



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

Aislamiento y elucidación estructural de los componentes con potencial  
efecto herbicida de *Salvia thymoides* Benth.

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

**Q. Daniel Guerrero Ramírez**

Dr. Baldomero Esquivel Rodríguez

Instituto de Química, UNAM

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, febrero del 2024



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.



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Aislamiento y elucidación estructural de los componentes con potencial efecto herbicida de *Salvia thymoides* Benth.

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

**Q. Daniel Guerrero Ramírez**



Tutor: Dr. Baldomero Esquivel Rodríguez

Ciudad de México, febrero del 2024



## **Jurado asignado**

**Presidente:** Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda

**Vocal:** Dr. Ricardo Reyes Chilpa

**Vocal:** Dra. María Yolanda Ríos Gómez

**Vocal:** Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava

**Secretario:** Dra. Nuria Esturau Escofet

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio 2-9 del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México bajo la dirección del Dr. Baldomero Esquivel Rodríguez.

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Humanidades Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el financiamiento de este proyecto a través de la beca (1134416) otorgada que me permitió llevar a cabo mis estudios de maestría.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas y al Instituto de Química por brindarme mi formación profesional, los medios suficientes para realizar este proyecto y por ser clave en mi crecimiento personal.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM) por el apoyo para la realización de esta tesis a través del Proyecto “Biodiversidad Mexicana como Fuente de Nuevos Herbicidas de Origen Natural. Mecanismos de acción y bioensayos de efectividad” PAPIIT IG200523.

Al Dr. Baldomero Esquivel Rodríguez mi más profundo y sincero agradecimiento por la confianza brindada, sus enseñanzas y todo el tiempo que dedicó a este trabajo.

A los honorables miembros del jurado: El Dr. Rogelio Gregorio Miranda Pereda, el Dr. Ricardo Reyes Chilpa, la Dra. María Yolanda Ríos Gómez, la Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava y la Dra. Nuria Esturau Escofet por sus significativos y valiosos aportes a la realización de este trabajo.

A la Dra. Celia Bustos Brito por su contribución en la recolección de la especie de estudio, así como los resultados de las pruebas biológicas presentadas en este proyecto.

Al personal técnico del Instituto de Química: A la Dra. Adriana Romo Pérez por la obtención de los espectros UV-Vis, IR, DC y RO. A la Dra. María del Carmen García González por la obtención de los espectros de masas mediante la técnica DART. A la Dra. Elizabeth Huerta Salazar y la Dra. María de los Ángeles Peña González por la obtención de los espectros de RMN de 300 y 400 MHz. A la Dra. Nuria Esturau Escofet y la Dra. Beatriz Quiroz García del Laboratorio Universitario de Resonancia Magnética Nuclear (LURMN) por la obtención de los espectros de RMN de 500 y 700 MHz. Al Dr. Diego Martínez Otero del CCIQS por la obtención de Rayos X de monocristal.

A mis profesores del programa del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas por todas sus enseñanzas, mismas que tengo como propósito aplicar para defender este proyecto.

Al personal administrativo del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas y a la Maestra Josefina Tenopala García por procurar que los alumnos llevemos orden en nuestros trámites.

A mis compañeros del laboratorio 2-9 del Instituto de Química M. en C. Diana Pérez Juanchi, M. en C. Juan Pablo Torres Medicis y Q. Anuar Hernández Pérez, por su amistad, apoyo y respeto.

### **Dedicatoria**

A mi amada madre Delia Ramírez Peralta por todo su amor y apoyo en esta que hasta ahora ha sido la etapa más dolorosa, difícil y desafiante de mi vida, por nunca dejar de creer en mí y por siempre alentarme a hacer las cosas lo mejor que pueda, incluso cuando ya se me había acabado toda la motivación. *Sin ti no hubiera llegado hasta aquí, te amo por siempre.*

# Índice

Lista de Abreviaturas .....	1
Lista de Espectros .....	2
Resumen .....	4
1. Introducción .....	6
1.1. Familia Lamiaceae (Labiatae) .....	7
1.1.1. Familia Lamiaceae en México.....	10
2. Antecedentes .....	11
2.1. Género <i>Salvia</i> .....	11
2.1.1. Género <i>Salvia</i> en México.....	14
2.1.2. Perfil químico de las salvias mexicanas .....	17
2.2. <i>Salvia thymoides</i> .....	19
2.2.1. Salvias de la sección <i>Flocculosae</i> .....	25
2.2.2. Perfil químico de las salvias que crecen en Tehuacán, Puebla .....	30
2.3. Terpenoides .....	36
2.3.1. Ruta biosintética del Mevalonato (MVA) .....	39
2.3.2. Ruta biosintética DXP .....	41
2.3.3. Biosíntesis de diterpenos .....	45
2.3.4. Biosíntesis de carotenos.....	49
2.3.5. Meroterpenos .....	53
2.4. Herbicidas.....	56
2.4.1. Malezas en México .....	57
2.4.2. Herbicidas blanqueadores e inhibidores de la DXP.....	58
2.4.3. <i>Lemna gibba</i> como material de evaluación en bioensayos de actividad fitotóxica ..	60
2.4.4. Fitotoxicidad de las salvias .....	62
3. Justificación .....	65



4. Objetivos .....	66
5. Metodología .....	67
5.1. Material vegetal .....	68
5.2. Extracción y aislamiento.....	68
5.3. Determinación de la configuración absoluta .....	70
5.4. Evaluación de la actividad herbicida .....	70
6. Discusión de resultados.....	71
6.1. Compuestos aislados de <i>Salvia thymoides</i> .....	71
6.1.1. Determinación estructural del compuesto 1.....	73
6.1.2. Determinación estructural del compuesto 2.....	78
6.1.3. Determinación estructural del compuesto 3.....	84
6.1.4. Determinación estructural del compuesto 4.....	89
6.1.5. Determinación estructural del compuesto 5.....	93
6.1.6. Determinación estructural del compuesto 6.....	96
6.1.7. Determinación estructural del compuesto 7.....	100
6.1.8. Determinación estructural del compuesto 8.....	105
6.1.9. Determinación estructural del compuesto 9.....	110
6.1.10. Identificación de los compuestos (10-13) .....	114
6.2. Evaluación de la actividad herbicida de algunos de los diterpenoides aislados de <i>Salvia thymoides</i> Benth .....	118
6.2.1. Bioensayo de inhibición de la germinación .....	118
6.2.2. Bioensayo con <i>Lemna gibba</i> .....	119
7. Conclusiones.....	120
8. Anexos .....	121

## Lista de Abreviaturas

Abreviatura	Significado
AcetilCo-A	Acetil coenzima A
AcOEt	Acetato de etilo
ADP	Adenosin difosfato
APT	Attached Proton Test
ATP	Adenosin trifosfato
CBD	Cannabidiol
CBDA	Ácido cannabidiólico
CC	Cromatografía en columna abierta
CCDa	Cromatografía en capa delgada analítica
CCDp	Cromatografía en capa delgada preparativa
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CD <sub>3</sub> OD	Metanol deuterado
cm	Centímetros
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> /DCM	Cloruro de metileno (diclorometano)
COSY	COrrrelation SpectroscopY
DART	Direct Analysis in Real Time
DMAPP	Pirofosfato de dimetilalilo
DXP	Ruta de la Deoxi-D-xilulosa-5-fosfato
EM	Espectrometría de masas
FPP	Pirofosfato de farnesilo
g	Gramos
GPP	Pirofosfato de geranilo
GGPP	Pirofosfato de geranilgeranilo
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
Hz	Hertz
IPP	Pirofosfato de isopentenilo
IR	Espectroscopía de infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
Kg	Kilogramos
L	Litros
m/z	Relación masa-carga
me	Metilo
MEP	2-C-metil-D-eritritol-4-P
MVA	Ruta del mevalonato
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
MHz	megaHertz
mL	Mililitros
mm	Milímetros
N <sub>2</sub>	Nitrógeno gaseoso
NADPH	Nicotiamida-Adenina Dinucleótido fosfato
NOESY	Nuclear Overhauser Effect spectroscopy
nm	Nanómetros
OPP	Pirofosfato

INSTITUTO DE QUÍMICA  
POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS, UNAM

p.f.	Punto de fusión
RMN	Resonancia magnética nuclear
ppm	Partes por millón
secc.	Sección
sp.	Especie no determinada
<i>S. thymoides</i>	<i>Salvia thymoides</i>
subg.	subgénero
THC	Tetrahidrocannabinol
THCA	Ácido tetrahidrocannabinólico
UV	Ultravioleta
$\delta$	Desplazamiento químico
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
Å	Angström
$\lambda$	Longitud de onda

## Lista de Espectros

Espectro	Título	Página
1	RMN $^1\text{H}$ (700 MHz $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 1.	122
2	RMN $^{13}\text{C}$ (175 MHz $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 1.	123
3	Experimento COSY (700 MHz $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 1.	124
4	Experimento HSQC (700 MHz $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 1.	125
5	Experimento HMBC (700 MHz $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 1.	126
6	Experimento NOESY (700 MHz $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 1.	127
7	RMN $^1\text{H}$ (500 MHz $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 2.	128
8	RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 2.	129
9	Experimento COSY (500 MHz $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 2.	130
10	Experimento HSQC (500 MHz $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 2.	131
11	Experimento HMBC (500 MHz $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 2.	132
12	Experimento NOESY (500 MHz $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 2.	133
13	RMN $^1\text{H}$ (700 MHz $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del compuesto 3.	134
14	RMN $^{13}\text{C}$ (175 MHz $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del compuesto 3.	135
15	Experimento COSY (700 MHz $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del compuesto 3.	136
16	Experimento HSQC (700 MHz $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del compuesto 3.	137
17	Experimento HMBC (700 MHz $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del compuesto 3.	138
18	Experimento NOESY (700 MHz $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del compuesto 3.	139
19	RMN $^1\text{H}$ (700 MHz $\text{CDCl}_3$ ) del producto de acetilación del compuesto 3.	140
20	RMN $^{13}\text{C}$ (175 MHz $\text{CDCl}_3$ ) del producto de acetilación del compuesto 3.	141
21	Experimento COSY (700 MHz $\text{CDCl}_3$ ) del producto de acetilación del compuesto 3.	142
22	Experimento HSQC (700 MHz $\text{CDCl}_3$ ) del producto de acetilación del compuesto 3.	143
23	Experimento HMBC (700 MHz $\text{CDCl}_3$ ) del producto de acetilación del compuesto 3.	144
24	Experimento NOESY (700 MHz $\text{CDCl}_3$ ) del producto de acetilación del compuesto 3.	145
25	RMN $^1\text{H}$ (700 MHz $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del compuesto 4.	146
26	RMN $^{13}\text{C}$ (175 MHz $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del compuesto 4.	147
27	Experimento COSY (700 MHz $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del compuesto 4.	148
28	Experimento HSQC (700 MHz $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del compuesto 4.	149
29	Experimento HMBC (700 MHz $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del compuesto 4.	150

INSTITUTO DE QUÍMICA  
 POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS, UNAM

30	Experimento NOESY (700 MHz CD <sub>3</sub> OD) del compuesto <b>4</b> .	151
31	RMN <sup>1</sup> H (700 MHz CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>5</b> .	152
32	RMN <sup>13</sup> C (175 MHz CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>5</b> .	153
33	Experimento COSY (700 MHz CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>5</b> .	154
34	Experimento HSQC (700 MHz CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>5</b> .	155
35	Experimento HMBC (700 MHz CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>5</b> .	156
36	Experimento NOESY (700 MHz CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>5</b> .	157
37	RMN <sup>1</sup> H (700 MHz CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>6</b> .	158
38	RMN <sup>13</sup> C (175 MHz CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>6</b> .	159
39	Experimento COSY (700 MHz CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>6</b> .	160
40	Experimento HSQC (700 MHz CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>6</b> .	161
41	Experimento HMBC (700 MHz CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>6</b> .	162
42	Experimento NOESY (700 MHz CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>6</b> .	163
43	RMN <sup>1</sup> H (700 MHz CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>7</b> .	164
44	RMN <sup>13</sup> C (175 MHz CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>7</b> .	165
45	Experimento COSY (700 MHz CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>7</b> .	166
46	Experimento HSQC (700 MHz CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>7</b> .	167
47	Experimento HMBC (700 MHz CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>7</b> .	168
48	Experimento NOESY (700 MHz CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>7</b> .	169
49	RMN <sup>1</sup> H (700 MHz CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>8</b> .	170
50	RMN <sup>13</sup> C (175 MHz CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>8</b> .	171
51	Experimento COSY (700 MHz CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>8</b> .	172
52	Experimento HSQC (700 MHz CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>8</b> .	173
53	Experimento HMBC (700 MHz CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>8</b> .	174
54	Experimento NOESY (700 MHz CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>8</b> .	175
55	RMN <sup>1</sup> H (700 MHz CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>9</b> .	176
56	RMN <sup>13</sup> C (175 MHz CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>9</b> .	177
57	Experimento COSY (700 MHz CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>9</b> .	178
58	Experimento HSQC (700 MHz CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>9</b> .	179
59	Experimento HMBC (700 MHz CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>9</b> .	180
60	Experimento NOESY (700 MHz CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>9</b> .	181
61	RMN <sup>1</sup> H (400 MHz CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>10</b> .	182
62	RMN <sup>13</sup> C (100 MHz CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>10</b> .	183
63	Experimento HMBC (400 MHz CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>10</b> .	184
64	Experimento NOESY (400 MHz CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>10</b> .	185
65	RMN <sup>1</sup> H (400 MHz CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>11</b> .	186
66	RMN <sup>13</sup> C (100 MHz CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>11</b> .	187
67	Experimento HMBC (400 MHz CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>11</b> .	188
68	Experimento NOESY (400 MHz CDCl <sub>3</sub> ) del compuesto <b>11</b> .	189

## Resumen

En el presente trabajo se describe el estudio fitoquímico y la evaluación de la actividad fitotóxica de los metabolitos secundarios aislados de la planta endémica *Salvia thymoides* Benth (secc. Flocculosae), perteneciente al subgénero *Calosphace*.

Se analizaron las partes aéreas de una población de *S. thymoides* colectada en Tehuacán en el estado de Puebla; se aislaron mediante técnicas cromatográficas dos metabolitos de tipo flavona (**10** y **11**), dos metabolitos de tipo triterpeno (**12** y **13**) y nueve metabolitos de tipo diterpeno (**1-9**) los cuales presentan un esqueleto de tipo *neo-clerodano*. Las estructuras de los compuestos que se presentan se establecieron mediante el empleo de técnicas espectroscópicas siendo la resonancia magnética nuclear (RMN) la técnica de mayor uso. Seis de los diterpenos reportados (**1, 3, 5, 6, 7** y **9**) son estructuras de las que no se encuentra información en las bases de datos por lo que se tratan de estructuras novedosas, seis compuestos han sido previamente descritos en otras especies del género *Salvia* (**2, 8, 10, 11, 12** y **13**) y seis compuestos han sido aislados de especies diferentes (**2, 4, 10, 11, 12** y **13**).

De los compuestos que se encuentran descritos en trabajos previamente realizados se realizaron correcciones y contribuciones en cuanto a su información espectroscópica y, en el caso de los compuestos nuevos, se presenta la información de espectrometría de masas (EM), espectroscopía de infrarrojo (IR) y RMN. Para el caso del compuesto **1** la determinación de su configuración absoluta se efectuó mediante difracción de Rayos X de monocristal (DRX-M).

Se llevó a cabo la evaluación de la actividad fitotóxica (herbicida) de algunos metabolitos aislados empleando modelos establecidos en el laboratorio de herbicidas del Instituto de Química de la UNAM los cuales fueron: cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento de las raíces en las semillas *Amaranthus hypochondriacus* (amaranto), *Medicago sativa* (alfalfa), *Panicum miliaceum* (mijo) y *Trifolium pratense* (trébol), y la evaluación del efecto herbicida mediante mecanismo de blanqueamiento en la planta acuática *Lemna gibba*.

## Abstract

The present thesis describes the chemical study and the phytotoxic activity evaluation of the secondary metabolites isolated from the endemic plant *Salvia thymoides* Benth (Flocculosae section) belonging to the *Calosphace* subgenera.

The aerial parts of a *Salvia thymoides* sample from Tehuacán, Puebla were analyzed; two flavones (**10** and **11**), two triterpenoids (**12** and **13**) and nine diterpenoids with *neoclerodane* skeleton (**1-9**) were isolated through chromatographic techniques. Their structures were established through different spectroscopic techniques with nuclear magnetic resonance being the principal one. Six of the reported diterpenoids (**1, 3, 5, 6, 7** and **9**) corresponded to new structures without reports in the data bases, six compounds were previously reported from other species of *Salvia* genus (**2, 8, 10, 11, 12** and **13**), and six compounds were isolated from other plant species (**2, 4, 10, 11, 12** and **13**).

Corrections and contributions were done for the previously reported compounds in the spectroscopy information section, for the novel compounds, the MS, IR and NMR information is presented. The absolute configuration for compound **1** was established by monocrystal X-ray diffraction.

Phytotoxic activity evaluation was carried out with some secondary metabolites isolated in this study by the use of techniques established at the Herbicides Laboratory (Institute of Chemistry, UNAM) which included: roots growing inhibition percent calculation in *Amaranthus hypochondriacus* (amaranth), *Medicago sativa* (alfalfa), *Panicum miliaceum* (millet) y *Trifolium pratense* (clover) seeds, and the bleaching mechanism for herbicide effect evaluation using the aquatic species *Lemna gibba*.

## 1. Introducción

Los metabolitos secundarios son compuestos biosintetizados por un grupo específico de organismos vivos, o en algunos casos, por sólo un organismo en particular, esto se debe a que la presencia de los metabolitos secundarios está dada como una expresión de los genes del ser vivo que los produce. El propósito de esta amplia variedad de compuestos sigue siendo desconocido en muchos casos, sin embargo, en un esquema general se sabe que son generados a través de procesos internos en los organismos para involucrarse en el proceso de adaptación a su entorno ya sea como protección contra las especies depredadoras, agentes patógenos o los generadores de estrés oxidativo, así como la atracción de polinizadores o la comunicación entre seres de su misma especie o de especies diferentes.<sup>1</sup>

Estos compuestos han sido de gran utilidad para el ser humano en diversas áreas, por lo que se les nombra de forma más común como productos naturales, y hay una gran rama de la química orgánica enfocada a estudiarlos, ya que poseen cierta toxicidad que se traduce en importantes actividades biológicas, como antibacteriana, antiviral, antiproliferativa, entre muchas otras, adicional a esto, han fungido como modelos para la síntesis de otras sustancias bioactivas, y como materias primas para la semisíntesis y, de esta manera, incrementar el efecto de dichas actividades.<sup>2</sup>

El gran interés que se ha tenido hacia los productos naturales radica en que algunos son compuestos de estructuras complejas y novedosas que son muy complicados de sintetizar en un laboratorio de investigación sin un suministro de precursores y energía grande, sin embargo, los seres vivos los preparan a través de procesos enzimáticos muy específicos.<sup>2</sup>

En los años más recientes se ha incrementado el interés hacia actividades biológicas más particulares asociadas a la interacción del organismo productor con su ecosistema.<sup>1</sup> En el caso de las plantas, estas biosintetizan compuestos que tienen la función de protegerlas

---

<sup>1</sup> Ávalos, G. A.; Pérez, U. C. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología) Serie Fisiología Vegetal* **2009**, 2(3), 119-145.

<sup>2</sup> Gutiérrez, R. A.; Estévez, B. A. Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el S.XXI, *Rev. R. Acad. Cienc. Exact. Fís. Nat. (Esp)* **2009**, 103(2), 409-419.

contra el estrés oxidativo que produce la radiación ultravioleta del sol, por lo que se han realizado trabajos de aislamiento e identificación de dichos compuestos para la fabricación de fármacos antioxidantes; otro ejemplo es la preparación de compuestos aleloquímicos que participan en sus procesos de crecimiento, reproducción y supervivencia, evitando que plantas de otras especies entren en competencia por espacio y nutrientes. La purificación e identificación de estos compuestos ha sido de utilidad para la fabricación de agroquímicos con mecanismos de acción distintos a los comerciales y, adicional a esto, con una menor toxicidad para el ser humano.<sup>3</sup>

Tomando en cuenta la relevancia de los productos naturales en el desarrollo de nuevos agroquímicos, en el presente trabajo se desarrolló el aislamiento y la elucidación estructural de los metabolitos secundarios de *Salvia thymoides* Benth, la cual pertenece a una de las familias más grandes y diversas en México (Lamiaceae). Además se ha observado que esta especie posee una destacada actividad alelopática en el ecosistema en donde se desarrolla (Tehuacán, Puebla) y, por lo tanto, se evaluará su actividad herbicida mediante bioensayos específicos de inhibición de crecimiento.

### 1.1. Familia Lamiaceae (Labiatae)

Se trata de un grupo muy amplio y diverso de plantas compuesto por alrededor de 7200 especies agrupadas en 240 géneros<sup>4</sup>, se caracterizan por ser hierbas anuales o perennes de forma arbustiva, poseen una gran cantidad de tricomas glandulares que funcionan como almacén de aceites volátiles lo que las hace muy aromáticas, son de distribución cosmopolita teniendo importantes zonas de concentración en las regiones tropicales, subtropicales y templadas del mundo, aunque también hay especies adaptadas a climas

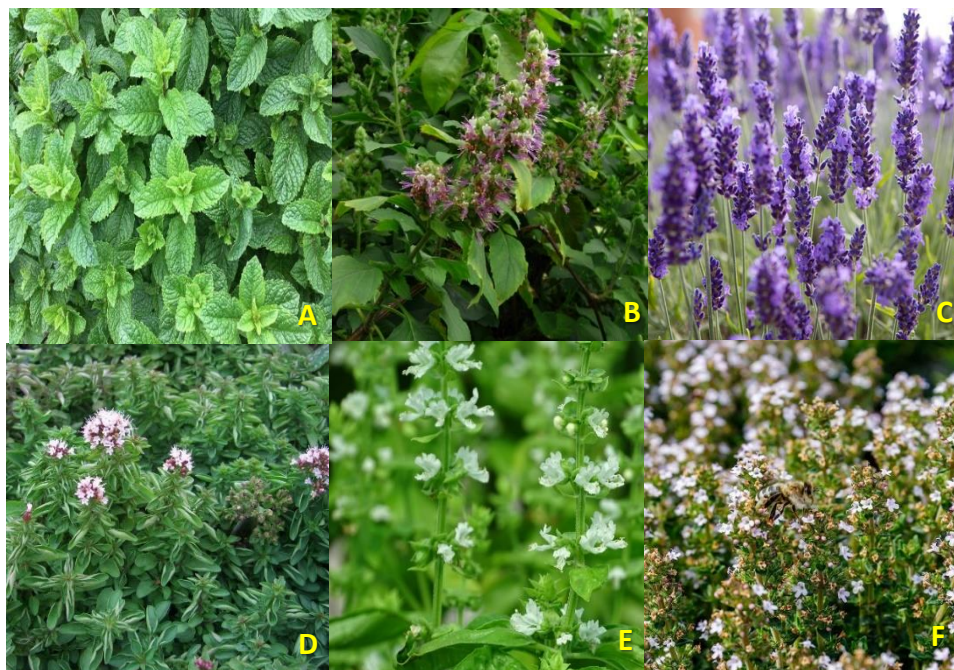
---

<sup>3</sup> Vitela, E. A.; González, P. L.; Ravetta, D. A. Metabolismo secundario de plantas leñosas en zonas áridas: mecanismo de producción, funciones y posibilidades de aprovechamiento, *Ecol. Austral*, **2011**, 21, 317-327.

<sup>4</sup> Harley, R. M.; Atkins, S.; Budantsev, A. L.; Cantino, P. D.; Conn, B. J.; Grayer, R.; Harley, M. M.; De Kok, R.; Krestovskaja, T.; Morales, R.; Paton, A. J.; Ryding, O.; Upson. Flowering plants dicotyledons, Lamiales, *The families and genera of vascular plants* **2004**, 7, 196-203.



semiáridos.<sup>5</sup> A continuación, se muestra un listado con los géneros más abundantes de la familia en el mundo (Tabla 1); sin embargo, hay géneros con un menor número de especies que a pesar de ello poseen una notoria relevancia por sus usos en la perfumería, en la gastronomía y en la medicina tradicional, en la Figura 1 se ilustran algunos ejemplos.<sup>6</sup>



**Figura 1.** Especies conocidas y empleadas alrededor del mundo pertenecientes a la familia Lamiaceae: **A.** *Mentha spicata* (Hierbabuena), **B.** *Pogostemon cablin* (Pachuli), **C.** *Lavandula angustifolia* (lavanda), **D.** *Origanum vulgare* (Orégano) **E.** *Ocimum basilicum* (Albahaca), **F.** *Thymus vulgaris* (Tomillo).

<sup>5</sup> Martínez-Gordillo, M.; Fragosó-Martínez, I.; García-Peña, M. R.; Montiel, O. Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo, *Revista mexicana de biodiversidad* **2013**, 84, 30-86.

<sup>6</sup> Martínez Gordillo, M.; Bedolla-García, B.; Cornejo-Tenorio, G.; Fragosó-Martínez, I.; García-Peña, M. R.; González-Gallegos, J. G.; Lara-Cabrera, S. I.; Zamudio, S. Lamiaceae de México, *Bot. Sci.* **2017**, 95(4), 780-806.

**Tabla 1.** Géneros más abundantes de la familia Lamiaceae y sus principales zonas de diversificación.

Género	Número aproximado de especies	Principales zonas de diversificación
<i>Salvia</i>	1000	América del Norte, Centroamérica, Sudamérica, este y centro de Asia, Mediterráneo, Sudáfrica, Madagascar y México. <sup>7</sup>
<i>Scutellaria</i>	360	América del norte, Centroamérica, Mediterráneo, este y centro de Asia. <sup>8</sup>
<i>Stachys</i>	300	Mediterráneo, Península Ibérica, América del norte, Centroamérica y suroeste de Asia. <sup>9</sup>
<i>Plectranthus</i>	300	Zonas tropicales de África, Asia y Australia. <sup>10</sup>
<i>Hyptis</i>	280	Brasil, zona tropical de África y Sudáfrica. <sup>11</sup>
<i>Teucrium</i>	250	Zona tropical de África, Sudáfrica, Mediterráneo, Península Ibérica, sureste de Australia, oeste de América del norte y oeste de Sudamérica. <sup>12</sup>
<i>Vitex</i>	250	Mediterráneo y suroeste de Asia. <sup>13</sup>
<i>Thymus</i>	220	Mediterráneo, Península Ibérica y el noroeste de África <sup>14</sup>
<i>Nepeta</i>	200	Suroeste de Asia (Irán y Turquía) y este de la cordillera de los Himalayas. <sup>15</sup>

<sup>7</sup> Drew, B. T.; González-Gallegos, J. G.; Xiang, C. L.; Kriebel, R.; Drummond, C. P.; Walker, J. B.; Sytsma, K. J. *Salvia* united: The greatest good for the greatest number, *Taxon* **2017**, 66(1), 133-145.

<sup>8</sup> Xiaofei, S.; Xirui, H.; Xiaoying, H.; Maoxing, L.; Ruxue, Z.; Pengcheng, F.; Quanlong, Z.; Zhengping, J. The genus *Scutellaria* an ethnopharmacological and phytochemical review, *J. ethnopharmacol.* **2010**, 128, 279-313.

<sup>9</sup> Tundis, R.; Peruzzi, L.; Menichini, F. Phytochemical and biological studies of *Stachys* species in relation to chemotaxonomy: A review, *Phytochemistry* **2014**, 102, 7-39.

<sup>10</sup> Lukhoba, C. W.; Simmonds, M. S. J.; Paton, A. J. *Plectranthus*: A review of ethnobotanical uses, *J. ethnopharmacol.* **2006**, 103, 1-24.

<sup>11</sup> Sedano-Partida, M. D.; Pereira dos Santos, K.; Sala-Carvalho, W. R.; Silva-Luz, C. L.; Furlan, C. M. A review of phytochemical profiling and biological activities of *Hyptis* Jacq.: a Brazilian native genus of Lamiaceae, *Braz. J. Bot.* **2020**, 43, 213-228.

<sup>12</sup> Salmaki, Y.; Kattari, S.; Heubl, G.; Bräuchler, C. Phylogeny of non-monophyletic *Teucrium* (Lamiaceae: Ajugoidae): Implications for character evolution and taxonomy, *Taxon* **2016**, 65(4), 805-822.

<sup>13</sup> Das, N.; Salgueiro, A. C. F.; Choudhury, D. R.; Mandal, S. K.; Logesh, R.; Hassan, M. M.; Devkota, H. P.; Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of genus *Vitex* (Lamiaceae), *Phytother. Res.* **2022**, 36, 571-671.

<sup>14</sup> Xiao, L.; Ting, H.; Xiuhuan, W.; Meng, S.; Xin, Y.; Shusheng, F.; Le, W.; Xiaoping, W.; Xiao, X.; Hong, S.; Gaimei, S. Traditional uses, chemical constituents and biological activities of plants from the genus *Thymus*, *Chem. Biodivers.* **2019**, 16, e1900254.

<sup>15</sup> Asparganah, J.; Sarabian, S.; Ziarati, P. Essential oil of *Nepeta* genus (Lamiaceae) from Iran: a review, *JEOR* **2014**, 26(1), 1-12.

*Salvia* es el género que posee el mayor número de especies de la familia Lamiaceae, adicional a esto, éste presenta el mayor número de puntos de diversificación en el mundo.<sup>7</sup>

Se han realizado una gran cantidad de estudios enfocados al aislamiento y elucidación estructural de los metabolitos secundarios presentes en especies pertenecientes a esta familia, encontrando una amplia diversidad de compuestos, principalmente triterpenos, esteroides, monoterpenos, diterpenos, sesquiterpenos, flavonoides, compuestos fenólicos, seterterpenos, entre otros.<sup>5</sup>

### 1.1.1. Familia Lamiaceae en México

Se ha descrito un número aproximado de 598 especies agrupadas en 33 géneros presentes en México, ya sea endémicas o naturalizadas. La mayoría se encuentran distribuidas en las regiones montañosas Sierra Madre Oriental, Sierra Madre Occidental y el Eje Neovolcánico transversal adaptadas a casi todos los tipos de ecosistemas del país.<sup>6</sup> A continuación, se presenta un listado de las especies de la familia más abundantes descritas en nuestro país (tabla 2).

**Tabla 2.** Riqueza y endemismo de la familia Lamiaceae en México.

Género	Número aproximado de especies	Especies endémicas
<i>Salvia</i>	306	236
<i>Scutellaria</i>	61	40
<i>Stachys</i>	45	33
<i>Hyptis</i>	35	16
<i>Hedeoma</i>	28	20
<i>Clinopodium</i>	14	9
<i>Agastache</i>	13	7
<i>Lepechinia</i>	12	6

Se puede observar que el género *Salvia* es el más abundante en México, y además es el que posee el mayor porcentaje de endemismo, lo cual hace al país el más importante centro de diversificación de este género.

Las especies de la familia Lamiaceae tiene una importante interacción con diversos polinizadores, lo cual las hace un elemento abundante y dominante de su ecosistema. Además, han tenido una relevante participación a través de la historia de México por su legendaria tradición en el uso de sus especies en la gastronomía y en la medicina tradicional. Bajo este antecedente, se fundamenta el gran número de estudios fitoquímicos que se han realizado de estas especies en búsqueda de los compuestos mayoritarios, a los cuales se les podrían atribuir dichas propiedades.<sup>5</sup>

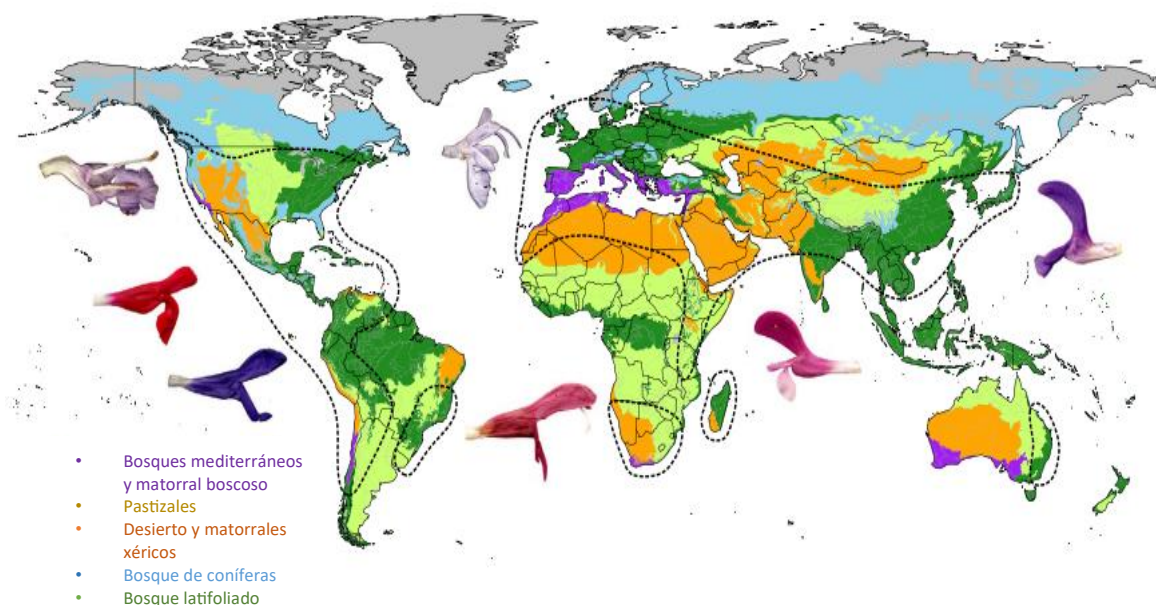
## 2. Antecedentes

### 2.1. Género *Salvia*

Como se mencionó en el apartado anterior, este género es el más amplio y diverso de las lamiáceas con aproximadamente 1000 especies reportadas (Tabla 1), sus especies presentan una distribución biogeográfica adaptada a todos los tipos de ecosistemas, y aspectos como su morfología, tipo de polinizador e incluso su perfil fitoquímico está sujeto a la zona en donde crecen. A continuación, se presenta un mapa de las zonas de desarrollo del género *Salvia*, así como la morfología de sus flores en perspectiva con los diferentes tipos de ecosistemas (Figura 2).<sup>16</sup>

---

<sup>16</sup> Kriebel, R.; Drew, B. T.; Drummond, C. P.; González-Gallegos, J. G.; Celep, F.; Mahdjoub, M. M.; Rose, J. P.; Xiang, C. L.; Hu, G. X.; Walker, J. B.; Lemmon, E. M.; Lemmon A. R.; Sytsma, K. J. Tracking temporal shifts in area, biomes and pollinators in the radiation of *Salvia* (sages) across continents: leveraging anchored hybrid enrichment and targeted sequence data, *American J. of Botany*. **2019**, 106(4), 573-597.



**Figura 2.** Distribución del género *Salvia* en el mundo (representado en líneas punteadas).

Los datos e investigaciones taxonómicas recientes proponen la clasificación del género *Salvia* en 11 subgéneros los cuales se enlistan a continuación (Tabla 3).

**Tabla 3.** Clasificación del género *Salvia* y su distribución biogeográfica.<sup>16</sup>

Subgénero	Número estimado de especies	Distribución biogeográfica
<i>Audibertia</i>	19	América del norte y norte de México
<i>Calosphace</i>	550	América del Norte, Centroamérica, Sudamérica, Caribe y México.
<i>Dorystaecheas</i>	1	Turquía (Antalya)
<i>Glutinaria</i>	100	Este de Asia, este de Australia y centro de Eurasia
<i>Heterosphace</i>	43	Este, sur y suroeste de América del norte, Sudáfrica, noreste de África, suroeste de Asia, Mediterráneo y Madagascar
<i>Meriandra</i>	2	Noreste de África e India (cordillera de los Himalayas)
<i>Perovskia</i>	8	Centro-suroeste de Asia
<i>Rosmarinus</i>	3	Mediterráneo
<i>Salvia L.</i>	70	Mediterráneo y Suroeste de Asia
<i>Sclarea</i>	120	Suroeste de Asia, Mediterráneo y Sudáfrica
<i>Zhumeria</i>	31	Mediterráneo y Centro-suroeste de Asia

El subgénero *Calosphace* es el que cuenta con el mayor número de especies las cuales crecen en toda la región del continente americano. Estudios taxonómicos extensos han permitido recabar información respecto a la identificación de las especies que pertenecen a dicho subgénero, los países en los cuales crecen, así como su endemismo. A continuación, se presenta un listado de los países con el mayor número de especies de *Salvia* (subg. *Calosphace*) y de ese número cuantas son endémicas de cada país (Tabla 4).<sup>17</sup>

**Tabla 4.** Países con mayor número de salvias del subg. *Calosphace* y su endemismo.

País	Número aproximado de especies	Especies endémicas	País	Número aproximado de especies	Especies endémicas
México	295	243	Haití	29	15
Perú	77	49	Costa Rica	22	1
Colombia	60	37	Argentina	21	1
Brasil	58	42	Rep. Dominicana	21	7
Guatemala	49	5	El Salvador	21	0
Ecuador	41	17	Venezuela	20	7
Honduras	29	0	Estados Unidos	19	3

Cabe mencionar que debido a la diversidad del subgénero *Calosphace*, este se divide a su vez en aproximadamente 103 secciones. Sin embargo, la mayoría de las especies se concentran en 14 secciones (Tabla 5), siendo que numerosas secciones cuentan con menos de cuatro especies o incluso hay secciones con sólo una.<sup>17</sup>

<sup>17</sup> González-Gallegos, J. G.; Bedolla-García, B. Y.; Cornejo-Tenorio, G.; Fernández-Alonso, J. L.; Fragoso-Martínez, I.; García-Peña, M. R.; Harley, R. M.; Klitgaard, B.; Martínez-Gordillo, M. J.; Wood, J. R. I.; Zamudio, S.; Zona, S.; Xifreda, C. C. Richness and distribution of *Salvia* subg. *Calosphace* (Lamiaceae), *Int. J. Plant Sci.* **2020**, 181(8), 831-856.

**Tabla 5.** Secciones del subgénero *Calosphace* con mayor número de especies.

Sección	Número de especies	Especies endémicas	Sección	Número de especies	Especies endémicas
<i>Angulatae</i>	52	21	<i>Tomentellae</i>	19	12
<i>Uliginosae</i>	32	27	<i>Lavanduloideae</i>	15	15
<i>Flocculosae</i>	26	14	<i>Tubiflorae</i>	17	3
<i>Scorodonia</i>	22	20	<i>Membranaceae</i>	13	13
<i>Farinaceae</i>	20	16	<i>Polystacheae</i>	12	12
<i>Holwaya</i>	18	16	<i>Dusenostachys</i>	10	8
<i>Sigmoideae</i>	14	14	<i>Fulgentes</i>	8	8

### 2.1.1. Género *Salvia* en México

México es el país con el mayor número de especies de *Salvia* del subgénero *Calosphace* de las cuales el 82.4% son endémicas (Tabla 4), por lo que el país es el punto de diversificación más importante de este subgénero. Este alto endemismo obedece a factores geológicos, edáficos, climáticos, fisiográficos y de aislamiento ecológico, que han permitido la diversificación y establecimiento de especies únicas en el territorio mexicano.

La abundancia de salvias en el país se debe a que una gran parte se compone de regiones montañosas como la Sierra Madre Oriental, la Sierra Madre Occidental, la Sierra Madre Sur, el Eje Neovolcánico transversal y las altas tierras de Chiapas, que son las zonas en las que éstas se concentran. A continuación, se representan unos ejemplares de salvias mexicanas pertenecientes al subgénero *Calosphace*, su ubicación biogeográfica<sup>18</sup> y actividades biológicas descritas (Figura 4, Tabla 6).

<sup>18</sup> Naturalista: Salvias o Mirtos (género *Salvia*) [naturalista.mx/taxa/50644-Salvia](http://naturalista.mx/taxa/50644-Salvia) (consultado en julio del 2023).



**Figura 4.** Especies mexicanas de *Salvia*: **A.** *Salvia adenophora*, **B.** *Salvia elegans*, **C.** *Salvia ballotiflora*, **D.** *Salvia microphylla*, **E.** *Salvia keerlii*, **F.** *Salvia semiatrata*.

**Tabla 6.** Descripción de las especies presentadas en la Figura 4.

	<b>Especie</b>	<b>Ubicación</b>	<b>Propiedades</b>
<b>A</b>	<i>Salvia adenophora</i>	Oaxaca.	Antibacteriana <sup>19</sup> y fitotóxica <sup>20</sup>
<b>B</b>	<i>Salvia elegans</i>	Jalisco, Oaxaca, Puebla, Michoacán, Hidalgo y Querétaro.	Antidepresiva <sup>21</sup> , ansiolítica <sup>21</sup> , antihipertensiva <sup>22</sup> y fitotóxica <sup>23</sup>

<sup>19</sup> Bisio, A.; Schito, A. M.; Ebrahimi, S. N.; Hamburger, M.; Mele, G.; Piatti, G.; Romussi, G.; Dal Piaz, F.; De Tommasi, N. Antibacterial compounds from *S. adenophora* F. (Lamiaceae). *Phytochemistry* **2015**, 110, 120-132.

<sup>20</sup> Bisio, A.; Fraternali, D.; Giacomini, M.; Giacomelli, E.; Pivetti, S.; Russo, E.; Caviglioli, G.; Romussi, G.; Ricci, D.; De Tommasi, N.; Phytotoxicity of *Salvia* spp. exudates. *Crop Protection* **2010**, 29, 1434-1446.

<sup>21</sup> Herrera-Ruiz, M.; García-Beltrán, Y.; Mora, S.; Díaz-Véliz, G.; Viana, G. S. B.; Tortoriello, J.; Rmz, G. Antidepressant and anxiolytic effects of hydroalcoholic extract from *S. elegans*. *J. ethnopharmacol.* **2006**, 107, 53-58.

<sup>22</sup> Jiménez-Ferrer, E.; Hernández-Badillo, F.; González-Cortázar, M.; Tortoriello, J.; Herrera-Ruiz, M. Antihypertensive activity of *S. elegans* V. (Lamiaceae): ACE inhibition and angiotensin II antagonism. *J. ethnopharmacol.* **2010**, 130, 340-346.

<sup>23</sup> De Martino, L.; Roscigno, G.; Mancini, E.; De Falco, E.; De Feo, V. Chemical composition and antigerminative activity of the essential oils from five *Salvia* species. *Molecules* **2010**, 15(2), 735-746.



**Tabla 6.** Descripción de las especies presentadas en la Figura 4 (continuación).

<b>C</b>	<i>Salvia ballotiflora</i>	Coahuila, Chihuahua, Nuevo León, San Luis Potosí y Durango.	Antiproliferativa <sup>24</sup> , antidiarreico <sup>25</sup> , antiinflamatoria <sup>26</sup> , antiherpes <sup>27</sup> e insecticida <sup>28</sup>
<b>D</b>	<i>Salvia microphylla</i>	Ciudad de México, Estado de México, Puebla, Guanajuato, Hidalgo y Querétaro.	Neuroprotectora <sup>29</sup> , antidiabética <sup>30</sup> , antioxidante <sup>30</sup> , insecticida <sup>31</sup> y antimutagénica <sup>32</sup>
<b>E</b>	<i>Salvia keerlii</i>	Tamaulipas, San Luis potosí y Guanajuato.	Antiinflamatoria <sup>33</sup> , antinociceptiva <sup>33</sup> , antiherpes <sup>34</sup> e insecticida <sup>35</sup>
<b>F</b>	<i>Salvia semiatrata</i>	Oaxaca.	Antinociceptiva <sup>36</sup> , ansiolítica <sup>36</sup> , antiproliferativa <sup>37</sup> y antialimentaria <sup>38</sup>

<sup>24</sup> Campos-Xolalpa, N.; Alonso-Castro, A. J.; Sánchez-Mendoza, E.; Zavala-Sánchez, M. A.; Pérez-Gutiérrez, S. Cytotoxic activity of the CHCl<sub>3</sub> extract and diterpenes isolated from *S. b.* *Braz. J. Pharmacol.* **2017**, *27*, 302-305.

<sup>25</sup> Pérez-Gutiérrez, S.; Zavala-Mendoza, D.; Hdz-Munive, A.; Mendoza-Martínez, Á.; Pérez-Gzlez, C.; Sánchez-Mendoza, E. Antidiarrheal activity of 19-deoxycitexone isolated from *S. ballotiflora* B. in mice and rats. *Molecules* **2013**, *18*(8), 8895-8905.

<sup>26</sup> Campos-Xolalpa, N.; Alonso-Castro, A. J.; Ortiz-Sánchez E.; Zapata-Morales, J. R.; González-Chavez M. M.; Pérez, S.; Anti-inflammatory and antitumor activities of the chloroform extract and anti-inflammatory effect of three diterpenes isolated from *S. ballotiflora* B. *BMC Complement. Med. Ther.* **2021**, *21*:17.

<sup>27</sup> Silva-Mares, D.; Torres-López, E.; Rivas-Estilla, A. M.; Cordero-Pérez P.; Waksman-Minsky, N.; Rivas-Galindo, V. M. Plants from northeast Mexico with anti-HSV activity. *Nat. Prod. Commun.* **2013**, *8*, 297-298.

<sup>28</sup> León-Herrera, L. R.; Ramos-López, M. A.; Mondragón-Olguín, V. M.; Romero-Gómez, S.; Campos-Guillen J.; Lucas-Deecke, G.; Exct. Cloroform. de *S. ballotiflora* una alternativa p/ el manejo integrado del gusano cogollero del maíz (*S. frugiperda*). *Entomología agrícola* **2016**, *3*, 401-406.

<sup>29</sup> Ayoub, I. M.; George, M. Y.; Menze, E. T.; Mahmoud, M.; Botros, M.; Essam, M.; Ashmawy, I.; Shendi, P.; Hany, A.; Galal, M.; Ayman, M.; Labib, R. M. Insights into the neuroprotective effects of *S. officinalis* L. and *S. microphylla* K. in the memory impairment rat model. *Food Funct.* **2022**, *13*, 2253-2268.

<sup>30</sup> Chouit, H.; Touafek, O.; Brada, M.; Benssouici, C.; Fauconnier, M. L.; El Hattab, M. GC-MS analysis and biological activities of *S. microphylla* essential oils. *J. Mex. Chem. Soc.* **2021**, *60*(4), 582-601.

<sup>31</sup> Romo-Asunción, D.; Ávila-Calderón, M. A.; Ramos-López, M. A.; Barranco-Florido J. E.; Rodríguez-Navarro, S.; Romero-Gómez, S.; Aldeco-Pérez, E. J.; Pacheco-Aguilar, J. R. Juvenomimetic and insecticidal activities of *S. salignus* and *S. microphylla* on *S. frugiperda*. *Flo. Entomologist* **2016**, *99*(3), 345-351.

<sup>32</sup> Matthew, J.; Thoppil J. E. investigation of the antimutagenic activity of three *Salvia* extracts. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **2012**, *4*(3), 225-230.

<sup>33</sup> Serrano-Vega, R.; Pérez-González, C.; Alonso-Castro, A. J.; Zapata-Morales, J. R.; Pérez-Gutiérrez, S. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *S. keerlii*. *Pharmacog. Mag.* **2020**, *16*(67), 27-33.

<sup>34</sup> Lhullier, C.; De Oliveira-Tabalipa, E.; Nienkötter-Sardá, F.; Pergaud-Sandjo, L.; Zanchett-Schneider, N. F.; Carraro, J. L.; Oliveira-Simões, C. M.; Schenkel, E. P. Clerodane diterpenes from *Raspailia bouryesnaultae* collected in South Brazil. *Mar. Drugs* **2019**, *17*(1), 57.

<sup>35</sup> Zavala-Gómez, C. E.; Zamora-Avella, D.; Rodríguez-Chávez, J. L.; Zavala-Sánchez, M. A.; Campos-Guillén, J.; Bah, M. M.; García-Serrano, L. A.; Cárdenas-Ortega, N. C.; Sosa-Domínguez, A. Bioactivity of 1,8-cineole and essential oil of *S. keerlii* against *S. frugiperda*. *Southw. Entom.* **2021**, *46*(2), 385-396.

<sup>36</sup> Ortiz-Mendoza, N.; Zavala-Ocampo, L. M.; Martínez-Gordillo, J. M.; González-Trujano, M. E.; Basurto-Peña, F. A.; Bazany-Rodríguez, I. J.; Rivera-Chávez, J. A.; Aguirre-Hdz. E. Antinociceptive and anxiolytic-like effects of a neo-clerodane diterpene from *S. semiatrata* aerial parts. *Pharm. Biol.* **2020**, *58*(1), 620-629.

<sup>37</sup> Esquivel, B.; Sánchez, A. A.; Vergara, F.; Matus, W.; Hernández-Ortega, S.; Ramírez-Apan, M. T. Abietane diterpenoids from the roots of some Mexican *Salvia* species: Chemical diversity, phytogeographical significance, and cytotoxic activity. *Chem. Biodiv.* **2005**, *2*(6), 738-747.

<sup>38</sup> Simmonds, M. J. S.; Blaney, W. M.; Esquivel, B.; Rodríguez-Hahn, L. Effect of clerodane-type diterpenoids isolated from *Salvia* spp. on the feeding behaviour of *S. littoralis*. *Pestic. Sci.* **1996**, *47*, 17-23.

### 2.1.2. Perfil químico de las salvias mexicanas

El perfil químico de las salvias del subgénero *Calosphace* está compuesto principalmente por esteroides, triterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, flavonoides y otros compuestos fenólicos<sup>39</sup>, sin embargo, los metabolitos secundarios más diversificados son los diterpenos, los cuales incluso han sido designados como marcadores taxonómicos, tanto a nivel subgénero como en las secciones botánicas. Los diterpenos son el tipo de metabolito más diverso e ilustrativo para el análisis de la expresión de los genes de las salvias del subgénero *Calosphace*, y presentan tres tipos generales de esqueleto, clerodano, abietano y pimarano (Figura 5), además de una gran variedad de esqueletos transpuestos provenientes de dichas estructuras, los cuales son más de 30. En la Figura 6 se presentan algunos ejemplos, donde la numeración en cada uno puede servir como un indicativo de cómo se deriva de sus precursores.<sup>40</sup>

Cabe mencionar que el perfil químico de las salvias del subgénero *Calosphace* ha mostrado variaciones sujetas a la región geográfica en donde éstas se desarrollan, el tipo de suelo, la época del año en que son colectadas, las condiciones climáticas, la presencia de depredadores, entre otras.<sup>41</sup>

---

<sup>39</sup> Esquivel, B.; Calderón, J. S.; Sánchez, A. A.; Ramamoorthy, T. P.; Flores, E. A.; Domínguez, R. M.; Recent advances in phytochemistry and biological activity of Mexican Labiatae, *Revista latinoamericana de Química* **1996**, 24, 44-64.

<sup>40</sup> Esquivel, B. Rearranged clerodane and abietane derived diterpenoids from American *Salvia* species, *NPC Nat. Prod. Commun.* **2008**, 3(6), 989-1002.

<sup>41</sup> Esquivel, B. Contribución al estudio sistemático del género *Salvia* (Lamiaceae) en México. Tesis de doctorado, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, **2017**.

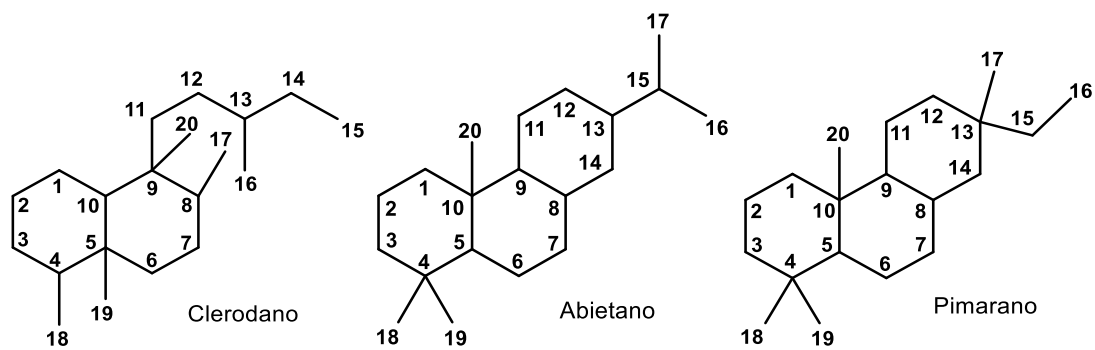


Figura 5. Principales esqueletos de diterpenos aislados de salvias mexicanas.

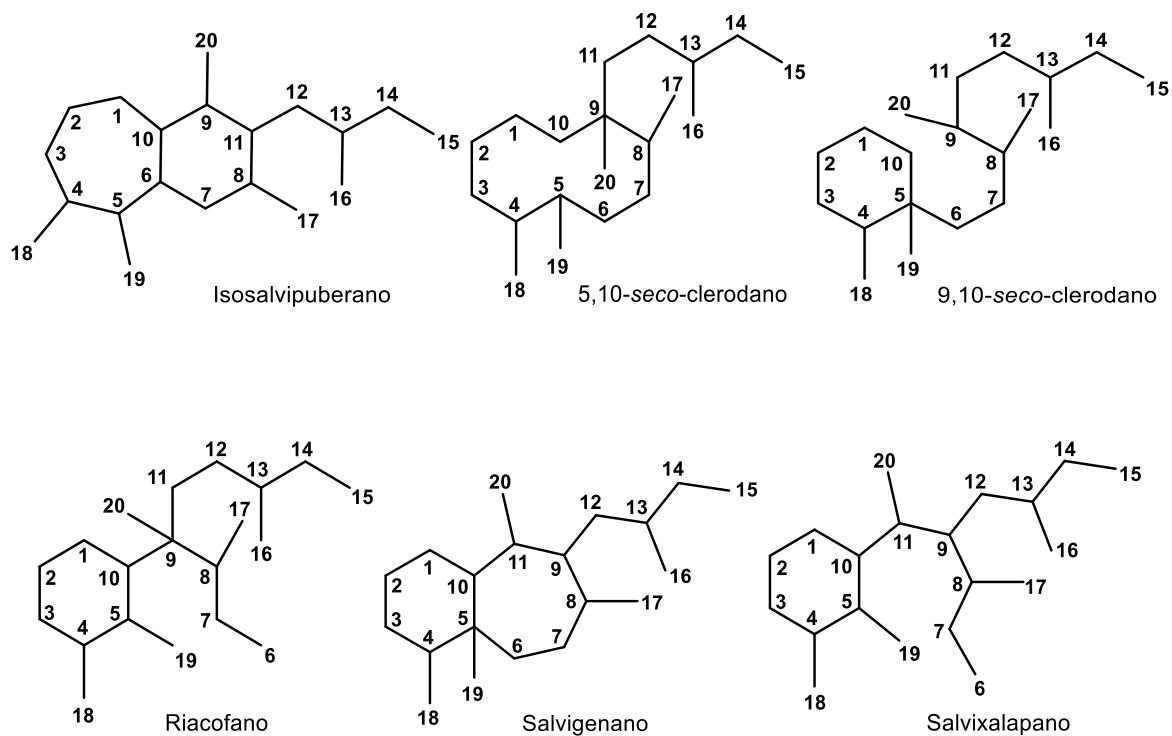


Figura 6. Esqueletos transpuestos de diterpenos aislados de salvias mexicanas.

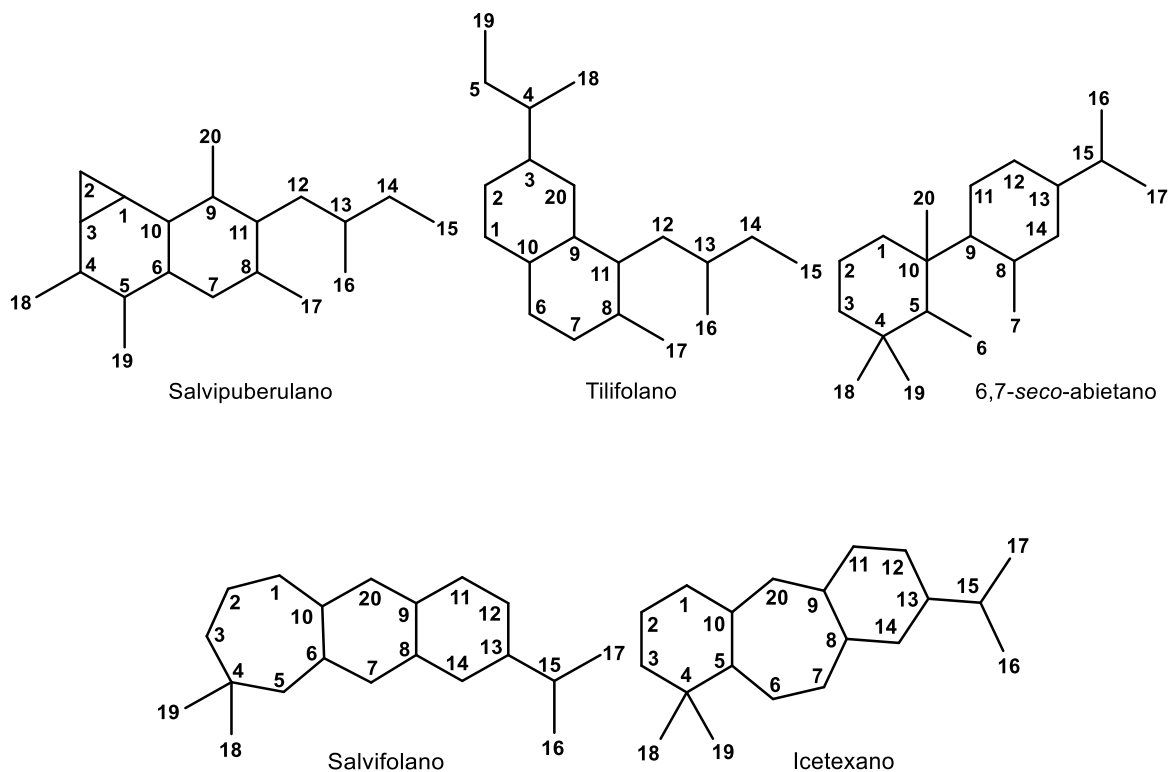


Figura 6. Esqueletos transpuestos de diterpenos aislados de salvias mexicanas (continuación).

## 2.2. *Salvia thymoides*

Es una especie endémica de México, localizada en Puebla, mayormente en el valle de Tehuacán y algunas zonas de Oaxaca y Chiapas. Pertenece a la sección *Flocculosae* y fue identificada por G. Bentham en 1833 con el nombre *S. thymoides* haciendo referencia a su parecido con el tomillo (*Thymus vulgaris*). Se describe morfológicamente como un arbusto perenne con 30 cm de altura (en promedio), hojas ovaladas de entre 4 y 7 mm cubiertas de pubescencia que funge como almacén de aceites esenciales, flores labiadas color púrpura obscuro con cáliz verde igualmente cubiertas de pubescencia (Figura 7).<sup>42</sup>

<sup>42</sup>*Salvia thymoides* Benth. <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/lamiaceae/salvia-thymoides/fichas/ficha.htm> (consultado en julio del 2023).

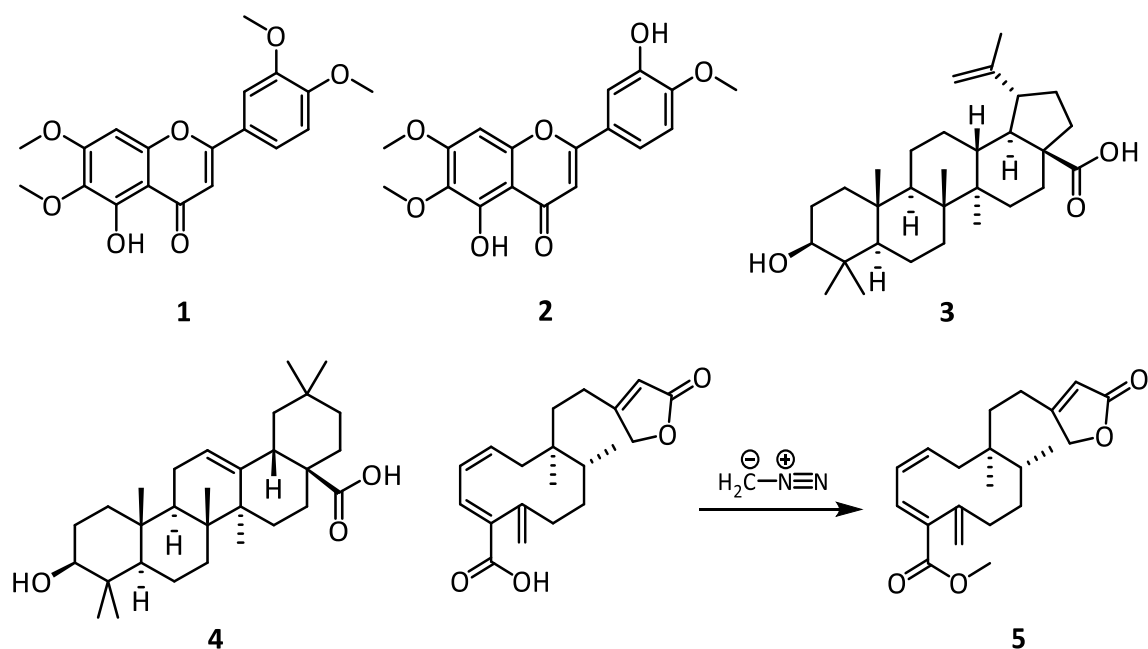


**Figura 7.** A. Foto de *Salvia thymoides* tomada en Tehuacán Puebla en septiembre del 2021. B. Imágenes de otras poblaciones de *Salvia thymoides*<sup>43</sup>.

En 1989, se realizó el estudio del perfil químico de una población de *S. thymoides* colectada en Oaxaca. En este estudio se realizaron diferentes separaciones cromatográficas al extracto de acetona de las partes aéreas de la planta obteniendo como resultado el aislamiento y elucidación estructural de cinco compuestos (Figura 8), las flavonas **1** y **2**, los triterpenos **3** y **4**, y el producto de esterificación del diterpeno ácido 5,10-*seco*-clerodan-1,3,5,13-tetraen-15,16-ólida-18-oico (**5**), empleando el reactivo metilante diazometano a una fracción proveniente de la separación cromatográfica del extracto crudo.<sup>44</sup>

<sup>43</sup> Naturalista: *Salvia Tomillo (Salvia thymoides)* [naturalista.mx/taxa/278927-Salvia-thymoides](https://naturalista.mx/taxa/278927-Salvia-thymoides) (consultado en julio del 2023).

<sup>44</sup> Flores-Oropeza, E. A. Estudio fitoquímico de *Salvia thymoides* Benth. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, **1989**.



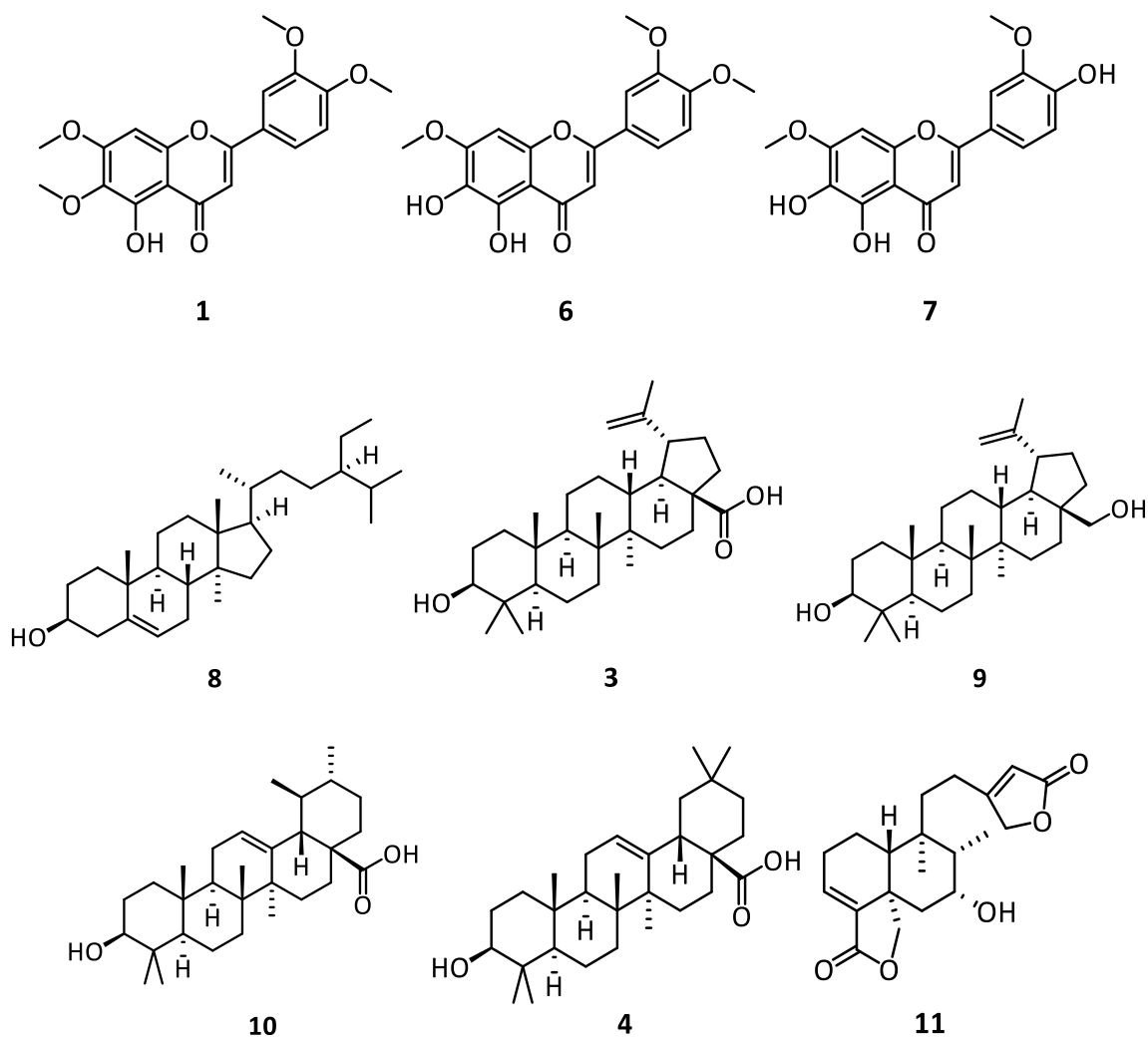
**Figura 8.** Metabolitos aislados de una población de *S. thymoides* recolectada en Oaxaca (1989). **1)** 5-hidroxi-6,7,3',4'-tetrametoxiflavona, **2)** eupatorina, **3)** ácido betulínico, **4)** ácido oleanólico, **5)** éster metílico del ácido 5,10-*seco*-clerodan-1,3,5,13-tetraen-15,16-ólida-18-oico.

En 1997, se realizó un nuevo estudio del perfil químico de *S. thymoides* colectada en Oaxaca a partir de la obtención del extracto de acetona de las partes aéreas y un previo tratamiento de éste con una partición líquido-líquido empleando hexano y una mezcla metanol-agua (4:1). De la realización de una columna cromatográfica a la fracción polar, se obtuvieron doce compuestos (Figura 9), tres flavonas de las cuales una ya se encontraba reportada en el trabajo de 1989 (**1**), cuatro triterpenos de los cuales dos ya se encontraban reportados en *S. thymoides* (**3** y **4**), el  $\beta$ -sitosterol (**8**), el diterpeno 7 $\alpha$ -hidroxi-neoclerodan-3,13-dien-18,19:15,16-diólida (**11**) el cual ya se había aislado previamente de *Salvia semiatrata*<sup>45</sup> y *Salvia melissodora*<sup>46</sup>, el diterpeno 7-oxo-neoclerodan-3,13-dien-18,19:15,16-diólida (**12**),

<sup>45</sup> Esquivel, B.; Hernández, M.; Ramamoorthy, T. P.; Cárdenas, J.; Rodríguez-Hahn, L. Semiatrin, a new neoclerodane diterpenoid from *Salvia semiatrata*. *Phytochemistry* **1986**, 25(6), 1484-1486.

<sup>46</sup> Esquivel, B.; Vallejo, A.; Gaviño, R.; Cárdenas, J.; Sánchez, A. A.; Ramamoorthy, T. P.; Rodríguez-Hahn, L. Clerodane diterpenoids from *Salvia melissodora*. *Phytochemistry* **1988**, 27(9), 2903-2905.

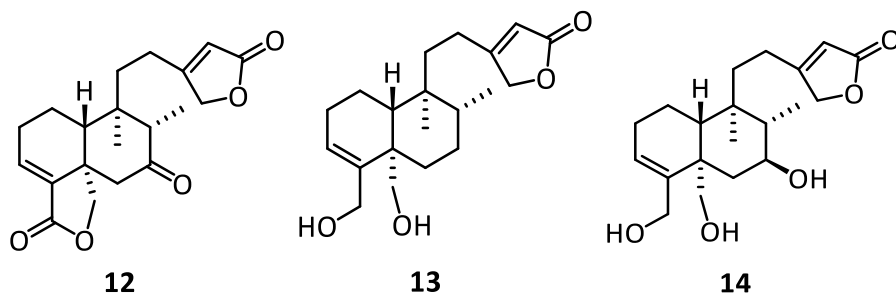
previamente aislado de *Baccharis trimera*<sup>47</sup>, y dos diterpenos de estructura novedosa los cuales fueron nombrados como thymonina (**13**) y 7 $\beta$ -hidroxithymonina (**14**).<sup>48</sup>



**Figura 9.** Metabolitos aislados de una población de *S. thymoides* recolectada en Oaxaca (1997). **6**) 5,6-dihidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavona, **7**) 5,6,4'-trihidroxi-7,3'-dimetoxiflavona, **8**)  $\beta$ -sitosterol, **9**) betulina, **10**) ácido ursólico, **11**) 7 $\alpha$ -hidroxi-neoclerodan-3,13-dien-18,19:15,16-diólida.

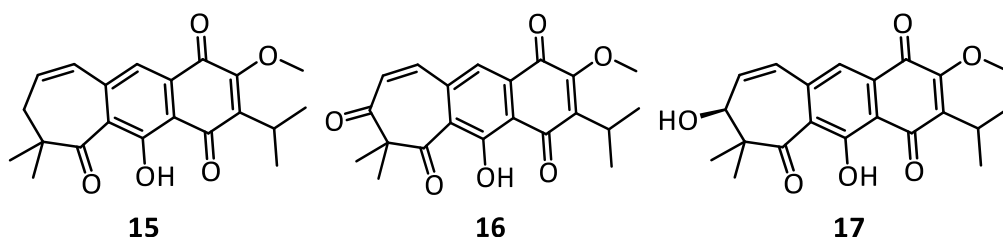
<sup>47</sup> Herz, W.; Pilotti, A. M.; Söderholm, A. C.; Shuhama, I. K.; Vichnewski, W. New ent-clerodane-type diterpenoids from *Baccharis trimera*. *J. Org. Chem.* **1977**, 42(24), 3913-3917.

<sup>48</sup> Maldonado, E.; Ortega, A. Neo-clerodane diterpenes from *Salvia thymoides*. *Phytochemistry* **1997**, 46(7), 1249-1254.



**Figura 9.** Metabolitos aislados de una población de *S. thymoides* recolectada en Oaxaca (1997). **12)** 7-oxo-neoclerodan-3,13-dien-18,19:15,16-diólida, **13)** thymonina, **14)** 7β-hidroxitymonina. (Continuación)

En 2005 se realizó el estudio del perfil químico de las raíces de *S. thymoides*, trabajando por medio de cromatografía el extracto acetónico de 950 g de raíces de una población colectada en Tehuacán, Puebla; obteniendo como resultado cuatro metabolitos (Figura 10), uno de ellos es un diterpeno de nombre tilifolidiona (**15**), previamente aislado de *Salvia tilifolia*<sup>49</sup> y, adicional a éste, dos diterpenos de nombre 3-oxo-tilifolidiona (**16**) y 3β-hidroxitilifolidiona (**17**), los cuales presentan un esqueleto de tipo salvifolano (proveniente de la transposición 20 y 6 en el abietano); el cuarto diterpeno aislado presenta la primer estructura de tipo *nor*-salvifolano descrito en las salvias mexicanas, el cual se nombró como 5-*nor*-3-oxo-tilifolidiona (**18**).<sup>50</sup>

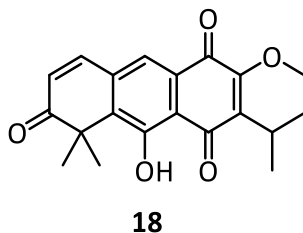


**Figura 10.** Metabolitos aislados de las raíces de una población de *S. thymoides* recolectada en Tehuacán, Puebla (2005). **15)** tilifolidiona, **16)** 3-oxo-tilifolidiona, **17)** 3β-hidroxitilifolidiona.

<sup>49</sup> Luis, J. G.; Quiñones, W.; Echeverri, F. Tilifolidione, a cicloheptanenaphthoquinone-type diterpenoid of abietanic origin from the roots of *Salvia tiliaefolia*. *Phytochemistry* **1994**, 36(1), 115-117.

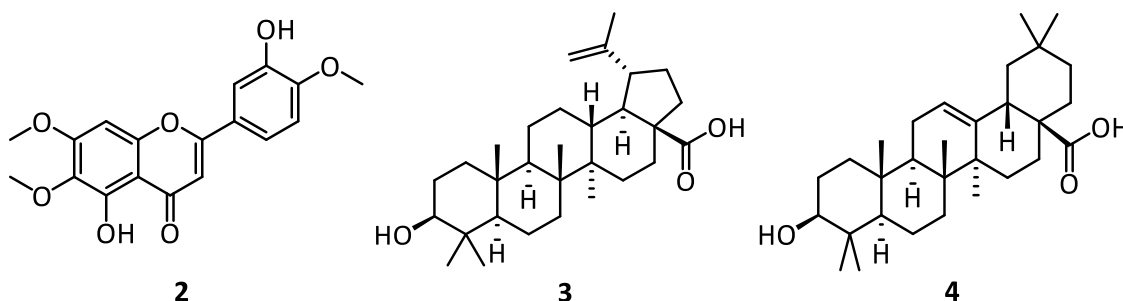
<sup>50</sup> Esquivel, B.; Sánchez, A. A. Rearranged icetexane diterpenoids from the roots of *Salvia thymoides* (Labiatae). *Nat. Prod. Res.* **2005**, 19(4), 413-417.





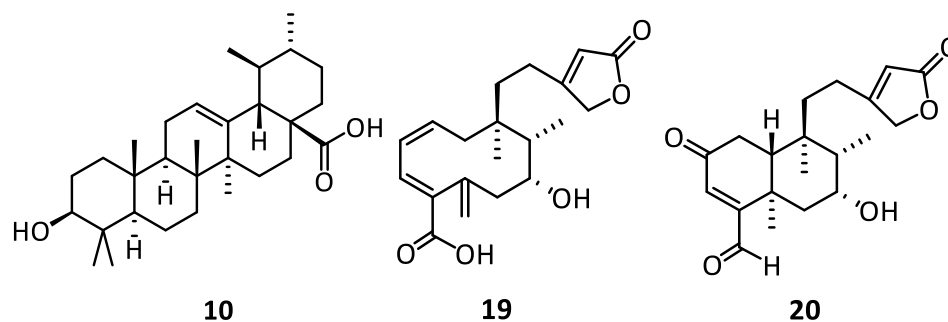
**Figura 10.** Metabolitos aislados de las raíces de una población de *S. thymoides* recolectada en Tehuacán, Puebla (2005). **18** 5-nor-3-oxo-tilifolidiona. (Continuación)

En el 2011 nuevamente se volvió a estudiar el perfil químico de las partes aéreas de una población *S. thymoides* colectada en Tehuacán, Puebla; a partir del tratamiento cromatográfico del extracto acetónico en un estudio biodirigido analizando la actividad antiinflamatoria, se obtuvo como resultado el aislamiento de seis metabolitos secundarios (Figura 11), de los cuales ya se encontraban reportados en esta especie la flavona eupatorina (**2**) y los triterpenos ácido betulínico (**3**), ácido oleanólico (**4**) y ácido ursólico (**10**). En cuanto a los diterpenos se aislaron dos compuestos que no se encontraban descritos con anterioridad, un 5,10-seco-clerodano (**19**) y un *neo*-clerodano (**20**).<sup>51</sup>



**Figura 11.** Metabolitos aislados de una población de *S. thymoides* recolectada en Tehuacán, Puebla (2011).

<sup>51</sup> Bustos, C. Estudio biodirigido de los componentes antiinflamatorios de *Salvia thymoides* Bent. Tesis de maestría, Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 2011.



**Figura 11.** Metabolitos aislados de una población de *S. thymoides* recolectada en Tehuacán, Puebla (2011). **19)** ácido 5,10-*seco*-clerodan-1,3,5,13-tetraen-7 $\alpha$ -hidroxi-15,16-ólida-18-oico, **20)** 2-oxo-7 $\alpha$ -hidroxi-18-formil-neoclerodan-3,13-dien-15,16-ólida. (Continuación)

### 2.2.1. Salvias de la sección *Flocculosae*

Descrita por Epling en 1939, esta sección consta de 26 especies (Tabla 7) que son arbustos perennes de entre 20 y 80 cm de altura, tallos con alto contenido de pubescencia, hojas entre ovoides y elípticas de entre 6 y 30 mm de largo y entre 4 y 10 mm de ancho, también con un alto contenido de pubescencia y acomodadas en forma de espigas interrumpidas. En cuanto a su floración, estas miden entre 5 y 8 mm con el labio superior pubescente, hay especies con flores de color azul, púrpura y rosa, y el principal distintivo de esta sección frente a otras es la presencia de una gran cantidad de pelos suaves con apariencia de lana.<sup>52</sup>

**Tabla 7.** Especies de la sección *Flocculosae* y su ubicación biogeográfica.<sup>17,52</sup>

Especie	Ubicación	Especie	Ubicación
<i>Salvia cedroensis</i>	Baja California Sur	<i>Salvia inornata</i>	Puebla
<i>Salvia chamaedryoides</i>	San Luis Potosí, Hidalgo, Puebla y Edo. Mex	<i>Salvia cognata</i>	República Dominicana
<i>Salvia chionophylla</i>	Coahuila, San Luis Potosí y Nuevo León	<i>Salvia cruikshanksii</i>	Perú y Brasil
<i>Salvia coahuilensis</i>	Coahuila y Nuevo León	<i>Salvia curticalyx</i>	Ecuador
<i>Salvia greggii</i>	Chihuahua, San Luis Potosí y Texas	<i>Salvia cyanotropha</i>	Colombia

<sup>52</sup> Turner, B. L. Taxonomic overview of the Mexican species of *Salvia* sect. *Flocculosae* (Lamiaceae). *Phytoneuron* **2013**, 36, 1-11.

<i>Salvia isochroma</i>	Zacatecas, Nuevo León, San Luis Potosí	<i>Salvia decumbens</i>	República Dominicana
<i>Salvia jessicae</i>	Coahuila	<i>Salvia flocculosa</i>	Ecuador
<i>Salvia lycioides</i>	Coahuila, Nuevo León, San Luis Potosí, Durango y Chihuahua	<i>Salvia grisea</i>	Perú
<i>Salvia macellaria</i>	San Luis Potosí, Zacatecas, Aguascalientes y Guanajuato	<i>Salvia sarmentosa</i>	Perú
<i>Salvia muelleri</i>	Nuevo León	<i>Salvia trifilis</i>	Perú
<i>Salvia serpyllifolia</i>	San Luis Potosí	<i>Salvia incumbens</i>	Haití
<i>Salvia venturana</i>	Puebla	<i>Salvia hunzikeri</i>	Perú
<i>Salvia thymoides</i>	Puebla, Oaxaca y Chiapas	<i>Salvia griseifolia</i>	Perú

Hasta ahora, la sección *Flocculosae* sigue siendo químicamente muy poco estudiada ya que de las 26 especies de *Salvia* que la componen sólo se ha reportado el perfil químico de *Salvia thymoides*, *Salvia chamaedryoides* y *Salvia greegii*.

En 2017, se realizó el aislamiento y la elucidación estructural de los componentes diterpénicos presentes en las partes aéreas de *Salvia chamaedryoides* (Figura 12) sometidos a bioensayos de actividad antibacteriana e hipoglucémica<sup>53</sup>; se obtuvieron como resultado trece diterpenos con estructuras de tipo *neo-clerodano*, 5,10-*seco-clerodano*, abietano, tilifolano y clerodano glicosilado (Figura 13), de los cuales, cinco *neo-clerodanos* (**21**, **22** y **24-26**), un 5,10-*seco-clerodano* (**23**) y un clerodano glicosilado (**33**) son compuestos que se describen por primera vez; de igual forma se aislaron compuestos que han sido identificados en otras especies: el 5,10-*seco-clerodano* salvimicrophyllina B (**27**) aislado previamente de *Salvia microphylla*<sup>54</sup>, el *neo-clerodano* 7 $\alpha$ -hidroxibacchotricuneatina A (**28**) de *Baccharis incarum*<sup>55</sup>, el abietano rosmanol (**29**) de

<sup>53</sup> Bisio, A.; De Mieri, M.; Milella, L.; Schito, A. M.; Parricchi, A.; Russo, D.; Alfei, S.; Lapillo, M.; Tuccinardi, T.; Hamburger, M.; De Tommasi, N. Antibacterial and hypoglycemic diterpenoids from *Salvia chamaedryoides*. *J. Nat. Prod.* **2017**, 80, 503-514.

<sup>54</sup> Bautista, E.; Toscano, R. A.; Ortega, A. 5,10-*seco-neo-clerodanes* from *Salvia microphylla*. *J. Nat. Prod.* **2014**, 77, 1088-1092.

<sup>55</sup> Givovich, A.; San-Martín, A.; Castillo, M. Neo-clerodane diterpenoids from *Baccharis incarum*. *Phytochemistry* **1986**, 25(12), 2829-2831.

*Salvia rosmarinus*<sup>56</sup>, el abietano galdosol (**30**) de *Salvia canariensis*<sup>57</sup>, el tilifolano tilifodiólida (**31**) de *Salvia tilifolia*<sup>58</sup> y el glicósido splendidina C (**32**) de *Salvia splendens*<sup>59</sup>.



Figura 12. *Salvia chamaedryoides*.

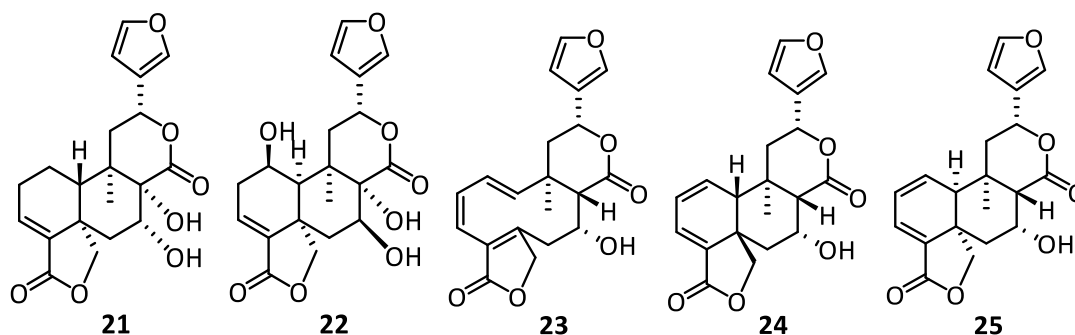


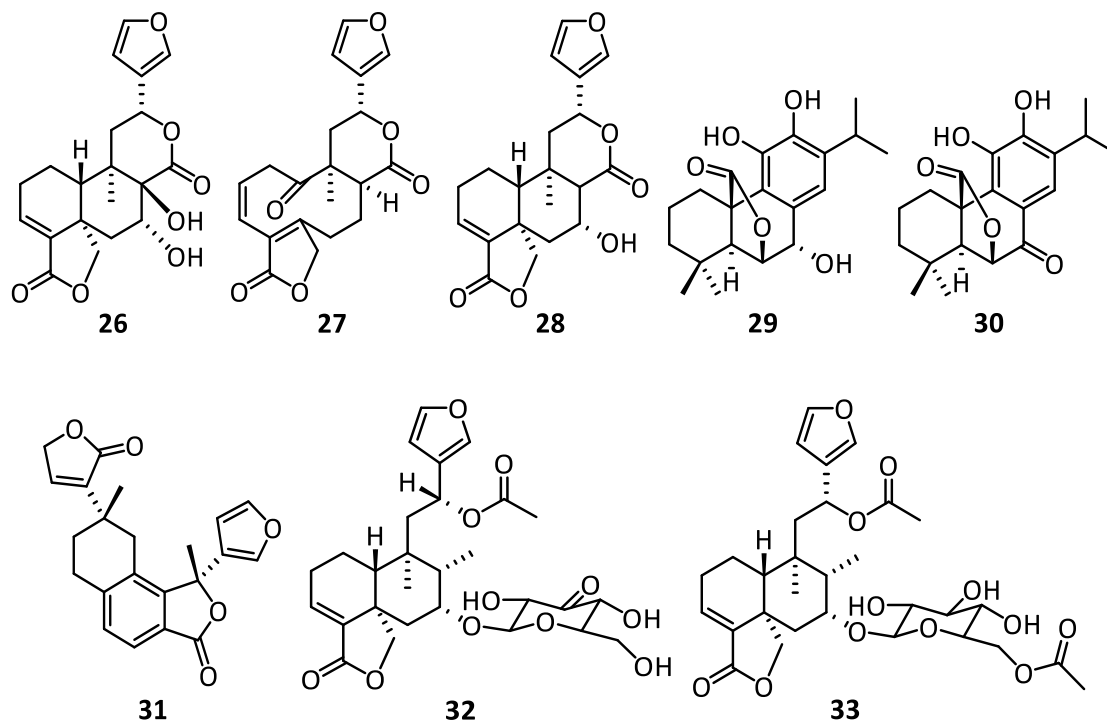
Figura 13. Metabolitos aislados de *S. chamaedryoides*.

<sup>56</sup> Nakatani, N.; Inatani, R. Structure of Rosmanol, a new antioxidant from Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Agric. Biol. Chem.* **1981**, 45, 2385-2386.

<sup>57</sup> González, G. A.; Andrés L. S.; Herrera, J. R.; Luis, J. G.; Ravelo, A. G. Abietane diterpenes with antibiotic activity from the flowers of *Salvia canariensis*. Reaction of Galdosol with diazometane. *Can. J. Chem.* **1989**, 67, 208-212.

<sup>58</sup> Rodríguez-Hahn, L.; O'Reilly, R.; Esquivel, B.; Maldonado, E.; Ortega, A.; Cárdenas, J.; Toscano, R. A. Tolifodiolide, tetraline-type diterpenoid of clerodanic origin from *Salvia tiliaefolia*. *J. Org. Chem.* **1990**, 55(11), 3522-3525.

<sup>59</sup> Pan, Z. H.; Cheng, J. T.; He, J.; Wang, Y. Y.; Peng, L. Y.; Xu, G.; Sun, W. B.; Zhao Q. S. Splendidins A-C, three new clerodane diterpenoids from *Salvia splendens*. *Helv. Chim. acta* **2011**, 94, 417-421.



**Figura 13.** Metabolitos aislados de *S. chamaedryoides* (continuación). **21**) (5*S*,7*R*,8*S*,9*R*,10*S*,12*R*)-7,8-dihidroxicleroda-3,13(16),14-trien-17,12:18,19-diólida, **22**) (1*R*,5*S*,7*S*,8*S*,9*R*,10*R*,12*R*)-1,7,8-trihidroxicleroda-3,13(16),14-trien-17,12:18,19-diólida, **23**) (7*R*,8*S*,9*R*,12*R*)-7-hidroxi-5,10-*seco-neo*-cleroda-1(10),2,4,13(16),14-pentaen-17,12:18,19-diólida, **24**) (5*R*,7*R*,8*S*,9*R*,10*R*,12*R*)-7-hidroxicleroda-1,3,13(16),14-tetraen-17,12:18,19-diólida, **25**) (5*S*,7*R*,8*S*,9*R*,10*S*,12*R*)-7-hidroxicleroda-1,3,13(16),14-tetraen-17,12:18,19-diólida, **26**) (5*S*,7*R*,8*R*,9*R*,10*S*,12*R*)-7,8-dihidroxicleroda-3,13(16),14-trien-17,12:18,19-diólida, **27**) salvimicrophyllina B, **28**) 7 $\alpha$ -hidroxibacchotricuneatina A, **29**) rosmanol **30**) Galdosol **31**) tilifodiólida **32**) splendidina C **33**) (5*S*,7*R*,8*S*,9*R*,10*R*)-7-(6-O-acetil- $\beta$ -D-glucopiranosil)hidroxi-12-O-acetilcleroda-3,13(16),14-trien-17,12:18,19-diólida.

En 1986 se realizó el primer estudio del perfil fitoquímico de las partes aéreas de *Salvia greegii* (Figura 14) en el que se obtuvieron cuatro diterpenos con estructura de tipo pimarano y uno con estructura de tipo *neo*-clerodano (Figura 15). La esterificación con diazometano permitió separar dos ácidos pimáricos en forma de sus ésteres metílicos, el derivado del ya conocido ácido isopimárico (**34**) previamente aislado de *Pinus peuce*<sup>60</sup> y el derivado del ácido 3 $\beta$ -hidroxi-7,15-isopimaradien-18-óico (**37**) el cual se trataba de una

<sup>60</sup> Weissmann, G. Delta 8(9), 15-isopimaric acid in balsam from *Pinus peuce* Grisebach. *Tetrahedron letters* 1968, 2053.

estructura nueva. También se aislaron dos nuevos pimaranos (**35** y **36**) y el *neo*-clerodano 7,8 $\beta$ -dihidrosalviacoccina (**38**) previamente aislado de *Salvia coccinea*<sup>61, 62</sup> En 2004 se volvió a estudiar el perfil fitoquímico de las partes aéreas de la especie, obteniendo como resultado cinco diterpenos nuevos (Figura 15), el *neo*-clerodano de nombre salvigresina (**39**) y los clerodanos glicosilados (**40-43**) nombrados salvigrésidas A-D respectivamente de los cuales se realizó la evaluación de su actividad antibacteriana.<sup>63</sup>



Figura 14. *Salvia greggii*.

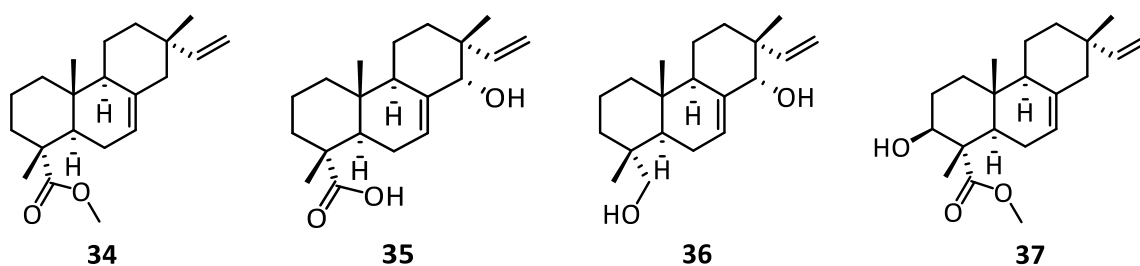
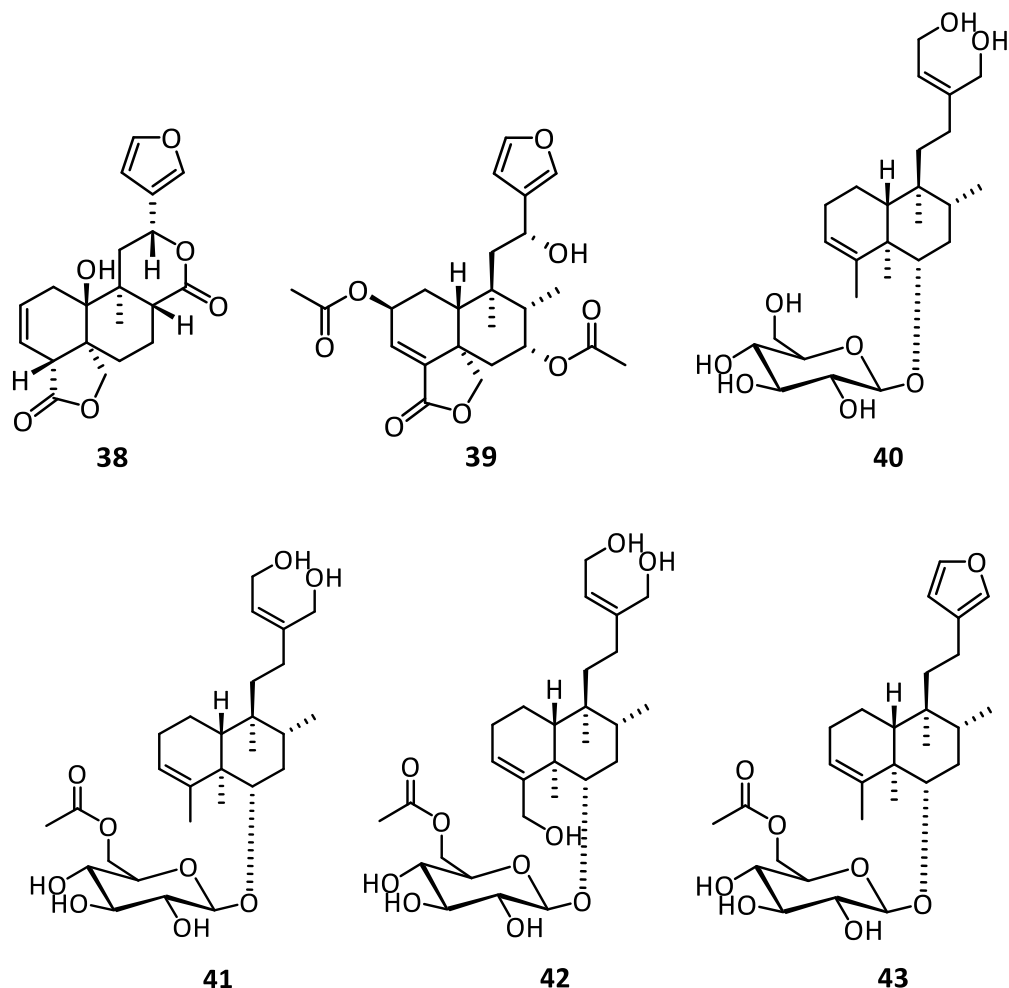


Figura 15. Metabolitos aislados de *S. greggii*.

<sup>61</sup> Savona, G.; Bruno, M.; Paternostro, M.; Marco, J. L.; Rodríguez, B. Salviacoccin, a neo-clerodane diterpenoid from *Salvia coccinea*. *Phytochemistry* **1982**, 21(10), 2563-2566.

<sup>62</sup> Bruno, M.; Savona, G.; Fernández-Gadea, F.; Rodríguez, B. Diterpenoids from *Salvia greggii*. *Phytochemistry* **1986**, 25(2), 475-477.

<sup>63</sup> Kawahara, N.; Tamura, T.; Inoue, M.; Hosoe, T.; Kawai, K.; Sekita, S.; Satake, M.; Goda, Y. Diterpenoid glucosides from *Salvia greggii*. *Phytochemistry* **2004**, 64, 2577-2581.



**Figura 15.** Metabolitos aislados de *S. greggii* (continuación). **34)** éster metílico del ácido 7,15-isopimaradien-18-óico, **35)** ácido 14 $\alpha$ -hidroxi-7,15-isopimaradien-18-óico, **36)** 14 $\alpha$ ,18-dihidroxi-7,15-isopimaradieno, **37)** éster metílico del ácido 3 $\beta$ -hidroxi-7,15-isopimaradien-18-óico, **38)** 7,8 $\beta$ -dihidrosalviacoccina, **39)** salvigresina, **40)** salvigrésida A, **41)** salvigrésida B, **42)** salvigrésida C, **43)** salvigrésida D.

### 2.2.2. Perfil químico de las salvias que crecen en Tehuacán, Puebla

El valle semiárido de Tehuacán, Puebla es una parte muy importante de la provincia florística del estado albergando una cantidad importante de especies endémicas adaptadas a climas mediterráneos; específicamente, la zona sureste de Puebla y la zona noroeste de Oaxaca, que abarca toda la región Tehuacán-Cuicatlán que corresponde al ecosistema denominado

como matorral esclerófilo perennifolio, el cual se constituye principalmente por arbustos achaparrados de 1 a 2 m de alto. En estudios de campo que tenían como objetivo plantear un listado florístico extenso de la zona, se encontró que las tres principales familias que establecen su dominancia en la zona son Fagaceae (género *Quercus*), Asteraceae (género *Ageratina*) y Lamiaceae (género *Salvia*).<sup>64</sup>

Las salvias que son predominantes en la zona del valle de Tehuacán son *Salvia aspera*, *Salvia candicans* y *Salvia thymoides*, las cuales han mostrado tener una actividad alelopática importante en su entorno; se han realizado estudios fitoquímicos de las tres especies y los metabolitos enlistados podrían presentar una posible actividad herbicida.

En 1995 se realizó el estudio de los metabolitos presentes en las raíces de *Salvia aspera* (Figura 16), a partir del tratamiento cromatográfico del extracto acetónico de las raíces se obtuvieron seis diterpenos (Figura 17), de los cuales tres son estructuras reportadas por primera vez, los icetexanos nombrados como salviasperanol (**44**) y 5,6-dihidro-6 $\alpha$ -hidroxisalviasperanol (**45**) y el abietano 6-*epi*-desmetilesquirolina D (**47**), los tres restantes son el icetexano desmetilsalvicanol (*Salvia mellifera*<sup>65</sup>) en forma de su derivado diacetilado (**46**), el sugiol (**48**) previamente aislado de *Salvia canariensis*<sup>66</sup>, *Salvia coulteri*<sup>67</sup> y *Salvia*

---

<sup>64</sup> Flores-Hernández, N.; Valiente-Banuet, A.; Dávila, P.; Villaseñor, J. L. La vegetación esclerófila perennifolia del valle de Tehuacán, Puebla y sus similitudes con la vegetación esclerófila de climas mediterráneos. *Bol. Soc. Bot. Méx.* **1999**, 64, 41-55.

<sup>65</sup> Moujir, L.; Gutiérrez-Navarro, A. M.; San Andrés, L.; Luis, J. G. Bioactive diterpenoids isolated from *Salvia mellifera*. *Phytother. Res.* **1996**, 10(2), 172-174.

<sup>66</sup> Fraga, B. M.; González, A.; Herrera, J. R.; Luis, J. G.; Ravelo, A. G. Diterpenes from the roots of *Salvia canariensis*. *Phytochemistry* **1985**, 25(1), 269-271.

<sup>67</sup> Fontana, B.; Cárdenas, J.; Rodríguez-Hahn, L. Diterpenoids from *Salvia coulteri*. *Phytochemistry* **1994**, 36(3), 739-741.



*prionitis*<sup>68</sup> y la taxodiona (**49**) previamente aislada de *Taxodium distichum*<sup>69</sup>, *Salvia phlomoides*<sup>70</sup>, *Salvia austriaca*<sup>71</sup> y *Salvia deserta*<sup>72,73</sup>

En 2002 se aislaron y elucidaron los metabolitos mayoritarios presentes en el extracto acetónico de las partes aéreas de la especie, obteniendo como resultado ocho compuestos (Figura 18), un compuesto y dos mezclas epiméricas de triterpenos con una estructura de tipo tri-nordammarano (**50-52**) aislados previamente de *Cleome amblyocarpa*<sup>74</sup> y tres neo-clerodanos identificados como los ya mencionados 7 $\alpha$ -hidroxi-neoclerodan-3,13-dien-18,19:15,16-diólida (**11**) y 7-oxo-neoclerodan-3,13-dien-18,19:15,16-diólida (**12**) previamente aislados de *Salvia thymoides*<sup>48</sup> y la semiatrina (**53**) previamente identificada en *Salvia semiatrata*<sup>75,76</sup>

---

<sup>68</sup> Lin, L. Z.; Wang, X. M.; Huang, X. L.; Huang, Y.; Yang, B. Y. Diterpenoids from *Salvia prionitis*. *Planta med.* **1988**, 54(5), 443-445.

<sup>69</sup> Kupchan, S. M.; Karim, A.; Marks, C. Taxodione and taxodone, two novel diterpenoid quinone methide tumor inhibitors from *Taxodium distichum*. *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, 90(21), 5923-5924.

<sup>70</sup> Hueso-Rodríguez, J. A.; Jimeno, M. L.; Rodríguez, B.; Savona, G.; Bruno, M. Abietane diterpenoids from the root of *Salvia phlomoides*. *Phytochemistry* **1983**, 22(9), 2005-2009.

<sup>71</sup> Kuzma, L.; Wysokinska, H.; Sikora, J.; Olszewska, P.; Makiciuk-Olasik, E.; Szymanski, P. Taxodione and extracts from *Salvia austriaca* roots as human cholinesterase inhibitors. *Phytotherapy research* **2016**, 30(2), 234-242.

<sup>72</sup> Búfalo, J.; Cantrell, C. L.; Jacob, M. R.; Schrader, K. K.; Tekwani, B. L.; Kustova, T. S.; Ali, A.; Boaro, C. S. F. Antimicrobial and antileishmanial activities of diterpenoids isolated from the roots of *Salvia deserta*. *Planta med.* **2016**, 82(1), 131-137.

<sup>73</sup> Esquivel, B.; Flores, M.; Hernández-Ortega, S.; Toscano, R. A.; Ramamoorthy, T. P. Abietane and icetexane diterpenoids from the roots of *Salvia aspera*. *Phytochemistry* **1995**, 39(1), 139-143.

<sup>74</sup> Harraz, F. M.; Ulubelen, A.; Öksüz, S.; Tan, N. Dammarane triterpenes from *Cleome amblyocarpa*. *Phytochemistry* **1995**, 39(1), 175-178.

<sup>75</sup> Esquivel, B.; Hernández, M.; Ramamoorthy, T. P.; Cárdenas, J.; Rodríguez-Hahn, L. Semiatrin, a neo-clerodane diterpenoid from *Salvia semiatrata*. *Phytochemistry* **1986**, 25(6), 1484-1486.

<sup>76</sup> Esquivel, B.; Guerrero, F.; Toscano, R. A. Tri-nordammarane triterpenoids and neoclerodane diterpenoids from *Salvia aspera* (Labiatae). *Nat. Prod. Lett.* **2002**, 16(2), 129-135.



Figura 16. *Salvia aspera*.

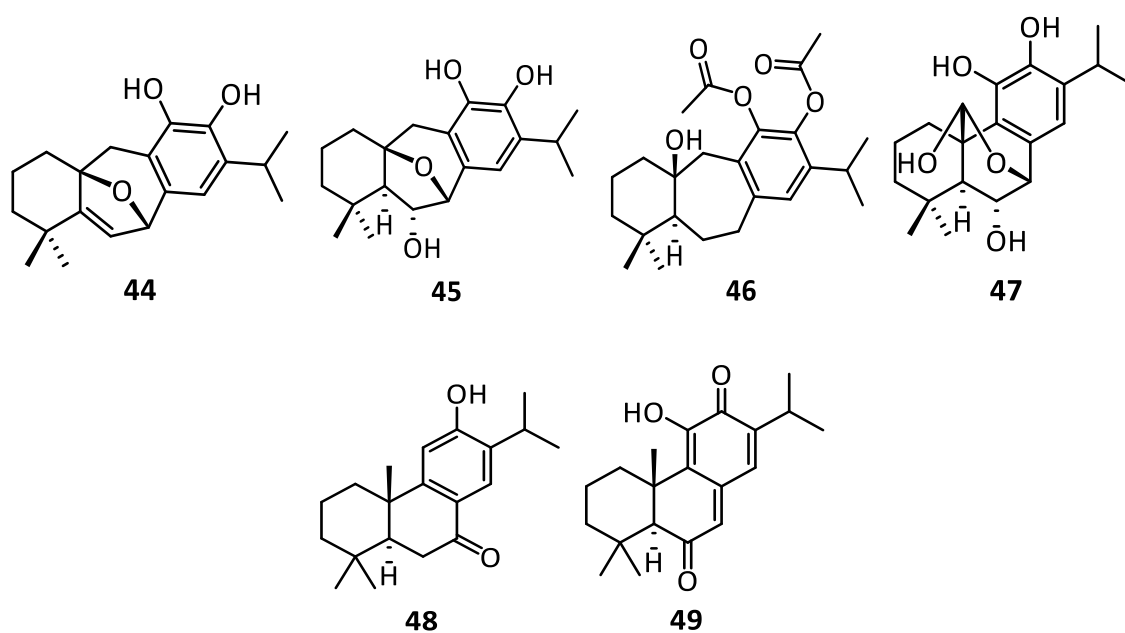
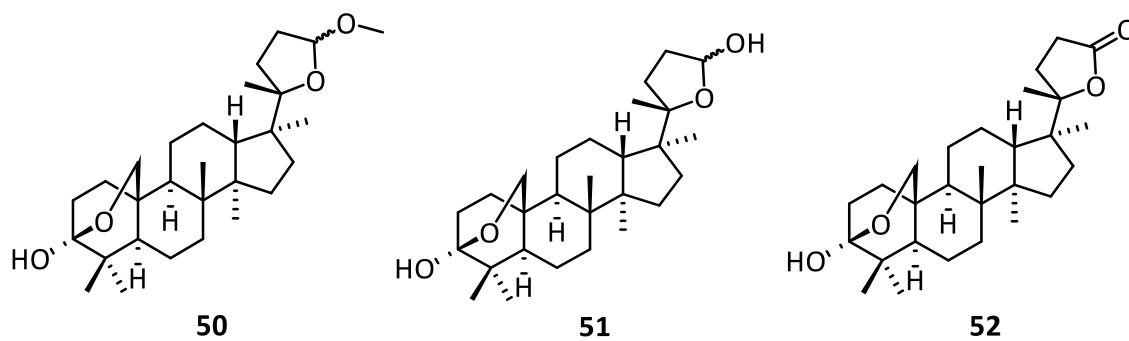
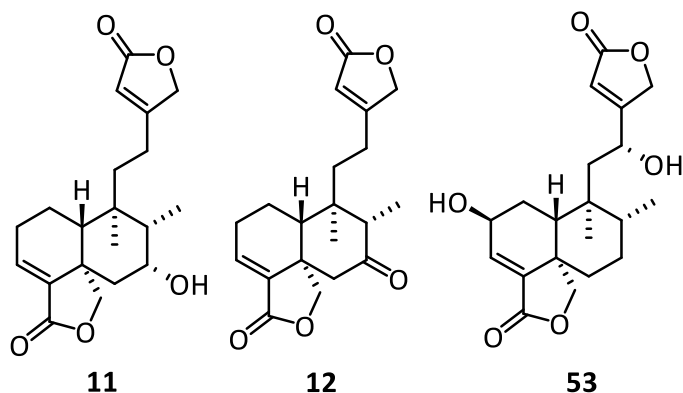


Figura 17. Metabolitos aislados de las raíces de *S. aspera*. **44)** Salviasperanol, **45)** 5,6-dihidro-6 $\alpha$ -hidroxisalviasperanol, **46)** diacetato del demetilsalvicanol, **47)** 6-*epi*-demetilesquirolina D, **48)** sugiol, **49)** taxodiona.





**Figura 18.** Metabolitos aislados de las partes aéreas de *S. aspera*. **50)** mezcla epimérica del 24-metoxiamblyol, **51)** mezcla epimérica del amblyiol, **52)** amblyona, **53)** semiatrina.

De *Salvia candicans* (Figura 19), se ha analizado la composición química de los extractos de las raíces y de las partes aéreas, obteniendo como resultado diterpenos de tipo abietano e icetexano (Figuras 20 y 21).

De la realización de una cromatografía en columna al extracto crudo de las raíces se aislaron los icetexanos 5 $\alpha$ ,6-dihidrosalviasperanol (**45**) y desmetilsalvicanol (**54**), mismos que fueron aislados de las raíces de *Salvia aspera*<sup>73,77</sup>. De la realización de una cromatografía en columna al extracto crudo de las partes aéreas se aislaron los icetexanos icetexona (**55**), también aislada de *Salvia ballotiflora*,<sup>78</sup> *Salvia pubescens*,<sup>79</sup> *Salvia uliginosa*<sup>80</sup> y *Salvia*

<sup>77</sup> Esquivel, B. Rearranged clerodane and abietane derived diterpenoids from American *Salvia* species. *NPC Nat. Prod. Comm.* **2008**, 3(6), 989-1002.

<sup>78</sup> Esquivel, B.; Burgueño-Tapia, E.; Bustos-Brito, C.; Pérez-Hernández, N.; Quijano, L.; Joseph-Nathan, P. Absolute configuration of the diterpenoids icetexone and conacytone from *Salvia ballotaeflora*. *Chirality* **2018**, 30(2), 177-188

<sup>79</sup> Esquivel, B.; Calderón, J. S.; Flores, E.; Chávez, C.; Juárez, M. Abietane and icetexane diterpenoids from *Salvia pubescens*. *Nat. Prod. Lett.* **1997**, 10, 87-93.

<sup>80</sup> Schneider-Cezarotto, C.; Dorneles, A.; Baldissera, F. G.; Brasil da Silva, M.; Markoski, M. M.; Rodrigues-Júnior, L. C.; Peres, A.; Fazolo, T.; Bordignon, S. A. L.; Anders-Apel, M.; Torres-Romão P. R.; von Poser, G. L. Leishmanicidal and antichemotactic activities of icetexanes from *Salvia uliginosa* Benth. *Phytomedicine* **2019**, 58, 152748.

*anastomosans*,<sup>81</sup> anastomosina (**56**), también aislada de *Salvia ballotiflora*<sup>82</sup> y *Salvia anastomosans*,<sup>81</sup> y 2,7-dihidro-8,20,1-trien-7-hidroxi-anastomosina (**57**) reportando esta estructura por primera vez; también se aislaron los abietanos conacytona (**58**), también aislada de *Salvia ballotiflora*,<sup>78</sup> *Salvia pubescens*,<sup>83</sup> y *Salvia anastomosans*<sup>81</sup>, la 18-hidroxi-conacytona (**59**) y la 18-metoxi-conacytona (**60**) reportadas como estructuras nuevas.<sup>84</sup>



Figura 19. *Salvia candicans*.

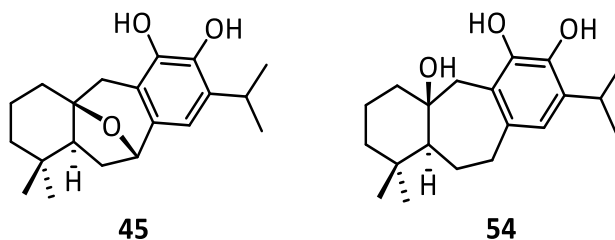


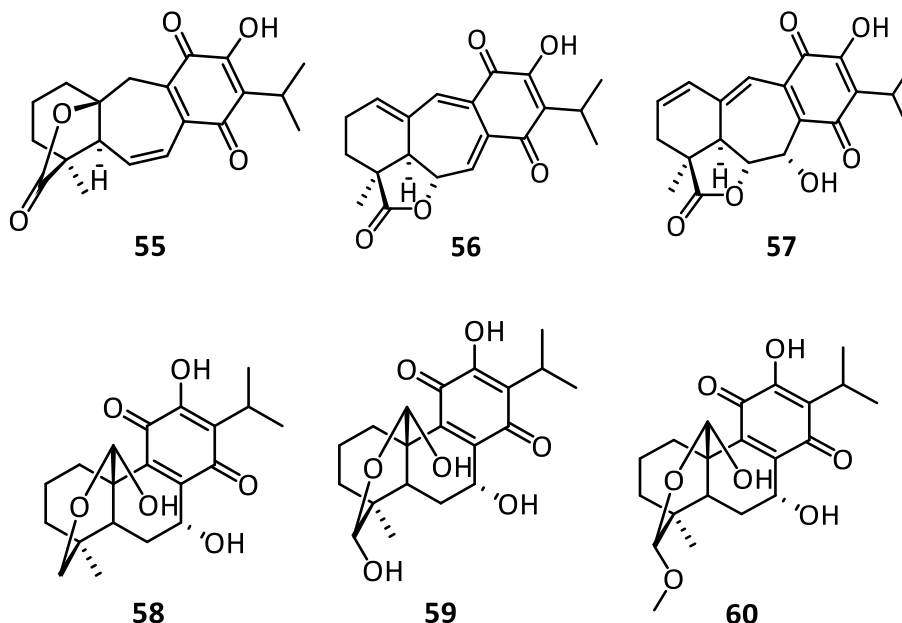
Figura 20. Metabolitos aislados de las raíces de *S. candicans*. **54**) desmetilsalvicanol.

<sup>81</sup> Sánchez, C.; Cárdenas, J.; Rodríguez-Hahn, L.; Ramamoorthy, T. P.; Abietane diterpenoids of *Salvia anastomosans*. *Phytochemistry* **1989**, 28(6), 1681-1684.

<sup>82</sup> Esquivel, B.; Calderón, J. S.; Flores, E.; Sánchez, A. A.; Rosas-Rivera, R. Abietane and icetexane diterpenoids from *Salvia ballotiflora* and *Salvia axillaris*. *Phytochemistry* **1997**, 46(3), 531-534.

<sup>83</sup> Galicia, M. A.; Esquivel, B.; Sánchez, A. A.; Cárdenas, J.; Ramamoorthy, T. P.; Rodríguez-Hahn, L. Abietane diterpenoids from *Salvia pubescens*. *Phytochemistry* **1988**, 27(1), 217-219.

<sup>84</sup> Cárdenas, J.; Rodríguez-Hahn, L. Abietane and icetexane diterpenoids from *Salvia candicans*. *Phytochemistry* **1995**, 38(1), 199-204.



**Figura 21.** Metabolitos aislados de las partes aéreas de *S. candidans*. **55)** icetexona, **56)** anastomosina, **57)** 2,7-dihidro-8,20,1-trien-7-hidroxianastomosina, **58)** conacytona, **59)** 18-hidroxiconacytona, **60)** 18-metoxiconacytona.

### 2.3. Terpenoides

Los terpenos y terpenoides son el grupo más grande y diverso dentro de la clasificación de los productos naturales, cumple con un número considerable de importantes funciones en las plantas, ya sea como hormonas (giberelinas y ácido abscísico), pigmentos (carotenos y xantofilas), componentes de su membrana celular (fitosteroles) o como base de su mecanismo de defensa químico (volátiles y aceites esenciales), por mencionar algunos ejemplos. Este tipo de compuestos destacan por su amplia diversidad de actividades biológicas de aplicación en la industria alimentaria, cosmética, agrícola y farmacéutica, las cuales les confieren un importante valor y a los organismos que los producen.<sup>85</sup>

<sup>85</sup> Croteau, R.; Kutchan, T. M.; Lewis, N. G. Natural Products (secondary metabolites). *Am. Soc. Plant Physiolog.* Rockville, Maryland, EU. **2000**, 24.

Se subclasifican por el número de bloques fundamentales que los constituyen (Tabla 8), los cuales son nombrados unidades de pirofosfato de isopentenilo (IPP) y su isómero pirofosfato de dimetilalilo (DMAPP), aunque también hay en la naturaleza compuestos de tipo polimérico constituidos por estas unidades, como el caucho, que se encuentra dentro de los denominados politerpenos.<sup>86</sup>

**Tabla 8.** Clasificación de los terpenoides a partir del número de unidades fundamentales.

Clasificación	No. de unidades	Precursor
Hemiterpenos	1 (C <sub>5</sub> )	Pirofosfato de isopentenilo (IPP)
Monoterpenos	2 (C <sub>10</sub> )	Pirofosfato de geranilo (GPP)
Sesquiterpenos	3 (C <sub>15</sub> )	Pirofosfato de farnesilo (FPP)
Diterpenos	4 (C <sub>20</sub> )	Pirofosfato de geranilgeranilo (GGPP)
Sesterterpenos	5 (C <sub>25</sub> )	GPP + FPP
Triterpenos	6 (C <sub>30</sub> )	Óxido de escualeno
Tetraterpenos	8 (C <sub>40</sub> )	Fitoeno

La formación de los precursores de los terpenos se da gracias al ataque nucleofílico del IPP al carbocatión alílico formado por la salida del grupo pirofosfato en el DMAPP, el cual está fungiendo como electrófilo (Figura 21), la unión de cada unidad de IPP está mediada y catalizada por enzimas de tipo prenil transferasas (Tabla 9), que dan lugar a cada uno de los precursores de los diferentes tipos de terpenoides, que frecuentemente pueden presentar diferentes ordenamientos a través de reacciones de ciclación y transposición, o sufrir pérdidas de átomos de carbono a través de rupturas de enlaces como en la descarboxilación, los cuales pueden incumplir la famosa regla de la unión cabeza-cola propuesta por Ruzicka en 1952<sup>87,88</sup>. La biosíntesis de las unidades fundamentales de los terpenos puede darse mediante dos rutas posibles: la ruta del mevalonato (MVA) y la ruta de la 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DXP/MEP) las cuales serán discutidas en los capítulos siguientes.

<sup>86</sup> Dewick, P. M. Medicinal Natural Products, a biosynthetic approach. *School of Pharmaceutical Sciences*. Universidad de Nottingham, Reino Unido. **2002**, 33-88.

<sup>87</sup> Ruzicka, L. The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia* 1953, 9, 357.

<sup>88</sup> Boronat, A.; Rodríguez-Concepción, M. Terpenoid biosynthesis in prokaryotes. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2015**, 148, 3-18.

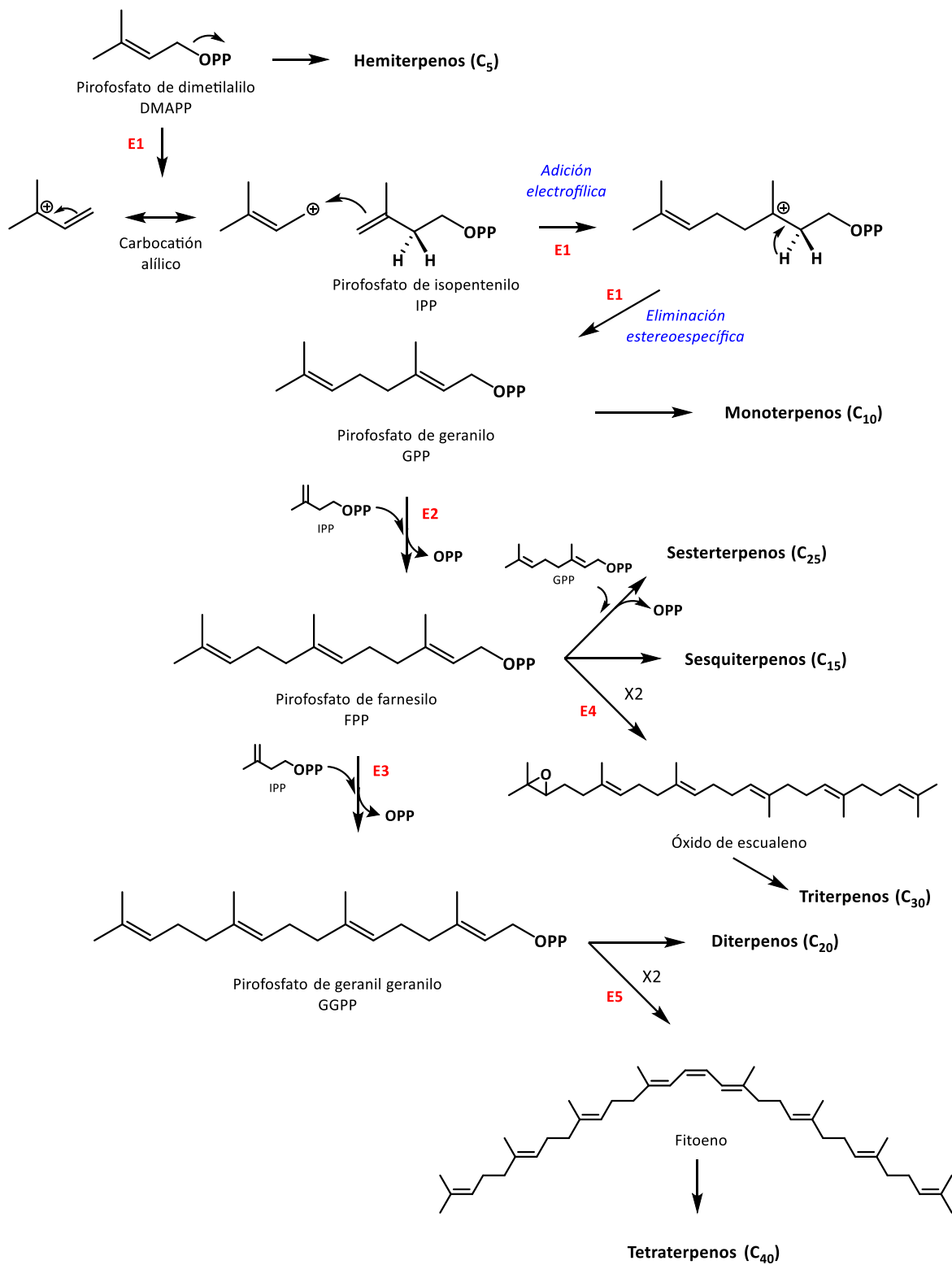


Figura 21. Formación de los precursores de los diferentes tipos de terpenoides.

**Tabla 9.** Nombre de las enzimas involucradas en la formación de los precursores de los terpenoides.

Enzima	Nombre
E1	Geranil difosfato sintasa
E2	Farnesil difosfato sintasa
E3	Geranilgeranilo difosfato sintasa
E4	Escualeno sintasa
E5	Fitoeno sintasa

### 2.3.1. Ruta biosintética del Mevalonato (MVA)

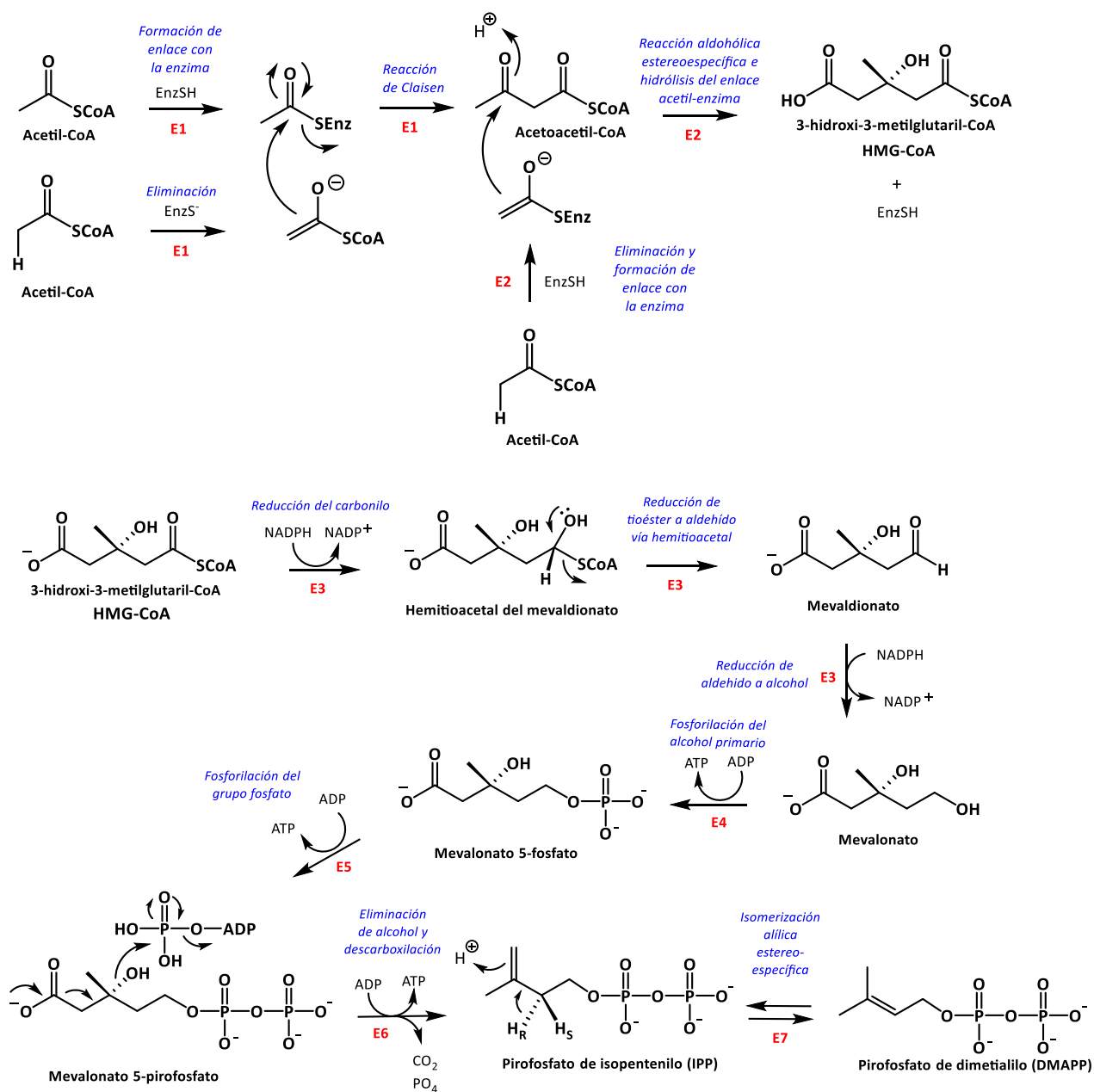
Durante años, se consideró a la ruta del mevalonato como la única por la cual los organismos biosintetizaban estos compuestos y esto es cierto en el caso del reino animal (incluyendo a los seres humanos) y los hongos. En el caso de las plantas, la preparación de los terpenos puede llevarse a cabo mediante esta ruta y una adicional que emplea a la 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato (DXP).<sup>88</sup>

La ruta inicia con la condensación de tres moléculas de acetil coenzima A, empleando un mecanismo similar al de una reacción de Claisen en el primer paso, y una reacción aldólica esteroespecífica en el segundo, lo cual conduce a la formación de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA); la conversión del HMG-CoA a la molécula de (3R)-mevalonato involucra varias reducciones, comenzando por la del tioéster de la posición 5, seguida de la reducción del aldehído resultante a un grupo alcohol en las cuales es fundamental la participación de dos moléculas de NADPH (Figura 22). Para la formación del IPP son necesarias dos fosforilaciones en la molécula de (3R)-mevalonato en la cual el adenosintrifosfato (ATP) funge como el agente fosforilante, la pérdida de un átomo de carbono en la especie pirofosfatada está dada por una descarboxilación, en la cual se involucra una tercera molécula de ATP, y de esta forma generar el IPP, que a su vez se puede isomerizar para formar el DMAPP.<sup>86</sup>

Esta serie de reacciones se encuentra regulada por enzimas en donde la 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMG-CoA reductasa) juega un papel clave como enzima



regulatoria del proceso (Tabla 10). La actividad enzimática en este proceso lo hace estereoespecífico y energéticamente viable.



**Figura 22.** Formación del IPP y DMAPP a partir de la ruta del mevalonato (MVA/MEP).

**Tabla 10.** Nombre de las enzimas involucradas en la ruta del mevalonato (MVA).

Enzima	Nombre
E1	Acetoacetil-CoA sintasa
E2	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintasa (HMG-CoA sintasa)
E3	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMG-CoA reductasa)
E4	Mevalonato cinasa
E5	Fosfomevalonato cinasa
E6	Mevalonato 5-difosfato descarboxilasa
E7	Isopentenil difosfato isomerasa (IPP isomerasa)

A partir de esta ruta se biosintetizan principalmente sesquiterpenos, triterpenos, fitosteroles, brasinoesteroides, politerpenos y terpenoides mitocondriales. En el reino animal y fungi la ruta del mevalonato es la única que se lleva a cabo para biosintetizar compuestos en donde el IPP es su unidad fundamental, tal es el caso del colesterol y otros compuestos que conforman a la membrana celular.<sup>88</sup>

Toda la ruta para la formación del IPP y DMAPP se lleva a cabo en el citosol al igual que la formación del FPP, precursor de los sesquiterpenos. En el retículo endoplásmico se lleva a cabo la condensación de los dos equivalentes de FPP para la formación del óxido de escualeno, precursor de los triterpenos, ya que es en este organelo donde se encuentran las enzimas escualeno sintasa y oxidoescualeno ciclasa, encargadas de su biosíntesis. De igual forma, en la mitocondria se lleva a cabo la biosíntesis de los llamados terpenoides mitocondriales como las ubiquinonas, ya que posee las enzimas farnesil difosfato sintasa y geranilgeranilo difosfato sintasa para dar lugar a su biosíntesis.<sup>89</sup>

### 2.3.2. Ruta biosintética DXP

La glucólisis y el ciclo de Calvin son los procesos metabólicos por los cuales se generan las dos moléculas que fungen como intermediarios de la ruta de la 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato o DXP (Figura 23), los cuales son el piruvato y el D-gliceraldehído-3-fosfato. El pirofosfato de

<sup>89</sup> Kempinski, C.; Jiang, Z.; Bell, S.; Chappell, J. Metabolic engineering of higher plants and algae for isoprenoid production. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2015**, 148, 161-199.

tiamina está involucrado en la descarboxilación de la molécula de piruvato y la condensación de estas dos especies para formar la DXP, esta etapa de la ruta está regulada por la enzima 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa o DXS.<sup>86</sup>

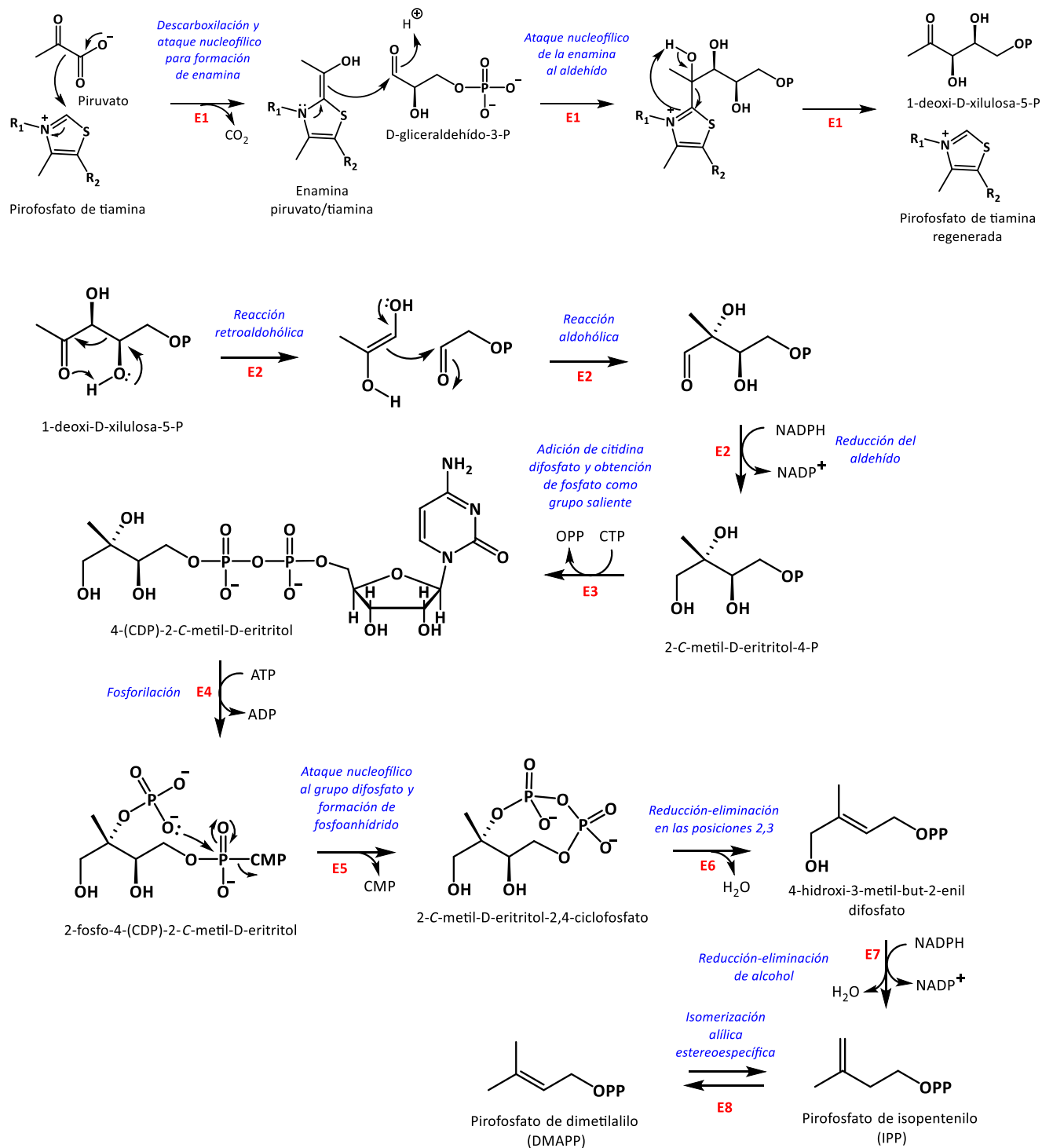
En la siguiente etapa de la ruta se genera la 2-C-metil-D-eritritol-4-P o MEP mediante el reordenamiento de la DXP, en el que suscita una reacción retroaldólica seguida de una reacción aldólica y la reducción del aldehído resultante en la posición 1 con la molécula de NADPH como agente reductor, esta etapa de la ruta está regulada por la enzima 1-desoxi-D-xilulosa-5-P reductoisomerasa o DXR.<sup>90</sup>

La última etapa de la ruta en la cual se forma el IPP y el DMAPP involucra a la molécula citidina difosfato, la cual se adiciona a partir de la fosforilación del grupo fosfato en la posición 4 de la MEP, seguida de la fosforilación del alcohol en la posición 2 con la molécula de ATP como agente fosforilante. El oxígeno del fosfato de la posición 2 realiza un ataque nucleofílico al fósforo del fosfato de la posición 4, favoreciendo la salida del monofosfato de citidina y formando un ciclofosfato, que al reordenarse y sufrir una reducción y eliminación del alcohol de la posición 1 genera el IPP, que a su vez genera su isómero DMAPP.<sup>89</sup>

En esta ruta la 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa (DXS) y la 1-desoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa (DXR) desempeñan el papel de enzimas regulatorias de toda la biosíntesis (Tabla 11). Al igual que la ruta del mevalonato, la actividad enzimática en este proceso lo hace estereoespecífico y energéticamente viable.<sup>89</sup>

---

<sup>90</sup> Tholl, D. Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2015**, 148, 63-106.



**Figura 23.** Formación del IPP y DMAPP a partir de la ruta de la 1-deoxi-D-xilulosa-5-P (DXP).

**Tabla 11.** Nombre de las enzimas involucradas en la ruta de la 1-deoxi-D-xilulosa-5-P (DXP).

Enzima	Nombre
E1	1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato sintasa (DXS)
E2	1-deoxi-D-xilulosa-5-fosfato reductoisomerasa (DXR)
E3	4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol sintasa (IspD)
E4	4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol cinasa (IspE)
E5	2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato sintasa (IspF)
E6	4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato sintasa (IspG)
E7	4-hidroxi-3-metilbut-2-enil difosfato reductase (IspH)
E8	Isopentenil difosfato isomerasa (IPP isomerasa)

A partir de esta ruta se biosintetizan los hemiterpenos, monoterpenos, diterpenos, carotenos y terpenoides de utilidad para los cloroplastos, como las giberelinas, citocininas, tocoferoles, plastiquinonas y las cadenas isoprénicas de las clorofilas. Se pudo realizar esta distinción gracias a estudios de tejidos vegetales con marcaje isotópico, donde se encontró que las unidades fundamentales de los terpenoides que éstas producían, no sólo se biosintetizaban a partir de la ruta del mevalonato en el citosol, se propuso la ruta DXP, la cual se llevaba a cabo en los cloroplastos, y ésta aportaba unidades de IPP a los compuestos que generaba, concluyendo que estos se podían formar a partir de la combinación de ambas rutas o en algunos casos, totalmente biosintetizados por la ruta DXP, como el caso de los terpenoides que tenían una participación en el proceso fotosintético.<sup>90</sup>

Esta ruta inicia en los cloroplastos, donde comienza con la condensación de una molécula de piruvato con una de D-gliceraldehído-3-fosfato, estos compuestos se consideran como un producto de la glucólisis y el ciclo de Calvin, y se transportan hacia dicho organelo. En el cloroplasto se encuentran presentes las enzimas que llevan a cabo la ruta DXP hasta la formación del IPP y DMAPP y las condensaciones para la formación del GPP precursor de los monoterpenos, del GGPP precursor de los diterpenos y del fitoeno precursor de los tetraterpenoides. De igual forma, a través de experimentos de marcaje isotópico se demostró que a través de esta ruta se generan los hemiterpenos a partir del IPP, como es el caso de la molécula de isopreno.<sup>89</sup>

Años posteriores al descubrimiento de esta ruta, se realizaron investigaciones que demuestran que hay casos en donde el cloroplasto es capaz de importar moléculas de FPP del citosol, para poder agregar la unidad adicional para generar diterpenoides con origen mixto en cuanto a su ruta biosintética.<sup>91</sup>

### 2.3.3. Biosíntesis de diterpenos

Los diterpenos provienen del pirofosfato de geranilgeranilo (GGPP) el cual, de manera frecuente, puede llevar a cabo reacciones de ciclización (Figura 24) promovidas por la formación de un carbocatión, o la salida del grupo pirofosfato y, posteriormente, reordenamientos de Wagner-Meerwein para generar una gran variedad de estructuras, sin embargo, también puede sólo reducirse, como en el caso del fitol, el cual es el precursor de importantes compuestos como el tocoferol (vitamina E) o la filoquinona (vitamina K).<sup>86</sup>

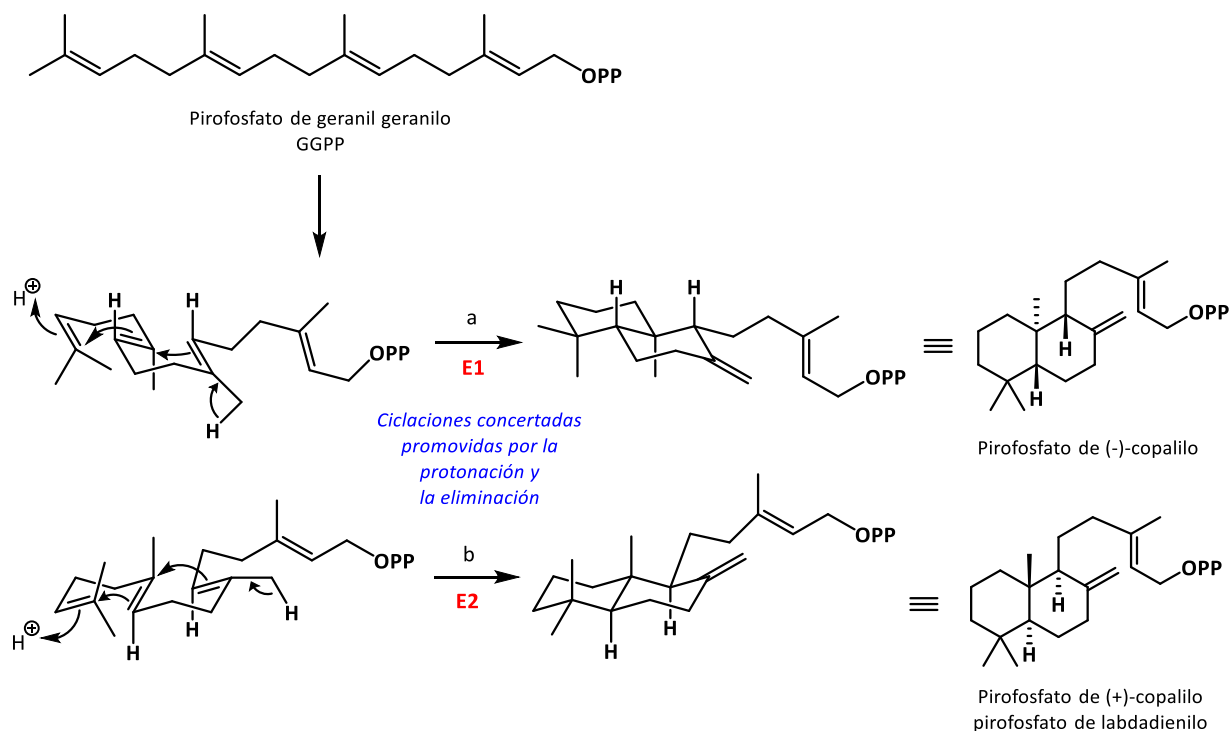
En cuanto a los mecanismos de ciclización que involucran la formación de un carbocatión (Figura 24), se propone que ésta se lleve a cabo a partir de la protonación del doble enlace de la primera unidad de IPP en el GGPP. Este proceso puede ser mediado por dos tipos de enzimas, (+)-copalil difosfato sintasa y (-)-copalil difosfato sintasa, las cuales le confieren estereoespecificidad, ya que las ciclaciones generan centros quirales en las moléculas resultantes que corresponden al par de enantiómeros pirofosfato de (+)-copalilo y pirofosfato de (-)-copalilo, a partir de las cuales se deriva un gran número de esqueletos que componen al grupo de los diterpenos.<sup>86</sup>

Las enzimas que regulan procesos estereoespecíficos (Tabla 12) como éste, están compuestas por un considerable número de aminoácidos aromáticos, como los son la fenilalanina, la tirosina y el triptófano, ya que las cadenas laterales al ser considerablemente voluminosas, hacen que las transposiciones que se llevan a cabo en el GGPP puedan realizarse por un lado

---

<sup>91</sup> Yang, Y. W.; Orihara, Y. Biosynthesis of abietane diterpenoids in cultured cells of *Torreya nucifera* var. *radicans*: biosynthetic inequality of the FPP part and the terminal IPP. *Tetrahedron* **2002**, 58, 1265-1270.

único y específico de la molécula ya que limitan la conformación de la molécula en solo una de las dos posibles ilustradas en la Figura 24.<sup>86</sup>



**Figura 24.** Formación del pirofosfato de copalilo a partir del precursor de los diterpenos (GGPP).

Un número importante de terpenos poseen un esqueleto de tipo abietano o un esqueleto derivado del este, el cual es derivado del pirofosfato de (+)-copalilo (Figura 25). La salida del grupo pirofosfato favorece la ciclización y la formación de una insaturación entre las posiciones 15 y 16, que da lugar a la formación del catión sandaracopimarenilo, precursor de los diterpenos con esqueleto de tipo pimarano. Posteriormente, la migración del metilo 17 de la posición 8 a la posición 15 genera un grupo isopropilo del catión abietanilo, que es la especie que da lugar a la formación de diterpenos con esqueleto de tipo abietano y esqueletos transpuestos provenientes de este.<sup>86</sup>

De manera general suelen formarse funciones aromáticas o de tipo *orto* y *para* quinona en el anillo C, estas últimas suelen conferirles color a los compuestos y proveerles una actividad antioxidante.

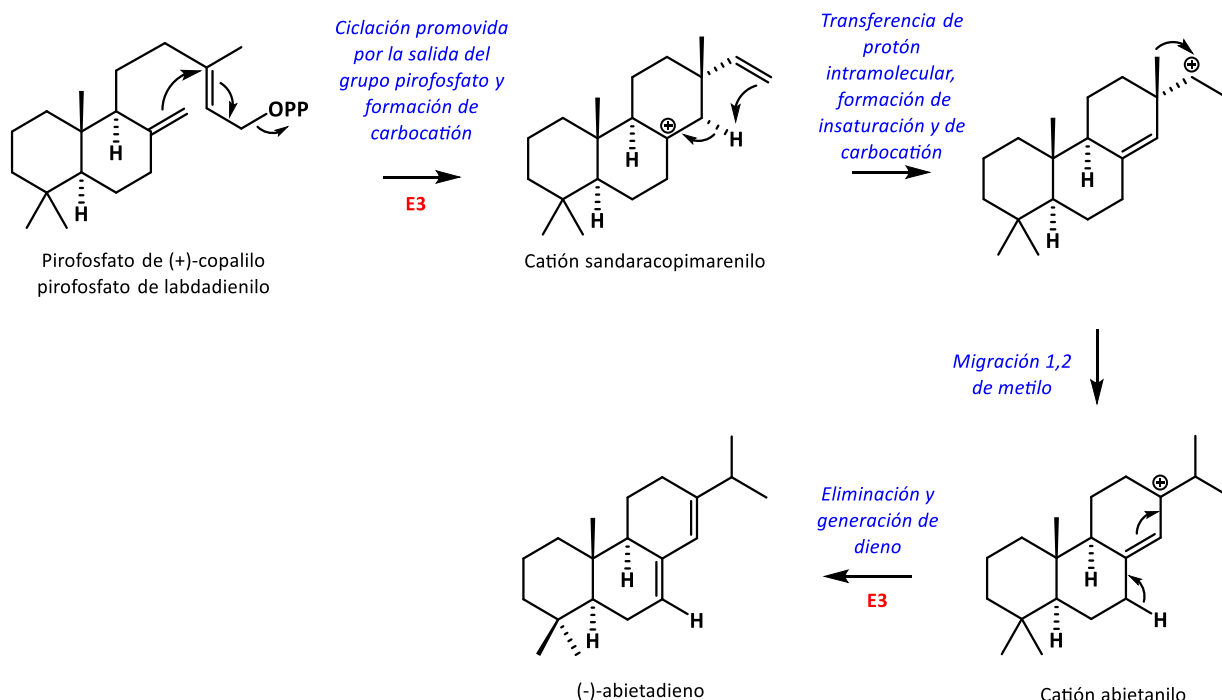


Figura 25. Formación del diterpeno abietano.

A través del pirofosfato de (-)-copalilo se da la formación de los diterpenos de tipo *neo*-clerodano (Figura 26), ya que se da lugar a una serie de transposiciones de Wagner-Meerwein de hidrógenos y metilos que invierten la configuración de las posiciones C5, C10, C9, C8 y resultan en una especie catiónica de dos anillos de nombre catión clerodenilo, que funge como precursor de los terpenoides con esqueleto de tipo *neo*-clerodano y esqueletos transpuestos provenientes de éste. Los llamados *ent*-*neo*-clerodanos presentan la configuración opuesta de los estereocentros del esqueleto de tipo *neo*-clerodano.<sup>86</sup>

Los *neo*-clerodanos presentes en las especies de *Salvia* del subgénero *Calosphace* por lo general presentan una configuración tipo *trans* entre los estereocentros de las posiciones 5 y 10, y una configuración tipo *cis* entre los estereocentros de las posiciones 8 y 9. De manera



frecuente, las posiciones 13, 14, 15 y 16 suelen formar estructuras cíclicas de tipo lactona o furano a partir de la salida del grupo pirofosfato.<sup>92</sup>

Estos compuestos han adquirido una gran importancia económica debido a las interesantes actividades biológicas que presentan. Se han descrito compuestos que afectan el comportamiento alimentario de insectos que son considerados depredadores de plantas de cultivo, también se han investigado actividades insecticida y fitotóxica, lo cual resulta de gran interés en la agroindustria; también, se han encontrado actividades citotóxica, antiinflamatoria, antifúngica, antiparasitaria, antibacteriana, antihiperlipidémica, analgésica, entre otras, que les confieren relevancia en la industria farmacéutica.<sup>93</sup>

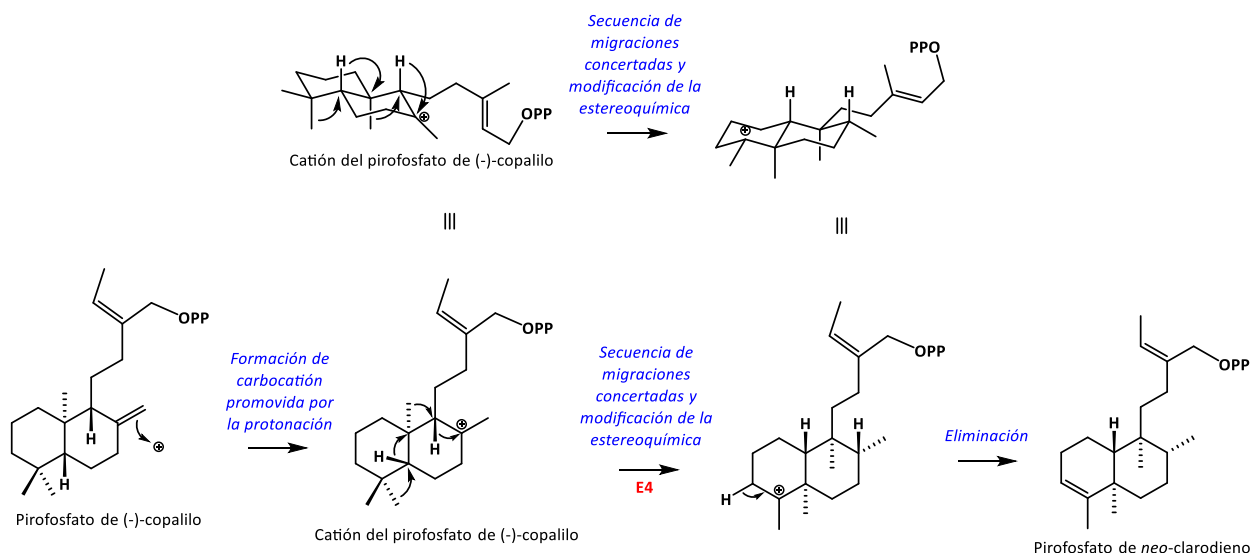
En general, los diterpenos presentan una toxicidad baja para los terpenoides de tipo *neo-clerodano*. Sin embargo, se ha observado una toxicidad considerable en terpenoides con funcionalidad de tipo furano evaluadas en bioensayos con tejido hepático de ratón. El análisis de la toxicidad de un compuesto es de suma importancia antes de considerarlo para la preparación de un producto comercial.<sup>94,93</sup>

---

<sup>92</sup> Tokoroyama, T.; Synthesis of clerodane diterpenoids and related compounds, stereoselective construction of the decalin skeleton with multiple contiguous stereogenic centers. *Synthesis* **2000**, 5, 611-633.

<sup>93</sup> Li, R.; Morris-Natschke, S. L.; Lee, K. H.; Clerodane diterpenes: sources, structures and biological activities. *Nat. Prod. Rep.* 2016, 33, 1166.

<sup>94</sup> Ma, M.; Jiang, Z.; Ruan, J.; Tan, X.; Liu, J.; Wang, C.; Zha, X. M.; Zhang, L. The furano norclerodane diterpenoid disobulbin-D induces apoptosis in normal human liver L-02 cells. *Exp. Toxicol. Pathol.* **2012**, 64(6), 611-618.



**Figura 26.** Formaci3n del diterpeno *neo*-clerodano.

**Tabla 12.** Nombre de las enzimas involucradas en las biosíntesis de diterpenos ilustradas en las figuras 24, 25 y 26.

Enzima	Nombre
E1	(-)-copalil difosfato sintasa o ent-kaurano sintasa A
E2	(+)-copalil difosfato sintasa o abietadieno sintasa (enzima bifuncional)
E3	Abietadieno sintasa (enzima bifuncional)
E4	<i>Neo</i> -clerodieno sintasa

### 2.3.4. Biosíntesis de carotenos

Los llamados tetraterpenos est3n representado por un 3nico tipo de compuestos denominados carotenoides de los cuales se conoce un gran n3mero de estructuras para esta clasificaci3n, estos juegan un papel fundamental en la fotosíntesis, sin embargo, tienen diferentes funciones no fotosint3ticas en bacterias y hongos.<sup>86</sup>

El precursor de los carotenoides es la mol3cula del fitoeno, el cual es producto de la uni3n cola-cola de dos equivalentes de GGPP, para lo cual se requiere la salida del grupo pirofosfato en una de ellas y el ataque nucleofílico del par de electrones presentes en el

doble enlace de las posiciones 2,3 de la otra (Figura 27); la migración de un protón hacia el carbocatión resultante favorece la formación del enlace que genera el anillo de ciclopropano en el pirofosfato de pre-escualeno, en este paso de la biosíntesis sucede una transposición promovida por la salida del grupo pirofosfato, lo cual genera una inversión en los centros quirales de la molécula.<sup>95</sup>

La apertura del anillo de ciclopropano da paso a la formación de la insaturación que genera al fitoeno. El proceso descrito se encuentra regulado por la enzima fitoeno sintasa, la cual en los hongos y plantas da como resultado el isómero *Z* o *cis* del fitoeno, y en las bacterias el isómero *E* o *trans* del fitoeno; la disposición de las insaturaciones en esta molécula imposibilita que sucedan reacciones de ciclación, por lo que en este tipo de compuestos prevalecen las largas cadenas insaturadas.<sup>95</sup>

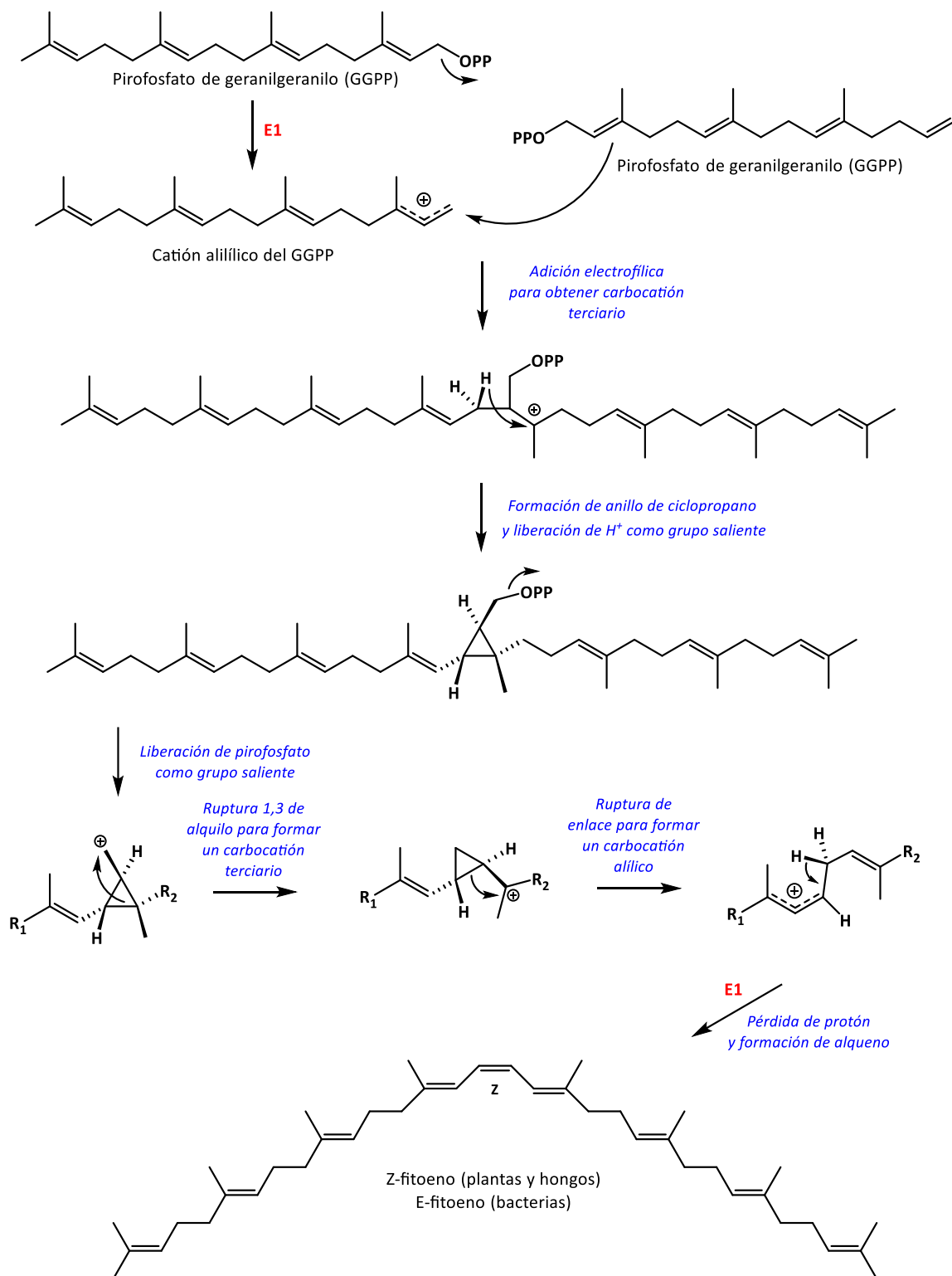
Se extiende la conjugación a través de una secuencia de reacciones de insaturación, en las cuales se desprotona la molécula de fitoeno regulado por enzimas de tipo fitoeno desaturasas, y en el caso de plantas y hongos la inversión de la configuración de *cis* a *trans* a través de caroteno isomerasas para dar pie a la formación del licopeno (Figura 27, Tabla 13), el cual es una estructura base para la formación de un gran número de carotenoides.<sup>95</sup>

La gran extensión en la deslocalización del sistema de electrones tipo  $\pi$  en los carotenoides les confiere una coloración entre el amarillo, el naranja y el rojo intenso, por lo que lleva a cabo la función de pigmentos en los tejidos vegetales, mientras que su precursor el fitoeno es incoloro, debido a que en este no se lleva a cabo la deslocalización de electrones  $\pi$  tan extensa como en los carotenoides.<sup>96</sup>

---

<sup>95</sup> Moise, A. R.; Al-Babili, S.; Wurtzel, E. T. Mechanistic aspects of carotenoid biosynthesis. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 164-193.

<sup>96</sup> Grotewold, E. The genetics and biochemistry of floral pigments. *An. Rev. Plant. Biol.* **2006**, *57*, 761-780.



**Figura 27.** Biosíntesis del fitoeno y diferentes tipos de carotenos.

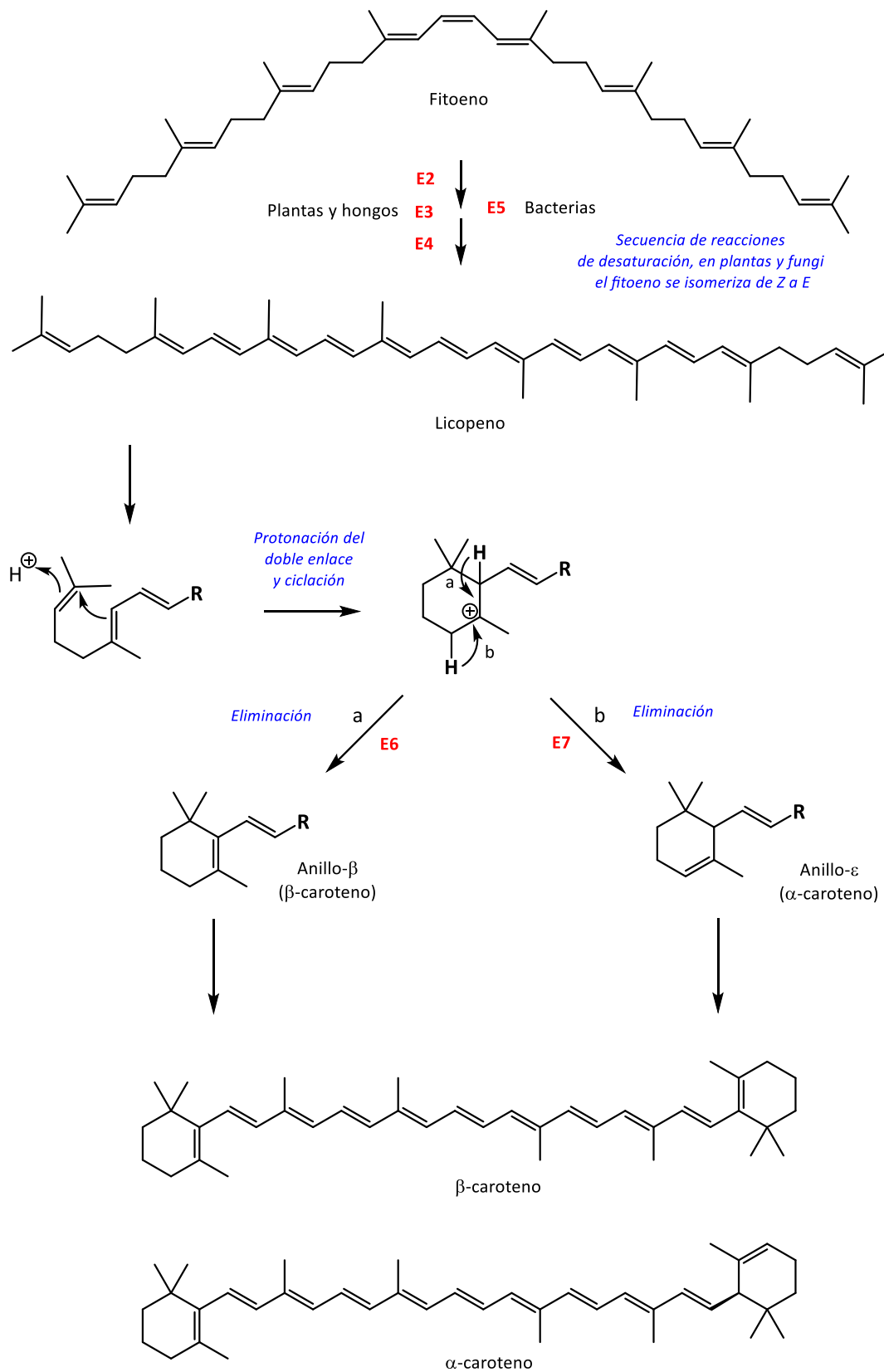


Figura 27. Biosíntesis del fitoeno y diferentes tipos de carotenos (continuación).



**Tabla 13.** Nombre de las enzimas involucradas en la biosíntesis de carotenoides.

Enzima	Nombre
E1	Fitoeno sintasa
E2	Fitoeno desaturasa
E3	$\zeta$ -caroteno desaturasa
E4	Caroteno isomerasa
E5	Fitoeno desaturasa
E6	$\beta$ -ciclasa
E7	$\epsilon$ -ciclasa

### 2.3.5. Meroterpenos

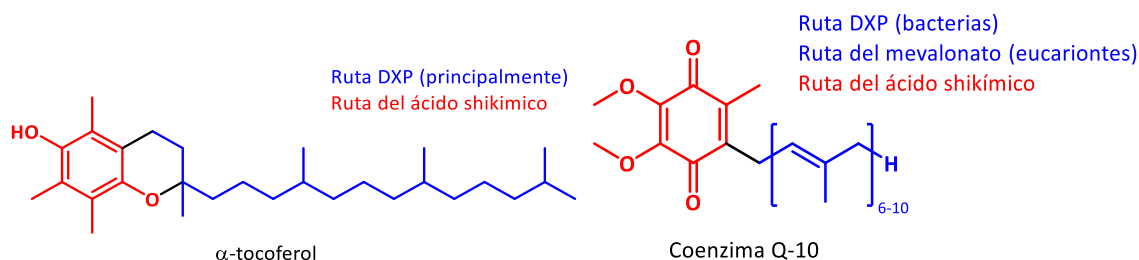
Los meroterpenos son productos naturales compuestos por unidades terpénicas enlazadas a estructuras con esqueletos provenientes de otras rutas biosintéticas, como los compuestos fenólicos, policétidos, alcaloides y azúcares, por mencionar algunos de ellos. Este tipo de compuestos han sido de gran interés, ya que tienen participaciones fundamentales en los procesos metabólicos de los seres vivos.<sup>86</sup>

Los tocoferoles (Figura 28), son compuestos orgánicos liposolubles que forman parte de la llamada vitamina E, los cuales amortiguan el daño de la célula por procesos de estrés oxidativo y ayudan a la asimilación de otras vitaminas como la vitamina K (filoquinona). Su biosíntesis mixta está compuesta por un anillo aromático formado a partir de la ruta del ácido shikímico con aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) como intermediarios, el cual se encuentra enlazado a una molécula de fitol, la cual se biosintetiza a través de la ruta DXP.<sup>97</sup> Las ubiquinonas (Figura 28) son compuestos liposolubles capaces de actuar como amortiguadores del estrés oxidativo y como facilitadores del transporte de electrones, esta última función está estrechamente relacionada con la oxigenación y la respiración celular aeróbica.

Es debido a estas funciones tan importantes que son consideradas como nutrientes esenciales para el ser humano; estos compuestos son biosintetizados a partir de una cadena

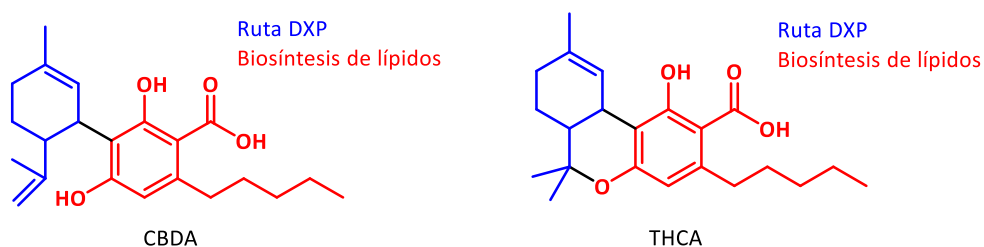
<sup>97</sup> Luschkak, V. I.; Semchuk, N. M. Tocopherol biosynthesis: chemistry, regulation and effects of environmental factors. *Acta Physiol. Plant* **2012**, 34, 1607-1628.

isoprenica, biosintetizada vía DXP en bacterias y MVA en células eucariotas, enlazada a una *para* quinona biosintetizada vía ácido shikímico a través del corismato en el caso de bacterias y de la tirosina en el caso de las células eucariotas.<sup>98</sup>



**Figura 28.** Estructuras del  $\alpha$ -tocoferol y la coenzima Q-10, ejemplos de tocoferoles y ubiquinonas.

Los llamados cannabinoides son compuestos liposolubles de tipo terpeno-fenólico capaces de interactuar con receptores que forman parte del sistema endocannabinoide en el ser humano. Estos compuestos se concentran en los tricomas de las especies *Cannabis sativa*, *Cannabis indica* y *Cannabis ruderalis*, los dos ejemplos más conocidos son los los ácidos canabidiólico CBDA y el  $\Delta$ -9-tetrahidrocannabinólico THCA (Figura 29), que se biosintetizan a través de la condensación (ruta cannabinoide) de una cadena de GPP producida vía DXP con una unidad de ácido olivetólico producida por la misma ruta que los lípidos; un proceso adicional de descarboxilación del ácido carboxílico presente en la función aromática da como resultado la formación de los ya conocidos CBD y THC.<sup>99</sup>

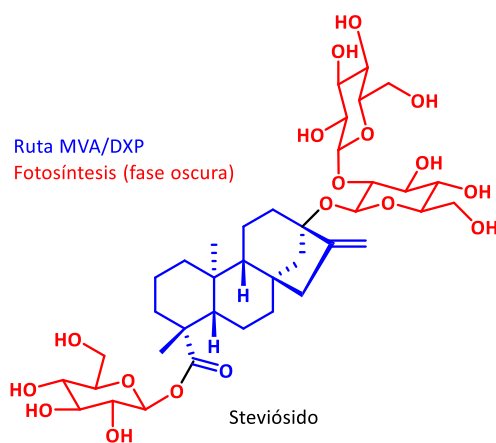


**Figura 29.** Estructuras del CBDA y THCA, ejemplos de cannabinoides.

<sup>98</sup> Meganathan, R. Ubiquinone biosynthesis in microorganisms. *FEMS Microbio. Lett.* **2001**, 203, 131-139.

<sup>99</sup> Degenhardt, F.; Stehle, F.; Kayser, O. The biosynthesis of cannabinoids, Handbook of cannabis and related pathologies. *Academic Press*. Reino Unido. **2017**, 13-23.

Los meroterpenos con unidades de carbohidratos, piranosas o furanosas, se denominan glucósidos. Un ejemplo muy conocido es la stevia (*Stevia rebaudiana*), en la cual se han reportado diterpenos de esqueleto *ent*-kaurano (biosintetizados vía mixta MVA/DXP) enlazados a moléculas de glucosa (biosintetizadas en la fase oscura de la fotosíntesis), lo cual da como resultado glucósidos como el esteviósido (Figura 30) entre otros, los cuales son empleados en gran medida como edulcorantes, con la ventaja de presentar una toxicidad baja. Sin embargo, se han descrito otras actividades biológicas en los glucósidos de la *Stevia* como la citotóxica, antihipertensiva, antihiperlipidémica y antidiarréica.<sup>100</sup>



**Figura 30.** Estructura del esteviósido, aislado de *Stevia rebaudiana*.

La biosíntesis y degradación de las clorofilas forman una parte importante del proceso fotosintético, esta ruta se lleva a cabo a través de enzimas hidrosolubles localizadas en los cloroplastos de las plantas. Las clorofilas fungen como pigmentos y a la par como fotoreceptores para atraer energía de la luz solar para transformar agua y dióxido de carbono en su alimento.<sup>101</sup>

La biosíntesis de la clorofila se lleva a cabo a través de la formación del ácido 5-aminolevulínico, y posteriormente la condensación de 8 equivalentes de esta molécula para dar como producto la protoporfirina XI (Protox), que es un agente hidrofóbico capaz de

<sup>100</sup> Bramachari, G.; Mandal, L. C.; Rajiv, R.; Mondal, S.; Brahmachari, A. K. Stevioside and related compounds-Molecules of farmaceutical promise: A critical overview. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* **2011**, 1, 5-19.

<sup>101</sup> Bollivar, D. W. Recent advances in chlorophyll biosynthesis. *Photosynth. Res.* **2006**. DOI 10.1007/s11120-006-9076-6.



quelatar al catión  $Mg^{2+}$  ya que el aducto entre la molécula y el catión magnesio es necesario para garantizar las subsecuentes reacciones enzimáticas.

En el último paso para la formación de las clorofilas se adiciona una cadena isoprénica a la estructura a través de preniltransferasas, en el caso de la clorofila a (Figura 31) se lleva a cabo la adición de una molécula de fitol (compuesta por 4 unidades reducidas de IPP). Tanto las clorofilas como los carotenos son responsables de captar la luz en el proceso fotosintético, sin embargo, la clorofila es una molécula con tendencia a sufrir reacciones con oxígeno reactivo en procesos que involucran radicales libres, por lo que requiere de la actividad antioxidante de los carotenoides para amortiguar dicho efecto ya que la labor de carotenoides y clorofilas se lleva a cabo en conjunto.<sup>102</sup>

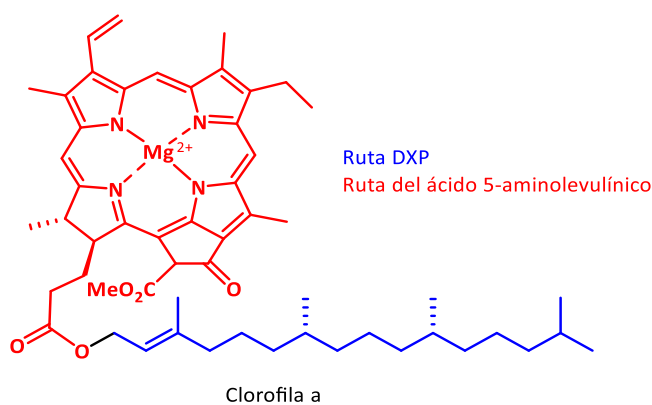


Figura 31. Estructura de la clorofila a, ejemplo de las clorofilas.

## 2.4. Herbicidas

Los herbicidas son productos químicos ya sea sintéticos o de origen natural que impiden el desarrollo de plantas indeseables (malezas) en los cultivos, uno de los herbicidas más destacados es el glifosato (*N*-fosfona metilglicina), el cual inhibe la enzima 5-enolpiruvilshikimato-3-fosfato sintasa como mecanismo de acción, esto le da un amplio espectro de aplicación, sobre todo en los cultivos resistentes (transgénicos) a esta sustancia como la

<sup>102</sup> Eckhardt, U.; Grimm, B.; Hörtensteiner, S. Recent advances in chlorophyll biosynthesis and breakdown in higher plants. *Plant Mol. Bio.* **2004**, 56, 1-14.

soya, el maíz, el algodón, entre otros. La eficiencia del glifosato provocó un importante descenso en la investigación de nuevos agentes herbicidas y a la par se reportaron en este producto comercial posibles efectos tóxicos al ser humano y una progresiva resistencia por parte de las malezas.<sup>103</sup>

No obstante, varios mecanismos de acción de los herbicidas comerciales siguen siendo desconocidos o poco entendidos; sin embargo, se sabe que más del 60% de los compuestos descritos como herbicidas interfieren con la función de los cloroplastos en las plantas parásitas, evitando que realicen sus procesos fotosintéticos. Dentro de este mecanismo se subdivide esta actividad según el “target” específico sobre el que actúa: (1) a partir de la destrucción de pigmentos fotosintéticos y de compuestos relacionados a estos (blanqueadores), (2) alteración de la biosíntesis de aminoácidos, (3) afectación en el metabolismo de lípidos y (4) inhibición del sistema fotosintético del transporte de electrones; sin embargo, existen herbicidas que presentan mecanismos de acción diferentes a éstos pero son comercialmente de uso más limitado.<sup>104</sup>

#### 2.4.1. Malezas en México

Se considera maleza a plantas que crecen en sitios donde no son deseadas, como cultivos agrícolas o jardines (aunque en ocasiones pueden llegar a tener un valor económico como la avena o el amaranto); las malezas suelen crecer de manera natural adaptándose a su medio y desarrollando mecanismos para poder extenderse, esto provoca la inhibición del desarrollo de otras especies, dentro de las problemáticas que generan pueden restringir la luz a otras plantas, entrar en competencia por los nutrientes del suelo, pueden contener y esparcir patógenos o pueden producir compuestos químicos de elevada toxicidad.<sup>103</sup>

---

<sup>103</sup> Duke, S. O. Why have no herbicides mode of action appeared in recent years? *Pest Manage. Sci.* **2012**, 68, 505-512.

<sup>104</sup> Wakabayashi, K.; Böger, P. Target sites for herbicides: entering the 21<sup>st</sup> century. *Pest Manage. Sci.* **2002**, 58, 1149-1154.

Aproximadamente 13% de la flora de México (3000 especies de 23000) se considera como maleza, la cual se encuentra distribuida en forma diferencial y solo pocas especies se distribuyen a través de todo el territorio mexicano. Son un problema importante debido a las pérdidas económicas que ha sufrido el sector agrícola en los últimos 50 años, ya que el comportamiento adaptativo de estas especies hacia los herbicidas comerciales las vuelve prácticamente poco viables para frenar su propagación y crecimiento, lo que resulta contraproducente para el cultivo de especies comerciales.<sup>105</sup>

Las malezas que crecen en México suelen catalogarse según el tipo de ecosistema en el que se desarrollan, las especies de distribución en casi todo el territorio mexicano pertenecen a las familias Asteraceae, Poaceae (pastos, ej. zacate), Mimosaceae (ej. el huizache y el mezquite), Caesalpiniaceae (ej. retamas y tabachines) y Fabaceae (ej. trébol, alfalfa), las que crecen en las regiones templadas del país pertenecen a las familias Brassicaceae, Amaranthaceae (ej. amaranto), Caryophyllaceae, Malvaceae y Lamiaceae, y las que crecen en las regiones tropicales del país pertenecen a las familias Convolvulaceae (enredaderas), Euphorbiaceae (lianas y especies ricas en látex), Solanaceae (bayas) y Cyperaceae.<sup>106,107</sup>

#### 2.4.2. Herbicidas blanqueadores e inhibidores de la DXP

Dentro de la clasificación de herbicidas inhibidores de la actividad de los cloroplastos, los herbicidas blanqueadores son aquellos que cumplen con la función de destrucción de pigmentos fotosintéticos como las clorofilas y los carotenoides, para obtener un blanqueamiento en la maleza como resultado de su aplicación.<sup>104</sup>

---

<sup>105</sup> Malezas de México. [http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/2inicio/\\_home-malezas-mexico.htm](http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/2inicio/_home-malezas-mexico.htm) (consultado en agosto del 2023).

<sup>106</sup> Villaseñor-Ríos, J. L.; Espinosa-García, F. J. Catálogo de malezas de México. *Consejo Nacional Consultivo fitosanitario, Fondo de cultura económica* 1998. México (CDMX).

<sup>107</sup> Calderón de Rzedowski, G.; Rzedowski, J. Manual de malezas de la región de Salvatierra. Flora del Bajío y regiones adyacentes. *Instituto de ecología* 2004. Centro regional del Bajío, Pátzcuaro, Michoacán, México.

La mayoría de los herbicidas que inhiben la biosíntesis de clorofila causan la formación de hidrocarburos de cadena corta, lo que resulta en la destrucción de pigmentos fotosintéticos. Estos herbicidas se conocen particularmente como herbicidas peroxidantes, sin embargo, su mecanismo de acción es complejo y aún se desconocen algunos aspectos de éste. La acción principal con la inhibición de la clorofila es la inhibición de la enzima Protoporfirinógeno-IX oxidasa, lo cual conduce a una saturación del tetrapirrol protoporfirina XI sensible a la luz, formando especies radicalarias de oxígeno las cuales destruyen las membranas y constituyentes celulares para generar hidrocarburos de cadena corta, provenientes principalmente de los ácidos grasos. Los pigmentos fotosintéticos son destruidos mediante la radiación de luz generando un proceso de blanqueamiento. A pesar de la efectividad de este mecanismo, estos herbicidas son de uso poco frecuente.<sup>108</sup>

Los herbicidas blanqueadores que inhiben la biosíntesis de carotenoides son de un menor rango de uso habiendo solo unos pocos. Su mecanismo de acción consiste en impedir la formación de insaturaciones en el fitoeno mediante inhibición de la fitoeno desaturasa, la cual impide la formación del licopeno y el resto de los carotenoides responsables de pigmentar a las plantas, en su lugar se concentra el contenido de fitoeno el cual es incoloro, esto se traduce en un proceso de blanqueamiento; debido a que las bacterias emplean carotenoides para funciones distintas pero vitales, los compuestos inhibidores de carotenoides también pueden ser perfilados como antibacterianos.<sup>109</sup>

Los herbicidas que inhiben la biosíntesis de terpenoides en las plantas son muy efectivos debido a que evitan la producción de componentes muy importantes para su crecimiento (hormonas), la mayoría de estos herbicidas inhiben las principales enzimas reguladoras de ambas rutas, la HMG-CoA reductasa en el caso de la ruta del mevalonato y las enzimas DXS y DXR en el caso de la ruta DXP. Los inhibidores de la ruta del mevalonato pueden llegar a ser de elevada toxicidad para los seres humanos y para los animales de ganado ya que

---

<sup>108</sup> Böger, P.; Wakabayashi, K. Peroxidizing Herbicides. *Springer*. 1999. Alemania.

<sup>109</sup> Sandmann, G.; Böger, P. Inhibition of carotenoid biosynthesis by herbicides, in Target sites of herbicide action. *CRC Press*. 1989. Boca Ratón, FL, Estados Unidos.

mediante esta ruta se biosintetizan compuestos importantes como el colesterol, el cual es uno de los principales constituyentes de la membrana celular.<sup>110</sup>

Por lo mencionado anteriormente, los inhibidores de la ruta DXP son una mejor alternativa, ya que, con su manejo adecuado, puede solucionarse el problema de toxicidad para el ser humano, al inhibirse esta ruta podrían verse diversos efectos en las malezas, ya sea impidiendo su germinación debido a la ausencia de hormonas de tipo terpénicas o un efecto similar al de los herbicidas blanqueadores debido al impedimento de la biosíntesis de carotenoides.<sup>111</sup>

#### **2.4.3. *Lemna gibba* como material de evaluación en bioensayos de actividad fitotóxica**

Las macrófitas son especies vegetales adaptadas a medios acuáticos los cuales suelen proliferar en áreas boscosas, humedales de pradera y pantanos, estas especies suelen generar hábitats críticos para otras especies. Las lentejas de agua (*Lemna*) son una especie macrófita que ha sido utilizada como organismo de bioensayo para la evaluación de la fitotoxicidad desde la década de 1930. Estas especies pueden ser empleadas como modelos de estudio para identificar los efectos de los herbicidas que inhiben la biosíntesis de compuestos fenólicos.<sup>112</sup>

Las lemnas no sólo interactúan con herbicidas, también son capaces de interactuar con surfactantes y metales pesados presentes en los cuerpos acuáticos en donde proliferan, esta característica resulta de utilidad para emplearlas como objeto de estudio para evaluar el

---

<sup>110</sup> Lichtenthaler, H. K.; Zeidler, J.; Schwender, J.; Müller, C. The non-mevalonate isoprenoid biosynthesis of plants as a test system for new herbicides and drugs against pathogenic bacteria and the malaria parasite. *Z. Naturforsch.* **2000**, 55, 305-313.

<sup>111</sup> Zeidler, J.; Schwender, J.; Müller, C.; Wiesner, J.; Weidemeyer, C.; Beck, E.; Jomaa, H.; Lichtenthaler, H. K. Inhibition of the non-mevalonate (DXP) pathway of plant isoprenoid biosynthesis by fosmidomycin. *Z. Naturforsch.* **1998**, 53, 980-986.

<sup>112</sup> Lockhart, W. L.; Billeck, B. N.; Baron, C. L.; Bioassays with a floating aquatic plant (*Lemna minor*) for effects of sprayed and dissolved glyphosate. *Hydrobiologia* **1989**, 188/189, 353-359.

nivel de contaminación del cuerpo de agua en donde proliferan, principalmente la contaminación por rocío de herbicidas en grandes áreas de cultivo.<sup>113</sup>

El crecimiento excesivo de lemnas puede provocar un desbalance en los hábitats acuáticos afectando el desarrollo de otras especies, provocando diversos problemas, como la disminución de luz, la escasez de nutrientes, la disminución de oxígeno en el agua y el aumento de fósforo y nitrógeno provocando sobrepoblación de algas.<sup>114</sup>

Las dos especies de *Lemna* que se utilizan en bioensayos con mayor frecuencia son *L. minor* y *L. gibba* para las cuales se ha observado una inhibición de su crecimiento al emplear glifosato y otros tipos de herbicidas ya sea disolviéndolos en su medio de cultivo o atomizándolos en sus partes aéreas.<sup>112</sup>

*Lemna gibba* (Figura 32) es una planta angiosperma monocotiledónea de tamaño muy reducido (2-4 mm) en la cual no es posible diferenciar el tallo y las hojas, al igual que todas las lemnas, presenta una raíz que se encuentra sumergida en el agua mientras que su cuerpo vegetativo se mantiene flotando en la superficie. Esta especie en particular se caracteriza por presentar frondas muy ovadas y un abultamiento (gibba) en la parte inferior de su cuerpo vegetativo, su forma de reproducción más habitual es la asexual y es una especie distribuida a lo largo de muchos países.<sup>115</sup>



Figura 32. *Lemna gibba*.

<sup>113</sup> Nasu, Y.; Kugimoto, M. *Lemna* (duckweed) as an indicator of water pollution, the sensitivity of *Lemna paucicostata* to heavy metals. *Arch. Envir. Contam. Toxicol.* **1981**, 10, 159-169.

<sup>114</sup> Andrade, C. E.; Morales, N. M.; Vera, A. L.; Jonte, L.; Briceño, B.; Rosales, N. L.; Morales, E. D. Comparative assessment of *Lemna obscura* growth with organic and inorganic nitrogen sources as a function of pH. *Rev. Tec. Ing. Univ. Zulia* **2013**, 36(2), 143-152.

<sup>115</sup> Villaseñor, J. L. Checklist of the native vascular plants of México. *Rev. Mex. Biodivers.* **2016**, 87, 559-902.

#### 2.4.4 Fitotoxicidad de las salvias

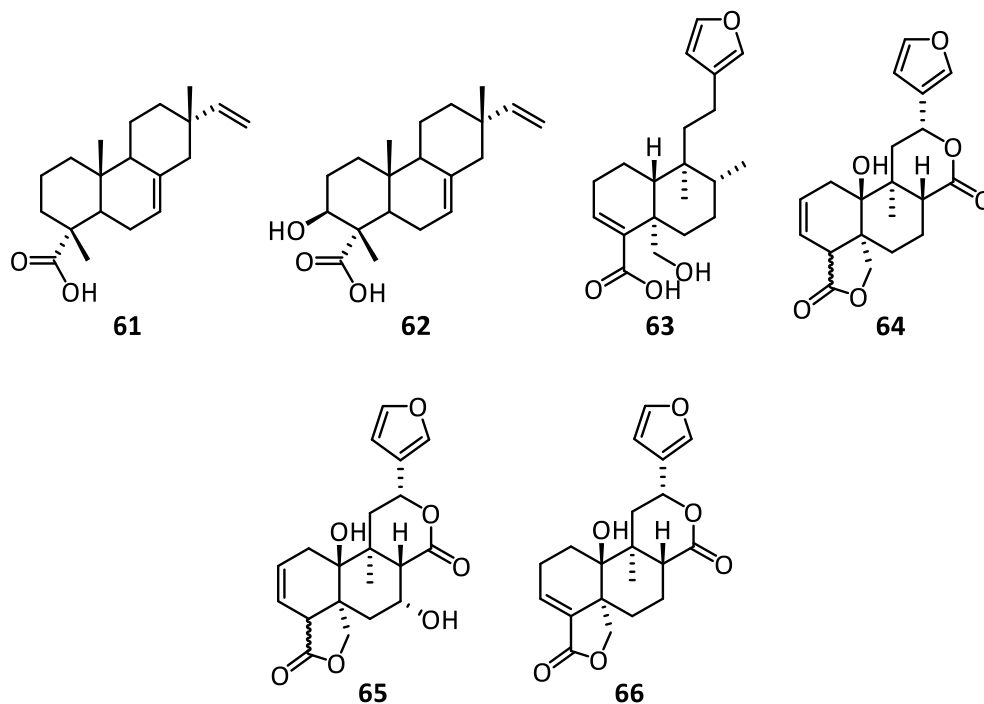
Hay estudios donde se evalúa la fitotoxicidad tanto de extractos crudos de especies de *Salvia*, como de metabolitos aislados de éstas, empleando semillas monocotiledóneas y dicotiledóneas de especies que se consideran como maleza y material de prueba en bioensayos.<sup>116</sup>

Se realizó un estudio donde se evalúan extractos de diclorometano de diferentes especies de *Salvia* frente al crecimiento de la raíz de la semilla dicotiledónea *Papaver rhoeas* (amapola) y la semilla monocotiledónea *Avena sativa* (avena); las especies evaluadas fueron *S. fallax*, *S. disermas*, *S. chamaedryoides*, *S. confertiflora*, *S. x jamensis*, *S. buchananii*, *S. wagneriana*, *S. scabra*, *S. miniata*, *S. cacaliaefolia*, *S. adenophora* y *S. rutilans* siendo el control negativo la concentración cero (agua destilada); los resultados de este estudio mostraron una baja actividad inhibitoria en comparación con el control para *Salvia disermas* y *Salvia scabra*, mientras que se describió una elevada actividad fitotóxica en comparación con el control para *Salvia x jamensis* inhibiendo la germinación de *P. rhoeas* y de *Salvia buchananii* inhibiendo la germinación de *A. sativa*. El resto de las especies de estudio mostraron una actividad inhibitoria de mediana a alta en comparación con el control, además se observó en la mayoría de las especies (con excepción de las especies con baja actividad) una importante disminución en la concentración de clorofila en las plántulas de las semillas germinadas. En este estudio no se atribuyó la actividad fitotóxica a ningún metabolito en particular presente en las especies en estudio.<sup>20</sup>

Se realizó el estudio químico de *S. x jamensis* en búsqueda de metabolitos secundarios con actividad inhibitoria de la germinación de *P. rhoeas* y *A. sativa*, como resultado se obtuvieron seis compuestos (**61-66**) con actividad fitotóxica elevada en comparación con el control negativo (concentración cero) frente a los tipos de semillas de estudio.<sup>117</sup>

<sup>116</sup> Jassbi, A. R.; Zare, S.; Firuzi, O.; Xiao, J. Bioactive phytochemicals from shoots and roots of *Salvia* species. *Pytochem. Rev.* **2016**, 15, 829-867.

<sup>117</sup> Bisio, A.; Fraternali, D.; Russo, E.; Damonte, G.; Millo, E.; Lanteri, A. P.; Romussi, G.; Parodi, B.; Ricci, D.; De Tommasi, N. Phytotoxic activity of *Salvia x jamensis*. *NPC Nat. Prod. Commun.* **2009**, 4(12), 1621-1630.



**Figura 33.** Diterpenos fitotóxicos aislados de *S. x jamensis* **61**) ácido isopimárico, **62**) ácido 3 $\beta$ -hidroxi-isopimárico, **63**) ácido hautriwáico, **64**) 7,8 $\beta$ -dihidrosalviacoccina, **65**) 15,16-epoxi-7 $\alpha$ ,10- dihidroxiclerodan-2,13(16),14-trien-17,12;18,19-diólida, **66**) 15,16-epoxi-10 $\beta$ -hidroxi-clerodan-3,13(16),14-trien-17,12;18,19-diólida.

También, se realizó el estudio químico de *S. miniata* para evaluar la actividad inhibitoria de los metabolitos aislados frente a *P. rhoeas* y *A. sativa*, como resultado se obtuvieron tres diterpenos (**70-72**) con una actividad fitotóxica elevada en comparación con el control negativo (concentración cero) para *A. sativa*, dos diterpenos (**68** y **69**) con una actividad fitotóxica elevada en comparación con el control negativo (concentración cero) para *P. rhoeas* y un diterpeno (**67**) con una actividad fitotóxica elevada en comparación con el control negativo (concentración cero) para ambos tipos de semillas.<sup>118</sup>

<sup>118</sup> Bisio, A.; Damonte, G.; Fraternali, D.; Giacomelli, E.; Salis, A.; Romussi, G.; Cafaggi, S.; Ricci, D.; De Tommasi, N. Phytotoxic clerodane diterpenes from *Salvia miniata* Fernald (Lamiaceae). *Phytochemistry* **2011**, 72(2-3), 265-275.



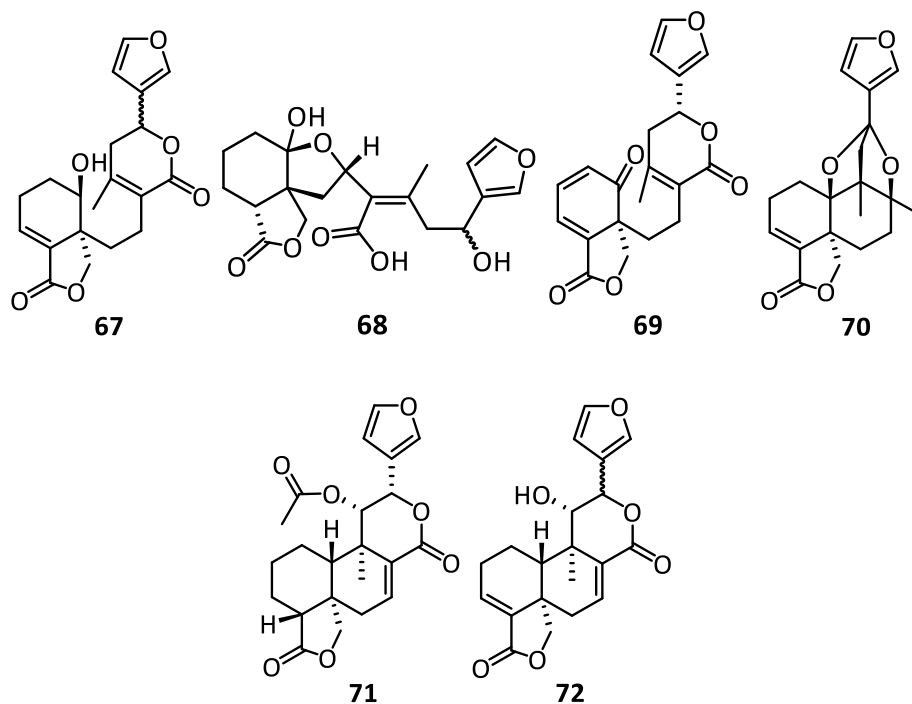
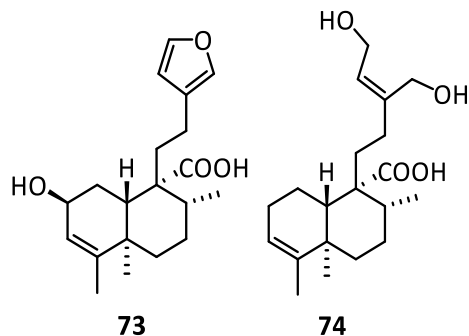


Figura 34. Diterpenos fitotóxicos (sin nombrar) aislados de *S. miniata*.

Se han obtenido *neo*-clerodanos de plantas pertenecientes a otros géneros, las cuales presentan una actividad fitotóxica equiparable al de herbicidas comerciales, tal es el caso de *Blakiella bartsiiifolia* (Asteraceae) de la cual se aislaron los diterpenos (**73** y **74**) los cuales inhibieron la germinación y crecimiento de las semillas de *Allium cepa* (cebolla) y *Lactuca sativa* (lechuga) de forma equiparable a la del herbicida comercial Linuron®.<sup>119</sup>

<sup>119</sup> Rodríguez-Hernández, D.; Oliveros-Bastidas, A.; Alonso-Amelot, M. E.; Calcagno-pissarelli, M. P. Diterpene Foliar exudates of *Bakelia bartsiiifolia* and phytotoxicity of clerodanes. *NPC Nat. Prod. Commun.* **2014**, 9(10), 1407-1412.



**Figura 35.** Diterpenos con elevada actividad fitotóxica aislados de *B. bartsifolia*. **73)** ácido 15,16-epoxi-2 $\beta$ -hidroxi-clerodan-3,13(16),14-trien-20-oico (ácido bartsiifólico), **74)** ácido Z-15,16-dihidroxi-3,13-clerodien-20-oico (ácido barthdrólico).

### 3. Justificación

El género *Salvia* es el más grande de la familia Lamiaceae y se encuentra muy presente en México, su éxito evolutivo en el país y en el mundo se debe a los mecanismos de defensa que han desarrollado en contra de sus depredadores naturales y las plantas que son competitivas en su hábitat, inhibiendo el crecimiento y/o germinación de otras especies; la base química de estos mecanismos de defensa son los metabolitos secundarios que biosintetizan, esto hace a las especies mexicanas del género *Salvia* un excelente objeto de estudio para el aislamiento de compuestos con propiedades insecticidas, alelopáticas, antifúngicas y herbicidas, los cuales pueden ser de gran utilidad en la agricultura.

En la actualidad hay una necesidad inminente en cuanto a productos agroquímicos, principalmente herbicidas, con un mecanismo de acción novedoso en los que interactúen con “targets” diferentes a los involucrados en los mecanismos de principios activos más antiguos. En este aspecto, los productos naturales son candidatos aptos para la búsqueda de nuevos agentes herbicidas debido a que presentan características idóneas:

- Presentan arreglos moleculares novedosos.
- Pueden actuar en nuevos sitios de acción a nivel molecular.

- c) En general son más amigables con el medio ambiente.
- d) Los avances en la instrumentación analítica hacen más fácil su identificación y menores los requerimientos en cuanto a cantidad de muestras para su elucidación.
- e) Pueden ser mejor aceptados públicamente debido a su procedencia.
- f) Su registro ante las instancias gubernamentales puede ser más económico.

Considerando lo anterior, en este proyecto se propone el estudio de *Salvia thymoides* Benth, para la cual se ha observado un potencial efecto de inhibición de la germinación de otras plantas ya que se ha observado que es una especie dominante en su hábitat (Puebla, Oaxaca y Chiapas), lo que sugiere que biosintetiza productos naturales inhibidores de la germinación, lo cual puede extrapolarse a un efecto herbicida.

#### 4. Objetivos

Realizar el estudio químico de las partes aéreas de *Salvia thymoides* Benth (secc. *Flocculosae*), mediante el cumplimiento de los siguientes objetivos particulares:

- Establecer el perfil químico de una muestra de *S. thymoides* colectada en el municipio de Tehuacán y realizar una comparación con respecto al perfil de otras poblaciones empleadas en estudios previos.
- Analizar la actividad herbicida (inhibitoria) de los compuestos aislados de *S. thymoides*.
- Contribuir al estudio químico de las especies del género *Salvia* que crecen en México.

Para cumplir con dichos objetivos, se llevará a cabo el aislamiento y la elucidación estructural de los metabolitos secundarios de la especie de estudio. Se trabajará con el extracto crudo de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  de la planta realizando el aislamiento mediante las técnicas cromatográficas que sean necesarias. La elucidación estructural de los metabolitos aislados

se realizará empleando diferentes técnicas espectroscópicas, principalmente la resonancia magnética nuclear (RMN).

De los compuestos aislados e identificados se llevarán a cabo ensayos biológicos que permitan evaluar su actividad fitotóxica.

## 5. Metodología

Para el aislamiento de los metabolitos secundarios se realizaron separaciones mediante cromatografía en columna abierta (CC) en gel de sílice de malla 230-400 y Sephadex LH-20, cromatográfica en capa delgada preparativa (CCDp) empleando placas Macherey-Nagel Sil G/UV254 de 20 x 20 cm y de 0.5 y 1 mm de espesor. El monitoreo del progreso de las separaciones cromatográficas se realizó mediante cromatografía en capa delgada analítica (CCDa) utilizando cromatofolios de 0.20 mm de espesor con indicador de fluorescencia adquiridas de Macherey-Nagel. La visualización de las placas se llevó a cabo con una lámpara de luz UV Spectroline modelo ENF-240C a dos longitudes de onda (254 y 365 nm) y utilizando solución de sulfato cérico como revelador.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos. Los espectros de infrarrojo se obtuvieron en un espectrómetro Bruker Tensor 27; los espectros de UV se registraron en un espectrómetro UV-Visible Shimadzu; las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro Perkin-Elmer 323. Los experimentos de RMN 1D y 2D se realizaron en espectrómetros Bruker Avance III a 400 MHz para  $^1\text{H}$  y 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ , HD Bruker Avance III a 500 MHz para  $^1\text{H}$  y 125 MHz para  $^{13}\text{C}$  y HD Bruker Avance III a 700 MHz para  $^1\text{H}$  y 175 MHz para  $^{13}\text{C}$ . Los desplazamientos químicos ( $\delta$ , en ppm) están referenciados con la señal del disolvente residual,  $\text{CDCl}_3$  ( $\delta_{\text{H}} = 7.26$ ,  $\delta_{\text{C}} = 77.16$ ) y  $\text{CD}_3\text{OD}$  ( $\delta_{\text{H}} = 4.87$ , 3.31 (5),  $\delta_{\text{C}} = 49.1$ ) y las constantes de acoplamiento ( $J$ ) están dadas en Hz, los experimentos de RMN se procesaron en el programa MestReNova versión 12.0. La espectrometría de masas

de alta resolución por la técnica DART se realizó en un espectrómetro de masas Jeol The AccuTOF JMS-T100LC.

### 5.1. Material vegetal

La especie de estudio se recolectó en el municipio de Tehuacán, Puebla (México) en septiembre del 2021.

### 5.2. Extracción y aislamiento

El material fue secado en la sombra a temperatura ambiente, posteriormente se separaron hojas y tallos. Se realizó la extracción de los componentes superficiales de las hojas (1.2 kg) colocándolas en contacto con diclorometano durante 20 segundos (4 L), la disolución resultante fue concentrada en rotavapor hasta obtener un extracto crudo seco (80 g). El extracto crudo fue sometido a cromatografía en columna sobre sílica gel 230-400 empleando un gradiente de elución de hexano:acetona (100:0 – 0:100) hasta obtener 64 fracciones de 500 mL cada una que posteriormente fueron reunidas en 29 fracciones primarias (A-S).

El compuesto **1** (754.2 mg) cristalizó en las fracciones 31 y 32, el compuesto **2** (688.9 mg) cristalizó en las fracciones 34, 35 y 36, el compuesto **3** (591.1 mg) precipitó en las fracciones reunidas y renombradas como O, P y Q, para poder realizar la elucidación estructural de **3** se realizó la acetilación de sus posiciones hidroxiladas colocando 10 mg del compuesto en anhídrido acético y piridina (1:1) cuanto baste para disolver y manteniendo una agitación constante por 12 horas, posteriormente el producto resultante fue tratado con una columna abierta de sílica gel empleando acetato de etilo:hexano (1:1) como eluyente para purificar y remover el exceso de piridina; el producto de acetilación fue analizado espectroscópicamente de forma comparativa con el compuesto **3**.

Se reunieron las fracciones M, N y Ñ y se purificaron por CC sobre sílica gel con diclorometano:acetona (9:1) como fase móvil, para obtener 65 fracciones de 125 mL. Se prestó particular atención a las fracciones (9-12) y a las fracciones (35-40); de la fracción (9-12) se realizó una columna de gel de sílice 230-400 empleando el sistema hexano:acetona (100:0 – 0:100) colectando fracciones de 20 mL, de esta se obtuvieron 40 fracciones reunidas en nueve fracciones primarias (A-I), de la fracción B se obtuvo el compuesto **8** (9.9 mg), de la fracción D se obtuvo el compuesto **9** (7.6 mg) y de la fracción G se obtuvo el compuesto **4** (20.3 mg).

La fracción (35-40) se sometió a una columna de Sephadex LH-20 eluída con metanol, de la cual se obtuvieron 38 fracciones de 10 mL que posteriormente fueron reunidas en 8 fracciones primarias (A-H). La fracción D fue sometida a una reacción con diazometano empleando N-nitroso-N-metilurea agregado a un embudo de separación con una solución bifásica compuesta por éter etílico y una disolución acuosa de hidróxido de potasio 40% m/V, la reacción genera el agente metilante (diazometano) disuelto en la fase orgánica el cual fue agregado a la fracción objetivo, todo el procedimiento fue llevado a cabo a una temperatura por debajo de los 0°C.

Se realizó la metilación empleando diazometano con el propósito de mejorar su separación cromatográfica, por consiguiente, se sometió al producto de reacción a una columna abierta de gel de sílice 230-400 empleando el sistema hexano:acetona (3:1) de la que se obtuvieron 46 fracciones de 20 mL las cuales fueron reunidas en 13 fracciones primarias (A-M), de la fracción K se obtuvo el compuesto **5** (8.7 mg), mientras que la fracción F se trabajó con una placa preparativa de 0.5 mm de sílica gel empleando el sistema de elución hexano:acetona:metanol (6:3.5:0.5), de la cual se pudieron obtener los compuestos **6** (45.3 mg) y **7** (13.8 mg).

Los triterpenos **12** y **13** se obtuvieron por filtración en la fracción G de la columna realizada al extracto y las flavonas **10** y **11** se obtuvieron al realizar una placa preparativa de sílica gel de 1 mm a la fracción J, empleando el sistema de elución DCM:Acetona (95:5).

### 5.3. Determinación de la configuración absoluta

Un cristal del ácido (-)-*cis*-clerodan-1,3,13-trien-15,18-diólico-15,16-ólida (**1**) se colocó en una fibra de vidrio para la colección de los datos usando radiación de Cu K $\alpha$  ( $\lambda = 1.54178 \text{ \AA}$ ) a 100(2) K en el modo barrido  $\omega/2\theta$ . Se utilizó un cristal blanco con dimensiones de 0.561 x 0.489 x 0.288 mm, C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>O<sub>4</sub>, M = 330.41, que cristalizó en un sistema ortorrómbico, con un grupo espacial P2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>, a = 7.7144(2) Å, b = 13.6308(3) Å, c = 16.5762(4) Å, V = 1743.04(7) Å<sup>3</sup>, Z = 4,  $\rho = 1.259 \text{ mg/mm}^3$ ,  $\mu = 0.696 \text{ mm}^{-1}$ , se colectaron 23452 reflexiones totales y 3269 (Rint = 0.0497) independientes.

Un cristal del ácido 5,10-*seco*-clerodan-1,3,5,13-tetraen-15,16-ólida-18-óico (**2**) se colocó en una fibra de vidrio para la colección de los datos usando radiación de Cu K $\alpha$  ( $\lambda = 1.54178 \text{ \AA}$ ) a 100(2) K en el modo barrido  $\omega/2\theta$ . Se utilizó un cristal blanco con dimensiones de 0.517 x 0.247 x 0.151 mm, C<sub>20</sub>H<sub>26</sub>O<sub>4</sub>, M = 330.41, que cristalizó en un sistema tetragonal, con un grupo espacial P4<sub>2</sub>, a = 36.7436(7) Å, b = 36.7436(7) Å, c = 5.97850(10) Å, V = 8071.5(3) Å<sup>3</sup>, Z = 16,  $\rho = 1.088 \text{ mg/mm}^3$ ,  $\mu = 0.601 \text{ mm}^{-1}$ , se colectaron 64402 reflexiones totales y 13499 (Rint = 0.0538) independientes. Cada estructura fue resuelta por métodos directos, usando el programa cristalográfico SHELXS-97 incluido en el software del paquete WinGX v1.70.01. El software lex2 v1.1.5 permitió calcular el índice de Flack.

### 5.4. Evaluación de la actividad herbicida

El potencial fitotóxico de los compuestos mayoritarios aislados de *S. thymoides* (**1**, **2**, **3**, **6** y **10**) se evaluó utilizando semillas de cuatro plantas, las cuales se consideran como malezas, *Amaranthus hypochondriacus* (amaranto), *Medicago sativa* (alfalfa), *Panicum miliaceum* (mijo) y *Trifolium pratense* (trébol).<sup>105</sup> Para la realización de este bioensayo se utilizaron cajas de Petri de 5 cm de diámetro en las que se adicionaron papel filtro y 1 mL de disolución metanólica de los compuestos evaluados, el experimento se realiza e un intervalo de al menos 5 concentraciones significativas estableciendo como límite 200 ppm, posteriormente

en el papel filtro totalmente libre de metanol y con 1 mL de agua destilada, se colocaron 20 semillas por caja para cada una de las plantas de prueba; se empleó agua destilada como control negativo y el herbicida comercial Treflan® (trifluralina) a 200 ppm como control positivo. Cada experimento se realizó por cuadruplicado, las semillas de *A. hypochondriacus* se incubaron por 24 horas y las demás por 48 horas, todas a una temperatura de 27 °C en completa oscuridad. Una vez transcurrido el periodo de incubación, se contabilizaron las semillas no germinadas y se midió la longitud de las raíces. Los resultados de germinación y crecimiento de la raíz se analizaron mediante ANOVA de una vía y una prueba de Tukey HSD (GraphPad Prism versión 6.01).

Se realizó un segundo bioensayo empleando la especie acuática *Lemna gibba* mediante un protocolo similar al descrito por Lockhart, Billeck y Baron en 1989,<sup>112</sup> en el cual se cultiva la especie en matraces Erlenmeyer de 250 mL (12 frondas en total) en aproximadamente 150 mL de un medio de cultivo preparado con agua destilada y sales minerales (sulfato de zinc heptahidratado, fosfato de potasio, sulfato de cobre (II) pentahidratado, nitrato de calcio tetrahidratado, carbonato de sodio, ácido etilendiamintetraacético, cloruro de cobalto (III) hexahidratado y cloruro de hierro (III) hexahidratado) a pH entre 6.5 y 7, temperatura constante (25°C) se adiciona el compuesto a evaluar en concentraciones conocidas en unidades de ppm (cinco concentraciones significativas siendo el máximo 200 ppm para este caso) para evaluar si hay un proceso de blanqueamiento y/o de debilitación mediante método gravimétrico, el experimento se realiza por cuadruplicado empleando medio de cultivo como blanco negativo y acetona como blanco positivo.

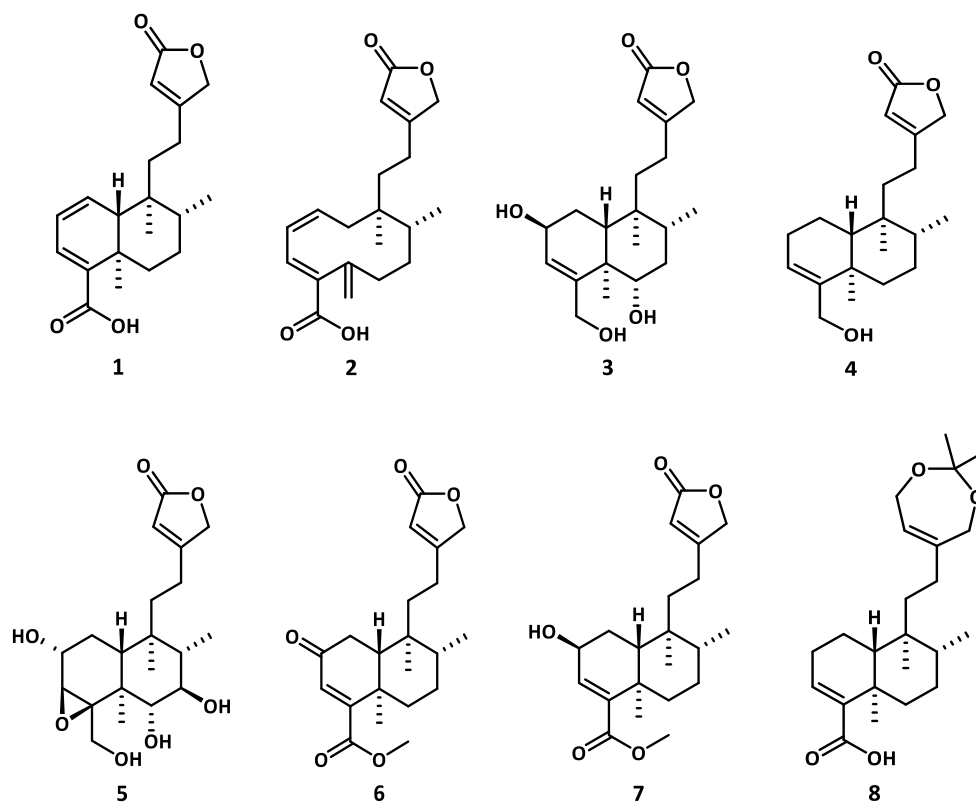
## 6. Discusión de resultados

### 6.1. Compuestos aislados de *Salvia thymoides*

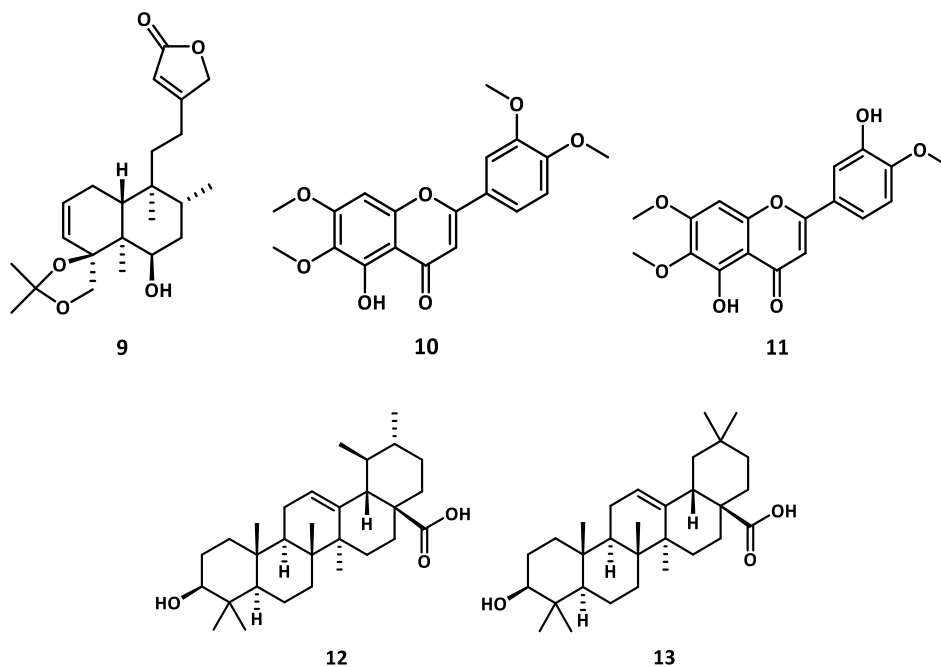
Mediante técnicas cromatográficas, se aislaron de las partes aéreas de *Salvia thymoides* Benth los trece compuestos (1-13) ilustrados en la Figura 36, de los cuales, nueve son



diterpenos con esqueleto de tipo *neo-clerodano* (**1-9**), dos son flavonas (**10 y 11**) y dos son triterpenos (**12 y 13**); sus estructuras fueron establecidas a partir de la aplicación de diferentes técnicas espectroscópicas tales como como EM, IR, RMN, UV-Vis y DRX-M.

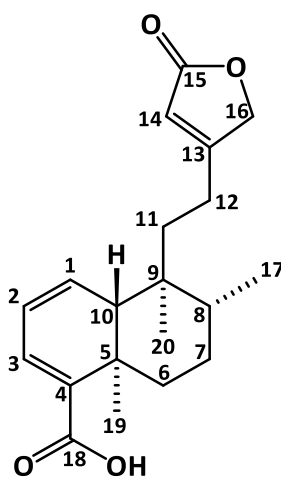


**Figura 36.** Metabolitos secundarios aislados de *Salvia thymoides* Benth. **1)** ácido neoclerodan-1,3,13-trien-18-óico-15,16-ólida, **2)** 5,10-*seco*-clerodan-1,3,5,13-tetraen-15,16-ólida-18-óico, **3)** 2 $\beta$ ,6 $\alpha$ ,18-trihidroxi-neoclclerodan-3,13-dien-15,16-ólida, **4)** lactona del ácido 16,18-dihidroxikolavénico, **5)** 2 $\alpha$ ,6 $\alpha$ ,7 $\beta$ ,18-tetrahidroxi-[3 $\beta$ ,4 $\beta$ ]oxiran-neoclclerodan-13-en-15,16-ólida, **6)** éster metílico del ácido 2-oxo-neoclclerodan-3,13-dien-15,16-ólida, **7)** éster metílico del ácido 2 $\beta$ -hidroxi-neoclclerodan-3,13-dien-15,16-ólida, **8)** ácido (5*R*,8*R*,9*S*,10*R*)- 12-[21-dimetil[15,16]dioxepin]-13-en-15,16-dihidro-hardwíckiico.



**Figura 36.** Metabolitos secundarios aislados de *Salvia thymoides* Benth (continuación). **9)** 6 $\beta$ -hidroxi-4-spiro-[21-dimetil-[4 $\beta$ ,18 $\alpha$ ]dioxolan]-neoclerodan-2,13-dien-15,16-ólida **10)** 5-hidroxi-6,7,3',4'-tetrametoxiflavona, **11)** eupatorina, **12)** ácido ursólico, **13)** ácido oleanólico.

### 6.1.1. Determinación estructural del compuesto 1



**Figura 37.** Estructura del compuesto 1.

El compuesto **1** (Figura 37) fue aislado en forma de cristales incoloros, del análisis de su espectro de masas mediante la técnica DART se dedujo la fórmula molecular  $C_{20}H_{26}O_4$ . En su espectro IR se observa una banda ancha en  $3210\text{ cm}^{-1}$  que se atribuye a un estiramiento O-H de un ácido carboxílico, una banda intensa en  $1736\text{ cm}^{-1}$ , la cual corresponde a un estiramiento C=O de un carbonilo de  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$  insaturada y una banda intensa en  $1698\text{ cm}^{-1}$  que corresponde a un estiramiento C=O de un carbonilo de ácido carboxílico. En el mismo espectro se observan alrededor de  $1560\text{ cm}^{-1}$  bandas que se atribuyen al estiramiento C=C y alrededor de  $1443\text{ cm}^{-1}$  bandas que se atribuyen a las flexiones de grupos metilo, además, en  $755\text{ cm}^{-1}$  se observa una banda correspondiente con la flexión =C-H fuera del plano; en  $1210\text{ cm}^{-1}$  se observa una banda intensa que corresponde con el estiramiento asimétrico CO-O de una  $\gamma$ -lactona, cuyo estiramiento simétrico se observa en  $1016\text{ cm}^{-1}$ .

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 1, Tabla 14) se observan cuatro señales muy desplazadas hacia frecuencias altas, las cuales corresponden a hidrógenos de tipo vinílico, las multiplicidades de dichas señales permiten asignar a cada una de estas. El hidrógeno H-1 se asigna a la señal en 6.15 ppm, el cual presenta una multiplicidad *ddd* con constantes de acoplamiento (*J*) con valores de 9.22 Hz por su acoplamiento con H-2, 3.22 Hz por su acoplamiento con H-10 $\beta$ , y 1.20 Hz por su acoplamiento de tipo alílico con H-3, estas asignaciones se corroboraron con la correlación observada en el experimento COSY entre H-1 y H-3. El átomo de hidrógeno H-2 se observa en 6.21 ppm y presenta una multiplicidad *ddd* con *J* = 9.25 Hz (acoplamiento con H-1), 5.16 Hz (acoplamiento con H3) y 1.30 Hz (acoplamiento alílico con H-10 $\beta$ ).

La señal más desplazada (6.93 ppm, *dd*, *J*= 5.20, 1.19 Hz) se atribuye al hidrógeno H-3 debido a que sufre un importante efecto de desprotección, ya que se trata de una posición  $\beta$  de un carbonilo  $\alpha,\beta$  insaturado. La señal en 5.84 ppm se asigna a H-14 ya que el valor bajo de las *J* se debe a los únicos acoplamientos alílicos con los dos hidrógenos de un metileno enlazado a un átomo de oxígeno (4.72 ppm, *dd*, *J*= 17.03, 1.59 Hz), los cuales se asignan a los hidrógenos de la posición C-16 que forma parte de una  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$  insaturada.

Se observa una señal con multiplicidad *dddd* y una señal con multiplicidad *ddd*, que se asignan a los hidrógenos del metileno C-7, los valores de las constantes de acoplamiento permiten diferenciar cada hidrógeno según la disposición en la que se encuentra. El átomo de hidrógeno H-7 que se encuentra con una orientación  $\alpha$ -axial presenta una *J* con valor muy grande (13.82 Hz) debido a su acoplamiento de tipo geminal, dos constantes de acoplamiento con valor grande (9.87 y 6.66 Hz) debido a los acoplamientos de tipo axial-axial con H-6 $\beta$  y H-8 $\beta$ , y una *J* con valor pequeño (3.72 Hz) debido al acoplamiento axial-ecuatorial con H-6 $\alpha$ .

El átomo de hidrógeno que se encuentra en orientación  $\beta$ -ecuatorial presenta una *J* de tipo geminal (13.89 Hz) y dos *J* con valores pequeños debido a los acoplamientos ecuatorial-axial con H-6 $\beta$  y H-8 $\beta$ , (2.98 y 2.95 Hz), el acoplamiento ecuatorial-ecuatorial con H-6 $\alpha$  se observa como un ligero ensanchamiento de la señal.

El espectro presenta tres señales que integran para 3H, lo que indica la presencia de tres metilos, dos son singuletes (C-19 y C-20), por lo que dichos metilos se encuentran enlazados a carbonos cuaternarios, la otra señal es un doblete (C-17) debido a que está enlazada a un metino y presenta una constante de acoplamiento de 6.13 Hz.

En el espectro APT de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 2, Tabla 14) la señal más desplazada (174.2 ppm) se atribuye al carbonilo (C-15) de la  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$  insaturada, seguida de una señal a 172.4 ppm asignada al carbonilo del ácido carboxílico ubicado en la posición C-18. Se asignaron las señales en 170.8 y 140.0 ppm a las posiciones C-13 y C-4 respectivamente que corresponden a carbonos vinílicos de tipo cuaternario.

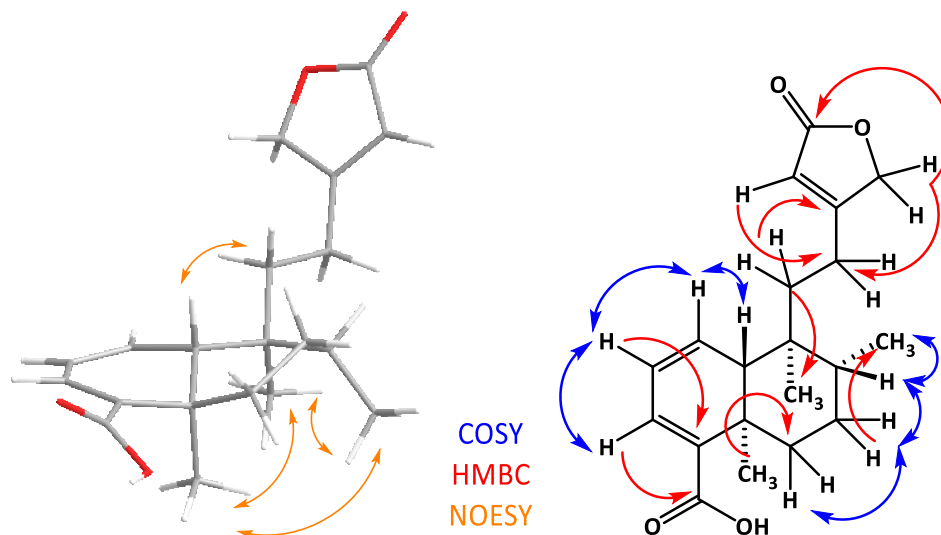
**Tabla 14.** Datos de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del compuesto 1.

Posición	Tipo*	$\delta_{\text{C}}$ /ppm	$\delta_{\text{H}}$ /ppm (número, multiplicidad, <i>J</i> /Hz)
1	CH	134.9	6.15 (1H, <i>ddd</i> 9.22, 3.22, 1.20)
2	CH	125.4	6.21 (1H, <i>ddd</i> 9.25, 5.16, 1.30)
3	CH	133.7	6.93 (1H, <i>dd</i> 5.20, 1.19)
4	C	140.0	-
5	C	39.0	-
6 $\alpha$	CH <sub>2</sub>	27.3	1.50 (2H, <i>m</i> )
6 $\beta$			

7 $\alpha$	CH <sub>2</sub>	34.7	1.40 (1H, <i>dddd</i> 13.82, 9.87, 6.66, 3.72)
7 $\beta$			2.48 (1H, <i>ddd</i> 13.89, 2.98, 2.95)
8	CH	35.9	1.50 (1H, <i>m</i> )
9	C	38.6	-
10	CH	48.5	2.26 (1H, <i>dd</i> 3.18, 1.29)
11a	CH <sub>2</sub>	35.1	1.73 (1H, <i>ddd</i> 14.64, 12.70, 4.70)
11b			1.64 (1H, <i>ddd</i> 14.61, 12.64, 4.40)
12a	CH <sub>2</sub>	22.4	2.28 (1H, <i>m</i> )
12b			2.13 (1H, <i>m</i> )
13	C	170.8	-
14	CH	115.4	5.84 (1H, <i>t</i> 1.62)
15	C	174.2	-
16	CH <sub>2</sub>	73.2	4.72 (2H, <i>dd</i> 17.03, 1.59)
17	CH <sub>3</sub>	15.8	0.84 (3H, <i>d</i> 6.13)
18	C	172.4	-
19	CH <sub>3</sub>	15.4	1.05 (3H, <i>s</i> )
20	CH <sub>3</sub>	19.5	0.93(3H, <i>s</i> )

<sup>1</sup>H 700 MHz, <sup>13</sup>C 175 MHz, CDCl<sub>3</sub>. \*Obtenido con el espectro HSQC.

En los experimentos bidimensionales se observan correlaciones (Figura 38) que sustentan la elucidación estructural del compuesto **1**, en el experimento COSY (Espectro 3) se pueden observar las correlaciones del sistema de spin del hidrógeno H-10 y los hidrógenos vinílicos H-1, H-2 y H-3, también se pueden observar las correlaciones entre los hidrógenos de los metilenos C-7 y C-6, y el hidrógeno del metino C-8. En el experimento HMBC (Espectro 5) se pueden observar correlaciones entre hidrógenos y carbonos de la  $\gamma$ -lactona (posiciones C-13, C-14, C-15 y C-16) que permitieron su elucidación, además de facilitar la asignación de las señales de carbonos cuaternarios como C-4, C-5, C-9, C-13, C-15 y C-18 que junto con los desplazamientos en el espectro de <sup>13</sup>C permitieron identificar a C-5 y C-9 como alifáticos, C-4 y C-13 como vinílicos, y a C-15 y C-18 como carbonilos de lactona y ácido carboxílico respectivamente.



**Figura 38.** Señalización de correlaciones importantes en los experimentos bidimensionales sobre la estructura optimizada del compuesto **1**.

Mediante el análisis de los resultados de la difracción de rayos X (Figura 39) y calculando el parámetro de Flack ( $x = -0.01$  (6)) se corrobora la configuración relativa propuesta con los espectros de RMN, y se asigna la configuración absoluta de **1** como (5*R*, 8*R*, 9*S*, 10*R*). En 1999, se aisló de *Scapania nemorea*<sup>120</sup> un isómero del compuesto **1** con la configuración (5*R*, 8*S*, 9*R*, 10*S*) e identificado como el ácido (-)-*cis*-clerodan-1,3,13-trien-15,18-dioico-15,16-ólida, analizando los datos espectroscópicos presentados en dicho trabajo se encontraron varias similitudes con la información presentada en esta tesis. El compuesto **1** tiene una estructura que no ha sido descrita anteriormente, por lo que se identifica como el ácido (5*R*, 8*R*, 9*S*, 10*R*)-neoclerodan-1,3,13-trien-18-óico-15,16-ólida y se trata de un compuesto inédito en la literatura fitoquímica.

<sup>120</sup> Geis, W.; Buschauer, B.; Becker, H. *cis*-Clerodanes from axenic cultures of the liverwort *Scapania nemorea*. *Phytochemistry* **1999**, 51, 643-649.

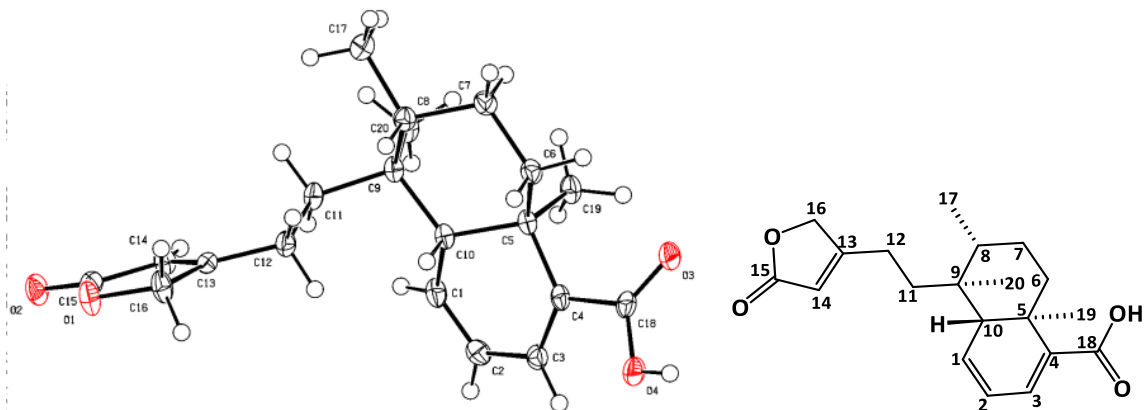


Figura 39. Configuración absoluta del compuesto 1, obtenida mediante difracción de rayos X de monocristal.

### 6.1.2. Determinación estructural del compuesto 2

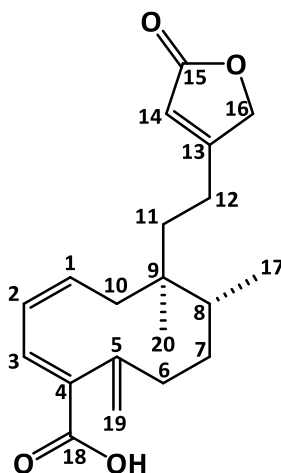


Figura 40. Estructura del compuesto 2.

En 1985, se aisló el compuesto 2 (Figura 40) de la especie *Pulicaria angustifolia*<sup>121</sup> y fue identificado como el ácido 5,10-*seco*-clerodan-1,3,5,13-tetraen-15,16-ólida-18-oico, en dicho trabajo se presenta la información de RMN (<sup>1</sup>H 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) con toda la asignación de las señales y una propuesta de configuración relativa. En 1989, se volvió a aislar de la especie *S. thymoides* en forma de su éster metílico<sup>44</sup>, en dicho trabajo se complementó la

<sup>121</sup> Singh, P.; Sharma, M. C.; Joshi, K. C.; Bohlmann, F. Diterpenes derived from clerodanes from *Pulicaria angustifolia*. *Phytochemistry* **1985**, 24(1), 190-192.

información de RMN ( $^{13}\text{C}$  20 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) con toda la asignación de los carbonos y se corroboró la configuración relativa.

El compuesto **2** se aisló en forma de cristales incoloros, del análisis de su espectro de masas mediante la técnica DART se dedujo una fórmula molecular  $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_4$ . En su espectro IR se observa una banda ancha en  $3110\text{ cm}^{-1}$  que se atribuye a un estiramiento O-H de un ácido carboxílico, una banda intensa en  $1716\text{ cm}^{-1}$ , la cual corresponde a un estiramiento C=O de un carbonilo de  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$  insaturada y una banda intensa en  $1688\text{ cm}^{-1}$  la cual corresponde a un estiramiento C=O de un carbonilo de ácido carboxílico. En este mismo espectro, alrededor de  $1439\text{ cm}^{-1}$  hay bandas que se atribuyen a las flexiones de grupos metilo, además, en  $725\text{ cm}^{-1}$  se observa una banda correspondiente con la flexión =C-H fuera del plano; en  $1225\text{ cm}^{-1}$  se observa una banda intensa que corresponde con el estiramiento asimétrico CO-O de una  $\gamma$ -lactona, cuyo estiramiento simétrico se observa en  $1041\text{ cm}^{-1}$ .

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 7, Tabla 15) se observan 6 señales a frecuencias altas que corresponden a hidrógenos de tipo vinílico, la multiplicidad y el valor de las constantes de acoplamiento de estas señales fueron de utilidad para asignar cada una de ellas. La señal en 5.29 ppm se asignó a H-1 ya que presenta una multiplicidad  $ddd_{\text{ancho}}$  por el acoplamiento con H-2 con un valor de 12.20 Hz y los acoplamientos con los dos hidrógenos del metileno C-10 con valores de 12.17 y 4.26 Hz, también se confirmó con el experimento COSY un acoplamiento de tipo alílico con H-3 (1.96 Hz).

La señal en 5.97 ppm se asignó a H-2 ya que presenta una multiplicidad  $ddd$  por el acoplamiento de 12.20 Hz con H-1, el acoplamiento con H-3 con un valor de 2.50 Hz y un acoplamiento alílico con H-10 que también se observa en el experimento COSY. La señal en 7.38 ppm se asigna a H-3 debido a que se encuentra en la posición  $\beta$  de un carbonilo  $\alpha,\beta$  insaturado conformado por las posiciones C-18, C-4 y C-3. Las señales de los hidrógenos del vinilo terminal en la posición C-19 se encuentran a 5.10 ppm y 4.87 ppm, las cuales se observan ensanchadas debido al acoplamiento geminal que hay entre ambos hidrógenos.



En el HSQC se observa que la posición C-10 es un metileno alifático, las señales de ambos hidrógenos se encuentran a 2.27 ppm ( $dd_{\text{ancho}}$ ,  $J = 13.89, 12.26$  Hz) y 1.73 ppm ( $ddd_{\text{ancho}}$ ,  $J = 14.12, 4.39, 2.02$  Hz). Se determina que la señal más desplazada corresponde al hidrogeno en  $\beta$ -axial ya que forma un ángulo mayor con H-1 y por ende una constante de acoplamiento con un mayor valor. En el espectro también se observa con claridad las señales correspondientes a los hidrógenos  $\alpha$ -ecuatorial (2.69 ppm,  $ddd$ ,  $J = 13.41, 4.47, 2.39$  Hz) y  $\beta$ -axial (2.10 ppm,  $ddd$ ,  $J = 13.56, 13.36, 2.64$  Hz) de la posición C-6, cabe mencionar que el hidrógeno  $\alpha$ -ecuatorial se desplaza más debido a que se encuentra ubicado en la zona de desprotección del doble enlace en C-5 a través del espacio. En este espectro a diferencia del compuesto **1**, sólo se observa la presencia de 2 grupos metilo, asignados a las posiciones 17 (0.78 ppm,  $d$ ,  $J = 6.76$  Hz) y 20 (0.72 ppm,  $s$ ).

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 8, Tabla 15) se observan las señales del carbonilo C-15 de una  $\gamma$ -lactona  $\alpha, \beta$  insaturada a 174.2 ppm y del carbonilo C-18 de un ácido carboxílico a 171.2 ppm, y las señales de carbonos cuaternarios de tipo vinílico asignadas a las posiciones C-4 (136.6 ppm), C-5 (144.6 ppm) y C-13 (171.1 ppm).

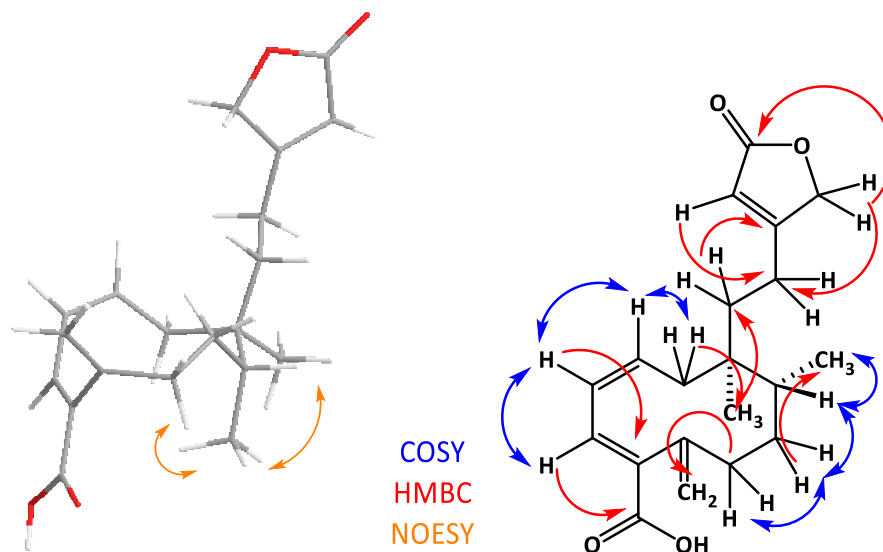
**Tabla 15.** Comparación de los datos de RMN del compuesto **2** aislado en este trabajo con los datos reportados en 1985 y 1989.

Posición	Tipo*	Compuesto 2 aislado en el presente trabajo <sup>a</sup>		Compuesto 2 reportado en 1985 <sup>b</sup> y 1989 <sup>c</sup>	
		$\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$	$\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$ (número, multiplicidad, $J/\text{Hz}$ )	$\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$ <sup>c</sup>	$\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$ (número, multiplicidad, $J/\text{Hz}$ ) <sup>b</sup>
1	CH	126.9	5.29 (1H, $ddd_{\text{ancho}}$ 12.20, 12.17, 4.26, 2.96)	140.48	5.25 (1H, $dddd$ 11, 4, 13, 2)
2	CH	128.3	5.97 (1H, $ddd$ 11.85, 2.50, 1.39)	128.42	5.94 (1H, $ddd$ 11, 2.5, 1.5)
3	CH	143.2	7.38 (1H, $dd$ 2.35, 2.30)	126.76	7.26 (1H, $dd_{\text{ancho}}$ 4, 2.5)
4	C	136.6	-	144.94	-
5	C	144.6	-	137.12	-
6 $\alpha$	CH <sub>2</sub>	33.8	2.69 (1H, $ddd$ 13.41, 4.47, 2.39)	33.92	2.60 (1H, $dddd$ 13.5, 2, 2, 2, 2)
6 $\beta$			2.10 (1H, $ddd$ 13.56, 13.36, 2.64)		2.06 (1H, $ddd$ 13.5, 2, 2)
7 $\alpha$	CH <sub>2</sub>	29.3	1.49 (1H, $m$ )	29.30	1.55 (1H, $m$ )

7 $\beta$			0.881H, <i>m</i> )		0.81 (1H, <i>m</i> )
8	CH	35.7	1.39 (1H, <i>ddd</i> 9.42, 6.77, 2.27)	35.83	1.35 (1H, <i>dd</i> <sub>ancho</sub> 10, 3, 2)
9	C	38.0	-	37.97	-
10 $\alpha$	CH <sub>2</sub>	35.9	2.27 (1H, <i>dd</i> <sub>ancho</sub> 13.89, 13.26)	34.93	2.27 (1H, <i>dd</i> <sub>ancho</sub> 13, 2, 1.5)
10 $\beta$			1.73 (1H, <i>ddd</i> <sub>ancho</sub> 14.12, 4.39, 2.02)		1.70 (1H, <i>dddd</i> 13, 13, 2, 1.5)
11a	CH <sub>2</sub>	34.8	1.56 (1H, <i>m</i> )	35.83	1.50 (1H, <i>m</i> )
11b			1.46 (1H, <i>m</i> )		1.50 (1H, <i>m</i> )
12	CH <sub>2</sub>	23.7	2.38 (2H, <i>dd</i> <sub>ancho</sub> 10.1, 8.11 Hz)	23.64	2.25 (2H, <i>m</i> )
13	C	171.1	-	171.03	-
14	CH	115.4	5.86 (1H, <i>t</i> 1.60 Hz)	115.9	5.84 (1H, <i>tt</i> 1.5, 1.5)
15	C	174.2	-	174.0	-
16	CH <sub>2</sub>	73.2	4.72 (2H, <i>dd</i> 16.88, 1.82 Hz)	73.04	4.76 (2H, <i>d</i> <sub>ancho</sub> 16)
17	CH <sub>3</sub>	14.0	0.78 (3H, <i>d</i> 6.76)	13.85	0.75 (3H, <i>d</i> 7)
18	C	171.2	-	166.5	-
19a	CH <sub>2</sub>	118.6	5.10 (1H, <i>s</i> <sub>ancho</sub> )	117.93	5.07 (1H, <i>s</i> <sub>ancho</sub> )
19b			4.87 (1H, <i>s</i> <sub>ancho</sub> )		4.84 (1H, <i>s</i> <sub>ancho</sub> )
20	CH <sub>3</sub>	18.7	0.72 (3H, <i>s</i> <sub>ancho</sub> )	18.59	0.68 (3H, <i>s</i> )

a) <sup>1</sup>H 500 MHz, <sup>13</sup>C 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>. \*Obtenido con el espectro HSQC. b) <sup>1</sup>H 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, c) <sup>13</sup>C 20 MHz, CDCl<sub>3</sub>.

En los experimentos bidimensionales se observan correlaciones (Figura 41) que sustentan la elucidación estructural del compuesto **2**. En el experimento COSY (Espectro 9) se pueden observar las correlaciones del sistema de spin de los hidrógenos H-10 y los hidrógenos vinílicos H-1, H-2 y H-3, también se pueden observar las correlaciones de los hidrógenos de los metilenos C-7 y C-6, y el hidrógeno del metino C-8. El experimento HMBC permitió asignar las señales de carbonos cuaternarios como C-4, C-5, C-9, C-13, C-15 y C-18.



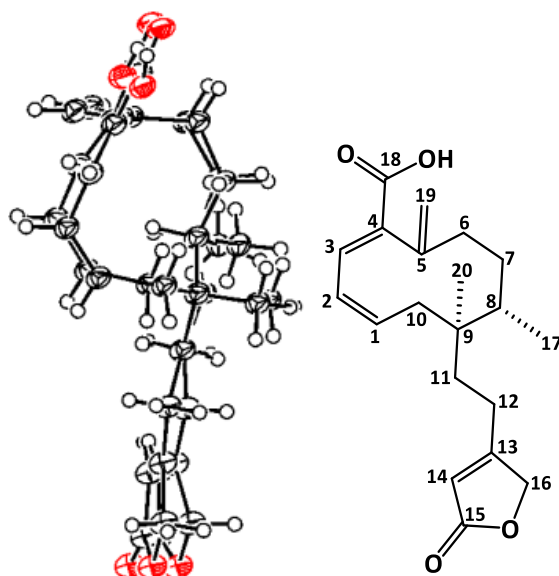
**Figura 41.** Señalización de correlaciones importantes en los experimentos bidimensionales sobre la estructura optimizada del compuesto **2**.

Comparando la información espectroscópica presentada en esta tesis con los trabajos presentados en 1985 y 1989 se observan algunas discrepancias en la asignación de las señales de RMN propuestas en estos, las cuales se corrigen y corroboran con ayuda de experimentos bidimensionales y espectros de mayor resolución.

En el trabajo de 1989<sup>44</sup> se propone que las señales en RMN <sup>13</sup>C de las posiciones C-1 y C-3 se observan a 140.48 ppm y 126.76 ppm, respectivamente; sin embargo, con ayuda de los experimentos HSQC y HMBC (Espectros 10 y 11) se llega a la conclusión de que deben invertirse estas asignaciones (C-1 a 126.1 ppm y C-3 a 143.3 ppm). Los vinilos cuaternarios C-4 y C-5 se asignaron en el trabajo de 1989 a las señales en 144.9 ppm y 137.1 ppm respectivamente, sin embargo, en el experimento HMBC realizado al compuesto **2** se observa una señal a 144.6 ppm teniendo correlaciones con las señales correspondientes a las posiciones H-3, H-7 $\alpha$  y H-7 $\beta$ , y una señal en 136.6 ppm teniendo correlaciones con las posiciones H-2, H-6 $\alpha$  y H-6 $\beta$ . Estas observaciones permitieron concluir que dichas asignaciones deben invertirse. Los metilenos C-10 y C-11 se asignaron a las señales en 34.9 ppm y 35.8 ppm respectivamente en el trabajo de 1989, sin embargo, en el experimento

COSY se pueden observar los hidrógenos acoplados con los dos H-12 y en el experimento HSQC la correlación con el carbono al que están unidos esos hidrógenos. Así, esta descripción corresponde a la posición C-11 que se asigna a la señal en 34.8 ppm mientras que la posición C-10 se asigna a la señal en 35.9 ppm por lo que se propone que dichas asignaciones también deben invertirse.

Mediante el análisis de los resultados de la difracción de rayos X (Figura 42) y calculando el parámetro de Flack ( $x = 0.18 (7)$ ) se establece la configuración absoluta como (8*R*, 9*R*).



**Figura 42.** Configuración absoluta del compuesto **2**, obtenida mediante difracción de rayos X de monocristal.

### 6.1.3. Determinación estructural del compuesto 3

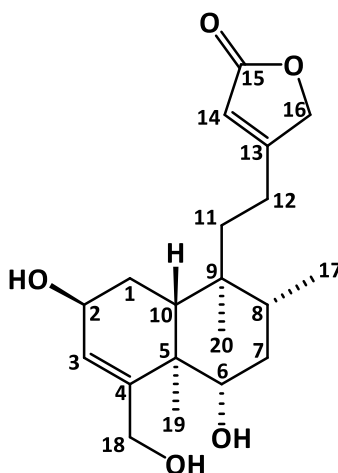


Figura 43. Estructura del compuesto 3.

El compuesto **3** (Figura 43) se aisló en forma de cristales incoloros, del análisis de su espectro de masas mediante la técnica DART se dedujo la fórmula molecular  $C_{20}H_{30}O_5$ . En su espectro IR se observa una banda ancha en  $3212\text{ cm}^{-1}$  que se atribuye a un estiramiento O-H de alcohol y una banda intensa en  $1738\text{ cm}^{-1}$ , la cual corresponde a un estiramiento C=O de un carbonilo de  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$  insaturada. En este mismo espectro se observan bandas alrededor de  $1580\text{ cm}^{-1}$  que se atribuyen al estiramiento C=C y en  $1428\text{ cm}^{-1}$  bandas que se atribuyen a las flexiones de grupos metilo, además, en  $1018\text{ cm}^{-1}$  se observa una banda intensa que corresponde con el estiramiento asimétrico C-O de los alcoholes.

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 13, Tabla 16) se observan a frecuencias altas los hidrógenos de los metinos vinílicos asignados a las posiciones H-3 ( $5.67\text{ ppm}$ ,  $dd_{\text{ancho}}$ ,  $J=4.68, 1.34\text{ Hz}$ ) y H-14 ( $5.84\text{ ppm}$ ,  $dd$ ,  $J=2.0, 1.2\text{ Hz}$ ). Se empleó el valor de las constantes de acoplamiento como criterio para asignar cada posición, ya que la señal de H-3 presenta acoplamientos con el hidrógeno del metino C-2 y acoplamientos alílicos con los hidrógenos de la posición C-18, que pueden corroborarse con la correlación presentada en el experimento COSY.

Hay cuatro señales en la región de hidrógenos geminales a oxígeno. En el experimento HSQC (Espectro 16) se observa que se trata de dos metilenos y dos metinos, los cuales se asignan a los hidrógenos H-16 (4.85 ppm, *m*), H-18 (4.20 ppm,  $d_{\text{ancho}}$ ,  $J = 15.2$  Hz), H-2 (4.15 ppm,  $ddd$ ,  $J = 4.59, 4.41, 1.26$  Hz) y H-6 (3.56 ppm,  $dd$ ,  $J = 8.84, 6.74$  Hz), respectivamente. De nuevo, el valor de las constantes de acoplamiento son el criterio para asignar dichas posiciones, y adicionalmente para determinar la configuración relativa de las posiciones H-2 ( $\alpha$ -ecuatorial) y H-6 ( $\beta$ -axial), lo cual puede corroborarse con las correlaciones observadas en el experimento NOESY.

El espectro presenta tres señales que integran para tres hidrógenos lo que indica la presencia de tres metilos, dos de ellas son singuletes (C-19 y C-20) por lo que dichos metilos se encuentran enlazados a carbonos cuaternarios, la otra señal es un doblete (C-17) debido a que está enlazada a un metino y presenta una constante de acoplamiento de 6.54 Hz.

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 14, Tabla 16), la señal más desplazada (177.2 ppm) se atribuye al carbonilo C-15 de la  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$  insaturada, seguida de una señal a 175.4 ppm asignada al carbono cuaternario de tipo vinílico ubicado en la posición C-13, por lo que la señal en 151.6 ppm se asigna a C-4, que también corresponde a un carbono cuaternario de tipo vinílico.

**Tabla 16.** Datos de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del compuesto **3**.

Posición	Tipo*	$\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$	$\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$ (número, multiplicidad, $J$ /Hz)
1 $\alpha$	CH <sub>2</sub>	28.7	1.83 (1H, $ddd$ 14.32, 12.82, 4.61)
1 $\beta$			1.71 (1H, <i>m</i> )
2	CH	65.1	4.15 (1H, $ddd_{\text{ancho}}$ 4.69, 4.60, 1.26)
3	CH	125.3	5.67 (1H, $dd_{\text{ancho}}$ 4.68, 1.34)
4	C	151.6	-
5	C	45.6	-
6	CH	75.6	3.56 (1H, $dd$ 8.84, 6.74)
7 $\alpha$	CH <sub>2</sub>	37.6	1.66 (2H, <i>m</i> )
7 $\beta$			
8	CH	35.8	1.61 (1H, <i>m</i> )
9	C	39.1	-
10	CH	41.2	1.59 (1H, <i>m</i> )
11a	CH <sub>2</sub>	35.1	1.63 (2H, <i>m</i> )
11b			
12a	CH <sub>2</sub>	36.3	2.56 (1H, $ddd$ 16.51, 12.53, 4.91)

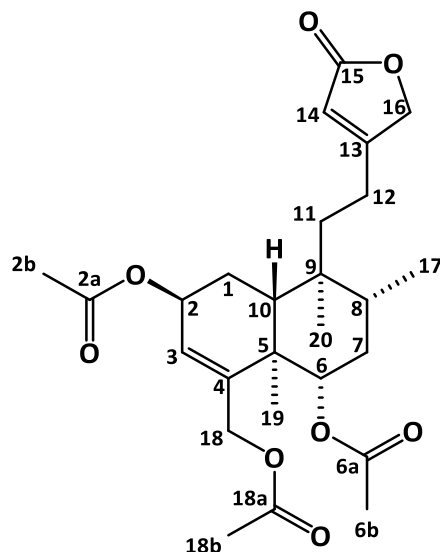
12b			2.31 (1H, <i>ddd</i> 16.47, 12.40, 4.86)
13	C	175.4	-
14	CH	114.9	5.84 (1H, <i>dd</i> 2.0, 1.2)
15	C	177.2	-
16	CH <sub>2</sub>	75.0	4.85 (2H, <i>m</i> )
17	CH <sub>3</sub>	15.9	0.87 (3H, <i>d</i> 6.54)
18	CH <sub>2</sub>	65.4	4.20 (2H, <i>d</i> <sub>ancho</sub> 15.2)
19	CH <sub>3</sub>	15.0	1.03 (3H, <i>s</i> )
20	CH <sub>3</sub>	18.2	0.79 (3H, <i>s</i> )

<sup>1</sup>H 700 MHz, <sup>13</sup>C 175 MHz, CD<sub>3</sub>OD. \*Obtenido con el espectro HSQC.

Los experimentos bidimensionales fueron de utilidad para elucidar y asignar algunas posiciones (Figura 45). En el experimento COSY (Espectro 15) se observan el sistema de espín compuesto por los hidrógenos de las posiciones C-1, C-2, C-3 y C-10, y el sistema de espín compuesto por los hidrógenos de las posiciones C-6, C-7, C-8 y C-17. Las posiciones oxigenadas se asignaron a través de correlaciones como H-2 con C-4 y C-10, H-6 con C-8 y C-19, Ha-18 y Hb-18 con C-3 y C-5, y H-16 con C-12, C-14 y C-13.

Se acetilaron los grupos hidroxilo del compuesto **3** empleando anhídrido acético y piridina con el objetivo de analizar la información espectroscópica de RMN de dicho producto, observando principalmente los cambios en las señales para obtener más información de cómo se encuentra la disposición espacial de este.

En el espectro de RMN <sup>1</sup>H (Espectro 19, Tabla 17) del producto de acetilación del compuesto **3** (Figura 44) se observa un evidente desplazamiento a frecuencias mayores para las posiciones H-2 (5.24 ppm, *ddd*, *J*= 6.07, 3.05, 3.0 Hz), H-6 (4.73 ppm, *m*) y H-18 (4.57 ppm, *dd*, *J*= 13.44, 1.14 Hz y 4.38 ppm, *dd*, *J*= 13.43, 1.22 Hz) a causa de la adición de los grupos acetato, además de la resolución de las señales asignadas a las posiciones H-10 y H-12.



**Figura 44.** Estructura del producto de acetilación del compuesto **3**.

**Tabla 17.** Datos de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del producto de acetilación del compuesto **3**.

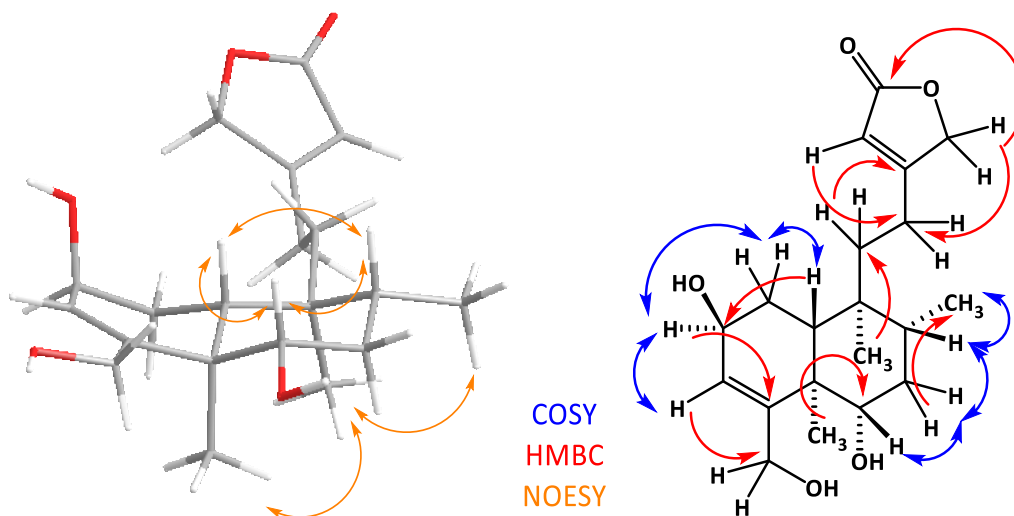
Posición	Tipo*	$\delta_{\text{C}}$ /ppm	$\delta_{\text{H}}$ /ppm (número, multiplicidad, $J$ /Hz)
1 $\alpha$	CH <sub>2</sub>	24.4	1.91 (1H, <i>ddd</i> 15.12, 12.96, 4.91)
1 $\beta$			1.73 (1H, <i>m</i> )
2	CH	67.3	5.24 (1H, <i>ddd</i> 5.07, 4.55, 3.0)
3	CH	123.1	5.74 (1H, <i>dd</i> 4.65, 1.31)
4	C	146.9	-
5	C	42.3	-
6	CH	76.8	4.73 (1H, <i>m</i> )
7 $\alpha$	CH <sub>2</sub>	32.4	1.80 (1H, <i>ddd</i> 13.03, 3.95, 3.90)
7 $\beta$			1.48 (1H, <i>ddd</i> 12.83, 12.80, 11.39)
8	CH	34.2	1.71 (1H, <i>m</i> )
9	C	38.0	-
10	CH	40.9	1.67 (1H, <i>dd</i> 12.97, 1.78)
11a	CH <sub>2</sub>	35.1	1.58 (2H, <i>m</i> )
11b			
12a	CH <sub>2</sub>	21.6	2.38 (1H, <i>ddd</i> 16.83, 11.73, 6.0)
12b			2.27 (1H, <i>ddd</i> 16.79, 11.56, 5.82)
13	C	170.5	-
14	CH	115.4	5.84 (1H, <i>dd</i> 1.62, 1.56)
15	C	173.2	-
16 <sub>pro-R</sub>	CH <sub>2</sub>	73.0	4.70 (1H, <i>d</i> <sub>ancho</sub> 8.45)
16 <sub>pro-S</sub>			4.69 (1H, <i>d</i> <sub>ancho</sub> 8.43)
17	CH <sub>3</sub>	15.4	0.82 (3H, <i>d</i> 6.75)
18 <sub>pro-R</sub>	CH <sub>2</sub>	64.6	4.57 (1H, <i>dd</i> 13.44, 1.14)
18 <sub>pro-S</sub>			4.38 (1H, <i>dd</i> 13.43, 1.22)
19	CH <sub>3</sub>	15.3	1.14 (3H, <i>s</i> )
20	CH <sub>3</sub>	17.7	0.79 (3H, <i>s</i> )
2a	C	170.0	-



2b	CH <sub>3</sub>	21.0	1.98 (3H, s)
6a	C	170.3	-
6b	CH <sub>3</sub>	21.5	2.03 (3H, s)
18a	C	170.9	-
18b	CH <sub>3</sub>	21.7	2.03 (3H, s)

<sup>1</sup>H 500 MHz, <sup>13</sup>C 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>. \*Obtenido con el espectro HSQC.

En el espectro NOESY (Espectro 24) se observa una correlación entre el hidrógeno H-3 y los hidrógenos Ha-18 y Hb-18, una correlación entre el hidrógeno H-6 $\beta$ , el hidrógeno H-8 $\beta$  y el hidrógeno H-10 $\beta$  lo que permite deducir la configuración relativa del compuesto **3**, al proponer que H-10 se encuentra en disposición  $\beta$ -axial, H-2 se encuentra en disposición  $\alpha$ -ecuatorial, H-6 se encuentra en disposición  $\beta$ -axial y H-8 se encuentra en una disposición  $\beta$ -axial.



**Figura 45.** Correlaciones importantes en los experimentos bidimensionales sobre la estructura optimizada del compuesto **3**.

El compuesto **3** no ha sido descrito previamente, por lo que se elucidó como la 2 $\beta$ ,6 $\alpha$ ,18-trihidroxi-neoclerodan-3,13-dien-15,16-ólida.

#### 6.1.4. Determinación estructural del compuesto 4

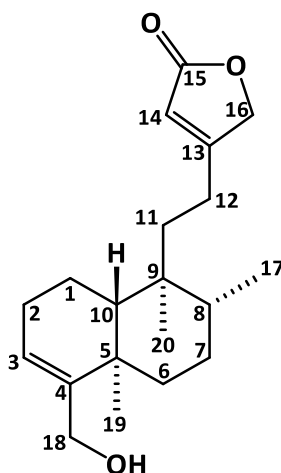


Figura 46. Estructura del compuesto 4.

En 1980, se aisló el compuesto **4** (Figura 46) de la especie *Ageratum hagei* siendo identificado como la lactona del ácido 16,18-dihidroxicolavénico.<sup>122</sup> En 2011, se volvió a aislar de la especie *Cyphostemma greveana*, en este último estudio se presenta la información de RMN (<sup>1</sup>H 500 MHz, <sup>13</sup>C 125 MHz CDCl<sub>3</sub>) con toda la asignación de las señales y una propuesta de configuración relativa.<sup>123</sup> En el año 2015, se aisló de la especie de Madagascar *Malleastrum* sp.<sup>124</sup>

El compuesto **4** se aisló en forma de cristales incoloros, del análisis de su espectro de masas mediante la técnica DART se dedujo la fórmula molecular C<sub>20</sub>H<sub>30</sub>O<sub>3</sub>. En su espectro IR se puede observar una banda ancha alrededor de 3200 cm<sup>-1</sup> que se atribuye a un estiramiento O-H de alcohol y una banda intensa en 1744 cm<sup>-1</sup>, la cual corresponde a un estiramiento C=O de un carbonilo de  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$  insaturada. En este mismo espectro se encuentran

<sup>122</sup> Bohlmann, F.; Zdero, C.; Gupta, R. K.; King, R. M.; Robinson, H. Diterpenes and tetranorditerpenes from *Acritopappus* species. *Phytochemistry* **1980**, *19*, 2695-2705.

<sup>123</sup> Cao, S.; Hou, Y.; Brodie, P.; Miller, J. S.; Randrianaivo, R.; Rakotobe, E.; Rasamison, V. E.; Kingston, D. G. I. Antiproliferative compounds of *Cyphostemma greveana* from a Madagascar dry forest. *Chem. Biodiv.* **2011**, *8*, 643-650.

<sup>124</sup> Liu, Y.; Wiedle Jr., C. H.; Brodie, P. J.; Callmender, M. W.; Rakotondrajaona, R.; Rakotobe, E.; Rasamison, V. E.; Kingston, D. G. I. Antiproliferative diterpenes from a *Malleastrum* sp. from the Madagascar dry forest. *NPC Nat. Prod. Commun.* **2015**, *10*(9), 1509-1512.

bandas alrededor de  $1430\text{ cm}^{-1}$  que se atribuyen a las flexiones de grupos metilo, además, en  $765\text{ cm}^{-1}$  se observa una banda correspondiente con la flexión =C-H fuera del plano, en  $1220\text{ cm}^{-1}$  se observa el estiramiento C-O del grupo hidroxilo y el estiramiento asimétrico CO-O de una  $\gamma$ -lactona, cuyo estiramiento simétrico se observa en  $1040\text{ cm}^{-1}$ .

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 25, Tabla 18), se observan tres señales que integran para 3H lo que indican la presencia de tres metilos, dos de ellos son singuletes por lo que se encuentran enlazados a carbonos cuaternarios, la otra es un doblete debido a que está enlazada a un metino y presenta una constante de acoplamiento de 6.62 Hz. En este mismo espectro, se observa en la región de hidrógenos geminales a oxígeno tres señales que corresponden a los hidrógenos H-16 (4.15 ppm, 2H *d*, *J*= 10.45 Hz) y H-18 (a y b) (4.18 ppm, 1H, *d*, *J*= 7.14 Hz; 4.16 ppm, 1H, *d*, *J*= 7.16 Hz). A frecuencias más altas, en la región de hidrógenos vinílicos se encuentran dos señales correspondientes a los hidrógenos de los metinos C-3 (5.50 ppm, *dd*<sub>ancho</sub>, *J*= 7, 6.79 Hz) y C-14 (6.68 ppm, *d*<sub>ancho</sub>, *J*= 2.7 Hz).

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 26, Tabla 18) la señal más desplazada (171.0 ppm) se atribuye al carbonilo C-15 que conforma a una  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$  insaturada, seguida de dos señales a 143.8 y 143.7 ppm asignadas a los carbonos cuaternarios de tipo vinílico de las posiciones C-13 y C-4 respectivamente. Se asignaron las señales en 127.3 y 138.4 ppm a las posiciones C-3 y C-14 respectivamente, que corresponden a carbonos vinílicos de tipo terciario.

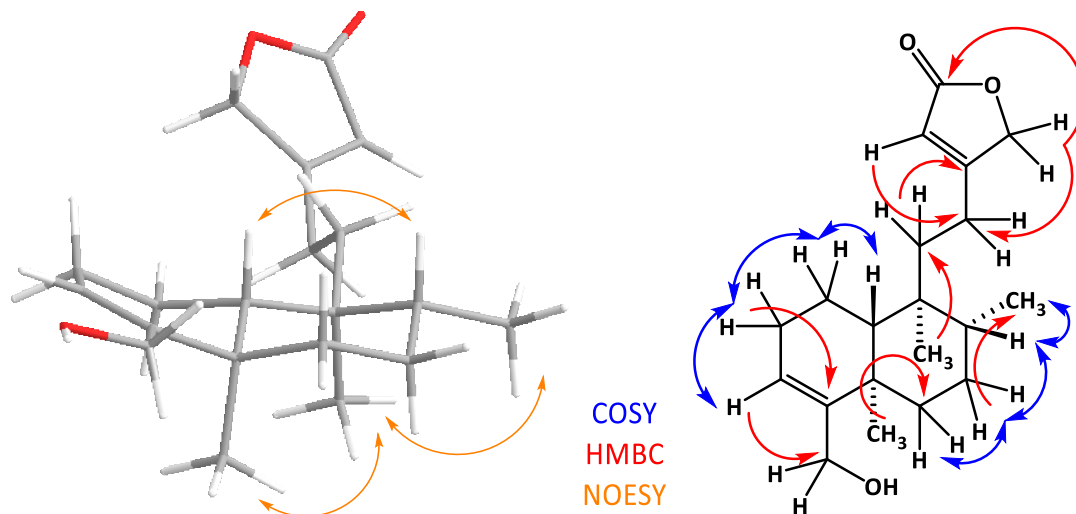
**Tabla 18.** Comparación de los datos de RMN del compuesto **4** aislado en este trabajo con los datos reportados en 2011.

Posición	Tipo*	Compuesto 4 aislado en el presente trabajo <sup>a</sup>		Compuesto 4 reportado en 2011 <sup>b</sup>	
		$\delta_c$ /ppm	$\delta_H$ /ppm (número, multiplicidad, <i>J</i> /Hz)	$\delta_c$ /ppm	$\delta_H$ /ppm (número, multiplicidad, <i>J</i> /Hz)
1 $\alpha$	CH <sub>2</sub>	38.4	1.60 (1H, <i>m</i> )	17.3	1.20 – 2.50 ( <i>m</i> , 14 H)
1 $\beta$			1.48 (1H, <i>m</i> )		1.20 – 2.50 ( <i>m</i> , 14 H)
2 $\alpha$	CH <sub>2</sub>	29.1	2.07 (1H, <i>ddd</i> 14, 13.46, 4.82)	26.1	1.20 – 2.50 ( <i>m</i> , 14 H)
2 $\beta$			1.99 (1H, <i>ddd</i> 13.76, 13.42, 3.71)		1.20 – 2.50 ( <i>m</i> , 14 H)
3	CH	127.3	5.50 (1H, <i>dd</i> <sub>ancho</sub> 7, 6.79)	120.9	5.57 (1H, <i>s</i> <sub>ancho</sub> )
4	C	143.7	-	147.2	-

5	C	38.7	-	37.5	-
6 $\alpha$	CH <sub>2</sub>	37.2	2.41 (1H, <i>ddd</i> 13.16, 3.4, 3.39)	36.0	1.20 – 2.50 ( <i>m</i> , 14 H )
6 $\beta$			1.15 (1H, <i>ddd</i> 16.89, 13.10, 3.37)		1.20 – 2.50 ( <i>m</i> , 14 H )
7 $\alpha$	CH <sub>2</sub>	28.5	1.52 (1H, <i>m</i> )	27.0	1.20 – 2.50 ( <i>m</i> , 14 H )
7 $\beta$			1.44 (1H, <i>m</i> )		1.20 – 2.50 ( <i>m</i> , 14 H )
8	CH	37.6	1.59 (1H, <i>m</i> )	36.2	1.20 – 2.50 ( <i>m</i> , 14 H )
9	C	39.9	-	38.5	-
10	CH	48.1	1.39 (1H, <i>d</i> <sub>ancho</sub> 11.48)	46.3	1.20 – 2.50 ( <i>m</i> , 14 H )
11a	CH <sub>2</sub>	18.6	1.77 (1H, <i>dd</i> <sub>ancho</sub> 13.29, 6.98)	35.2	1.20 – 2.50 ( <i>m</i> , 14 H )
11b			1.53 (1H, <i>m</i> )		1.20 – 2.50 ( <i>m</i> , 14 H )
12a	CH <sub>2</sub>	28.2	2.31 (1H, <i>m</i> )	28.1	1.20 – 2.50 ( <i>m</i> , 14 H )
12b			2.25 (1H, <i>m</i> )		1.20 – 2.50 ( <i>m</i> , 14 H )
13	C	143.8	-	168.8	-
14	CH	138.4	6.68 (1H, <i>d</i> <sub>ancho</sub> 2.7)	113.7	5.84 (1H, <i>s</i> <sub>ancho</sub> )
15	C	171.0	-	169.0	-
16	CH <sub>2</sub>	60.2	4.15 (2H, <i>d</i> 10.45)	63.7	4.73 (2H, <i>d</i> 10)
17	CH <sub>3</sub>	16.3	0.87 (3H, <i>d</i> 6.62)	15.0	0.81 (3H, <i>d</i> 6)
18 <sub>Pro-R</sub>	CH <sub>2</sub>	58.8	4.18 (1H, <i>d</i> 7.14)	61.4	4.09 (2H, <i>d</i> 6.98)
18 <sub>Pro-S</sub>			4.16 (1H, <i>d</i> 7.16)		
19	CH <sub>3</sub>	21.1	1.29 (3H, <i>s</i> )	20.3	1.08 (3H, <i>s</i> )
20	CH <sub>3</sub>	18.9	0.80 (3H, <i>s</i> )	18.0	0.78 (3H, <i>s</i> )

a) <sup>1</sup>H 700 MHz, <sup>13</sup>C 175 MHz, CD<sub>3</sub>OD. \*Obtenido con el espectro HSQC. b) <sup>1</sup>H 500 MHz, <sup>13</sup>C 125 MHz, CD<sub>3</sub>OD.

En los experimentos bidimensionales, se observan correlaciones (Figura 47) que sustentan la elucidación estructural del compuesto **4**; en el experimento COSY (Espectro 27) se pueden observar las correlaciones del sistema de espín compuesto por el hidrógeno H10, los hidrógenos alifáticos H-1 ( $\alpha$  y  $\beta$ ), H-2 ( $\alpha$  y  $\beta$ ) y el hidrógeno vinílico H-3, así como las correlaciones del sistema de espín compuesto por los hidrógenos H-6 ( $\alpha$  y  $\beta$ ), H-7 ( $\alpha$  y  $\beta$ ), el hidrógeno H-8 $\beta$  y los hidrógenos del metilo C-17. En el experimento NOESY (Espectro 30) existe una correlación entre los hidrógenos H-10 y H-8, por lo que se propone una disposición  $\beta$ -axial para ambos.



**Figura 47.** Correlaciones importantes en los experimentos bidimensionales sobre la estructura optimizada del compuesto **4**.

Comparando la información espectroscópica presentada en esta tesis con la del trabajo publicado en el 2011,<sup>123</sup> se observan algunas discrepancias en las asignaciones de las señales de RMN realizadas en este, además se puede completar mucha información respecto a las señales que se encuentran a frecuencias bajas, ambas correcciones se pueden corroborar con ayuda de las correlaciones observadas en los experimentos bidimensionales y con espectros de mayor resolución.

En el 2011 se propuso que las señales en RMN <sup>13</sup>C de las posiciones C-1, C-2, C-7 y C-11 se observan a 17.3, 26.1, 27.0 y 35.2 ppm respectivamente, sin embargo, con ayuda de los experimentos HSQC y HMBC (Espectros 22 y 23) se llega a la conclusión de que dichas asignaciones son incorrectas, ya que en el espectro de RMN <sup>13</sup>C realizado a 175 MHz que se presenta en este trabajo, se asignan dichas posiciones a 38.4, 29.1, 28.5 y 18.6 ppm, respectivamente. Las señales que se encuentran a frecuencias bajas en el espectro de RMN <sup>1</sup>H presentado en el 2011 se engloban como una señal muy ancha que integra para 14H que abarca desde 1.20 hasta 2.50 ppm, esto impide la descripción individual de las señales para los hidrógenos H-1 ( $\alpha$  y  $\beta$ ), H-2 ( $\alpha$  y  $\beta$ ), H-6 ( $\alpha$  y  $\beta$ ), H-7 ( $\alpha$  y  $\beta$ ), H-8, H-10, H-11 (a y b) y H-12 (a y b). En esta tesis se presenta un espectro de RMN <sup>1</sup>H en una mayor resolución (700

MHz) lo que permite describir de mejor manera el desplazamiento químico, la multiplicidad y el valor de las constantes de acoplamiento para varias de estas señales.

### 6.1.5. Determinación estructural del compuesto 5

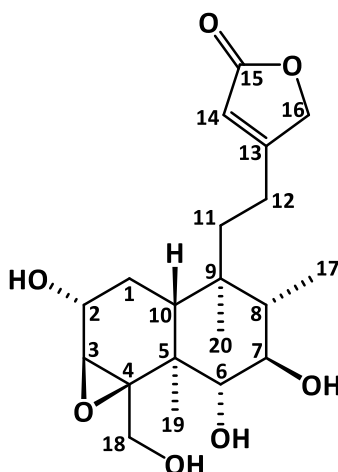


Figura 48. Estructura del compuesto 5.

El compuesto **5** (Figura 48) fue aislado en forma de cristales incoloros. Del análisis de su espectro de masas mediante la técnica DART se dedujo la fórmula molecular  $C_{20}H_{30}O_7$ . En su espectro IR, se observa una banda ancha en  $3408\text{ cm}^{-1}$  que se atribuye a un estiramiento O-H de alcohol, y una banda intensa en  $1737\text{ cm}^{-1}$ , la cual corresponde a un estiramiento C=O de un carbonilo de  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$  insaturada. En este mismo espectro, en  $1446\text{ cm}^{-1}$  se observan bandas atribuidas a las flexiones de grupos metilo, además, en  $866\text{ cm}^{-1}$  se observa una banda correspondiente con la flexión =C-H fuera del plano; en  $1173\text{ cm}^{-1}$  se observa una banda intensa que corresponde al estiramiento C-O de los alcoholes, y del estiramiento asimétrico CO-O de una  $\gamma$ -lactona, cuyo estiramiento simétrico se observa en  $1017\text{ cm}^{-1}$ .

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 31, Tabla 19), se observan tres señales que integran para 3H, lo que indica la presencia de tres metilos, dos de ellos son singuletes por lo que se encuentran enlazados a carbonos cuaternarios, la otra es un doblete debido a que está enlazada a un metino, por lo que presenta una constante de acoplamiento de 6.36 Hz; se observa sólo una señal correspondiente a un metino vinílico, que indica la ausencia de la

insaturación en las posiciones C-3 y C-4 observada en los diterpenos descritos previamente, también se observan varias señales en la región de hidrógenos geminales a oxígeno. En 3.74 ppm se observa una señal  $dd_{\text{ancho}}$  que presenta constantes de acoplamiento de 10.85 y 4.8 Hz, esta señal se asigna a H-2 $\beta$ , dichas constantes se atribuyen a los acoplamientos con H-1 $\beta$  y H-1 $\alpha$ , el acoplamiento con H-3 $\alpha$  se percibe como un ensanchamiento de la señal.

En 3.32 ppm, se observa la señal asignada a H-3 $\alpha$ , la cual presenta una multiplicidad  $d$  con una  $J$  de 2.68 Hz debido a su acoplamiento con H-2 $\beta$ . En 3.36 ppm ( $dd$ ,  $J$ = 4.60, 2.74 Hz) y 2.92 ppm ( $dd$ ,  $J$ = 4.60, 4.57), se observan las señales de H-6 $\beta$  y H-7 $\alpha$  respectivamente. Al analizar el valor de sus constantes de acoplamiento, se determina que ambos hidrógenos se encuentran en orientación ecuatorial del anillo B.

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 32, Tabla 19), la señal más desplazada (174.3 ppm) se atribuye al carbonilo C-15 que conforma a la  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$  insaturada, seguida de la señal del carbono cuaternario de tipo vinílico en la posición C-13 (170.8 ppm). En la región de carbonos enlazados a oxígeno, se observan cuatro metinos (71.9, 54.9, 48.3 y 48.4 ppm), dos metilenos (73.3 y 64.4 ppm) y un carbono cuaternario (67.2 ppm), por lo que se identifica a las posiciones C-2, C-6 y C-7 como alcoholes terciarios, a la posición C-18 como alcohol secundario y la formación de un epóxido en las posiciones C-3 y C-4.

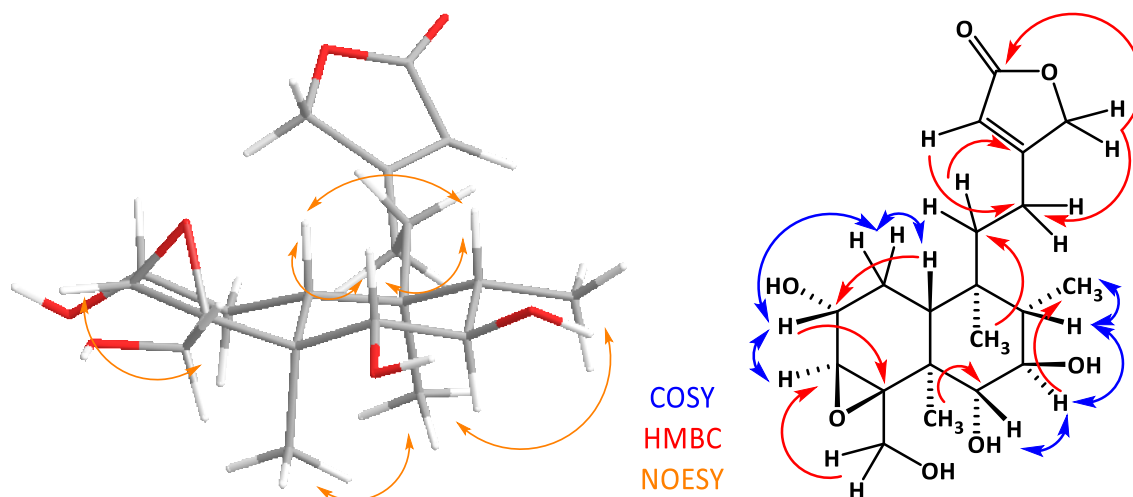
**Tabla 19.** Datos de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del compuesto 5.

Posición	Tipo*	$\delta_{\text{C}}$ /ppm	$\delta_{\text{H}}$ /ppm (número, multiplicidad, $J$ /Hz)
1 $\alpha$	CH <sub>2</sub>	35.7	1.64 (1H, <i>m</i> )
1 $\beta$			1.59 (1H, <i>m</i> )
2	CH	71.9	3.74 (1H, $dd_{\text{ancho}}$ 10.85, 4.8)
3	CH	54.9	3.32 (1H, <i>d</i> 2.68)
4	C	67.2	-
5	C	43.7	-
6	CH	48.3	3.36 (1H, $dd$ 4.60, 2.74)
7	CH	48.4	2.92 (1H, $dd$ 4.60, 4.57)
8	CH	34.4	1.57 (1H, <i>m</i> )
9	C	38.2	-
10	CH	41.6	1.61 (1H, <i>m</i> )
11a	CH <sub>2</sub>	36.4	1.76 (1H, $ddd$ 14.50, 12.88, 4.24 Hz)
11b			1.62 (1H, <i>m</i> )
12a	CH <sub>2</sub>	22.1	2.46 (1H, <i>m</i> )
12b			2.28 (1H, <i>m</i> )

13	C	170.8	-
14	CH	115.4	5.85 (1H, <i>s</i> <sub>Sancho</sub> )
15	C	174.3	-
16 <sub>Pro-R</sub>	CH <sub>2</sub>	73.3	4.79 (1H, <i>dd</i> 17.45, 1.79)
16 <sub>Pro-S</sub>			4.74 (1H, <i>dd</i> 17.45, 1.79)
17	CH <sub>3</sub>	15.2	0.86 (3H, <i>d</i> 6.36)
18 <sub>Pro-R</sub>	CH <sub>2</sub>	64.4	4.23 (1H, <i>d</i> 12.91)
18 <sub>Pro-S</sub>			3.37 (1H, <i>d</i> 13.10)
19	CH <sub>3</sub>	13.6	1.10 (3H, <i>s</i> )
20	CH <sub>3</sub>	18.3	0.95 (3H, <i>s</i> )

<sup>1</sup>H 700 MHz, <sup>13</sup>C 175 MHz, CDCl<sub>3</sub>. \*Obtenido con el espectro HSQC.

En los experimentos bidimensionales, se observan correlaciones (Figura 49) que sustentan la elucidación estructural del compuesto **5**, en el experimento COSY (Espectro 33) se observa el sistema de espín conformado por los hidrógenos H-10 $\beta$ , H-1 ( $\alpha$  y  $\beta$ ), H-2 $\beta$  y H-3 $\alpha$ ; de igual forma se observa el sistema de espín conformado por los hidrógenos H-6 $\beta$ , H-7 $\alpha$  y H-8 $\beta$ . Las correlaciones en el experimento NOESY (Espectro 36) permitieron asignar la configuración relativa de los estereocentros de la molécula, la correlación del hidrógeno H-7 con los hidrógenos del metilo C-20 indica una disposición  $\alpha$ -axial, la correlación del hidrógeno H-3 con los hidrógenos del metileno C-18 indica una disposición  $\alpha$ , el resto de los estereocentros pudieron ser definidos al analizar las constantes de acoplamiento de las señales en el espectro de RMN <sup>1</sup>H.



**Figura 49.** Correlaciones importantes en los experimentos bidimensionales sobre la estructura optimizada del compuesto **5**.



Este compuesto es inédito, por lo que se identificó con el nombre  $2\alpha,6\alpha,7\beta,18$ -tetrahidroxi-[ $3\beta,4\beta$ ]oxiran-neoclerodan-13-en-15,16-ólida.

### 6.1.6. Determinación estructural del compuesto 6

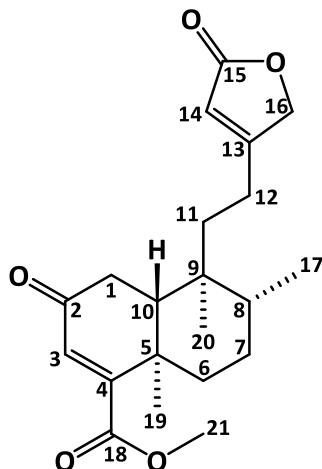


Figura 50. Estructura del compuesto 6.

El compuesto **6** (Figura 50) fue aislado en forma de cristales incoloros, del análisis de su espectro de masas mediante la técnica DART permitió calcular la fórmula molecular  $C_{21}H_{28}O_5$ . En su espectro IR se observa una banda intensa en  $1745\text{ cm}^{-1}$ , la cual corresponde a un estiramiento C=O de un carbonilo de  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$  insaturada, una banda intensa en  $1721\text{ cm}^{-1}$ , la cual corresponde a un estiramiento C=O de un carbonilo de éster y una banda intensa en  $1676\text{ cm}^{-1}$ , la cual corresponde a un estiramiento C=O de carbonilo de cetona. En este mismo espectro, se observan alrededor de  $1447$  y  $1435\text{ cm}^{-1}$  bandas que se atribuyen a las flexiones de grupos metilo, además, en  $733\text{ cm}^{-1}$  se observa una banda correspondiente con la flexión =C-H fuera del plano; en  $1233\text{ cm}^{-1}$  se observa una banda intensa que corresponde con el estiramiento asimétrico CO-O de una  $\gamma$ -lactona, cuyo estiramiento simétrico se observa en  $1020\text{ cm}^{-1}$ .

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 37, Tabla 20) se observan tres señales que integran para 3H lo que indica la presencia de tres metilos, dos de ellos son singuletes por lo que se

encuentran enlazados a carbonos cuaternarios, la otra es un doblete debido a que está enlazada a un metino, y presenta una constante de acoplamiento de 6.64 Hz. En este mismo espectro, se observa en la región de hidrógenos geminales a oxígeno, dos señales correspondientes a los hidrógenos de la posición H-16 (4.72 ppm, 2H *d*, *J*= 14.91 Hz) y a los hidrógenos del metilo del éster de la posición C-21 (3.80 ppm, 3H *s*); a frecuencias más altas, en la región de hidrógenos vinílicos se encuentran dos señales correspondientes a los hidrógenos H-3 (6.21 ppm, *Sancho*) y H-14 (5.83 ppm, *dd*, *J*= 1.61, 1.56 Hz).

En el espectro de RMN <sup>13</sup>C (Espectro 38, Tabla 20), la señal más desplazada (200.0 ppm) se atribuye al carbonilo C-2 de tipo cetona, seguida de la señal del carbonilo C-15 (173.9 ppm) que conforma a la  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$  insaturada, seguida de la señal a 169.9 ppm asignada al carbono cuaternario de tipo vinílico en la posición C-13, en la región de carbonos de tipo vinílico se observan dos metinos a 129.0 y 115.5 ppm, que se asignan a las posiciones C-3 y C-14 respectivamente.

**Tabla 20.** Datos de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C del compuesto 6.

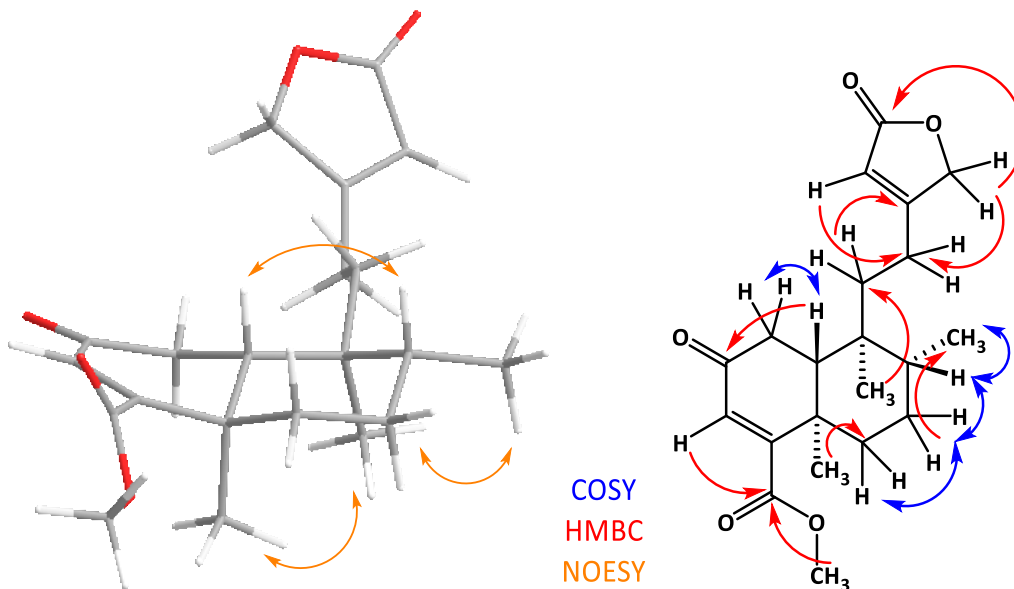
Posición	Tipo*	$\delta_c$ /ppm	$\delta_H$ /ppm (número, multiplicidad, <i>J</i> /Hz)
1 $\alpha$	CH <sub>2</sub>	35.2	2.51 (1H, <i>dd</i> 17.72, 14.48)
1 $\beta$			2.34 (1H, <i>dd</i> 17.73, 3.15)
2	C	200.0	-
3	CH	129.0	6.21 (1H, <i>Sancho</i> )
4	C	161.2	-
5	C	39.0	-
6 $\alpha$	CH <sub>2</sub>	34.7	2.13 (1H, <i>m</i> )
6 $\beta$			1.31 (1H, <i>ddd</i> 12.99, 12.88, 4.28)
7 $\alpha$	CH <sub>2</sub>	26.7	1.53 (1H, <i>m</i> )
7 $\beta$			1.56 (1H, <i>m</i> )
8	CH	36.1	1.49 (1H, <i>m</i> )
9	C	38.8	-
10	CH	46.0	1.86 (1H, <i>dd</i> 14.50, 3.14)
11a	CH <sub>2</sub>	22.0	2.28 (1H, <i>m</i> )
11b			2.11 (1H, <i>m</i> )
12	CH <sub>2</sub>	34.8	1.58 (2H, <i>m</i> )
13	C	169.9	-
14	CH	115.5	5.83 (1H, <i>dd</i> 1.61, 1.56)
15	C	173.9	-
16	CH <sub>2</sub>	73.1	4.72 (2H, <i>dd</i> 14.91, 1.51)
17	CH <sub>3</sub>	15.8	0.85 (3H, <i>d</i> 6.64)
18	C	167.3	-
19	CH <sub>3</sub>	18.9	1.41 (3H, <i>s</i> )

20	CH <sub>3</sub>	17.8	0.88 (3H, s)
21	CH <sub>3</sub>	52.4	3.80 (3H, s)

<sup>1</sup>H 700 MHz, <sup>13</sup>C 175 MHz, CDCl<sub>3</sub>. \*Obtenido con el espectro HSQC.

En los experimentos bidimensionales, se observan correlaciones (Figura 51) que sustentan la elucidación estructural del compuesto **6**. En el experimento COSY (Espectro 39) se observa el sistema de espín conformado por los hidrógenos H-6 ( $\alpha$  y  $\beta$ ), H-7 ( $\alpha$  y  $\beta$ ) y H-8 $\beta$ .

Las correlaciones en el experimento NOESY (Espectro 42) permitieron asignar la configuración relativa de los estereocentros de la molécula, la correlación del hidrógeno H-8 con el hidrógeno H-10 indica una disposición  $\beta$ -axial para ambos, la correlación de los hidrógenos de los metilos C-17, C-19 y C-20 permiten proponer una disposición  $\alpha$  para los tres casos. Con el experimento HMBC (Espectro 41), se asigna el carbonilo de tipo cetona para la posición C-2 debido a la correlación con el hidrógeno H-10 $\beta$  y el ácido esterificado se encuentra en la posición C18 debido a su correlación con el hidrógeno H-3.



**Figura 51.** Correlaciones importantes en los experimentos bidimensionales sobre la estructura optimizada del compuesto **6**.

El compuesto **6** se aisló gracias a la metilación de la fracción de la que provino empleando diazometano como agente metilante. La esterificación permitió una mejor separación en la fase estacionaria empleada para la separación cromatográfica de la fracción de donde provino. Se propone que el *neo*-clerodano presente en la especie *S. thymoides* es el ácido carboxílico correspondiente (Figura 52), el cual se esterificó a pH ligeramente básico impuesto por el diazometano a través del mecanismo propuesto en la figura 53.

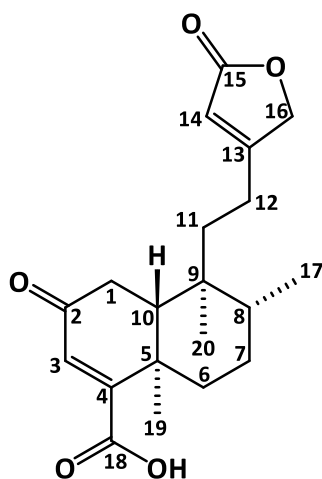


Figura 52. Precursor del compuesto **6**.

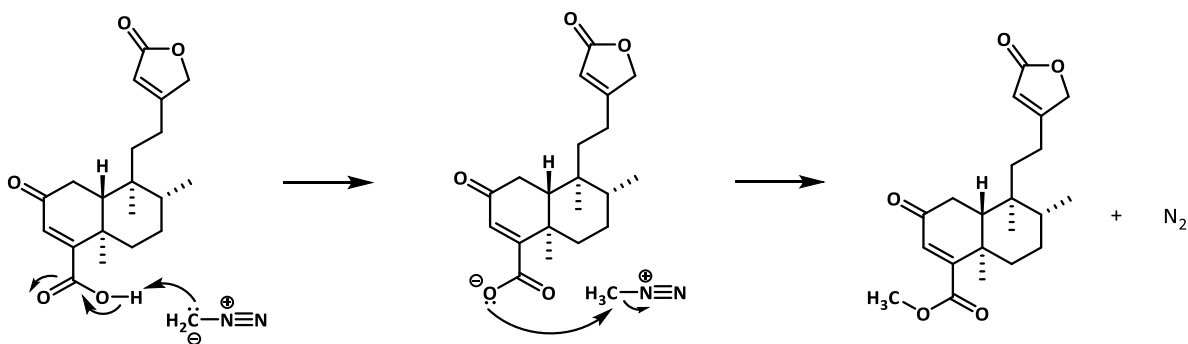


Figura 53. Mecanismo de formación del compuesto **6**.

En 1973, se aisló de *Leonurus marrubiastrum*<sup>125</sup> un isómero del compuesto **6** con la configuración (5*S*, 8*S*, 9*R*, 10*S*) y fue identificado como el 2-oxomarubiagenina-metiléster, analizando los datos espectroscópicos presentados en dicho trabajo se encontraron similitudes con la información presentada en esta tesis; sin embargo, tanto el compuesto **6** como el ácido carboxílico del que se deriva no han sido descritos. Se nombró al compuesto **6** como el éster metílico del ácido 2-oxo-neoclerodan-3,13-dien-15,16-ólida-18-óico.

### 6.1.7. Determinación estructural del compuesto **7**

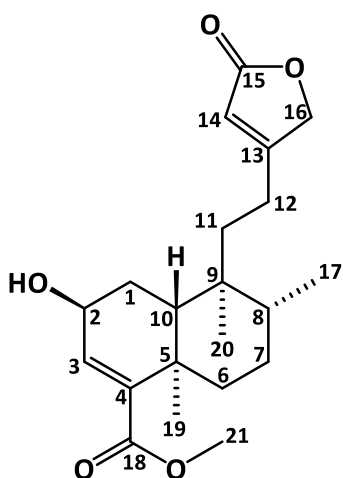


Figura 54. Estructura del compuesto **7**.

El compuesto **7** (Espectro 54) fue aislado en forma de cristales incoloros. Del análisis de su espectro de masas mediante la técnica DART se dedujo una fórmula molecular  $C_{21}H_{30}O_5$ . En su espectro IR se observa una banda ancha en  $3452\text{ cm}^{-1}$  que se atribuye a un estiramiento O-H de un alcohol, una banda intensa en  $1743\text{ cm}^{-1}$ , que corresponde a un estiramiento C=O de un carbonilo de  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$  insaturada y una banda intensa en  $1712\text{ cm}^{-1}$ , la cual corresponde a un estiramiento C=O de un carbonilo de un éster. En este mismo espectro, alrededor de  $1434\text{ cm}^{-1}$  se observan bandas que se atribuyen a las flexiones de grupos metilo, además, en  $729\text{ cm}^{-1}$  se observa una banda correspondiente con la flexión C=C-H

<sup>125</sup> Tschesche, R.; Plenio, H. U. Über Marrubiasid und Marrubialacton, zwei diterpenderivate mi umgelagertem labdangengerüst aus *Leonurus marrubiastrum* L. *Chem. Ber.* **1973**, 106, 2929-2942.

fuera del plano; en  $1236\text{ cm}^{-1}$  se observa una banda intensa que corresponde con el estiramiento asimétrico CO-O de una  $\gamma$ -lactona, cuyo estiramiento simétrico se observa en  $1021\text{ cm}^{-1}$ .

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Espectro 43, Tabla 21) se observa a frecuencias altas los hidrógenos de los metinos vinílicos asignados a las posiciones H-3 ( $6.46\text{ ppm}$ ,  $dd_{\text{ancho}}$ ,  $J=2.24, 1.30\text{ Hz}$ ) y H-14 ( $5.84\text{ ppm}$ ,  $m$ ), se empleó el valor de las constantes de acoplamiento como criterio para asignar cada posición, ya que la señal de H-3 presenta acoplamientos con el hidrógeno H- $2\alpha$  y acoplamiento en "M o W" con uno de los hidrógenos de la posición C-1 la cual puede corroborarse con la correlación presentada en el experimento COSY (Espectro 45).

Hay tres señales en la región de hidrógenos geminales a oxígeno. En el experimento HSQC (Espectro 46) se observa que se trata de un metino, un metileno y un metilo, los cuales se asignan al metino C-2 ( $4.33\text{ ppm}$ ,  $ddd$ ,  $J=9.87, 6.93, 2.52\text{ Hz}$ ), al metileno C-16 ( $4.72\text{ ppm}$ ,  $dd$ ,  $J=13.12, 1.81\text{ Hz}$ ) y al metilo C-21 ( $3.70\text{ ppm}$ ,  $s$ ). El valor de las constantes de acoplamiento es el criterio para asignar dichas posiciones y para determinar la configuración relativa de la posición H-2 ( $\alpha$ -ecuatorial), la cual puede corroborarse con las correlaciones observadas en el experimento NOESY (Espectro 48).

Se observa en la región de baja frecuencia, tres señales que integran para  $3\text{H}$  lo que indica la presencia de tres metilos alifáticos, dos de ellas son singuletes (C-19 y C-20) por lo que dichos metilos se encuentran enlazados a carbonos cuaternarios, la otra señal es un doblete (C-17) debido a que está enlazada a un metino y presenta una constante de acoplamiento de  $6.75\text{ Hz}$ .

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 44, Tabla 21) la señal más desplazada ( $174.1\text{ ppm}$ ) se atribuye al carbonilo C-15 de la  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$  insaturada, seguida de una señal a  $170.7\text{ ppm}$  asignada al carbono cuaternario de tipo vinílico ubicado en la posición C-13, por lo que la señal en  $143.7\text{ ppm}$  se asigna a C-4, que también corresponde a un carbono cuaternario de tipo vinílico.

**Tabla 21.** Datos de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del compuesto **7**.

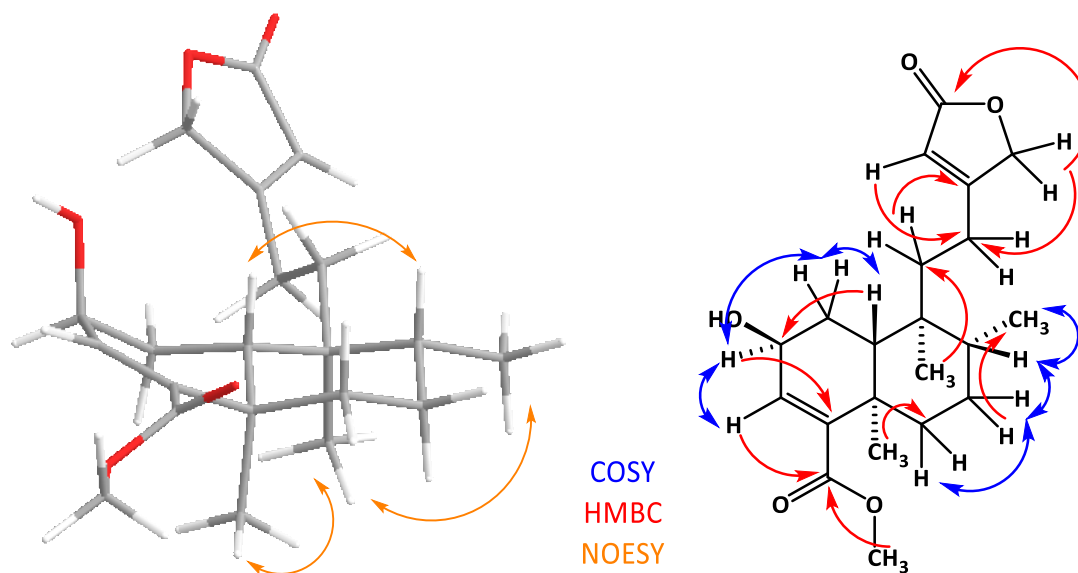
Posición	Tipo*	$\delta_{\text{C}}$ /ppm	$\delta_{\text{H}}$ /ppm (número, multiplicidad, J /Hz)
1 $\alpha$	CH <sub>2</sub>	28.2	1.50 (1H, <i>dd</i> <sub>ancho</sub> 12.66, 2.44)
1 $\beta$			1.95 (1H, <i>dd</i> <sub>ancho</sub> 12.74, 6.91)
2	CH	69.0	4.33 (1H, <i>ddd</i> 9.87, 6.93, 2.52)
3	CH	138.0	6.46 (1H, <i>dd</i> 2.24, 1.30)
4	C	143.7	-
5	C	38.3	-
6 $\alpha$	CH <sub>2</sub>	35.6	2.25 (1H, <i>ddd</i> 13.23, 3.20, 3.17)
6 $\beta$			1.10 (1H, <i>ddd</i> 12.88, 12.87, 3.95)
7 $\alpha$	CH <sub>2</sub>	27.0	1.46 (1H, <i>m</i> )
7 $\beta$			1.43 (1H, <i>m</i> )
8	CH	36.2	1.44 (1H, <i>m</i> )
9	C	38.6	-
10	CH	45.5	1.30 (1H, <i>da</i> 6.91)
11a	CH <sub>2</sub>	35.4	1.57 (1H, <i>m</i> )
11b			1.67 (1H, <i>ddd</i> 13.68, 13.04, 4.90)
12a	CH <sub>2</sub>	22.3	2.11 (1H, <i>m</i> )
12b			2.27 (1H, <i>m</i> )
13	C	170.7	-
14	CH	115.3	5.84 (1H, <i>m</i> )
15	C	174.1	-
16	CH <sub>2</sub>	73.2	4.72 (2H, <i>dd</i> 13.12, 1.81)
17	CH <sub>3</sub>	16.1	0.81 (3H, <i>d</i> 6.75)
18	C	167.5	-
19	CH <sub>3</sub>	20.8	1.32 (3H, <i>s</i> )
20	CH <sub>3</sub>	18.4	0.80 (3H, <i>s</i> )
21	CH <sub>3</sub>	51.7	3.70 (3H, <i>s</i> )

$^1\text{H}$  700 MHz,  $^{13}\text{C}$  175 MHz, CDCl<sub>3</sub>. \*Obtenido con el espectro HSQC.

En los experimentos bidimensionales se observan correlaciones (Figura 55) que sustentan la elucidación estructural del compuesto **7**. En el experimento COSY se pueden observar las correlaciones del sistema de espín compuesto por el hidrógeno H10 $\beta$ , los hidrógenos H-1 ( $\alpha$  y  $\beta$ ), el hidrógeno geminal a oxígeno en H2 $\alpha$  y el hidrógeno vinílico H3, así como las correlaciones del sistema de espín compuesto por los hidrógenos de las posiciones C-6 y C-7, así como del hidrógeno del metino C-8 y los hidrógenos del metilo C-17.

Las correlaciones en el experimento NOESY permitieron asignar la configuración relativa de los estereocentros de la molécula. La correlación del hidrógeno H-8 con el hidrógeno H-10 indica una disposición  $\beta$ -axial para ambos, la correlación de los hidrógenos de los metilos C-17, C-19 y C-20 permiten proponer una disposición  $\alpha$  para los tres casos. Con el experimento

HMBC (Espectro 47) se identifica un hidroxilo en la posición C-2 debido a su correlación con el hidrógeno H-10 $\beta$  y el ácido esterificado se encuentra en la posición C-18 debido a su correlación a tres enlaces con el hidrógeno H-3.



**Figura 55.** Correlaciones importantes en los experimentos bidimensionales sobre la estructura optimizada del compuesto **7**.

El compuesto **7** fue aislado gracias a la metilación de la fracción de la que provino empleando diazometano como agente esterificante del ácido carboxílico de la posición C-18. La esterificación permitió una mejor separación en la fase estacionaria empleada para la separación cromatográfica de la fracción de donde provino. Se propone que el *neo*-clerodano presente en la especie *S. thymoides* es el ácido carboxílico del que se deriva el compuesto **7** (Figura 56), el cual fue esterificado a pH ligeramente básico con diazometano a través del mecanismo similar al propuesto en la Figura 53.



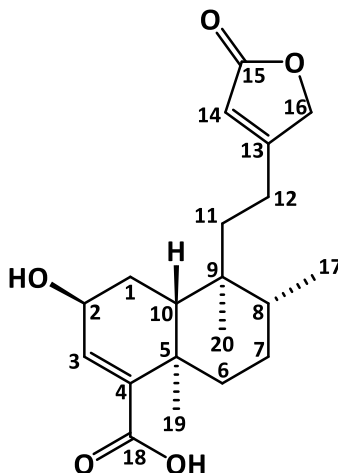


Figura 56. Precursor del compuesto 7.

En 1973 se aisló de *Leonurus marrubiastrum*<sup>125</sup> un isómero del compuesto **7** con la configuración (5*S*, 8*S*, 9*R*, 10*S*), que fue identificado como el 2-hidroximarubiagenina-metiléster. Analizando los datos espectroscópicos presentados en dicho trabajo se encontraron varias similitudes con la información presentada en esta tesis. Sin embargo, tanto el compuesto **7** como el ácido carboxílico del que se deriva no han sido descritos. Se nombró al compuesto **7** como el éster metílico del ácido 2β-hidroxi-neoclerodan-3,13-dien-15,16-ólida-18-óico.

### 6.1.8. Determinación estructural del compuesto 8

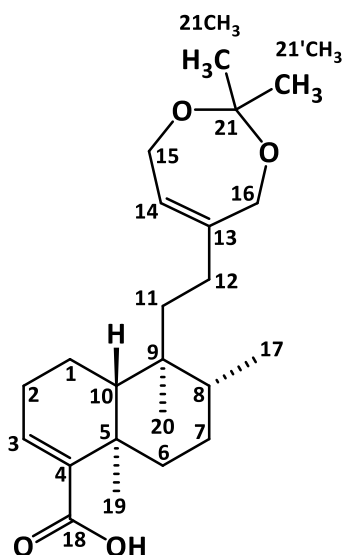


Figura 57. Estructura del compuesto 8.

El compuesto **8** (Figura 57) fue aislado en forma de cristales incoloros, del análisis de su espectro de masas mediante la técnica DART se dedujo la fórmula molecular C<sub>23</sub>H<sub>36</sub>O<sub>4</sub>. En su espectro IR se observa una banda ancha en 3410 cm<sup>-1</sup> que se atribuye a un estiramiento O-H de un ácido carboxílico, y una banda intensa en 1681 cm<sup>-1</sup> la cual corresponde a un estiramiento C=O de un carbonilo de ácido carboxílico. En este mismo espectro se observan alrededor de 1452 cm<sup>-1</sup> bandas que se atribuyen a las flexiones de grupos metilo, además, en 770 cm<sup>-1</sup> se observa una banda correspondiente con la flexión =C-H fuera del plano; en 1217 cm<sup>-1</sup> se observa una banda intensa que corresponde al estiramiento C-O.

En el espectro de RMN <sup>1</sup>H (Espectro 49, Tabla 22), se observan tres señales que integran para 3H y una que integra para 6H, lo que indica la presencia de cinco metilos, de los cuales dos son espectroscópicamente equivalentes, tres de estas señales son singuletes, lo que indica que son metilos enlazados a carbonos cuaternarios y la señal restante es un doblete con constante de acoplamiento de 5.96 Hz, indicativo de que es un metilo enlazado a un metino.

En el mismo espectro se observan dos señales que corresponden a los metinos vinílicos de las posiciones C-3 y C-14. También se observan dos señales en la región de hidrógenos geminales a oxígeno, asignadas a los hidrógenos de las posiciones C-15 y C-16.

En el espectro de RMN <sup>13</sup>C (Espectro 50, Tabla 22) se observan más señales a las esperadas en un diterpeno (C<sub>20</sub>) por lo que se propone la adición de tres átomos de carbono, dos metilos correspondientes a la señal en 24.0 ppm y un cuaternario correspondiente a la señal en 102.1 ppm, que se trata de un desplazamiento característico a un grupo funcional de tipo cetal, específicamente de un acetónido. En el espectro 50 también se observa que solo hay una señal correspondiente a un carbonilo (172.1 ppm) de ácido carboxílico, que se encuentra situado en la posición C-18. También, se observan las señales de dos metinos en la región de los vinílicos a 140.3 y 122.8 ppm correspondientes a las posiciones C-3 y C-14 respectivamente.

El compuesto **8** no ha sido descrito anteriormente, sin embargo, el diol del que se deriva fue aislado de *Salvia adenophora* en 2015,<sup>19</sup> identificado con el nombre de ácido (5*R*,8*R*,9*S*,10*R*)-15,16-diol-13-en-15,16-dihidro-18-óico-hardwíckiico, por lo que se identificó a **8** como el ácido (5*R*,8*R*,9*S*,10*R*)-12-[21-dimetil[15,16]dioxepin]-13-en-15,16-dihidro-18-óico-hardwíckiico.

**Tabla 22.** Comparación de los datos de RMN del compuesto **8** aislado en este trabajo con los datos reportados en 2014 para el diol del que se deriva.

Posición	Tipo*	Compuesto <b>8</b> aislado en el presente trabajo <sup>a</sup>		Diol del que deriva el compuesto <b>8</b> , reportado en 2014 <sup>b</sup>	
		δ <sub>c</sub> /ppm	δ <sub>H</sub> /ppm (número, multiplicidad, J /Hz)	δ <sub>c</sub> /ppm	δ <sub>H</sub> /ppm (número, multiplicidad, J /Hz)
1α	CH <sub>2</sub>	17.5	1.61 (1H, <i>dd</i> <sub>ancho</sub> 9.25, 1.22)	17.6	1.67 (1H, <i>m</i> )
1β			1.48 (1H, <i>m</i> )		1.47 (1H, <i>m</i> )
2α	CH <sub>2</sub>	27.6	2.30 (1H, <i>dddd</i> 19.91, 5.92, 4.70, 1.04)	27.4	2.32 (1H, <i>m</i> )
2β			2.12 (1H, <i>m</i> )		2.22 (1H, <i>m</i> )
3	CH	140.3	6.83 (1H, <i>dd</i> <sub>ancho</sub> 4.86, 2.83)	140.1	6.82 (1H, <i>S</i> <sub>ancho</sub> )
4	C	141.6	-	141.3	-
5	C	37.7	-	38.9	-

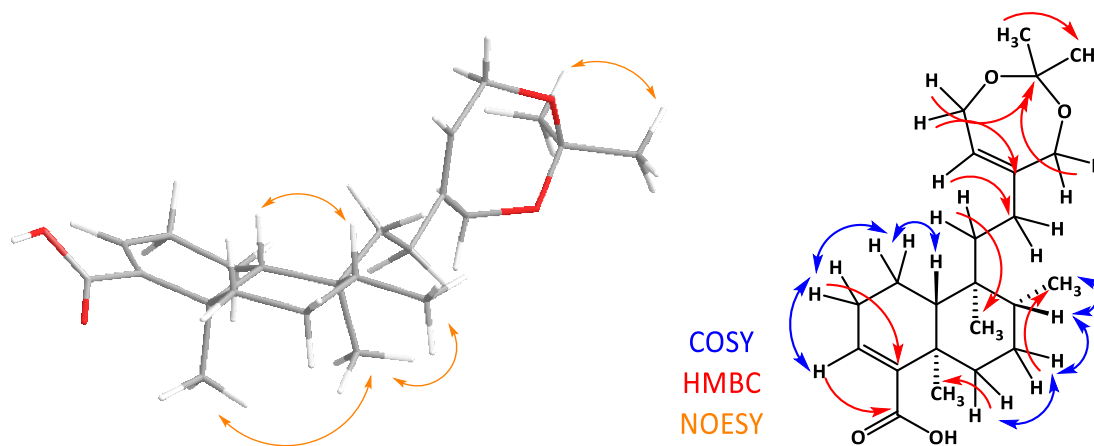
6 $\alpha$	CH <sub>2</sub>	35.9	2.39 (1H, <i>ddd</i> 13.26, 3.2, 3.19)	35.9	2.40 (1H, <i>m</i> )
6 $\beta$			1.13 (1H, <i>m</i> )		1.15 (1H, <i>m</i> )
7 $\alpha$	CH <sub>2</sub>	27.4	1.46 (1H, <i>m</i> )	27.6	1.49 (1H, <i>m</i> )
7 $\beta$			1.40 (1H, <i>m</i> )		1.44 (1H, <i>m</i> )
8	CH	36.3	1.45 (1H, <i>m</i> )	35.9	1.52 (1H, <i>m</i> )
9	C	38.8	-	39.0	-
10	CH	46.8	1.28 (1H, <i>dd</i> 12.17, 1.59)	46.8	1.34 (1H, <i>m</i> )
11a	CH <sub>2</sub>	36.8	1.38 (1H, <i>m</i> )	36.4	1.54 (1H, <i>m</i> )
11b			1.35 (1H, <i>m</i> )		1.43 (1H, <i>m</i> )
12a	CH <sub>2</sub>	27.8	1.81 (1H, <i>ddd</i> 14.02, 13.71, 3.5)	29.2	2.02 (1H, <i>m</i> )
12b			1.68 (1H, <i>ddd</i> 13.86, 13.58, 3.99)		1.89 (1H, <i>m</i> )
13	C	141.9	-	144.8	-
14	CH	122.8	5.34 (1H, <i>s<sub>ancho</sub></i> )	126.3	5.61 (1H, <i>t</i> 7.0)
15	CH <sub>2</sub>	61.0	4.20 (2H, <i>s<sub>ancho</sub></i> )	58.8	4.21 (2H, <i>s<sub>ancho</sub></i> )
16	CH <sub>2</sub>	64.8	4.16 (2H, <i>s<sub>ancho</sub></i> )	61.3	4.18 (2H, <i>s<sub>ancho</sub></i> )
17	CH <sub>3</sub>	16.0	0.79 (3H, <i>d</i> 5.96)	16.1	0.81 (3H, <i>d</i> 6.5)
18	C	172.1	-	170.6	-
19	CH <sub>3</sub>	20.7	1.06 (3H, <i>s</i> )	20.7	1.25 (3H, <i>s</i> )
20	CH <sub>3</sub>	18.5	0.73 (3H, <i>s</i> )	18.5	0.75 (3H, <i>s</i> )
21	C	102.1	-	-	-
21 CH <sub>3</sub> 21' CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	24.0	1.43 (6H, <i>s</i> )	-	-

a) <sup>1</sup>H 700 MHz, <sup>13</sup>C 175 MHz, CDCl<sub>3</sub>. \*Obtenido con el espectro HSQC. b) <sup>1</sup>H 600 MHz, <sup>13</sup>C 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>.

Comparando la información espectroscópica presentada en esta tesis con la del trabajo publicado en el 2015,<sup>19</sup> se observan ligeros cambios en los desplazamientos de las señales de RMN, sin embargo, la asignación concuerda para ambos casos, sin contar las señales adicionales para el caso del compuesto **8**, que se encuentra formando un acetónido. Además, se puede complementar la información respecto a las señales que se encuentran a frecuencias bajas con espectros de mayor resolución.

En los experimentos bidimensionales se observan correlaciones (Figura 58) que sustentan la elucidación estructural del compuesto **8**. En el experimento HMBC (Espectro 53) hay correlaciones de dos metilenos enlazados a oxígeno con el carbono cuaternario de la posición adicionada nombrada como C-21, esto indica que en lugar de una  $\gamma$ -lactona, hay un ciclo de 7 miembros formado por un acetónido que conecta a las posiciones C-15 y C-16, y una insaturación entre C-13 y C-14. En el experimento HSQC (Espectro 52) se observa la

presencia de 6 metilenos alifáticos (C-1, C-2, C-6, C-7, C-11 y C-12), y en el experimento COSY (Espectro 51) se observa el sistema de espín compuesto por el hidrógeno H-10 $\beta$ , los hidrógenos H-1 ( $\alpha$  y  $\beta$ ), H-2 ( $\alpha$  y  $\beta$ ), y el hidrógeno vinílico H-3, también se puede observar el sistema de espín compuesto por los hidrógenos de los metilenos H-6 ( $\alpha$  y  $\beta$ ) y H-7 ( $\alpha$  y  $\beta$ ) y el hidrógeno H-8 $\beta$ .



**Figura 58.** Correlaciones importantes en los experimentos bidimensionales sobre la estructura optimizada del compuesto **8**.

El compuesto **8** fue aislado e identificado como un artefacto producto de la reacción de acetona con los hidroxilos en las posiciones C-15 y C-16 mediante un mecanismo (Figura 61) en el que se propone dicho proceso catalizado por un pH ácido. Es probable que la formación del compuesto **8** se llevó a cabo durante el tratamiento cromatográfico, ya que las separaciones se llevaron a cabo en presencia de fases móviles con contenido de acetona y la acidez requerida para la formación del acetónido se debe al pH ligeramente ácido de la fase estacionaria sílica gel,<sup>126</sup> en la cual pudo suscitar un proceso de hidrólisis con la presencia de humedad del ambiente o de los disolventes empleados en el tratamiento cromatográfico, generando en la sílica sitios disponibles en los cuales se puede liberar la especie ácida hidronio, capaz de llevar a cabo la acetonicación en **8**, esto lleva a proponer

<sup>126</sup> Balköse, D. Effect of preparation pH on properties of silica gel. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* **1990**, 49, 165-171.

que el *neo*-clerodano presente en la especie *S. thymoides* es el diol mostrado en la Figura 60.

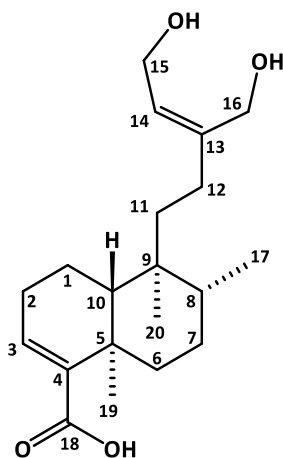


Figura 59. Precursor del compuesto 8.

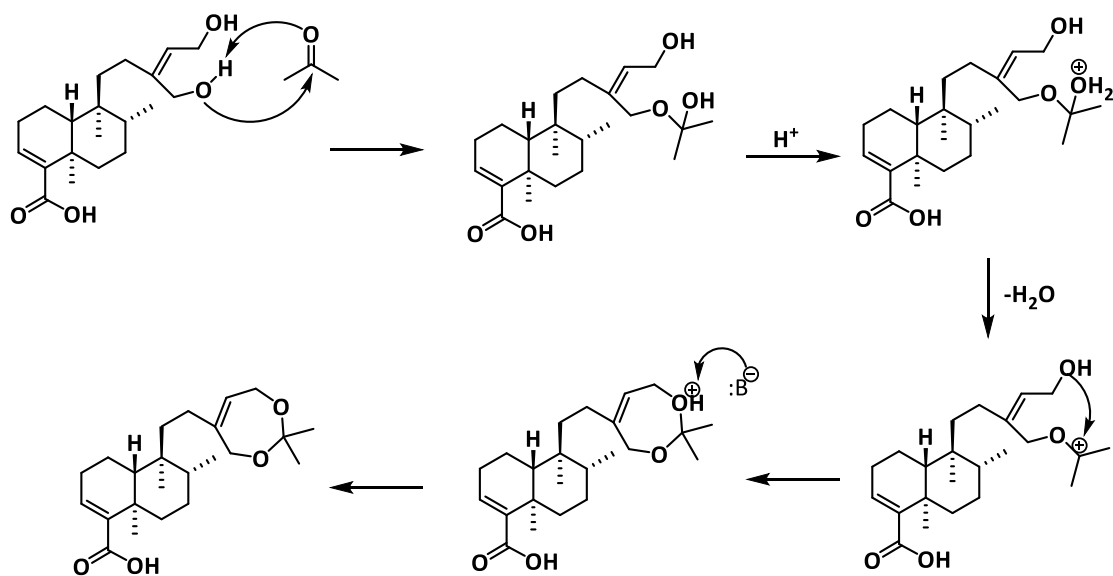
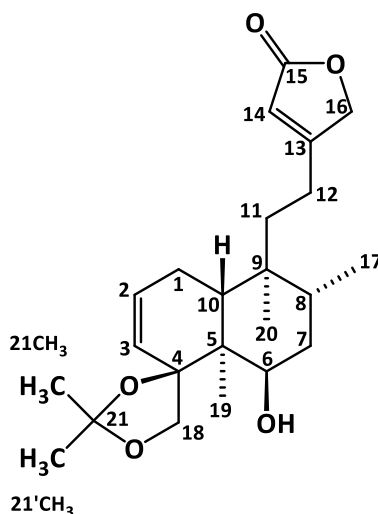


Figura 60. Mecanismo propuesto para la formación del compuesto 8.

### 6.1.9. Determinación estructural del compuesto 9



**Figura 61.** Estructura del compuesto 9.

El compuesto **9** (Figura 61) fue aislado en forma de cristales incoloros, del análisis de su espectro de masas mediante la técnica DART se dedujo una fórmula molecular C<sub>23</sub>H<sub>34</sub>O<sub>5</sub>. En su espectro IR se puede observar una banda ancha en 3476 cm<sup>-1</sup> que se atribuye a un estiramiento O-H de un alcohol y una banda intensa en 1743 cm<sup>-1</sup>, la cual corresponde a un estiramiento C=O de un carbonilo de  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$  insaturada. En el mismo espectro, alrededor de 1450 cm<sup>-1</sup> se observan bandas que se atribuyen a las flexiones de grupos metilo, además, en 729 cm<sup>-1</sup> se observa una banda correspondiente con la flexión =C-H fuera del plano y en 1214 cm<sup>-1</sup>, una banda intensa que corresponde con el estiramiento asimétrico CO-O de una  $\gamma$ -lactona, cuyo estiramiento simétrico se observa en 1016 cm<sup>-1</sup>.

En el espectro de RMN <sup>1</sup>H (Espectro 55, Tabla 23) se observan 5 señales que integran para 3H, lo que indica la presencia de cinco metilos, cuatro de estas señales son singuletes, indicativo de metilos enlazados a carbonos cuaternarios, y la señal restante es un doblete con constante de acoplamiento de 6.24 Hz, correspondiente a un metilo enlazado a un metino.

Se observa la presencia de tres señales en la región de hidrógenos vinílicos (5.47, 5.94 y 5.81 ppm), por lo que se asume que hay una insaturación entre dos metinos (C-2 y C-3) y una insaturación entre un metino y un carbono cuaternario (C-13 y C-14). También se observa una señal en 3.99 ppm con una multiplicidad  $dd_{\text{ancho}}$ ,  $J = 10.27$  y  $5.69$  Hz, cuyo desplazamiento corresponde a un hidrógeno geminal a oxígeno y se asigna al hidrógeno H6, el cual presenta una disposición  $\alpha$ -ecuatorial debido al valor de las constantes de acoplamiento, que sugieren un acoplamiento de tipo geminal (10.27 Hz), uno de tipo ecuatorial-axial (5.69 Hz) y uno de tipo ecuatorial-ecuatorial (ensanchamiento de la señal).

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (Espectro 56, Tabla 23) se observan más señales a las esperadas en un diterpeno ( $\text{C}_{20}$ ), por lo que se propone la adición de tres átomos de carbono, dos metilos correspondientes a las señales en 26.5 y 25.9 ppm y un cuaternario correspondiente a la señal en 109.7 ppm, que se trata de un desplazamiento característico a un grupo funcional de tipo cetal, en específico de un acetónido. En el espectro 56 se observa una señal correspondiente a un carbonilo (174.2 ppm) de  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$  insaturada situado en la posición C-15.

**Tabla 23.** Datos de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del compuesto **9**.

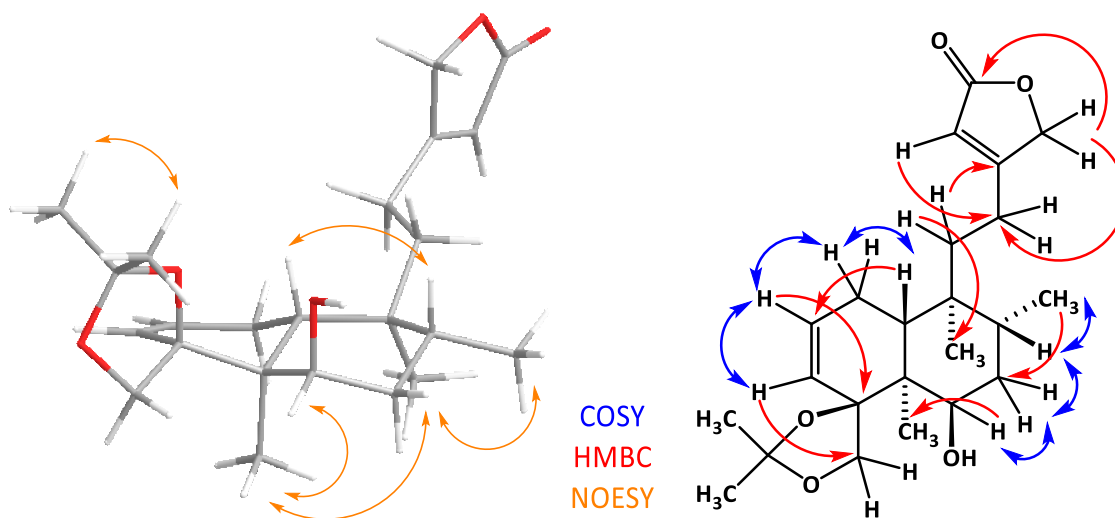
Posición	Tipo*	$\delta_{\text{C}}/\text{ppm}$	$\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$ (número, multiplicidad, $J/\text{Hz}$ )
1 $\alpha$	CH <sub>2</sub>	23.5	2.06 (1H, <i>m</i> )
1 $\beta$			1.94 (1H, <i>ddd</i> 18.0, 5.4, 2.8)
2	CH	131.5	5.94 (1H, <i>dddd</i> 10.63, 5.60, 3.06, 2.93)
3	CH	130.5	5.47 (1H, <i>dt</i> 9.80, 2.13)
4	C	84.4	-
5	C	44.7	-
6	CH	71.4	3.99 (1H, <i>dd</i> <sub>ancho</sub> 10.27, 5.69)
7 $\alpha$	CH <sub>2</sub>	34.9	1.57 (1H, <i>m</i> )
7 $\beta$			2.51 (1H, <i>m</i> )
8	CH	35.2	1.58 (1H, <i>m</i> )
9	C	38.8	-
10	CH	38.4	1.69 (1H, <i>dd</i> <sub>ancho</sub> 11.82, 5.09)
11a	CH <sub>2</sub>	35.1	1.56 (1H, <i>m</i> )
11b			1.49 (1H, <i>m</i> )
12a	CH <sub>2</sub>	22.2	2.27 (2H, <i>dd</i> <sub>ancho</sub> 14.0, 12.23)
12b			
13	C	171.0	-
14	CH	115.1	5.81 (1H, <i>s</i> <sub>ancho</sub> )
15	C	174.2	-



16 <sub>Pro-R</sub>	CH <sub>2</sub>	73.3	4.72 (2H, <i>d</i> <sub>ancho</sub> 17.9)
16 <sub>Pro-S</sub>			
17	CH <sub>3</sub>	15.5	0.84 (3H, <i>d</i> 6.24)
18 <sub>Pro-R</sub>	CH <sub>2</sub>	71.1	4.60 (1H, <i>dd</i> 9.5, 2.39)
18 <sub>Pro-S</sub>			3.63 (1H, <i>dd</i> 9.6, 1.92)
19	CH <sub>3</sub>	11.5	0.93 (3H, <i>s</i> )
20	CH <sub>3</sub>	18.0	0.86 (3H, <i>s</i> )
21	C	109.7	-
21 CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	26.5	1.53 (3H, <i>s</i> )
21' CH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	25.9	1.41 (3H, <i>s</i> )

<sup>1</sup>H 700 MHz, <sup>13</sup>C 175 MHz, CDCl<sub>3</sub>. \*Obtenido con el espectro HSQC.

En los experimentos bidimensionales se observan correlaciones (Figura 62) que sustentan la elucidación estructural del compuesto **9**. En el experimento HMBC (Espectro 59) hay correlaciones de los hidrógenos de un metileno geminales a oxígeno con el carbono cuaternario de la posición C-21, esto indica que no se encuentra la insaturación habitual entre C-3 y C-4 ya que en este caso la posición C-4 se encuentra enlazada a oxígeno formando un ciclo de 5 miembros junto a los carbonos C-18 y C-21. En el experimento HSQC (Espectro 58) se observa la presencia de cuatro metilenos alifáticos (C-1, C-7, C-11 y C-12) y en el experimento COSY (Espectro 57) se observan el sistema de espín compuesto por el hidrógeno H-10β, los hidrógenos H-1 (α y β) y los hidrógenos vinílicos H-2 y H-3; también se puede observar el sistema de espín compuesto por el hidrógeno geminal a oxígeno en C-6, los hidrógenos H-7 (α y β) y el hidrógeno H-8β.



**Figura 62.** Correlaciones importantes en los experimentos bidimensionales sobre la estructura optimizada del compuesto **9**.

El compuesto **9** fue aislado e identificado como un artefacto producto de la adición de una molécula de acetona entre los hidroxilos de las posiciones C-4 y C-18 mediante un mecanismo similar al presentado en la Figura 60 para el compuesto **8**. Así, se propone que este producto de reacción se obtuvo mediante la catálisis ácida promovida por el gel de sílice durante el tratamiento cromatográfico, por lo que se establece que el metabolito presente en el extracto de diclorometano de *S. thymoides* es un diol en las posiciones C-4 y C-18 (Figura 64) del cual no hay reportes previos en las bases de datos por lo que es un compuesto nuevo.

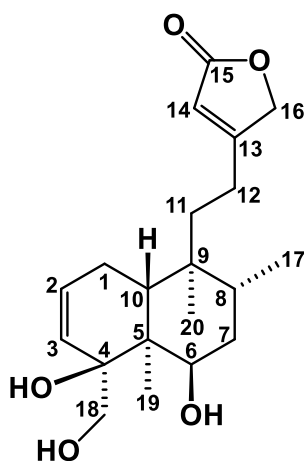
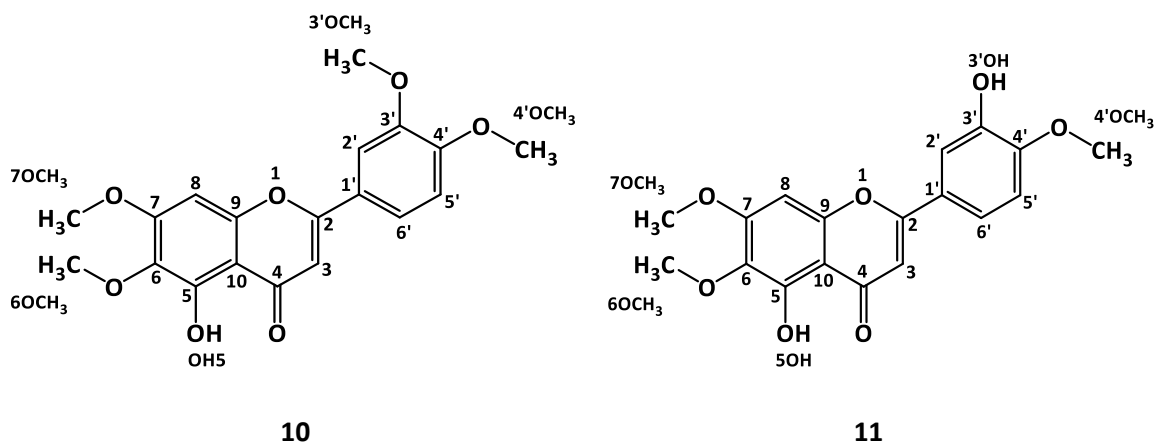


Figura 63. Precursor del compuesto 9.

Tanto este compuesto como el diol del que deriva no han sido descritos. Se identificó a **9** con el nombre de 6 $\beta$ -hidroxi-4-spiro-[21-dimetil-[4 $\beta$ ,18 $\alpha$ ]dioxolan]-neoclerodan-2,13-dien-15,16-ólida.

### 6.1.10. Identificación de los compuestos (10-13)



**Figura 64.** Estructura de los compuestos **10** y **11**.

Los compuestos **10** y **11** (Figura 64) se identificaron como la 5-hidroxi-6,7,3',4'-tetrametoxiflavona y la eupatorina respectivamente. Presentan una estructura de tipo flavona y han sido ampliamente reportadas para otras especies del género *Salvia*, como *S. tomentosa*,<sup>127</sup> *S. cardiophylla*,<sup>128</sup> *S. palaefolia*,<sup>129</sup> *S. lavanduloides*,<sup>130</sup> y *S. mirzayanii*<sup>131</sup>; así como de diferentes especies vegetales como *Achillea millefolium*,<sup>132</sup> *Orthosiphon*

<sup>127</sup> Ulubelen, A.; Miski, M.; Neuman, P.; Mabry, T. J. Flavonoids of *Salvia tomentosa* (Labiatae). *J. Nat. Prod.* **1979**, 42(3), 261-263.

<sup>128</sup> González, A. G.; Herrera, J. R.; Luis, J. G.; Ravelo, A. G.; Ferro, E. A. Terpenes and flavones of *Salvia cardiophylla*. *Phytochemistry* **1988**, 27(5), 1540-1541.

<sup>129</sup> González, A. G.; Luis, J. G.; Grillo, T. A.; Vázquez, J. T. A new  $\beta$ -agarofuran sesquiterpene dibenzoate from *Salvia palaefolia*. *J. Nat. Prod.* **1991**, 54(2), 579-581.

<sup>130</sup> González-Cortazar, M.; Salinas-Sánchez, D. O.; Herrera-Ruiz, M.; Román-Ramos, D. C.; Zamilpa, A.; Jiménez-Ferrer, E.; Ble-González, E. A.; Álvarez-Fitz, P.; Castrejón-Salgado, R.; Pérez-García M. D.; Eupatorin and salviandulin-A with antimicrobial and anti-inflammatory effects from *Salvia lavanduloides* Kunth leaves. *Plants* **2022**, 11(13), 1739.

<sup>131</sup> Sarvestani, N. N.; Sepehri, H.; Delphi, L.; Farimani, M. M. Eupatorin and salvigenin potentiate Doxorubicin-induced apoptosis and cell cycle arrest in HT-29 and SW948 human colon cancer cells. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2018**, 19(1), 131-139.

<sup>132</sup> Gadgoli, C.; Mishra, S. H. Antihepatotoxic activity of 5-hydroxy 3',4',6,7 tetramethoxy flavone from *Acillea millefolium*. *Pharmacology online* **2007**, 1, 391-399.

*stamineus*,<sup>133</sup> *Baccharis trimera*,<sup>134</sup> y *Eupatorium semiserratum*<sup>135</sup>; se han realizado evaluaciones de diversas actividades biológicas para ambos compuestos reportando un importante efecto antimicrobiano,<sup>130</sup> antiinflamatorio,<sup>130</sup> antiproliferativo,<sup>131</sup> antihepatotóxico,<sup>132</sup> antimutagénico,<sup>134</sup> antileishmaniásico,<sup>136</sup> entre otros.

En los espectros de RMN <sup>1</sup>H (Espectros 61 y 65, Tabla 24), se observan tres señales en la región de hidrógenos aromáticos que por sus multiplicidades y el valor de sus constantes de acoplamiento indican que se encuentran en las posiciones H-2' (7.4 ppm, *d*, *J*= 2.14 Hz), H-6' (7.48 ppm, *dd*, *J*= 8.48, 2.20 Hz) y H-5' (6.96 ppm, *d*, *J*= 8.50 Hz) del anillo C; alrededor de 6.5 ppm se encuentran las señales correspondientes a los hidrógenos H-8 y H-3, que están enlazadas a carbonos cuaternarios por lo que se observan como singuletes. A 12.75 ppm se encuentra la señal del hidrógeno del hidroxilo en C-5 y alrededor de 3.90 ppm se encuentran los hidrógenos de los metilos de tipo metoxilo en las posiciones C-6, C-7, C-3' y C-4'; en el caso de la eupatorina la señal del hidroxilo en C-3' se encuentra en 5.82 ppm.

En el espectro de RMN <sup>13</sup>C (Espectros 62 y 66, Tabla 24) se observan en 56 ppm las señales de los metilos de tipo metoxilo. Al ser un experimento APT se pueden asignar las señales correspondientes a los metinos aromáticos de la molécula y considerar que las señales restantes se tratan de carbonos aromáticos cuaternarios.

**Tabla 24.** Datos de RMN de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C del compuesto 9.

Posición	Tipo*	Compuesto 10		Posición	Tipo*	Compuesto 11	
		δ <sub>C</sub> /ppm	δ <sub>H</sub> /ppm (número, multiplicidad, <i>J</i> /Hz)			δ <sub>C</sub> /ppm	δ <sub>H</sub> /ppm (número, multiplicidad, <i>J</i> /Hz)
2	C	164.1	-	2	C	164.0	-
3	CH	104.6	6.60 (1H, <i>s</i> )	3	CH	104.6	6.57 (1H, <i>s</i> )
4	C	182.8	-	4	C	182.8	-

<sup>133</sup> Hossain, M. A.; Rahman, S. M. M. Isolation and characterization of flavonoids from the leaves of medicinal plant *Orthosiphon stamineus*. *Arab. J. Chem.* **2015**, 8(2), 218-221.

<sup>134</sup> Nakasugi, T.; Komai, K. Antimutagens in the Brazilian folk plant Carqueja (*Baccharis trimera* Less.). *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46(7), 2560-2564.

<sup>135</sup> Herz, W.; Govindan, S. V.; Kumar, N. Sesquiterpene lactones and other constituents of *Eupatorium lancifolium* and *Eupatorium semiserratum*. *Phytochemistry* **1981**, 20(6), 1343-1347.

<sup>136</sup> Sahid, E. D. N.; Claudino, J. C.; Oda, F. B.; Carvalho, F. A.; dos Santos, A. G. *Baccharis trimera* DC leaf derivatives and eupatorine activities against *Leishmania amazonensis*. *Nat. Prod. Research* **2022**, 36(6), 1599-1603.

5	C	153.2	-	5	C	153.2	-
6	C	132.8	-	6	C	132.8	-
7	C	158.9	-	7	C	158.9	-
8	CH	90.7	6.55 (1H, s)	8	CH	90.7	6.54 (1H, s)
9	C	153.4	-	9	C	153.4	-
10	C	106.3	-	10	C	106.3	-
1'	C	123.9	-	1'	C	124.6	-
2'	CH	108.9	7.34 (1H, d 2.14)	2'	CH	112.5	7.46 (1H, d 2.25)
3'	C	149.5	-	3'	C	146.2	-
4'	C	152.4	-	4'	C	149.8	-
5'	CH	111.3	6.98 (1H, d 8.52)	5'	CH	110.8	6.95 (1H, d 8.46)
6'	CH	120.2	7.52 (1H, dd 8.51, 2.15)	6'	CH	119.3	7.42 (1H, dd 8.44, 2.25)
5OH	-	-	12.75 (1H, s)	5OH	-	-	12.74 (1H, s)
6OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	61.0	3.93 (3H, s)	3'OH	-	-	5.82 (1H, s <sub>ancho</sub> )
7OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	56.5	3.98 (3H, s)	6OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	61.0	3.92 (3H, s)
3'OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	56.3 <sup>#</sup>	3.99 (3H, s)	7OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	56.3	3.97 (3H, s)
4'OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	56.2 <sup>#</sup>	3.97 (3H, s)	4'OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	56.5	3.98 (3H, s)

<sup>1</sup>H 400 MHz, <sup>13</sup>C 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>. \*Obtenido con el espectro HSQC.

En los experimentos bidimensionales se observan correlaciones (Figura 65) que permitieron la elucidación estructural de estos compuestos y la asignación de las posiciones. En el experimento NOESY de ambos compuestos (Espectros 64 y 68) se observa la correlación de los hidrógenos del metoxilo en C-6 con el hidrógeno aromático H-8, la correlación de los hidrógenos del metoxilo C-4' con el hidrógeno aromático H-5', y la correlación de los hidrógenos del metoxilo en C-3' con el hidrógeno aromático H-2' para el caso del compuesto **10**. En el experimento HMBC (Espectros 63 y 68), se observan las correlaciones de los hidrógenos H-2' y H-6' con el carbono cuaternario C-2, los hidrógenos H-8 y H-3 con el carbono C-10, el hidrógeno H-5' con el carbono C-1' y los metilos de tipo metoxilo con el carbono al que se encuentran directamente enlazados.

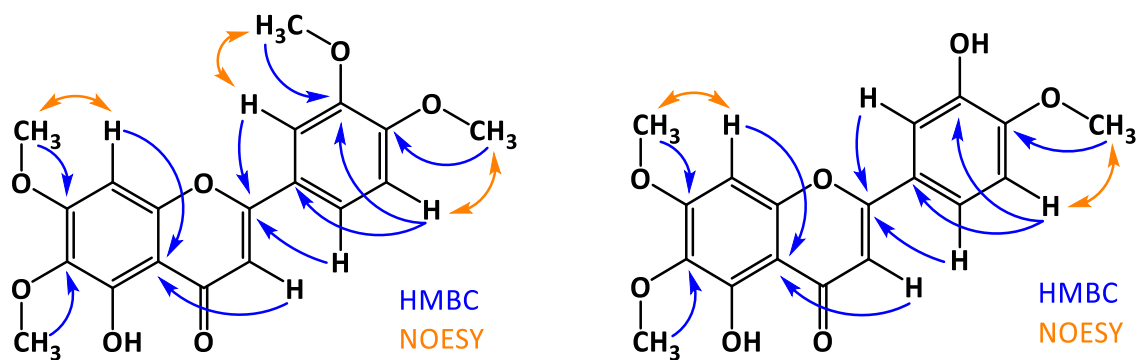


Figura 65. Correlaciones importantes en los experimentos bidimensionales sobre las estructuras de los compuestos **10** y **11**.

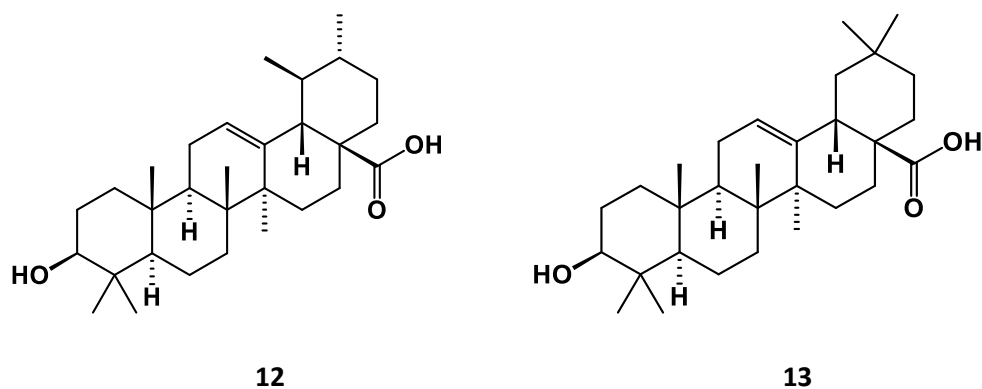


Figura 66. Estructura de los compuestos **12** y **13**.

En el estudio fitoquímico de las partes aéreas de *S. thymoides* se obtuvieron fracciones que al analizar mediante CCDa, al emplear el revelador sulfato cérico se observó la presencia de triterpenos con apariencia de un sólido opaco y parcialmente soluble en varios disolventes como el hexano, diclorometano, acetato de etilo, acetona y metanol por mencionar algunos de ellos. Al analizar el espectro de masas realizado mediante la técnica DART se observó que el ión molecular corresponde a la fórmula molecular  $C_{30}H_{48}O_3$ , lo cual permite proponer que se trata de la mezcla de los isómeros (Figura 66), ácido ursólico (**12**) y ácido oleanólico (**13**), los cuales se encuentran ampliamente reportados en diversas especies del género *Salvia* y

con actividades biológicas variadas como antiviral,<sup>137</sup> antiinflamatoria,<sup>138</sup> antialérgica,<sup>139</sup> antiplasmodial<sup>140</sup>, antibacteriana,<sup>141</sup> antifúngica,<sup>140</sup> entre otras.

## 6.2. Evaluación de la actividad herbicida de algunos de los diterpenoides aislados de *Salvia thymoides* Benth

En el presente trabajo se llevó a cabo la evaluación de la actividad fitotóxica de los metabolitos mayoritarios aislados de *S. thymoides*, que corresponden a los compuestos **1**, **2**, **3**, **6**, **7**, **11** y **12** sobre los procesos de germinación y crecimiento radicular de cuatro malezas, *A. hypochondriacus*, *M. sativa*, *P. miliaceum* y *T. pratense*. De igual forma, se evaluó su efecto herbicida mediante el proceso de blanqueamiento en la especie acuática *Lemna gibba*. Los resultados se expresan como el porcentaje de inhibición, el cual es dependiente de la concentración evaluada.

### 6.2.1. Bioensayo de inhibición de la germinación

De los compuestos evaluados se observa un efecto fitotóxico significativo en el compuesto **2** contra la raíz de mijo y en el compuesto **6** contra la raíz de amaranto, los resultados se expresan en porcentaje de inhibición. Inicialmente, se evaluó el efecto a 500 y 100 ppm para posteriormente realizar la IC<sub>50</sub> (Figuras 69 y 70). En todos los análisis se empleó agua como blanco negativo para tener un punto de referencia al momento de realizar la medición del crecimiento de las raíces.

---

<sup>137</sup> Kashiwada, Y.; Nagao, T.; Hashimoto, A.; Ikeshiro, Y.; Okabe, H.; Cosentino, L. M.; Lee, K. J. *Nat. Prod.* **2000**, 63, 1619-1622.

<sup>138</sup> Safayhi, H. and Sailer, E.R. *Planta Med.* **1997**, 63, 487-493.

<sup>139</sup> Ryu, S. Y., Oak, M. H., Yoon, S. K., Cho, D. I., Yoo, G. S., Kim, T. S. and Kim, K. M. *Planta Med.* **2000**, 66, 358-360.

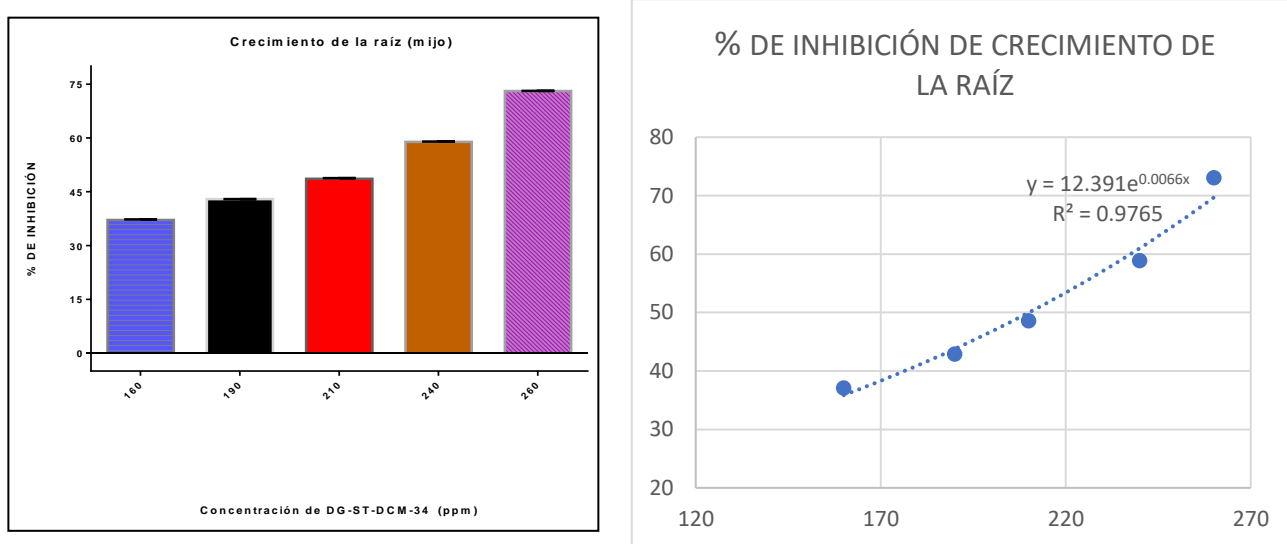
<sup>140</sup> Sairafianpour, M., Bahreininejad, B., Witt, M., Ziegler, H. L., Jaroszewski, J. W. and Staerk, D. *Planta Med.* **2003**, 69, 846-850.

<sup>141</sup> Cota, B. B., De Oliveira, A. B., De Souza-Filho, J. D. and Braga, F. C. *Fitoterapia* **2003**, 74, 729-731.

Los resultados indican que la concentración de inhibición media es de 232.5 ppm en el caso del compuesto **2** contra el crecimiento radicular de mijo, y de 68.87 ppm en el caso del compuesto **6** contra el crecimiento radicular de amaranto.

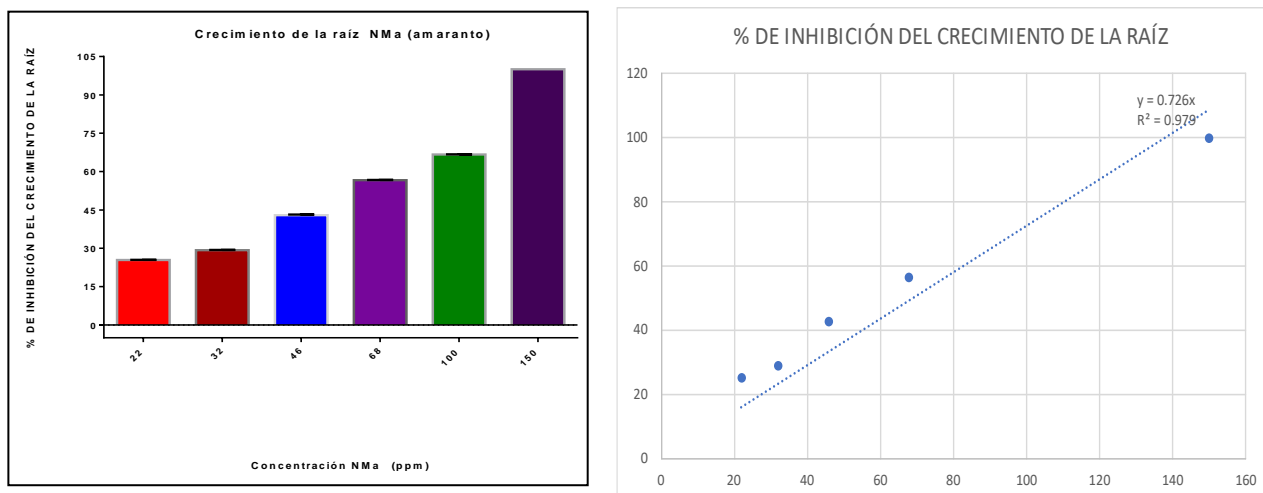
### 6.2.2. Bioensayo con *Lemna gibba*

En los resultados de la evaluación de la actividad herbicida de los metabolitos aislados de *S. thymoides* empleando la especie *Lemna gibba* se observó, en todos los casos, el crecimiento de algas en los matraces con la planta acuática en medio de cultivo y el compuesto a evaluar, por lo que se establece que no poseen actividad herbicida que involucre el proceso de blanqueamiento por inhibición de la formación de clorofilas y carotenoides.



**Figura 67.** IC<sub>50</sub> del efecto fitotóxico del Compuesto **2** sobre el crecimiento de la raíz de *P. miliaceum* empleando agua como control negativo. ANOVA ( $p < 0.05$ )





**Figura 68.** IC<sub>50</sub> del efecto fitotóxico del Compuesto 6 sobre el crecimiento de la raíz de *A. hypochondriacus* empleando agua como control negativo. ANOVA ( $p < 0.05$ )

## 7. Conclusiones

### Conclusión general

A partir de la identificación y el análisis en bioensayos de fitotoxicidad de los metabolitos secundarios presentes en el extracto de diclorometano de las partes aéreas de *Salvia thymoides* Benth se concluye que puede existir un posible efecto herbicida de tipo preemergente atribuido principalmente a los diterpenos de tipo *neo*-clerodano aislados e identificados en esta especie, principalmente el ácido 5,10-*seco*-clerodan-1,3,5,13-tetraen-15,16-ólida-18-oico (Compuesto 2) y el éster metílico del ácido 2-oxo-*neo*clerodan-3,13-dien-15,16-ólida-18-óico (Compuesto 6).

### Resumen de resultados

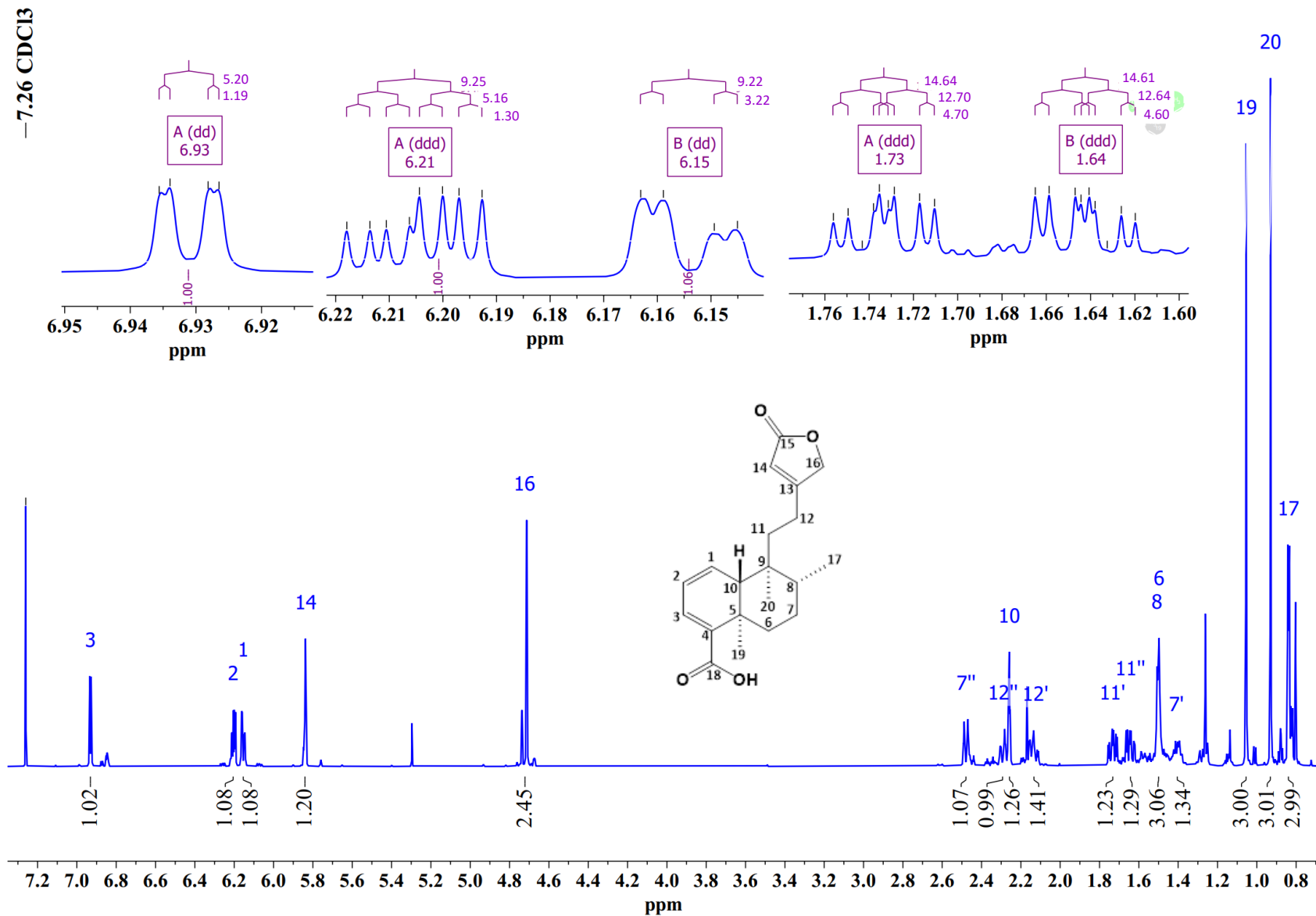
En esta tesis se obtuvieron los siguientes resultados:

- Se aislaron 13 compuestos del extracto de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> de *S. thymoides*, cuyas estructuras fueron determinadas mediante el análisis de técnicas espectroscópicas,

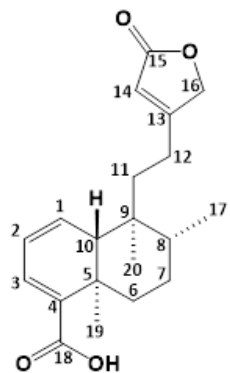
principalmente RMN. De los compuestos aislados se identificaron, dos flavonas, dos triterpenoides y nueve diterpenoides con esqueleto de tipo *neo*-clerodano de los cuales seis presentan una estructura que no ha sido reportada anteriormente (compuestos **1**, **3**, **5**, **6**, **7** y **9**).

- b) Se estableció la configuración absoluta del compuesto **1** mediante difracción de rayos X de monocristal.
- c) Se obtuvieron los espectros de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (en algunos casos APT, DEPT 90 y DEPT 135) y experimentos bidimensionales (COSY, HSQC, HMBC y NOESY) de todos los compuestos aislados. Además, se realizaron aportes y correcciones en las asignaciones en los espectros de RMN de los compuestos **2**, **4** y **8**.
- d) Se evaluó la actividad fitotóxica de los compuestos **1**, **2**, **3**, **6**, **7**, **11** y **12** como inhibidores de la germinación y del crecimiento de la raíz de cuatro plantas maleza. Sobre la germinación se observaron % de inhibición bajos contra *M. sativa* y *T. pratense*, e inhibición media contra *A. hypochondriacus* y *P. miliaceum*, para los compuestos **2** y **6** con respecto al efecto fitotóxico observado en el herbicida comercial Treflan® (trifluralina) empleado como control positivo y agua como control negativo.
- e) Realizando un análisis comparativo de los metabolitos aislados de *S. thymoides* en trabajos preliminares con los aislados en este trabajo, se logró observar ciertas concordancias en los perfiles fitoquímicos, ya que se aislaron compuestos reportados con anterioridad en la especie (**2** y **10-13**), no obstante, se observaron también diferencias significativas, ya que se elucidaron *neo*-clerodanos nuevos y conocidos que se reportan por primera vez para esta especie, pero que guardan una cierta relación en cuanto a las funcionalidades que presentan con las estructuras reportadas con anterioridad.

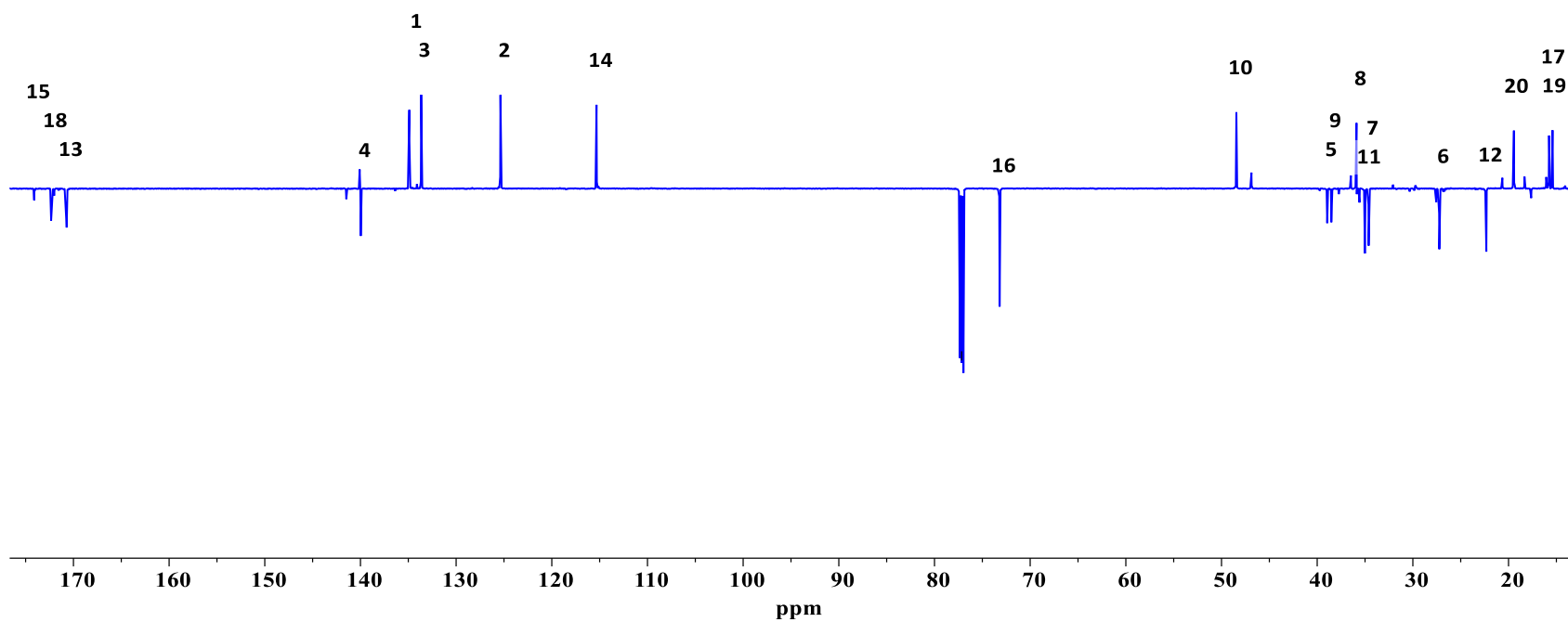
## 8. Anexos



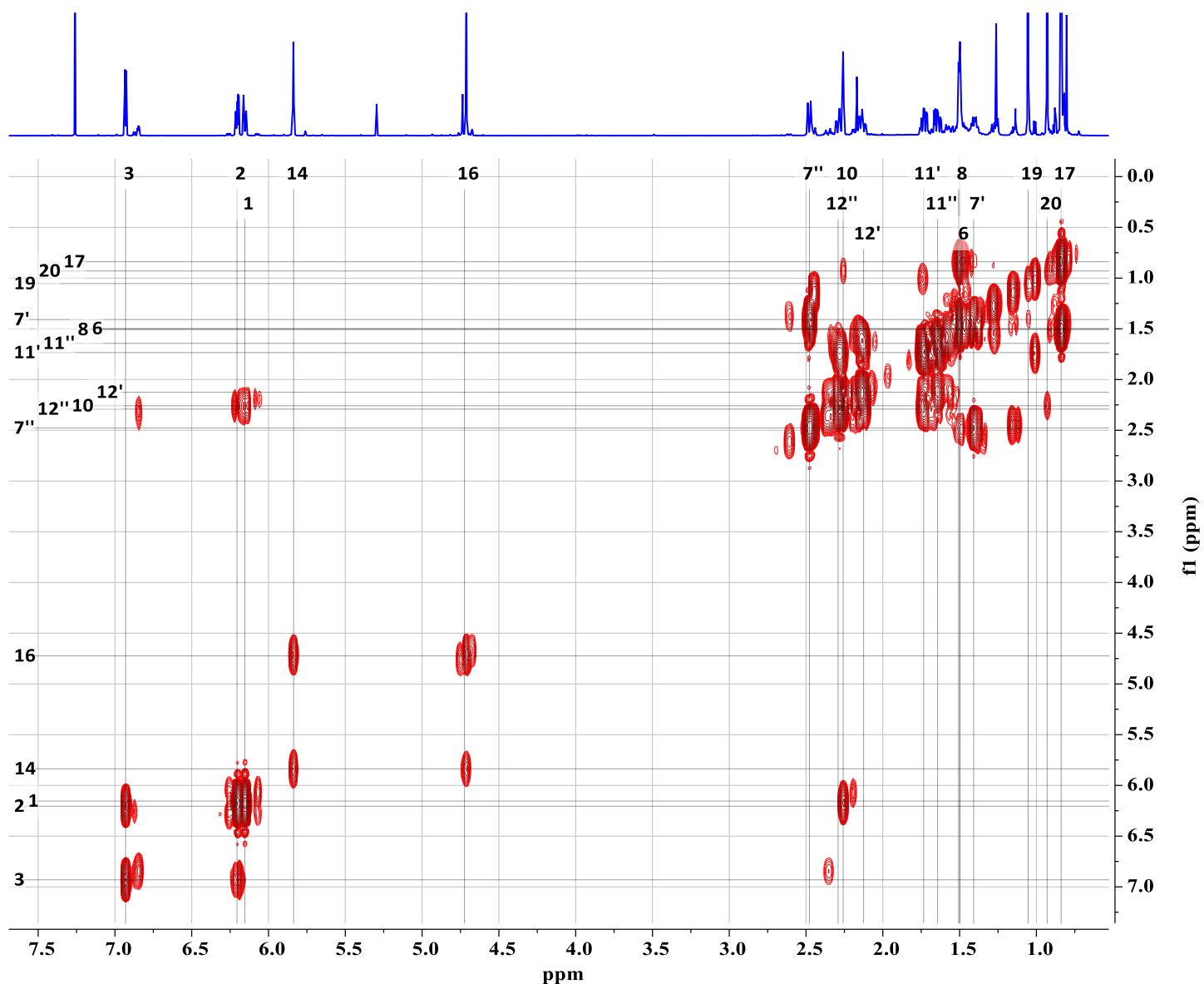
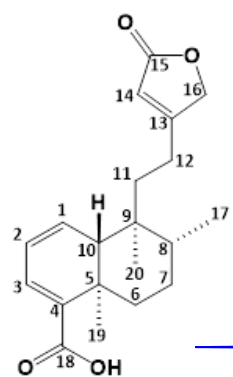
Espectro 1. RMN <sup>1</sup>H (700 MHz CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 1.



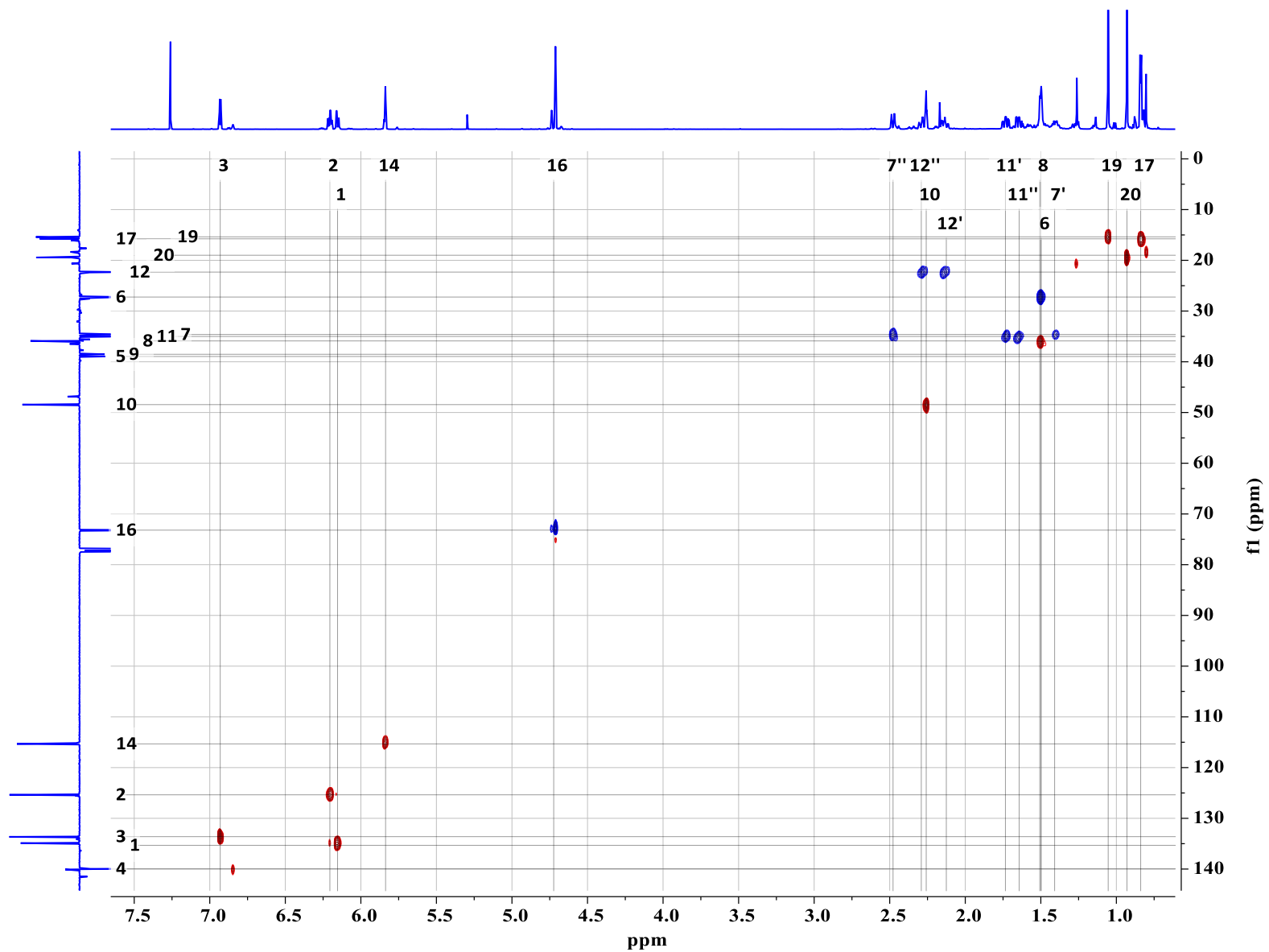
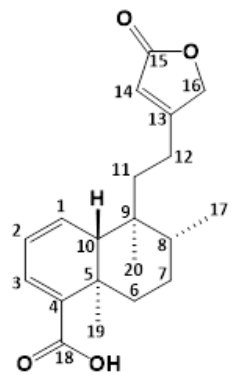
— 77.16 CDCl<sub>3</sub>



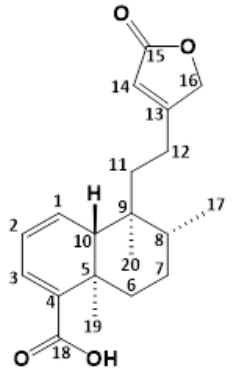
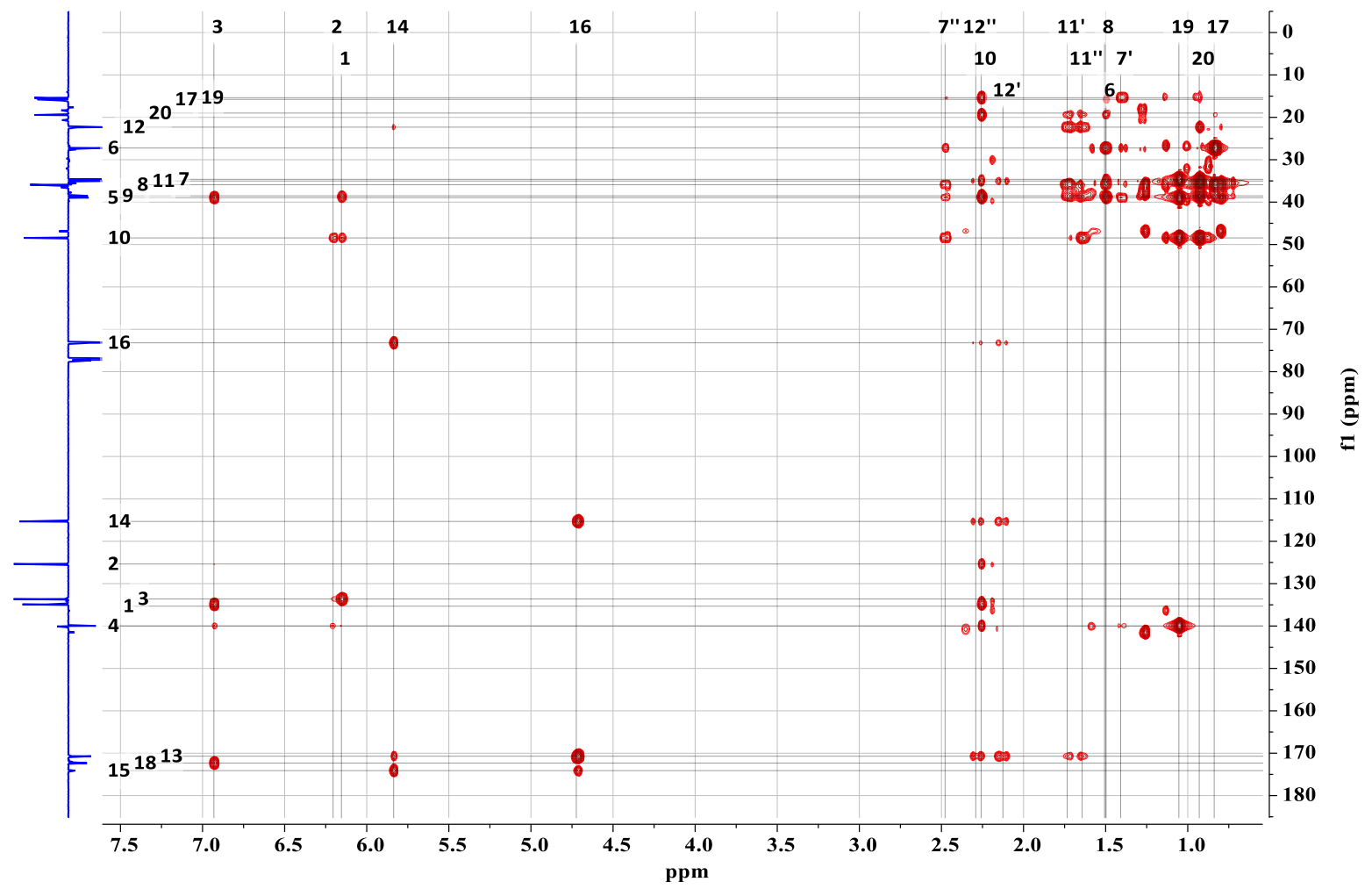
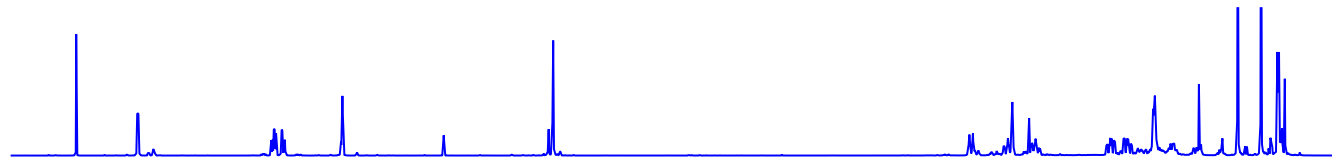
Espectro 2. RMN <sup>13</sup>C (175 MHz CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 1.



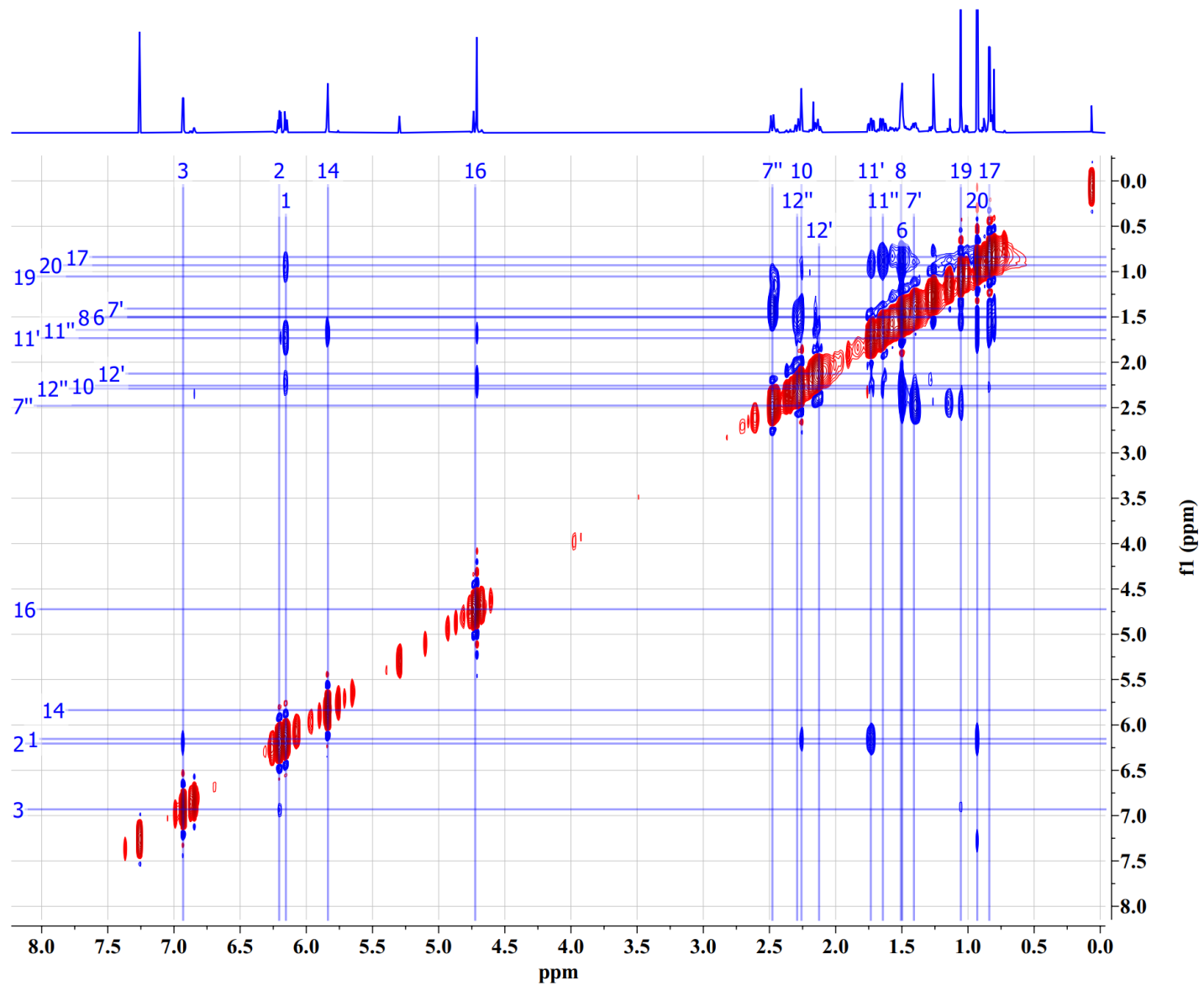
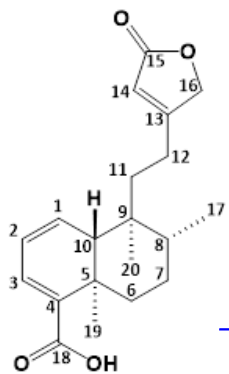
**Espectro 3.** Experimento COSY (700 MHz CDCl<sub>3</sub>) del compuesto **1**.



**Espectro 4.** Experimento HSQC (700 MHz CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 1.

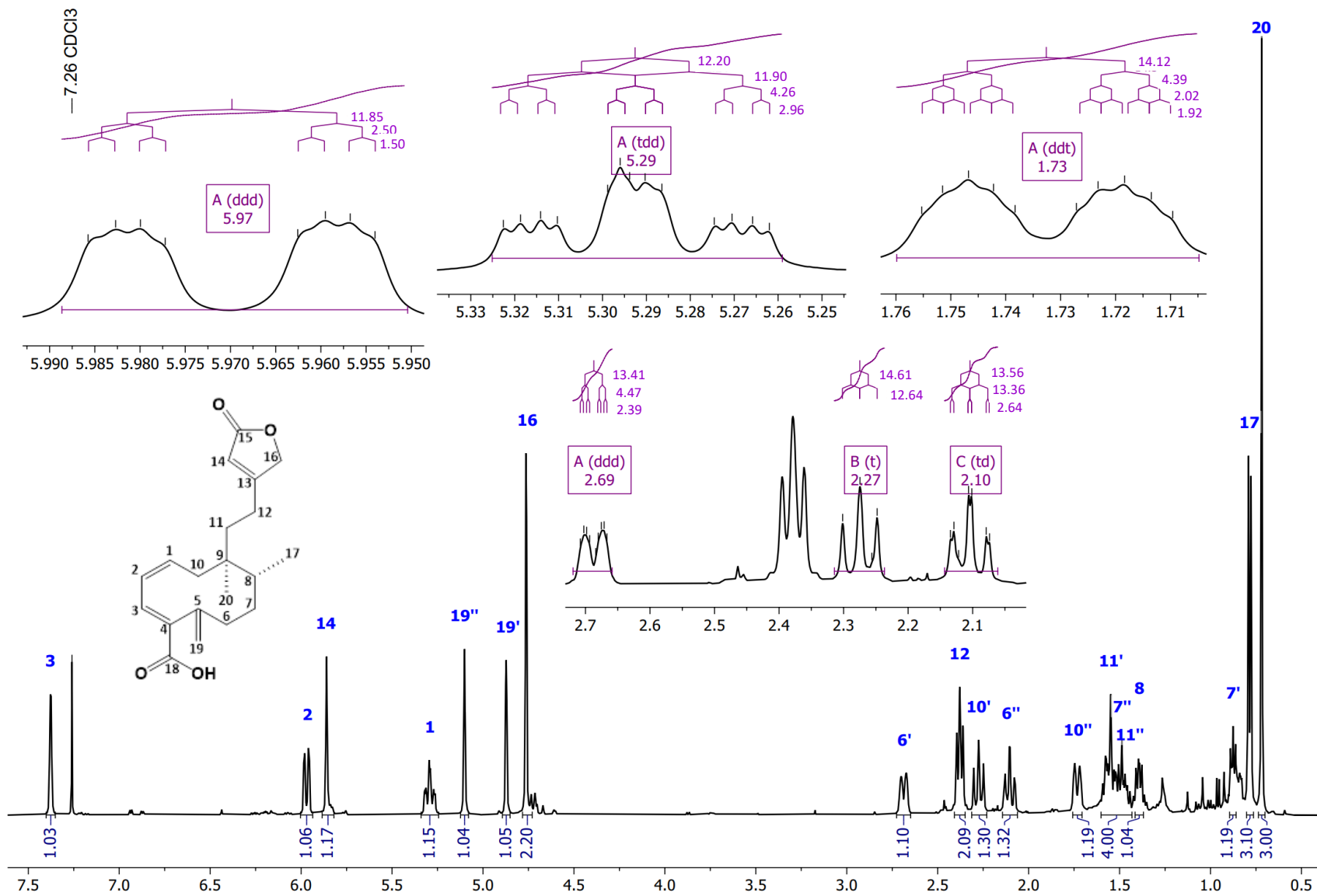


**Espectro 5.** Experimento HMBC (700 MHz CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 1.

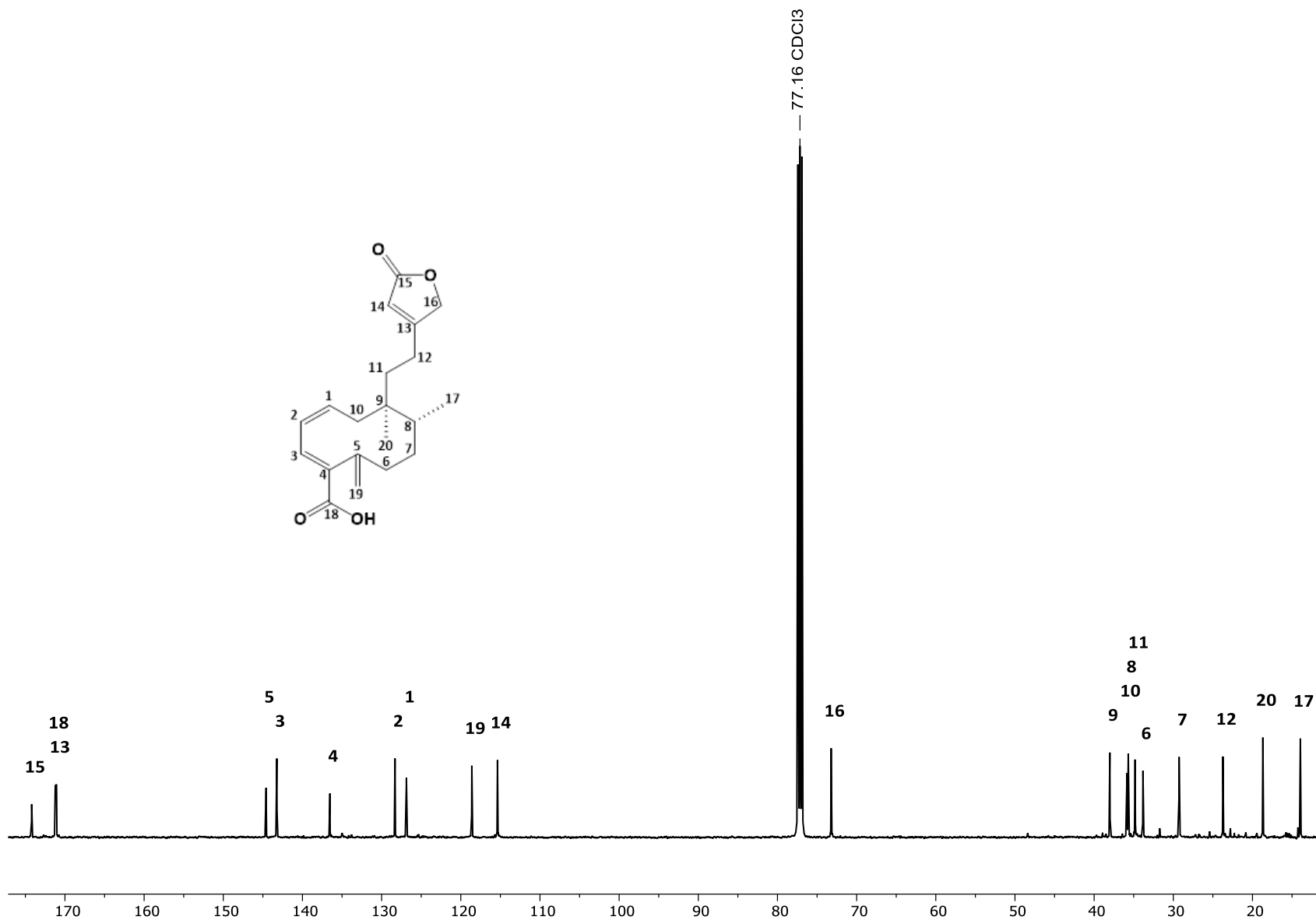


Espectro 6. Experimento NOESY (700 MHz  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 1.

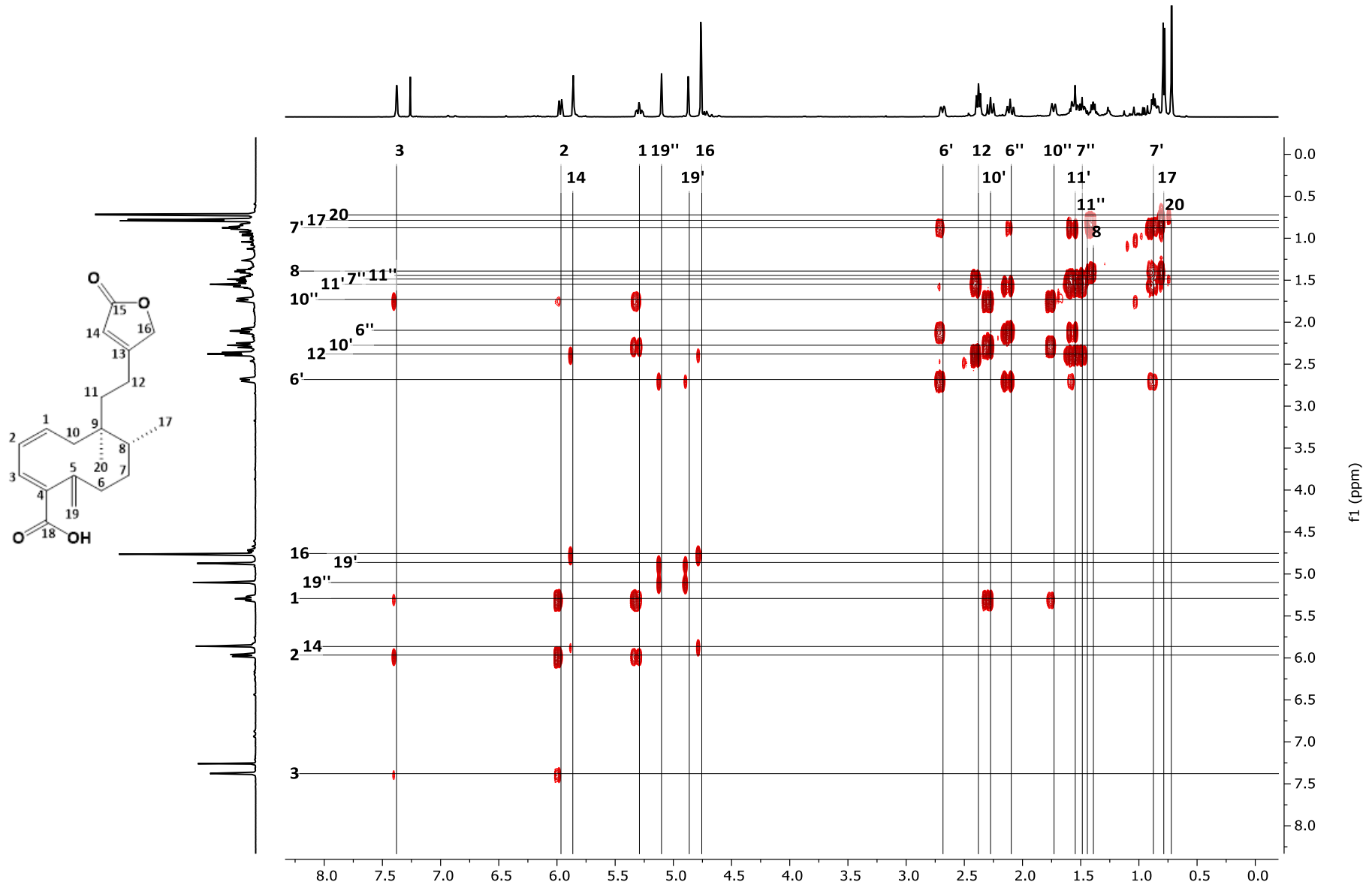




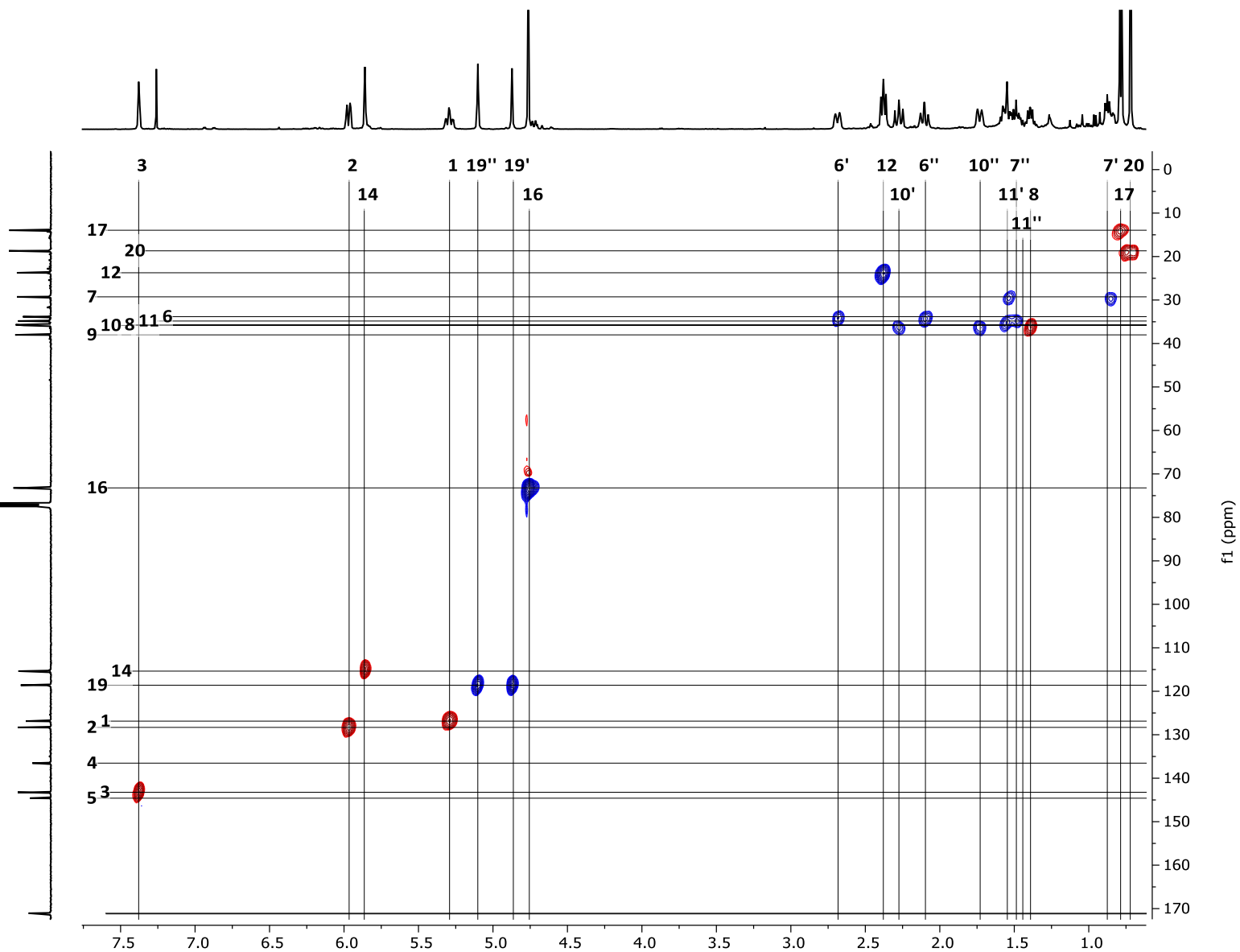
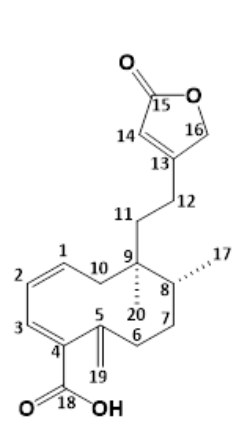
Espectro 7. RMN <sup>1</sup>H (500 MHz CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 2.



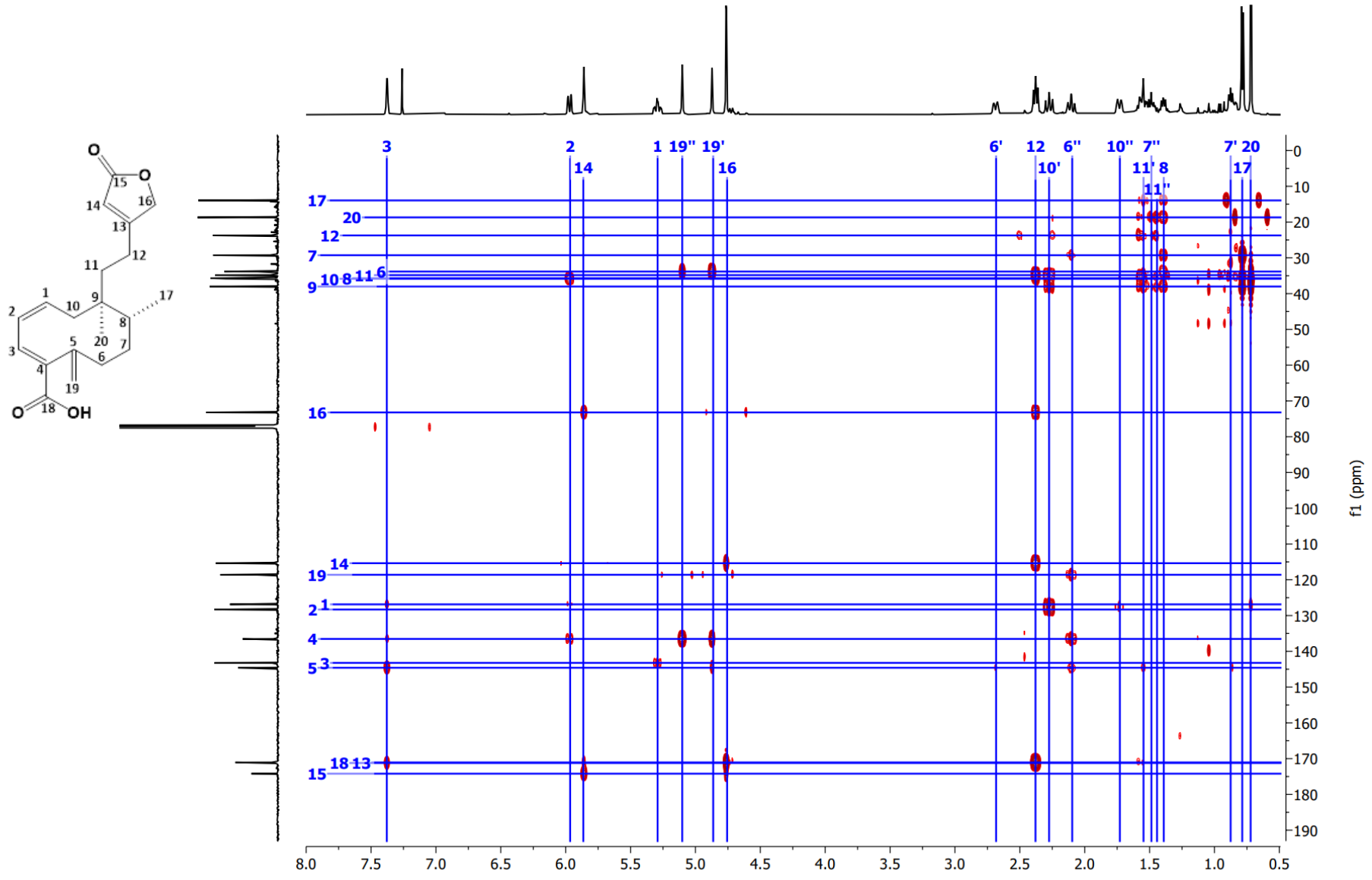
**Espectro 8.** RMN <sup>13</sup>C (125 MHz CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 2.



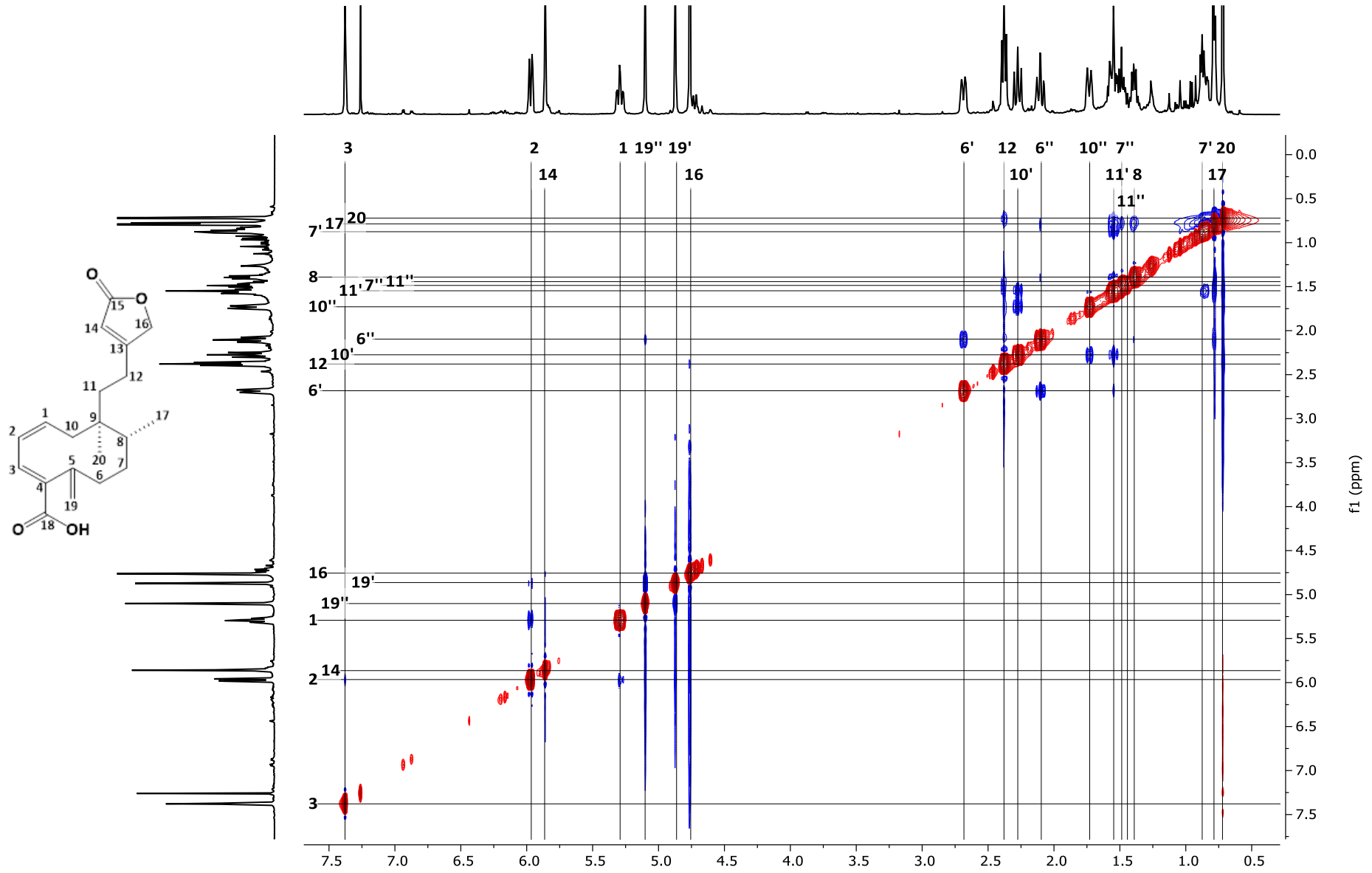
**Espectro 9.** Experimento COSY (500 MHz CDCl<sub>3</sub>) del compuesto **2**.



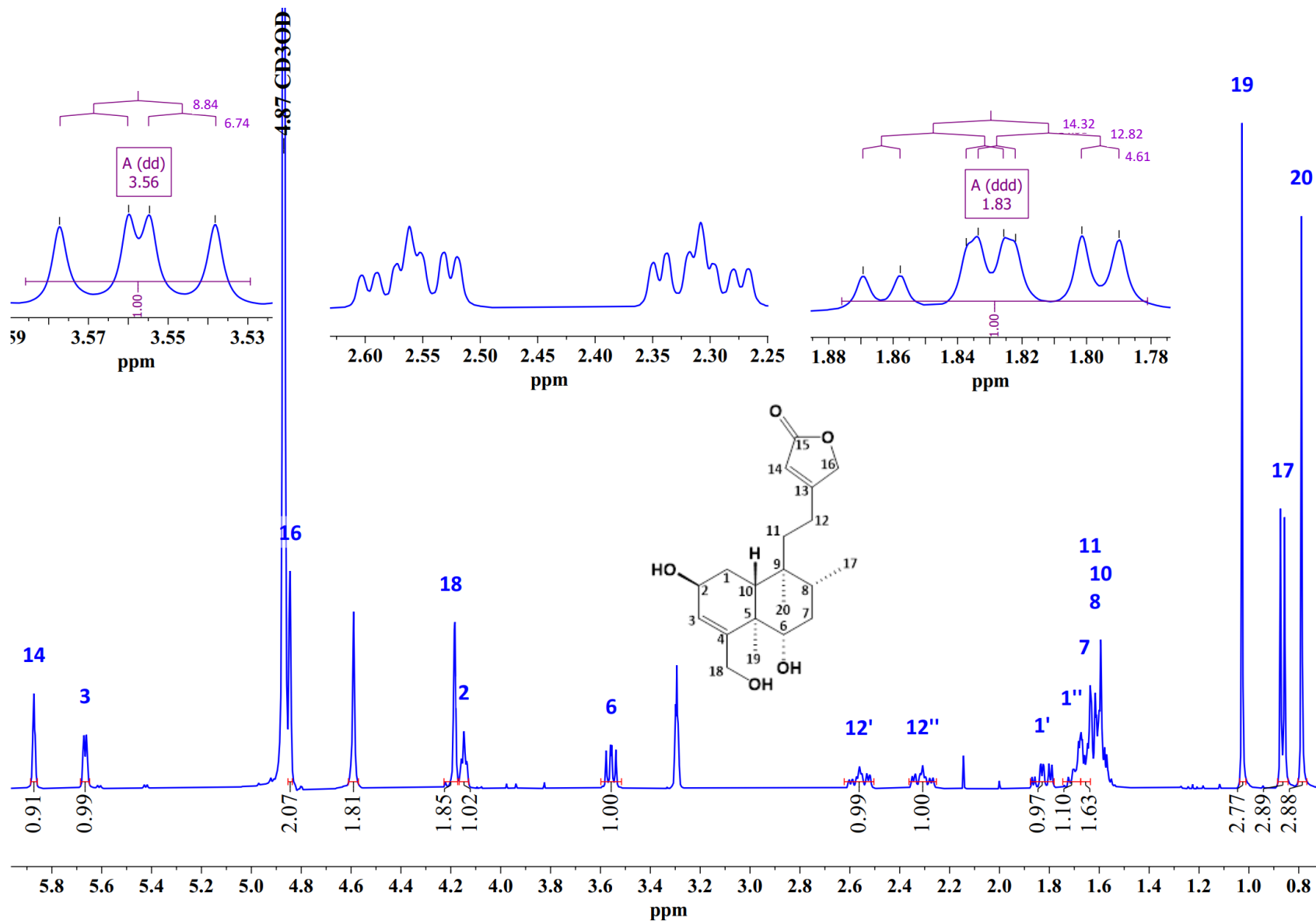
**Espectro 10.** Experimento HSQC (500 MHz CDCl<sub>3</sub>) del compuesto **2**.



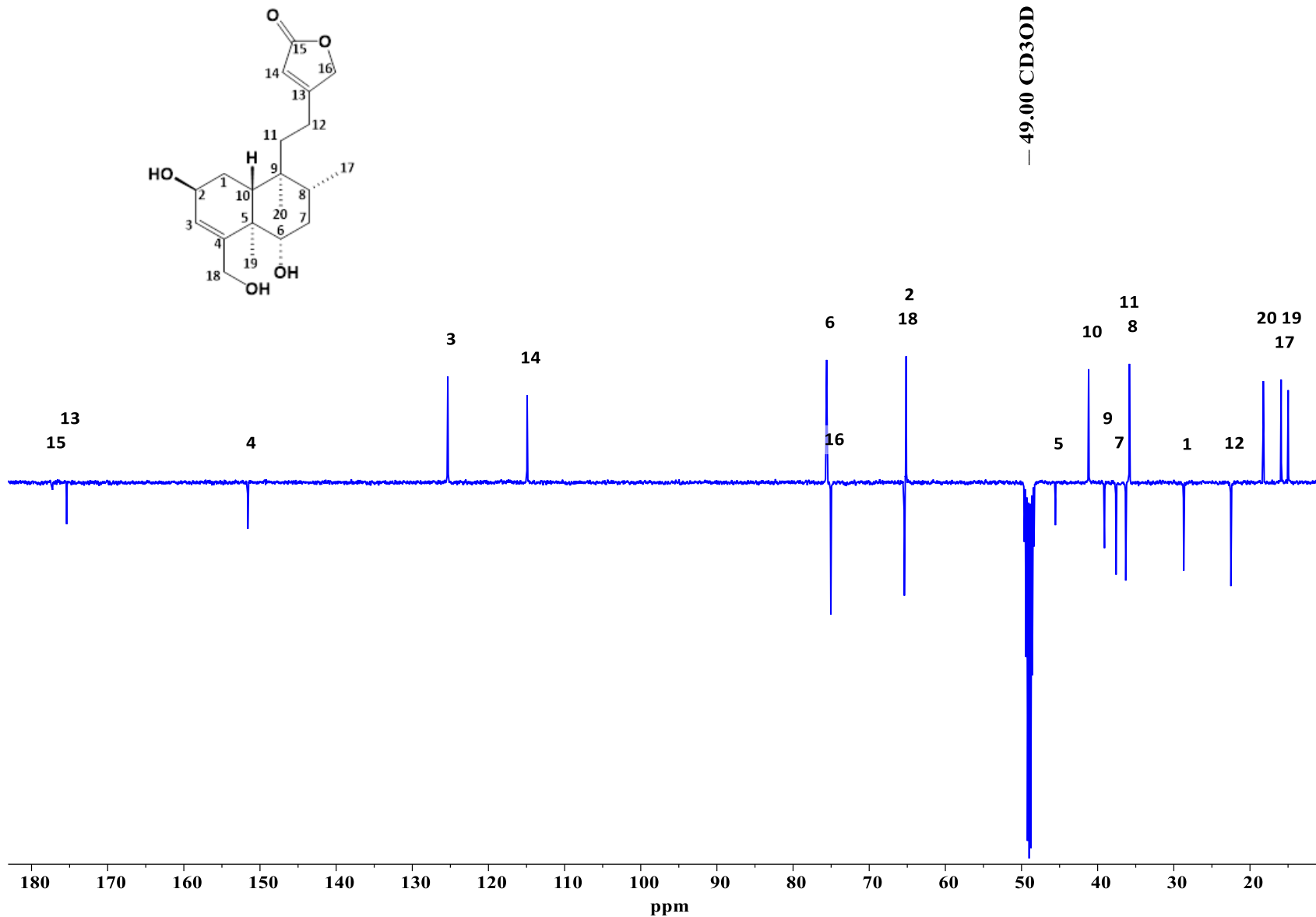
**Espectro 11.** Experimento HMBC (500 MHz CDCl<sub>3</sub>) del compuesto **2**.



**Espectro 12.** Experimento NOESY (500 MHz CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 2.

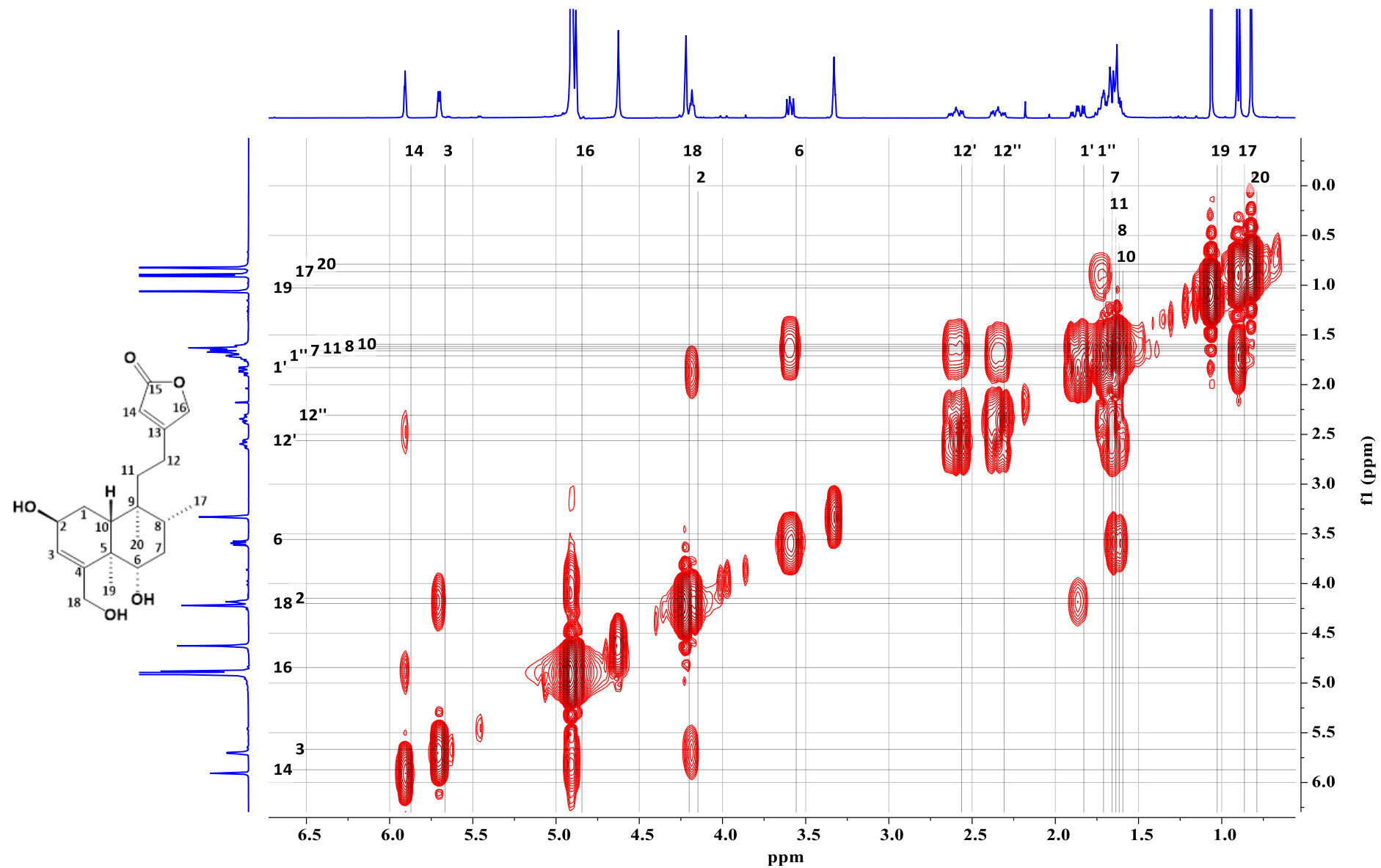


Espectro 13. RMN  $^1\text{H}$  (700 MHz  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del compuesto 3.

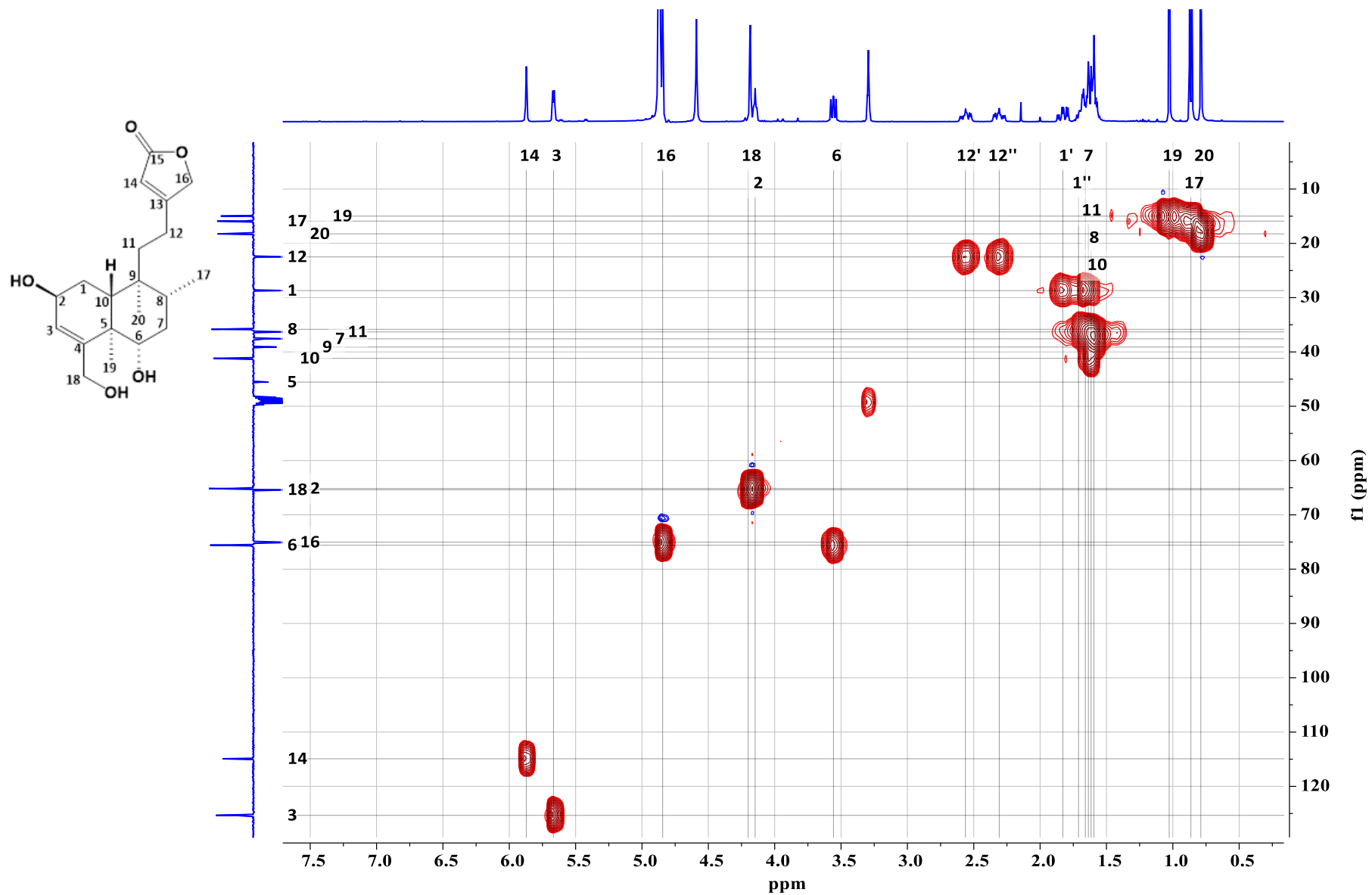


Espectro 14. RMN  $^{13}\text{C}$  (175 MHz  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del compuesto 3.

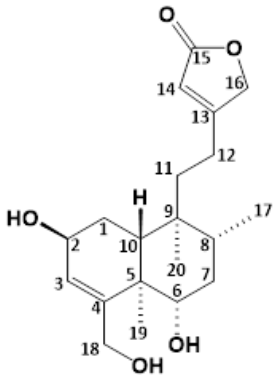
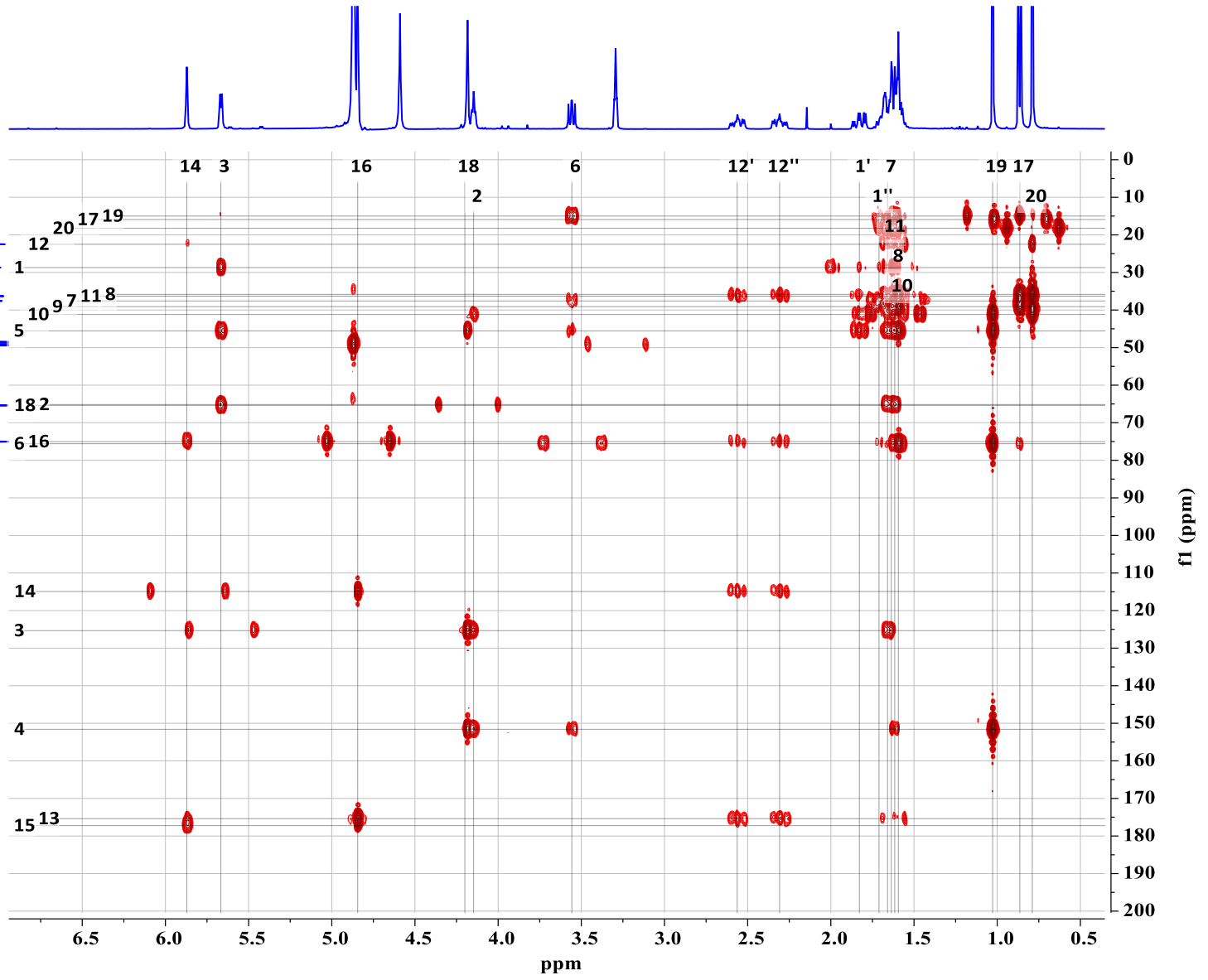




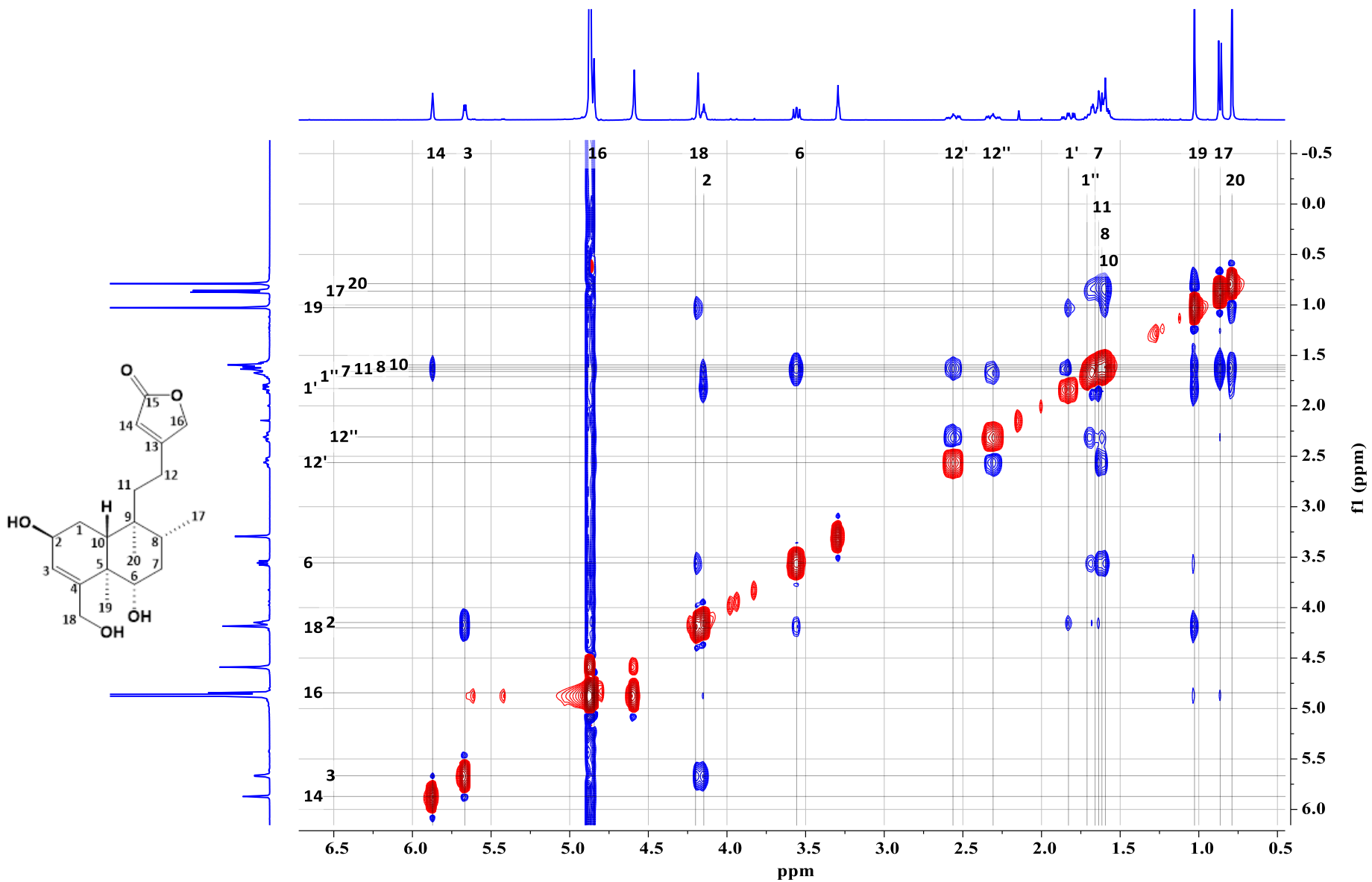
Espectro 15. Experimento COSY (700 MHz CD<sub>3</sub>OD) del compuesto 3.



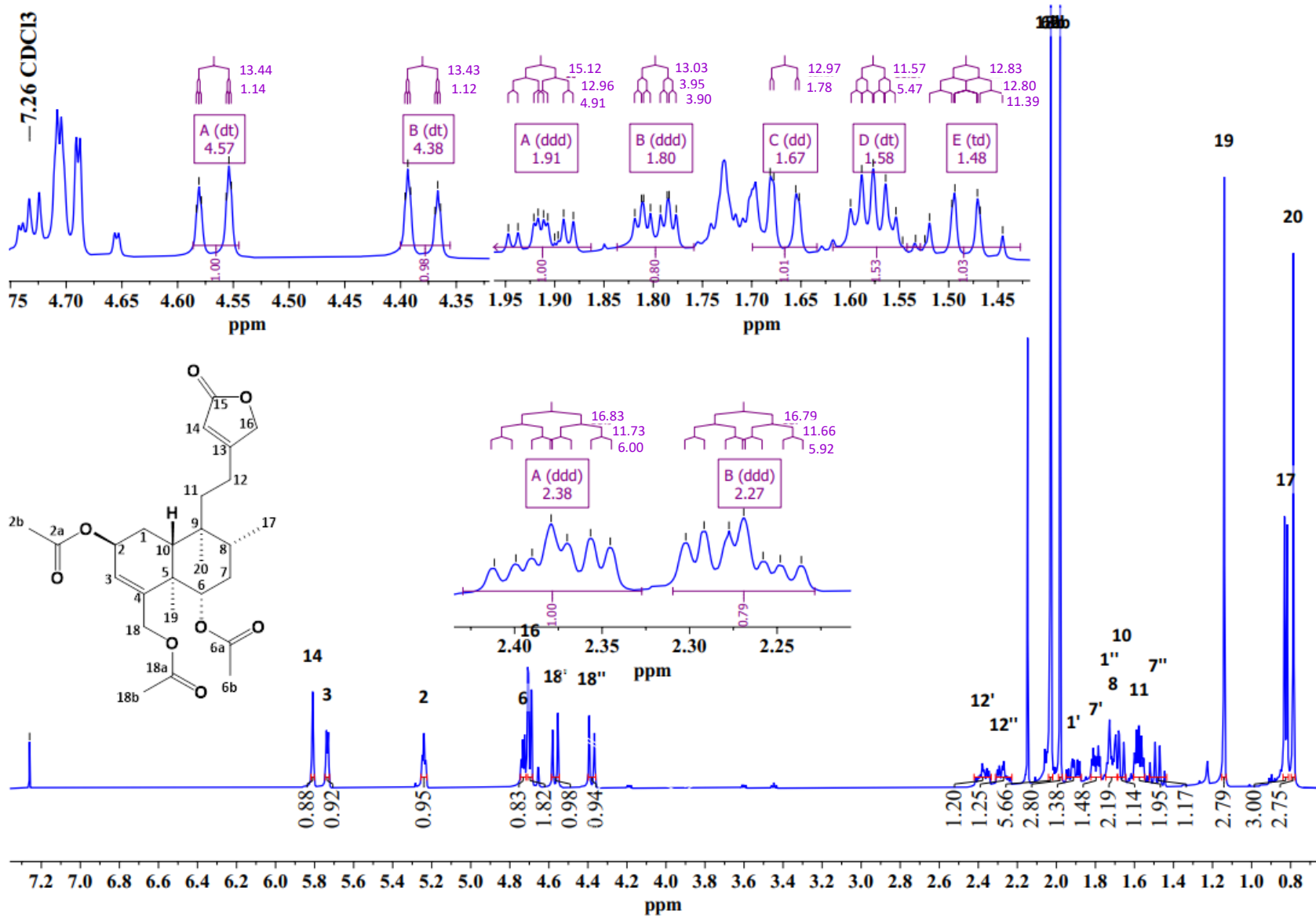
Espectro 16. Experimento HSQC (700 MHz CD<sub>3</sub>OD) del compuesto 3.



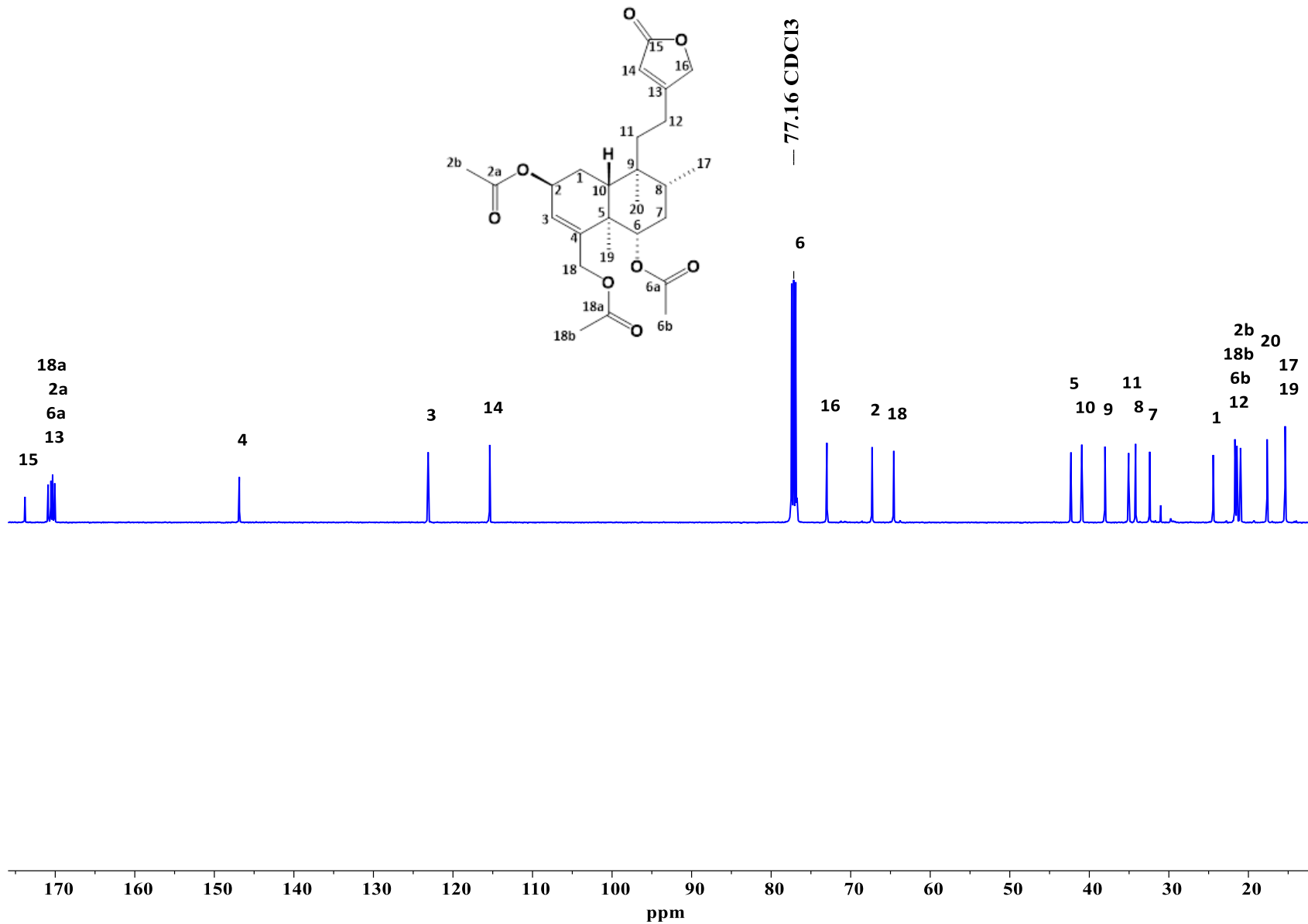
Espectro 17. Experimento HMBC (700 MHz CD<sub>3</sub>OD) del compuesto 3.



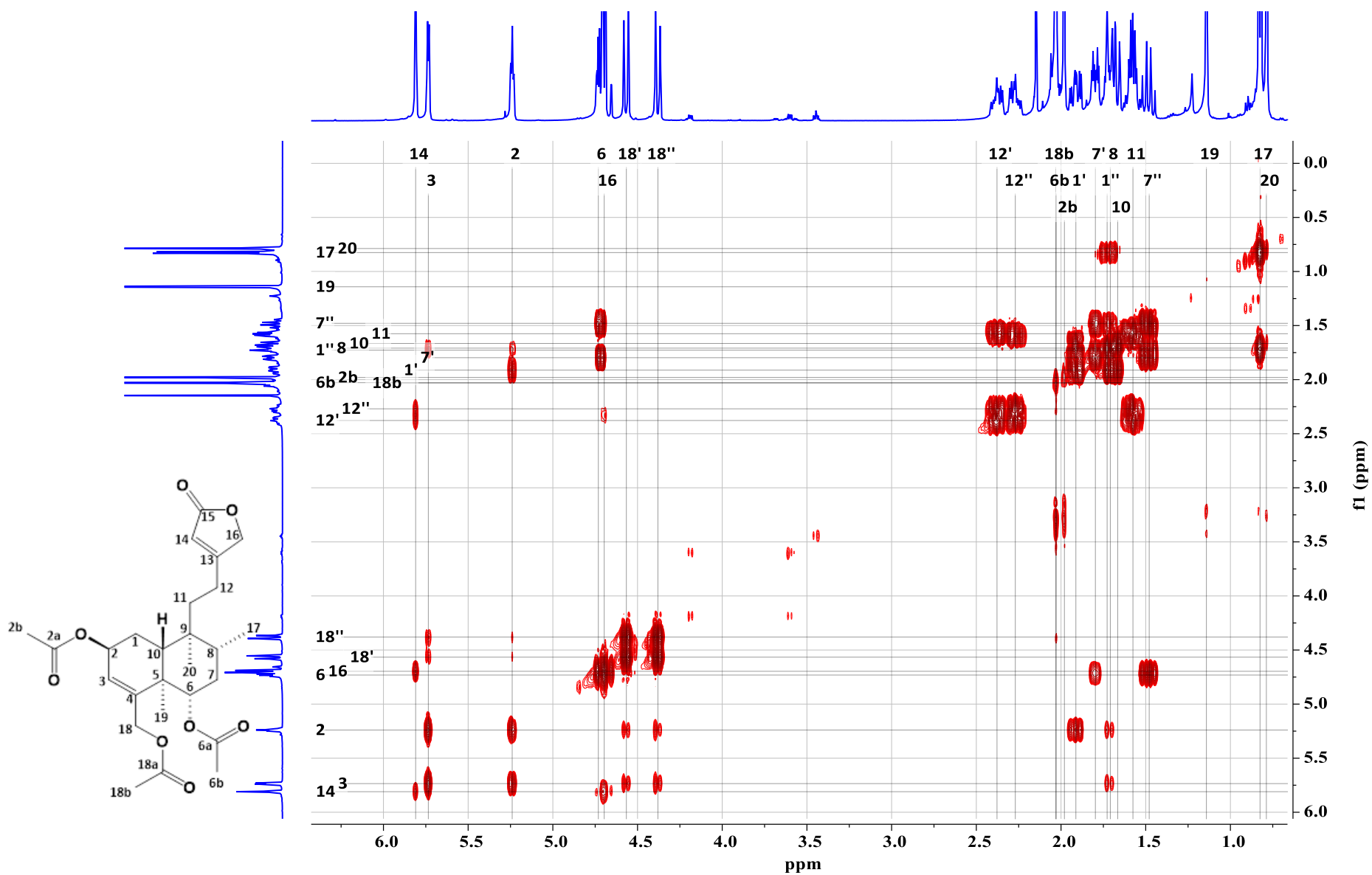
**Espectro 18.** Experimento NOESY (700 MHz CD<sub>3</sub>OD) del compuesto 3.



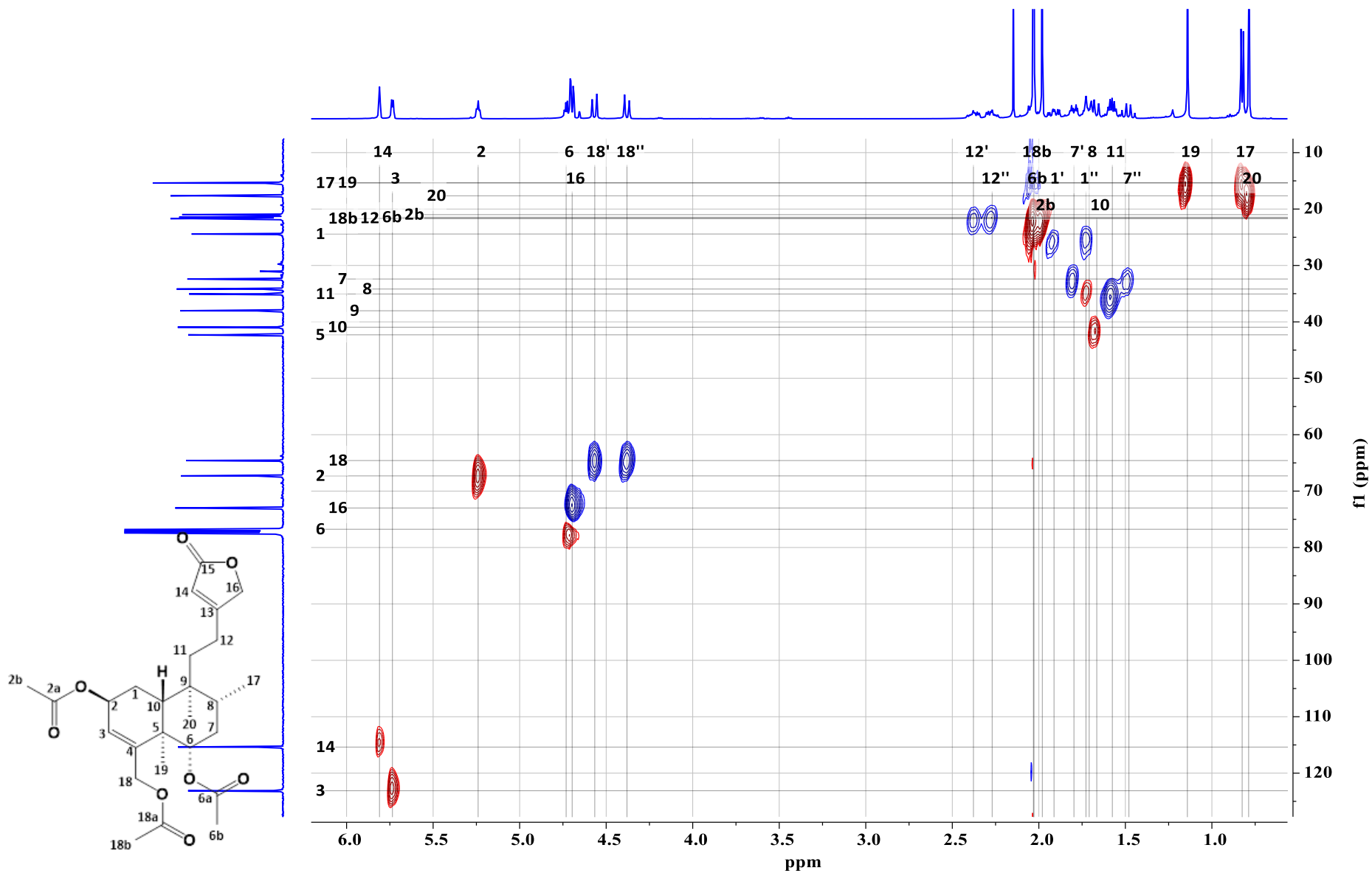
**Espectro 19.** RMN <sup>1</sup>H (500 MHz CDCl<sub>3</sub>) del producto de acetilación del compuesto **3**.



**Espectro 20.** RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz  $\text{CDCl}_3$ ) del producto de acetilación del compuesto 3.

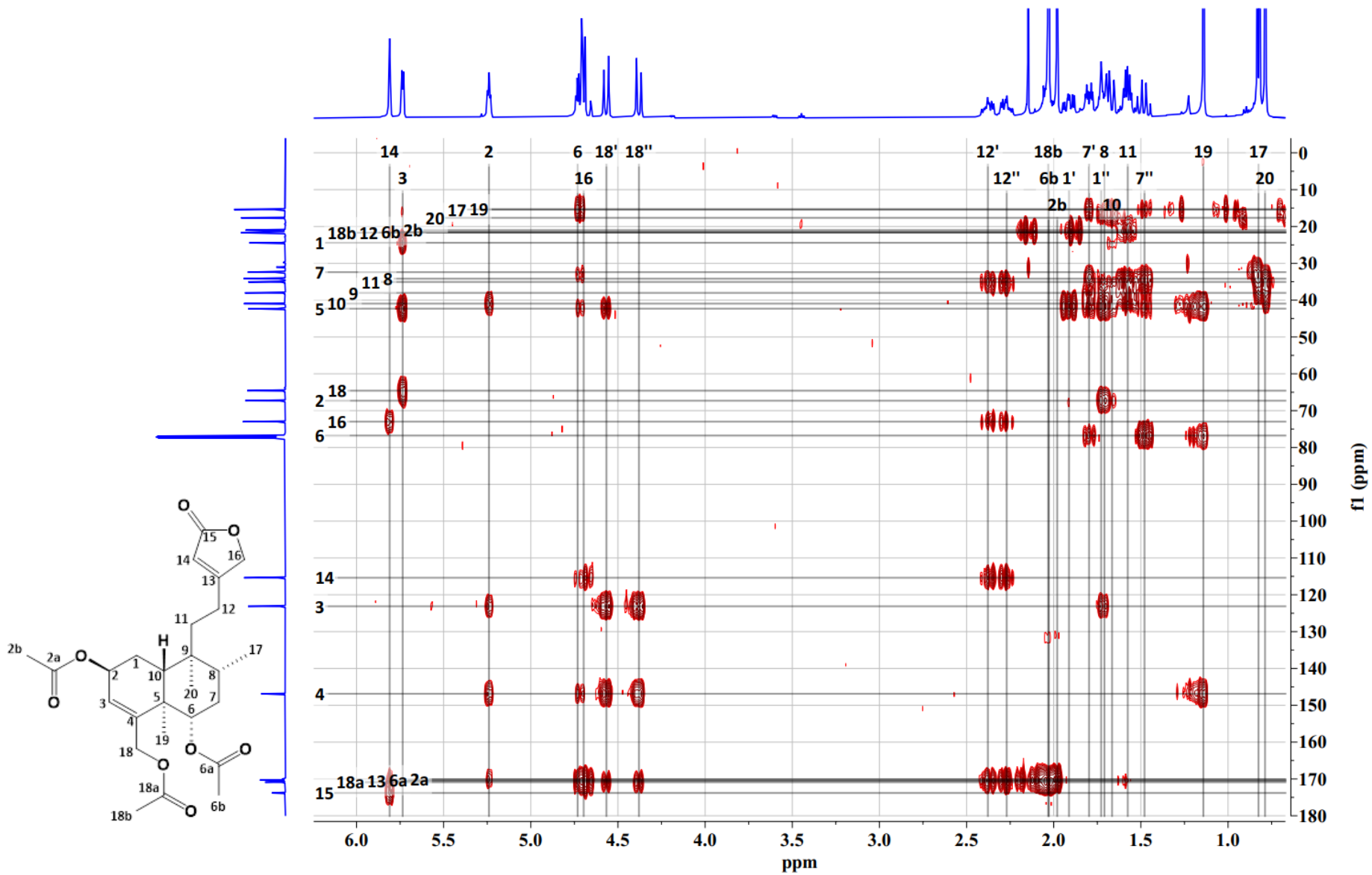


**Espectro 21.** Experimento COSY (500 MHz CDCl<sub>3</sub>) del producto de acetilación del compuesto 3.

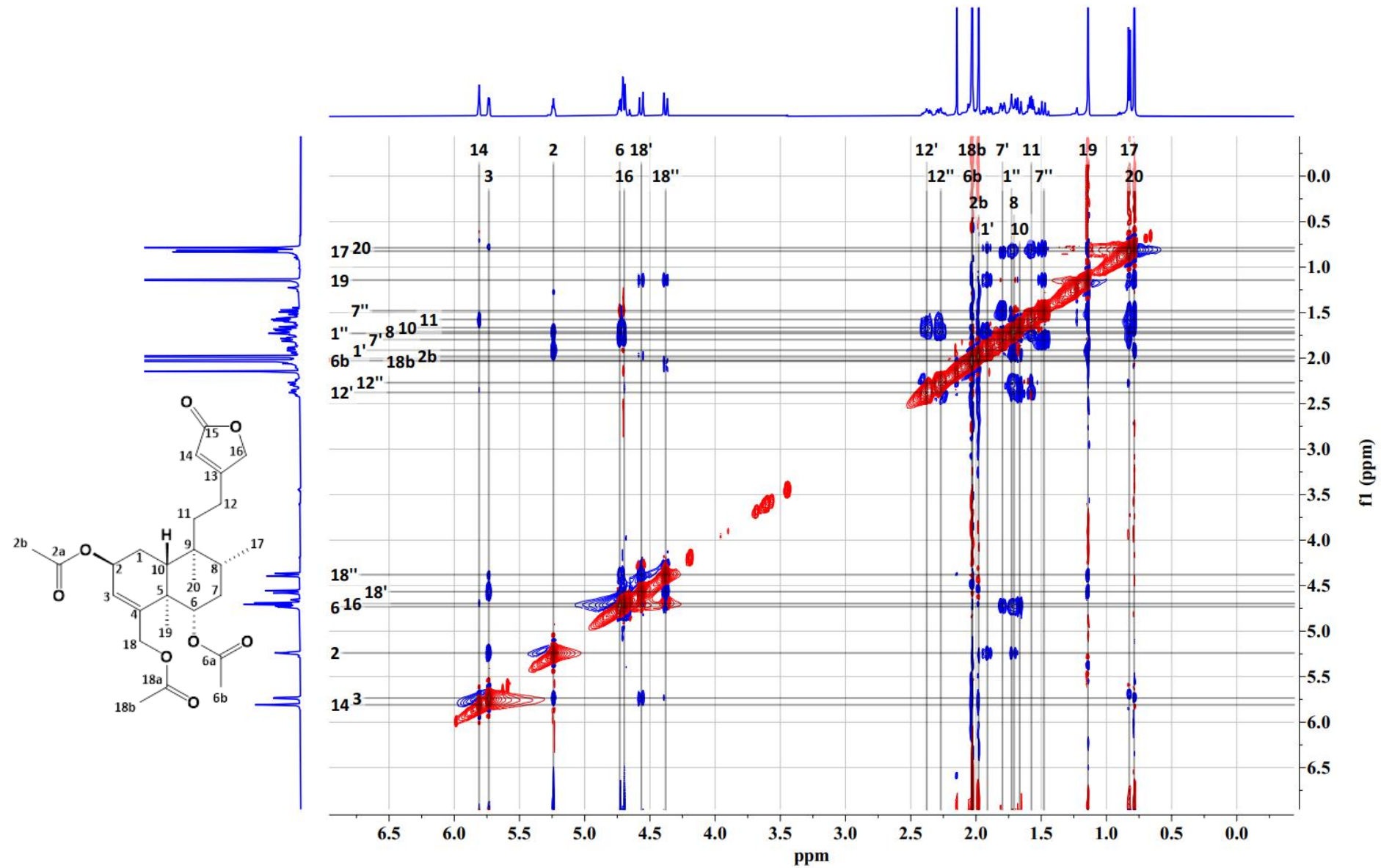


**Espectro 22.** Experimento HSQC (500 MHz CDCl<sub>3</sub>) del producto de acetilación del compuesto **3**.

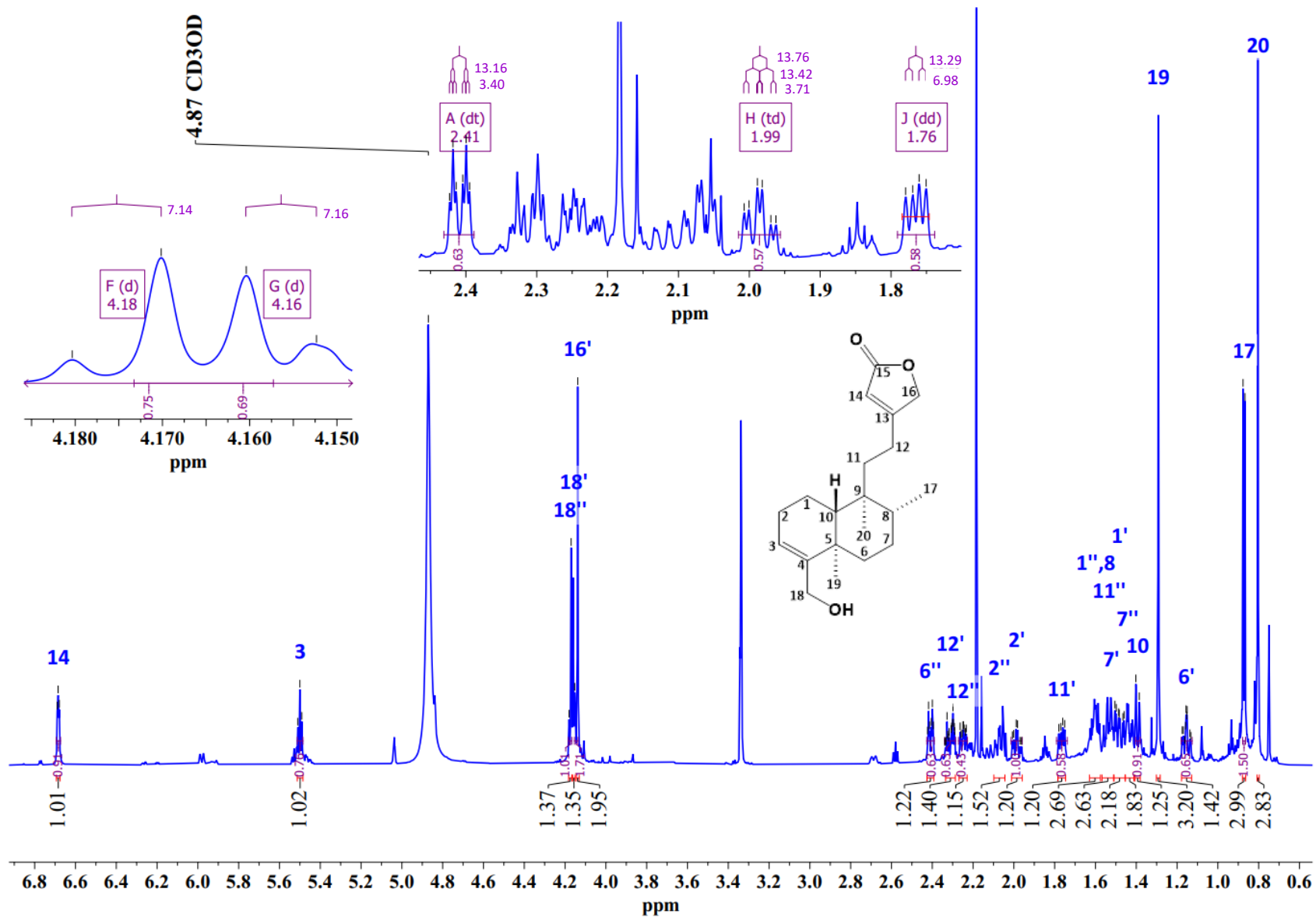




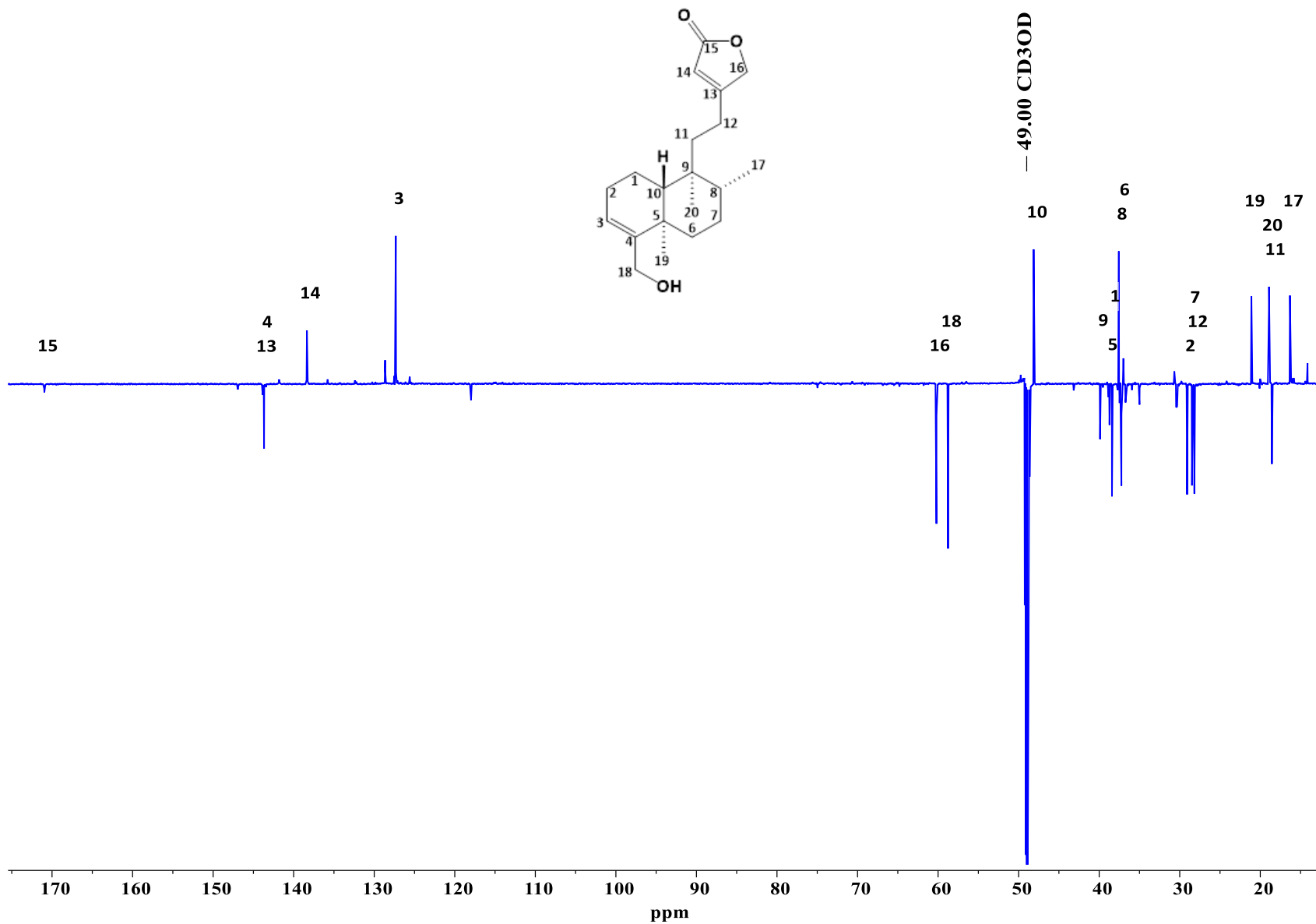
**Espectro 23.** Experimento HMBC (500 MHz  $\text{CDCl}_3$ ) del producto de acetilación del compuesto 3.



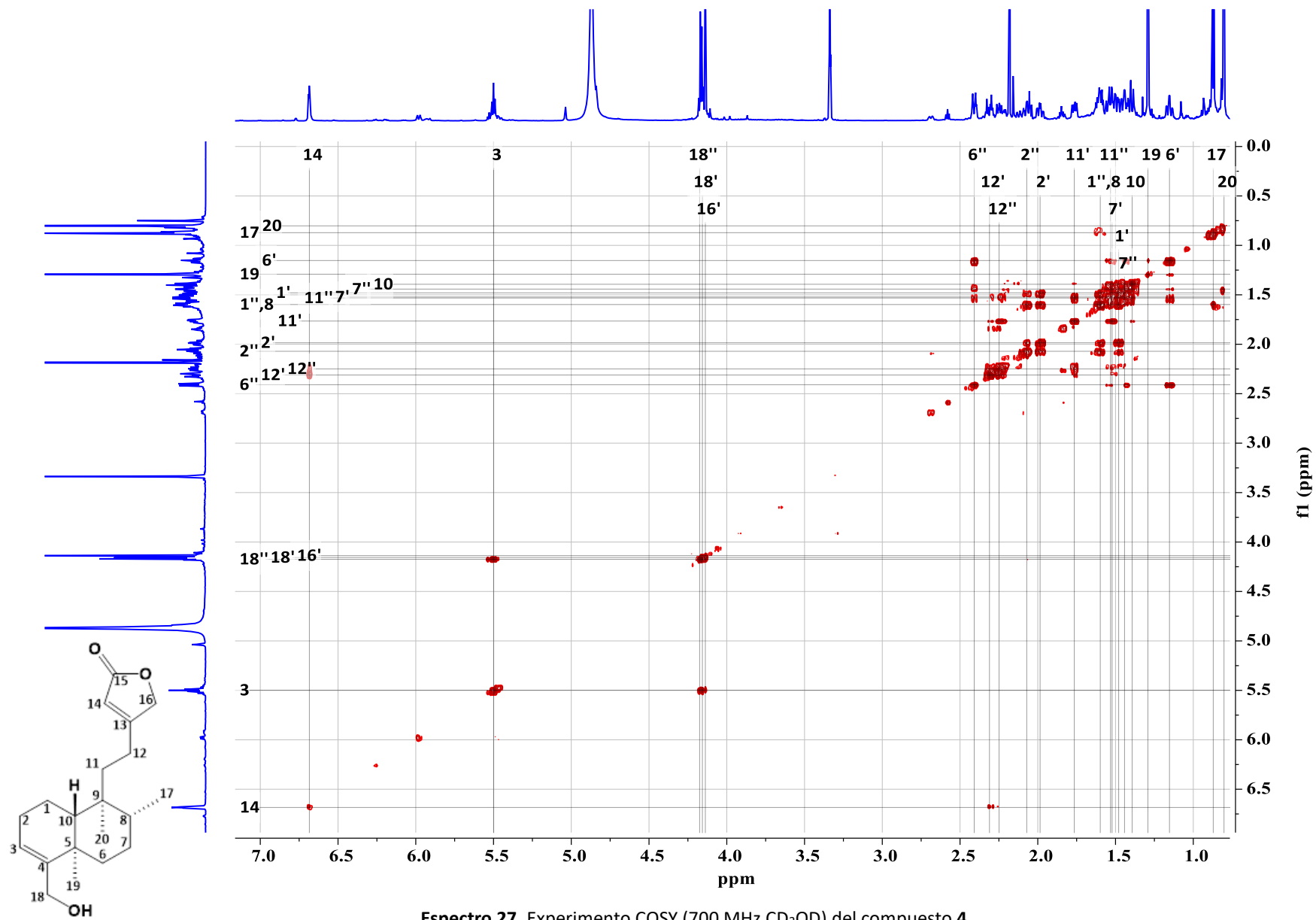
**Espectro 24.** Experimento NOESY (500 MHz CDCl<sub>3</sub>) del producto de acetilación del compuesto 3.



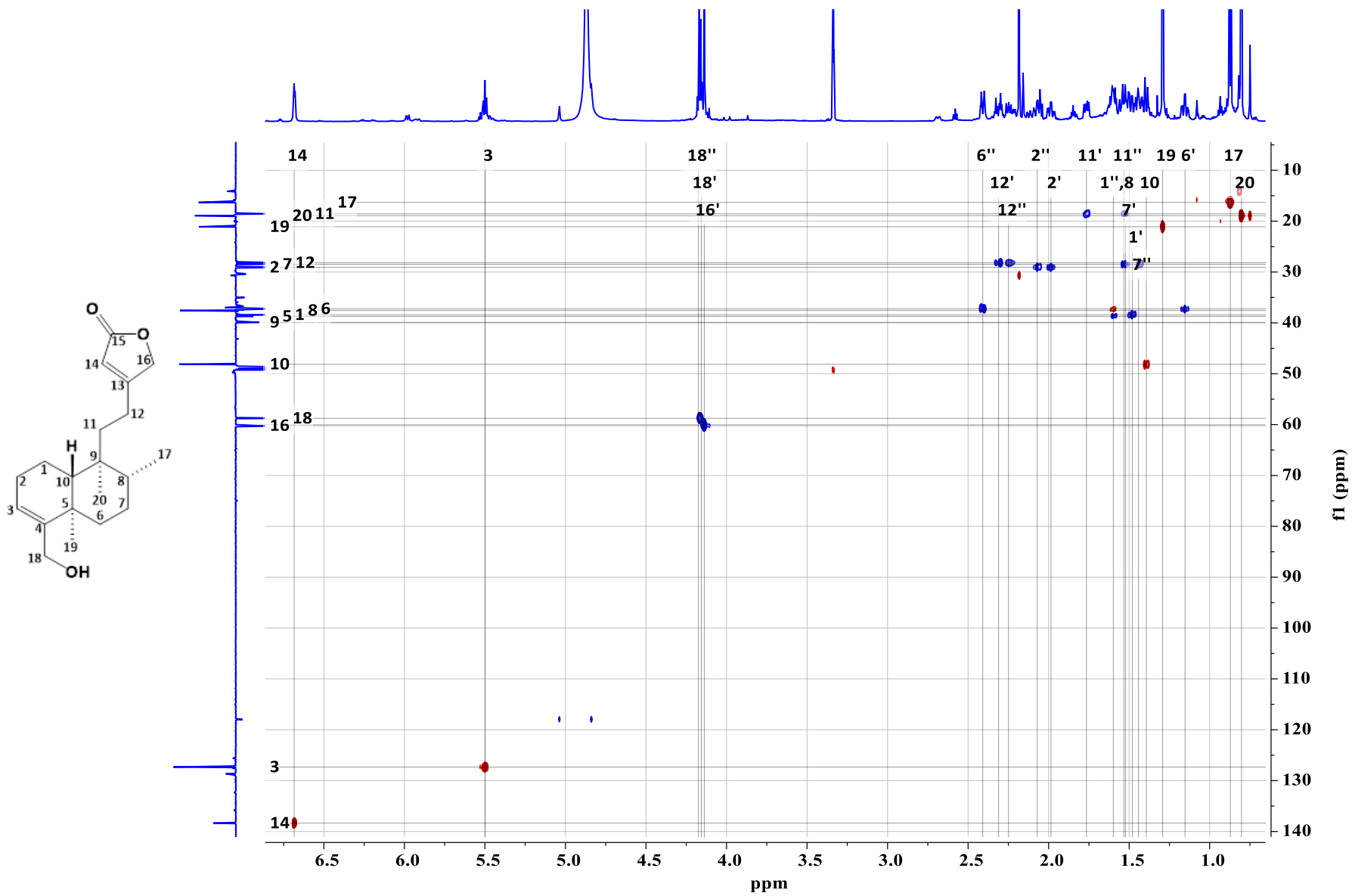
Espectro 25. RMN  $^1\text{H}$  (700 MHz  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del compuesto 4.



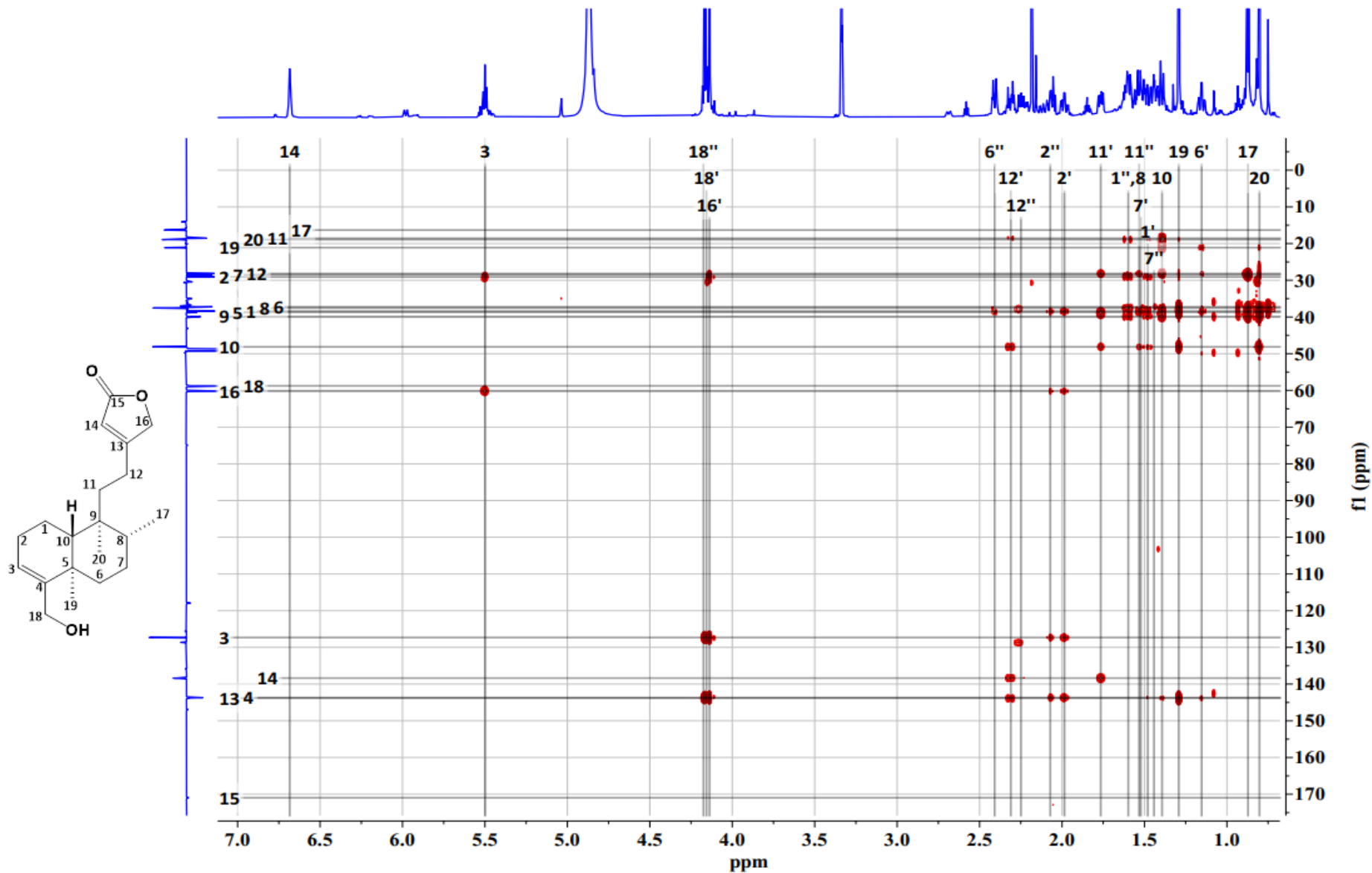
Espectro 26. RMN  $^{13}\text{C}$  (175 MHz  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) del compuesto 4.



Espectro 27. Experimento COSY (700 MHz CD<sub>3</sub>OD) del compuesto 4.



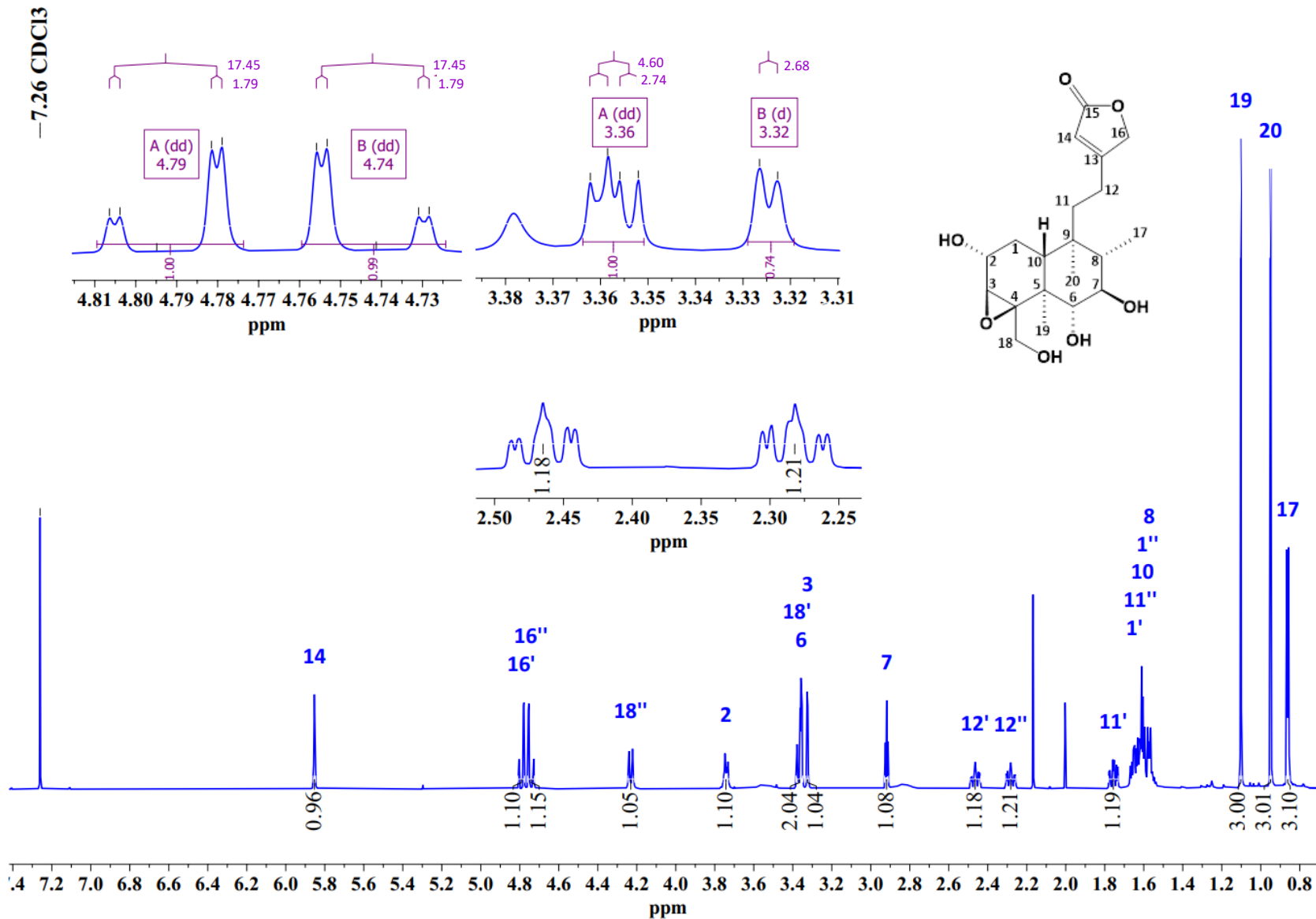
Espectro 28. Experimento HSQC (700 MHz CD<sub>3</sub>OD) del compuesto 4.



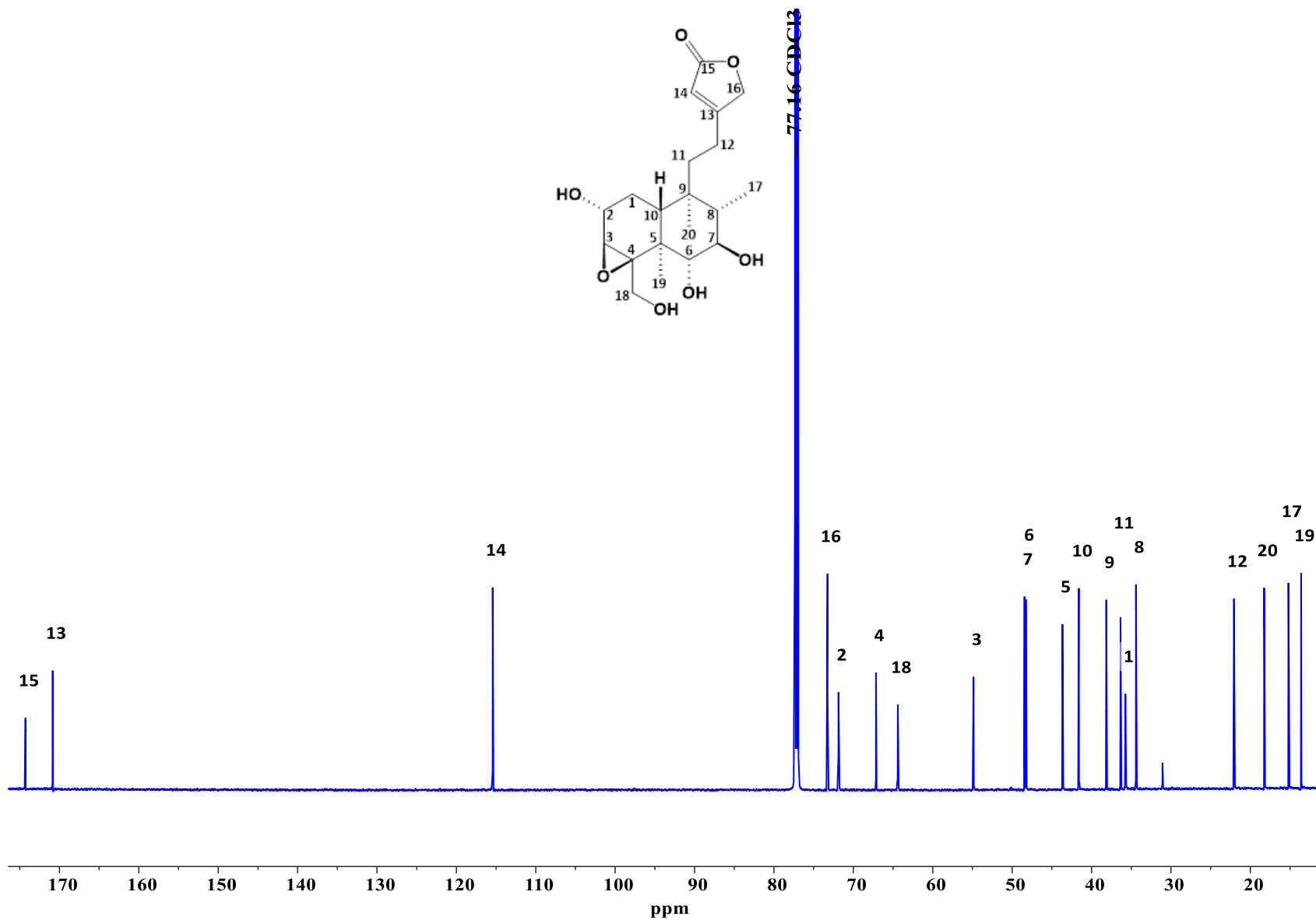
Espectro 29. Experimento HMBC (700 MHz CD<sub>3</sub>OD) del compuesto 4.



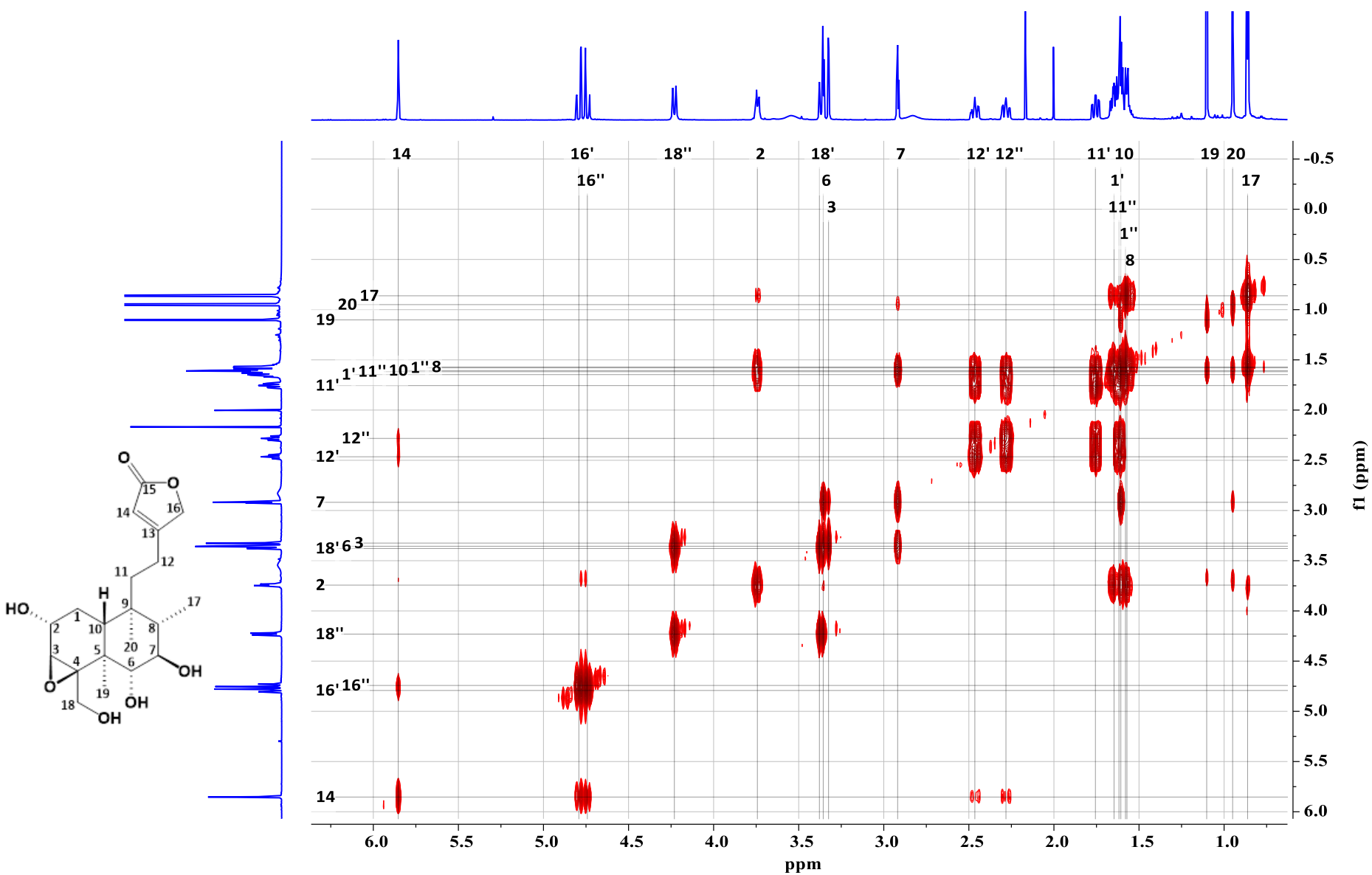




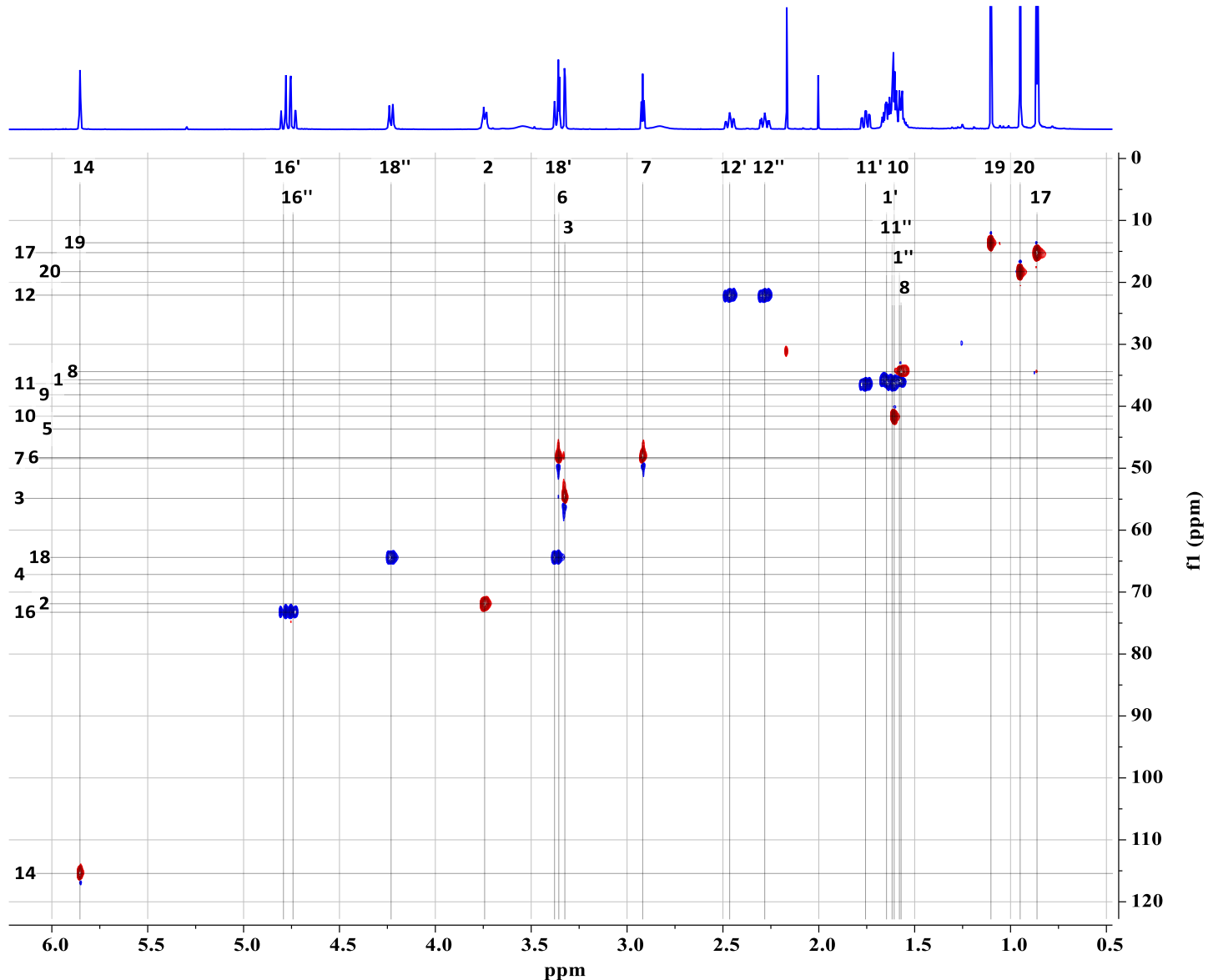
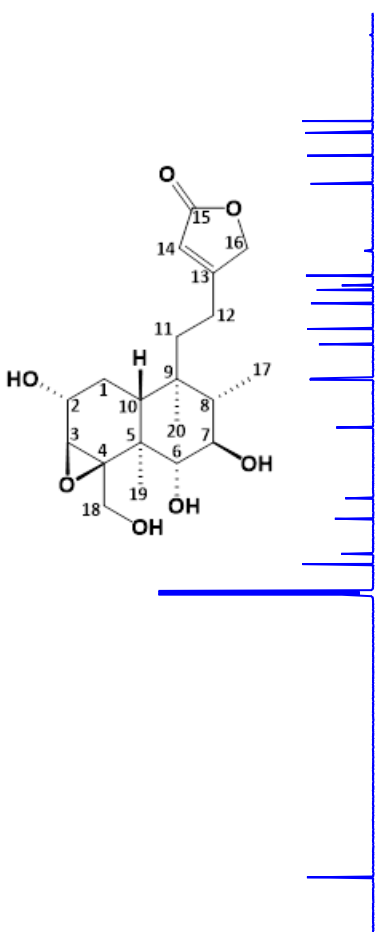
Espectro 31. RMN <sup>1</sup>H (700 MHz CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 5.



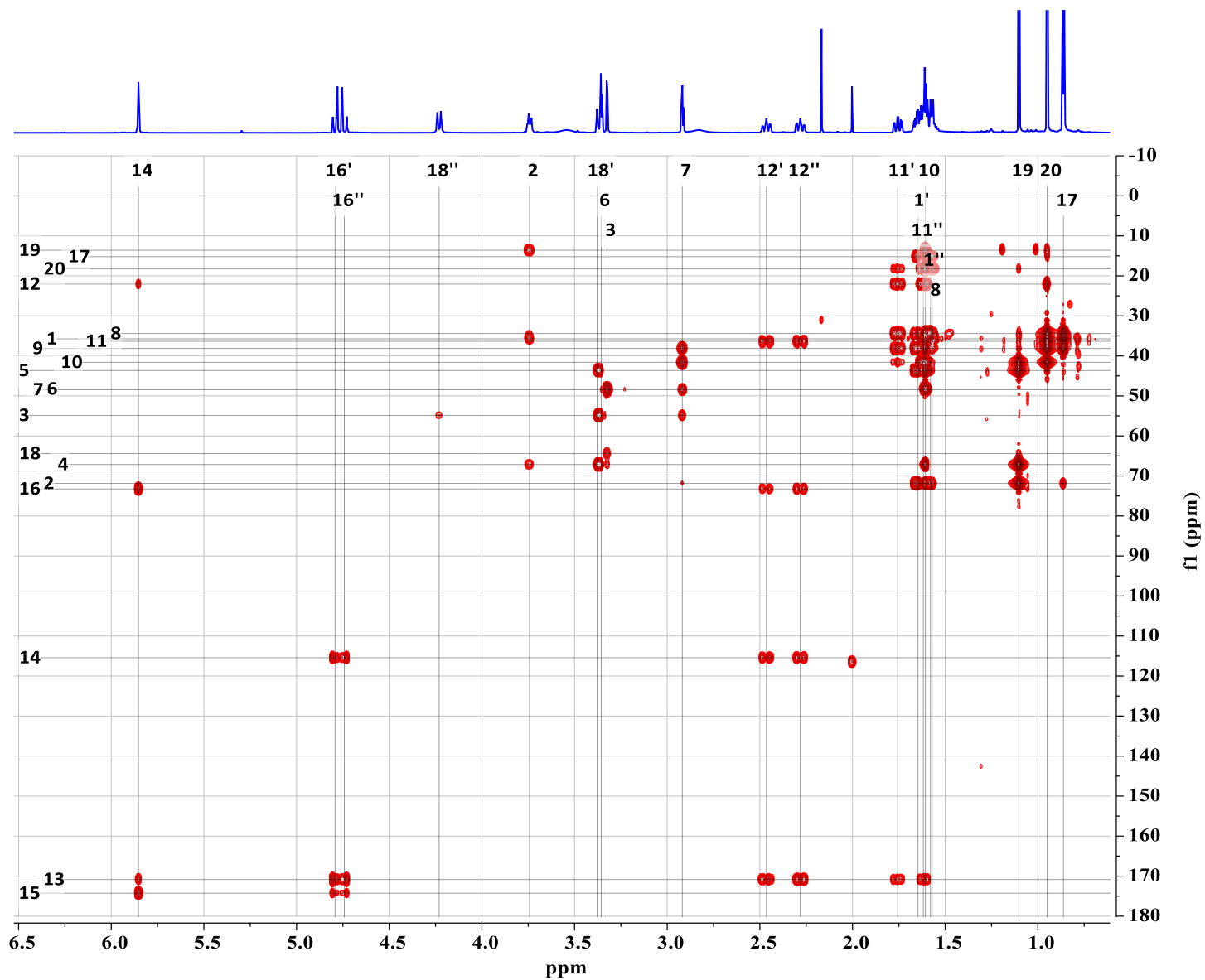
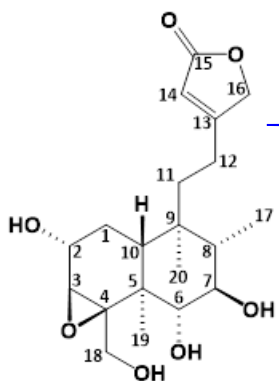
Espectro 32. RMN  $^{13}\text{C}$  (175 MHz  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 5.



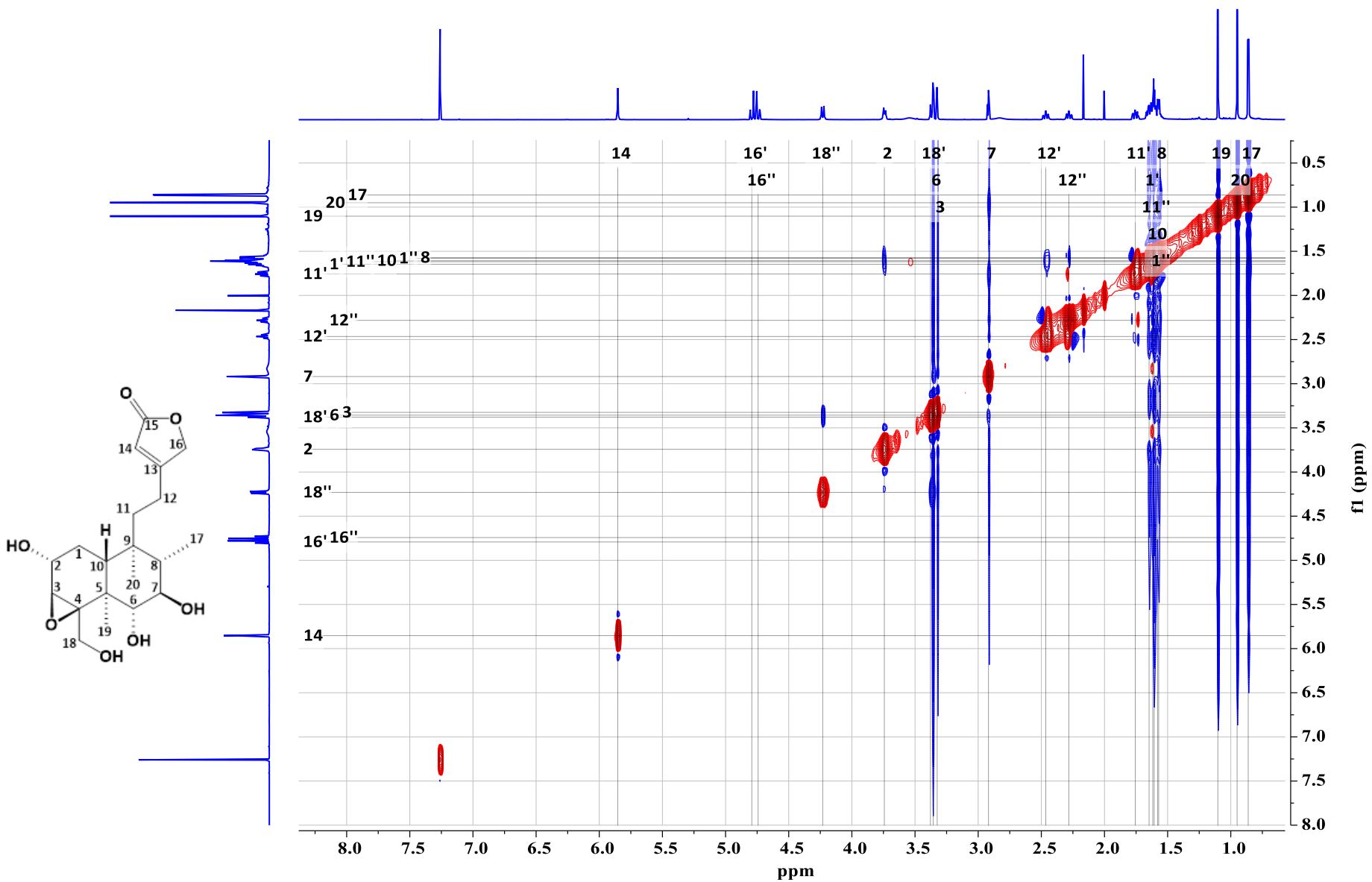
Espectro 33. Experimento COSY (700 MHz CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 5.



Espectro 34. Experimento HSQC (700 MHz CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 5.

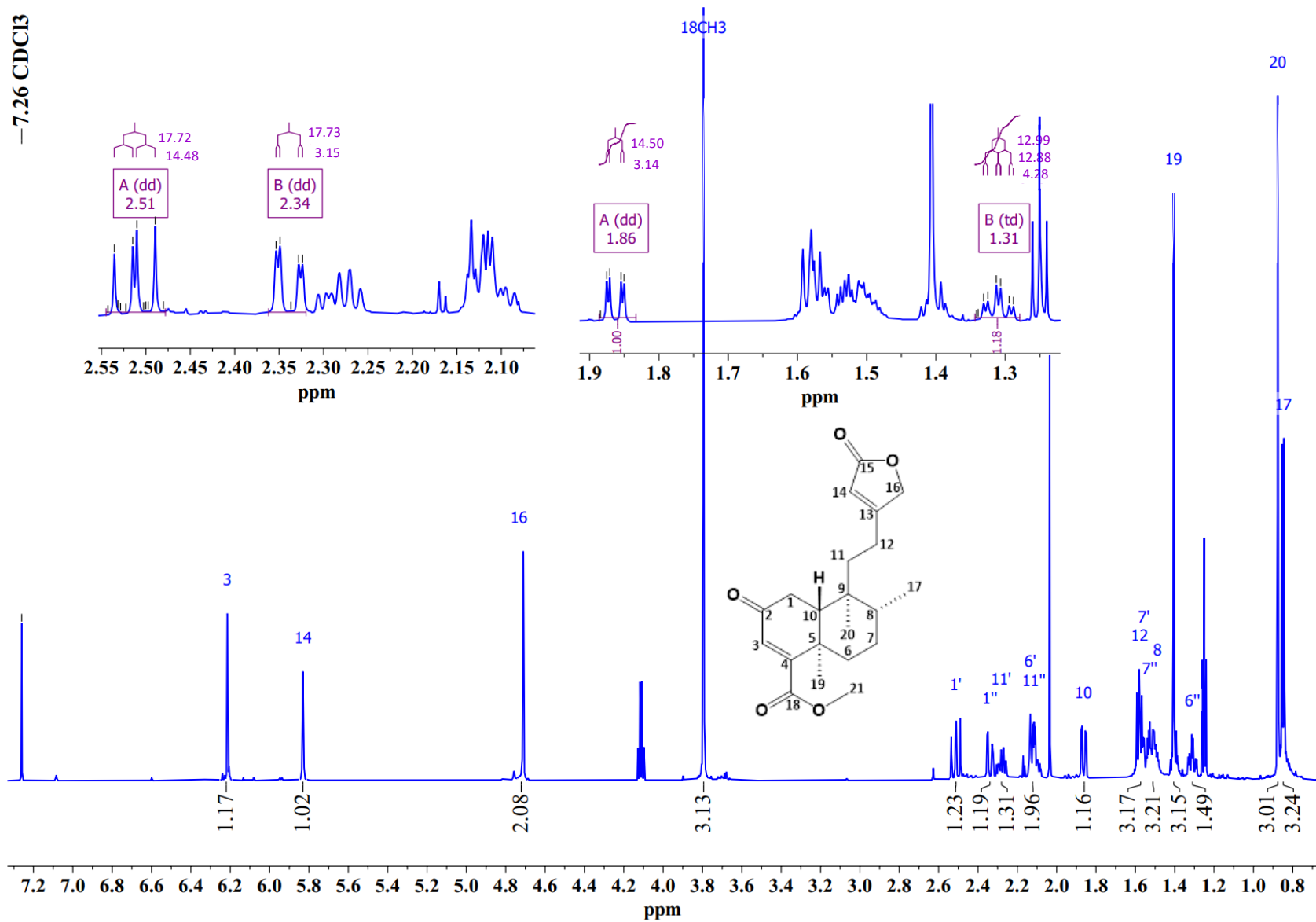


Espectro 35. Experimento HMBC (700 MHz CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 5.

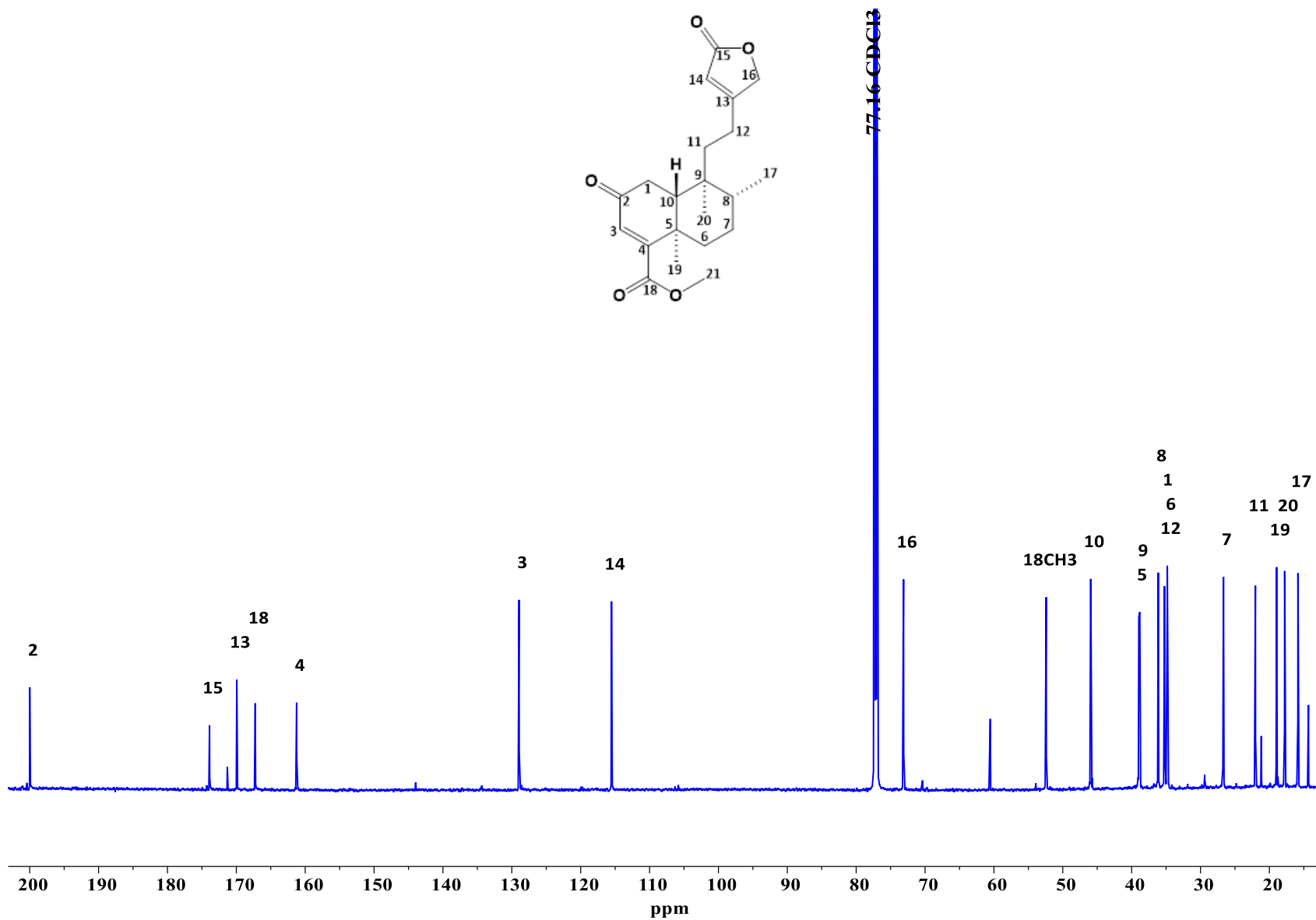
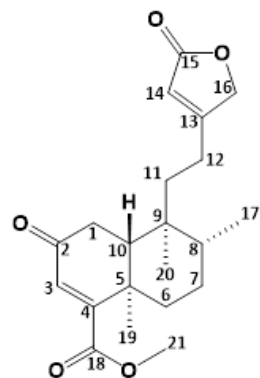


Espectro 36. Experimento NOESY (700 MHz CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 5.

-7.26 CDCl<sub>3</sub>

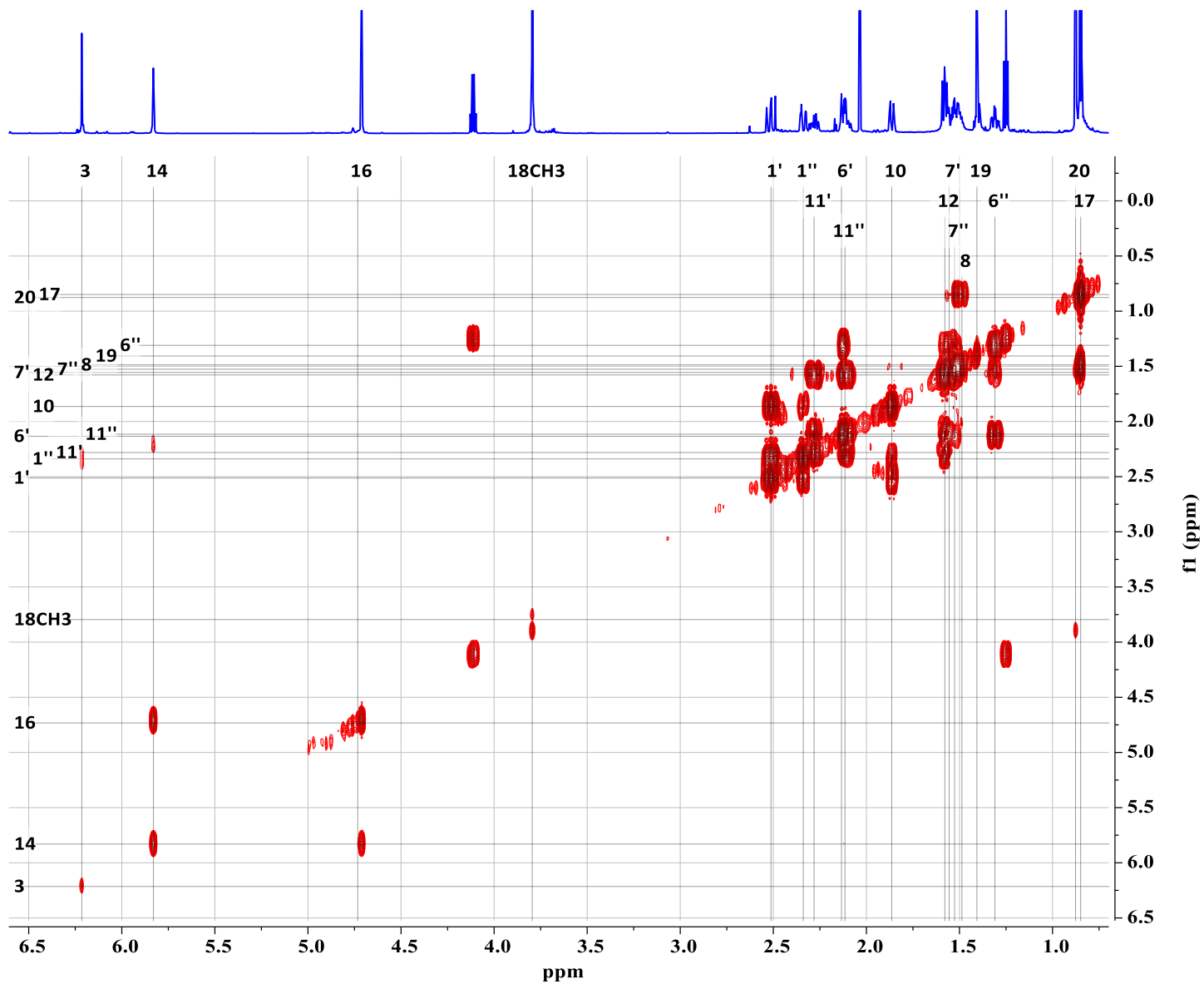


Espectro 37. RMN <sup>1</sup>H (700 MHz CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 6.

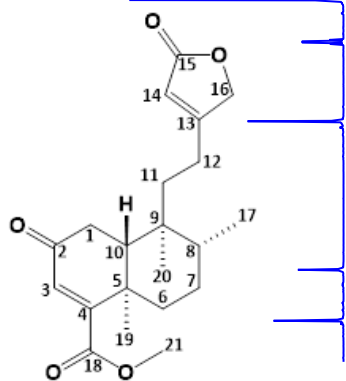


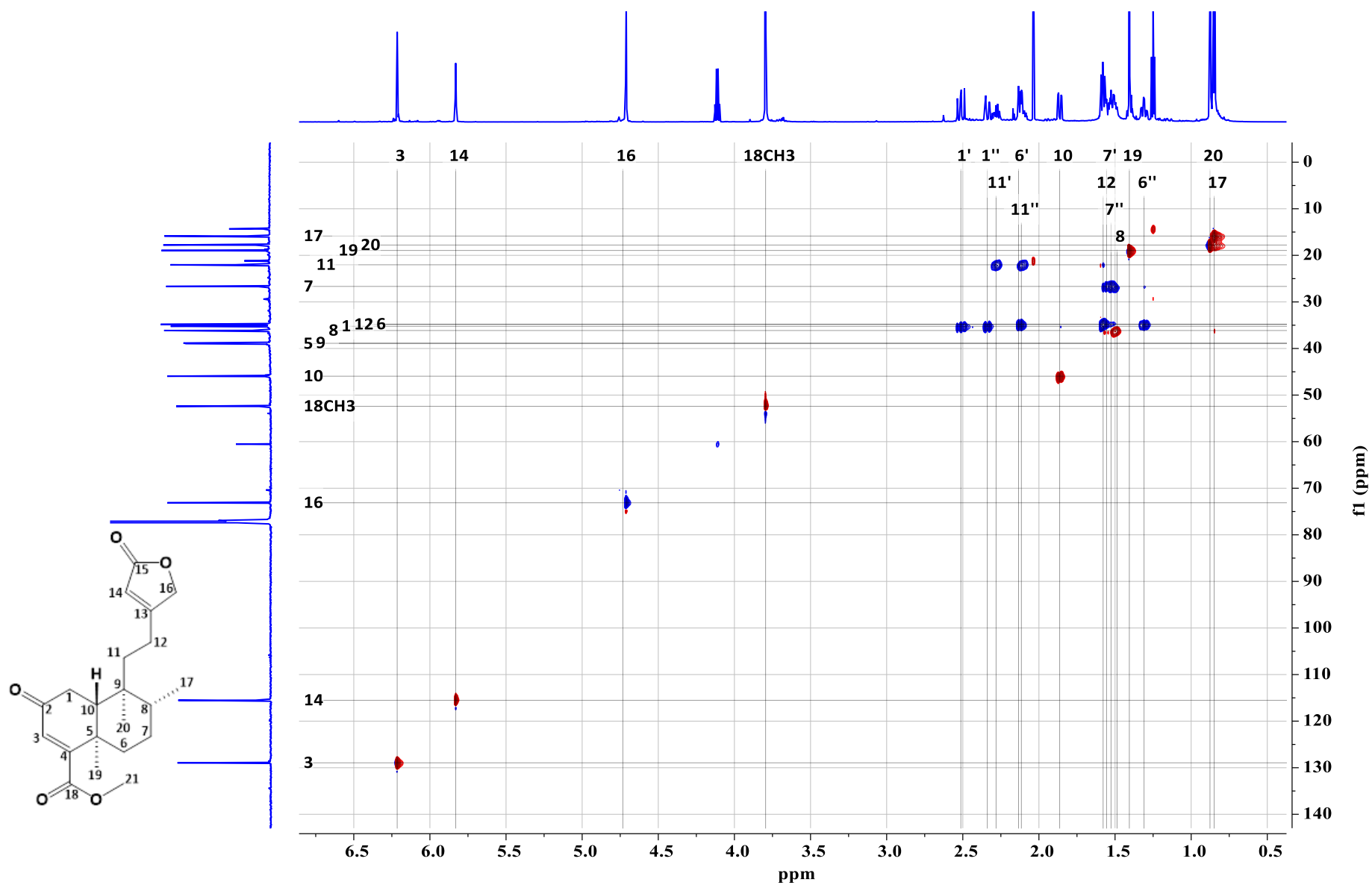
Espectro 38. RMN  $^{13}\text{C}$  (175 MHz  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 6.



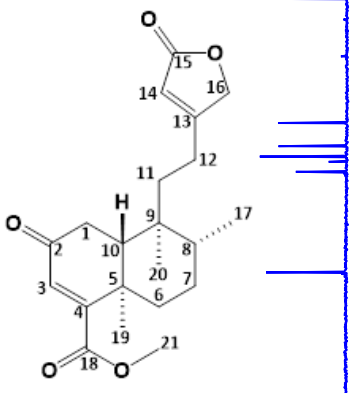
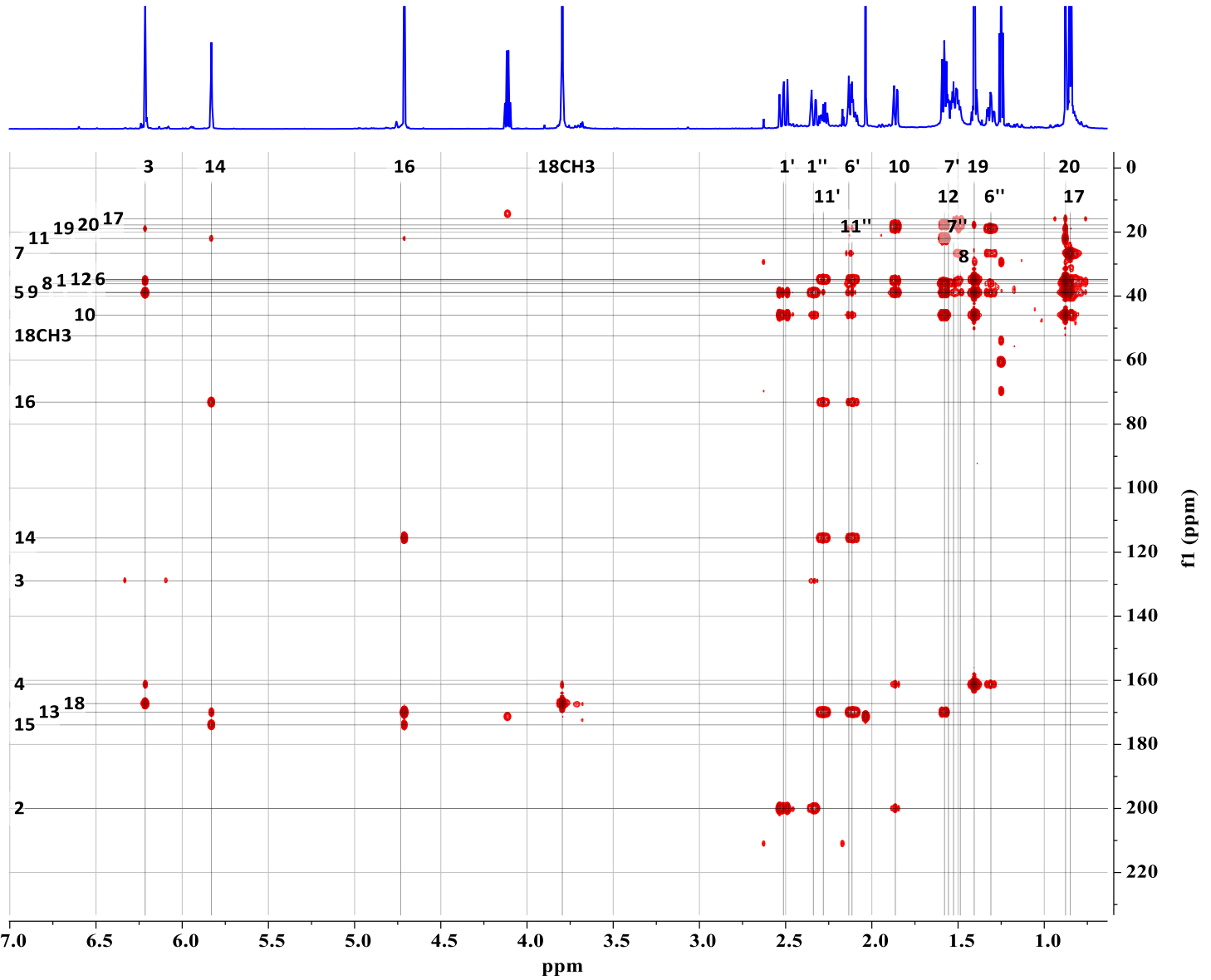


Espectro 39. Experimento COSY (700 MHz CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 6.

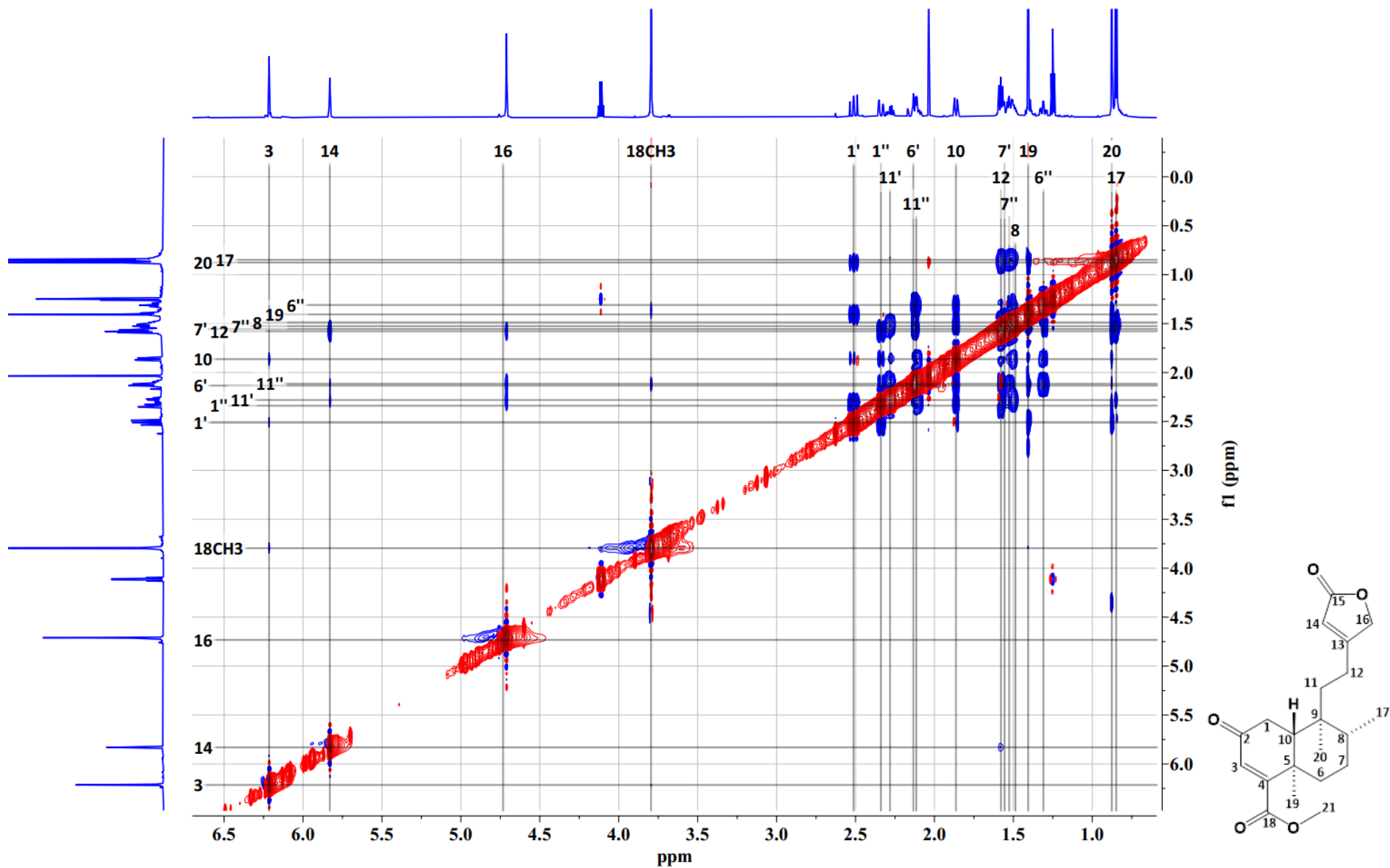




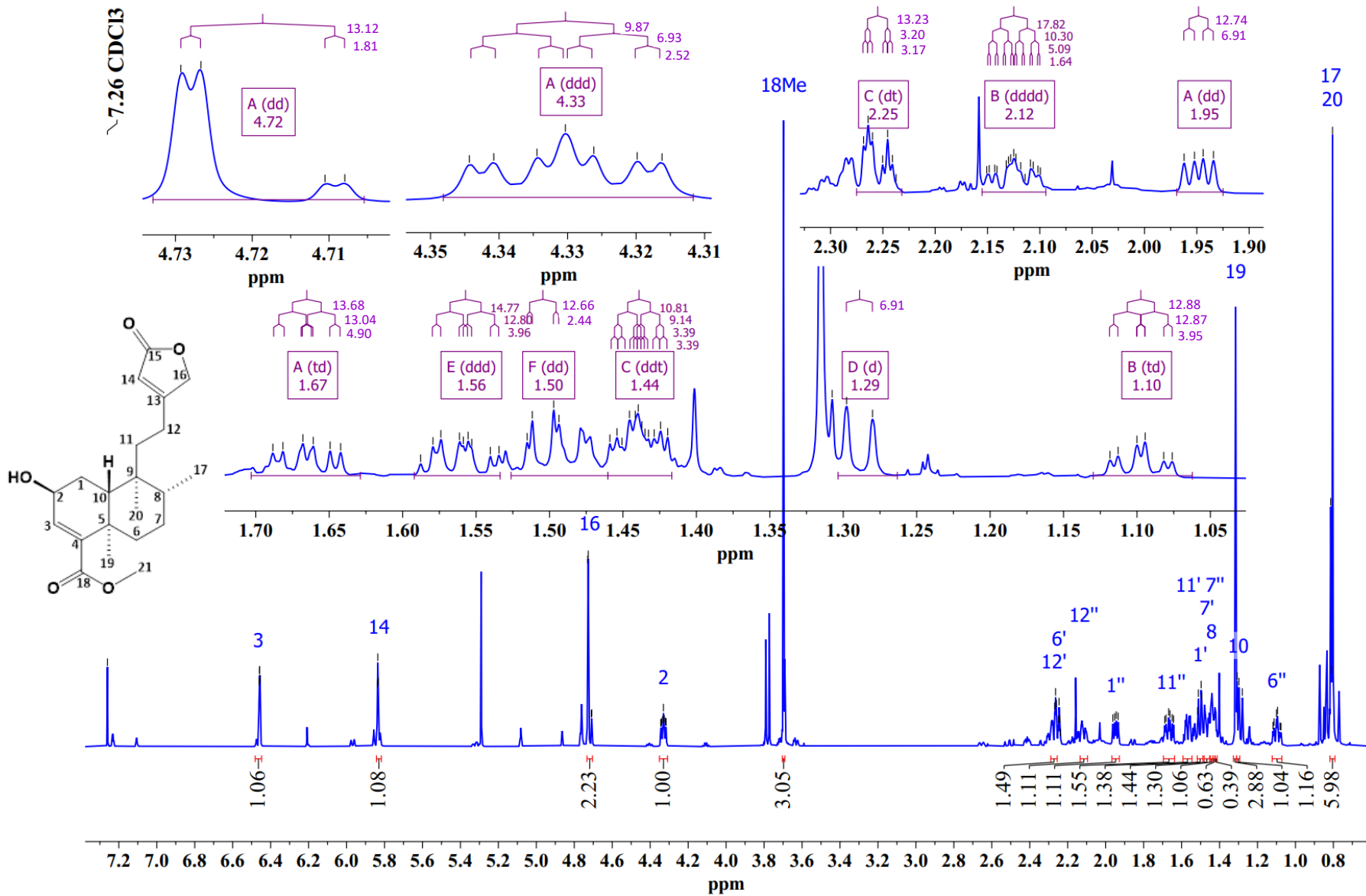
**Espectro 40.** Experimento HSQC (700 MHz  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 6.

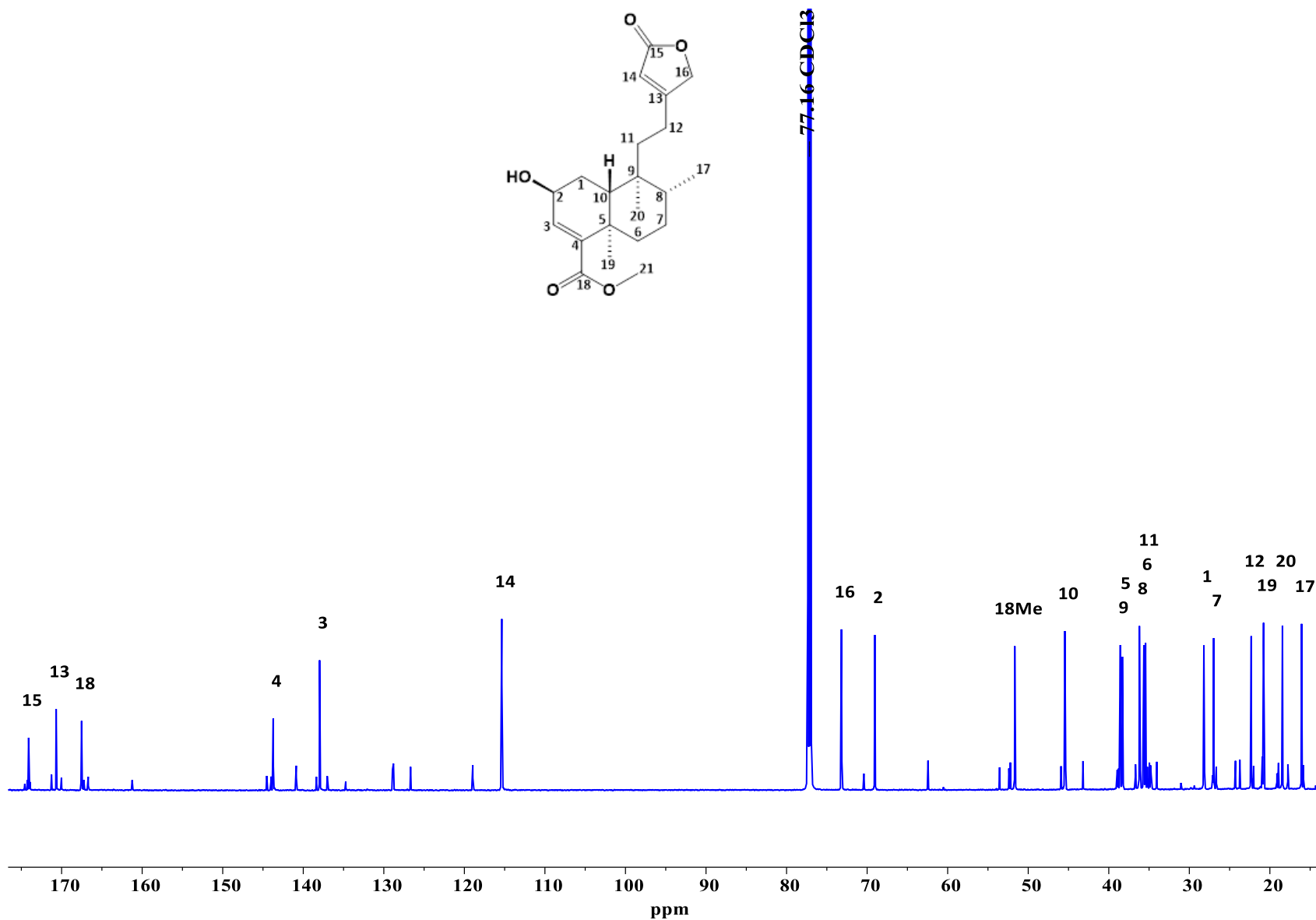
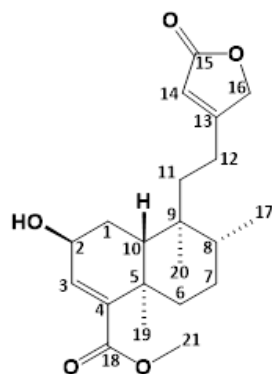


Espectro 41. Experimento HMBC (700 MHz CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 6.

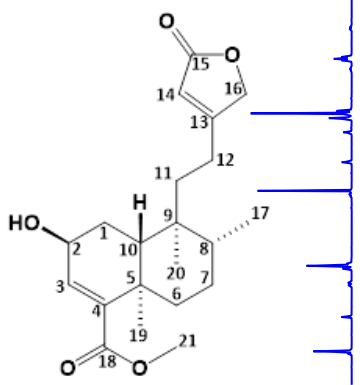
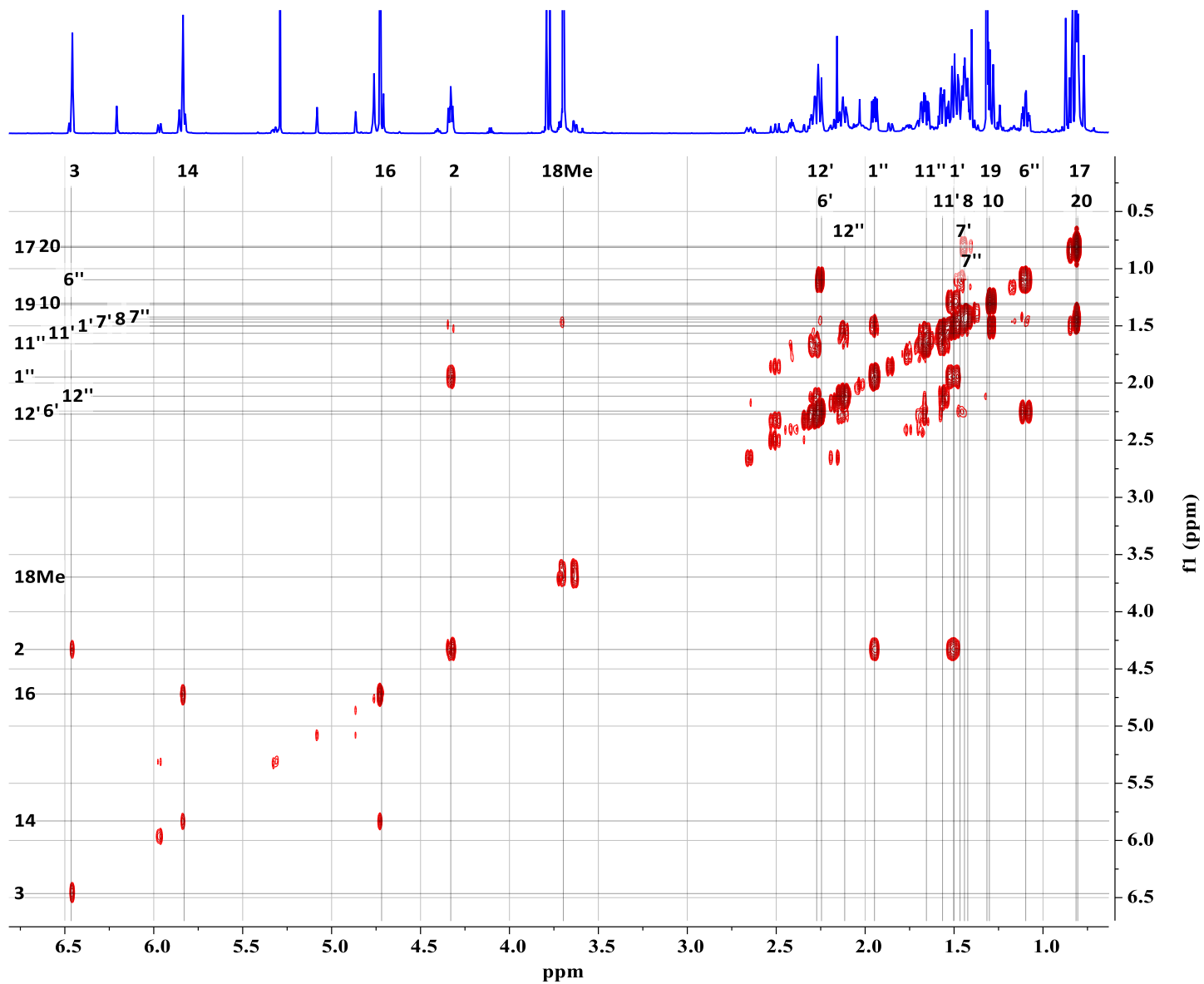


Espectro 42. Experimento NOESY (700 MHz CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 6.





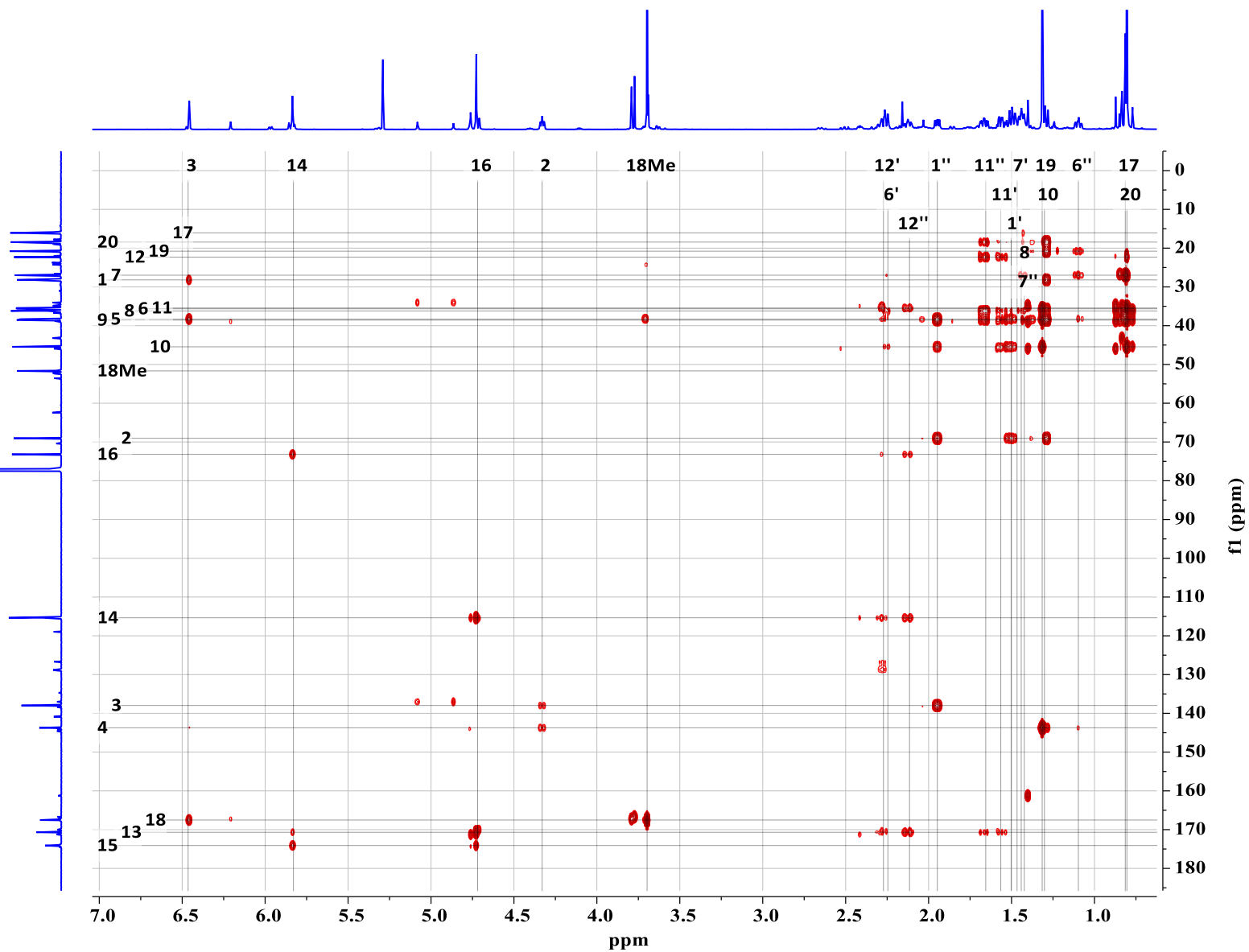
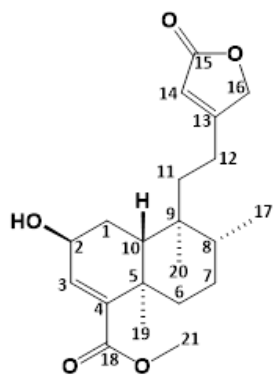
Espectro 44. RMN <sup>13</sup>C (175 MHz CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 7.



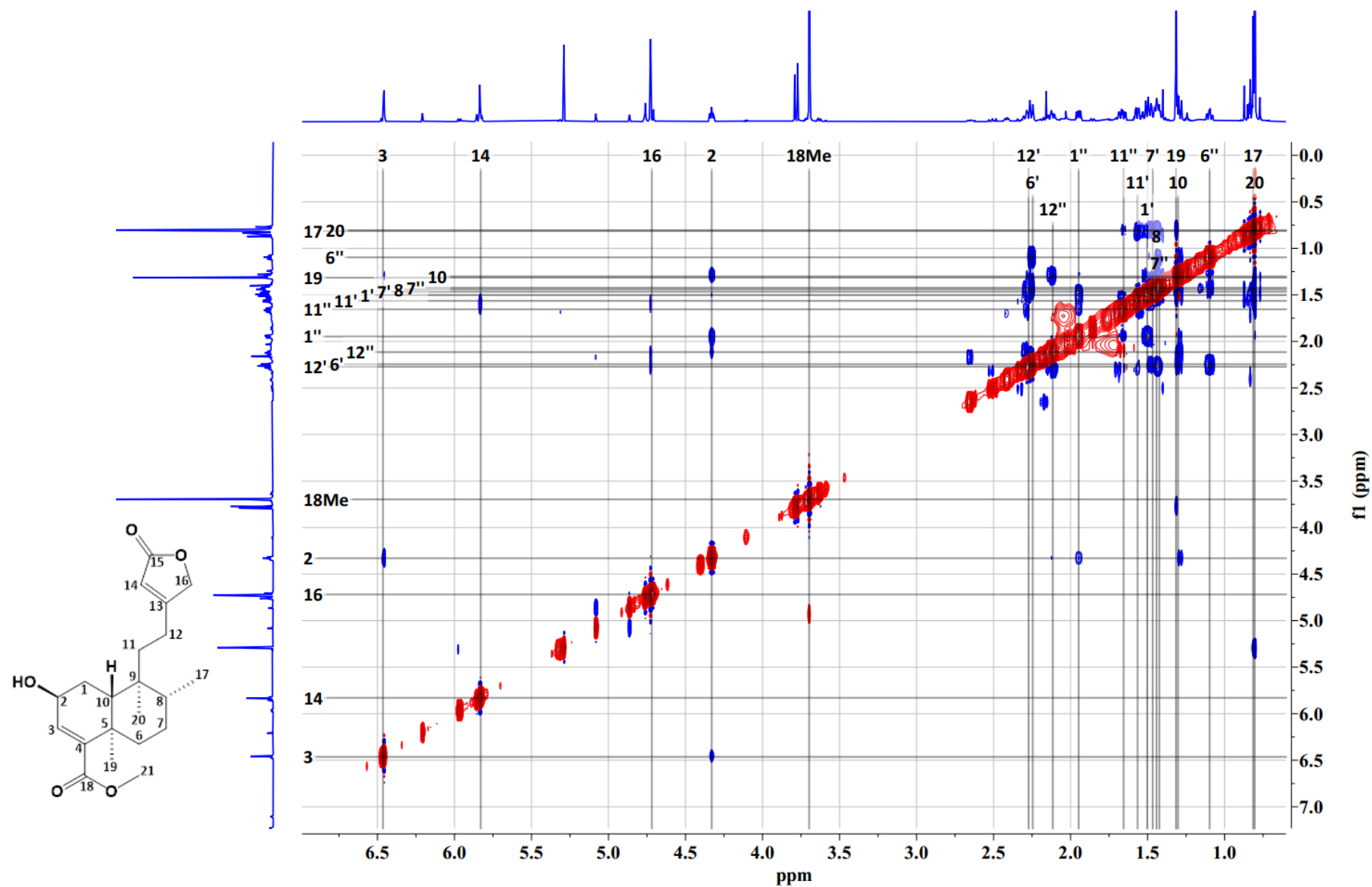
**Espectro 45.** Experimento COSY (700 MHz CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 7.



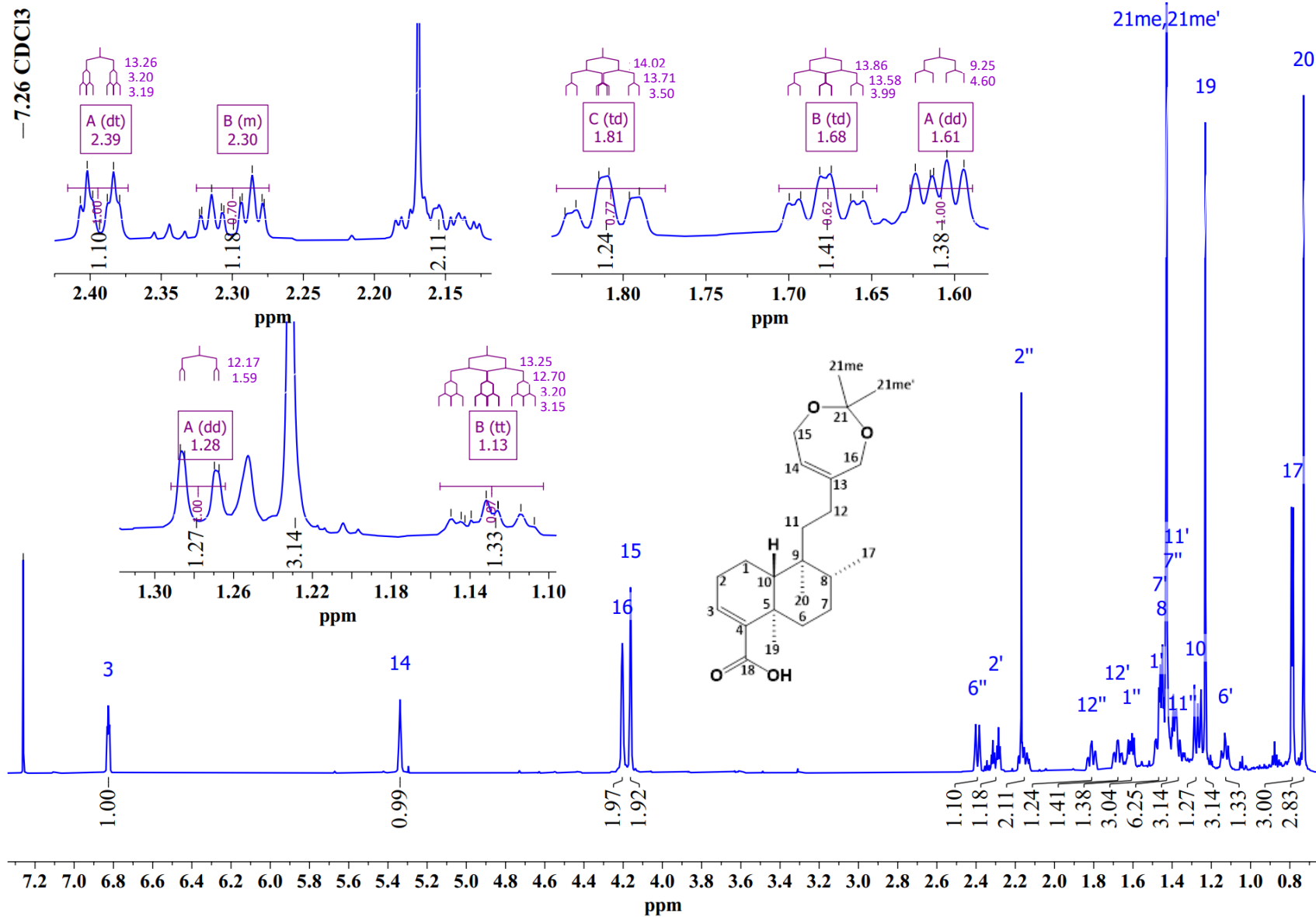




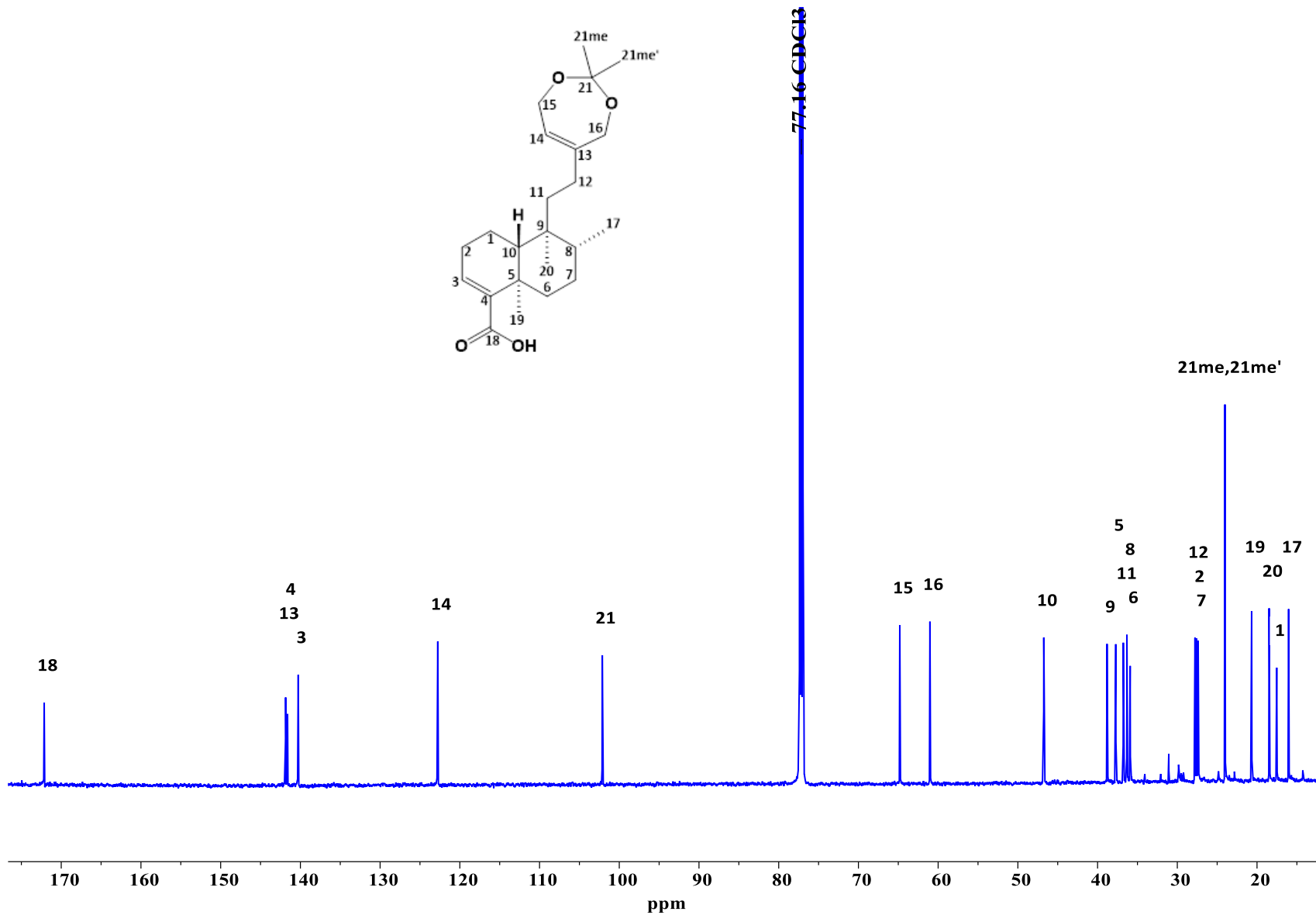
Espectro 47. Experimento HMBC (700 MHz CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 7.



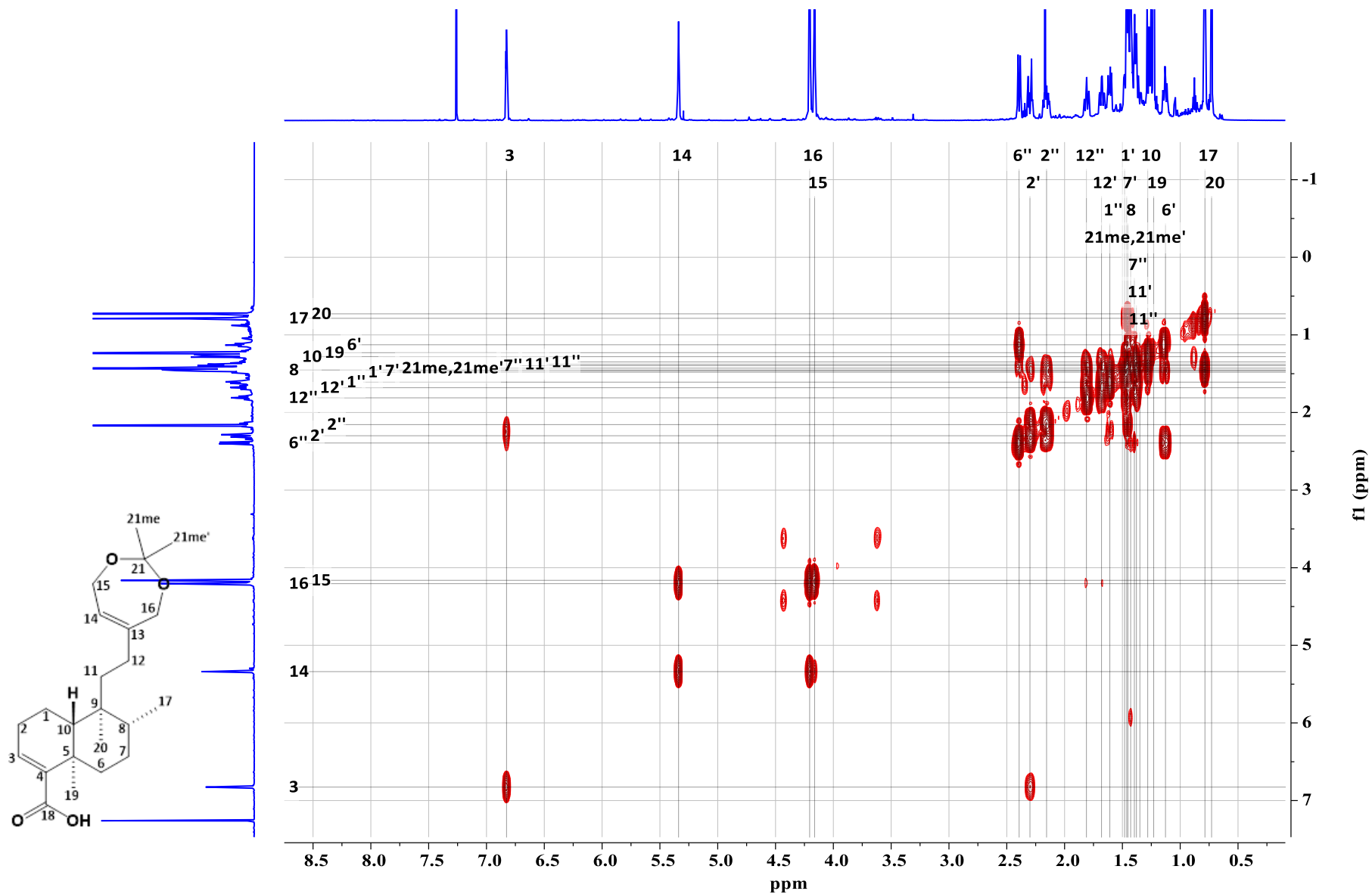
Espectro 48. Experimento NOESY (700 MHz CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 7.



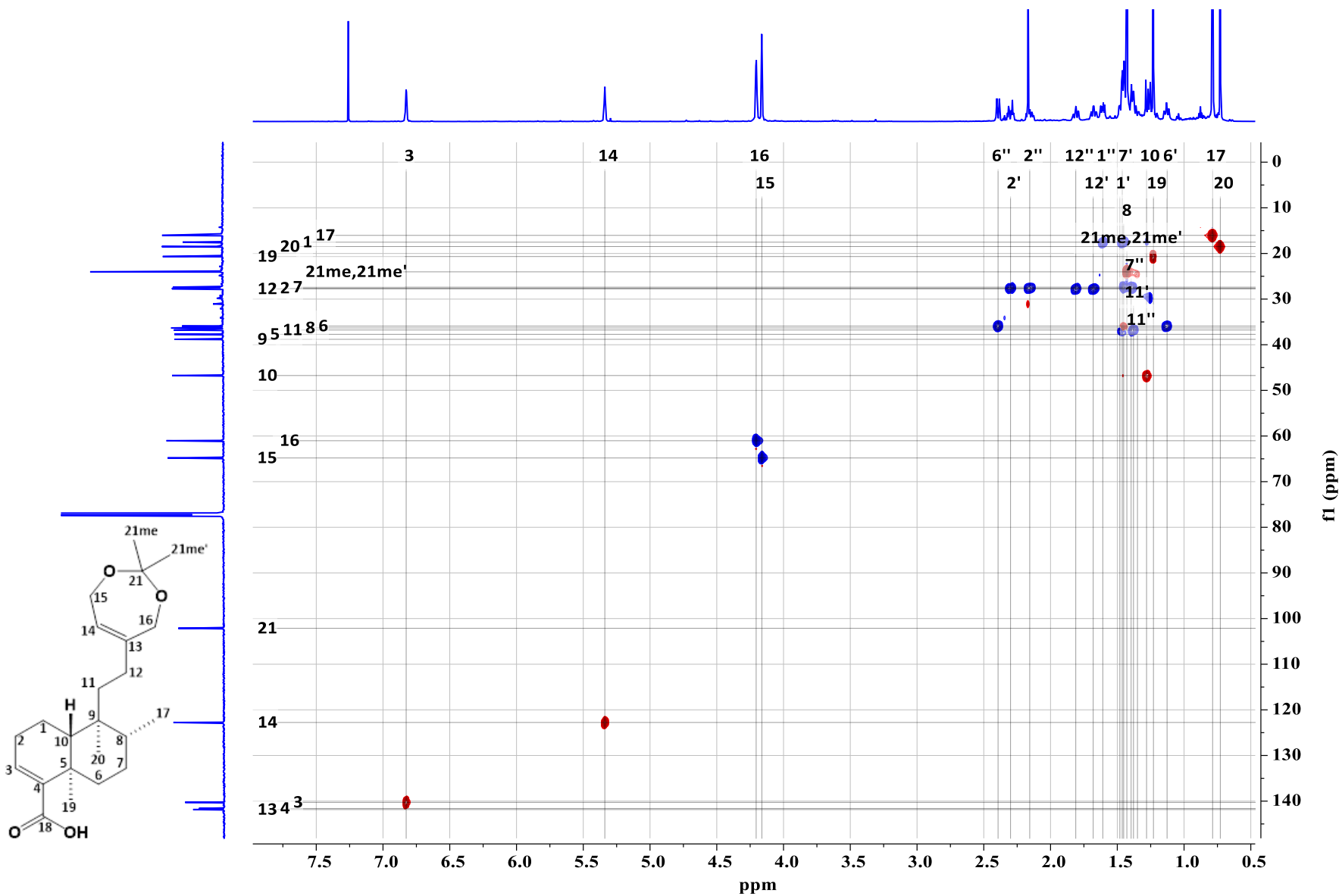
Espectro 49. RMN <sup>1</sup>H (700 MHz CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 8.



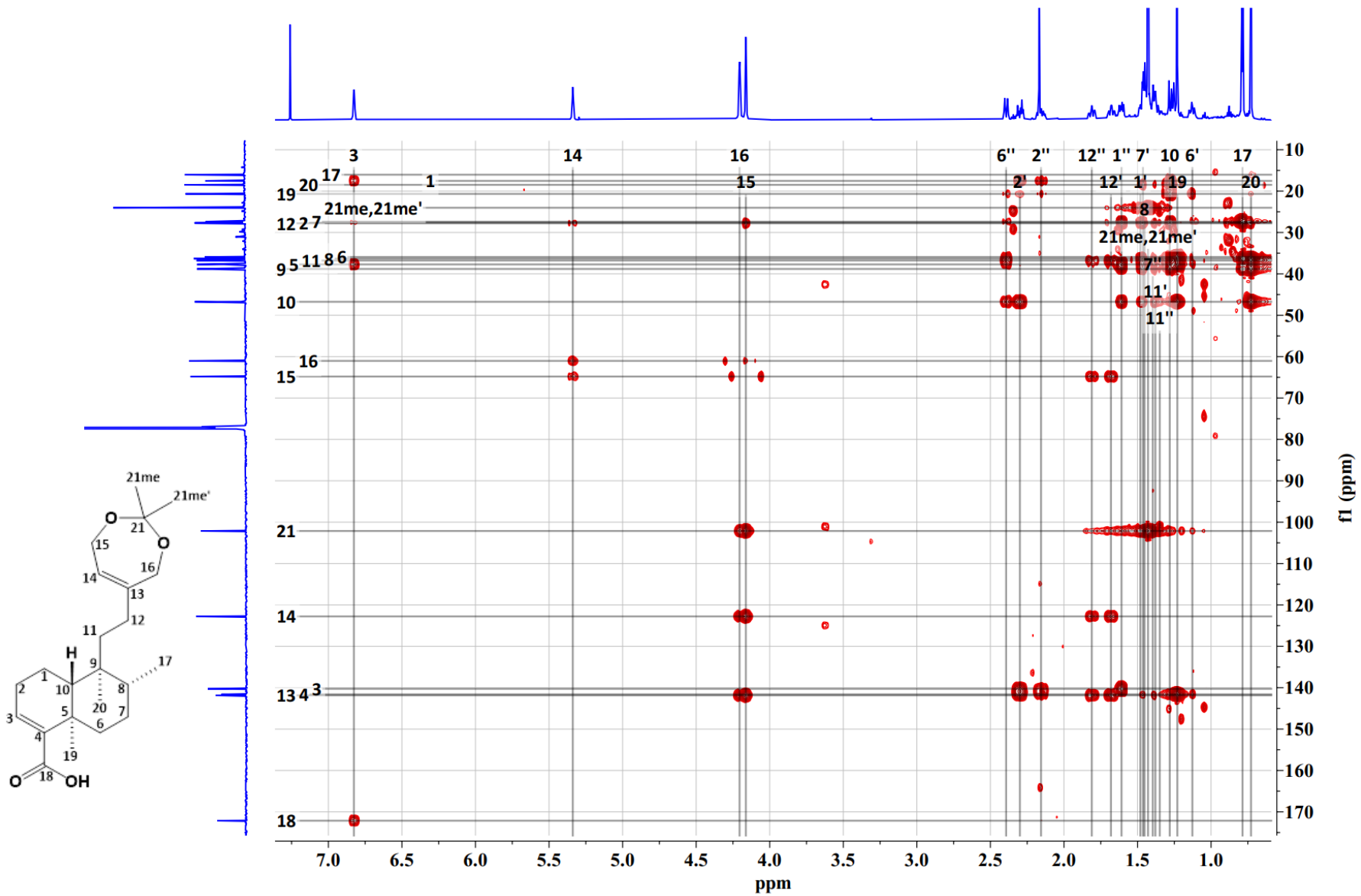
Espectro 50. RMN <sup>13</sup>C (175 MHz CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 8.



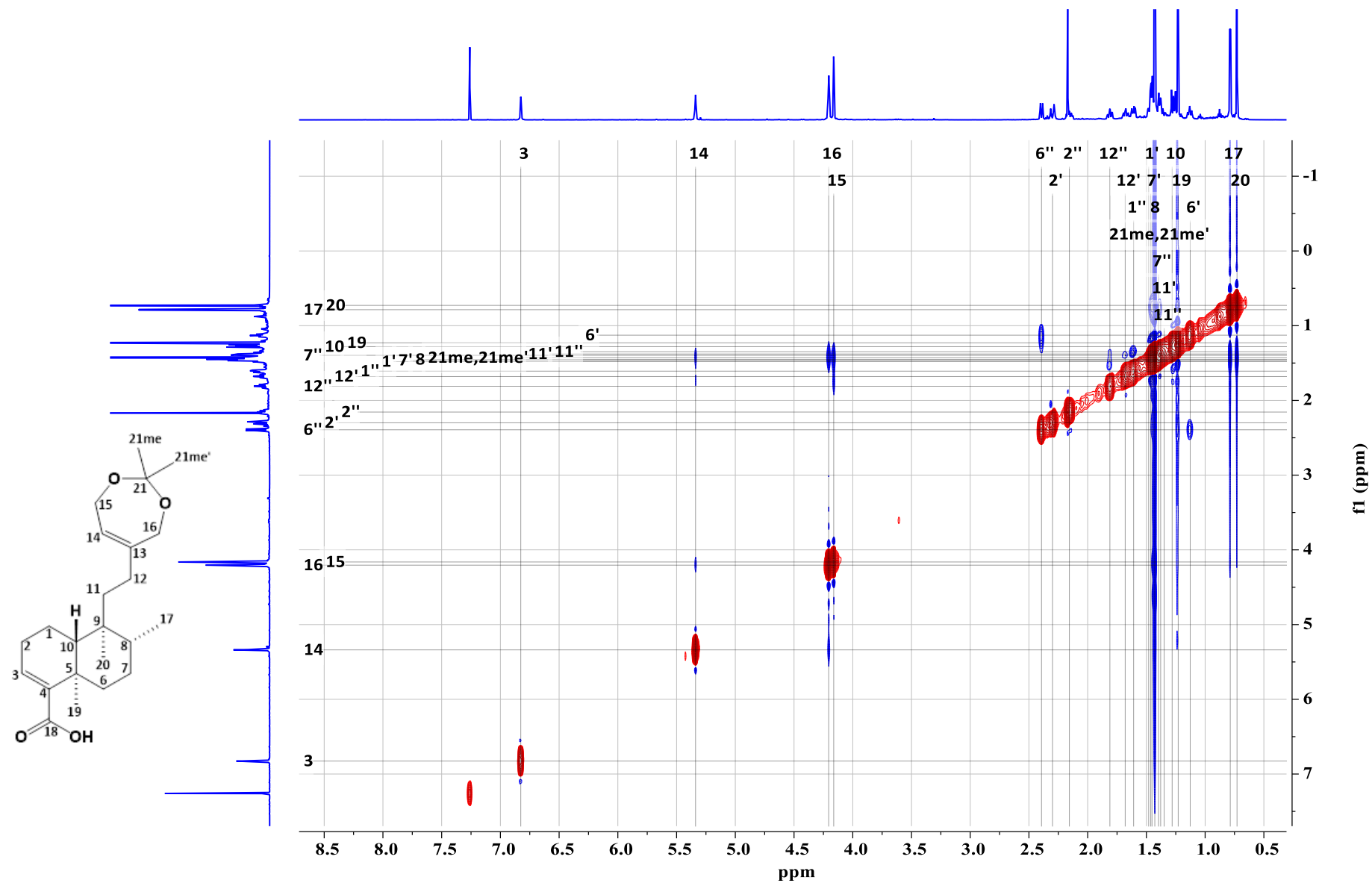
Espectro 51. Experimento COSY (700 MHz CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 8.



Espectro 52. Experimento HSQC (700 MHz CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 8.

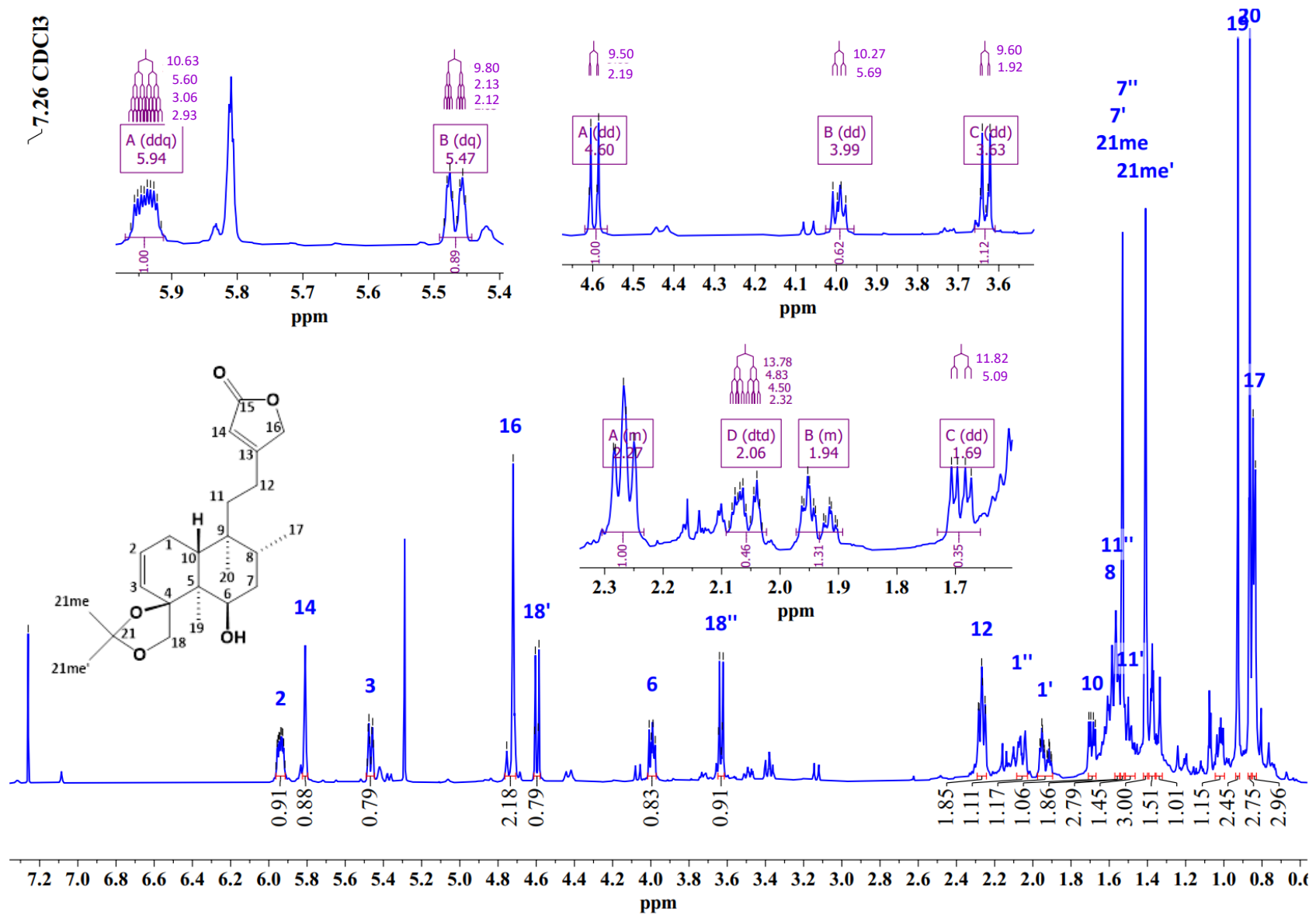


Espectro 53. Experimento HMBC (700 MHz CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 8.

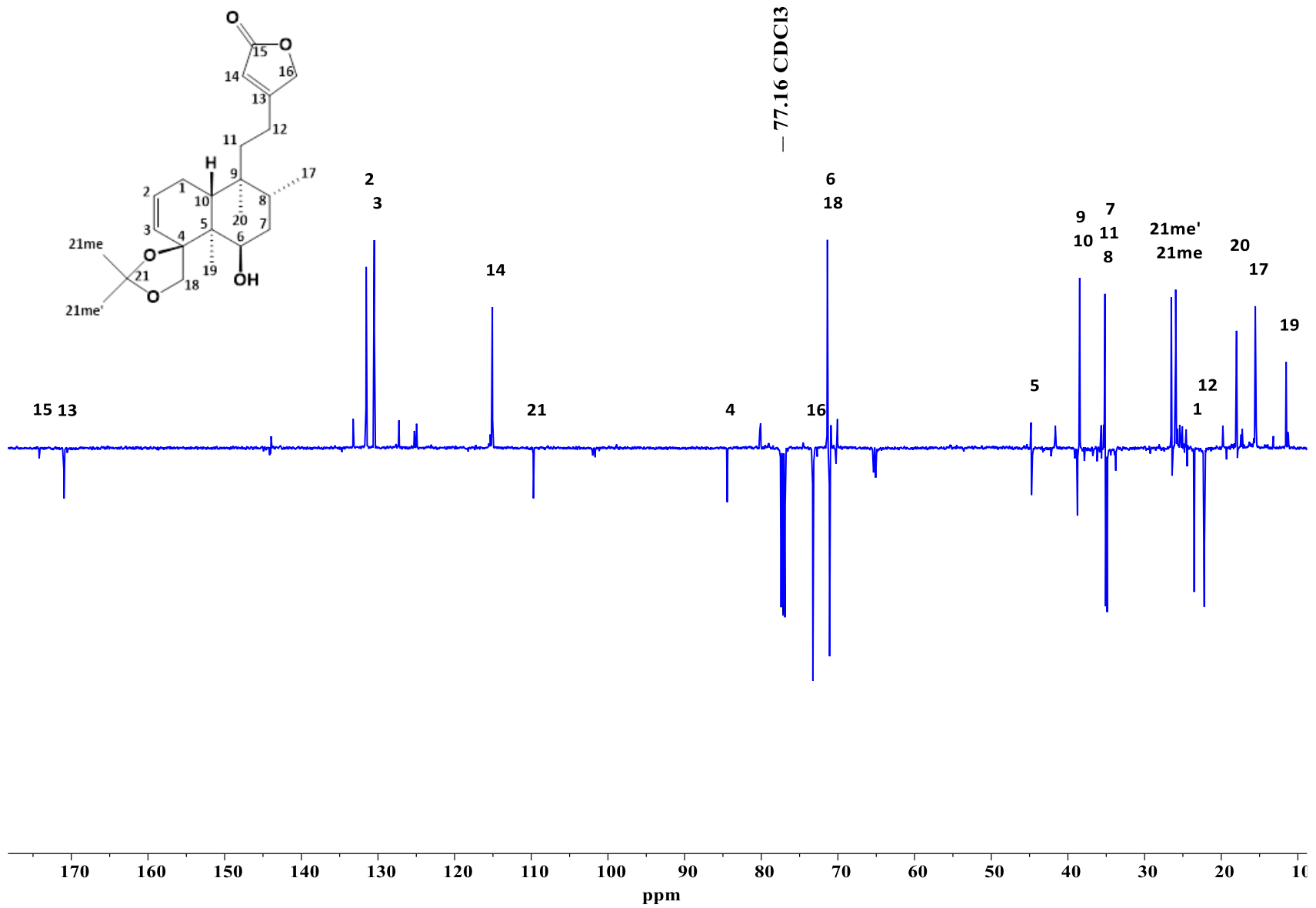


Espectro 54. Experimento NOESY (700 MHz  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 8.

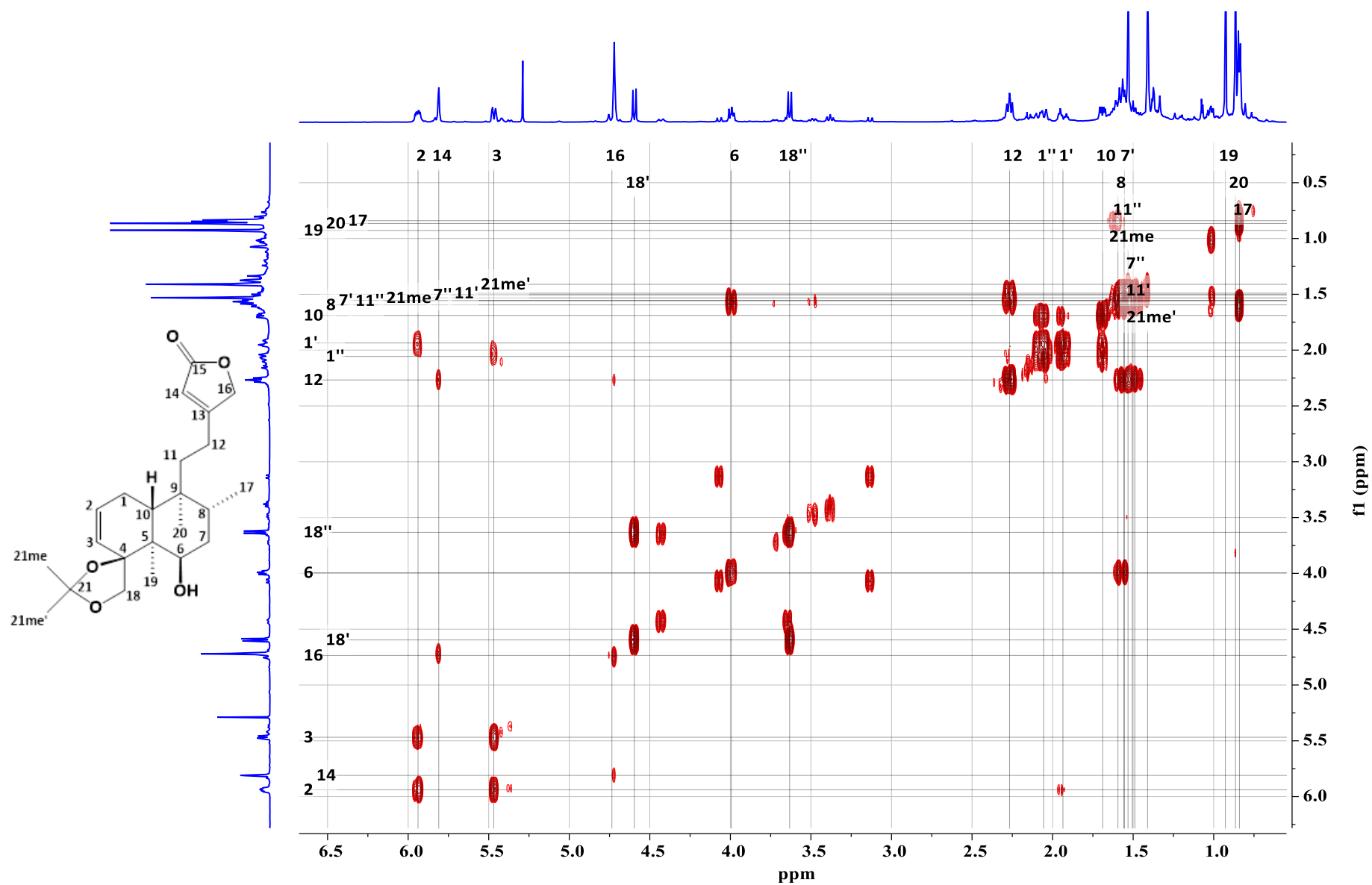




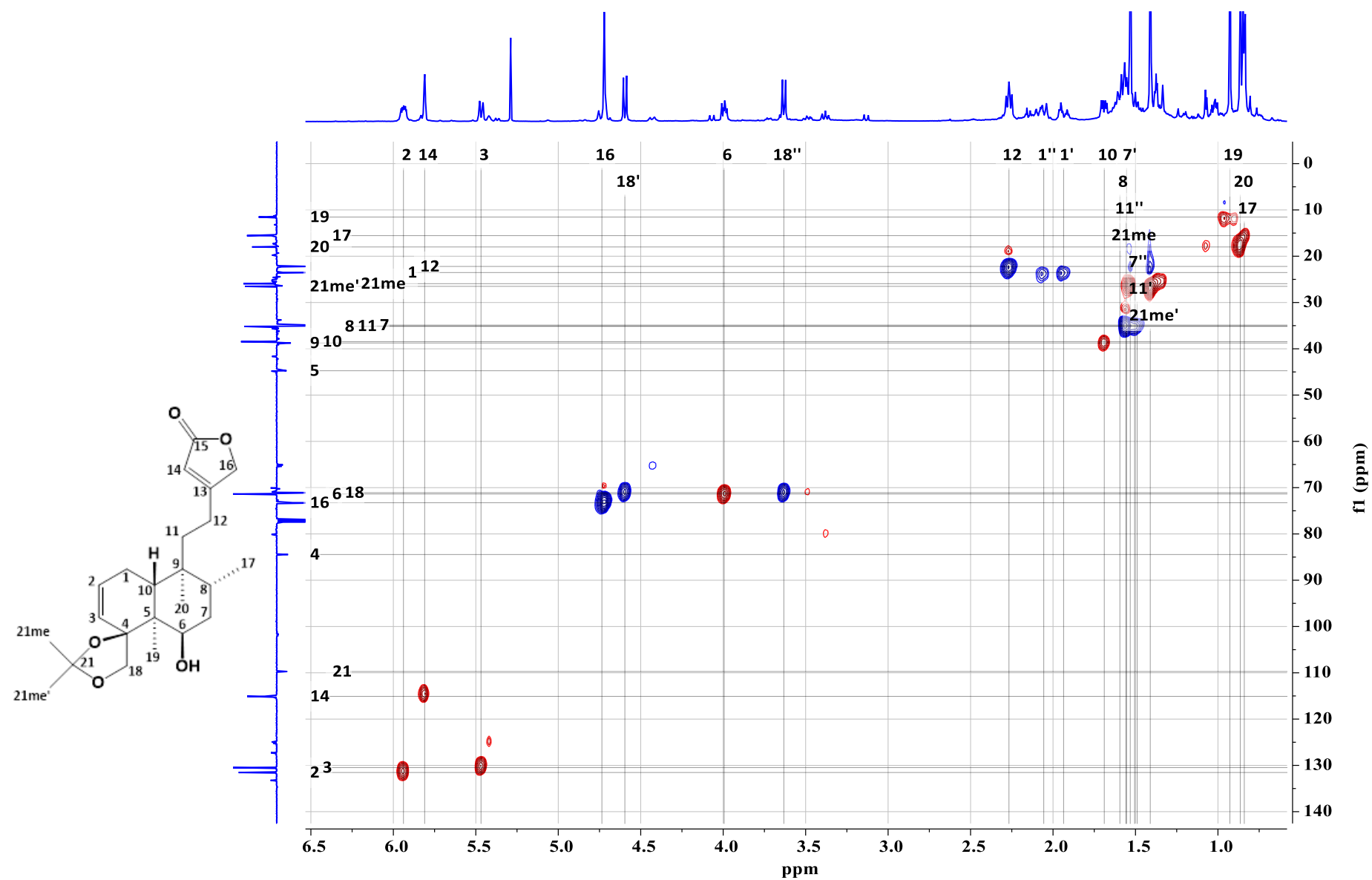
Espectro 55. RMN <sup>1</sup>H (700 MHz CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 9.



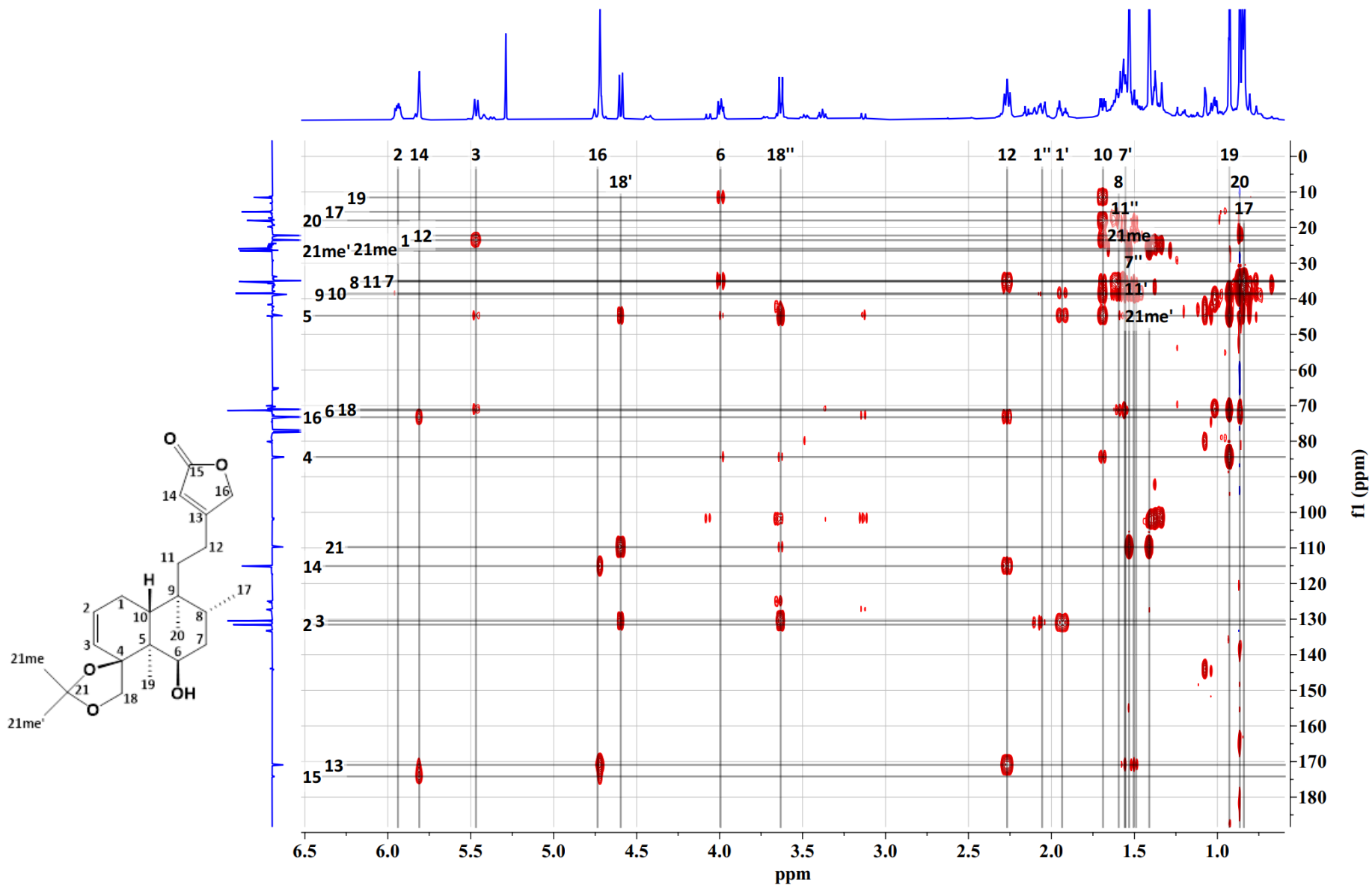
Espectro 56. RMN  $^{13}\text{C}$  (175 MHz  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 9.



**Espectro 57.** Experimento COSY (700 MHz CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 9.

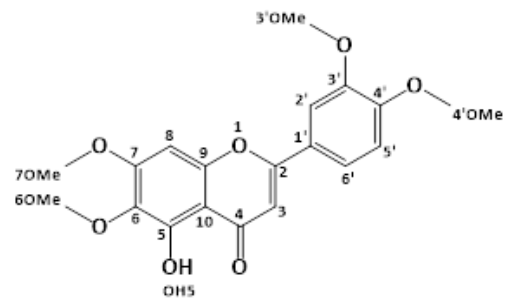


Espectro 58. Experimento HSQC (700 MHz  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 9.

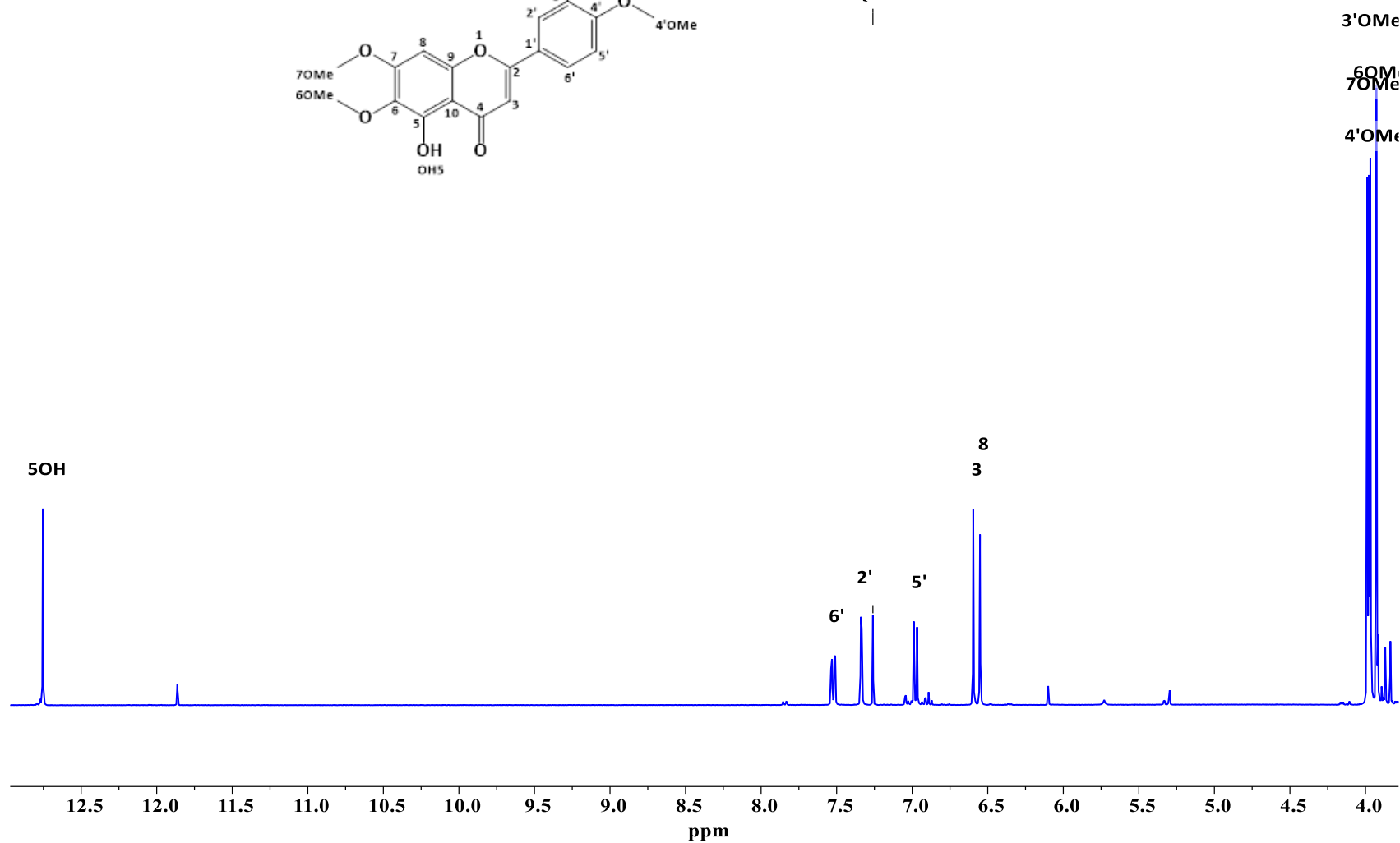


Espectro 59. Experimento HMBC (700 MHz  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 9.

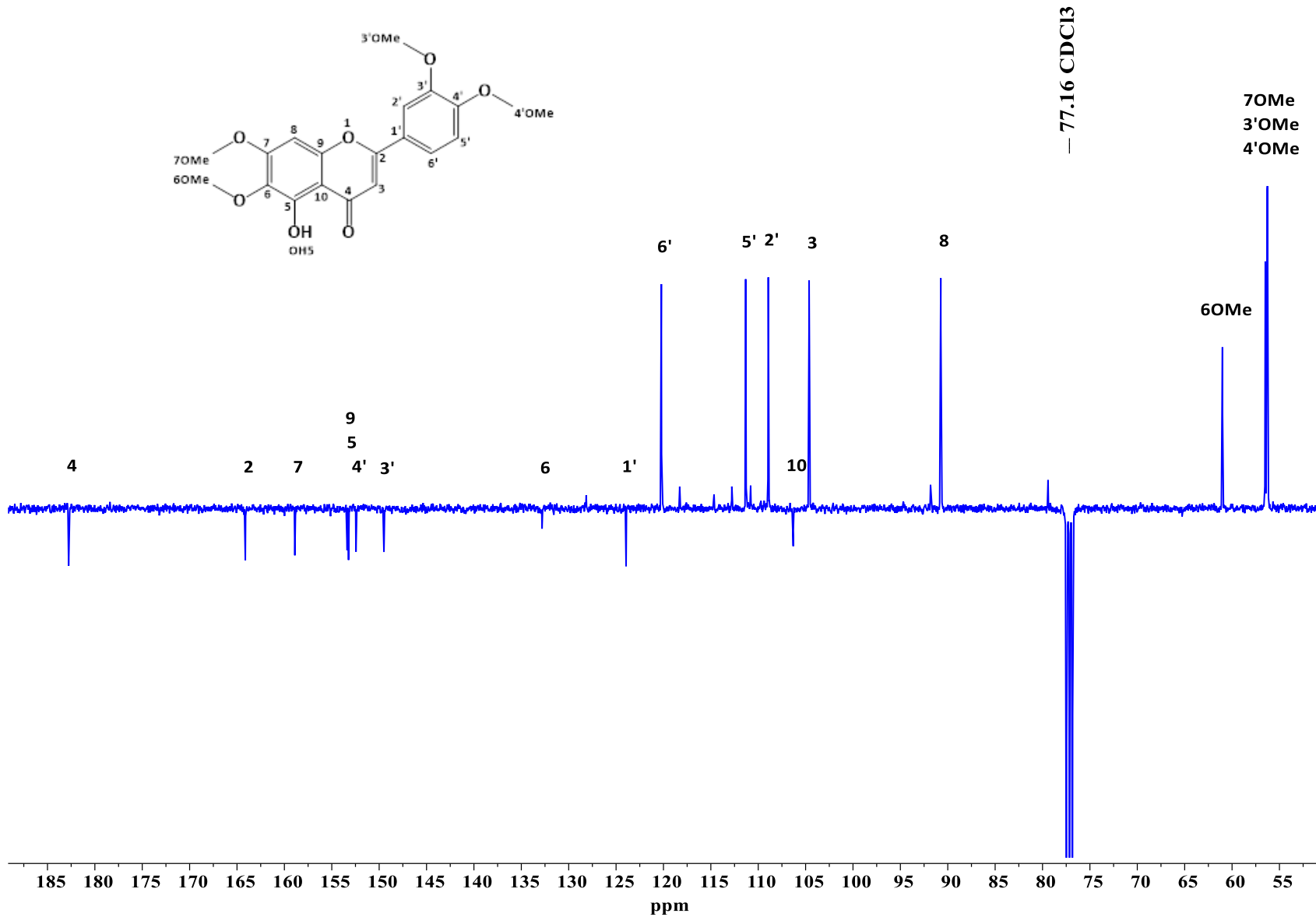




— 7.26 CDCl<sub>3</sub>

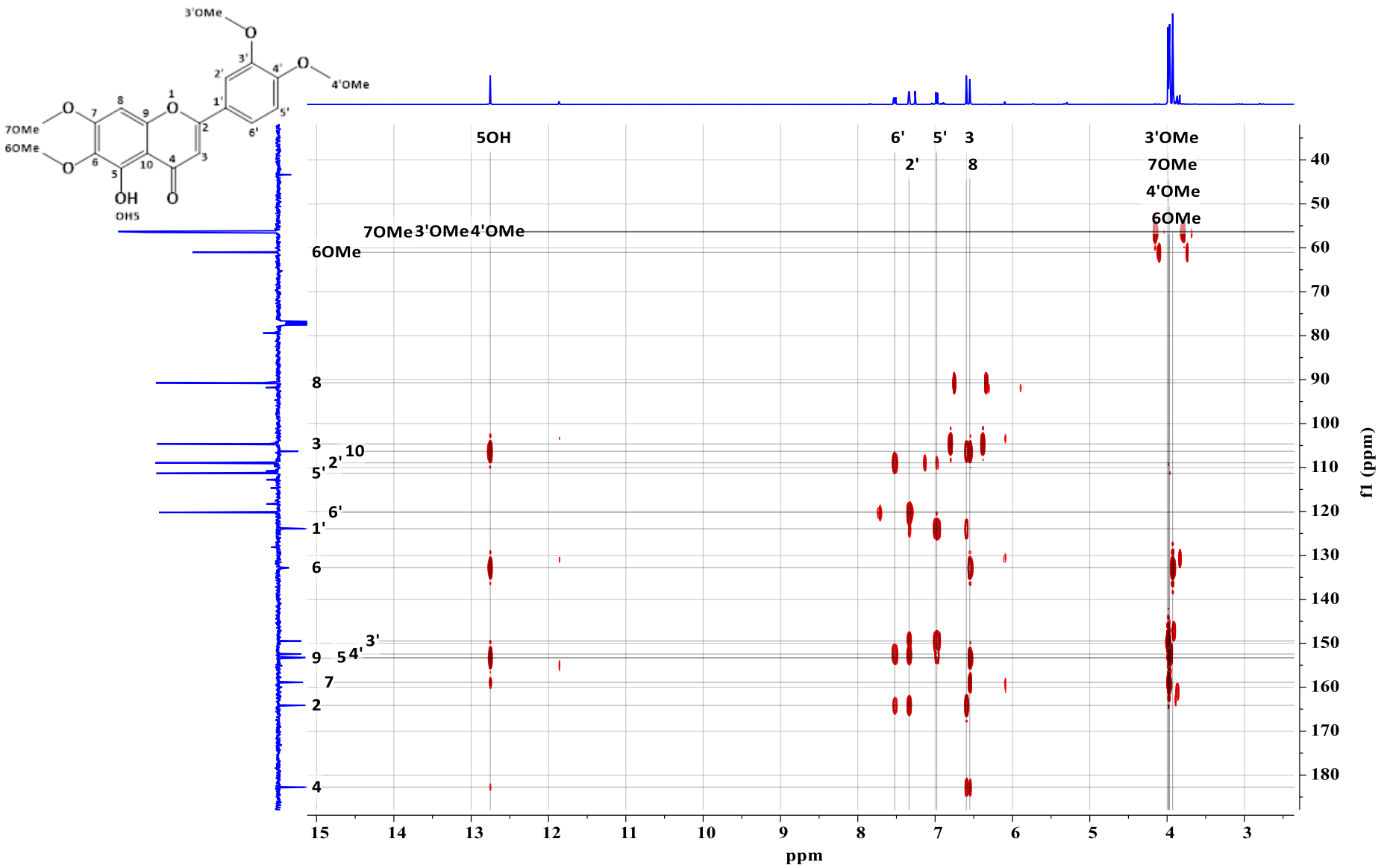


Espectro 61. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 10.

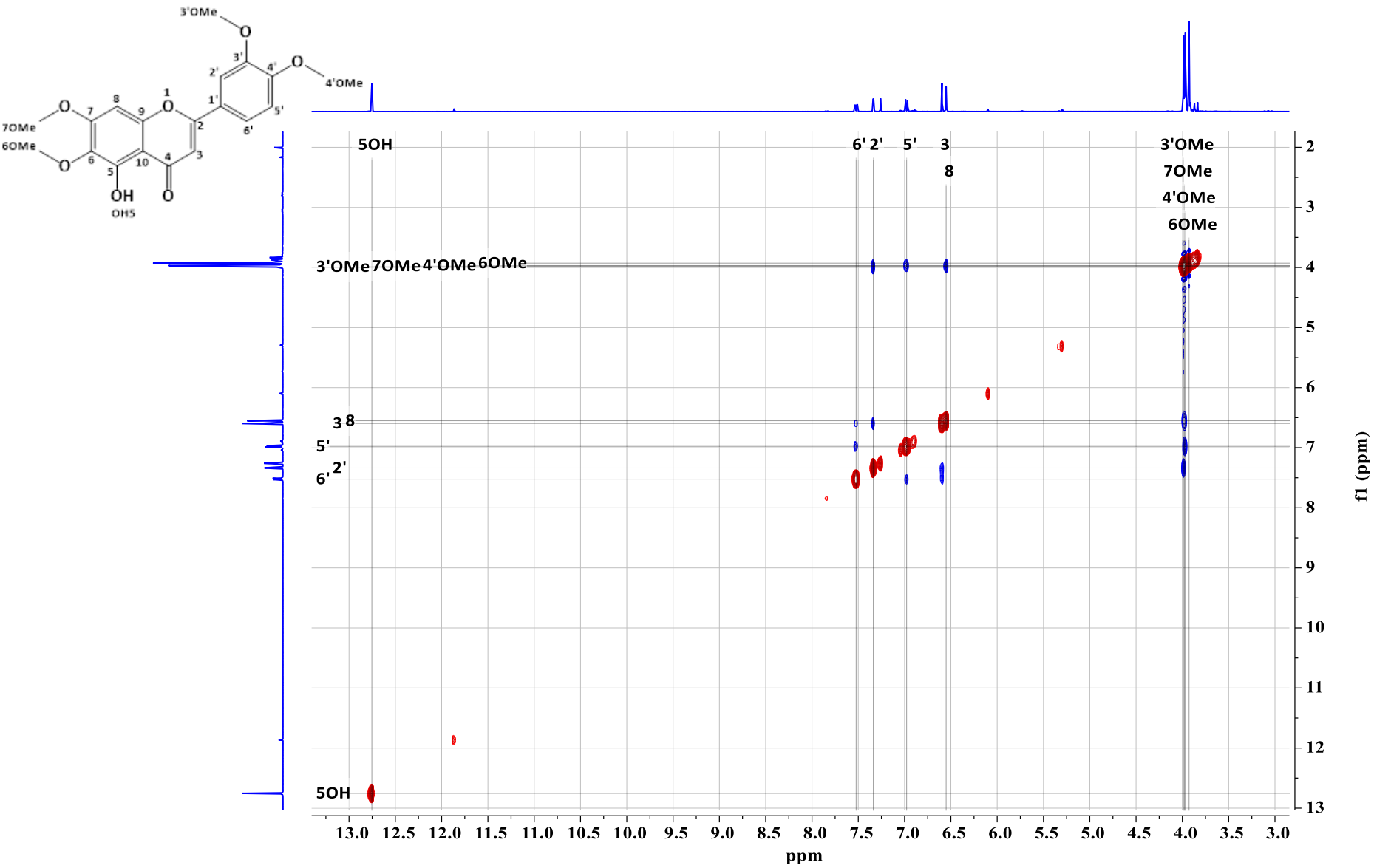


Espectro 62. RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz  $\text{CDCl}_3$ ) del compuesto 10.

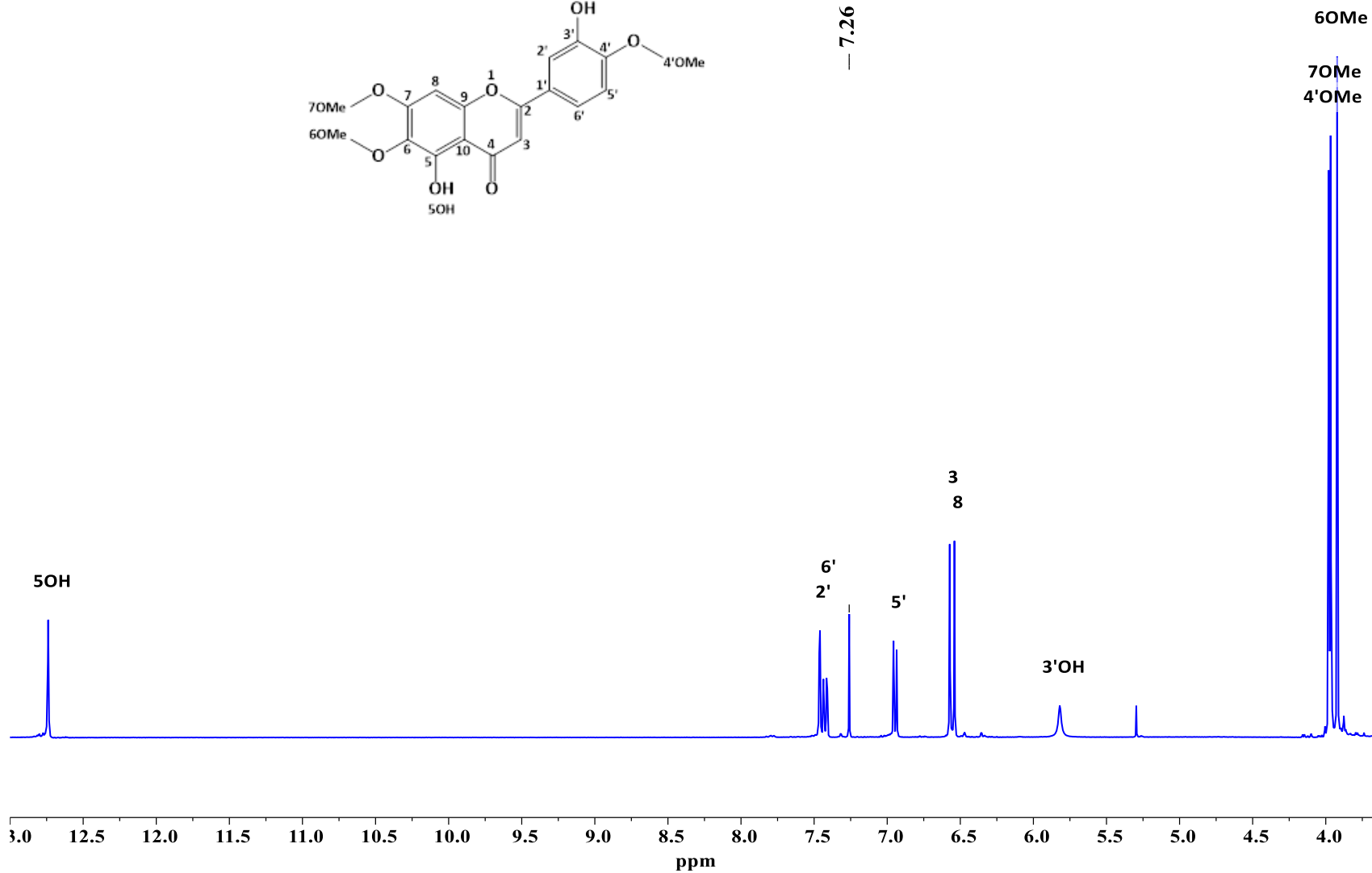
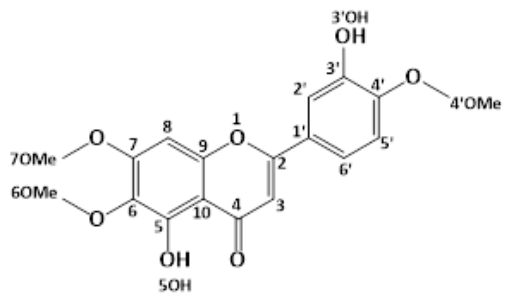




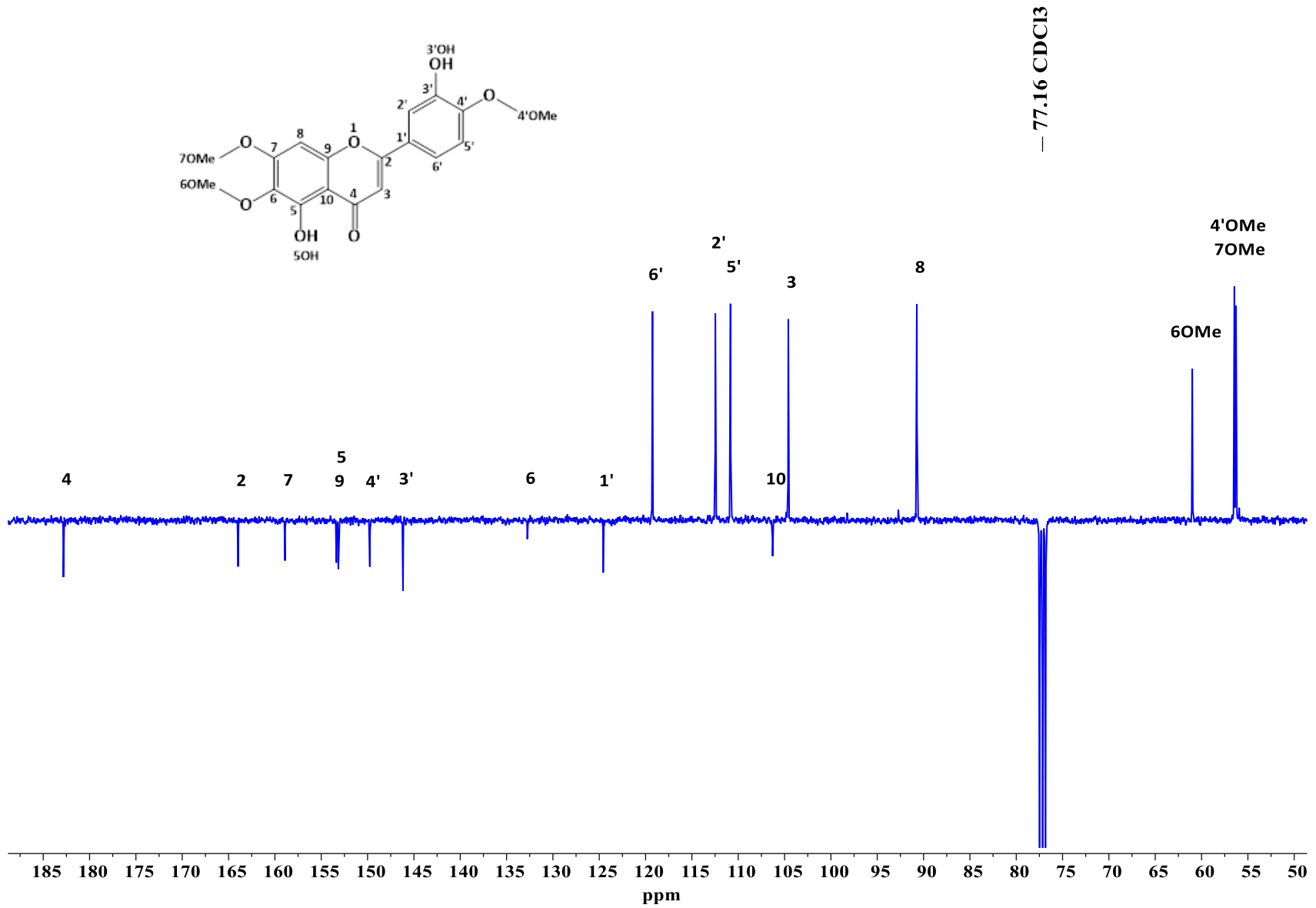
Espectro 63. Experimento HMBC (400 MHz CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 10.



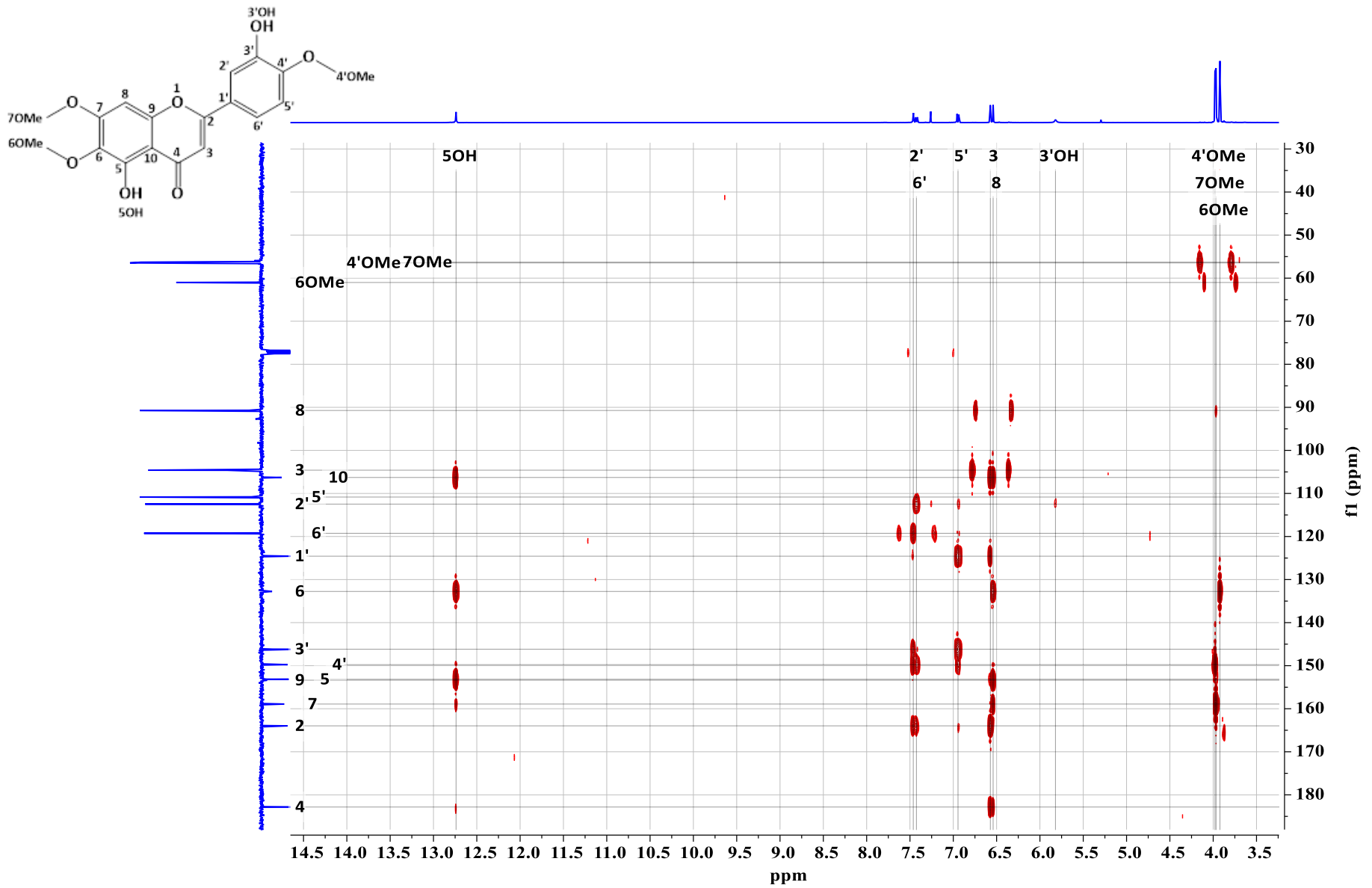
Espectro 64. Experimento NOESY (400 MHz CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 10.



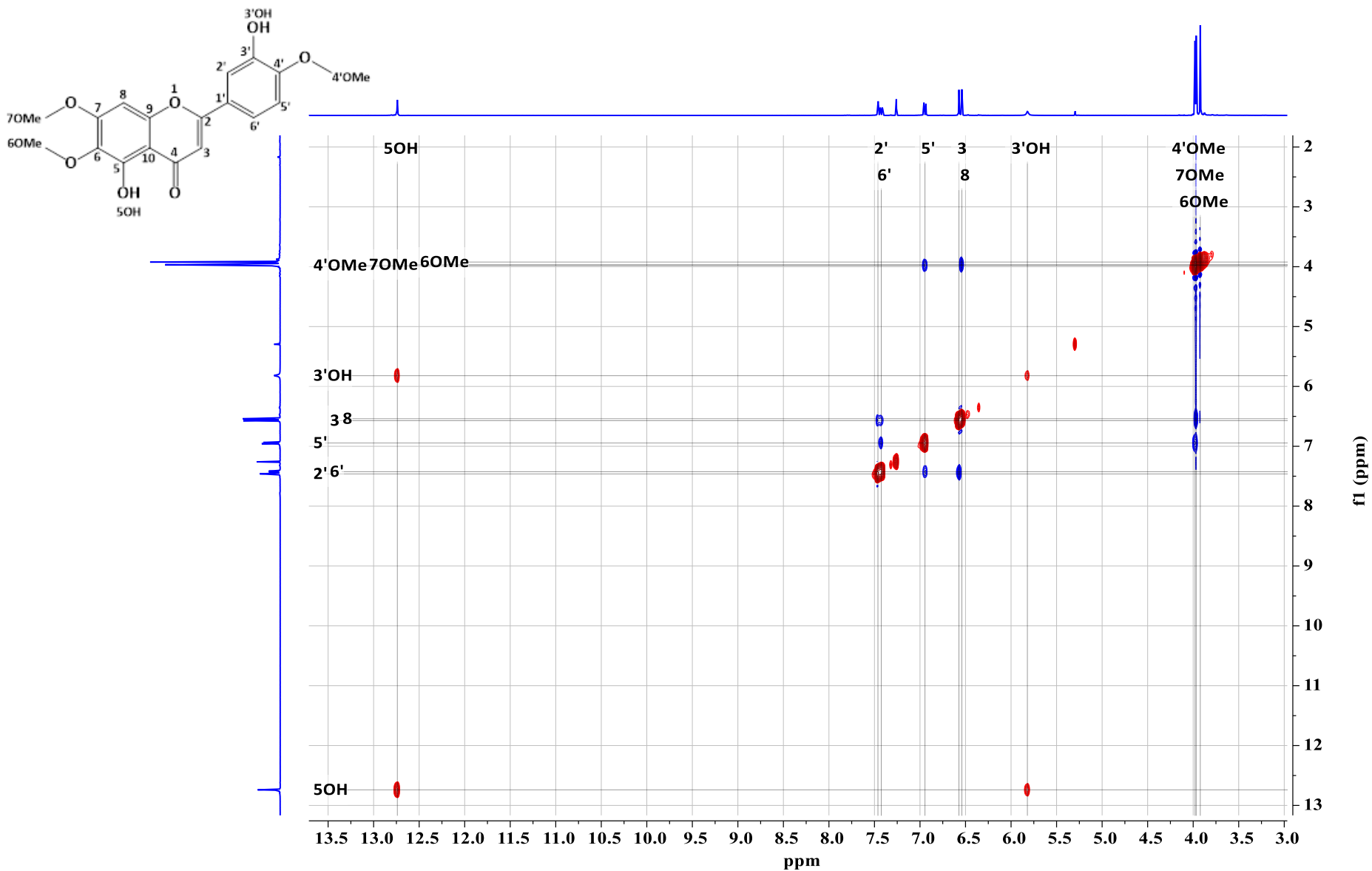
Espectro 65. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 11.



Espectro 66. RMN <sup>13</sup>C (100 MHz CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 11.



Espectro 67. Experimento HMBC (400 MHz CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 11.



Espectro 68. Experimento NOESY (400 MHz CDCl<sub>3</sub>) del compuesto 11.