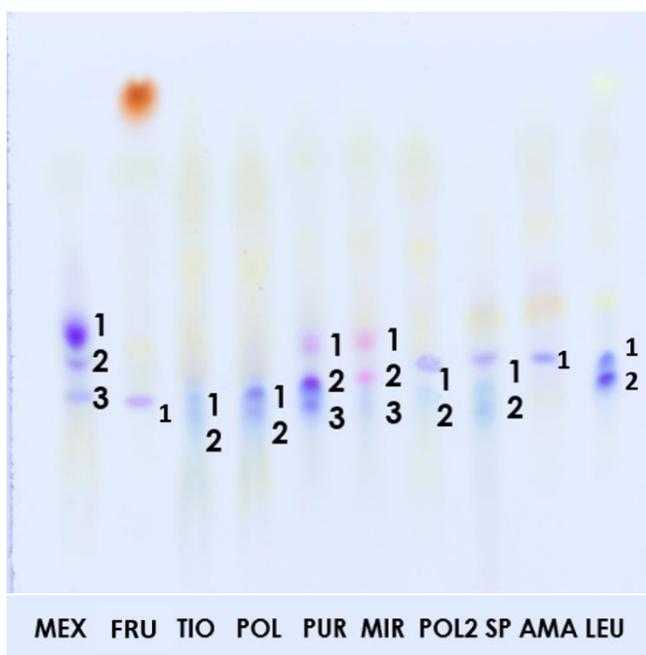


Figura 33. CCF de antocianinas en flores de salvias.  
MEX: *S. mexicana*; FRU: *S. fruticulosa*; TIO: *S. tiliifolia*; POL: *S. polystachya*; PUR: *S. purpurea*; MIR: *S. microphylla*; SP: *Salvia* sp.; AMA: *S. amarissima*; LEU: *S. leucantha*; POL2: *S. polystachya* 2; HIS: *S. hispánica*. Fase móvil: Butanol:Ácido acético:H<sub>2</sub>O (6:1:3). \*Los números indican el número de antocianinas que se logran identificar en cada muestra de flores.

## Terpenos y esteroides

Se realizó la identificación de algunos los componentes mayoritarios reportados en trabajos previos del extracto metanol:diclorometano; las moléculas que se identificaron por CCF fueron, ácido ursólico, ácido oleanólico, β-amirina del grupo de terpenos y de esteroides únicamente se identificó estigmasterol. Las

cromatoplasmas fueron reveladas con anisaldehído para lograr un mejor contraste en la identificación de los compuestos.

Los resultados del análisis fitoquímico de terpenos y esteroides por CCF se observan en la Figura 34, se identificaron ácido ursólico y su isómero el ácido oleanólico, compuestos muy característicos de la familia *Lamiaceae* y por lo tanto de las salvia, estos ácidos y fueron los de mayor concentración en el trabajo Kontogianni, *et al.*, 2013 en muestra de *S. officinalis*. En esta CCF se logró identificar la presencia de estos compuestos en todas las muestras de salvia analizadas, coincidiendo con el trabajo de Islas en 2013, con muestras de salvia de México, un buen número de las de especies presentan una intensidad mayor de la mancha en tallos y hojas, lo cual sugiere una mayor concentración en estos órganos de las salvia. De igual manera Argumedo y colaboradores en 2003, ha reportado la presencia de ácido oleanólico en *S. mexicana* en concentraciones considerables en relación con la presencia de otros terpenos.

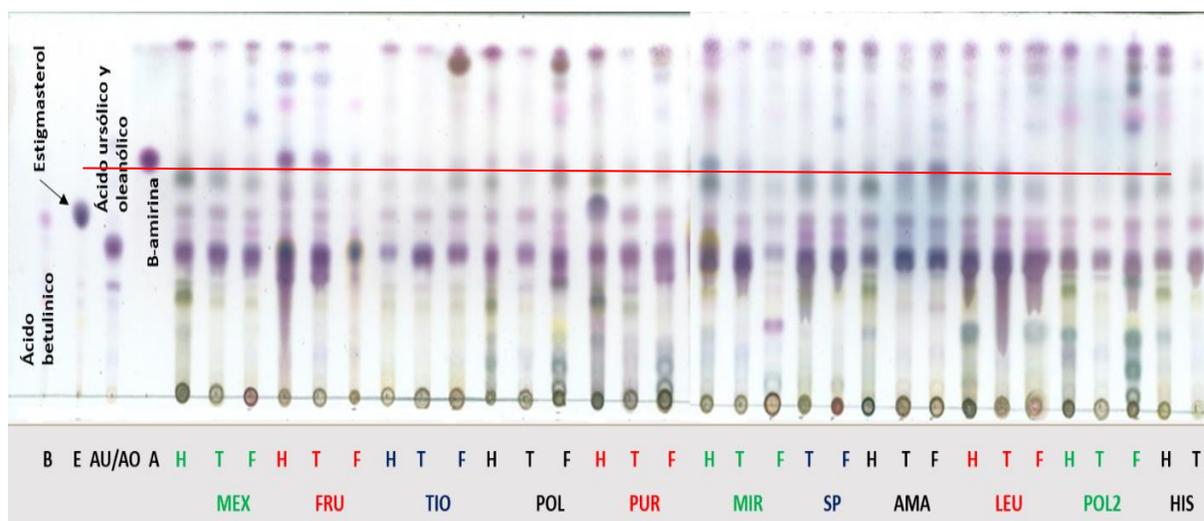


Figura 34. CCF para la identificación de terpenos y esteroides presentes en muestras de salvia. Terpenos: a: Ácido oleanólico; b: Ácido ursólico; c:  $\beta$ -amirina Esteroides: d:  $\beta$ -sitoesterol ; MEX: *S. mexicana*; FRU: *S. fruticulosa*; TIO: *S. tiliifolia*; POL: *S. polystachya*; PUR: *S. purpurea*; MIR: *S. microphylla*; SP: *Salvia* sp.; AMA: *S. amarissima*; LEU: *S. leucantha*; POL2: *S. polystachya* 2; HIS: *S. hispánica*. H: hojas; T: tallos; F: flores. Fase móvil: Hexano:Acetato de etilo (7:3) con gotas de ácido acético.

Con respecto a  $\beta$ -amirina este compuesto se logró identificar de forma clara en la mayoría de las especies, en *S. fruticulosa*, *S. purpurea*, *S. microphylla* y *S. amarissima* se observa una mayor intensidad en la mancha. En el trabajo de Cuevas de 2018, ese logró identificar este compuesto en *S. purpurea* por CCF.

El ácido betulínico en el sistema de elución empleado no logró ser identificado ya que presenta un Rf igual al del estigmasterol (Tabla 16), ahora bien, en la literatura no se menciona la presencia de este compuesto en muestra de *S. officinalis*, en HPLC por Kontogianni con lo que asumimos que este compuesto no es común en salvias, considerando esto asumimos que el compuesto con ese Rf corresponde al esterol.

Por lo tanto, para el caso de los esteroides se logró identificar estigmasterol en todas las salvias analizadas, las hojas *S. polystachya* aparenta una mayor concentración debido a la intensidad de la mancha, y si se compara la intensidad de esta especie con sus tallos y flores la tendencia es hojas>flores>tallos, y en las demás especies se observa la misma intensidad en los tres órganos. Se ha reportado la presencia de este compuesto en *S. mexicana*, y *S. leucantha* y al pertenecer a la misma familia de plantas se espera una composición similar (Argumedo, 2003 y Cely, 2014).

Tabla 16. Rf obtenidos experimentales en la identificación de terpenos y esteroides.

<b>Compuesto</b>	<b>Rf</b>
Ácido ursólico	0.41
Ácido oleanólico	0.29
$\beta$ -amirina	0.62
Ácido betulínico	0.46
Estigmasterol	0.46

Fase móvil: Hexano:Acetato de etilo (7:3) con gotas de ácido acético.

En esta fracción del extracto de Diclorometano:MeOH se logra apreciar la presencia de más compuestos, que no fue posible identificar por no contar con más estándares, pero se logra evidenciar que existen un buen número de compuestos

pertenecientes al grupo de esteroides y terpenos, en la Tabla 17 se observa un resumen de todos los compuestos identificados. Un estudio fitoquímico realizado a la especie *Salvia leucantha* dio como resultado la identificación de triterpenoides como acetato de lupeol,  $\alpha$ -amirina, acetato de  $\alpha$ -amirina y  $\gamma$ -sitosterol, indicando que esta especie, al igual que otras del mismo género y familia, son ricas en triterpenos (Cely, 2014). En un trabajo publicado por Wu en 2012 sobre la composición de fitoquímicos en salvias muestra que se han logrado identificar cerca de 550 terpenos y esteroides en este grupo de plantas, lo cual nos da una idea de la riqueza de su composición, responsables de un gran número de efectos farmacológicos.

Tabla 17. Compuestos de terpenos y esteroides identificados en cada especie y órgano de salvias

Salvia/Parte	Ácido ursólico Ácido oleanólico	$\beta$ -amirina	Estigmasterol
<b><i>S. mexicana</i></b>			
Hojas	***	*	**
Tallos	**	*	**
Flores	***	*	**
<b><i>S. fruticulosa</i></b>			
Hojas	***	***	**
Tallos	***	**	**
Flores	***	*	*
<b><i>S. tiliifolia</i></b>			
Hojas	***	*	**
Tallos	***	n.i	**
Flores	***	*	**
<b><i>S. polystachya</i></b>			
Hojas	***	*	*
Tallos	***	*	**
Flores	***	**	**
<b><i>S. purpurea</i></b>			
Hojas	***	**	***
Tallos	***	*	**
Flores	***	*	**
<b><i>S. microphylla</i></b>			
Hojas	***	***	**
Tallos	***	**	*
Flores	**	n.i	*

Tabla 17. (Continuación)

Salvia/Parte	Ácido ursólico Ácido oleanólico	β-amirina	Estigmasterol
<b>Salvia sp.</b>			
Hojas	***	*	**
Tallos	***	*	**
<b>S. amarissima</b>			
Hojas	***	**	*
Tallos	***	**	**
Flores	***	***	**
<b>S. leucantha</b>			
Hojas	***	n.i	*
Tallos	***	*	**
Flores	***	n.i	**
<b>S. polystachya 2</b>			
Hojas	***	n.i	**
Tallos	**	n.i	*
Flores	***	*	**
<b>S. hispánica</b>			
Hojas	**	*	**
Tallos	**	*	**

Fase móvil: Hexano:Acetato de etilo (7:3) con gotas de ácido acético.

\*Baja intensidad, \*\*Moderada intensidad, \*\*\*Alta intensidad de las manchas del compuesto; n.i: no identificado.

## Carotenos

De la misma CCF elaborada para terpenos y esteroides, antes de ser revelada e inmediatamente después de ser eluida se logró apreciar carotenos presentes en las muestras, pues la extracción con metanol: diclorometano también se extraen estos componentes al ser compuestos no polares. Fue muy importante el observarlos inmediatamente después de la elución, debido a que son compuestos muy sensibles a la luz, y al estar en contacto con ella se descomponen perdiendo el color característico que permite identificar de qué tipo de caroteno, juntamente con el Rf (Tabla 18). En la Figura 35 y 36 se logra apreciar la fotografía de la CCF que permite observar los carotenos observados en las muestras.

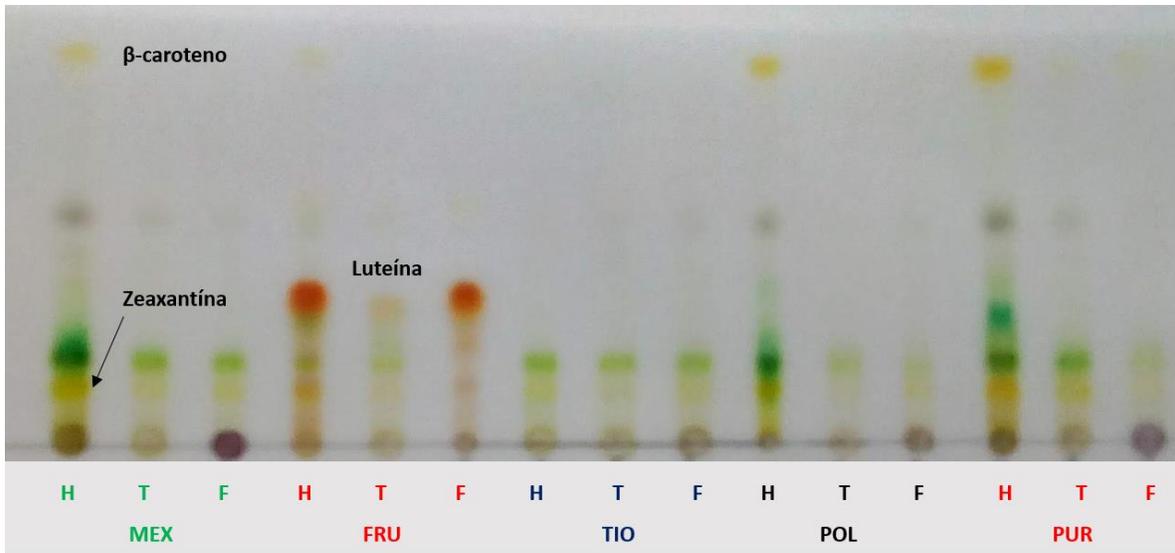


Figura 35. CCF para la identificación de carotenos presentes en muestras de salvias  
 MEX: *S. mexicana*; FRU: *S. fruticulosa*; TIO: *S. tiliifolia*; POL: *S. polystachya*; H: hojas; T: tallos; F: flores. Fase móvil: Hexano:Acetato de etilo (7:3) con gotas de ácido acético.

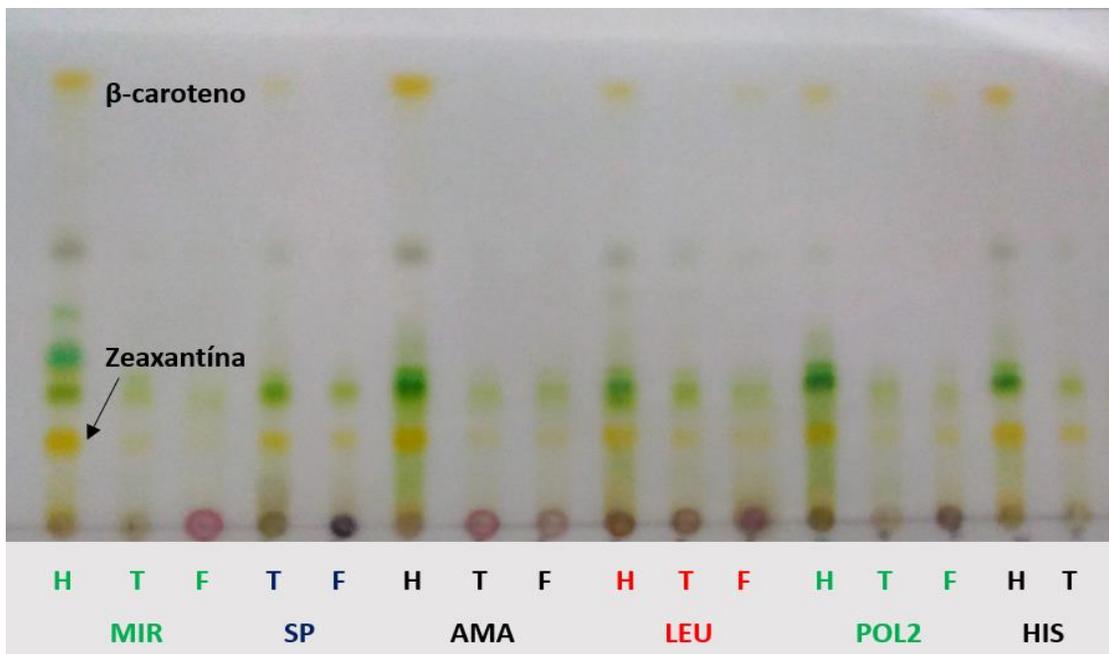


Figura 36. CCF para la identificación de carotenos presentes en muestras de salvias  
 PUR: *S. purpurea*; MIR: *S. microphylla*; SP: *Salvia sp.*; AMA: *S. amarissima*; LEU: *S. leucantha*; POL2: *S. polystachya 2*; HIS: *S. hispánica*; H: hojas; T: tallos; F: flores. Fase móvil: Hexano:Acetato de etilo (7:3) con gotas de ácido acético.

Tabla 18. Rf experimentales y reportados de carotenos.

Compuesto	Rf experimental	Rf reportado	Referencia
$\beta$ -caroteno	0.96	0.97	Yuangsoi, 2008; Hayashi, 2003
Zeaxantina	0.17	-	-
Luteína	0.35	0.36	Hayashi, 2003

Fase móvil: Hexano:Acetato de etilo (7:3) con gotas de ácido acético.

\*Baja intensidad, \*\*Moderada intensidad, \*\*\*Alta intensidad de las manchas del compuesto; n.i: no identificado.

Se lograron observar dos carotenos de color amarillo correspondientes a  $\beta$ -caroteno y zeaxantina, el primero se ubica en la parte superior de la CCF mientras que el segundo se observa en la zona inferior. El  $\beta$ -caroteno se logra observar principalmente en las hojas, y seguido en las flores, los tallos de *Salvia sp.* es la única muestra en la que se observa. Zeaxantina se logra observar en todas las muestras de salvias, pero se observa una mayor intensidad de la mancha en hojas. Luteína fue el caroteno que se logró identificar únicamente en una especie en *S. fruticulosa*, mayoritariamente en hojas, flores y por último tallos.

Los tres carotenos se han reportado en hojas de *S. officinalis* en el trabajo de Daly, 2010, las concentraciones de  $\beta$ -caroteno fueron superiores a la mezcla de luteína+zeaxantina. Cada caroteno identificado en cada muestra se muestra en la Tabla 19.

Tabla 19. Carotenos identificados en cada muestra de salvia

Salvia/Parte	B-caroteno	Zeaxantina	Luteína
<b><i>S. mexicana</i></b>			
Hojas	*	***	n.i
Tallos	n.i	*	n.i
Flores	n.i	*	n.i
<b><i>S. fruticulosa</i></b>			
Hojas	*	n.i	***
Tallos	n.i	*	**
Flores	n.i	n.i	***

Tabla 19. Continuación

<b>Salvia/Parte</b>	<b>B-caroteno</b>	<b>Zeaxantina</b>	<b>Luteína</b>
<b><i>S. tiliifolia</i></b>			
Hojas	***	*	n.i
Tallos	***	*	n.i
Flores	***	*	n.i
<b><i>S. polystachya</i></b>			
Hojas	*	**	n.i
Tallos	n.i	*	n.i
Flores	n.i	*	n.i
<b><i>S. purpurea</i></b>			
Hojas	*	***	n.i
Tallos	n.i	**	n.i
Flores	n.i	*	n.i
<b><i>S. microphylla</i></b>			
Hojas	*	***	n.i
Tallos	n.i	*	n.i
Flores	n.i	*	n.i
<b><i>Salvia sp.</i></b>			
Hojas	*	**	n.i
Tallos	n.i	*	n.i
<b><i>S. amarissima</i></b>			
Hojas	***	***	n.i
Tallos	n.i	*	n.i
Flores	n.i	*	n.i
<b><i>S. leucantha</i></b>			
Hojas	*	**	n.i
Tallos	n.i	*	n.i
Flores	*	*	n.i
<b><i>S. polystachya 2</i></b>			
Hojas	*	***	n.i
Tallos	n.i	*	n.i
Flores	*	*	n.i
<b><i>S. hispánica</i></b>			
Hojas	*	***	n.i
Tallos	n.i	*	n.i

Fase móvil: Hexano:Acetato de etilo (7:3) con gotas de ácido acético.

\*Baja intensidad, \*\*Moderada intensidad, \*\*\*Alta intensidad de las manchas del compuesto; n.i: no identificado.

Como se pudo observar la cromatografía en capa fina es una técnica fácil que nos permite identificar de una manera cualitativa el perfil de fitoquímicos presente en salvias. Los compuestos que se lograron identificar en la mayoría de las muestras fueron ácidos fenólicos: ácido rosmarínico, ácido clorógeno; flavonoides: el mayoritario fue únicamente luteolina; terpenos: ácido ursólico/ácido oleanólico y  $\beta$ -amirina, y finalmente un esteroles: estigmasterol. Mientras que en las antocininas la CCF sugiere que en su mayoría se trata de antocianinas aciladas y que son derivados de pelargonidina, definidina, malvidina y cianidina. Y de carotenos el mayoritario fue Zeaxantina.

## Etapa 5. Cuantificación de ácido rosmarínico en salvias por HPLC

### Preparación de muestras

La semipurificación de la muestra de flores de *S. mexicana* realizando extracciones líquido-líquido con acetato de etilo y hexano, permitió una mejor separación logrando una identificación de los compuestos y una posible cuantificación (Figura, 37).

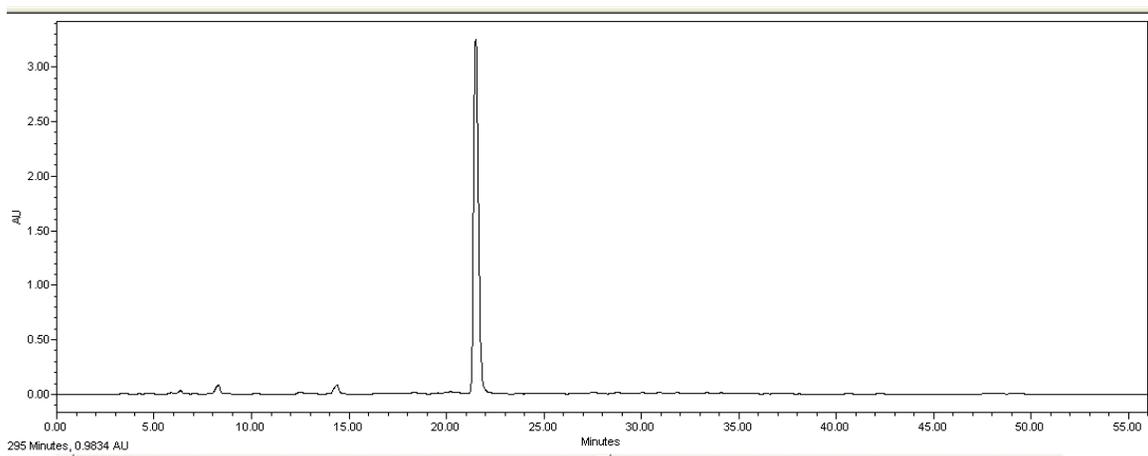


Figura 37. Cromatograma de HPLC a 320 nm del extracto semipurificado de flores de *S. mexicana*

Adicionalmente una de las ventajas de esta metodología es que al obtenerse 3 fracciones: acuosa, de hexano y de acetato de etilo, cada una de estas se enriquece en ciertos compuestos, esto se aprecia en la Figura 38.

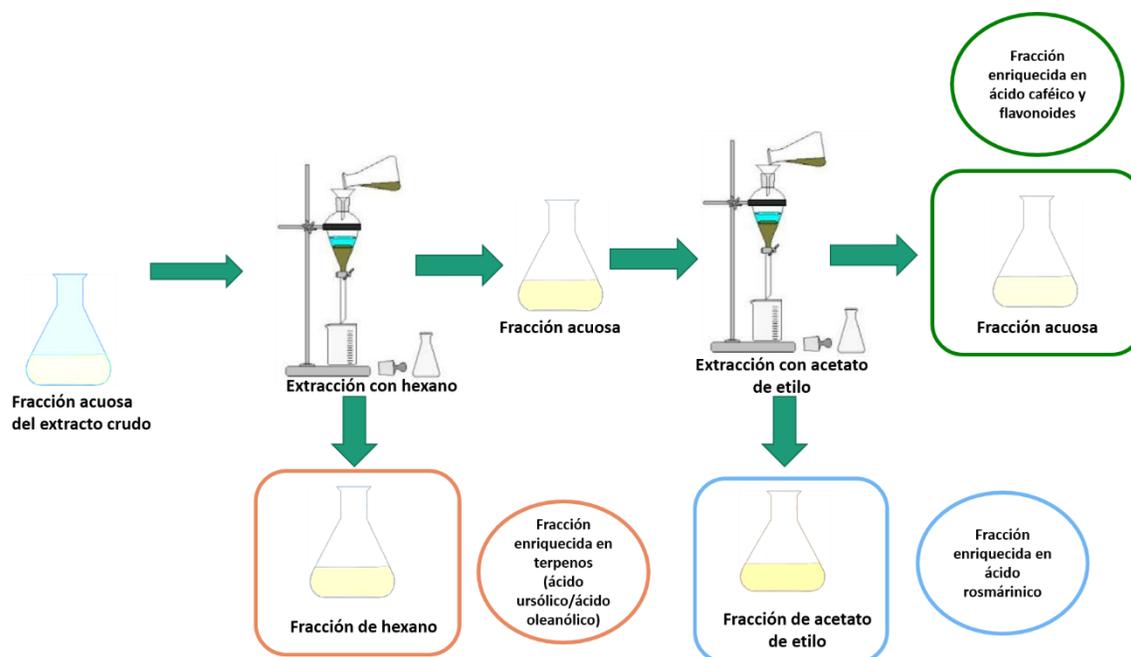


Figura 38. Fracciones y compuestos de la extracción líquido-líquido.

Además, si se parte de una muestra de flores la fracción acuosa se enriquece además en antocianinas, ya que son compuestos hidrosolubles, sin embargo, para conservarlos es necesario mantener un pH ácido.

### Obtención del estándar de ácido rosmarínico

Se logró obtener 3.41 mg de ácido rosmarínico a partir de un extracto de romero residual de la extracción de aceite esencial por medio de una cromatografía en capa fina preparativa. Este compuesto se empleó como estándar al comprobarse la identidad del compuesto y la pureza por medio de HPLC masas, la pureza obtenida fue de 96 % y la masa molecular fue de 360 g/mol (Linares, 2011), mientras que el tiempo de retención experimental de 21.8 min. concuerda con el reportado para este ácido de 22.8 min. por Fotovvat, 2018; el cromatograma obtenido fue el de la Figura 39.

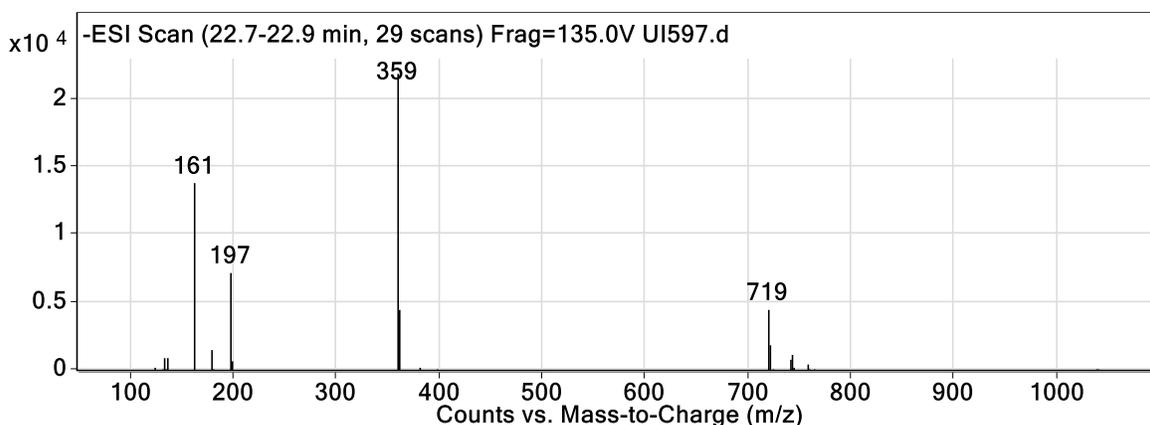


Figura 39. Cromatograma HPLC masas del estándar de ácido rosmarínico.

Con este compuesto se elaboró la curva patrón de ácido rosmarínico empleada para la cuantificación en salvias. La ecuación obtenida fue  $y = 2 \times 10^7 x + 3 \times 10^6$ ;  $r^2 = 0.9765$ .

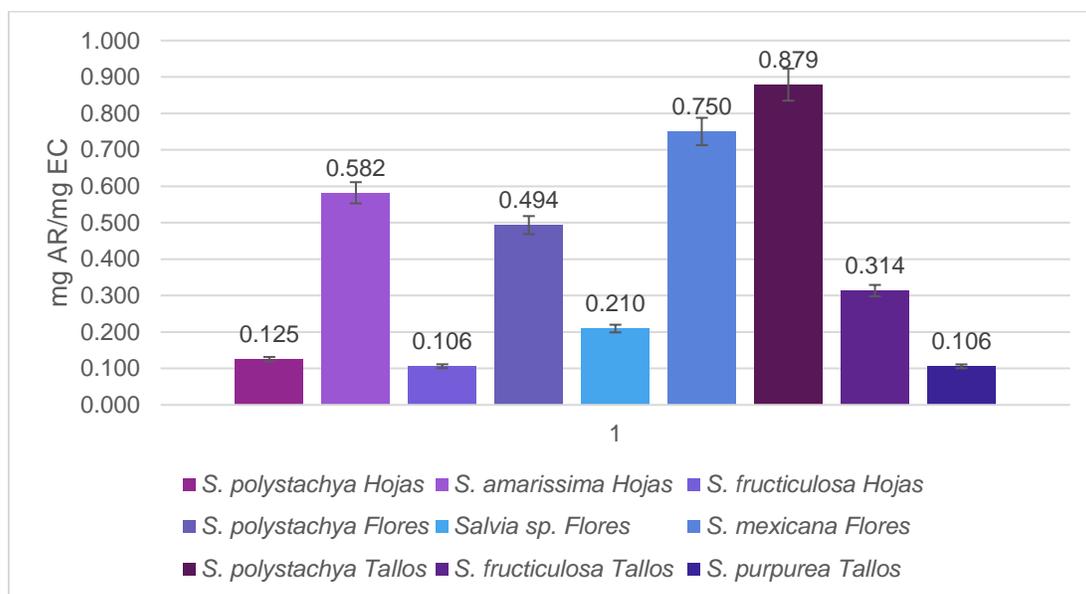
### Cuantificación de ácido rosmarínico en muestras de salvias

Las nueve muestras de salvias a las que se le cuantificó el contenido de ácido rosmarínico se muestran en la Tabla 20. Estas muestras fueron elegidas por tener un alto contenido de fenoles, se eligieron a *S. polystachya* por ser la especie que presentó contenido interesante de fenoles en sus tres órganos, mientras que se eligieron otras dos muestras que presentaran un contenido elevado de fenoles en cada órgano, esto con el fin de tener un total de tres determinaciones de ácido rosmarínico en hojas, tallos y flores de salvias.

Tabla 20. Muestras de salvias analizadas por HPLC

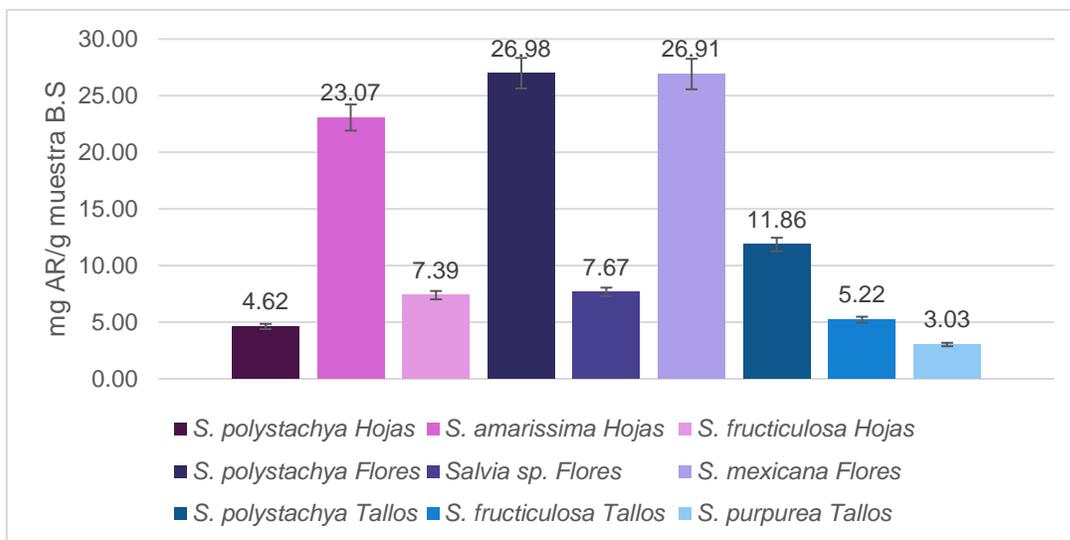
Muestra	Órgano	Muestra	Órgano
<i>S. polystachya</i>	Flores	<i>Salvia sp.</i>	Flores
<i>S. polystachya</i>	Tallos	<i>S. mexicana</i>	Flores
<i>S. polystachya</i>	Hojas	<i>S. fruticulosa</i>	Tallos
<i>S. amarissima</i>	Hojas	<i>S. purpurea</i>	Tallos
<i>S. fruticulosa</i>	Hojas		

Los resultados se obtuvieron con la ecuación de la curva patrón de ácido rosmarínico (AR) en cada una de las muestras, y se expresaron de 2 diferentes maneras con respecto al contenido de AR en el extracto concentrado de acetato de etilo (EC), como mg de AR/mg EC, Gráfica 5, el otro resultado fue respecto al contenido de AR en la muestra en base seca como mg de AR/g de muestra BS, Gráfica 6.



Gráfica 5. Contenido de ácido rosmarínico en extracto concentrado de salvias

La cuantificación de ácido rosmarínico con respecto a la cantidad de concentrado de acetato de etilo se observa que los tallos de *S. polystachya* es la que presenta una mayor cantidad con 0.879 mg AR/mg EC, lo cual representa que el ácido rosmarínico equivale al 88% del total del concentrado de la muestra, seguido de las flores de *S. mexicana* con 0.750 y de 0.582 mg AR/mg de las hojas de *S. amarissima*, es decir aquí se observa que existe un mayor contenido de AR en el siguiente orden tallos>flores>hojas. Al observar los tres órganos de *S. polystachya* observamos que esta tendencia se conserva.



Gráfica 6. Contenido de ácido rosmarínico en muestras de salvias

Ahora bien, al observar y analizar la Gráfica 6 en el que los resultados están expresados como mg de AR/g de muestra BS, observamos que la tendencia cambia, hay un mayor contenido en las flores de *S. polystachya* con 26.98 mg/g y *S. mexicana* seguido de las hojas de *S. amarissima*, con 26.91 y 23 mg/g, respectivamente, es decir que al considerar la masa de salvia de la que se parte para poder preparar el extracto, se demuestra que hay un mayor contenido en las flores, esto como resultado de cómo se mencionó en la determinación de fenoles, en los tallos hay un gran porcentaje de masa que corresponde a tejido de soporte.

En este caso al observar el contenido de AR en los tres órganos de *S. polystachya* se observa que la tendencia es la siguiente: flores>tallos>hojas. Previos trabajos indican que el contenido de AR en muestras de partes aéreas y hojas *S. officinalis* están en un rango de 5.5 a 39.3 mg/g extracto seco, dependiendo del método de extracción y sitio de colecta (Fotovvat, 2019) además, mientras que el trabajo de Shan, 2005 reporta 21.86 mg de AR/g muestra BS; los resultados obtenidos en estas especies mexicanas de salvias entran dentro del rango de concentraciones obtenidas en muestras de *S. officinalis*.

Al comparar los resultados con los valores de fenoles determinados (Tabla 10) se observa que se obtuvo resultados contrarios a lo esperado, ya que se esperaba que

las hojas de *S. amarissima* resultara con el mayor contenido de ácido rosmarínico al ser la muestra con el mayor contenido de mg de ácido gálico/g muestra, esto como posible consecuencia de que las hojas de las salvias presentaron un contenido elevado de flavonoides.

El método utilizado para la semipurificación y cuantificación de AR fue eficiente ya que permite enriquecer en más del 60% el extracto en contenido de este compuesto, esto se puede observar en los cromatogramas de cada una de las muestras cuantificadas de salvias. (Anexo IV).

Los datos obtenidos demuestran que existe una mayor concentración de ácido rosmarínico en flores y tallos. En un trabajo publicado por Li en 2015 se observa que existe un mayor contenido de AR en flores que en hojas de *S. officinalis*, esta tendencia fue corroborada en este trabajo.

## **Etapa 6. Evaluación del mejor método de extracción de ácido rosmarínico**

En esta etapa ya no fue posible seguir trabajando con muestras de salvias mexicanas, porque son especies que no se consumen, por lo tanto se empleó como muestra, romero ya que es una especie comestible, de fácil adquisición y con un alto contenido de ácido rosmarínico con el fin de en la siguiente etapa emplearlo para una aplicación en alimentos. La extracción de ácido rosmarínico se experimentó en hojas de romero residual de la extracción de aceite esencial, esto tuvo como ventaja la presencia de trabajar con una muestra con un menor contenido de compuestos volátiles, significando una muestra con un menor número de compuestos que facilitan la preparación y obtención de extractos ricos en ácido rosmarínico, además de la utilización de un residuo para la obtención de un subproducto con mayor valor agregado.

Los 6 métodos que se probaron y las características de la semipurificación se observan en la Tabla 8. Estos métodos fueron determinados según los resultados

obtenidos en la cuantificación de ácido rosmarínico en las muestras de salvias juntamente con la metodología reportada por Pires, 2018 para el método en el que realizan extracciones líquido-líquido, además las extracciones con agua caliente también han sido reportadas como un buen método para la extracción de AR en muestras de romero, según lo mencionado en la patente ES 2 285 714 T3 *Alimentos y bebidas que contienen antocianinas estabilizadas por extractos vegetales* de Naturex Inc.

Los resultados se expresan como mg ácido rosmarínico/mg extracto concentrado rico en ácido rosmarínico (mg AR/ mg ECAR) así como mg AR/ 100 g de romero BS en la Tabla 21.

*Tabla 21. Concentración de ácido rosmarínico en los 6 métodos probados.*

<b>Método</b>	<b>mg AR/ mg ECAR</b>	<b>mg AR/ 100 g romero</b>
<b>1:</b> H <sub>2</sub> O/liq-liq/AcEt	0.30	293.38
<b>2:</b> H <sub>2</sub> O/sol-liq/EtOH	0.19	448.52
<b>3:</b> H <sub>2</sub> O/sol-liq/AcEt	0.14	488.06
<b>4:</b> Acet/liq-liq/AcEt	0.32	729.39
<b>5:</b> Acet/sol-liq/EtOH	0.10	601.68
<b>6:</b> Acet/sol-liq/AcEt	0.15	602.21

De los seis métodos de la extracción de ácido rosmarínico en romero obtenemos que se favorece la utilizando una mezcla de acetona:agua como disolvente en comparación con el agua caliente al obtenerse mayores concentraciones con el extracto preparado con acetona:agua, esto concuerda con el trabajo de Sun, 2005; en el que menciona que un extracto de acetona-agua contiene concentraciones mayores de AR en muestra de romero. Con respecto al método de semipurificación se observa que para el extracto de agua se favorece la obtención de un extracto rico en AR utilizando una extracción sólido-líquido mientras que con el extracto obtenido de acetona hay un mayor rendimiento con una extracción líquido-líquido.

Ahora bien, si nos centramos en la extracción sólido-líquido observamos que para ambos métodos de extracción hay un ligero mayor recobro del AR adsorbido en la superficie de la resina Amberlite al utilizar acetato de etilo que con etanol. El método

con el que se obtiene el concentrado con un mayor contenido de AR es al emplearse una extracción sólido-líquido y una desabsorción con acetato de etilo es más efectiva, al obtener 488.06 mg AR/100 g muestra en el extracto a partir de agua, mientras que del extracto con acetona se obtiene una mayor cantidad al emplear la extracción líquido-líquido con 729.39 mg AR/100 g de muestra.

Si comparamos la presencia de impurezas en los 6 extractos obtenidos de cada método, por medio de los cromatogramas de las Figuras 40 y 41, podemos observar que los 2 métodos con mayor concentración Figuras 40 ( $H_2O/sol-liq/AcEt$ ) y 41 ( $Acet/liq-liq/AcEt$ ) presentan una menor presencia de impurezas notándolo como un menor número de picos.

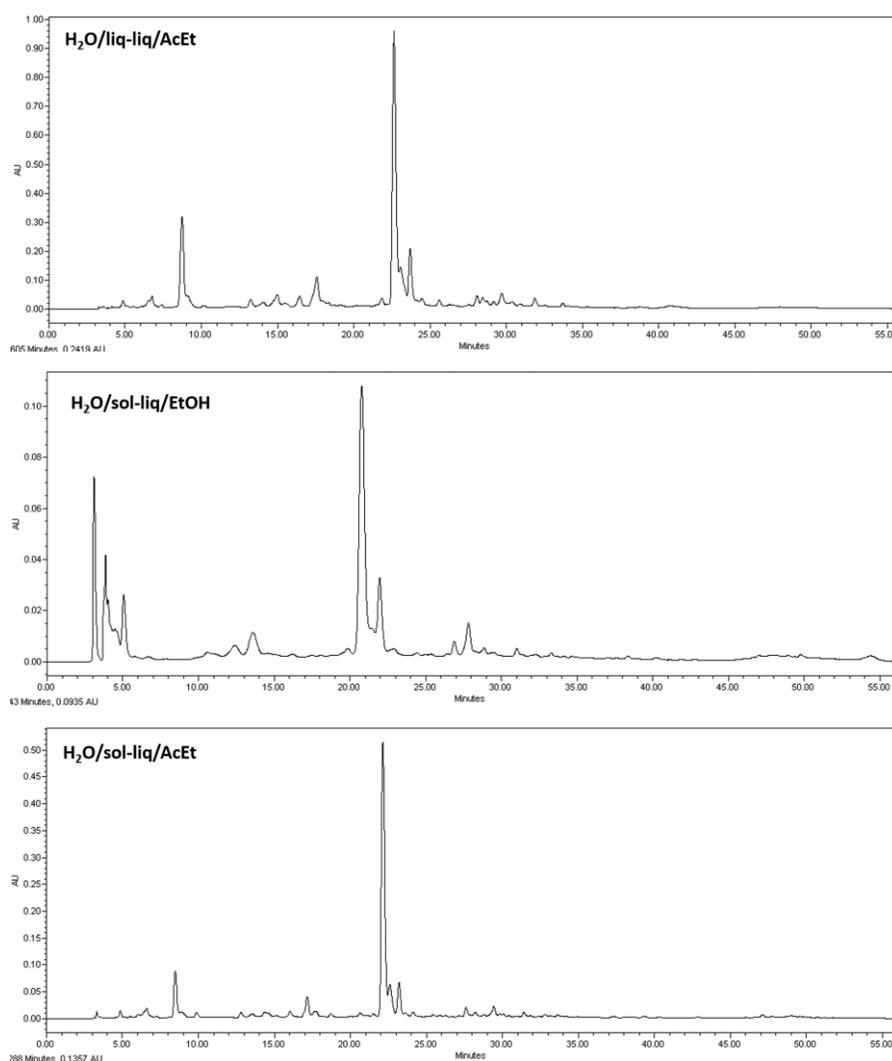


Figura 40. Cromatograma de HPLC a 320 nm de extractos concentrados enriquecidos en ácido rosmarínico a partir de extracto de agua

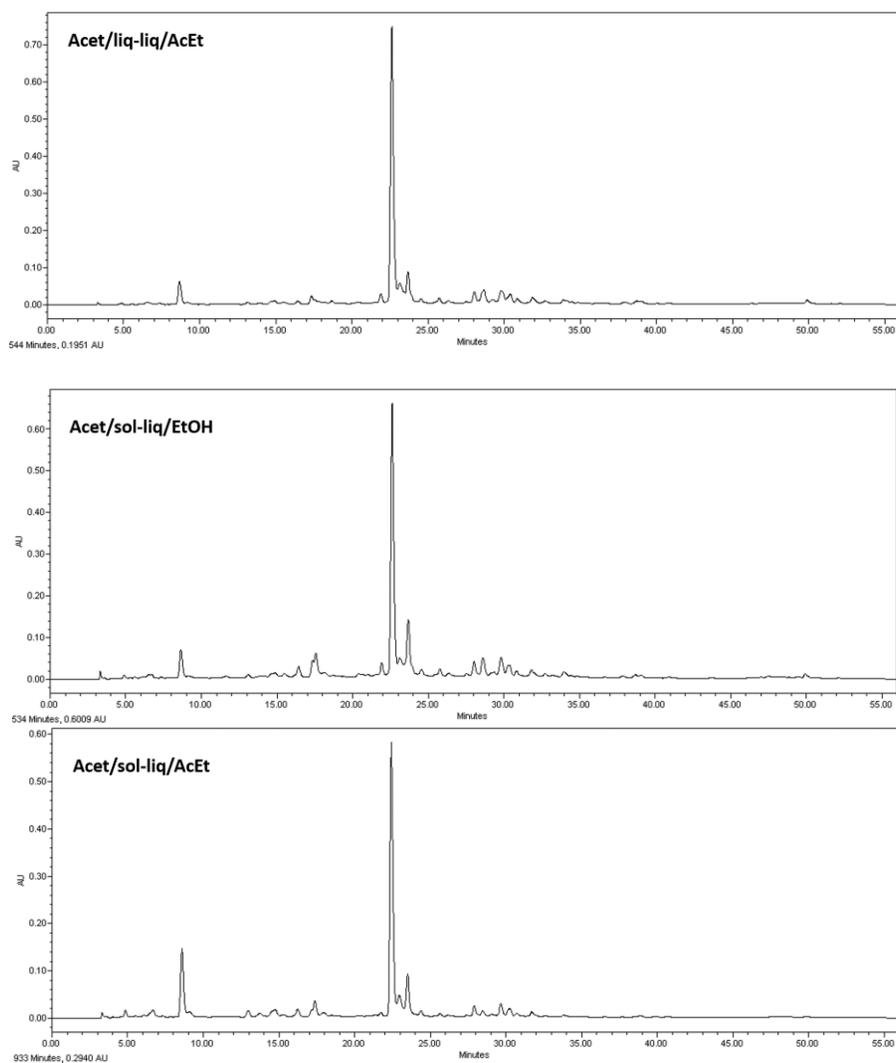


Figura 41. Cromatogramas de HPLC a 320 nm de extractos concentrados enriquecidos en ácido rosmarínico a partir del extracto de acetona

Retomando lo más importante de esta etapa es que existe una mayor extracción de AR al emplear acetona:agua y que el acetato de etilo es el disolvente que permite una mayor recuperación del compuesto de interés, tanto en la extracción líquido-líquido, así como en la sólido-líquido; sin olvidar que esta metodología fue probada en residuos de romero usado para la obtención de aceite esencial, demostrando que el residuo aún es rico en AR, y es posible la obtención de un producto con mayor valor agregado.

Asimismo, después de determinar cuáles fueron los mejores métodos de extracción en romero residual de la extracción de aceite esencial se realizaron estas metodologías pero ahora con romero comercial seco, en el que se esperaba obtener

una mayor concentración de ácido rosmarínico, ya que en la muestra anterior, al haber sido sometida a una destilación por arrastre de vapor para la obtención de aceite esencial el AR es extraído en la fracción acuosa empleada, se comprobó la presencia de AR en el agua residual de este proceso por CCF.

Las dos metodologías elegidas que se probaron en la muestra comercial de romero fueron las que presentó una mayor concentración de AR en cada extracto de agua y acetona, es decir, H<sub>2</sub>O/sol-liq/AcEt y Acet/liq-liq/AcEt, los resultados se pueden ver en la Tabla 22.

*Tabla 22. Concentraciones de ácido rosmarínico obtenidas en muestra de romero comercial*

<b>Método</b>	<b>mg AR/mg ECAR</b>	<b>mg AR/ 100 g romero</b>	<b>% AR (g AR/100 g romero)</b>
H <sub>2</sub> O/sol-liq/AcEt	0.32	887.96	0.89
Acet/liq-liq/AcEt	0.55	1809.31	1.81

Los datos obtenidos de AR ahora empleando romero comercial como muestra exhibe mayores concentraciones de AR por ambos métodos empleados al compararse con los resultados obtenidos con el romero residual, la concentración de mg AR/mg ECAR es de un 56 % más para el de agua y de 41 % más del método de extracción con acetona, esto concuerda con lo señalado anteriormente ya que en el proceso de obtención de aceite esencial se pierde el compuesto en la fracción acuosa de la hidrodestilación. Enfocándonos únicamente en los 2 métodos probados en el romero comercial se observa que existe una mayor concentración de AR en el extracto enriquecido con el extracto de acetona con el 1.81 %, mientras que el de agua un 0.90 % y es prácticamente un 50 % más.

La razón por la que se decidió probar ambos métodos es porque existe una mayor facilidad con respecto al número de pasos involucrados en la metodología de la extracción con agua que con el de acetona, a pesar de que previamente ya se conocía que se obtiene una mayor concentración partiendo del extracto de acetona

y se quiso determinar que tanta variación había al emplear romero sin ningún procedimiento previo.

Pires en 2018 realizó una metodología similar a la empleada para el extracto de acetona; trabajo en el que se empleó romero extrayendo con etanol al 70 % y se realizaron extracciones con acetato de etilo obteniéndose 115 mg AR/g extracto concentrado (ECAR), comparando nuestros valores obtenidos por ambos métodos obtenemos valores muy superiores a esta referencia con 320 y 550 mg/g ECAR, con esto comprobamos que la metodología desarrollada y empleada es eficiente para la obtención de un concentrado rico en ácido rosmarínico.

Después de determinar que el mejor método para la obtención de un extracto enriquecido en AR es una extracción con acetona para la obtención de un extracto que posteriormente es semipurificado con extracciones líquido-líquido con hexano y acetato de etilo, este procedimiento se utilizó con las flores de *S. polystachya*, muestra de salvia que presentó un mayor contenido de AR, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 23.

Tabla 23. Datos de ECAR en flores de *S. polystachya*

<b>Muestra</b>	<b>mg AR/mg ECAR</b>	<b>mg AR/100 g salvia</b>	<b>% AR (g AR/100 g salvia)</b>
Flores de <i>S. polystachya</i>	0.49	2697.98	2.70

Los resultados obtenidos en la muestra de *S. polystachya* muestra concentraciones muy interesantes, pues se obtienen concentraciones mayores a las encontradas en romero, con un 50 % más que lo encontrado en romero, por lo tanto, puede representar una nueva fuente para la obtención de ácido rosmarínico. No obstante, al tratarse de una muestra no comestible los usos que se le pueden dar son limitados para la industria alimentaria, por lo que es necesario profundizar más en la investigación de esta especie de salvia.

## Etapa 7. Prueba de estabilización de antocianinas con ácido rosmarínico

### Prueba de resistencia al calor de antocianinas con ácido rosmarínico

La prueba que se realizó para observar la resistencia al calor de la antocianina fue con el fin de observar si existe una diferencia entre la solución con la antocianina junto con el el ácido rosmarínico, como copigmentador, con respecto con la antocianina sola, ya que el fin fue aplicarlo en una bebida, la gran mayoría de alimentos son sometidos a tratamientos térmicos ya sea para su preparación o como método de conservación, y como se conoce que las antocianinas son altamente sensibles a altas temperatura, por lo tanto el realizar esta prueba nos dio un indicativo de la viabilidad del usarlo como colorante para alimentos.

A lo largo del procesamiento térmico los extracto tanto del control como el de prueba que contenía ácido rosmarínico presentaron cambios visibles muy ligeros en cuanto al color de las soluciones (Figura 43), las soluciones controles presentan una ligera disminución del tono de rojo, indicando una disminución del contenido de antocianinas y que la solución que contiene el extracto de romero se observa un color más intenso y por lo tanto sugiere una mayor resistencia al tratamiento térmico.

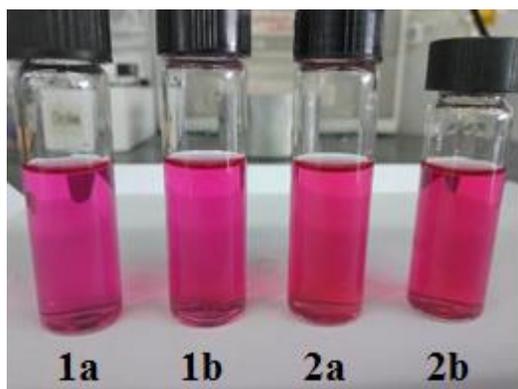


Figura 42. Soluciones para la prueba de copigmentación antes de tratamiento térmico. (1a y 1b: Control; 2a y 2b: con AR)

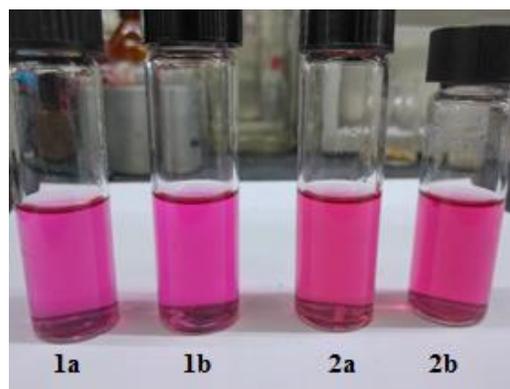
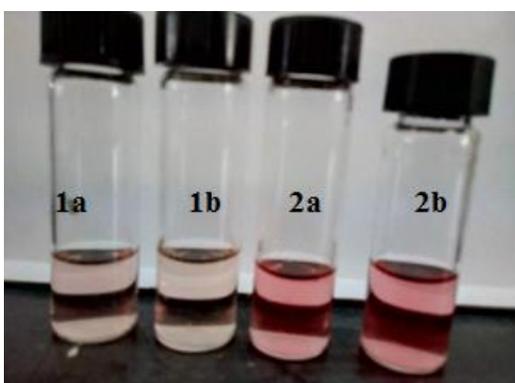
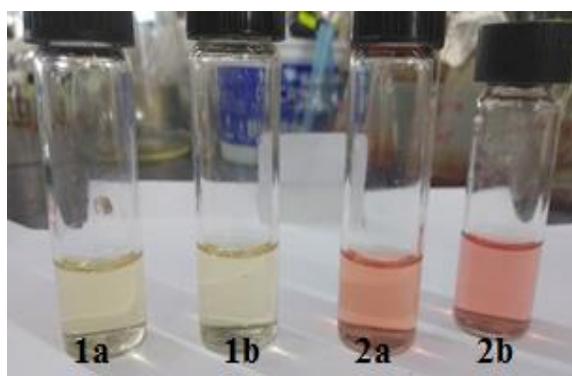


Figura 43. Soluciones para la prueba de copigmentación después de tratamiento térmico. (1a y 1b: Control; 2a y 2b: con AR)

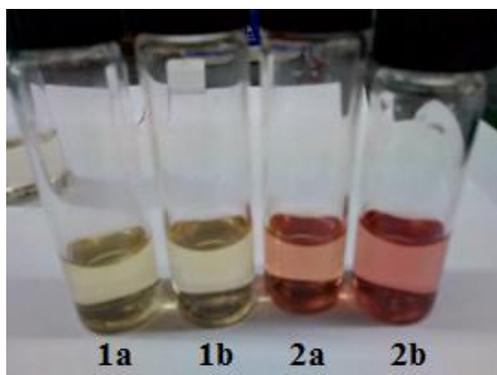
Aunque los cambios no son tan evidentes con los resultados obtenidos en el tratamiento térmico los mismos viales al ser expuestos al sol, simulando condiciones aceleradas de descomposición de antocianinas se logró observar cambios más interesantes entre el control y el que contiene ácido rosmarínico (AR). Las Figuras 44-45 muestran que con el paso de los días el color en las soluciones control se fue perdiendo hasta que en día 5 ya hay una pérdida total del color observando la solución color amarillo, evidenciando la degradación de la antocianina por la formación de la chalcona; mientras que las soluciones que contenían AR se observó de igual forma una pérdida de la tonalidad roja pero el color se mantiene más que el control, por lo tanto esto nos indica de manera cualitativa que la presencia de AR (con un alto contenido de ácido rosmarínico) en una antocianina presentó un efecto de protección contra el tratamiento térmico y a la luz solar.



*Figura 44. Soluciones para la prueba de copigmentación después de 4 días de tratamiento térmico.  
(1a y 1b: Control; 2a y 2b: con AR)*



*Figura 45. Soluciones para la prueba de copigmentación después de 5 días de tratamiento térmico.  
(1a y 1b: Control; 2a y 2b: con AR)*



*Figura 46. Soluciones para la prueba de copigmentación después de 6 días de tratamiento térmico.  
(1a y 1b: Control; 2a y 2b: con AR)*

El ácido rosmarínico ha sido probado como agente copigmentador con malvidina-3-glucósido en un trabajo de Eiro en 2002, y menciona que se encontró que este ácido en comparación con otros ácidos fenólicos probados obtuvo el mayor efecto batocrómico con 19 nm y el más fuerte efecto hiperocrómico dando como resultado un incremento en la intensidad de color de un 260 %, sin embargo la solución probada fue almacenada y durante un tiempo la estabilidad del color se vio afectada, este efecto se observó con los resultados obtenidos ya que con el paso del tiempo la estabilidad del color se vio afectada aunque no se ve una pérdida total de color. Sin embargo para obtener datos cuantificables se sugiere realizar esta misma prueba con datos de efectos batocrómicos e hiperocrómicos, y/o a su vez determinaciones con un colorímetro.

### **Aplicación de ácido rosmarínico en una bebida**

La bebida elaborada se realizó con el fin de observar si la presencia de extracto de romero mejora el color de la bebida, se elaboraron un total de 4 bebidas, 2 con un pH=3 y 2 con pH>3, después del tratamiento térmico se observó que las bebidas mantenían una coloración roja (Figura 47) demostrando que habían soportado el tratamiento térmico de 85°C y se observó que en la bebida con un pH de 3 se nota una coloración más intensa, debido a que las antocianinas presentan una mayor intensidad de color a pH más ácidos.

Las bebidas a diferentes pH que se colocaron en cada una de las 2 condiciones diferentes, en condiciones ideales a temperatura de refrigeración (4°C) y en contacto con la luz solar a temperatura ambiente, es decir condiciones que representan una degradación acelerada de las antocianinas, presentaron cambios que se monitorearon de forma visual. En la Figura 47 y 48 se observan las bebidas después de 1 día de elaboración de las bebidas, y se puede observar que existió un cambio en la intensidad del color, en las bebidas expuestas a sol sin importar el pH se observa que la coloración roja es muy ligera, pero aún presentan coloración, pero al observar las bebidas de pH 3 en las 2 condiciones se observa una diferencia muy

notable en cuanto al tono de color, esto nos indica que la antocianina si se degradó con la presencia de luz, y que en condiciones ideales el color permanece.

Al día 4 (Figura 49) la bebida expuesta a sol presenta una coloración roja aún más ligera y al día 7 (Figura 50) esa coloración se pierde, observando la bebida con una coloración ligeramente marrón indicando que la antocianina ya se degrado en su totalidad. Sin embargo, en esas mismas figuras se puede comparar con la bebida almacenada en condiciones ideales, y se observa que esta bebida sigue manteniendo la coloración roja.

Al día 76 (2.5 meses) de almacenamiento las bebidas en condiciones ideales tanto de pH 3 y pH>3 mantienen la coloración roja, demostrando que el colorante empleado de antocianina más extracto de romero como copigmentador logra mantener el color de la bebida después de tratamiento térmico, Figura 52. Por lo que si se emplea este colorante para la elaboración de alimentos es indispensable mantenerlo en refrigeración para mantener la coloración deseada, ya que como observamos al estar a temperatura ambiente y en contacto con la luz la antocianina se degrada rápidamente perdiendo el color, y si este efecto se observa en un alimento el consumidor lo rechazará por no cumplir con las características sensoriales esperadas.



*Figura 47. Bebidas después de tratamiento térmico, día 1 (derecha: pH 3, izquierda: pH>3)*



*Figura 48. Bebidas día 2 (derecha: pH>3 y expuesta a sol; izquierda: pH 3 expuesta a sol)*



*Figura 49. Bebidas día 2  
(derecha: pH 3, condiciones ideales; izquierda pH 3  
expuesta a sol)*



*Figura 50. Bebidas día 4  
(derecha: pH 3 condiciones ideales; izquierda pH 3  
expuesta a sol)*



*Figura 51. Bebida día 7  
(derecha: pH 3 expuesta a sol; izquierda: pH 3  
condiciones ideales.*



*Figura 52. Bebida día 76 condiciones ideales  
(derecha pH 3; izquierda pH>3)*

### 3. Conclusiones

- I. La utilización de acetona:agua como disolvente para la extracción de fenoles y flavonoides aumenta la concentración en comparación con la utilización de mezclas de agua con metanol y etanol, mientras que las antocianinas son favorecidas con la mezcla metanol:agua:ácido acético
  
- II. Las muestras de salvias de origen mexicano presentan concentraciones de fenoles en un rango de 28.51 a 141.39 mg ácido gálico/g muestra, mientras que flavonoides de 8.60 a 70.12 mg catequina/ g muestra; estas concentraciones van de acuerdo con las tendencias determinadas en diferentes especies de salvias. Las hojas y flores son los órganos de las salvias que presentan un mayor contenido de fenoles, en el caso de flavonoides son las hojas. En general las hojas de *S. amarissima* es la que presentó mayores concentraciones de fenoles y flavonoides.
  
- III. La cromatografía en capa fina es una técnica que permite identificar de una manera sencilla el perfil de fitoquímicos presentes en salvias. Los compuestos que se lograron identificar en todas las muestras fue el ácido rosmarínico y en la mayoría de las muestras fueron ácido clorogénico y ácido cafeico; flavonoides: luteolina; terpenos: ácido ursólico/ácido oleanólico y  $\beta$ -amirina, y un esteroles: estigmasterol. En los carotenos el mayoritario fue Zeaxantina.
  
- IV. El ácido rosmarínico se cuantificó por HPLC en 9 muestras de salvias con un método que permitió obtener un concentrado enriquecido en ácido rosmarínico, las muestras contienen de 3.03-26.98 mgAR/g muestra, la muestra con un mayor contenido corresponde a flores de *S. polystachya* con 26.98 mg AR/g muestra.

**V.** De los 6 métodos probados para la obtención de un extracto enriquecido en ácido rosmarínico en romero residual de la obtención de aceite esencial, los 2 mejores fueron la extracción acetona:agua con extracción líquido-líquido, y la extracción con agua con extracción sólido-líquido con acetato de etilo, y fue demostrado que a partir del residuo de romero es posible la obtención de un extracto enriquecido en ácido rosmarínico. A partir de romero comercial se obtuvieron extractos enriquecidos en ácido rosmarínico con una concentración de 1809.31 y 887.96 mg AR/ 100 g romero, para el método Acet/liq-liq/AcEt y H<sub>2</sub>O/sol-liq/AcEt respectivamente. La muestra de flores de *Salvia polystachya* presenta una concentración muy interesante, pues se obtienen concentraciones mayores a las encontradas en romero, con un 50 % más que lo encontrado en romero, por lo tanto, representan una posible nueva fuente para la obtención de ácido rosmarínico.

**VI.** La adición de un extracto de romero enriquecido en ácido rosmarínico en una solución de antocianina presenta un efecto copigmentador al proteger de la degradación de la antocianina al estar en contacto con la luz del sol, visualmente se observa que la solución con AR mantiene el color rojo de la antocianina después de 5 días, mientras que la solución control ha perdido el color, observándose la coloración amarilla de la formación de la chalcona.

**VII.** La adición de un extracto de romero en una solución de antocianinas empleado como colorante en la elaboración de una bebida logra mantener el color rojo después del tratamiento térmico y el color se mantiene después de ser almacenada en condiciones de refrigeración (4°C) por 76 días.

## 4. Bibliografía

1. Abdelkader, M., Ahcen, B., Rachid, D., Hakim, H. (2014). Phytochemical Study and Biological Activity of Sage (*Salvia officinalis* L.). *International Journal of Bioengineering and Life Sciences*.8 (11). 1253-1257
2. Ahmed, A. M., & Ismail, T. H. (2010). Improvement of the quality and shelf-life of minced beef mixed with soy protein by Sage (*Saliva officinalis*). *African Journal of Food Science*, 4(6), 330–334.
3. Ahuatzin, B. (2015). Las plantas sagradas mexicanas. *Revista Ciencia*. 48
4. Alonso, A., Villarreal, M., Salazar, L., Gómez, M., Domínguez, F., García, A. (2011). Review Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 133, 945 -972.
5. Andrade, A. and Heinrich, M. (2005). Mexican plants with hypoglycemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 99, 325–348.
6. Andrade, A. (2009). Ethnobotanical study of the medicinal plants from Tlanchinol, Hidalgo, México. *Journal of Ethnopharmacology* 122, 163–171.
7. Argumedo, R., Parra, H., Ramírez, M., Camacho, A., Martínez, M. (2003). Isolation and Chemical Transformations of Some Anti-inflammatory Triterpenes from *Salvia mexicana* L. var. minor Benth. *Revista de la Sociedad Química de México*, 47 (2),167-172.
8. Bahadori, M., Mirzaei, M. (2015). Cytotoxicity, antioxidant activity, total flavonoid and phenolic contents of *Salvia urmiensis* Bunge and *Salvia hydrangea* DC. ex Benth. *Research Journal of Pharmacognosy*, 2(2), 27-32.
9. Bakowska, A., Kucharska, A., JOszmianski, O. (2003). The effects of heating, UV irradiation, and storage on stability of the anthocyanin–polyphenol copigment complex. *Food Chemistry*, 81,349–355.
10. Barnes, J., Anderso, L., Philipson, D. (2005). *Plantas medicinales: guía para los profesionales de la salud*. Barcelona: Pharma, 443-444
11. Bautista, E. Fragoso, M., Ortiz, Y., Toscano, R., Ortega, A. (2016). Structural elucidation and evaluation of multidrug-resistance modulatory capability of amarissinins A–C, diterpenes derived from *Salvia amarissima*. *Fitoterapia*, 114, 1-6.
12. Barreiro, C. Barredo, J. (2018). *Methods in Molecular Biology. Microbial Carotenoids*. Human press; Springer Protocols: USA, 45-53.
13. Biesalski, H., Ove, L., Elmadfa, I., Grossklaus, R., Müller, M., Schrenk, D., Walter, P., Weber, P. (2009). Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition*. 25, 1202–1205.

14. Carović-Stanko K, Petek M, Grdiša M, et al. (2016). Medicinal plants of the family *Lamiaceae* as functional foods –a review. *Czech J Food Sci*, 34(5):377-390.
15. Castañeda, A., Guerrero, J. (2015). Pigmentos en frutas y hortalizas rojas: Antocianinas. *Temas selectos de ingeniería de alimentos* 9. 25-33.
16. Cely, W., Matulevich, J., Castrillón, F. 2014. Triterpenes and sterols of *Salvia leucantha* (*Lamiaceae*) and evaluation of their antioxidant capacity. *Facultad de ciencias básicas*. 10 (1), 68-79.
17. Chang, Z., Yu, Y., Zhong, C., Guo, W., Fu, W., Quan, Z. Chong, W, Xing, X. (2017). Review Stability-increasing effects of anthocyanin glycosyl acylation. *Food Chemistry* 214, 119–128.
18. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. (CONABIO) y Secretaría del Medio Ambiente del Distrito Federal. (SEDEMA). (2016). *La biodiversidad de la Ciudad de México*. México: CONABIO/SEDEMA. 158-167.
19. Comisión nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad. CONABIO. (2012). Distribución de las especies. Recuperado el 26 de noviembre de 2019 en: <https://www.biodiversidad.gob.mx/especies/distribesp.html>.
20. Cornejo, G., Ibarra, I. (2011). Diversidad y distribución del género *Salvia* (*Lamiaceae*) en Michoacán, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 82, 11279-1296.
21. Cuevas, C. (2018). Química y evaluación del efecto antinociceptivo de *Salvia purpurea* Cav. (*Lamiaceae*). Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. [En línea] Disponible en: <http://132.248.9.195/ptd2018/noviembre/0783230/Index.html>.
22. Daly, T., Jiwan, M., O'Brien, N., Aherne, A. (2010). Carotenoid Content of Commonly Consumed Herbs and Assessment of Their Bioaccessibility Using an In Vitro Digestion Model. *Plant Foods Hum Nutr* 65:164–169.
23. Díaz, J. (2014). *Salvia divinorum*: enigma psicofarmacológico y resquicio mente-cuerpo. *Salud Mental*; 37, 183-193.
24. Dominguez, G. y Castro A. (2002). Usos medicinales de la familia *labiatae* en Chiapas, México. *Etnobiología*, 2, 19-31.
25. Eiro, M. Heinonen, M. (2001). Anthocyanin Color Behavior and Stability during Storage: Effect of Intermolecular Copigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7461-7466.
26. Fan, M., Luo, D., Peng, L.-Y., Li, X.-N., Wu, X.-D., Ji, X., & Zhao, Q.-S. (2019). Neo-clerodane diterpenoids from aerial parts of *Salvia hispanica* L. and their cardioprotective effects. *Phytochemistry*, 166.
27. Fakir, H., Korkmaz, M., & Güller, B. (2009). Medicinal plant diversity of western Mediterranean region in Turkey. *Journal of Applied Biological Sciences*, 3(2), 30–40.

28. Fasseas, M. K., Mountzouris, K. C., Tarantilis, P. A., Polissiou, M., & Zervas, G. (2008). Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils *Food Chemistry*, 106(3), 1188–1194.
29. Fernández, M. F. (2014). Identificación y cuantificación de antocianinas aciladas de plantas endémicas de México (maíces y salvias). Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. [En línea] Disponible en: <http://132.248.9.195/ptd2014/octubre/0720451/Index.html>
30. Figueroa, J. (2009). Reflexiones respecto a plantas medicinales y su enseñanza en medicina. *Revista Digital Universitaria*. [en línea]. 10(9). Disponible en: <<http://www.revista.unam.mx/vol.10/num9/art55/int55.htm>
31. Forés, R. (1997). Atlas de las plantas medicinales y curativas. La salud a través de las plantas. España: Cultural. S.A, 100.
32. Fontanay, S., Grare, M., Mayer, J., Finance, C., Duval, R. (2008). Ursolic, oleanolic and betulinic acids: Antibacterial spectra and selectivity indexes. *Journal of Ethnopharmacology*, 120, 272–276.
33. Fotovvat, M., Radjabian, T., Saboora, A. (2019). HPLC Fingerprint of Important Phenolic Compounds in Some *Salvia L.* Species from Iran. *Recorder of Natural Products*. 13(1), 37-49.
34. Frezza, C., Venditti, A., Serafini, M., Bianco, M., (2019). Chapter 4: Phytochemistry, Chemotaxonomy, Ethnopharmacology, and Nutraceuticals of *Lamiácea*. *Studies in Natural Products Chemistry*, 62, p.125-178.
35. Gantner, M., Brodowska, M., Górska, E., Wojtasik, I., Najda, A., Pogorzelska, E., Godziszewsk, J. (2018). Antioxidant effect of sage (*Salvia officinalis L.*) extract on turkey meatballs packed in cold modified atmosphere. *Journal of Food*. 16(1), 628–636.
36. Garzón, G. 2008. Anthocyanins As Natural Colorants And Bioactive Compounds. A Review. *Acta Biológica Colombiana*, 13(3), 27-36.
37. Gauche, C., da Silva, E., Bordignon, M. (2010). Effect of pH on the copigmentation of anthocyanins from Cabernet Sauvignon grape extracts with organic acids. *Scientia Agricola (Piracicaba, Braz.)*, 67(1), 41-46.
38. Gezek, G., Hashemia, P., Kalaycioğlu, K., Kaygusuza, H., Sarioğlu, G., Dökerc, S., Dirmencid, T., Erima, F. (2019). Evaluation of some Turkish *Salvia* species by principal component analysis based on their vitamin B2, mineral composition, and antioxidant properties. *Food Science and Technology*. 100, 287–293.
39. Ghorbani, A., Esmailizadhe, M. (2017). Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. *Journal of traditional and complementary medicine*. 7. 433-440.
40. Gonzáles, J. (2014). Sistemática de *Salvia* sección *Membranaceae* (Lamiaceae) y diversidad de Lamiaceae en el occidente de México. Tesis de doctorado. Universidad de Guadalajara.

41. Gould, K., Davies, K. Winefield, C. (2009). Anthocyanins Biosynthesis, Functions, and Applications. Springer Science: USA. 287-289.
42. Guevara, M., Tovar, A. R., Torres, N., Aguilar, C. A., Medina, I., Gil, L., Hernández, I., López, P., Ordaz, G., Canizales, S., & Guillen, L. E. (2012). A Dietary Pattern Including Nopal, Chia Seed, Soy Protein, and Oat Reduces Serum Triglycerides and Glucose Intolerance in Patients with Metabolic Syndrome. *The Journal of Nutrition*, 1, 64.
43. Haque, S., Ghoshal, O., Ghoshal, K. (1981). Anthocyanins in *Salvia* -Their Significance in Species Relationship and Evolution. *Proceedings of Indian National Science Academy*, B47(2), 204-209.
44. Hamdy, M., Sarhana, M., Abdel-Hamed, K., Ibrahim K. (2013). Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris L.*), sage (*Salvia officinalis L.*), and marjoram (*Origanum majorana L.*) extracts. *Industrial Crops and Products*. 43, 827–831.
45. Hayashi, T., Oka, H., Ito, Y., Goto, T., Ozeki, N., Itakura, Y., Matsumoto, H., Otsuji, Y., Akatsuka, H., Miyazawa, T., Nagase, H. (2003). Simultaneous Analysis of Carotenoid Colorings in Foods by Thin Layer Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 26(5). 819–832.
46. Idolo, M., Motti, R., & Mazzoleni, S. (2010). Ethnobotanical and phytomedicinal knowledge in a long-history protected area, the Abruzzo, Lazio and Molise national park (Italian Apennines). *Journal of Ethnopharmacology*, 127(2), 379–395.
47. Islas E. (2013). Determinación del perfil de compuestos bioactivos fenólicos y terpénicos pentacíclicos en salvias mexicanas. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. [En línea] Disponible en <http://132.248.9.195/ptd2013/abril/0692585/Index.html>
48. Jacobo, N., Jacobo, F., Zentella, A., Andrade, A., Heinrich, M., Pérez, C. (2016). Medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of colorectal cancer. *Journal of Ethnopharmacology* 179, 391–402.
49. Jarić, S., Mačukanović-Jocić, M., Djurdjević, L., Mitrović, M., Kostić, O., Karadžić, B., *et al.* (2015). An ethnobotanical survey of traditionally used plants on Suva planina mountain (south-eastern Serbia). *Journal of Ethnopharmacology*, 175, 93–108.
50. Jenks, A., & Kim, S. (2013). Medicinal plant complexes of *Salvia* subgenus *Calosphace*: An ethnobotanical study of new world sages. *Journal of Ethnopharmacology*, 146(1), 214–224.
51. Jiménez, A. (2012). *Herbolaría mexicana*. 2a. Ed. México: Colegio de postgraduados, 306.

52. Jolanta B., Z., & Jakub, W. (2013). *Salvia divinorum*: from Mazatec medicinal and hallucinogenic plant to emerging recreational drug. *Human. Psychopharmacology: Clinical & Experimental*, (5), 403.
53. Juárez, M., Carranza, C., Alonso, A., González, V., Bravo, E., Chamarro, F., Solano, E. (2013). Ethnobotany of medicinal plants used in Xalpatlahuac, Guerrero, México. *Journal of Ethnopharmacology*, 148, 521–527.
54. Jurado, T., Aparcana, I., Villarreal, L., Ramos, E. *et al.* 2016. Evaluación del contenido de polifenoles totales y la capacidad antioxidante de los extractos etanólicos de los frutos de aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) de diferentes lugares del Perú. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 82(3), 272-279
55. Kamatou, G. Makunga, N., N.Ramogola, W., Viljoen, M. (2008). Review South African *Salvia* species: A review of biological activities and phytochemistry. *Journal of Ethnopharmacology*, 119(3), 664-672.
56. Khanam, U. Oba, S. (2013). Bioactive substances in leaves of two amaranth species, *Amaranthus tricolor* and *A. hypochondriacus*. *Can. J. Plants Sci.* 93, 7-58.
57. Kocak, M., Sarikurkub, C., Cengiz, M., Kocak, S., Urena, M., Tepe, B. (2016). *Salvia cadmica*: Phenolic composition and biological activity. *Industrial Crops and Products*. 85, 204–212.
58. Kontogianni, V. G., Tomic, G., Nikolic, I., Nerantzaki, A. A., Sayyad, N., Stosic-Grujicic, S., Tzakos, A. G. (2013). Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. *Food Chemistry*, 136(1), 120–129.
59. Lara, E., Fernández, E. C., Lara, D., Chaloupkova, P., Zepeda, J., Milella, L., & Russo, D. (2019). An Ethnobotanical Survey of Medicinal Plants Used in Papantla, Veracruz, Mexico. *Plants (Basel, Switzerland)*, 8(8), 246.
60. Li, B., Zhang, C., Peng, L., Liang, Z., Yane, X., Zhue, Y., Liu, Y. (2015). Comparison of essential oil composition and phenolic acid content of selected *Salvia* species measured by GC–MS and HPLC methods. *Industrial Crops and Products*, 69, 329–334.
61. Linares, I., Arráez, D., Herrero, m. Ibáñez, E., Segura, A., Fernández, A. (2011). Comparison of different extraction procedures for the comprehensive characterization of bioactive phenolic compounds in *Rosmarinus officinalis* by reversed-phase high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218. 7682– 7690.
62. López, L., Castaño, H., Mejía, C. (2013). Antimicrobial effect of essential oil from *Salvia officinalis* L. on food related microorganisms. *Actualidades Biológicas*, 35(98), 77-83.

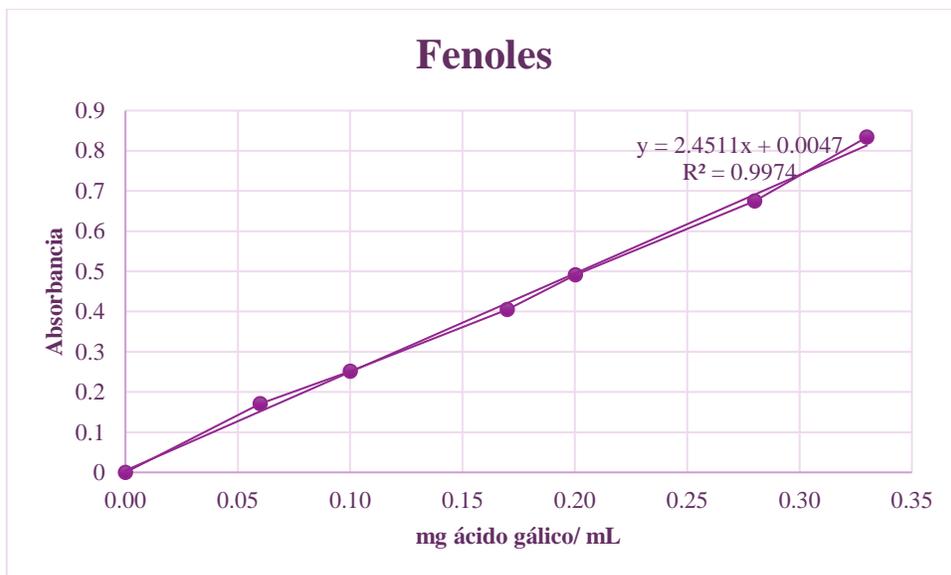
63. López, C., Sánchez, M., Arrieta, D., Román, J. (2010). Estudio preliminar fitoquímico y de la actividad antimicrobiana de *Salvia amarissima* Ort. *Investigación Universitaria Multidisciplinaria*. 9 (9). 67-76.
64. Lu, Y., Foo, Y. (2002). Polyphenolics of *Salvia*—a review. *Phytochemistry* 59. 117–140.
65. Maldonado, E and Ortega, A. (2000). Polystachynes A-E, five cis-neoclerodane diterpenoids from *Salvia polystachya*, *Phytochemistry*, 53, 103-109.
66. Malten, A. Dangles. O. Amlot M. (2001). Color Stability of Commercial Anthocyanin-Based Extracts in Relation to the Phenolic Composition. Protective Effects by Intra and Intermolecular Copigmentation. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 49, 170-176.
67. Martínez, M., Fragoso, I., García, M., Montiel, O. (2013). Géneros de *Lamiaceae* de México, diversidad y endemismo. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84: 30-86.
68. Martínez, M., González, E., Carretero, M., Gómez, P. (2014). Influence of phenological stage on chemical composition and antioxidant activity of *Salvia lavandulifolia* Vahl. essential oils. *Industrial Crops and Products*, 53, 71– 77.
69. Martínez, M. Bedolla, B., Cornejo, G., Fragoso, I., García, M., González, J., Lara, S., Zamudio, S. (2017). *Lamiaceae* de México. *Botanical Sciences*, 95 (4): 780-806.
70. Mariutti, Lilian R., Orlien, Vibeke, Bragagnolo, Neura, & Skibsted, Leif H. (2008). Effect of sage and garlic on lipid oxidation in high-pressure processed chicken meat. *European Food Research and Technology*, 227(2), 337–344.
71. Muñetón, P. (2009). "Plantas medicinales: un complemento vital para la salud de los mexicanos. Entrevista con el Mtro. Erick Estrada Lugo". *Revista Digital Universitaria*. [en línea].10(9).  
Disponibile en : <http://www.revista.unam.mx/vol.10/num9/art58/int58.htm>
72. Muñoz, A. Ortiz, C. Encina, C. (2011). Fitoesteroles y fitoestanoles: Propiedades saludables. *Revista Horizonte Médico*, 11(2), 93-100.
73. Ortega, T., Carretero, M., Villar, a. 2002. *Salvia* Fitoquímica, farmacología y terapéutica. *Farmacia profesional*. 16(7), 60-63.
74. Ormeño, E., Fernández, C. (2012). Los terpenos de las plantas. *Investigación y ciencia*. 62-69.
75. Pinzón, S., Méndez, D., Marmolejo, M., Tascón, J., Zurita, M., Galindo, Y., Lozano, G. (1994). *Diccionario enciclopédico de la medicina tradicional mexicana*. México: Instituto Nacional Indigenista de México. 383, 780
76. Pires, G., Rigon, C., Terra, S., Loureiro, A., Luiz, R., Anraku de Campos, M., Antunes, F., Fachinnetto, R. (2018). Antibacterial and antioxidant effects of

- Rosmarinus officinalis* L. extract and its fractions. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* xxx, 1-10.
77. Pop, A., Bobeanu, C., Fărcaș, A., Tofană, M., Vârban, D., Bogătean, C., Socaci, S. (2016). Study Regarding the Use of *Salvia Officinalis* Essential Oil in Food Products with a High Fat Content (Mayonnaise). *Bulletin UASVM Food Science and Technology*, 73(1)
  78. Qiangqiang, J., Ruyuan, Z, Yimiao, T., Beibei, C., Rui, L., Lin, L., Lili, W., Yiwen, C., Dandan, Z., Fangfang, M., Sihua, G., Dongweia, Z. (2019). Review *Salvia miltiorrhiza* in diabetes: A review of its pharmacology, phytochemistry, and safety. *Phytomedicine*, 58, 152871
  79. Quintana, A. Hurtado, A., Hernández, C., Palacios, E. (2018). Carotenoides ¿Qué son y para que se usan?. *Revista ciencia*. 69(4), 51-55
  80. Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular. *Nutrición Hospitalaria*, 27(1), 76-89.
  81. Rodríguez, L., Esquivel, B., Sanchez, C., Estebanes, L. Cárdenas, J. Soriano, M., Ramamoorthy, T. (1989). Abietane type diterpenoids from *sali4/l fruticulosa*. a revision of the structure of fruticulin B. *Phytochemistry*, 28( 2), 567-570.
  82. Rodriguez, D. (2019). Update on natural food pigments - A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains. *Food Research International*, 124, 200–205
  83. Sánchez, E., Pérez, A. Chávez, D y Rodríguez, C. (2005). Caracterización farmacognóstica de *Salvia officinalis* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 10(1)
  84. Santana, O., Cabrera, R., Giménez, C., González-Colomad, A., R. et al (2012). Perfil químico y biológico de aceites esenciales de plantas aromáticas de interés agroindustrial en Castilla-La Mancha (España). *Grasas y aceites*, 63 (2), 214-222.
  85. Selim, S. (2011). Antimicrobial activity of essential oils against vancomycin-resistant enterococci (VRE) and *Escherichia coli* O157: H7 in feta soft cheese and minced beef meat. *Brazilian Journal of Microbiology*, 42(1), 187–196.
  86. Serrano, C., Calsino, B., Tupa, A., Huamán, R., Ludeña, M., Ludeño, M., Rodríguez, E. (2016). Quantification of oleanolic acid, ursolic acid and rosmarinic acid in three Peruvian species of *Clinopodium* (*Lamiaceae*, *Nepetoideae*, *Menthaeae*). *Arnaldoa*, 23(1), 333 – 350.
  87. Serrano, M., López, M., Sainz, T. (2006). Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 37(4), 58-68.

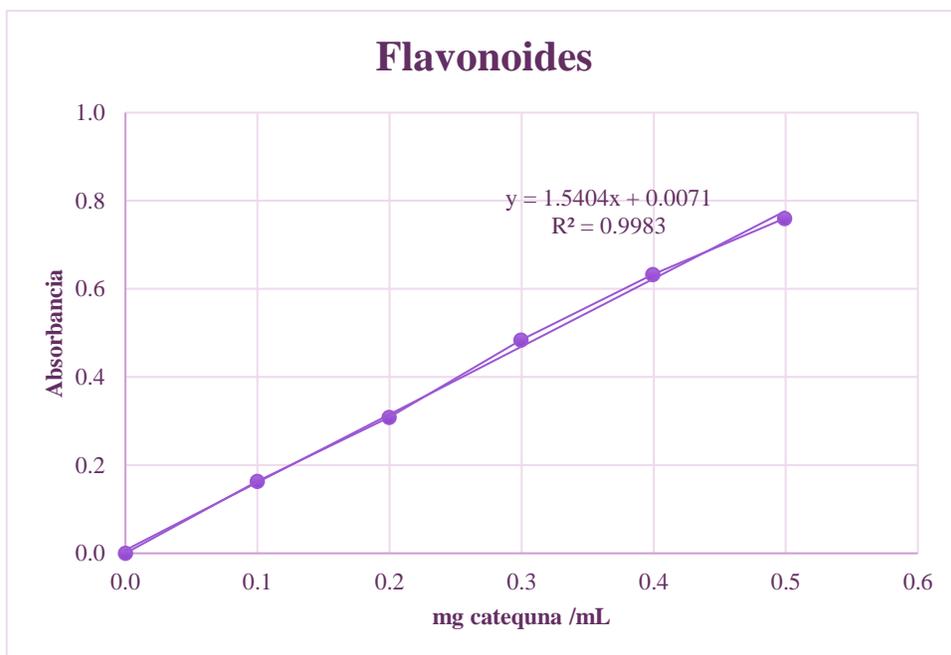
88. Shan, B., Cai, Y., Sun, M., Corke, H. (2005). Antioxidant Capacity of 26 Spice Extracts and Characterization of Their Phenolic Constituents. *J. Agric. Food Chem*, 53, 7749–7759.
89. Silk, B., Kapcsándi, V., Székelyhidi, R., Hanczné, E and Ajtony, Z. (2019). Recent Advances in the Analysis of Rosmarinic Acid From Herbs in the Lamiaceae Family. *Natural Product Communications*, 1–10.
90. Su, C.-Y., Ming, Q.-L., Rahman, K., Han, T., & Qin, L.-P. (2015). *Salvia miltiorrhiza*: Traditional medicinal uses, chemistry, and pharmacology. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 13(3), 163–182.
91. Tepe, B., Donmez, E., Unlu, M., Candan, F., Daferera, D., Vardar-Unlu, G., et al. (2004). Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl). *Food Chemistry*, 84(4), 519–525.
92. Torres, A. (2016). Caracterización y cuantificación de compuestos bioactivos de *ipomoea batatas (l.) lam* variedad morada y en un snack de camote. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. [En línea] Disponible en: <http://132.248.9.195/ptd2017/septiembre/0765848/Index.html>
93. Yuangsoi, B., Jintasataporn, O., Areechon, N., Tabthipwon, P. (2008). Validated TLC-densitometric analysis for determination of carotenoids in fancy carp (*Cyprinus carpio*) serum and the application for pharmacokinetic parameter assessment. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 30 (6), 693-700.
94. Wang, T., Li, Q., Bi, K. (2018). Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13, 12–23
95. Wrolstad, E. (2004). Anthocyanin Pigments-bioactivity and Coloring Properties. *J Food Sci*. 69(5):C419-C425.
96. Wu, Y., Ni, Z., Shi, Q., Dong, M., Kiyota, H., Gu, Y. & Cong, B (2012). Constituents from *Salvia* Species and Their Biological Activities. *Chemical Reviews*, 112(11), 5967–6026.
97. Zengin, G., Aktumsek, A., Llorent-Martínez, E. J., Córdova, M. L. F., Bahadori, M. B., Mocan, A., & Locatelli, M. (2018). Chemical composition and biological activities of extracts from three *Salvia* species: *S. blepharochlaena*, *S. euphratica* var. *leiocalycina*, and *S. verticillata* subsp. *amasiaca*. *Industrial Crops & Products*, 111, 11–21

## ANEXOS

### I. Curva patrón de fenoles



### II. Curva patrón de flavonoides



### III. Ecuación para el cálculo de antocianinas totales

$$A^* = (A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{pH_1} - (A_{520 \text{ nm}} - A_{700 \text{ nm}})_{pH_{4.5}}$$

$A^*$  = absorbancia corregida

$$A = \varepsilon C l$$

$\varepsilon$  = coeficiente de absortividad molar

$C$  = concentración molar

$l$  = longitud de la celda = 1 cm

$A$  = absorbaancia

$$C = \left( \frac{A^*}{\varepsilon l} \right)$$

$$AT = \left( \frac{A^*}{\varepsilon \left( \frac{L}{cm * mol} \right) l(cm)} \right) \times PM \left( \frac{g}{mol} \right) \times \frac{1000 \text{ mg}}{g} \times \frac{\text{vol ext (L)}}{g \text{ muestra}} \times FD$$

$AT$  = antocianinas totales (mg C3G/g muestra)

$PM$  = peso molecular

$FD$  = factor de dilución = 10 (200  $\mu$ L/2000  $\mu$ L)

#### **Datos de cianidina – 3 – glucósido (C3G)**

$$\varepsilon = 26900 \text{ L/cm * mol}$$

$$PM = 449.2 \text{ g/mol}$$

$$AT = \frac{A^* \times PM \times FD \times 100}{(\varepsilon \times 1)}$$

#### IV. Análisis estadístico de la elección del disolvente de extracción

##### Fenoles

##### ANOVA

##### Análisis de varianza de un factor

##### RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Acetona	3	254.1373203	84.71244011	65.8364375
Metanol	3	188.8414658	62.94715528	42.8930801
Etanol	3	167.4621668	55.82072227	3.19602161

##### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	1359.245031	2	679.6225156	18.2162852	0.00282719	5.14325285
Dentro de los grupos	223.8510784	6	37.30851307			
Total	1583.09611	8				

##### Prueba Tukey

<i>Disolventes</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Acetona	3	84.71	a
Metanol	3	62.95	b
Etanol	3	55.82	b

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- límites</i>
A-M	*	21.77	15.30499078
A-E	*	28.89	15.30499078
M-E		7.13	15.30499078

\*indica una diferencia significativa

## Flavonoides

### ANOVA

#### Análisis de varianza de un factor

##### RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Acetona	3	62.35133	20.78377738	1.618897
Metanol	3	35.55985	11.85328308	0.187072
Etanol	3	31.45678	10.48559269	0.405610

##### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	187.6769	2	93.83845675	127.2916	1.2E-05	5.14325
Dentro de los grupos	4.423159	6	0.737193124			
Total	192.1001	8				

### Prueba Tukey

<i>Disolventes</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Acetona	3	20.78	a
Metanol	3	11.85	b
Etanol	3	10.49	b

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- límites</i>
A-M	*	8.93	2.151392944
A-E	*	10.30	2.151392944
M-E		1.37	2.151392944

\*indica una diferencia significativa

## Antocianinas

### ANOVA

Análisis de varianza de un factor

#### RESUMEN

<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Acetona	3	0.88214 8	0.29404936	0.00036
Metanol	3	1.26142 4	0.42047466	0.00119
Etanol	3	0.94215 3	0.31405101	0.00048

#### ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre grupos	0.027709	2	0.01385471	20.4912	0.002083	5.14325
Dentro de los grupos	0.004057	6	0.00067613			
Total	0.031766	8				

#### Prueba Tukey

<i>Disolventes</i>	<i>Casos</i>	<i>Media</i>	<i>Grupos homogéneos</i>
Acetona	3	0.29	a
Metanol	3	0.42	b
Etanol	3	0.31	a

<i>Contraste</i>	<i>Sig.</i>	<i>Diferencia</i>	<i>+/- límites</i>
A-M	*	-0.13	0.06515447
A-E		-0.02	0.06515447
M-E	*	0.11	0.06515447

\*indica una diferencia significativa

## V. Cromatogramas de HPLC de muestras para la cuantificación de ácido rosmarínico

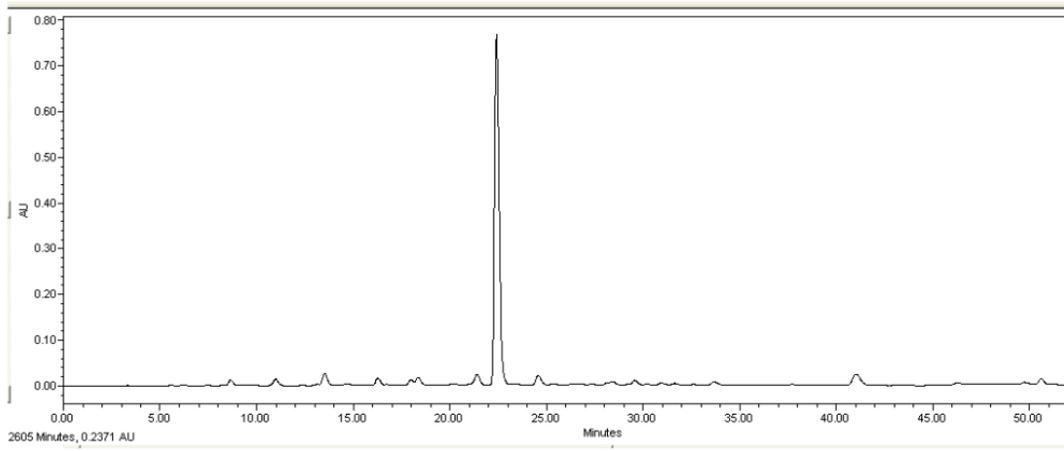


Figura 53. Cromatograma de HPLC a 320 nm de hojas de *S. polystachya*

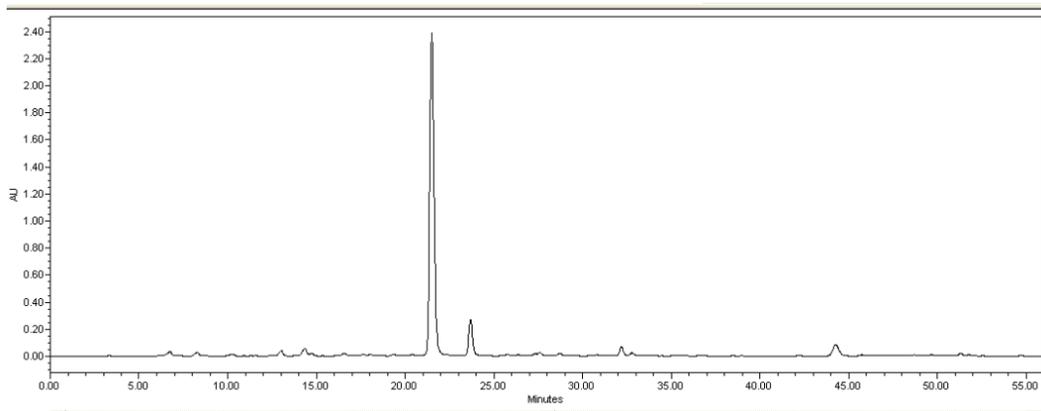


Figura 54. Cromatograma de HPLC a 320 nm de hojas de *S. amarissima*

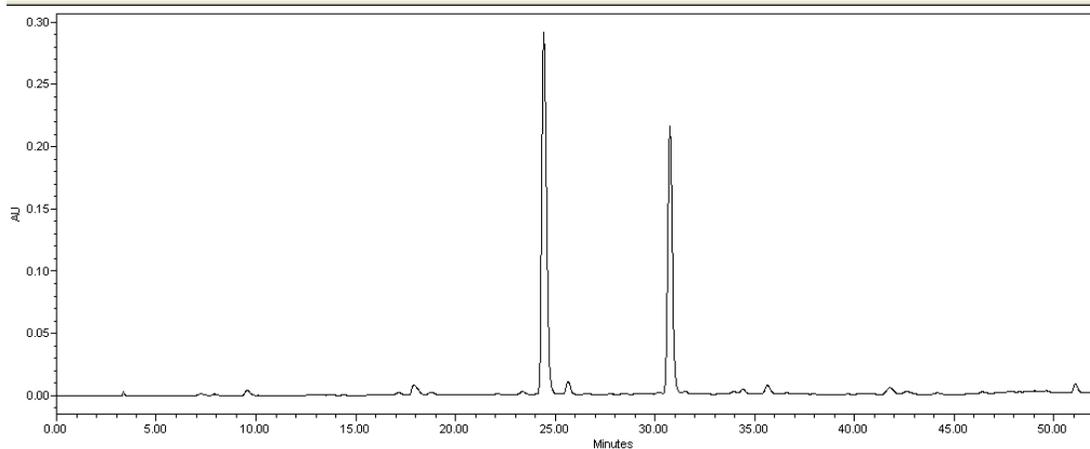


Figura 55. Cromatograma de HPLC a 320 nm de hojas de *S. fruticulosa*

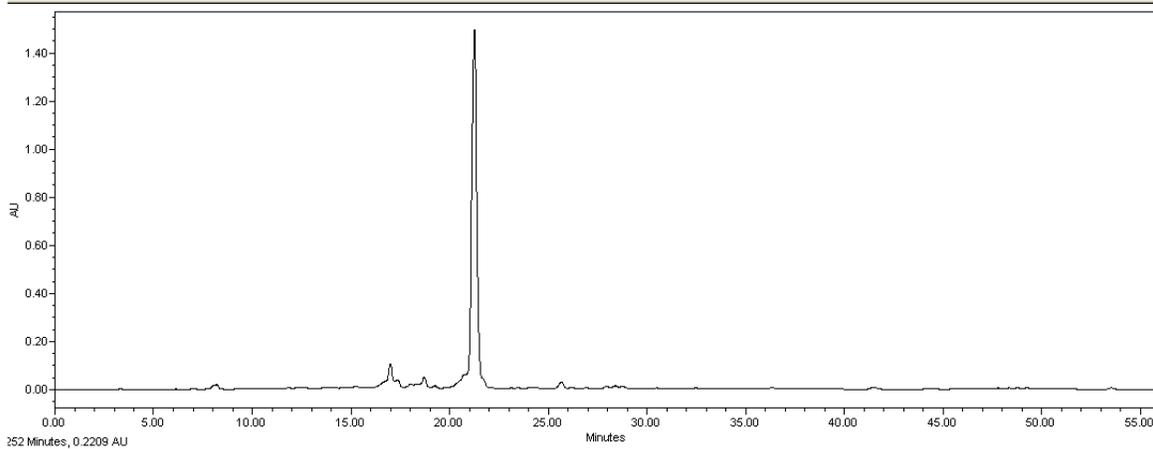


Figura 56. Cromatograma de HPLC a 320 nm de tallos de *S. polystachya*

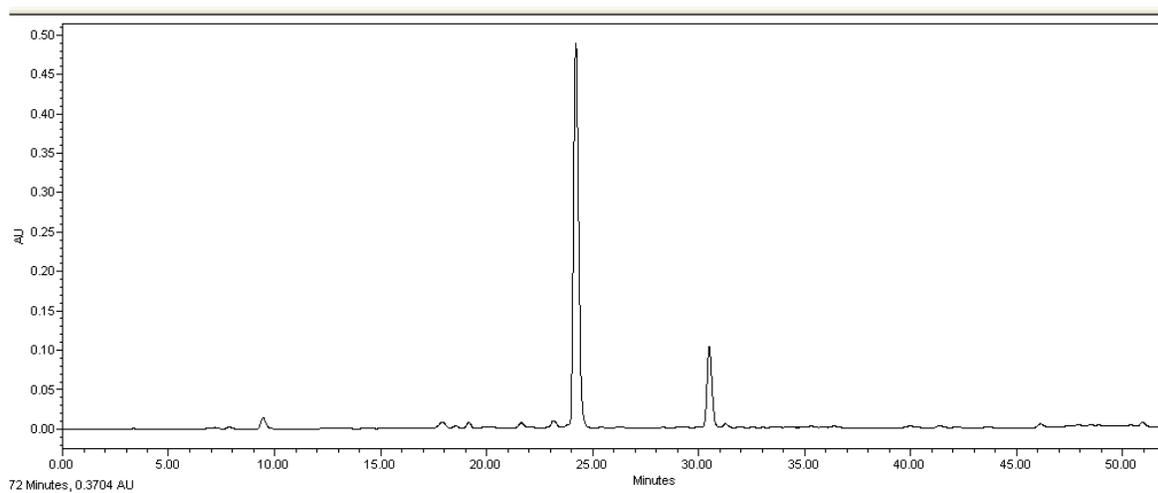


Figura 57. Cromatograma de HPLC a 320 nm de tallos de *S. fruticulosa*

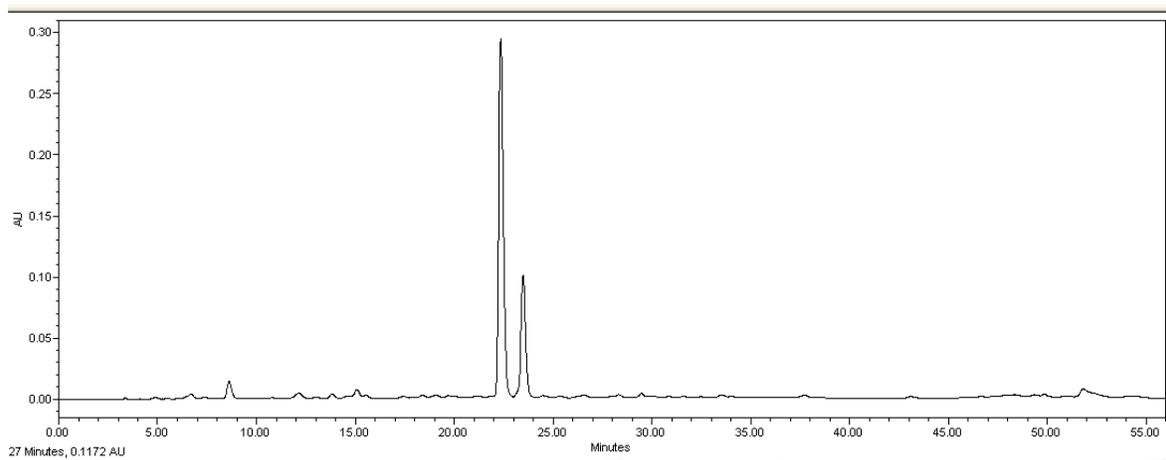


Figura 58. Cromatograma de HPLC a 320 nm de tallos de *S. purpurea*

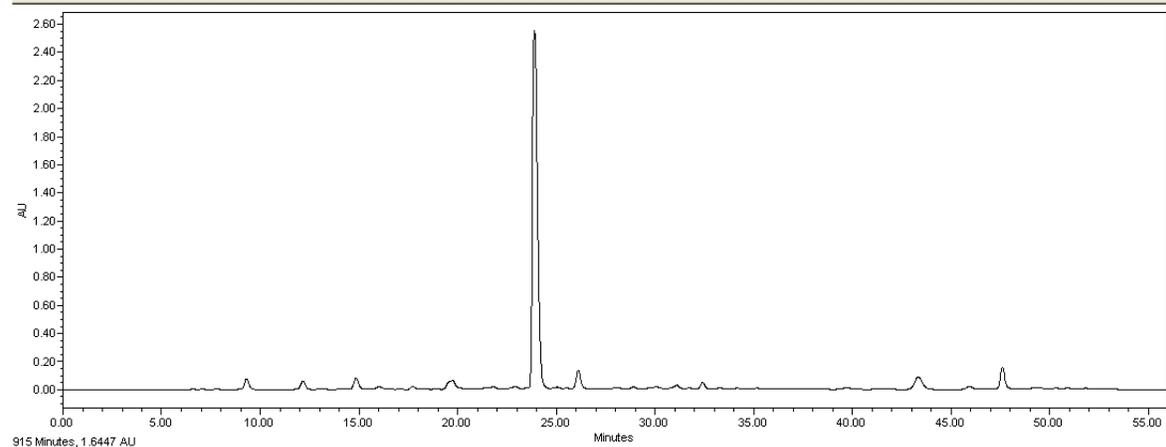


Figura 59. Cromatograma de HPLC a 320 nm de flores de *S. polystachya*

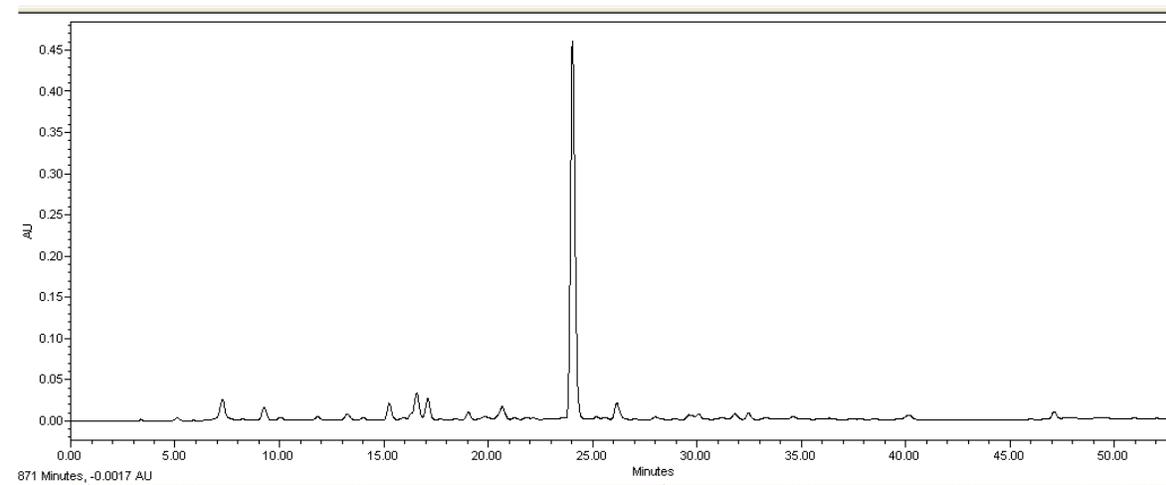


Figura 60. Cromatograma de HPLC a 320 nm de flores de *Salvia* sp.

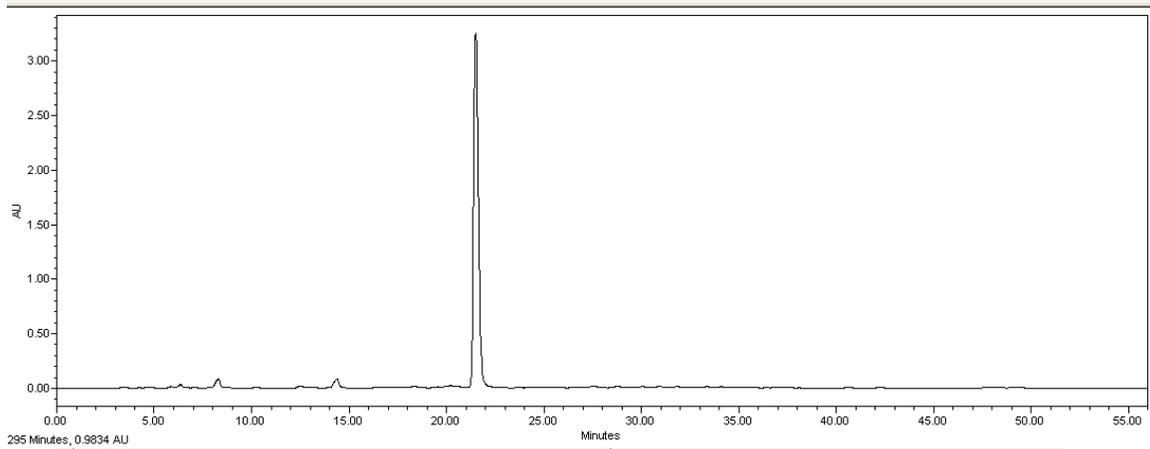


Figura 61. Cromatograma de HPLC a 320 nm de flores de *S. mexicana*