



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

**“AISLAMIENTO DE METABOLITOS SECUNDARIOS
DE LA PARTE AÉREA DE *SALVIA CLEVELANDII*
Y SU ACTIVIDAD ANTITUMORAL”**

T E S I S

Que para obtener el título de

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

Presenta:

EVA JACQUELINE MEDINA IÑIGUEZ

Tijuana, Baja California

Noviembre de 2006

Universidad Autónoma de Baja California

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

FOLIO No. 198

Tijuana, B.C.

C. EVA JACQUELINE MEDINA IÑIGUEZ

16 DE NOVIEMBRE DE 2006

Pasante de QUIMICO FARMACOBIOLOGO

Presente

El tema de trabajo y/o tesis para su exámen profesional, en la

Opción TESIS

es propuesto, por el C. DR. IVÁN CÓRDOVA GUERRERO Y DR. JOSÉ MANUEL PADRÓN CARRILLO

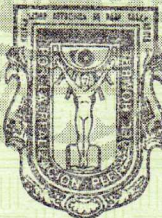
quien será el responsable de la calidad de trabajo que usted presente, referido al tema

"AISLAMIENTO DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE LA PARTE AÉREA DE
SALVIA CLEVELANDII Y SU ACTIVIDAD ANTITUMORAL"

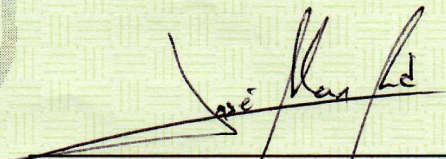
el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I.- INTRODUCCIÓN
- II.- OBJETIVOS GENERALES
- III.- ANTECEDENTES
- IV.- CONCLUSIONES
- V.- APÉNDICES
- VI.- ÍNDICE DE PRODUCTOS
- VII.- ÍNDICE DE TABLAS
- VIII.- ÍNDICE DE FIGURAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BAJA CALIFORNIA




FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS E INGENIERÍA



DR. JOSÉ MANUEL PADRÓN
CARRILLO
Asesor Externo


DR. IVÁN CÓRDOVA GUERRERO

Asesor


M.C. RUBÉN GUILLERMO SEPÚLVEDA
MARQUÉS

Sub-Director Secretario


MC. MARÍA EUGENIA PÉREZ MORALES

Directora

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Baja California y a la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, por el apoyo otorgado en mi formación académica.

A mis asesores de tesis Dr. Iván Córdova y Dr. José Manuel Padrón del Instituto de Bio-Orgánica "Antonio González" (Tenerife, España) por su asesoría y dirección para la elaboración de este trabajo.

A los Doctores Javier Gutiérrez Luis y Lucía San Andrés Tejera del Instituto de Bio-Orgánica "Antonio González" (Tenerife, España), por brindarme la oportunidad de realizar la primera parte experimental de esta tesis.

A mi esposo, un agradecimiento muy especial por estar siempre a mi lado y quien me ha impulsado para realizar este trabajo, y a mis hijos Iván e Ivar que son la alegría de mi vida.

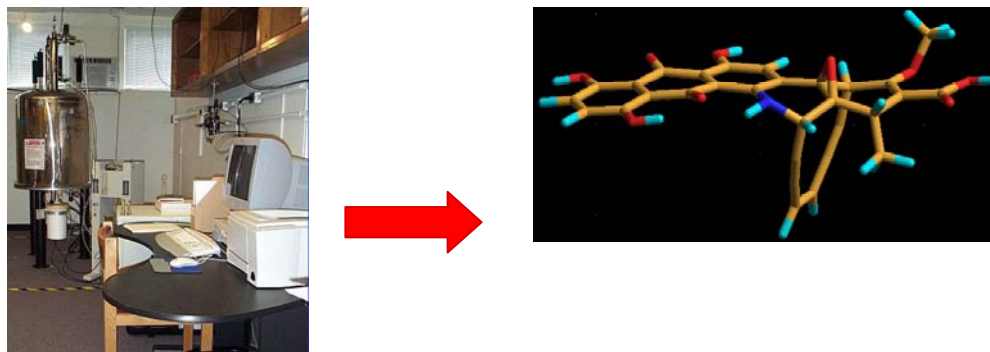
A mi familia, de quien siempre he recibido cariño y apoyo en todo momento.

Con cariño,
mamá Rosa[†] y papi Beto[†]

ÍNDICE	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS GENERALES	18
<u>CAPÍTULO 1. EVALUACIÓN FITOQUÍMICA DE S. CLEVELANDII</u>	
<i>Antecedentes</i>	20
<i>Parte experimental</i>	36
<i>Resultados y discusión</i>	45
<u>CAPÍTULO 2. ESTUDIO DE ACTIVIDAD ANTITUMORAL</u>	
<i>Introducción</i>	53
<i>Parte experimental</i>	55
<i>Resultados obtenidos</i>	59
<i>Discusión de resultados</i>	62
CONCLUSIONES	64
APÉNDICES.	
<i>-Técnicas experimentales</i>	67
<i>-Selección de espectros</i>	71
<i>-Abreviaturas y acrónimos</i>	75
ÍNDICE DE PRODUCTOS	77
ÍNDICE DE TABLAS	78
ÍNDICE DE ESQUEMAS	79

INTRODUCCIÓN

La investigación en Productos Naturales constituye, en si misma, un campo de actividad que engloba a todas las distintas áreas de la química orgánica. Las tareas que han de desarrollarse en el estudio de los productos naturales comprenden: procesos de extracción, aislamiento y purificación de los componentes químicos de los seres vivos; reacciones sobre dichos metabolitos, implicando en ellas el empleo de reactivos estéreo y regioselectivos; interpretación de mecanismos de reacción y racionalización de éstos en términos de las características químicas de los sustratos; el empleo exhaustivo de la totalidad de la técnicas espectroscópicas hoy en uso en la química orgánica (IR, UV, RMN de ^1H y ^{13}C , espectrometría de masas, DC, etc.);



Determinación estructural de Productos Naturales

El estudio de los mecanismos biológicos que dan lugar a la formación de los diversos grupos de metabolitos, cuya comprensión nos llevará al mejor conocimiento de los procesos vitales y de las tendencias evolutivas de la vida en el universo, así como a la interpretación de las complejas interrelaciones de los diversos seres en el entorno ecológico y, por último, al planteamiento de procesos sintéticos que se aproximen cada vez mas a las rutas biogenéticas marcadas por la naturaleza que, sin duda alguna, sigue siendo el químico sintético más eficaz y rentable, del que aún tenemos mucho que aprender.

Se comprende así que la química de productos naturales haya sido y siga siendo a nuestro entender y en contra de algunas opiniones, una especialidad de capital importancia cuyo cultivo no ha decaído en intensidad a lo largo de su dilatada historia, si bien en el curso de la misma se han producido variaciones en aquello que se considera como mas interesante o de mayor importancia coyuntural dentro del campo, poniéndose así de actualidad en determinados momentos alguna de las pautas (determinación estructural, estudios espectroscópicos, transformaciones químicas, estudios biogénéticos, cultivos celulares, síntesis de productos naturales de marcada actividad, etc.) que ella cubre. Sin embargo, en la actualidad puede asegurarse que todos los campos de la química de productos naturales son interesantes y, además, complementarios y han de seguir desarrollándose todos ellos, para que pueda llegarse a un conocimiento racional y lo mas profundo de esta disciplina.

La primera documentación escrita que nos habla de las *plantas medicinales* data de 3000 a 4000 años antes de Cristo, gracias a los sumerios, que describen mediante grabaciones en tablillas de arcilla, qué partes y en qué dosis tenían las plantas propiedades curativas. En la antigüedad algunas plantas fueron veneradas por las virtudes que se les había reconocido. Dentro de las llamadas civilizaciones avanzadas, los Egipcios dieron muestras de un profundo conocimiento médico, y a través del **Papiro de Ebers** (primer documento médico de la antigüedad descubierto en 1872) describieron las virtudes curativas de unas 700 plantas medicinales, algunas de las cuales figuran actualmente en la farmacología como los purgantes sen y ricino o la cardiotónica scilla. En la India, quienes profesaban el arte de curar eran los **Brahmanes**, sacerdotes y doctores pertenecientes a la casta superior de la Religión de Brahma, ya que dentro de su concepción de vida: *“quienes tenían la facultad de reparar los problemas del espíritu, también podían reparar los trastornos del cuerpo...”*. En los **Ayur Veda** (enciclopedias médicas) de autores de la época, entre los que cabe

destacar los de: **Charaka**, **Susruta** y **Vagabhta**, (datadas entre los siglos IX-III antes de Cristo) se mencionan las virtudes de cientos de plantas medicinales. En todas estas obras se observa más de una analogía con las doctrinas posteriores de Hipócrates y forman como unos apéndices al **Libro de los Vedas** y como aquél se consideraban reveladas. La mayoría de las obras sobre medicina, escritas posteriormente en la India, sólo son comentarios de estas enciclopedias.

En Grecia entre el siglo IV y III antes de Cristo surge la figura de **Hipócrates**, conocido como el *"Padre de la Medicina"*, quien dio las directrices del correcto empleo de las plantas medicinales para tratar diversas dolencias. Seguidor de Hipócrates, **Dioscórides** (siglo I de nuestra era) nos dejó su *"De Materia Médica"*, única fuente de donde han bebido griegos, latinos y árabes hasta el Renacimiento.

En época posterior, los chinos dejaron constancia de un amplio muestrario de la aplicación de plantas medicinales, en tratados como el **Pen Tshao**, título genérico de diversas obras chinas en el que se describen los medicamentos obtenidos de los tres reinos de la Naturaleza. Una de las más antiguas es *"Ta Koan Pen Tshao"*, anterior a 1058 y la más conocida es *"Pen Tshao Kangmu"* (52 libros), compilada durante la dinastía de los Ming por Li Chi Tehen (1573-1619), de la que se publicaron varios extractos en los siglos XVII y XVIII.

En la Edad Media, el empleo de las plantas medicinales sufre un proceso de estancamiento y descrédito, debido a la intemperancia de la Santa Inquisición, que en su famosa *"caza de brujas"* mandó quemar en la hoguera a cientos de hombres y mujeres (curanderos de la época) que realizaban *"conjuros con los poderes demoníacos"* durante sus actos terapéuticos. Paradójicamente, sólo en los monasterios se siguió preservando el arte de curar a través del uso de las plantas, gracias al valioso

trabajo de recopilación de los monjes que tradujeron del griego y del latín las primitivas obras sobre el empleo medicinal de las plantas. Eran famosos sus huertos y sus preparados en forma de vinos medicinales, tradición que aún hoy se conserva. En este período los árabes fueron quienes continuaron los estudios científicos, destacando médicos-filósofos tan notables como Avicena y Baithar que con sus investigaciones sobre la alquimia dieron un impulso importante al mejor conocimiento de medicamentos más elaborados.

Durante la conquista de América los sacerdotes y frailes que se trasladaron al Nuevo Mundo llevaron sus conocimientos médicos, que se vieron enormemente enriquecidos por el contacto con *chamanes* indígenas que les transmitieron su saber respecto del empleo de las plantas medicinales americanas¹.

En Europa, el arte de curar cobró un nuevo impulso por parte de los alquimistas, entre los que destacó la figura de **Paracelso**². Hasta mediados del siglo XVIII, los estudios acerca de plantas medicinales se ubican dentro de lo que se designó como "*materia médica*"³. No había una ciencia propia que se ocupara específicamente de las plantas medicinales. Es con autores como Guilbourt (1790-1867), J. Pereira (1804-1853) y F.A. Fluckier (1828-1894) como la **Farmacología** y la **Farmacognosia** comienzan a desarrollarse como ciencias con contenido propio⁴. La **Farmacología** se dedica al estudio de la acción de las drogas. La **Farmacognosia** se dedica al estudio de medicamentos naturales, ya sean de origen vegetal, animal o de microorganismos, en cuanto a su biología, bioquímica y producción.

¹ Flores, F. De Asis: "Historia de la Medicina en México", Instituto Mexicano de Seguridad Social, México, Reprint, **1982**.

² Shellar, E.J.: "Medicines from Plants with Special Reference to Herbal Products in Great Britain", *Planta Medica*, **53**(2), 121-123, **1987**.

³ Capasso, F.: "Medicinal Plants: An Approach to the Study of Naturally Occurring Drugs", *J. of Ethnopharmacology*, **13**; 111-114, **1985**.

⁴ Hegnauer, R.: "Arzneipflanzen: Gestern, Heute und Morgen"; *Planta Medica*, **34**(1), 1-25, **1978**.

Finalmente en el siglo XIX, cuando **Friedrich Wöhler** realizó la síntesis de la urea a partir de una sustancia inorgánica (el cianato amónico), da comienzo la industria de la síntesis química, ya que hasta entonces no se concebía como fuente de materia orgánica ningún otro elemento que no fuese animal o vegetal. El siglo XX marca el liderazgo de los fármacos de síntesis, dejando relegadas a las plantas como una *“práctica medicinal menor”*.

Sin embargo, el uso medicinal de las plantas, **Fitoterapia**, nunca ha dejado de tener vigencia. Casi todas las culturas del mundo usan muchas de sus plantas locales como medicinas de una forma u otra. Muchos de los fármacos más importantes, con efecto terapéutico, provienen incluso hoy en día, de la naturaleza o son sintetizadas por el hombre imitando productos naturales. Así, una considerable cantidad de estos productos se han hallado e incorporado al arsenal terapéutico siguiendo las pistas dejadas, por diversas culturas a través de su medicina popular.

Aunque **Paracelso** había introducido el concepto de “principio activo” en medicina en el siglo XV, fue el advenimiento de la química moderna a finales del siglo XVIII y principios del XIX lo que permitió que los compuestos fuesen aislados como sustancias puras a partir de extractos de plantas, particularmente si aquéllos cristalizaban fácilmente. En muchos casos, esos compuestos aislados tenían los mismos efectos que extractos de la planta y así rápidamente fueron sustituidos como el ingrediente activo en las medicinas, aunque es importante decir que sus estructuras químicas no fueron completamente elucidadas hasta muchos años más tarde. **Sertürner** aisló, en los primeros años del siglo XIX, el calmante **morfina**, y otros alcaloides tales como **codeína** y **narcotina**, a partir del opio (látex seco de la amapola *Papaver somniferum*).

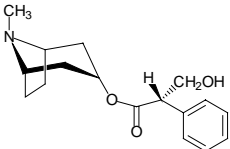
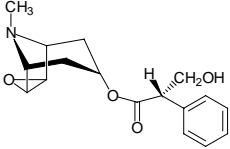
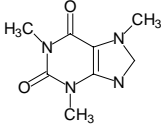
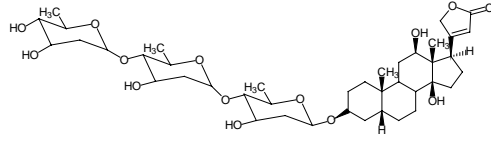
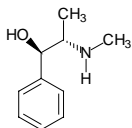
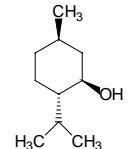
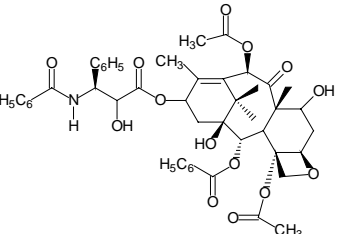
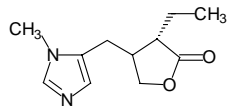


Papaver somniferum

Estos fueron los primeros compuestos naturales aislados y continúan siendo fármacos muy importantes. Desde entonces, varios miles de compuestos se han aislado de plantas y muchos de ellos continúan usándose extensivamente en medicina (**Tabla 1**). Un ejemplo más específico es el proporcionado por el glicósido cardiotónico **digitoxina**, y más recientemente por la **digoxina**, aislados a partir de especies de *Digitalis*. Las hojas de *Digitalis purpurea* se introdujeron en medicina por William Withering en Inglaterra en 1785, después de que éste llevase a cabo una serie de test derivados de su observación de su uso exitoso por una mujer local para el tratamiento de la hidropesía. Hidropesía fue el nombre que se dio a la tumefacción de los miembros y tejidos debida a una insuficiente fuerza y frecuencia del latido del corazón, y para la que hoy se sabe que los glicósidos de *Digitalis* revierten esta situación. Las hojas secas se usaron, al principio, como polvos o como tinturas, pero con el tiempo se aisló la **digitoxina**, que se usó como compuesto puro en farmacia en el siglo XIX. La toxicidad de la digitoxina era demasiado elevada y un compuesto similar, denominado **digoxina**, aislado de *Digitalis lanata* de centro de Europa reemplazó a la primera y continúa siendo el fármaco preferido por muchos médicos para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca⁵.

⁵ Aronson, J.K.: “An Account of the Foxglove and Its Medical Uses”, Oxford University Press, Oxford, UK, 1985.

Tabla1.- Algunos medicamentos representativos obtenidos a partir de plantas.

NOMBRE	ESTRUCTURA	PLANTA	USO EN MEDICINA
Atropina		<i>Atropa belladonna</i> <i>Hyoscyamus</i> spp. <i>Datura</i> spp.	Antiespasmódico para el tracto gastrointestinal; dilata las pupilas
Escopolamina		<i>Atropa belladonna</i> <i>Hyoscyamus</i> spp. <i>Datura</i> spp.	Sedante preoperatorio; antiemético en mareos de viaje
Cafeína		<i>Cofea arabica</i> <i>Thea sinensis</i>	Estimulante del sistema nervioso central (SNC)
Digoxina		<i>Digitalis lanata</i>	Mejora la fuerza de las contracciones para solucionar problemas cardiovasculares
Efedrina		<i>Ephedra sinica</i> y otras spp.	Alivio del asma y de la fiebre del heno
Mentol		<i>Menta (Mentha x piperita)</i> y especies relacionadas	Descongestionante; efecto refrescante de las fosas nasales
Paclitaxel		<i>Taxus brevifolia</i>	Anticancerígeno, especialmente para el cáncer de ovario
Pilocarpina		<i>Pilocarpus faborandi</i>	Tratamiento del glaucoma; contrae las pupilas

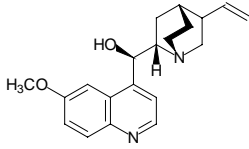
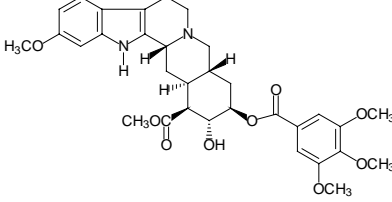
Quinina	 The chemical structure of quinine is shown, featuring a quinoline ring system with a methoxy group (H ₃ CO) at the 8-position and a quinuclidine ring system attached at the 6-position. The quinuclidine ring has a hydroxyl group (HO) and a vinyl group (CH=CH ₂) attached to it.	<i>Cinchona spp.</i>	Antimalárico
Reserpina	 The chemical structure of reserpine is shown, consisting of a complex polycyclic ring system. It includes a tryptamine-like core with a methoxy group (H ₃ CO) and a tropane-like ring system. The structure is highly substituted with various functional groups, including a methyl ester (CH ₃ OC=O), a hydroxyl group (OH), and a trimethoxyphenyl group (C ₆ H ₂ (OCH ₃) ₃).	<i>Rauwolfia spp.</i>	Tranquilizante; hipotensivo
Vinblastina	 The chemical structure of vinblastine is shown, a complex pentacyclic alkaloid. It features a tropane-like ring system fused to a tropane-like ring, with a tropane-like ring system attached to the tropane-like ring. The structure is highly substituted with various functional groups, including a methyl ester (CH ₃ OC=O), a hydroxyl group (OH), and a trimethoxyphenyl group (C ₆ H ₂ (OCH ₃) ₃).	<i>Catharanthus roseus</i>	Anticancerígeno, especialmente contra la leucemia

Tabla 1.- (Continuación).

La investigación de especies locales europeas, se extendió a plantas que fueron adquiridas durante viajes de exploración por naciones europeas a lo largo del mundo y que ya eran consideradas medicinas de valor en los países de donde eran nativas. Los extractos de corteza de varias especies de *Cinchona* se han usado, desde el siglo XVI, para el tratamiento de la malaria y en el año 1820 se aisló, de la corteza de estas especies, la **quinina**. Este alcaloide ha sido desde entonces muy importante en la lucha contra la malaria, aunque actualmente derivados profilácticos sintéticos del mismo, tales como la **cloroquina**, predominan en el mundo desarrollado. Tras los años y con el desarrollo de mejores técnicas de extracción y separación, ha comenzado a ser más fácil el aislamiento de sustancias que no cristalizan fácilmente o que existen como mezclas complejas junto con moléculas íntimamente relacionadas. Esto, junto con los avances en los métodos espectroscópicos, que dan información más detallada sobre la estructura de las moléculas y el uso de trazadores sensibles, que permiten seguir y determinar su ruta de formación en la planta, ha llevado a definiciones más precisas y a

la determinación de muchas más clases de compuestos⁶, así como a esclarecer, en muchos casos, cuál es el papel que estas sustancias desempeñan en el metabolismo y fisiología celular de la planta.

La **Etnobotánica**⁷, disciplina que surge como tal en 1895, es el estudio de cómo la gente de una cultura y/o región particular hacen uso de la flora autóctona, incluyendo el uso de las plantas en alimentación, medicina, materiales de construcción y cualquier otra aplicación económica. Por otro lado, la **Etnomedicina** se refiere al uso de plantas por los nativos como medicina, aunque debería de ser llamada medicina etnobotánica, mientras que la **Medicina tradicional** es la suma total de todas las prácticas médicas que excluyen la llamada medicina occidental.

Los remedios en la medicina tradicional se presentan como fórmulas preparadas a partir de sustancias naturales, animales y vegetales. De ellos, los remedios vegetales representan aproximadamente el 90% del total. La correcta preparación de los fármacos vegetales es de gran importancia ya que se consideran ineficaces a no ser que se hayan tratado previamente de la manera prescrita. Estos remedios pueden ser masticados, frotados, vertidos en heridas, hervidos e inhalados como vapores, rociados o salpicados en los ojos, fumados en pipas o esnifados como rapé. A pesar del escepticismo de los médicos y científicos occidentales sobre el valor de la información resultante de estos sistemas, la medicina tradicional cubre actualmente las necesidades sanitarias primarias de la mayoría de la población del mundo y ello no se debe ignorar en ningún programa de desarrollo racional de fármacos de origen vegetal.

⁶ Robbers, J.E.; Speedie, M.K.; Tyler, V.; *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology*, Williams and Wilkins, USA, **1996**.

⁷ Cotton, C.M.; *Ethnobotany. Principles and Applications*, Jonh Wiley and Sons, England, **1996**.

La Organización Mundial de la Salud (O.M.S.) ha definido como **Fitomedicina** a la aplicación de principios activos de origen vegetal en terapéutica. Por otra parte, dicha organización ha manifestado, en 1996, que el 80% de la población mundial que no tiene acceso al sistema moderno de salud y por lo tanto a los medicamentos sintéticos, se sirve de las plantas medicinales y de otras formas de medicina tradicional para el tratamiento de sus enfermedades. Es así como existe un importante acervo tradicional de sabiduría popular, aprovechado por los sectores académico e industrial para descubrir y establecer el potencial terapéutico de productos naturales. Además, el 25% de las prescripciones médicas en los países industrializados contienen ingredientes extraídos de plantas⁸. Así, por ejemplo, de las 87 sustancias anticancerígenas aprobadas en 1994, el 62% eran productos de origen natural o modificaciones estructurales de los mismos⁹. Por otro lado, dos tercios de las especies de plantas de todo el mundo que tienen documentado su valor medicinal (alrededor de 35.000) provienen de países en vías de desarrollo. Sin embargo, del medio millón de especies registradas en todo el planeta sólo se ha estudiado un pequeño porcentaje.

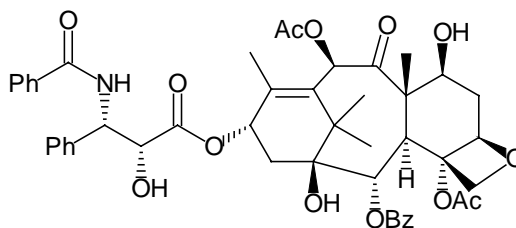
Un estudio realizado en 1985, que recibió apoyo de la Organización Mundial de la Salud, identificó 119 sustancias, aisladas de plantas superiores, que los países desarrollados usaban en sus medicinas¹⁰. Estas sustancias todavía se extraen comercialmente de alrededor de 90 especies de tales plantas, pero, dado que existen más de 250.000 especies de ellas en el planeta, y que se ignora el potencial médico de, por lo menos el 95%, el sentido común indica que numerosas sustancias que se pueden usar como medicamentos aún esperan ser descubiertas. La búsqueda sistemática de esta clase de compuestos en las plantas ha sido lenta, costosa y de bajo rendimiento.

⁸ Farnsworth, N. R.; In: *Bioactive compounds from Plants* (D. J. Chadwich and J. Marsh, eds.), pp 2-21, John Wiley and Sons, England, **1990**.

⁹ Cragg, G. M.; Newman, D. J.; Snader, K. M.; *J. Nat. Prod.*, **60**, 52-60, **1997**.

¹⁰ Paladini, A.C.; *CienciaHoy*, **6**(34), **1996**.

Por ejemplo, el National Cancer Institute de los E.E.U.U., inició, en 1950, un programa de prospección de productos naturales con propiedades anticancerosas. Treinta y dos años después, en 1982, tras haber examinado más de 35.000 compuestos procedentes de plantas, sólo había hallado varias docenas de sustancias activas, de las cuales por ahora, sólo el **taxol**, aislado de la corteza del árbol *Taxus brevifolia*, con propiedades antitumorales y antileucémicas ha llegado a convertirse en un medicamento¹¹.



Taxol

Innumerables productos naturales están aún por ser descubiertos; entre ellos, compuestos con estructuras moleculares que no podrían haber sido predichas, como lo son las de algunas de las sustancias medicinales más recientes¹². Por ejemplo, la **ivermectina** (mezcla de la 22,23-dihidroavermectina B_{1a} y 22,23-dihidroavermectina B_{1b}), perteneciente al grupo de las macrolidas avermectinas y aislada de un hongo del Japón, es uno de los antihelmínticos (de *-hélminthos-*, lombriz, sustancias que destruyen o expulsan los gusanos parásitos, causantes de infecciones en seres humanos y animales) más eficaces que existen¹³. Lo mismo vale para la **ciclosporina** y para el **tacrolimus (FK506)**¹³, sustancias procedentes de hongos que suprimen la respuesta inmune, utilizadas para evitar el rechazo de órganos transplantados; y para el ya citado **taxol**¹¹ (**Paclitaxel**). No existe manera de predecir lo que encontrará la búsqueda

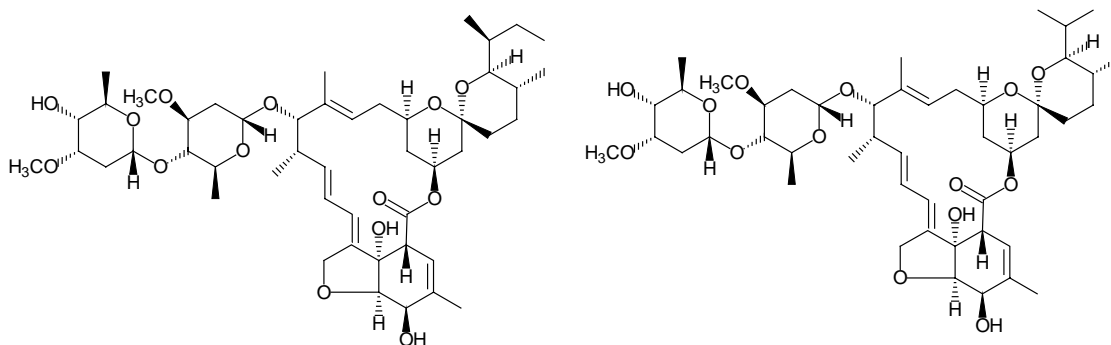
¹¹ Vyas, D.M.; Kadow, J.F.; *Prog. Med. Chem.*, **32**, 289-337, **1995**.

¹¹ Vyas, D.M.; Kadow, J.F.; *Prog. Med. Chem.*, **32**, 289-337, **1995**.

¹² Eisner, T.; Niemeyer, H.M.; *CienciaHoy*, **6**(33), **1996**.

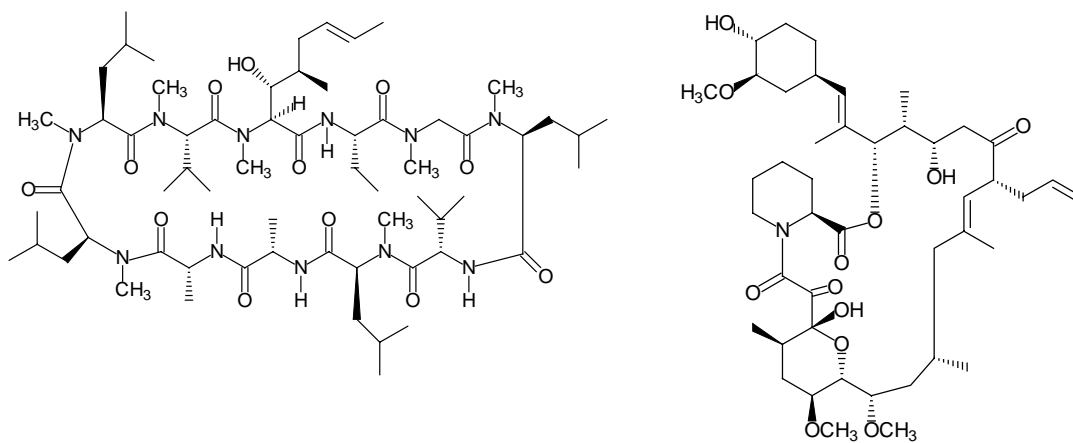
¹³ Shu, Y-Z.; *J. Nat. Prod.*, **61**, 1053-1071, **1998**.

química, pero se tiene la certeza de que la misma rendirá sus frutos, ya que la mayor parte de las especies nunca han sido estudiadas químicamente.



22,23-Dihidroavermectina B_{1a} + 22,23-Dihidroavermectina B_{1b}
(80%) (20%)

Ivermectina



Ciclosporina

Tacrolimus (FK506)

En la actualidad, la búsqueda de productos naturales con propiedades terapéuticas se ha acelerado mucho, aprovechando indicios proporcionados por ciertos grupos étnicos, que tradicionalmente asignan cualidades curativas a plantas y otros compuestos naturales, lo cual dio origen a la **Etnobotánica** y la **Etnofarmacología**. A ello se suman los avances en la automatización de las pruebas farmacológicas y el

empleo de receptores específicos y de cultivos de células, para identificar sustancias activas.

Además, la secuenciación del genoma humano ha permitido descubrir blancos moleculares asociadas con ciertas enfermedades, tales como diabetes y obesidad¹⁴, o cáncer^{15,16}. Por otro lado, la secuenciación de los genomas de agentes patógenos y parásitos, permitirá la identificación de genes esenciales para la supervivencia de éstos, por lo que se podrán emplear como blancos moleculares las proteínas que codifican los mismos. Excelentes ejemplos son la secuenciación de los genomas del parásito de la malaria, *Plasmodium falciparum*¹⁷, y uno de los mayores mosquitos vector, *Anopheles gambiae*¹⁸, lo que proporcionará nuevas herramientas para el control de esta enfermedad¹⁹.

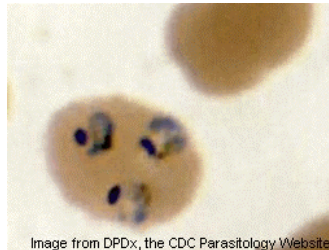


Image from DPDx, the CDC Parasitology Website

Plasmodium falciparum

¹⁴ Van Huijsduijnen, R. H.; Bombrun, A.; Swinnen, D.; *Drug Discovery Today*, 7, 1013-1019, **2002**.

¹⁵ Fabbro, D.; Ruetz, S.; Buchdunger, E.; Cowan-Jacob, S. W.; Fendrich, G.; Liebtanz, J.; Mestan, J.; O'Reilly, T.; Traxler, P.; Chaudhuri, B.; Fretz, H.; Zimmermann, J.; Meyer, T.; Caravatti, F. P.; Manley, P. W.; *Pharmacol. Ther.*, 93, 79-98, **2002**.

¹⁶ Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Holbeck, S.; Sausville, E. A.; *Curr. Cancer Drug Targ.*, 2, 279-308, **2002**.

¹⁷ Gardner, D. J.; Hall, N.; Fung, E.; White, O.; Berriman, M.; Hyman, R. W.; Carlton, J. M.; Pain, A.; Nelson, K. E.; Bowman, S.; Paulsen, I. T.; James, K.; Eisen, J. A.; *Nature*, 419, 498-511, **2002**.

¹⁸ Holt, R. A.; Subramanian, G. M.; Halpern, A.; Sutton, G. G.; Charlab, R.; Nusskern, D. R.; Wincker, P.; Clark, A. G.; Ribiero, J. M. C.; Wides, R.; Salzberg, S. L.; *Science*, 298, 129-149, **2002**.

¹⁹ Miller, L. H.; Greenwood, B.; *Science*, 298, 121-122, **2002**.

En todos los casos, lo que se busca es información sobre **sustancias activas** llamadas **líderes**, las que luego se intenta transformar en fármacos útiles sometiéndolas a modificaciones químicas²⁰ (**Tabla 2**).

Tabla 2.- Algunos fármacos sintetizados usando moléculas naturales como modelos.

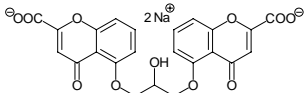
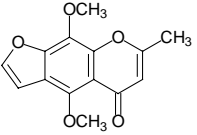
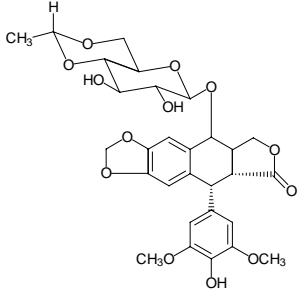
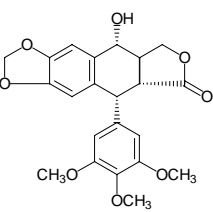
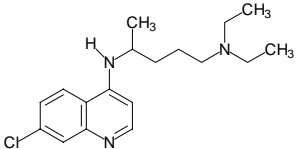
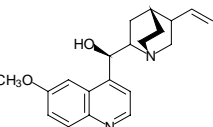
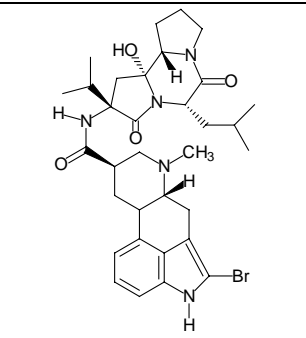
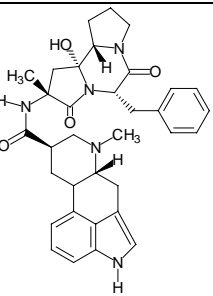
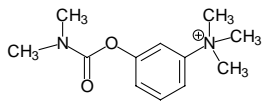
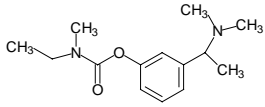
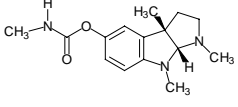
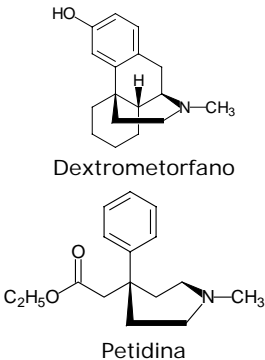
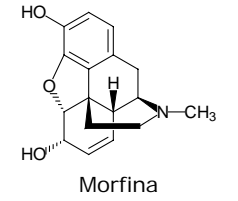
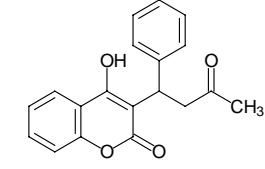
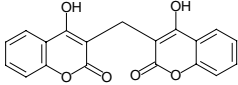
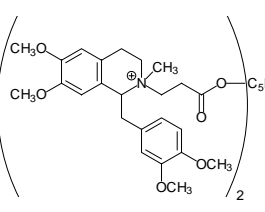
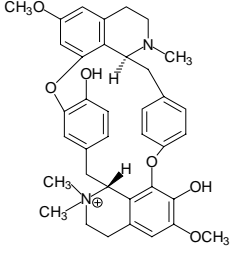
ESTRUCTURA DEL FARMACO	ESTRUCTURA DE LA MOLÉCULA MODELO	PLANTA	USO TRADICIONAL	USO CLÍNICO DEL FARMACO
 <p>Cromoglicato sódico</p>	 <p>Khellina</p>	<i>Ammi visnaga</i>	Tratamiento de complicaciones bronquiales	Antiasmático
 <p>Etoposido</p>	 <p>Podophyllotoxina</p>	<i>Podophyllum peltatum</i>	Purgativo	Anticáncer
 <p>Cloroquina y antimaláricos relacionados</p>	 <p>Quinina</p>	<i>Cinchona</i> spp.	-----	Antimalárico
 <p>Bromocriptina (también cabergolina, metiserghida)</p>	 <p>Ergotamina</p>	<i>Claviceps purpurea</i>	Para asistir nacimientos	Tratamiento del Parkinson

Tabla 2.- (Continuación).

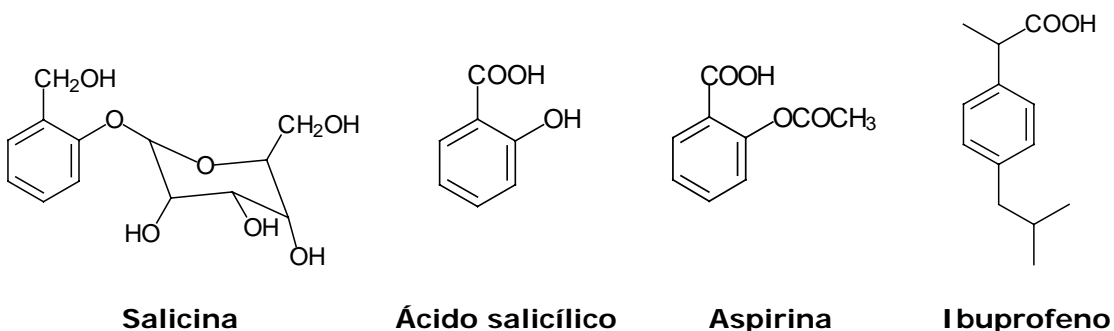
²⁰ Newman, D.J.; Cragg, G.M.; Snader, K.M.: "The influence of Natural Products upon drug discovery"; *Nat. Prod. Rep.*, 17, 215-234, **2000**.

ESTRUCTURA DEL FARMACO	ESTRUCTURA DE LA MOLÉCULA MODELO	PLANTA	USO TRADICIONAL	USO CLÍNICO DEL FARMACO
 <p>Neostigmina</p>  <p>Rivastigmina</p>	 <p>Physostigmina</p>	<i>Physostigma venesum</i>	Ordalías venenosas	Tratamiento de miastenia gravis Tratamiento de los síntomas iniciales del Alzheimer
 <p>Dextrometorfano</p> <p>Petidina</p>	 <p>Morfina</p>	<i>Papaver somniferum</i>	Analgésico, soporífero	Supresor de la tos Analgésico
 <p>Warfarina</p>	 <p>Dicumarol</p>	Melilotus alba	-----	Anticoagulante
 <p>Atracurium y otros relajantes musculares</p>	 <p>Tubocurarina</p>	<i>Chondodendron tomentosum</i>	Dardo venenoso paralizante	Relajante muscular durante la anestesia

Los productos naturales se usan como modelos de aproximación para la síntesis de fármacos, eliminando las partes no deseadas de la molécula y sintetizando

compuestos relacionados, de modo que se pueden llevar a cabo estudios de relación estructura-actividad²¹.

Esta aproximación ha llevado a la introducción de numerosos fármacos, incluyendo probablemente el mejor conocida del mundo, la **aspirina**. La aspirina (ácido acetilsalicílico) es completamente sintética, pero su descubrimiento se basó en el uso, en Europa, de plantas tales como el sauce (*Salix* spp.) para el tratamiento del reumatismo y dolores en general. A principios del siglo XIX se aisló de estas plantas la **salicina**, compuesto que demostró ser un profármaco que en el tracto intestinal e hígado se convertía en el principio activo, el **ácido salicílico**. El ácido salicílico, presentaba los mismos efectos que el extracto de la planta, pero su uso en medicina requería dosis muy elevadas, tenía un sabor desagradable y no era bien tolerado por el estómago. Se hicieron derivados del ácido salicílico para intentar superar estos problemas, y en 1899 el derivado acetilado, sintetizado por la compañía Bayer en Alemania, fue introducido como la aspirina dentro del uso clínico²². Es importante comprender de que no solo la aspirina sino el total de los agentes antiinflamatorios no esteroideos tales como el **ibuprofeno**, han sido el resultado de la investigación de la existencia natural de salicilatos.



²¹ Nicolau, K.C.; Sorensen, E.J.; Winssinger, N.; *J. Chem. Educ.*, **75**, 1225-1258, **1998**.

²² Dewick, P.M.; *Medicinal Natural Products*, Willey: Chichester; UK, p.129, **1997**.

La habilidad de las plantas y algunos otros organismos vivientes para producir moléculas estereoespecíficas con esqueletos muy complejos es uno de los aspectos que las hace atractivas como fuentes de nuevas moléculas. Numerosas teorías han avanzado para explicar el fenómeno de la complejidad y diversidad químicas encontradas en el mundo botánico, pero la más ampliamente aceptada hasta ahora es que las plantas producen esos compuestos como parte de su estrategia de supervivencia²³. Así, el interés científico de las plantas medicinales está aumentando, y se está comenzando a tener una actitud más seria en cuanto a sus usos terapéuticos.

Durante las últimas décadas, ha habido un interés resurgente por las plantas como fuentes de medicamentos y de nuevas moléculas para su uso en la elucidación de fenómenos fisiológico/bioquímicos, por una serie de razones. Entre otras, hay una auténtica expectación en los países desarrollados de que sus problemas de fármacos pueden ser subsanados a través de la explotación sensible y científica de las plantas medicinales, algunas de las cuales se han usado por generaciones por los pueblos indígenas. Y la creencia de que los remedios naturales a partir de las plantas son seguros y menos perjudiciales para el cuerpo humano que los fármacos sintéticos.

Muchos de los medicamentos más sofisticados que existen en el mercado, y más aún muchos de los que se están investigando, provienen de plantas, algas u hongos²⁴, como por ejemplo: penicilina, aspirina, digital, vincristina, atropina, reserpina, etc. Se encuentra un **principio activo natural**, se extrae, se mezcla con excipientes y se comercializa (valga la drástica simplificación a la que hemos sometido el proceso de creación de un medicamento). En otros casos, se busca una sustancia equivalente que sea más barata.

²³ Harborne, J.B.; *Introduction to Ecological Biochemistry*, 3rd Ed., Academic, London, p.214, **1988**.

²⁴ Shu, F.; *J. Nat. Prod.*, 61, 1053-1071, **1998**.

OBJETIVOS GENERALES

Los productos naturales han sido y siguen siendo la fuente principal de la mayoría de los actuales y futuros fármacos. Solo por mencionar algunos datos relevantes, desde 1981 hasta la fecha el 78 % de los compuestos antibacterianos y el 74 % de anticancerosos son productos naturales o compuestos diseñados y obtenidos usando como modelo algún producto natural¹.

Sin duda alguna las plantas seguirán siendo uno de los principales pilares en la investigación de la química medicinal, ya que sus componentes pueden ser sustancias que presenten nuevos mecanismos de acción contra la lucha de enfermedades.

Para el desarrollo de esta tesis se han propuesto los siguientes objetivos:

- Selección, recolección y secado de una planta del genero *Salvia* nativa de Baja California México.
- Aislamiento y purificación de metabolitos secundarios de la parte aérea de la planta *Salvia clevelandii*.
- Elucidación estructural de los productos obtenidos, mediante técnicas espectroscópicas y de espectrometría.

¹ www.nesacs.org/MeetingMay2004.pdf.

- Realización de bioensayos antitumorales de los metabolitos aislados de *Salvia Clevelandii*.
- Obtener herramientas para poder establecer que posibles factores estructurales de los metabolitos estudiados, son los responsables de la actividad biológica.

CAPITULO 1
EVALUACIÓN FITOQUÍMICA DE S. CLEVELANDII



ANTECEDENTES

Dentro de la familia botánica **Lamiaceae**, se han clasificado más de tres mil especies que se encuentran ampliamente distribuidas en la Naturaleza, siendo habituales en regiones de clima cálido y templado y muy raramente en climas fríos. Dentro de esta familia, el género **Salvia** está representado por más de quinientas especies que se encuentran muy repartidas por todas las regiones cálidas y templadas de nuestro planeta. Anteriormente, muchas especies de este género han sido objeto de interés, estando muy extendido su uso como plantas medicinales¹. En la actualidad, su uso se extiende a la farmacología², la cosmética³ y a la conservación de alimentos⁴.

El estudio fitoquímico de plantas de la familia Lamiaceae ha rendido numerosos diterpenos⁵ con actividades biológicas muy variadas tales como antitumorales, bactericidas o inhibidores del desarrollo de insectos.

En comparación con otros géneros de la familia Lamiaceae, el género **Salvia** ha sido poco estudiado fitoquímicamente, aproximadamente sólo un 6,5% de las quinientas especies descritas, y han mostrado poseer un rico contenido en estructuras diterpénicas. Algunas especies del género **Salvia** y concretamente **Salvia officinalis**, han sido objeto de interés desde la antigüedad en el mundo occidental⁶ y su uso como planta medicinal se ha extendido hasta nuestros días. En este mismo sentido pero referido al mundo oriental, merece especial mención **Salvia miltiorrhiza** Bunge.

Las cortezas secas de las raíces de **S. miltiorrhiza**, constituyen el mítico y antiquísimo fármaco chino conocido como Dan Shen y sin duda es la especie de **Salvia**

¹ Wagner, H.; *Rev. Latinoam. Quim.*, **8**, 16, **1977**.

² Gerald, S.; *Chemistry in Britain*, 684, **1985**.

³ Bergwein, K.; *Amer. Perfum. Cosmet.*, **83**, 41, **1968**.

⁴ Gwenter; "The Essential Oils"; D. Van Nostram Company Inc., New York, **38**, 710, **1964**.

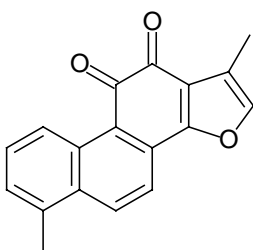
⁵ Hanson, J.R.; "Terpenoids and Steroids"; The Chemical Society Ed.; vol. II, London.

⁶ Funt Quer, P. "Plantas Medicinales". El Dioscorides Renovado. Editorial Labor, S.A.

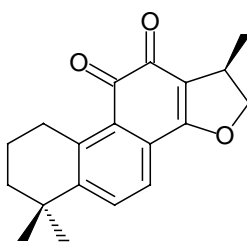
más profundamente investigada hasta ahora⁷ y que aún sigue siendo objeto de atención debido al notable número de diferentes tipos de actividad biológica que presenta⁸. Esta amplia gama de actividades biológicas ha sido atribuida y confirmada para algunas de

111111

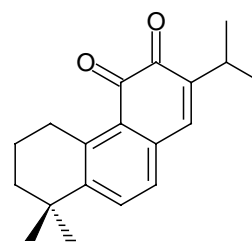
ellas, a una serie de diterpenoquinonas⁹ con esqueleto básico de abietano como pueden ser: **tanshinona I**, **criptotanshinona**, **miltirona**, **hidroxitanshinona** o **isotanshinona II**.



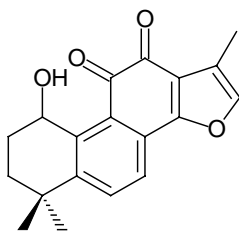
Tanshinona I



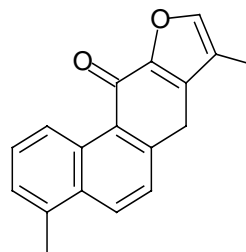
Criptotanshinona



Miltirona



Hidroxitanshinona



Isotanshinona II

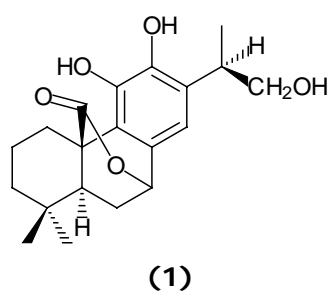
⁷ Chang, H.M.; But, P.P.H.; In "Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica"; Eds. World Scientific: Singapore, **1**, 255, **1986**.

⁸ (a) Chien, M.K.; Youg, P.T.; Ku, W.H.; Chen, H.T.; Yeh, H.C.; *Acta Chim. Sin.*, **36**, 199, **1978**. (b) Wu, W.L.; Chang, W.L.; Lee, A.R.; Liu, H.C.; King, M.L.; *J. Med. Sci.*, **6**, 159, **1985**. (c) Lee, A.R.; Wu, W.L.; Liu, H.C.; Kings, M.L.; *J. Nat. Prod.*, **50**, 157, **1987**. (d) Honda, G.; Koezuka, Y.; Tabada, M.; *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 408, **1988**.

⁹ (a) Chien, M.K.; Youg P.T.; Ku, W.H.; Chen, H.T.; Yeh, H.C.; *Acta Chim. Sin.*, **36**, 199, **1978**. (b) Tong, I.I.; *Chin. Derm.*, **4**, 210, **1986**. (c) Kakisawa, H.; Hayashi, T.; Yamazadi, T.; *Tetrahedron Lett.*, 3231, **1968**. (d) Hayashi, T.; Kakisawa, H.; Hsu, H.Y.; Chen, Y.P.; *J. Chem. Soc., Chem. Comm.*, 299, **1970**. (e) Luo, H.W.; Wu, M.Y.; Yong, Z.G.; Niwa, M.; Hirata, Y.; *Phytochemistry*, **24**, 815, **1985**. (f) Ginda, H.; kusumi, T.; Ishituka, M.O.; Kakisawa, H.; Zhao, W.; Chen, I.; Tian, G.Y.; *Tetrahedron Lett.*, **29**, 4603, **1988**.

Con estos antecedentes se inicio hace algunos años por el grupo de J. G. Luis y *col.*, el estudio fitoquímico sistemático de *Salvias* latinoamericanas, principalmente especies de Colombia, México, Paraguay, Panamá y Chile.

De la especie nativa de Baja California, *Salvia mellifera* Greene, se aislaron una serie de diterpenos del abietatrieno con la posición C-16 hidroxilada^{10,11} como por ejemplo el **16-hidroxicarnosol (1)**



Aunque la mayoría de diterpenos aromáticos encontrados en la naturaleza sólo presentan aromatización en el anillo C, las **tanshinonas**, aisladas de *Salvia miltiorrhiza*^{12,13,14}, constituyen quizás el caso más llamativo de diterpenos abietánicos con aromatización extendida a los anillos A y B. En dichas quinonas se observa una notable progresión desde la **miltirona**, la menos modificada, a la **tanshinona I**, el compuesto más altamente deshidrogenado, que sugiere un paralelismo entre el incremento de deshidrogenación y la secuencia biogenética real.

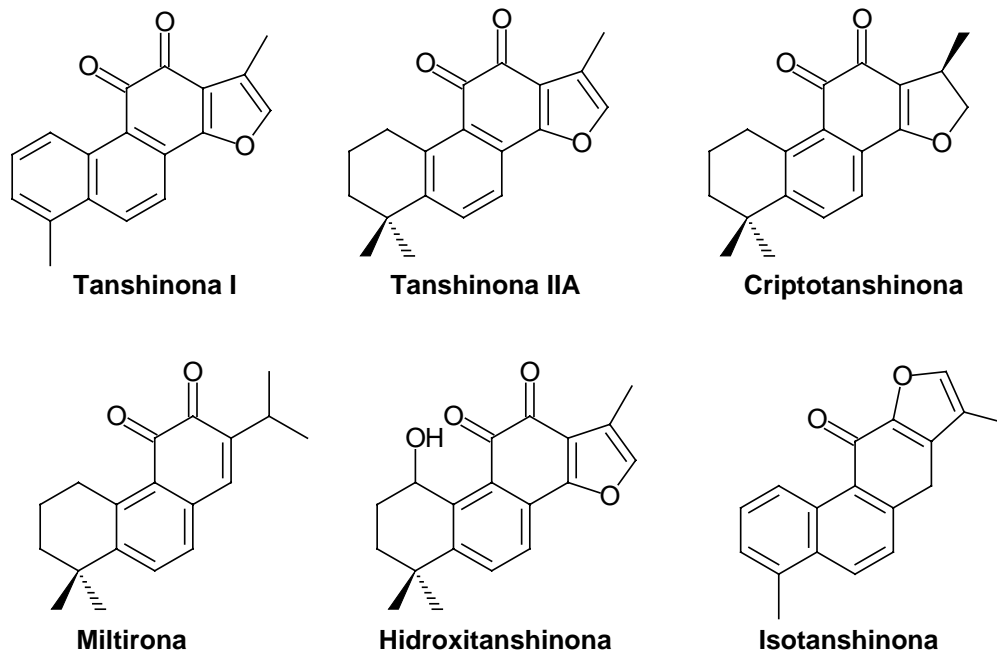
¹⁰ Luis, J.G.; San Andrés, L.; *Phytochemistry*, **33**, 635, **1993**.

¹¹ Luis, J.G.; San Andrés, L.; Perales A.; *Tetrahedron*, **49**, 4993, **1993**.

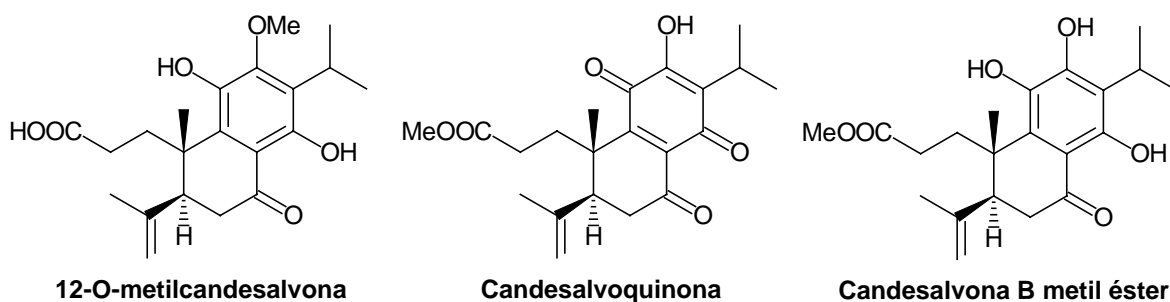
¹² Chang, H.M.; Cheng, K.P.; Choang, T.F.; Chow, H.F.; Chui, K.Y.; Hon, P.M.; Tan, F.W.L.; Yang, Y.; Zhong, Z.P.; Lee, C.M.; Sham, H.L.; Chan, C.F.; Cui, Y.X.; Wong, H.N.C.; *J. Org. Chem.*, **55**, 3537, **1990**, y referencias citadas.

¹³ Hayashi, T.; Kakisawa, H.; Hsü, H-Y.; Pan Chen, Y.; *Chem. Comm.*, 299, **1970**.

¹⁴ Honda, G.; Koezuka, Y.; Tabata, M.; *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 408, **1988**.



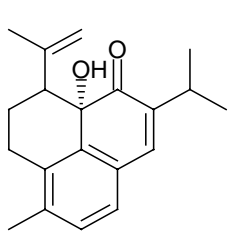
Es frecuente encontrar estructuras donde se ha producido la ruptura de un enlace en uno de los anillos del esqueleto. Así, de la *Salvia candelabrum* se han aislado numerosos compuestos que presentan la ruptura del enlace entre los carbonos C3-C4, como en los casos de **12-O-metilcandesalvona**, **candesalvoquinona** y **metil éster de la candesalvona B**¹⁵.



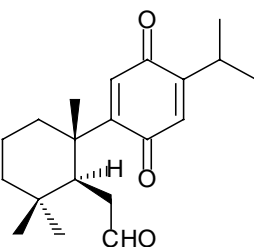
Algunos de estos compuestos con esqueleto de *seco*-abietano han mostrado poseer interesantes actividades biológicas como son: **sapirearina**, **7,8-*seco*-**

¹⁵ Hohmann, J.; Janicsak, G.; Forgo, P.; Redei, D.; Mathe, I.; Bartok, T.; *Planta Medica*, **69**, 254, **2003**.

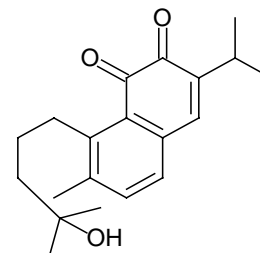
para-ferruginona, 4-hidroxisaprortoquinona y 3-ceto-4-hidroxisaprortoquinona, aislados por Chen y col.¹⁶ de las raíces de *Salvia prionitis*.



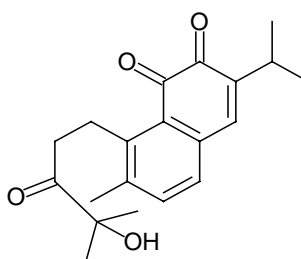
Sapirearina



7,8-Seco-para-ferruginona

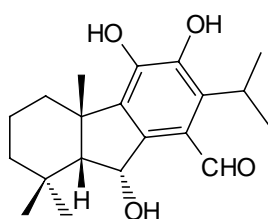


4-Hidroxisaprortoquinona

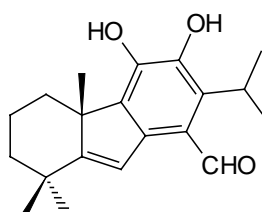


3-Ceto-4-hidroxisaprortoquinona

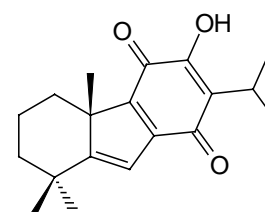
Los casos donde se ha producido la contracción de alguno de los anillos son escasos, y tres ejemplos de los mismos son el **dichroanal A**, **dichroanal B** y la **dichroanona**¹⁷, aislados de la *Salvia dichroanta*, donde el anillo B se ha transformado en un anillo de cinco miembros.



Dichroanal A



Dichroanal B

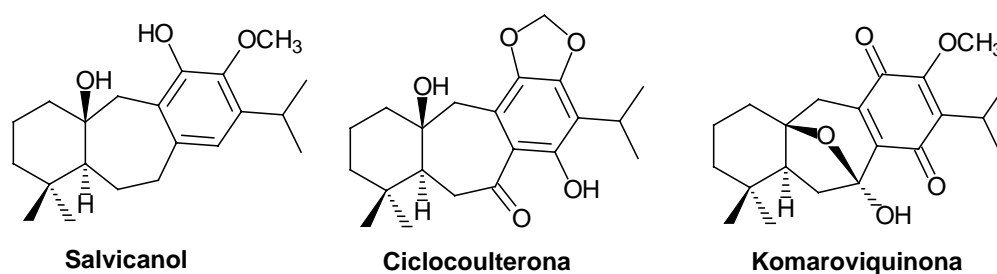


Dichroanona

¹⁶ Chen, X.; Ding, J.; Ye, Y. M.; Zhang, J. S.; *J. Nat. Prod.*, **65**, 1016, **2002**.

¹⁷ Kawazoe, K.; Yamamoto, H.; Takaishi, Y.; Honda, G.; Fujita, T.; Sezik, E.; Yesilada, E.; *Phytochemistry*, **50**, 493, **1998**.

Por el contrario, sí que son frecuentes los compuestos donde hay una expansión de uno de los anillos del esqueleto del abietano. Son relativamente abundantes los **icetaxanos**, donde hay un reagrupamiento químico en el que el carbono 20 se incorpora al anillo B, para originar un anillo de siete miembros, como sucede en el **salvicanol**¹⁸, aislado de las raíces de *S. canariensis* L., o en la **ciclocoulterona** y **komaroviquinona**¹⁹ aislados de *Dracocephalum komarovi* Lypsky (Labiada).

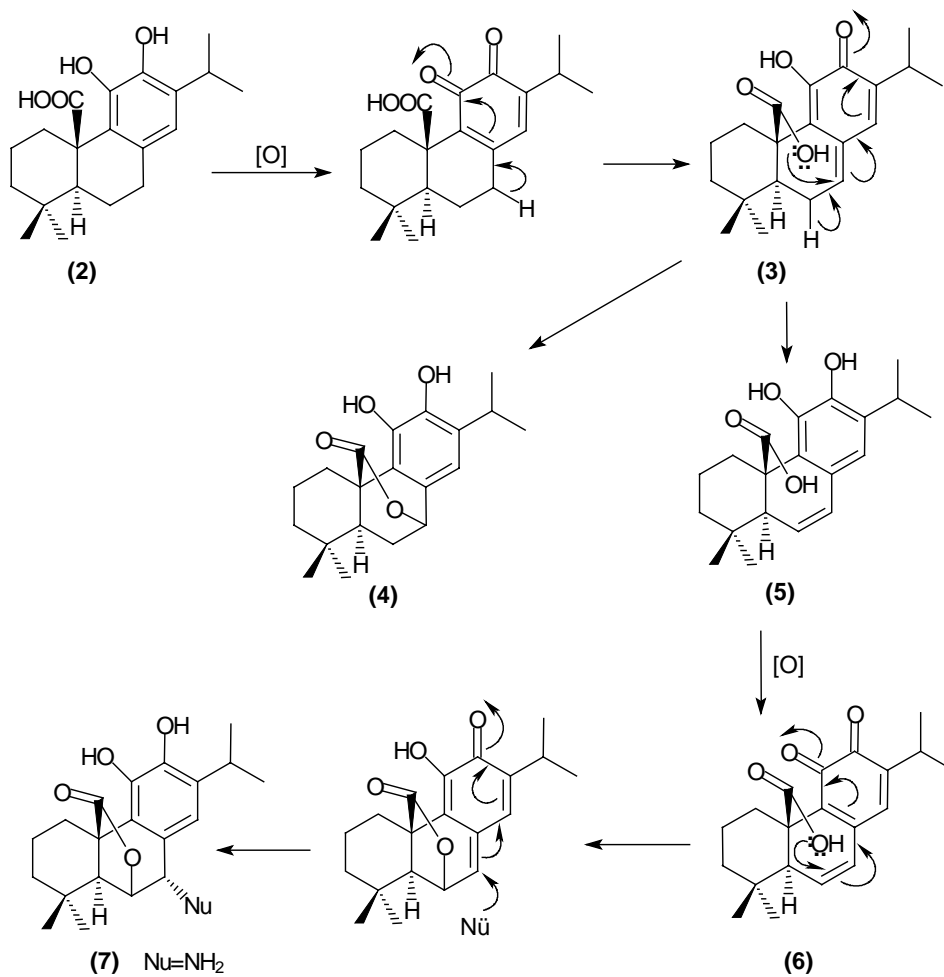


Hace algunos años Wenkert y *col.*²⁰ demostraron que el **carosol (4)** se podía formar como un artefacto a partir del **ácido carnósico (2)** mediante un proceso de oxidación al aire tal y como se muestra en el **Esquema 1**. Los mismos autores proponían que este esquema se podía extender mediante tautomerización de **(3)** para dar **(5)** y posterior oxidación a compuestos del tipo **(6)**, ya que cuando hicieron un extracto de las hojas del *Rosmarinus officinalis* en diclorometano/amoniaco obtenían la amina **(7)**.

¹⁸ Fraga, B. M.; González, A. G.; Herrera, J. R.; Luis, J. G.; Ravelo, A. G.; *Phytochemistry*, **25**, 269, **1986**.

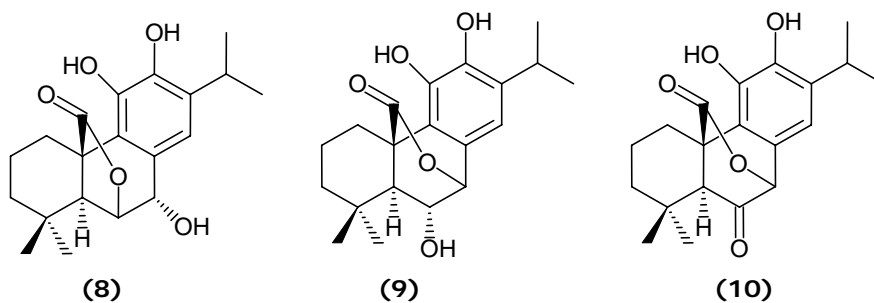
¹⁹ Uchiyama, N.; Kiuchi, F.; Ito, M.; Honda, G.; Takeda, Y.; Khodzhimatov, O. K.; Ashurmetov, O. A.; *J. Nat. Prod.*, **66**, 128, **2003**.

²⁰ Wenkert, E.; Fuchs, A.; McChesney, J.D.; *J. Org. Chem.*, **30**, 2931, **1965**.



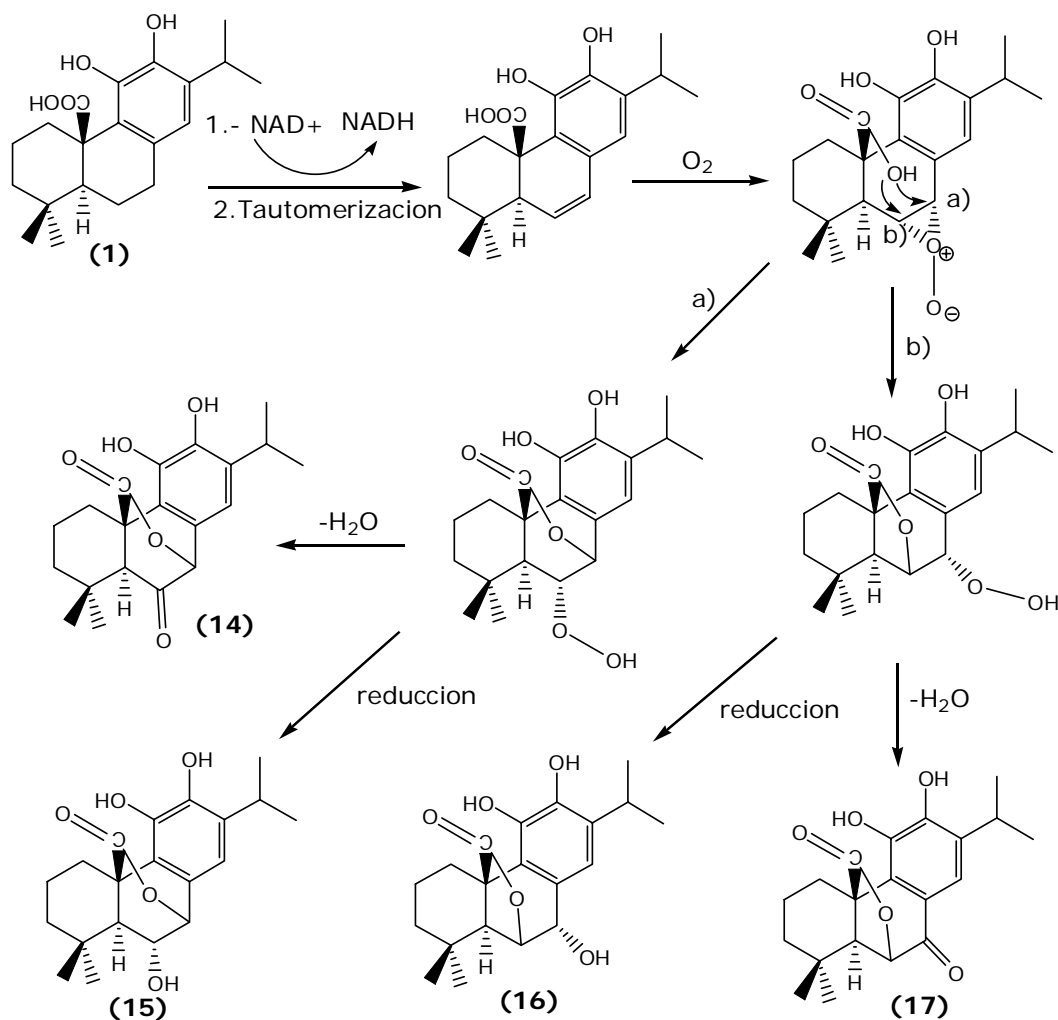
Esquema 1. Generación de Carnosol (4) a partir de ácido carnósico (2).

Esta propuesta sugería el origen como artefactos de compuestos tales como el **rosmanol (8)**, pero no explicaría el mismo origen del **isorosmanol (9)** e **isogaldosol (10)**, aislados de *S. mellifera* junto con el **rosmanol (8)**.



La variedad y grado en estados de oxidación de diterpenos aislados, así como su comportamiento químico, llevó a algunos investigadores como el de J. G. Luis y *col.*, a postular una hipótesis biogenética para lactonas diterpénicas de esta naturaleza con alto grado de oxidación en los anillos B y C. En dicha hipótesis la intervención del oxígeno en su estado singulete y de enzimas deshidrogenasa jugarían un papel fundamental. Esta ruta explicaría la formación no sólo de compuestos como el **rosmanol (8)** sino también del **galdosol (11)**, **isorosmanol (9)** e **isogaldosol (10)**, aislados de la especie *S. mellifera*. Esta hipótesis de participación del oxígeno en su estado singulete en dichos procesos biosintéticos ha sido probada químicamente²¹ (**Esquema 2**), llevando además a la conclusión de que al menos en monoalquenos tales como **(18)**, la reacción con oxígeno en su estado excitado singulete transcurre a través de la participación de un intermedio perepóxido y no vía un proceso "énico" concertado tal como se había postulado hasta entonces para la reacción general de monoolefinas con el oxígeno singulete.

²¹ Luis, J.G.; San Andrés; L.; Fletcher, W.Q.; *Tetrahedron Letters*, 35, 179, **1994**.



Esquema 2. Reacciones biosintéticas para la generación de diterpenos.

Estos hechos llevaron a la conclusión^{22,23,24} de que en el género *Salvia*, los diterpenos abietatriénicos juegan un papel importante en el mecanismo de defensa contra especies químicas altamente dañinas para las células como son los radicales libres del oxígeno y oxígeno molecular en su estado singulete, comportándose así como fitoalexinas de estrés lumínico. Esta conclusión está apoyada además por la observación

²² González, A.G.; San Andrés, L.; Aguiar, Z.E.; Luis, J.G.; *Phytochemistry*, **31**, 1305, **1992**.

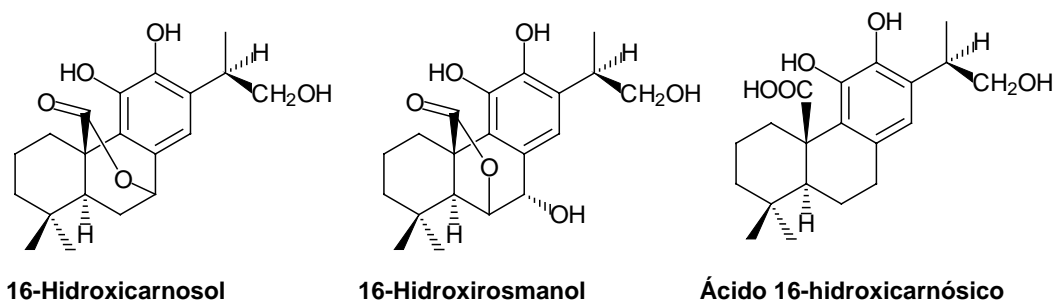
²³ Luis, J.G.; San Andrés, L.; Fletcher, W.Q.; *Tetrahedron Letters*, **35**, 179, **1994**.

²⁴ Luis, J.G.; "Chemistry, biogenesis and chemotaxonomy of the diterpenoids of *Salvia*"; *Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids*, p.63, Edited by J.B.Harborne and F.A. Tomas-Barberan, Oxford Science Publications, **1991**.

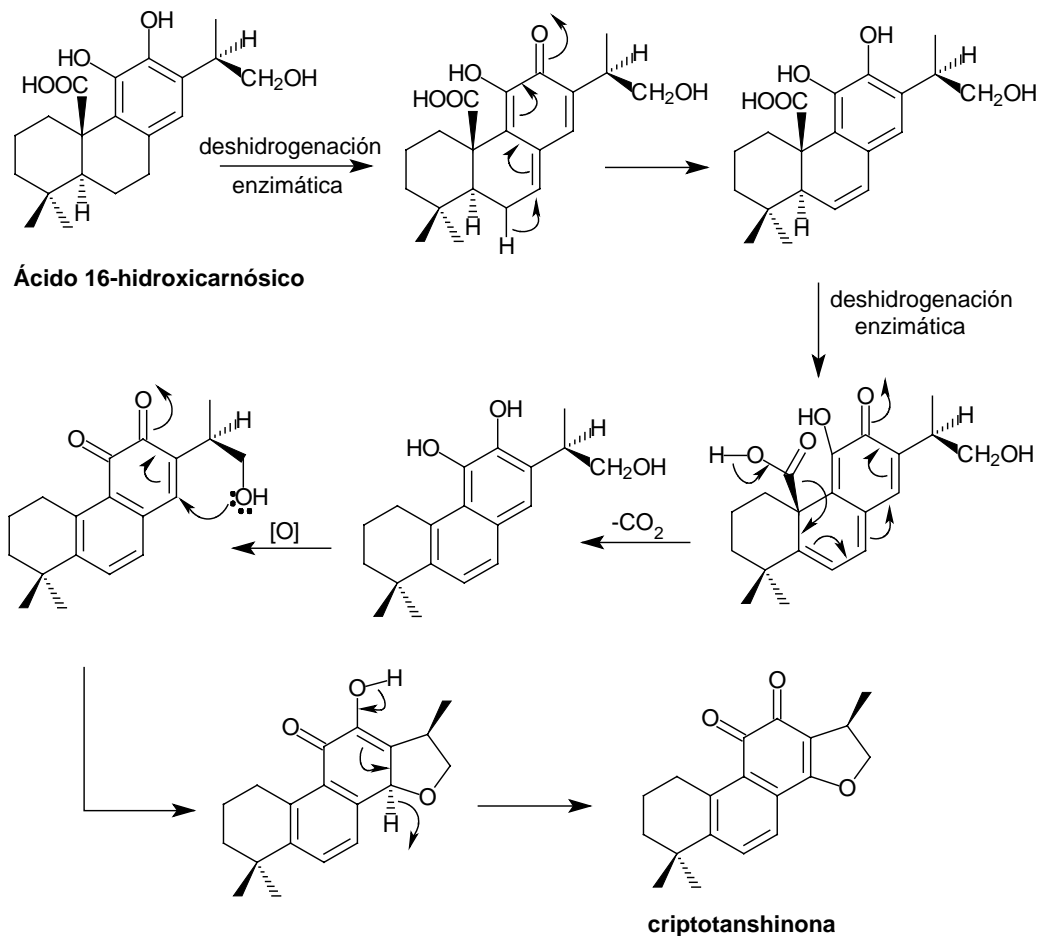
de que la concentración de este tipo de diterpenos es muy alta en especies de *Salvias* de zonas desérticas las cuales están sometidas a una elevada dosis de irradiación solar, mientras que otras especies de *Salvias* de zonas húmedas y bosques de niebla, biosintetizan preferentemente diterpenos neoclerodánicos, pero no diterpenos abietatriénicos.

Estudios recientes, realizados por otros autores²⁵, sobre la producción de este tipo de diterpenos por *Rosmarinus officinalis*, cuando está sometido a estrés lumínico o hídrico, apoyan asimismo estas conclusiones.

Por otro lado el aislamiento de un gran número de diterpenos abietatriénicos hidroxilados en C-16, como son el **16-hidroxicarnosol**, **16-hidroxirosmanol** o el **ácido 16-hidroxicarnósico**, puede dar cuenta de la formación de las sustancias con esqueleto de tanshinonas, aisladas de las raíces de *S. mellifera* siguiendo un proceso análogo de deshidrogenaciones enzimáticas y participación del oxígeno en su estado singulete (**Esquema 3**).



²⁵ Munné-Bosch, S.; Schwarz, K.; Alegre, L.; "Response of abietane diterpenes to stress in *Rosmarinus officinalis* L.: New insights into the function of diterpenes in plants"; *Free Radical Research*, **1999**.



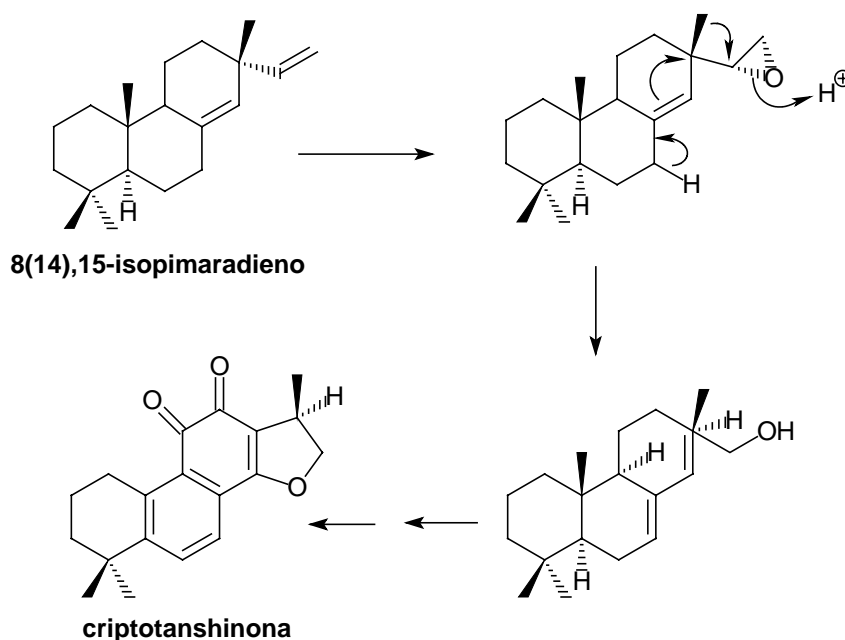
Esquema 3. Generación de **criptotanshinona** mediante la participación de oxígeno en su estado singlete.

Dicha ruta está de acuerdo con la configuración absoluta 15-R encontrada tanto para los 16-hidroxiabietanos como para la criptotanshinona aislados, ya que la configuración en C-15 no estaría implicada en la formación del anillo dihidrofuránico. Más aún, previamente ha sido demostrado que en la biosíntesis de la **criptotanshinona**²⁶ y del **ferruginol**²⁷, el esqueleto abietánico se forma por una migración 1,2 de metilo desde el carbono C-13 al C-15 y por la cara *si* del doble enlace

²⁶ Tomita, Y.; Ikeshiro, Y.; *Chem. Comm.*, 1311, **1987**.

²⁷ (a) Enzall, C.K.; Ryhage, R.; *Ark. Kemi*, 26, 425, **1966**. (b) Clark, G.K.; Waters, T.N.; *J. Chem. Soc. (C)*, 887, **1970**.

en el precursor **4(14),15-isopimaradieno (Esquema 4)**. El aislamiento de dicho precursor de *S. mellifera* Greene junto con las reacciones observadas²⁸ entre el oxígeno en su estado singulete y los metabolitos secundarios del género *Salvia*, parecen indicar que tal proceso es una ruta biosintética general para la formación del esqueleto abietánico en el género *Salvia* y que además la formación de abietanos hidroxilados en C-16 debe ocurrir, previa epoxidación del doble enlace monosustituido.



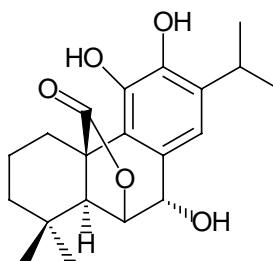
Esquema 4. Obtención de criptotanshinona a partir de 4(14),15-isopimaradieno.

Como se ha mencionado anteriormente, entre los diterpenos aromáticos del abietatrieno se ha encontrado una amplia gama de actividades farmacológicas dependientes de la estructura. Por esta razón los diterpenos aislados por J. G. Luis y *col.*, de varias especies de *Salvia*, fueron sometidos a estudios de actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram (+) y Gram (-) y frente a levaduras; actividad

²⁸ Luis, J.G.; San Andrés, L.; Quiñones, W.F.; *Tetrahedron Letters*, **35**, 179, **1994**.

citotóxica frente a dos líneas celulares (HeLa y Hep-2); actividad antivírica y actividad antioxidante.

Estos estudios permitieron establecer algunas relaciones estructura-actividad^{29,30,31}. Por otro lado el **rosmanol (8)** mostró ser un potente antioxidante³² en estudios de cultivo *in vitro* de algunas especies, impidiendo la excreción al medio de cultivo de sustancias tóxicas que eran un problema para el crecimiento de los brotes.



(8)

En relación al estudio de la vegetación de Baja California México, principalmente la que se distribuye en la parte norte de la península y que en algunas ocasiones ha recibido la atención de investigadores extranjeros, ha sido estudiada de una manera incompleta y por lo general, no se ofrecen resultados acerca de la fitogeografía donde se nos muestre de una manera clara la distribución actual de esta vegetación, además de que la nomenclatura utilizada no resulta ser del todo congruente y uniforme.

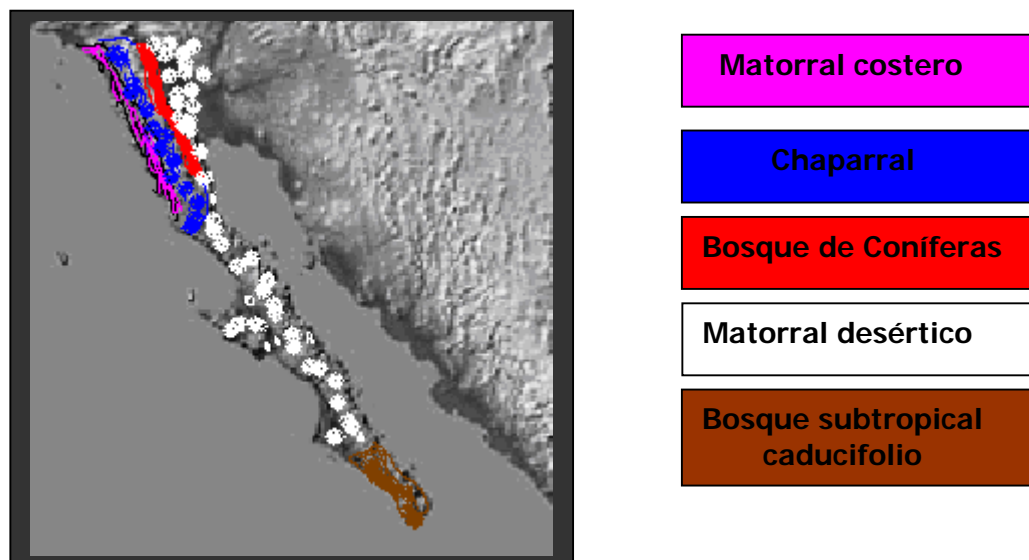
²⁹ González, A.G.; Grillo, T.A.; Jiménez, I.A.; Ravelo, A.G.; Luis, J.G.; Aguiar, Z.; San Andrés, L.; Plasencia, M.; Herrera, J.R.; Moujir, L.; *Biochem. System. Ecol.*, **17**, 293, **1989**.

³⁰ Moujir, L.; Gutiérrez-Navarro, A.M.; San Andrés, L.; Luis, J.G.; *Phytochemistry*, **34**, 1493, **1993**.

³¹ Moujir, L.; Gutiérrez-Navarro, A.M.; San Andrés, L.; Luis, J.G.; *Phytotherapy Research*, **10**, 172, **1996**.

³² Mederos, S.; San Andrés, L.; Luis, J.G.; *Acta Societatis Botan. Pol.*, **66**, 347, **1997**.

Sin embargo, actualmente se han podido establecer los diferentes tipos de vegetación distribuidos sobre toda la extensión de esta Península Mexicana³³



Principales tipos de vegetación de Baja California México.

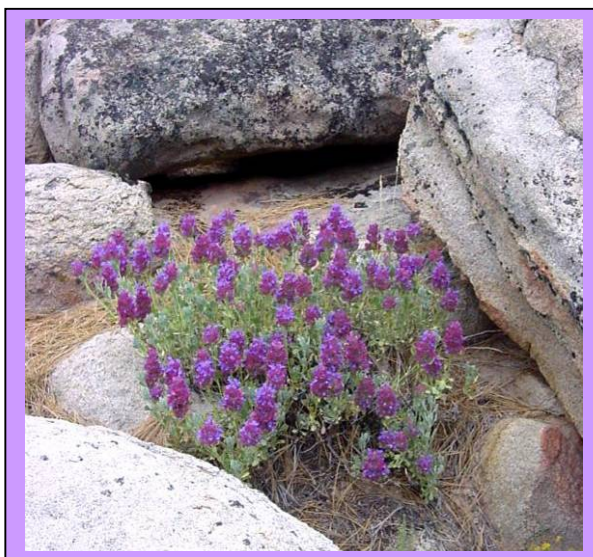
Fitoquímicamente se han realizado estudios parciales de las *salvias pachyphylla* y *clevelandii* lográndose aislar algunos metabolitos secundarios importantes en su mayoría de tipo diterpeno³⁴.

La especie *Salvia pachyphylla* conocida también como Rosa o *Salvia* de la montaña del desierto, es una planta vascular de la familia Lamiaceae del género *Salvia* y de categoría perenne, que crece en un clima tipo mediterráneo característico de esta región de América. Esta planta se encuentra como un arbusto que llega a medir entre 60 y 90 cm de altura. Presenta hojas verdes y grisáceas de forma lanceolada que miden

³³ Delgadillo, J. “*Florística y ecología del norte de Baja California*”, Universidad Autónoma de Baja California. Mexicali Baja California, Pág. 121-125, **1997**.

³⁴ Iván Córdova “Estudio fitoquímico de *Salvia pachyphylla* y *S. clevelandii*. Aproximación Sintética de diterpenos y sus derivados: Evaluación de actividades Biológicas”. Tesis Doctoral. IUBO-”AG”, 2006.

entre 2 y 5 cm de longitud, y flores de color morado o rosa con una fragancia muy agradable. El cáliz de cada flor mide aproximadamente entre 9 y 12 mm, mientras que la corola en forma de tubo cilíndrico mide entre 13 y 23 mm de longitud. El periodo de florecimiento de esta planta se da entre mediados y finales del verano o iniciando el periodo de otoño. Esta *Salvia* tiene un uso medicinal por las comunidades indígenas de Baja California³⁵.

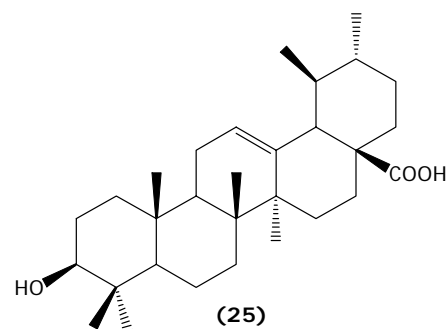
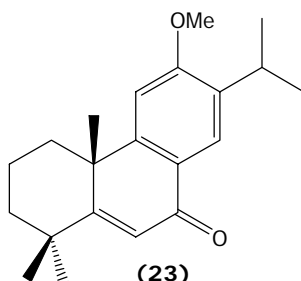
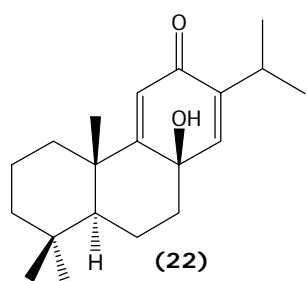
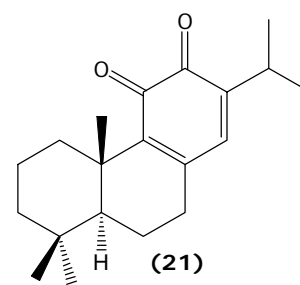
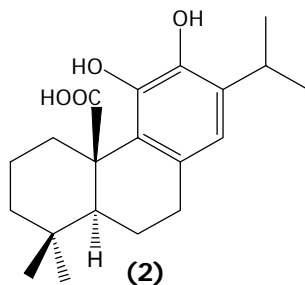
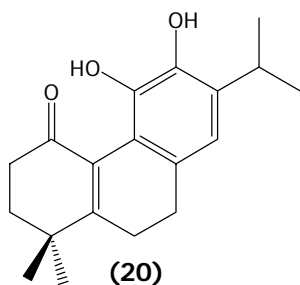
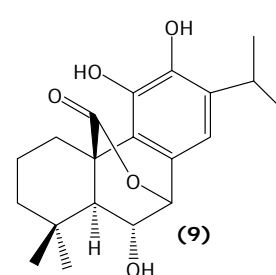
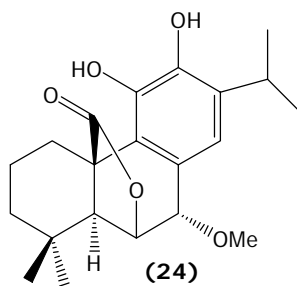
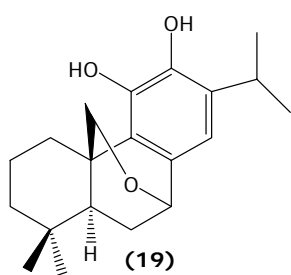
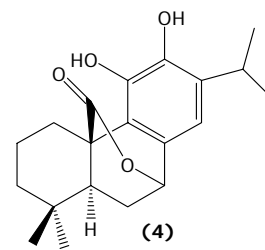
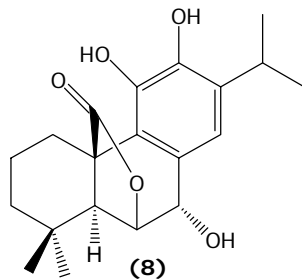
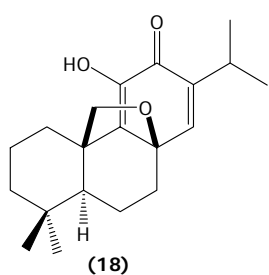


Salvia pachyphylla

Las partes aéreas (tallos, hojas y flores secas) de la planta (460 g) fueron extraídas a temperatura ambiente, por maceración con acetona destilada, filtradas y el disolvente eliminado a presión reducida a una temperatura de 40 °C, obteniéndose un extracto de 41 g, el cual fue sometido a una cromatografía en columna en gel de sílice, aislándose un diterpeno no descrito en la literatura denominado pachyphylona **(18)** y los compuestos conocidos: 20-deoxocarnosol **(19)**, 11,12-Dihidroxi-20-nor-abieta-5(10), 8, 11, 13-tetraen-1-ona **(20)**, 11,12-dioxo-8,13-abietadieno **(21)**, 8 β -hidroxi-9,13-abietadien-12-ona **(22)**, 5,6-didehidro-*O*-metil-sugiol **(23)**, carnosol **(4)**,

³⁵ Cortés, R.A.E. *Estudio etnobotánico de los grupos Kumiai y pai pai de Baja California*. Escuela Superior de Ciencias, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, B.C., México, **1988**.

rosmanol (**8**), ácido carnósico (**2**), 7-metoxirosmanol (**24**), isorosmanol (**9**) y el triterpeno ácido ursólico (**25**).



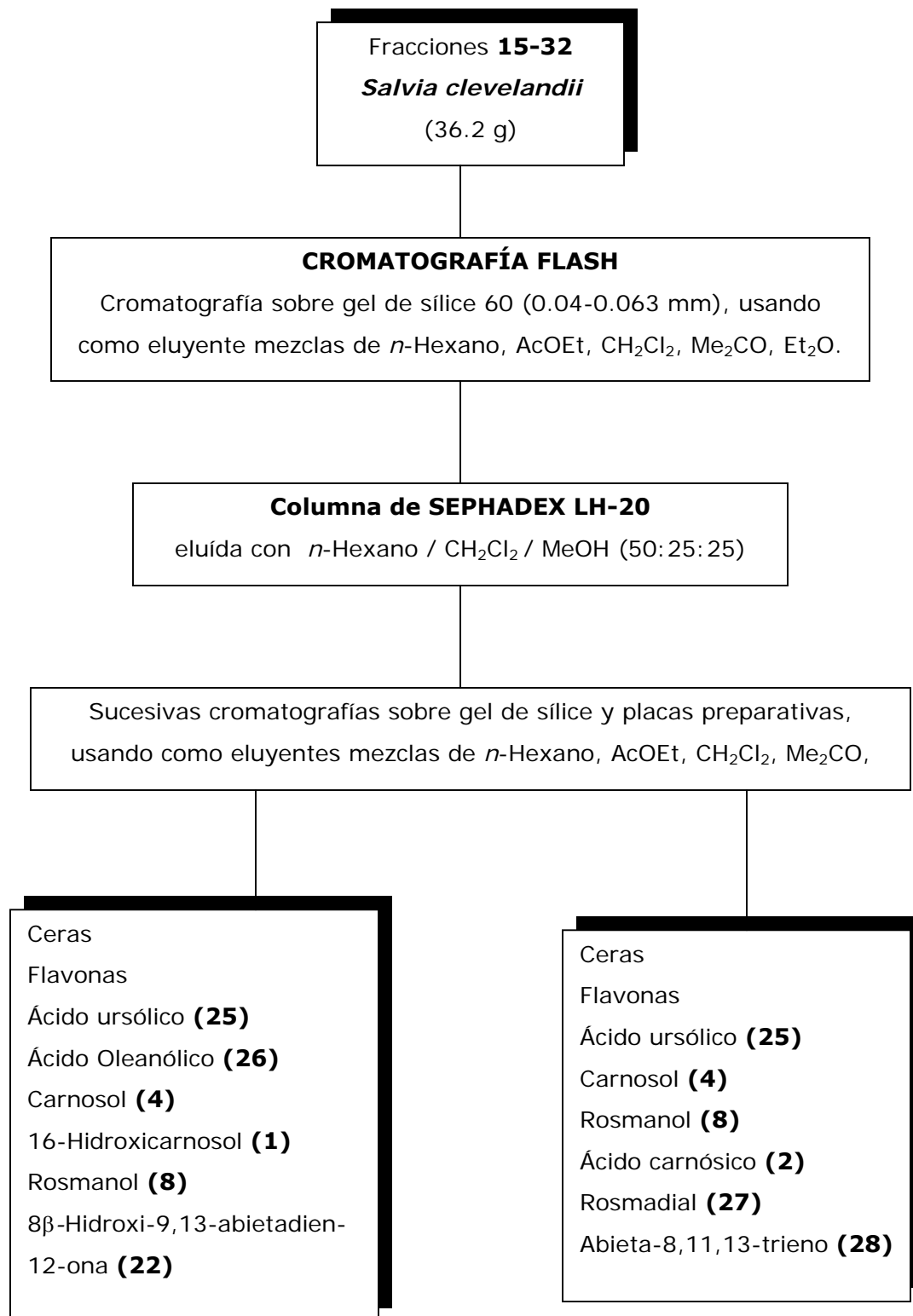
PARTE EXPERIMENTAL

FRACCIONAMIENTO CROMATOGRÁFICO DEL EXTRACTO DE LA PARTE AÉREA DE SALVIA CLEVELANDII

La parte aérea (tallos, hojas y flores) de *Salvia clevelandii* que se estudió en nuestro laboratorio, también fue recolectada en el noroeste de México dentro de la península de Baja California. La zona específica de recolección fue la sierra de San Pedro Mártir a una altitud promedio de entre 1200 y 2000 m.

El material seco y finamente molido fue macerado a temperatura ambiente con acetona destilada. Se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida en el rotavapor a 40°C, obteniéndose 36.2 g de extracto.

El extracto así obtenido se disolvió en CHCl_3 y se mezcló con gel de sílice 60 (0.063-0.2 mm). El disolvente se evaporó en el rotavapor a presión reducida y a una temperatura de 35-45°C. El material obtenido se usó como cabeza de una columna de gel de sílice 60 (0.04-0.063 mm) previamente compactada y se eluyó inicialmente con *n*-Hexano, y después con mezclas de *n*-Hexano/AcOEt de polaridad creciente hasta llegar a AcOEt. La columna se lavó finalmente con etanol recogiendo en total 41 fracciones de 500 mL, de las cuales solo se estudiaron las fracciones de la **15** a la **32** que fueron reunidas apropiadamente y sometidas a distintas cromatografías, aislandose los distintos compuestos naturales que se muestran en el siguiente esquema.



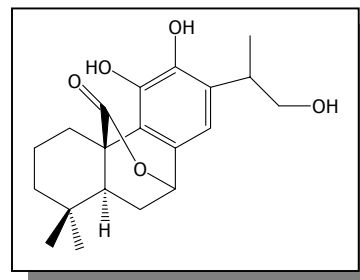
DATOS FÍSICOS Y ESPECTROSCÓPICOS DE LOS PRODUCTOS AISLADOS DE
SALVIA CLEVELANDII

16-Hidroxycarnosol (1)

Fórmula molecular: C₂₀H₂₆O₅

Aspecto físico: Sólido color blanco (43 mg)

UV λ_{máx} (EtOH) nm: 322, 284.



IR (NaCl) ν_{máx} cm⁻¹: 3469, 3290, 2953, 1722, 1456, 1393, 1335, 1299, 1249, 1218, 1160, 1120, 1070.

EM (alta resolución): [M]⁺ a *m/z* 346.1738 (calc. para C₂₁H₂₈O₂, 346.1696).

EM m/z (%): 346 [M]⁺ (38), 316 (14), 302 (100), 284 (53), 271 (22), 231 (14), 213 (35), 201 (14), 149 (10), 91 (62), 55 (27).

RMN ¹H (CDCl₃) δ: 0.85 (3H, s, Me-18), 0.89 (3H, s, Me-19), 1.26 (3H, d, *J* = 7.3 Hz, Me-16), 1.31 (3H, d, *J* = 7.3 Hz, Me-17), 1.45-1.95 (6H, señal compleja, H-3, H-5, H-2, y H-6), 2.15 (1H, m, H-6), 2.45 (1H, t d, H-1α), 2.88 (1H, d ancho, *J* = 14.0 Hz, H-1β), 3.12 (1H, hept, *J* = 7.0 Hz, H-15), 3.74 (1H, dd, H-16), 4.01 (1H, dd, *J*₁ = 2.6 Hz y *J*₂ = 9.3 Hz, H-16), 5.33 (1H, dd, *J*₁ = 2.6, *J*₂ = 3.7 Hz, H-7), 6.22 (1H, s, HO-Ar), 6.56 (1H, s, H-14), 8.82 (1H, s ancho, HO-Ar).

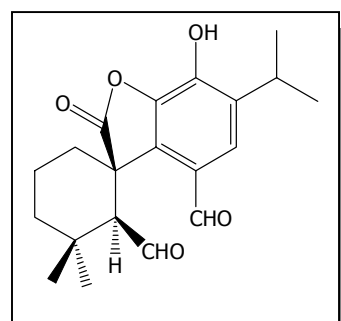
RMN¹³C (CDCl₃) δ: 15.4 (q, C-17), 19.2 (t, C-2), 20.0 (q, C-19), 29.1 (t, C-1), 30.1 (t, C-6), 32.1 (q, C-19), 34.9 (s, C-4), 37.8 (d, C-15), 41.4 (t, C-3), 45.8 (d, C-5), 48.7 (s, C-10), 70.4 (t, C-16), 78.1 (d, C-7), 113.3 (d, C-14), 122.2 (s, C-9), 129.3 (s, C-13), 132.6 (s, C-8), 143.2 (s, C-12), 144.0 (s, C-11), 176.6 (s, C-20).

Rosmadial (27)

Fórmula molecular: C₂₀H₂₄O₅

Aspecto físico: Sólido amorfo (2.9 mg)

UV λ_{máx} (EtOH) nm : 290, 234, 203.



IR ν_{máx} (NaCl) cm⁻¹ : 3140, 2730, 1803, 1786, 1713, 1655, 1615, 1580, 1240, 1170, 1132, 1002.

EM (alta resolución): [M]⁺ a *m/z* 344.1602 (calc. para C₂₀H₂₄O₅, 344.1622).

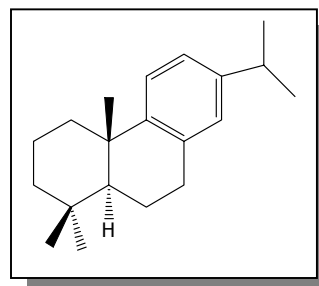
EM *m/z* (%) : 344 [M]⁺ (38), 316 (15), 287 (100), 273 (20), 231 (16).

RMN ^1H (CDCl_3) δ : 1.27 (6H, d, $J=7.0$ Hz, Me-16, Me-17), 1.28 (3H, s, Me-19), 1.50 (3H, s, Me-18), 1.55-2.27 (6H, señal compleja, H-1, H-2, H-3), 3.35 (1H, hept, $J=7.0$ Hz, H-15), 4.11 (1H, s, H-5), 6.84 (1H, s ancho, Ar-OH), 7.41 (1H, s, H-14), 9.67 (1H, s, H-6), 9.78 (1H, s, H-7).

Abieta-8,11,13-trieno (28)

Fórmula molecular: $\text{C}_{20}\text{H}_{30}$

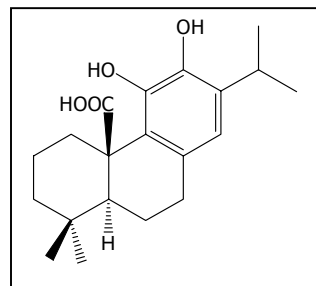
Aspecto físico: Sólido amorfo (3.7 mg)



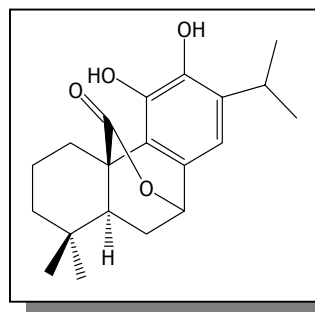
IR $\nu_{\text{máx}}$ (NaCl) cm^{-1} : 2959, 1867, 1730, 1668, 1608, 1498, 1456, 1376, 1259, 1200, 1084.

EM m/z (%) : 270 $[\text{M}]^+$ (36), 255 (100), 227 (7), 213 (7), 199 (12), 185 (35), 173 (39), 159 (45), 69 (22).

RMN ^1H (CDCl_3) δ : 0.93 (3H, s, Me-18), 0.95 (3H, s, Me-19), 1.23 (3H, d, $J=7.0$ Hz, Me-16), 1.27 (3H, d, $J=7.0$ Hz, Me-17), 1.58 (3H, s, Me-20), 2.30 (1H, d ancho, H-1 β), 2.87 (3H, señales solapadas, H-15 y H-7), 6.90 (1H, s, H-14), 6.99 (1H, d, $J=8.0$ Hz, H-11), 7.18 (1H, s, $J=8.0$ Hz, H-12).

Ácido carnósico (2)**Fórmula molecular:** C₂₁H₂₈O₅.**Aspecto físico:** Sólido amorfo (11 mg)**PF:** 191-194°C

RMN ¹H (CDCl₃) δ: 0.90 (3H, s Me-18), 1.01 (3H, s, Me-19), 1.21 (6H, d, *J* = 6.9 Hz, Me-16 y Me-17), 1.80 (1H, m, H-1 α), 2.37 (2H, m, H-6), 2.84 (2H, t, *J* = 12.0 Hz, H-7), 3.15 (1H, hept, *J* = 7.0 Hz, H-15), 3.28 (1H, d ancho, *J* = 14.6 Hz, H-1 β), 6.55 (1H, s, H-14).

Carnosol (4)**Fórmula molecular:** C₂₁H₃₀O₄**Aspecto físico:** Sólido amorfo (44 mg)**UV $\lambda_{\text{máx}}$ (EtOH) nm:** 284.**IR (NaCl) $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹:** 3495, 3390, 2980, 2870, 1710, 1580, 1480, 1450, 1350, 1200.**EM *m/z* (%):** 330 [M]⁺ (22), 286 (100), 271 (9), 243 (7), 215 (30).

RMN ^1H (CDCl_3) δ : 0.86 (3H, s, Me-18), 0.90 (3H, s, Me-19), 1.22 (6H, d, $J = 7.0$ Hz, Me-16 y Me-17), 1.31 (1H, dd, $J_1=3.5$ Hz, $J_2 =14.0$ Hz, H-3), 1.65 (2H, señales solapadas, H-2 y H-3), 1.73 (1H, s, H-5), 1.90 (1H, t d, H-6 β), 1.99 (1H, d t, H-2), 2.20 (1H, m, H-6 α), 2.39 (1H, td, $J_1= 4.3$ Hz, $J_2 = 14.0$ Hz, H-1 α), 2.90 (1H, d ancho, H-1 β), 3.08 (1H, hept, $J = 7.0$ Hz, H-15), 5.31 (1H, s ancho, Ar-OH), 5.35 (1H, dd, $J_1 = 2.2$ Hz y $J_2 = 3.8$ Hz, H-7), 5.76 (1H, s ancho, Ar-OH), 6.31 (1H, s, H-14).

RMN ^{13}C (CDCl_3) δ : 18.8 (t, C-2), 19.7 (q, C-18), 22.5 (q, C-16 y C-17), 27.3 (d, C-15), 29.1 (t, C-1), 29.7(t, C-6), 31.7 (q, C-19), 34.5 (s, C-4), 41.0 (t, C-3), 45.0 (d, C-5), 48.0 (s, C-10), 77.9 (d, C-7), 112.3 (d, C-14), 121.6 (s, C-9), 132.1 (s, C-13), 132.8 (s, C-8), 141.0 (s, C-12), 141.8 (s, C-11), 175.0 (s, C-20).

Rosmanol (8)

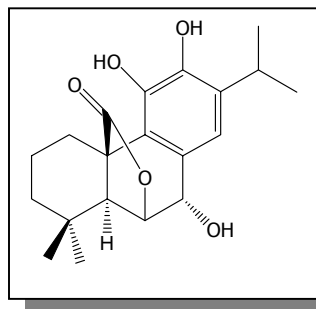
Fórmula molecular: $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_5$

Aspecto físico: Sólido cristalino (11 mg)

UV $\lambda_{\text{máx}}$ (EtOH) nm : 209, 226, 282.

IR $\nu_{\text{máx}}$ (NaCl) cm^{-1} : 3460, 3320, 2950, 1740, 1275, 1120, 1052, 1000, 952, 900, 856, 800.

EM (alta resolución): $[\text{M}]^+$ a m/z 346.1798 (calc. para $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_5$, 346.1779).



EM m/z (%): 346 $[M]^+$ (100), 300 (48), 287 (62), 284 (41), 273 (38), 269 (31), 231 (51), 215 (51).

RMN 1H ($CDCl_3$) δ : 0.93 (3H, s, Me-19), 1.03 (3H, s, Me-18), 1.22, 1.23 (cada uno 3H, d, $J=7.0$ Hz, Me-16 y Me-17), 2.00 (1H, td, H-1 α), 2.21 (1H, s, H-5), 3.20 (1H, hept, $J=7.0$ Hz, H-15), 3.21 (1H, d ancho, H-1 β), 4.57 (1H, d, $J=3.3$ Hz, H-6), 4.74 (1H, d, $J=3.3$ Hz, H-7), 6.87 (1H, s, H-14).

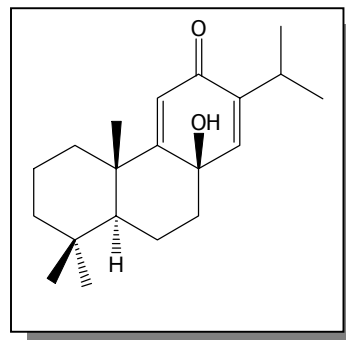
RMN ^{13}C (CD_3OD) δ : 20.1 (t, C-2), 22.2 (q, C-17), 22.5 (q, C-19), 22.9 (q, C-16), 27.9 (d, C-15), 28.6 (t, C-1), 31.9 (q, C-18), 32.2 (s, C-4), 39.3 (t, C-3), 48.3 (s, C-10), 51.6 (d, C-5), 69.1 (d, C-7), 79.9 (d, C-6), 120.4 (d, C-14), 124.9 (s, C-9), 129.4 (s, C-8), 137.4 (s, C-13), 143.3 (s, C-12), 145.2 (s, C-11), 180.9 (s, C-20).

8 β -Hidroxi-9,13-abietadien-12-ona (22)

Fórmula molecular: $C_{20}H_{30}O_2$

Aspecto físico: Sólido amorfo (17 mg)

$[\alpha]_D^{20} =$ -138° (c 0.006 $CHCl_3$)



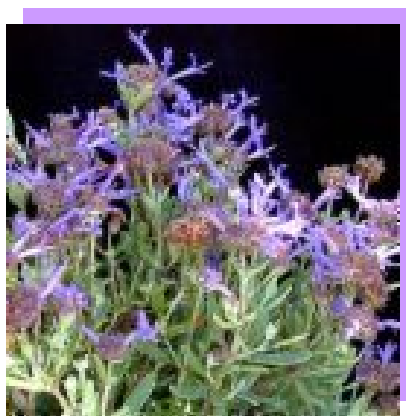
EM (alta resolución): $[M]^+$ a m/z 302.2225 (calc. para $C_{20}H_{30}O_2$, 302.2246).

EM <i>m/z</i> (%):	302 [M] ⁺ (68), 286 (13), 230 (10), 205 (17), 178 (42), 165 (100), 157 (17), 138 (18), 105 (16), 95 (17), 77 (21), 69 (28), 55 (31).
RMN ¹H (CDCl₃) δ:	0.90 (3H, s, Me-18), 0.96 (3H, s, Me-19), 0.97 (1H, dd, $J_1 = 2.18$ Hz, $J_2 = 13.4$ Hz, H-5), 1.06 (3H, d, $J = 6.8$ Hz Me-16), 1.08 (3H, d, $J = 6.8$ Hz, Me-17), 1.20 (1H, m, H-3), 1.38 (3H, s, Me-20), 1.39 (1H, m, H-1 α), 1.40 (2H, m, H-3 y H-7), 1.60 (2H, m, H-2 y H-6), 1.70 (2H, m, H-1 β y H-2), 1.92 (1H, ddd, $J_1 = 3.2$ Hz, $J_2 = 13.0$ Hz, $J_3 = 16.0$ Hz, H-6), 2.14 (1H, d ancho, $J = 13.6$ Hz, H-7), 2.92 (1H, hept, $J = 6.9$ Hz, H-15), 6.02 (1H, s, H-11), 6.40 (1H, s, H-14).
RMN ¹³C (CDCl₃) δ:	17.4 (t, C-6), 18.3 (t, C-2), 19.9 (q, C-20), 21.1 (q, C-17), 21.5 (q, C-16), 21.5 (q, C-19), 25.3 (d, C-15), 33.2 (q, C-18), 33.9 (s, C-4), 37.5 (t, C-1), 39.4 (t, C-7), 41.0 (s, C-10), 41.6 (t, C-3), 54.5 (d, C-5), 69.0 (s, C-8), 121.7 (d, C-11), 141.6 (s, C-13), 145.3 (d, C-14), 168.8 (s, C-9), 187.1 (s, C-12).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Salvia clevelandii

La especie *Salvia clevelandii* es una planta vascular de la familia Lamiaceae del género *Salvia*, que al igual que *Salvia pachyphylla* crece en zonas con un clima tipo mediterráneo característico de esta región de América. Esta especie se encuentra como un arbusto redondeado de color verde que llega a medir entre 60 cm y 1,5 m de altura. Presenta hojas verdes y grisáceas de forma lineal o lanceolada que miden aproximadamente entre 3 cm de longitud de contorno aserrado, y presentan un aroma fuerte. Las flores de esta planta son de color moradas o azuladas en forma de racimos. El periodo de florecimiento es de un mes generalmente iniciando el verano. El tallo es de estructura rígida y aérea.



Salvia clevelandii

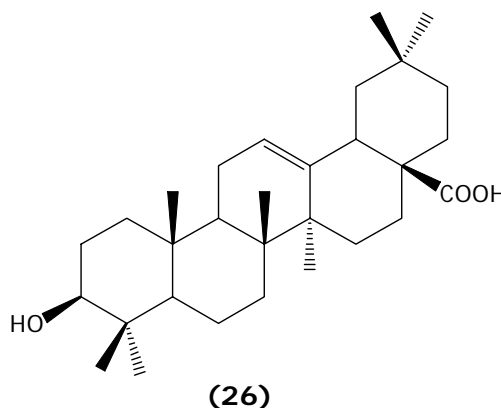
La parte aérea, seca y molida de la planta (426.7 g) fue extraída a temperatura ambiente, por maceración con acetona destilada. Filtración y eliminación del disolvente a presión reducida a una temperatura de 40 °C, condujo a la obtención de un extracto de 36.2 g. El extracto fue sometido a una cromatografía en columna en gel de sílice, como se indica en la parte experimental, aislándose ácido ursólico (**25**), ácido

oleanolico (**26**), rosmanol (**8**), carnosol (**4**), 16-hidroxycarnosol (**1**), abieta-8,11,13-trieno (**28**), rosmadial (**27**) y 8 β -hidroxi-9,13-abietadien-12-ona (**22**).

COMPUESTOS AISLADOS DE SALVIA CLEVELANDII

Ácido oleanólico (26)

Este triterpeno (**26**) fue caracterizado por sus datos físicos y espectroscópicos y por comparación con los datos encontrados en la bibliografía¹ para el ácido oleanólico.

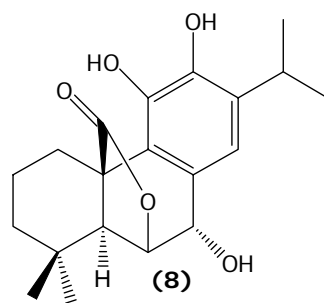


Rosmanol (8)

Fue aislado como un sólido cristalino, de fórmula molecular $C_{20}H_{26}O_5$ por espectrometría de masas de alta resolución. Su espectro de RMN 1H en cloroformo deuterado muestra las señales típicas de un grupo isopropilo sobre aromático, dos metilos angulares, un protón aromático (6.87 δ), un sistema AB como dos dobletes de

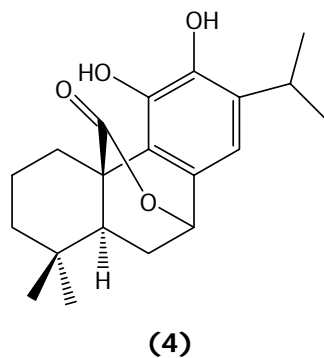
¹ González, A.G.; Fraga, B. M.; Luis, J. G.; Ravelo, A. G. *An. Quim.*, 71, 701, **1975**.

un protón cada uno a 4.57 y 4.74 δ , asignables a los protones H-6 y H-7 respectivamente y un protón singlete a 2.21 δ atribuible a H-5. Todos los datos espectroscópicos de nuestro producto fueron superponibles a los dados en la bibliografía química² para el **rosmanol (8)**.



Carnosol (4)

Se aisló como un sólido cristalino. El espectro de RMN ¹H en cloroformo deuterado presenta señales a 6.31 δ un singlete asignable al protón aromático H-14; a 5.76 y 5.32 δ dos singletes anchos intercambiables con D₂O típicos de los protones de los hidroxilos en C-11 y C-12; en 5.35 δ un doble doblete con constantes de acoplamiento $J_1 = 2.25$ Hz y $J_2 = 3.76$ Hz que integra para un protón atribuible al protón H-7, y a 3.08 δ un protón heptuplete correspondiente a H-15. Todos los datos físicos y espectroscópicos fueron superponibles a los del **carnosol (4)** ya descrito en la bibliografía³.

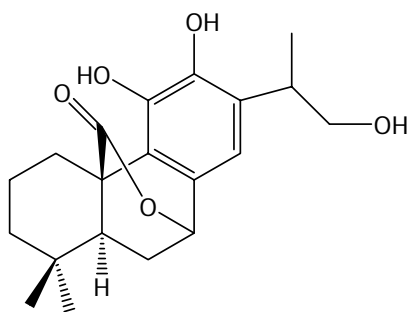


² González, A. G.; Fraga, B. M.; Luis, J. G.; Herrera, J. R.; Ravelo, A. G. *Phytochemistry*, **24**, 1853, **1985**.

³ Lucía S. Andrés "Aspectos químicos, biosintéticos y actividad biológica de diterpenos del genero *Salvia*: *Salvia canariensis* L. y *Salvia mellifera* Greene". Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna, **1992**.

16-Hidroxycarnosol (1)

Aislado como un sólido cristalino, muestra en espectrometría de masas de alta resolución un ión molecular a m/z 346.1738 para una fórmula molecular $C_{20}H_{26}O_5$. En el espectro de RMN 1H se observaron las siguientes señales que identifican la estructura de (1), un singlete a 6.56 δ correspondiente al protón aromático H-14, a 8.82 y 6.22 δ las señales de los hidroxilos aromáticos, un doble dobletes a 5.33 δ con constantes de acoplamiento de $J_1 = 2.6$ y $J_2 = 3.7$ Hz asignado al protón H-7; a 4.01 δ un doble dobletes con constantes de acoplamiento $J_1 = 2.6$ Hz y $J_2 = 9.3$ Hz para uno de los protones de C-16; y a 3.74 δ un doble dobletes para el otro protón H-16; un heptuplete a 3.12 δ con $J = 7.0$ Hz para el protón H-15. En el espectro de RMN ^{13}C se observaron las señales de los 20 carbonos esperados de este compuesto (1). Todos los datos espectroscópicos fueron superponibles con los encontrados en la bibliografía⁴ para el 16-hidroxycarnosol (1).

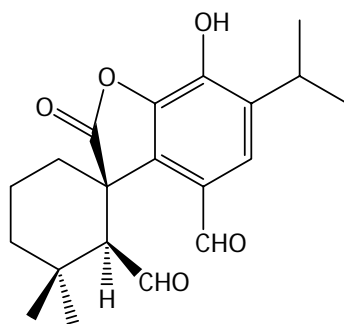


(1)

⁴ Lucía S. Andrés “Aspectos químicos, biosintéticos y actividad biológica de diterpenos del genero *Salvia*: *Salvia canariensis* L. y *Salvia mellifera* Greene”. Tesis Doctoral, Universidad de La Laguna, **1992**.

Rosmadial (27)

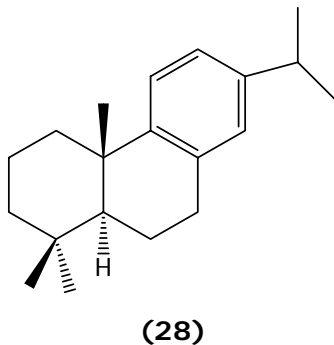
Producto aislado como un sólido amorfo. En espectrometría de masas de baja resolución mostró un ión molecular a m/z 344. La característica más significativa del espectro de RMN ^1H es la presencia de dos protones aldehídicos a 9.77 y 9.66 δ . Además presenta dos dobletes de tres protones cada uno ($J=7.0$ Hz) a 1.27 y 1.28 δ y un protón como heptuplete ($J = 7.0$ Hz) a 3.35 δ , indicando la presencia de un grupo isopropilo unido a un anillo aromático, con un solo protón aromático a 7.40 δ . Dos singletes de tres protones cada uno a 1.28 y 1.50 δ son atribuibles a dos metilos angulares. Todos estos datos estaban de acuerdo con la estructura (27) propuesta para la sustancia y consultada la bibliografía química resultaron completamente superponibles a los descritos para el **rosmadial**⁵ aislado de *Rosmarinus officinalis*.

**(27)****Abieta-8, 11, 13-trieno (28)**

Compuesto aislado en forma de aceite. En el espectro de RMN ^1H aparecen las señales correspondientes de los protones aromáticos a 7.00, 7.15 y 6.85 δ , y de 5

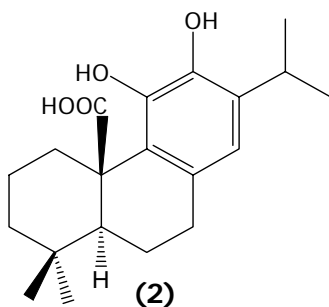
⁵ Nakatani, N.; Inatani, R.; *Agricol. Biol. Chem.*, 47, 353, **1983**.

grupos metilos a 0.90, 0.95, 1.24, 1.27, y 1.60 δ . Todos los datos espectroscópicos coinciden con los dados en la bibliografía⁶ para el abieta-8, 11, 13-trieno **(28)**.



Ácido carnósico (2)

Este diterpeno fue aislado como un sólido cristalino. Presenta un punto de fusión de 191-194°C. En el espectro de RMN ¹H en CDCl₃ muestra señales representativas de protón aromático a 6.55 δ , un heptuplete a 3.15 δ correspondiente al protón H-15 del grupo isopropilo. Toda la información espectroscópica fue superponible con la de este compuesto **(2)** ya descrito en la bibliografía⁷ como ácido carnósico.

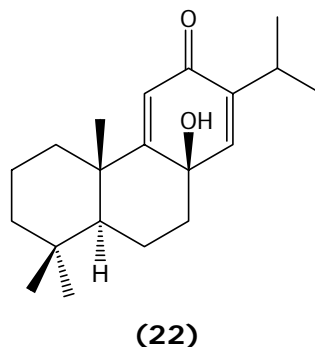


⁶ Kitadani, M.; Yoshikishi, A.; Kitara, Y.; de Paiva Campillo, J.; Mc. Chesney, J.D.; Watts, D.J.; Wenkert, E. *Chem., Pharm. Bull.*, **18**, 402, **1970**.

⁷ Richheimer, S. L.; Bernart, M. W.; King, G. A.; Kent, M. C.; Bailey, D. T. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **73**, 507, **1996**.

β -Hidroxi-9,13-abietadien-12-ona (22)

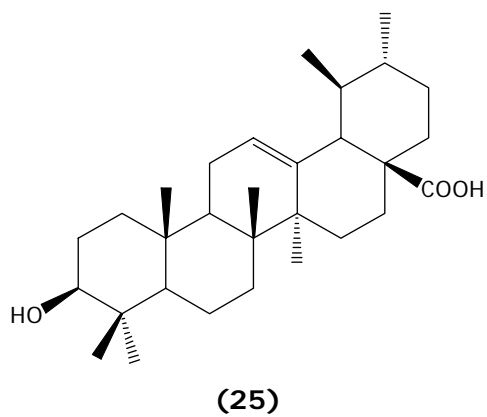
Este compuesto fue aislado como un sólido amorfo. En espectrometría de masas de alta resolución presentó un ión molecular a m/z 302.2225 para una fórmula molecular $C_{20}H_{30}O_2$. En el espectro de RMN 1H se observaron como señales más características las siguientes: a 6.40 δ un singulete asignado al protón H-14; a 6.02 δ un singulete atribuido al protón H-11, un heptuplete para H-15 a 2.92 δ . En el espectro de RMN ^{13}C presenta la señal del carbonilo en C-12 a 187.1 δ , y se observaron los 20 átomos de carbono esperados para este compuesto. Estos datos así como el resto de la información espectroscópica, fueron superponibles con las del 8 β -hidroxi-9,13-abietadien-12-ona (22) aislado de la planta *Cephalotaxus harringtonia*⁸.

**Ácido ursólico (25)**

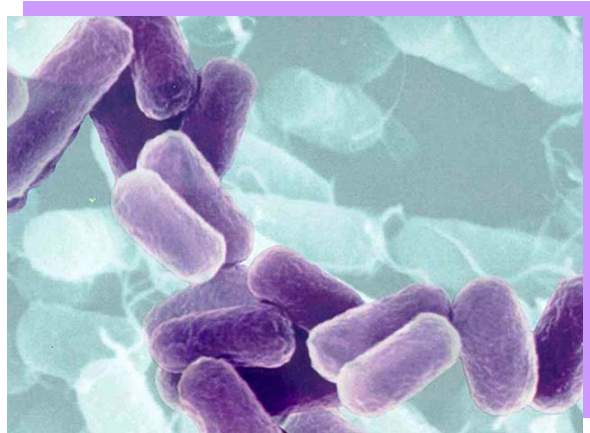
El triterpeno ácido ursólico (25) fue caracterizado por sus datos físicos y espectroscópicos y por comparación de los mismos con los datos dados en la bibliografía química⁹, así como con una muestra auténtica del mismo.

⁸ Polito, M.; Braca, A.; De Tomáis, N.; Morelli, I.; Manunta, A.; Battinelli, L.; Mazzanti, G. *Planta Med.*, **69**, 468-470, **2003**.

⁹ González, A.G.; Fraga, B. M.; Luis, J. G.; Ravelo, A. G. *An Quim.*, **71**, 701, **1975**.



CAPÍTULO 2
ACTIVIDAD ANTITUMORAL



INTRODUCCIÓN.

La necesidad de realizar investigación hacia la búsqueda de nuevos medicamentos es de trascendental importancia para la humanidad.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) hasta la fecha, todavía no existen tratamientos adecuados para tres cuartas partes de las dos mil quinientas afecciones médicas reconocidas actualmente y que afectan a la humanidad.

En la actualidad, una prioridad fundamental es la necesidad urgente de elaborar nuevos medicamentos antimicrobianos que sustituyan a los que resultan ya ineficaces debido a la resistencia microbiana.

Tras varias décadas de uso abusivo e indiscriminado de los antibióticos, se ha llegado a una situación en la que se han seleccionado cepas bacterianas resistentes y que, por tanto, tienen incrementada la virulencia del patógeno en su mecanismo de infección. La propagación de estas cepas resistentes a los antibióticos conocidos hoy en día (unos 160 compuestos)¹ es un problema grave y se apunta como una de las principales causas de mortalidad para el próximo milenio. Basta con mencionar que enfermedades como la tuberculosis, la fiebre tifoidea, la meningitis, la neumonía y las septicemias son cada vez más frecuentes en zonas donde se pensaba que ya estaban erradicadas; las mismas bacterias que durante mucho tiempo habían sido controladas con antibióticos, son ahora invulnerables. Es por esta situación de alarma por lo que surge la necesidad de desarrollar urgentemente nuevos compuestos activos.

¹ Service, R.F.; *Science*, 270, 724, **1995**.

Con relación al cáncer, hay que señalar que aunque en los casos donde el tumor se detecta en sus inicios los porcentajes de "curación" (supervivencia de 5 años sin que el cáncer se manifieste de nuevo) son relativamente elevados, sin embargo cuando éste se ha desarrollado y extendido la cuestión es muy diferente. En tales casos dichos porcentajes son muy bajos.

Estos resultados han obligado a todas las compañías a realizar un cambio fundamental de estrategia y que los esfuerzos se encaminen ahora en buscar moléculas que inhiban la proliferación celular. Es decir, a encontrar inhibidores específicos de los factores de crecimiento², receptores y GTP³ de la célula. La nueva "*quimioterapia dirigida*" pretende crear cuerpos monoclonales para cortar la transmisión de la información en la célula cancerosa, moléculas inhibitoras que impidan su replicación logrando que entre en apoptosis, es decir, lograr que la célula se autodestruya o sea destruida por las células de defensa del organismo.

Estos dos ejemplos ponen de manifiesto la necesidad de buscar otros medicamentos, más eficaces y seguros. Por esto, es fundamental la realización de ensayos biológicos de las moléculas aisladas de fuente natural, o sintetizadas en el laboratorio. De esta forma se podría crear un amplio arsenal terapéutico para curar o controlar enfermedades tales como las infecciones con gérmenes cada vez más resistentes a los antibióticos, nuevos medicamentos para enfermedades crónicas como:

² **Factor de crecimiento:** Molécula polipeptídica extracelular, que se une a un receptor de superficie celular y activa una vía de señales intracelular que induce la proliferación, diferenciación u otra respuesta celular.

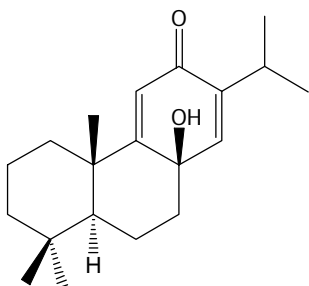
³ **GTP:** (5'-trifosfato de Adenosina). Nucleótido precursor de la síntesis del RNA que también desempeña un papel esencial en la síntesis de proteínas, las vías de transducción de señales y el ensamblaje de microtúbulos.

hipertensión, hipercolesterolemia, Parkinson, Alzheimer, diabetes u osteoporosis; así como sustancias activas frente a enfermedades como el SIDA o cáncer.

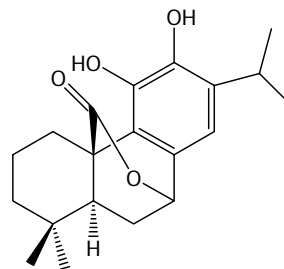
PARTE EXPERIMENTAL

En colaboración con el BioLab del Instituto Universitario de Bio-Orgánica "Antonio González" (La Laguna, Tenerife) y del Instituto Canario de Investigación del Cáncer (I.C.I.C), se realizaron estudios de actividad antiproliferativa de algunos metabolitos secundarios aislados de la especie *Salvia clevelandii*,

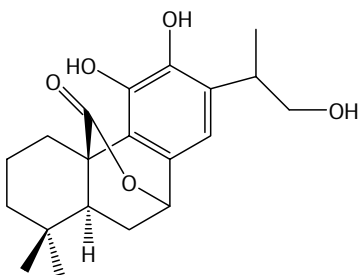
Metabolitos estudiados.



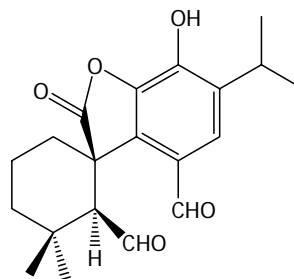
8-Hidroxi-9,13-abietadien-12-ona



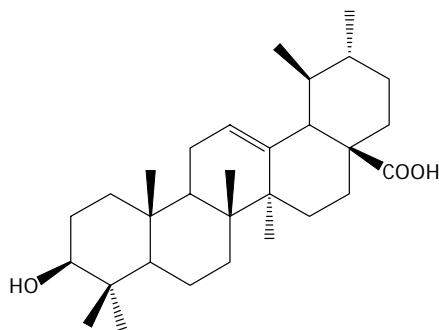
Carnosol



16-Hidroxycarnosol



Rosmadiol



Acido ursólico

Líneas celulares.

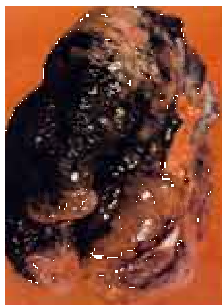
Las líneas celulares empleadas para llevar a cabo los experimentos proceden de tumores sólidos humanos y que se relacionan a continuación:

- Cáncer de ovario (A2780)
- Cáncer de pulmón no microcítico (SW1573)
- Cáncer de colon (WiDr)
- Cáncer de mama hormonodependiente (T-47D)
- Cáncer de mama (HBL-100)
- Cáncer cervical (HeLa)

Estas líneas celulares son ejemplos de tumores sólidos encontrados en la literatura, y son equivalentes a las del programa de screening anticanceroso del Instituto Nacional de Cáncer (NCI-EUA).



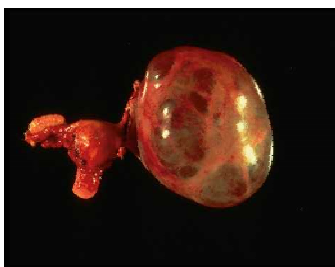
Cáncer cervical



Cáncer de pulmón



Cáncer de colon



Cáncer de ovario

Determinación de la actividad citostática y citotóxica

Los ensayos biológicos fueron realizados en placas de cultivo de 96 pocillos usando el protocolo del National Cancer Institute (NCI) realizando solo pequeñas modificaciones⁴. Después de 48 h de exposición a los productos y usando el método de la sulforodamina B (SRB), se determinó la inhibición del crecimiento y la citotoxicidad frente a las líneas celulares de acuerdo al procedimiento que se describe a continuación. Los compuestos puros se disolvieron inicialmente en DMSO a 400 veces la máxima concentración de ensayo, esto es 100 μM . Las células control fueron expuestas a un equivalente de la concentración de DMSO. Cada agente fue evaluado por duplicado. El

⁴ Padrón, J. M.; Villar, J.; Martín, V. S.; Martín, T.; Donadel, O. J.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, 3536-3539, **2005**.

tiempo de incubación fue de 48 h, periodo tras el cual las células se precipitaron con 50 μ L de una disolución de ácido tricloroacético al 50 % (p/v) durante 60 min a 4°C. Después se lavó con agua y se tiñó con 25 μ L de una disolución de SRB al 0.4 % durante 15 min. Posteriormente se eliminó el exceso de colorante con disolución de AcOH al 1 %, para después adicionar una disolución de 10 mM tris (hidroximetil)aminometano en agua (150 μ L). La absorbancia de cada pocillo se leyó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm usando un lector Bio-Tek PowerWave XS. El porcentaje de crecimiento de los niveles de concentración de los compuestos fue calculado con respecto a la diferencia de absorbancia inicial y final de los compuestos evaluados. Por otra parte la morfología celular fue analizada por microscopía de contraste de fases.

A partir de los datos obtenidos en estos bioensayos, se calcularon tres parámetros:

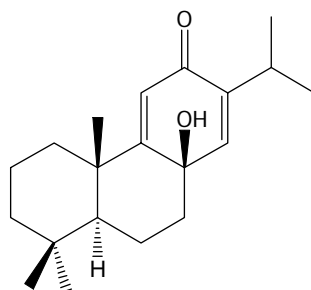
GI₅₀ : La concentración necesaria para reducir en un 50 % el crecimiento de las células tratadas comparada con las células sin tratamiento.

TGI : La concentración requerida para inhibir completamente el crecimiento de las células tratadas.

LC₅₀ : Es la concentración letal, es decir, la concentración que aniquila o mata el 50 % de células en tratamiento. Se determinó la capacidad antiproliferativa de 5 metabolitos secundarios frente a las líneas celulares de cáncer de ovario (A2780), cáncer de colon (WiDr), cáncer de pulmón no microcítico (SW1573), cáncer de mama hormonodependiente (T-47D), cáncer de mama (HBL-100) y cáncer cervical (HeLa). Los resultados se presentan en las **Tablas 3, 4, 5, 6 y 7**.

RESULTADOS OBTENIDOS.

Resultados de evaluación (por productos)



8-Hidroxi-9,13-abietadien-12-ona

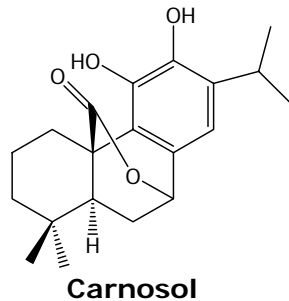
Línea celular	GI ₅₀	SD	TGI	SD	LC ₅₀	SD	# Exp
A2780	19	±3.8	52	±13	94	±10	6
SW1573	29	±2.3	99	±0.2	100	±0.0	5
WiDr	82	±31	100	±0.0	100	±0.0	3
HBL-100	26	±3.3	89	±1.9	100	±0.0	3
T-47D	83	±29	100	±0.0	100	±0.0	3
HeLa	27	-	91	-	100	-	1

Tabla 3. Actividad *in vitro* de 8-Hidroxi-9,13-abietadien-12-ona^a.

^a Resultados en unidades μM , y están representados entre 2 y 4 experimentos.

Los valores de los parámetros GI₅₀, TGI y LC₅₀, están dados si son menores a 100 μM .

SD. Desviación estándar



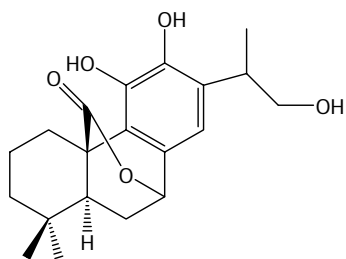
<i>Línea celular</i>	<i>GI₅₀</i>	<i>SD</i>	<i>TGI</i>	<i>SD</i>	<i>LC₅₀</i>	<i>SD</i>	<i># Exp</i>
A2780	3.5	±1.0	17	±13	61	±38	5
SW1573	10	±8.2	48	±40	100	±0.0	5
WiDr	25	±1.3	70	±7.2	100	±0.0	3
HBL-100	3.8	±0.4	16	±4.3	100	±0.0	3
T-47D	23	±2.8	55	±9.2	100	±0.0	3
HeLa	16	-	43	-	100	-	1

Tabla 4. Actividad *in vitro* de **Carnosol**^a.

^a Resultados en unidades μM , y están representados entre 2 y 4 experimentos.

Los valores de los parámetros GI_{50} , TGI y LC_{50} , están dados si son menores a 100 μM .

SD. Desviación estándar

**16-Hidroxicarnosol**

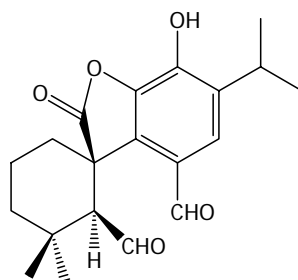
Línea celular	GI ₅₀	SD	TGI	SD	LC ₅₀	SD	# Exp
A2780	3.5	±0.5	9.9	±0.7	49	±5.4	3
SW1573	8.9	±5.0	47	±5	100	±0.0	5
WiDr	28	±1.2	88	±19	100	±0.0	3
HBL-100	3.6	±0.2	18	±4.0	93	±11	3
T-47D	34	±5.1	97	±4.6	100	±0.0	3
HeLa	30	-	75	-	100	-	1

Tabla 5. Actividad *in vitro* de **16-Hidroxicarnosol**^a.

^a Resultados en unidades μM , y están representados entre 2 y 4 experimentos.

Los valores de los parámetros GI₅₀, TGI y LC₅₀, están dados si son menores a 100 μM .

SD. Desviación estándar

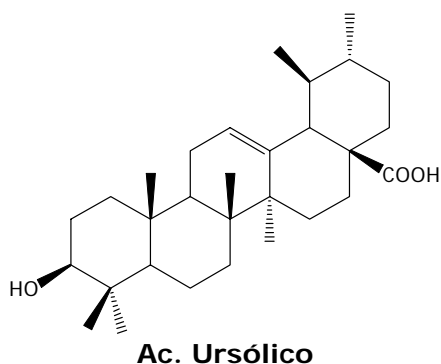
**Rosmadiol**

Línea celular	GI ₅₀	SD	TGI	SD	LC ₅₀	SD	# Exp
A2780	35	±2.5	91	±14	100	±0.0	3
HBL-100	25	±0.7	97	±14	100	±0.0	3

Tabla 6. Actividad *in vitro* de **Rosmadiol**^a

^a Resultados en unidades μM , y están representados entre 2 y 4 experimentos.

Los valores de los parámetros GI₅₀, TGI y LC₅₀, están dados si son menores a 100 μM .



<i>Línea celular</i>	<i>GI₅₀</i>	<i>SD</i>	<i>TGI</i>	<i>SD</i>	<i>LC₅₀</i>	<i>SD</i>	<i># Exp</i>
SW1573	12	-	33	-	88	-	1

Tabla 7. Actividad *in vitro* **Ac. Ursólico**^a

^a Resultados en unidades μM , y están representados entre 2 y 4 experimentos.

Los valores de los parámetros GI_{50} , TGI y LC_{50} , están dados si son menores a 100 μM .

SD. Desviación estándar

DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Como puede observarse en los resultados obtenidos, se muestra que la línea celular de cáncer de colon (WiDr), fue la menos sensible con respecto a las otras frente a los compuestos ensayados. Por otro lado se observó menor resistencia por parte de las líneas de de cáncer de ovario (A2780) y de cáncer de mama (HBL-100) frente a los metabolitos ensayados. Estos resultados son coherentes con los valores de actividad antiproliferativa obtenidos para agentes anticancerígenos convencionales. De una manera general la línea de colon es más resistente que las células de ovario y mama.

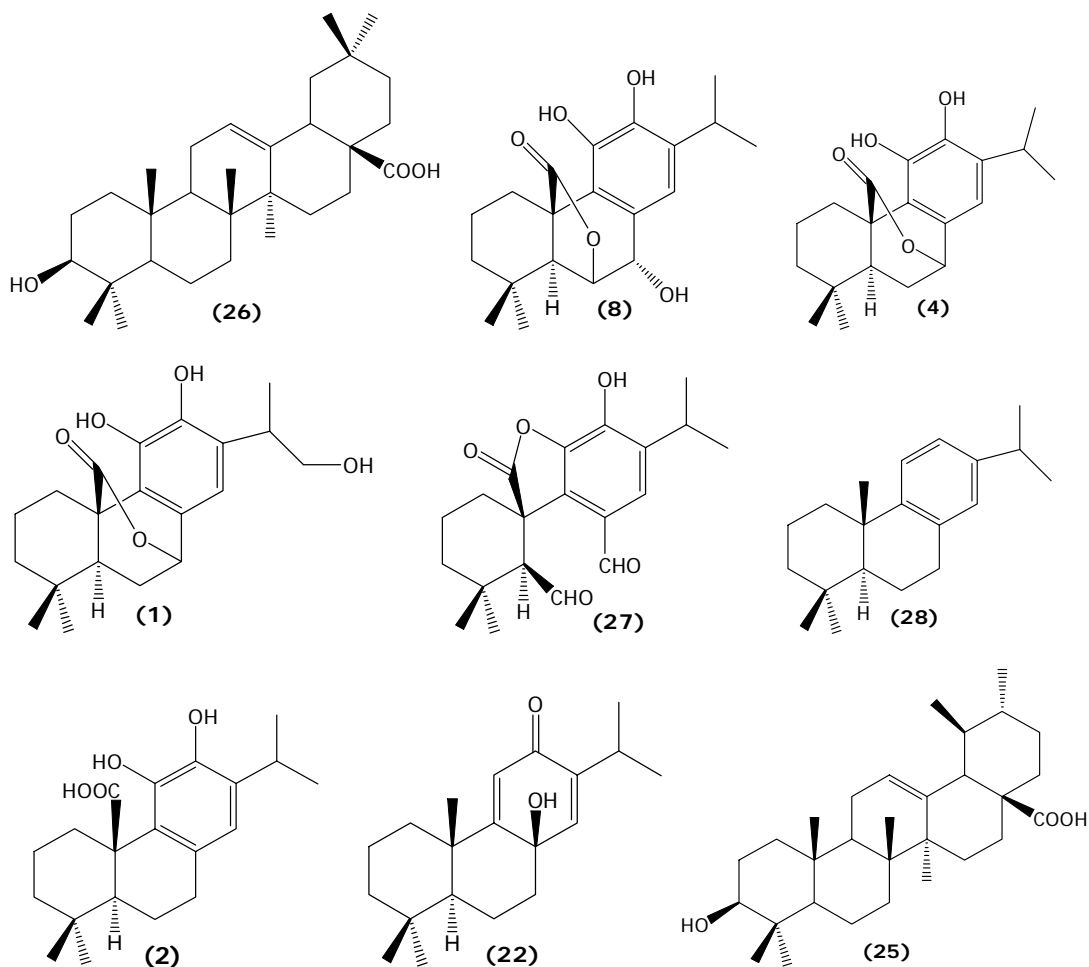
Se encontró una analogía entre el comportamiento de respuesta con **carosol** y **16-hidroxicarosol**; ambos mostraron resultados semejantes frente a las células cancerosas utilizadas.

Aunque fueron solo pocos los compuestos evaluados, los resultados obtenidos de **carosol** y **16-Hidroxicarosol**, nos indican que deberíamos plantear la formación de análogos a estos diterpenos, principalmente con la presencia de un sistema fenólico en el anillo "C" y lactonizado en el núcleo "B", para estudiar la respuesta biológica y poder determinar que factores estructurales determinan la bioactividad.

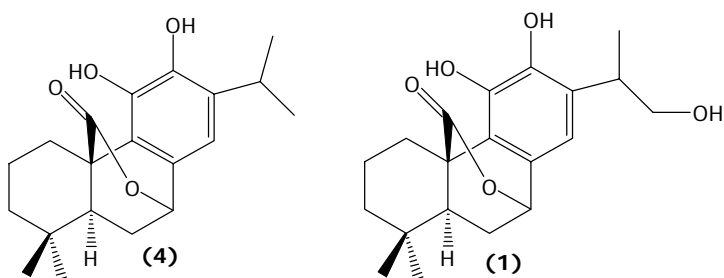
CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- Mediante los resultados fitoquímicos y biológicos obtenidos en esta tesis, se confirma la gran importancia que tienen las plantas del genero *Salvia* como fuentes potenciales de nuevos principios activos.
- De la evaluación fitoquímica de la parte aérea de *S. clevelandii* se lograron aislar los metabolitos secundarios: **ácido ursólico (25)**, **ácido oleanólico (26)**, **rosmanol (8)**, **carnosol (4)**, **16-hidroxycarnosol (1)**, **abieta-8,11,13-trieno (28)**, **ácido carnósico (2)**, **rosmadial (27)** y **8β-hidroxi-9,13-abietadien-12-ona (22)**. Todos ellos fueron productos naturales conocidos ya, en la literatura científica.



- Todos los compuestos fueron purificados a través de diferentes métodos cromatográficos, y elucidados correctamente mediante técnicas espectroscópicas de resonancia magnética nuclear, infrarroja, ultravioleta y espectrometría de masas.
- Se analizó la actividad antitumoral de los productos naturales aislados de *S.clevelandii* frente a las líneas celulares de cáncer de ovario (A2780), cáncer de colon (WiDr), cáncer de pulmón no microcítico (SW1573), cáncer de mama hormonodependiente (T-47D), cáncer de mama (HBL-100) y cáncer cervical (HeLa). De los metabolitos estudiados los más activos fueron los diterpenos **carosol (4)** y **16- hidroxicarosol (1)**.



- La línea de cáncer de ovario (A2780) fue la más sensible frente a los compuestos ensayados, y las que presentaron mayor resistencia fueron las de cáncer de colon (WiDr) y las células cancerosas de mama hormonodependiente (T-47D).
- Finalmente con estos resultados se establece, que el sistema fenólico del anillo "c" y la lactona formada entre las posiciones 10 y 7 del núcleo central de estos diterpenos, fueron posiblemente los responsables de la actividad observada. Sin embargo, es importante realizar en el futuro mayores estudios de estructura-actividad biológica,

con otra serie de metabolitos diterpénicos y/o con análogos semisintéticos de estos, para poder así, establecer que elementos estructurales son determinantes en la respuesta biológica que estos compuestos presentan.

APÉNDICES

TÉCNICAS EXPERIMENTALES

TÉCNICAS EXPERIMENTALES

INSTRUMENTACIÓN

Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Espectros de RMN ^1H , ^{13}C y DEPT. Se realizaron en el espectrómetro BRUKER AVANCE 300 (300 MHz), utilizando CDCl_3 como disolvente y con TMS como referencia interna. Los valores de desplazamiento químico (δ), se expresan en ppm y los de las constantes de acoplamiento (J), se expresan en Hz.

Espectroscopía Infrarroja

Los espectros de IR, fueron realizados en un espectrofotómetro BRUKER IFS 55/28 (FTIR), en pastillas de NaCl donde los valores de ν están expresados en cm^{-1} .

Espectroscopía Ultravioleta

Los espectros de UV se efectuaron en un espectrofotómetro JASCO V-560, en una celda de cuarzo de 5mm. Como disolvente se empleó EtOH. Los valores de λ se expresan en nm.

Espectrometría de Masas de baja resolución

Los espectros de masas de baja resolución se realizaron en un espectrómetro VG MICROMASS ZAB-2F.

Espectrometría de Masas de alta resolución

La determinación de fórmulas moleculares de fragmentos e iones moleculares fueron realizados en un espectrómetro VG MICROMASS ZAB-2F (a potenciales de ionización de 15 o 70eV).

Rotación óptica

La determinación de la actividad óptica se realizó en un polarímetro PERKIN ELMER, modelo 241, usando la línea D del sodio, a 25°C y en disolución de CHCl₃ seco en células de 1dm. La concentración está expresada en gr/100mL de disolución.

Puntos de fusión

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato BUCHI modelo 535. Los datos se expresan en grados centígrados y están sin corregir.

TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS**Cromatografía en capa fina**

Las cromatografías en capa fina fueron realizadas sobre cromatofolios de gel de sílice tipo G, con indicador de luminiscencia a 254nm, SCHLEICHER & SCHUELL, F-1500/LS 254. Las placas se revelaron con oleum (solución formada por 4% de H₂SO₄, 80% de CH₃COOH y 16% H₂O) o con KMnO₄ acuoso (disolución de menos del 2%) y posterior calentamiento a 120°C durante unos minutos.

Cromatografía en capa fina preparativa

Se usaron placas de 1mm de espesor de la casa SCHLEICHER & SCHUELL, tipo G 1510/LS 254, sembrándose entre 40 y 50mgr de producto en cada una de ellas. La detección de los productos en las placas se hizo usando una lámpara de luz ultravioleta.

Cromatografía en columna

Para las columnas secas y húmedas se empleó gel de sílice 0.063-0.200mm de diámetro de la casa MERCK. También para las columnas húmedas se usó SEPHADEX LH-20 de la casa PHARMACIA FINE CHEMICALS.

Las columnas cromatográficas secas se montaron introduciendo lentamente la gel de sílice por el extremo superior de la columna y aplicando posteriormente vacío por el extremo inferior.

Las columnas cromatográficas húmedas se montaron preparando una suspensión del gel de sílice en el disolvente, vertiendo esta suspensión por la parte superior de la columna y aplicando presión.

Las columnas cromatográficas húmedas de SEPHADEX LH-20 se montaron de la siguiente manera: la cantidad de SEPHADEX deseada se dejó en suspensión con metanol (1gr para 4.1ml) durante al menos 24h y se vertió en la columna dejándola reposar. La columna se estabilizó haciendo pasar una cantidad de mezcla eluyente igual a tres veces el volumen de la columna. La mezcla empleada como eluyente fue *n*-Hexano:CH₂Cl₂:MeOH (2:1:1). La muestra a cromatografiar, previamente filtrada, se colocó en la parte superior de la columna disuelta en una cantidad de eluyente no superior al 5% del volumen de la columna.

Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

El aislamiento y purificación de algunos productos se llevó a cabo mediante el empleo de un cromatógrafo de HPLC, equipado con una bomba JASCO PU-980 y un detector JASCO UV-975. Se empleó una columna Kromasil 100 de 10x250 mm rellena

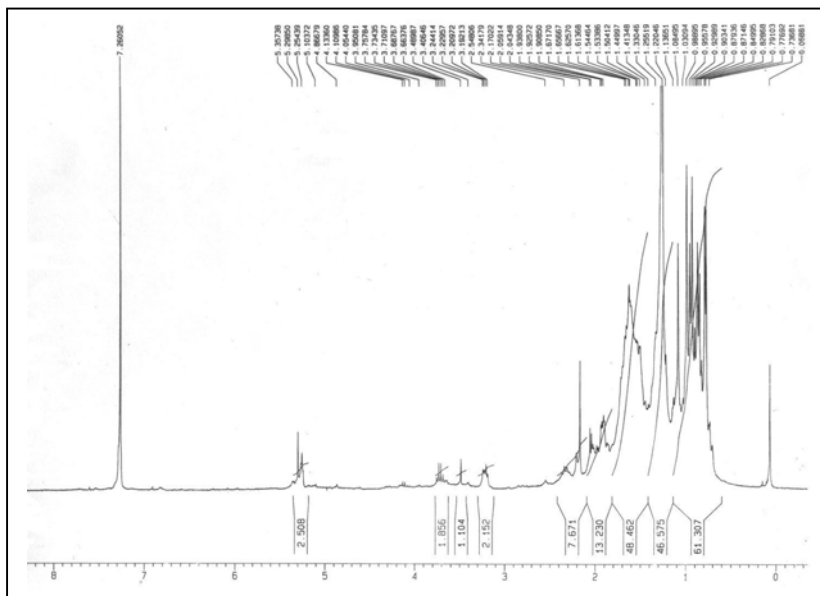
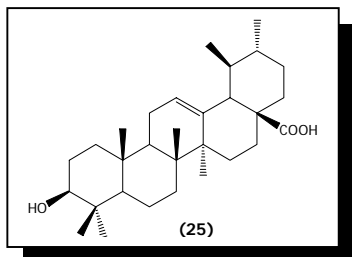
de gel de sílice con tamaño de partícula de 5 μ m. Para las mezclas eluyentes se emplearon disolventes purificados y filtrados en nuestro laboratorio.

DISOLVENTES

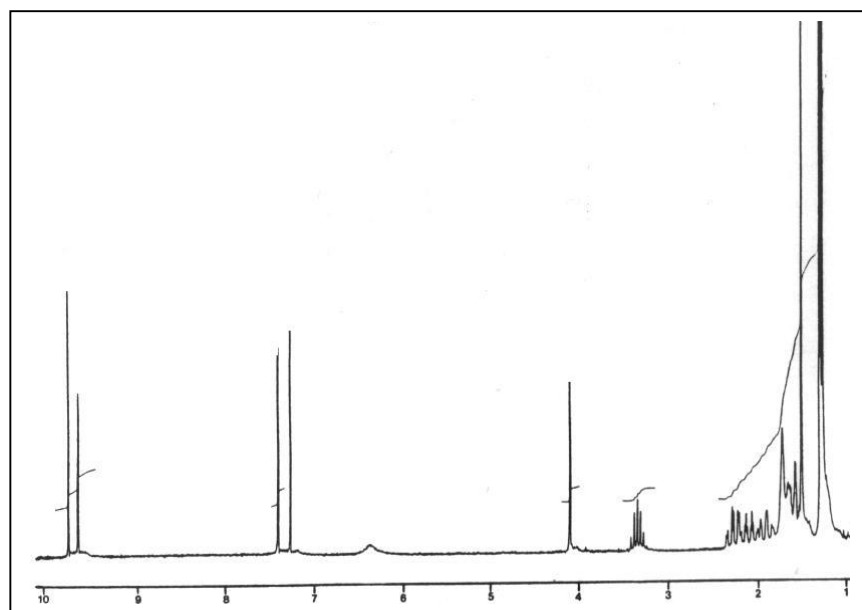
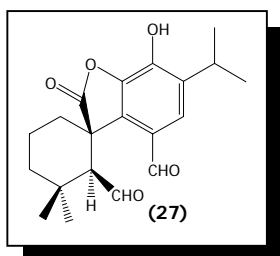
Los disolventes fueron secados y destilados empleando métodos estándar y siempre bajo atmósfera de nitrógeno o argón. El tetrahidrofurano (THF) y el éter dietílico se secaron a reflujo sobre sodio metálico y posteriormente fueron destilados. El diclorometano, libre de metanol, se secó a reflujo sobre hidruro cálcico y después fue destilado.

SELECCIÓN DE ESPECTROS

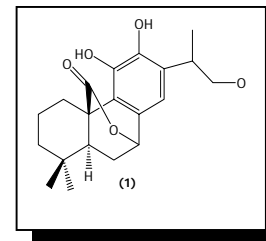
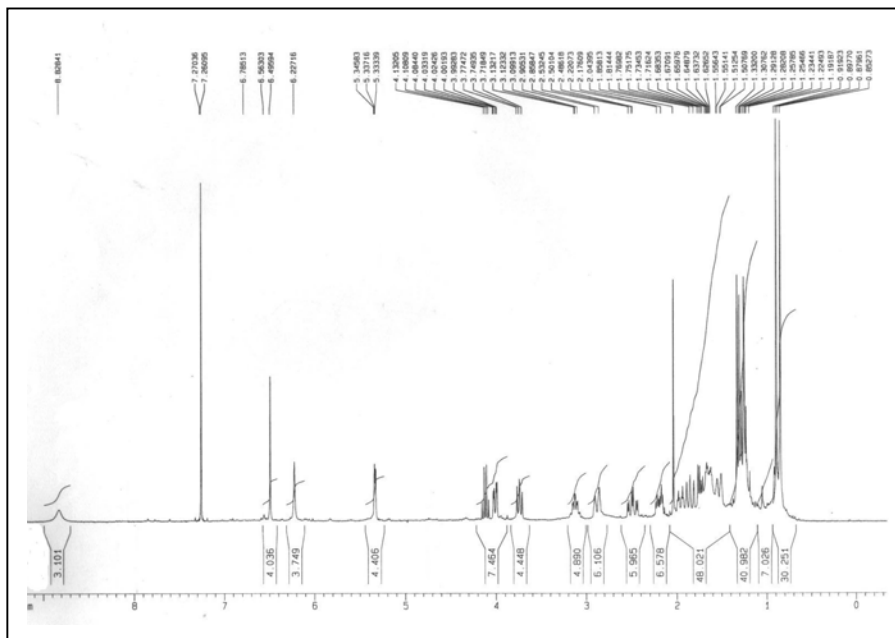
RMN ¹H (CDCl₃)



RMN ¹H (CDCl₃)



RMN ¹H (CDCl₃)



***ABREVIATURAS
Y ACRÓNIMOS***

Abreviaturas y acrónimos

$[\alpha]_D^{20}$	rotación específica
μL	microlitro
μM	micromolar
AcOEt	acetato de etilo
AcOH	ácido acético
$^{\circ}\text{C}$	grados centígrados
CDCl_3	cloroformo deuterado
CH_2Cl_2	dicloroetano
CHCl_3	triclorometano
cm	centímetros
d	doblete
DC	dicroísmo circular
DMSO	dimetil sulfoxido
EM	espectroscopia de masas de baja resolución
Et_2O	éter etílico
EUA	Estados Unidos de América
g	gramos
GTP	guanosina 5' - trifosfato
h	horas
HeLa	línea celular de cáncer cervical conocida como "Helen Lane"
I.C.I.C.	Instituto Canario de Investigación del Cáncer
IR	infrarrojo
m	metros
m/z	relación masa carga en EM

M ⁺	masa del ión molecular
Me ₂ CO	acetona
MeOH	metanol
mg	miligramos
min	minutos
mL	mililitros
mm	milímetros
NaCl	cloruro de sodio
NCI	Nacional Cancer Institute
nm	nanometros
OMS.	Organización mundial de la salud
p/v	peso/volumen
PF	punto de fusión
q	cuarteto
RMN ¹³ H	resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹ H	resonancia magnética nuclear de protón
s	singulete
SIDA	síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SNC	sistema nervioso central
SRB	Sulfurodamida B
Ssp.	especies
t	triplete
UV	ultravioleta
δ	desplazamiento químico en ppm
λ _{max}	longitud de onda máxima

ÍNDICE DE PRODUCTOS

ÍNDICE DE PRODUCTOS

Productos	R y D	P.E	E
Ácido ursólico (25)	51	--	73
Ácido Oleanólico (26)	46	--	72
Carnosol (4)	47	41	71
16-Hidroxicarnosol (1)	48	38	74
Rosmanol (8)	46	42	71
8 β -Hidroxi-9,13-abietadien-12-ona (22)	51	43	--
Ácido carnósico (2)	50	41	72
Rosmadial (27)	49	39	73
Abieta-8,11,13-trieno (28)	49	40	--

R y D: *Resultados y discusión*

P.E: *Parte experimental*

E: *Espectro*

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE TABLAS		Pag.
Tabla 1.- Algunos medicamentos representativos obtenidos a partir de plantas.....		7
Tabla 2.- Algunos fármacos sintetizados usando moléculas naturales como modelos.....		14
Tabla 3. Actividad <i>in vitro</i> de 8-Hidroxi-9,13-abietadien-12-ona.....		59
Tabla 4. Actividad <i>in vitro</i> de Carnosol.....		60
Tabla 5. Actividad <i>in vitro</i> de 16-Hidroxycarnosol.....		61
Tabla 6. Actividad <i>in vitro</i> de Rosmadial.....		61
Tabla 7. Actividad <i>in vitro</i> Ac. Ursólico.....		62

ÍNDICE DE ESQUEMAS

ÍNDICE DE ESQUEMAS

	Pag.
Esquema 1. Generación de Carnosol (4) a partir de ácido carnósico (2)	26
Esquema 2. Reacciones biosintéticas para la generación de diterpenos.....	28
Esquema 3. Generación de criptotanshinona mediante la participación de oxígeno en su estado singulete.....	30
Esquema 4. Obtención de criptotanshinona a partir de 4(14),15-isopimaradieno....	31