

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERA



“ESTUDIO FITOQUÍMICO BIODIRIGIDO DE LA RAÍZ DE *SALVIA CLEVELANDIF*”

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA

LAURA JANETH DÍAZ RUBIO

TIJUANA B.C.

MARZO DEL 2013

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

Tijuana, Baja California
Marzo de 2013

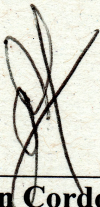
C. LAURA JANETH DIAZ RUBIO
Pasante de Químico Farmacobiólogo
Presente

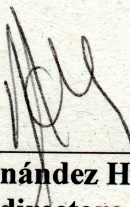
El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción TESIS

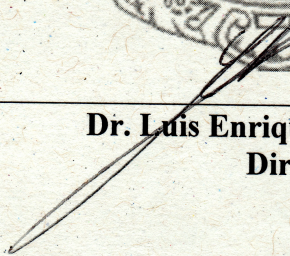
es propuesto por el **DR. IVAN CORDOVA GUERRERO** quiénes serán responsables de la calidad de trabajo que usted presenta, referido al tema:

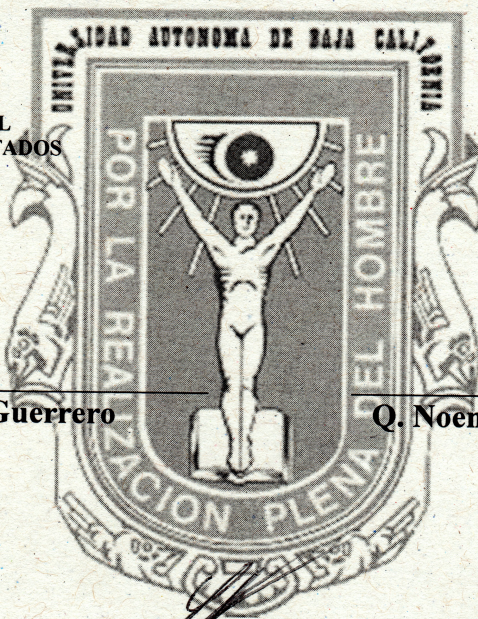
“Estudio Fitoquímico Biodirigido de la Raíz de *Salvia clevelandii*”, el cual deberá desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I.- INTRODUCCION
- II.- ANTECEDENTES
- III.- PARTE EXPERIMENTAL
- IV.- DISCUSION DE RESULTADOS
- V.- CONCLUSIONES
- VI.- BIBLIOGRAFIA


Dr. Ivan Cordova Guerrero
Asesor


Q. Noemí Hernández Hernández
Subdirectora


Dr. Luis Enrique Palafox Maestre
Director



***“Las ciencias tienen las raíces
amargas, pero dulces los frutos”***
Aristóteles

Dios

Por la oportunidad de cada mañana poder abrir los ojos a un nuevo día, por darme la bendición de tener en mi vida a personas maravillosas que hacen de mi existencia algo hermoso por el simple hecho de que ellas están aquí a mi lado.

Por los retos que me has puesto en el pasado, los que me encuentro viviendo día con día y los que faltan, que espero sean muchos, ya que sin ellos no podemos quedarnos con una enseñanza de vida, la cual podemos transmitir a nuevas generaciones.

Por las oportunidades personales, laborales y de superación profesional que me has puesto en el camino, gracias por inspirarme para poder tomar el camino adecuado y aprovechar al máximo esas oportunidades que me preparas.

Mi familia

A mis papas, gracias a ustedes son quien soy, y cualquier logro en mi vida es también de ustedes, gracias por todos los valores inculcados, por enseñarme que la mejor manera de salir adelante es forjándose un camino en el estudio, por siempre estar a mi lado dándome su apoyo y amor incondicional, los cuales me han permitido llegar a donde me encuentro ahora, por esa fuerza que ustedes me brindan y el me deseo de nunca rendirme y siempre seguir adelante.

Doctor Iván Córdova

Por sus palabras de aliento, sus regaños, por todos los consejos, tanto profesionales como personales, definitivamente usted es un ejemplo a seguir, una excelente persona, muy admirable ya que a pesar de todos los golpes que le ha dado la vida, me ha tocado ver como usted sabe levantarse con la frente en alto y nos ha transmitido todas esas enseñanzas y las que faltan, gracias por eso y muchas cosas más.

Por transmitirnos esa pasión que usted tiene por lo que hace y ese amor por la investigación, camino por el cual quiero seguir por mucho tiempo más y lo más

importante, por la confianza depositada en mí al permitirme ser parte de su grupo de trabajo y poner en mis manos este proyecto.

A mis maestros.

Por las clases impartidas durante toda mi carrera, las cuales fueron decisivas para poder encontrar este camino que actualmente sigo y en el cual quiero seguir adelante.

En especial al profesor Mario Ramírez por su apoyo en todas mis locuras de estudiante, gracias por esas largas horas en el laboratorio de farmacognosia, sin lugar a dudas, rindieron fruto ya que ahí comenzó y se reafirmó el gusto por esta área de la investigación.

A mis amigos

Por los momentos de convivencia, locura, diversión y por supuesto, los de estudio, siempre estarán en mi corazón y en mi memoria.

Al Laboratorio de Investigación Química de Productos Naturales

Gracias a todos mis compañeros de trabajo, que ya han pasado de ser compañeros a mis amigos y hermanos, ha sido una experiencia maravillosa conocerlos y compartir con ustedes tantos sentimientos, desde los personales hasta los logros profesionales obtenidos en este laboratorio.

Por toda la ayuda que me brindaron para la realización de este proyecto que tan mío como como de ustedes porque todos formamos parte de este maravilloso equipo de trabajo, gracias Eduardo, Karina, Mayra, Lupita y Lucy.

Rubén Rodríguez.

Por estar siempre a mi lado apoyándome a realizar mis sueños, impulsarme a seguir adelante y desarrollarme como la profesional e investigadora que quiero ser.

RESUMEN



En la presente investigación se muestran estudios *in vitro* de fracciones obtenidas a partir de un extracto etanólico de la raíz de *Salvia clevelandii* (planta endémica de Baja California), tanto antioxidantes como antimicrobianos. A partir de los resultados de estos estudios biológicos, se realizaron estudios fitoquímicos preliminares con el aislamiento biodirigido de metabolitos secundarios de dicha raíz.

En las generalidades se presentan hallazgos históricos fundamentales para la comprensión de la importancia de la fitoquímica en la supervivencia humana, y un poco sobre cómo ha ido evolucionando la utilización de las plantas por el ser humano, incluyendo el uso etnobotánico de las raíces. También se muestra la importancia de las actividades biológicas encontradas en una gran variedad de metabolitos secundarios aislados de plantas del género *Salvia* y un gran número más aislados de diversos géneros de la familia *Lamiaceae*, entre estos compuestos podemos encontrar los antioxidantes como prevención para enfermedades y los que puedan combatir agentes patógenos para los seres humanos.

La metodología se encuentra dividida en varias secciones donde podemos encontrar la metodología de obtención de las fracciones, las metodologías empleadas en el estudio fitoquímico preliminar para la obtención de los metabolitos secundarios por medio de cromatografía, muestra los diversos ensayos biológicos empleados para monitorear las actividades antioxidantes y antimicrobianas de las fracciones. Las técnicas empleadas fueron decoloración oxidativa del β -caroteno, reducción del radical DPPH, inhibición de la enzima xantina oxidasa, evaluación antibacteriana y evaluación anti fúngica y la determinación de fenoles totales y por último la metodología para la realización de las pruebas colorimétricas.

Finalmente encontraremos los resultados obtenidos así como sus discusiones y conclusiones obtenidas.

Índice de Figuras.....	i
Índice de Tablas.....	iii
Índice de esquemas.....	iv
Índice de Anexos.....	v
Abreviaturas y Acrónimos.....	vi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS.....	6
3. OBJETIVO GENERAL Y PARTICULARES.....	7
4. GENERALIDADES	
4.1. FAMILIA LAMIACEAE Y EL GÉNERO SALVIA	
4.1.1. Familia <i>Lamiaceae</i>.....	8
4.1.2. Género <i>Salvia</i>.....	9
4.1.3. Estudios sobre el género <i>salvia</i> en México.....	11
4.2. VEGETACIÓN EN BAJA CALIFORNIA	
4.2.1. Vegetación en Baja California.....	13
4.2.2. Región californiana o mediterránea.....	14
4.2.3. Familia <i>Lamiacea</i> y <i>salvia</i> en Baja California.....	16
4.3. METABOLITOS SECUNDARIOS DE ESPECIES VEGETALES	
4.3.1. Química de productos naturales.....	18
4.3.2. Identificación de metabolitos secundarios.....	20
4.4. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LAS RAÍCES EN LA BIOSÍNTESIS DE METABOLITOS	

4.4.1. Fisiología de la raíz.....	21
4.4.2. Estructura de la raíz.....	22
4.4.3. Metabolismo en las plantas.....	23
4.4.4. Metabolismo en la raíz.....	25
4.4.5. Estudios previos sobre raíces.....	26
4.5. ESTUDIOS FITOQUÍMICOS DE SALVIAS	
4.5.1. Estudios fitoquímicos de la familia <i>Lamiaceae</i>	27
4.5.2. Estudios fitoquímicos de salvias.....	27
4.5.3. Estudios previos de <i>Salvia clevelandii</i>	30
5. MATERIALES Y MÉTODOS	
5.1. RECOLECCIÓN E IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA.....	32
5.2. GENERACIÓN DE EXTRACTOS.....	33
5.3. SCREENING FITOQUÍMICO PRELIMINAR (PRUEBAS COLORIMÉTRICAS).....	37
5.4. AISLAMIENTO DE METABOLITOS SECUNDARIOS.....	47
5.5. EVALUACIÓN QUÍMICA Y BIOLÓGICA <i>IN VITRO</i> DE EXTRACTOS	
5.5.1. Análisis cuantitativo de compuestos polifenólicos totales.....	50
5.5.2. Análisis cuantitativo de flavonoles.....	52
5.5.5. Actividad antioxidante por la técnica de reducción del DPPH.....	53
5.5.6. Actividad antioxidante mediante el método de la decoloración oxidativa del β -caroteno.....	55
5.5.4. Inhibición de la enzima xantina oxidasa.....	56
5.5.2. Actividad antibacteriana.....	59

5.5.3. Actividad antifúngica.....	59
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	
6.1. ANÁLISIS DEL SCREENING FITOQUÍMICO.....	63
6.2. RESULTADOS DE LAS EVALUACIONES BIOLÓGICAS Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	65
6.3. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS METABOLITOS AISLADOS.....	73
7. CONCLUSIONES.....	77
8. BIBLIOGRAFÍA.....	78
9. APÉNDICE.....	
9.1. ANEXOS.....	
9.2. TÉCNICAS EXPERIMENTALES.....	

ÍNDICE DE FIGURAS



Figura 1. Indígenas mexicanos trabajando.....	1
Figura 2. Chamanes mexicanos practicando la medicina.....	3
Figura 3. Planta del género <i>Salvia</i>	5
Figura 4. Alusión a la medicina natural.....	8
Figura 5. <i>Mentha arvensis</i> , familia <i>Lamiaceae</i>	9
Figura 6. <i>Salvia officinalis</i>	10
Figura 7. Ecoregiones de la península de Baja California.....	14
Figura 8. Distribución de clima mediterráneo en el mundo.....	15
Figura 9. Chaparral.....	16
Figura 10. Árbol de barbasco y cabeza de negro. Productos naturales base de esteroides.....	18
Figura 11. Cocaína, atropina y morfina (respectivamente). Alcaloides importantes en la industria farmacéutica.....	19
Figura 12. Quinina y taxol (respectivamente). Compuestos químicos importantes de origen vegetal.....	19
Figura 13. Equipo de resonancia magnética nuclear.....	20
Figura 14. Morfología externa de la raíz y su entorno.....	21
Figura 15. Morfología interna de la raíz.....	23
Figura 16. Elementos básicos del metabolismo primario y en relación con el metabolismo secundario de las plantas.....	24
Figura 17. <i>Salvia clevelandii</i>	31
Figura 18. Lugar de recolección de la planta.....	32

Figura 19. Raíz seca y triturada.....	33
Figura 20. Maceración etanólica de a raíz de <i>Salvia clevelandii</i>	34
Figura 21. Obtención de los tres extractos de la raíz.....	36
Figura 22. Cambio de coloración en diferentes medios.....	43
Figura 23. Desarrollo de la cromatografía preparativa (CP) con el extracto de RSCA.....	48
Figura 24. Principales bandas para separacion.....	49
Figura 25. Productos de la CP.....	49
Figura 26. Reacción de flavonoles con cloruro de aluminio.....	52
Figura 27. Reducción del radical DPPH.....	53
Figura 28. Actividad antioxidante por el método de DPPH.....	68
Figura 29. Bacterias utilizadas en los ensayos antimicrobianos.....	69
Figura 30. Principales bandas para separación.....	73
Figura 31. 17- hidroxí- criptotanshinona.....	76

ÍNDICE DE TABLAS



Tabla 1. Taxa San Pedro Mártir (Delgadillo Rodríguez, 2004).....	17
Tabla 2. Mililitros utilizados para redissolver el extracto.....	35
Tabla 3. Fracciones obtenidas.....	35
Tabla 4. Pruebas colorimétricas realizadas.....	38
Tabla 5. Especificaciones de espectrofotometría para cada organismo.....	61
Tabla 6. Resultados de las pruebas fitoquímicas preliminares.....	63
Tabla 7. Resultados técnicas de fenoles y flavonoles.....	65
Tabla 8. Resultados técnicas actividad antioxidante por los métodos de β -caroteno y DPPH.....	66
Tabla 9. Resultados ensayos antimicrobianos.....	68
Tabla 10. Resultados ensayos antifúngicos.....	70
Tabla 11. Resultados ensayos inhibición de la enzima xantina oxidasa.....	72
Tabla 12. Miligramos de producto obtenido en la CP.....	73
Tabla 13. Asignación de señales para protón.....	74
Tabla 14. Asignación de señales para carbono.....	75

ÍNDICE DE ESQUEMAS



Esquema 1. Esquema de la acción metabólica de la xantina oxidasa.....57

ÍNDICE DE ANEXOS



ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS



°C	Grados centígrados
Ac	Absorbancia de la muestra control
Ac ⁰	Absorbancia de la muestra a 0 minutos.
Ac ¹²⁰	Absorbancia de la muestra a 120 minutos.
AcOEt	Acetato de etilo
Am	Absorbancia de la muestra.
Am ⁰	Absorbancia de la muestra a 0 minutos.
Am ¹²⁰	Absorbancia de la muestra a 120 minutos.
ATCI	Yoduro de acetilcolina
B.C	Baja California
cm	Centímetro
cm ³	Centímetros cúbicos
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	Dipicril fenil hidrazilo (por sus siglas en inglés)
DTNB	Ácido-5,5-ditio-2-nitrobenzoico
EM	Espectrometría de masas
EM-CG	Espectrometría de masas- cromatografía de gases
etc.	Etcétera
EtOH	Etanol
g	gramo
HCl	Ácido clorhídrico
IC50	Concentración media inhibitoria
IR	Infrarrojo
Kg	Kilogramo
L	Litro
M	Molar
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
NaOH	Hidróxido de sodio

nm	Nanómetros
pH	Potencial de hidrógeno
RMN	Resonancia magnética nuclear
t	Tiempo
UABC	Universidad Autónoma de Baja California
UV	Ultravioleta
v/v	Volumen/volumen
Vol.	Volumen
y col.	Y colaboradores
β	Beta
μg	Microgramos
μM	Micromolar
μL	Microlitro
RSCH	Raíz <i>Salvia clevelandii</i> hexano
RSCA	Raíz <i>Salvia clevelandii</i> acetato de etilo
RSCM	Raíz <i>Salvia clevelandii</i> metanol
p. ej.	Por ejemplo
CMI	Concentration minima inhibitoria
N	Norte
O	Oeste
Mm	Milímetros

INTRODUCCIÓN



Historia de las plantas medicinales.

Las plantas medicinales han formado parte importante de la historia y cultura de los pueblos indígenas. El uso y aplicaciones para el remedio de enfermedades, constituye un conocimiento que se transmite en forma oral de generación en generación.

Antes de la llegada de los conquistadores existía en México una gran riqueza de medicina tradicional practicada por muchos grupos indígenas.



Figura 1. Indígenas mexicanos trabajando

Los indígenas poseían un amplio conocimiento sobre los vegetales y yerbas medicinales, así como también de la anatomía del cuerpo humano. Lo que les permitió curar con certeza muchas de las enfermedades que se presentaban.

A la curación con yerbas se agregaron los minerales de animales que poseían propiedades curativas. La forma de administrar sus medicamentos, era mediante cocimientos, aceraciones, emplastos, polvos secos, aceites, etc., muchas veces acompañados de conjuros, mandas, rezos o limpiezas.

La aplicación de la medicina dependía del tipo de enfermedad que se atendía, es decir, los curanderos estaban ubicados por especialidades: médicos, cirujanos, parteras, yerberos, hueseros, sobadores, etc.

Todos estos eran llamados "médicos verdaderos" porque conocían la medicina que curaba. Existían además otro tipo de médicos, los falsos quienes se burlaban, ocultaban sus conocimientos y mataban a la gente con medicinas,

eran los nahuales, hechiceros o brujos (Irais Cosme Pérez, revista intercultural, enero 2008).

Cuando los españoles llegaron a nuestro país se quedaron admirados de los conocimientos y habilidades que tenían los indígenas sobre la curación de las enfermedades. Sin embargo, la forma tradicional de curar se vio limitada e influenciada por la medicina europea.

Los españoles en su afán de conquista y en su desconocimiento hacia este tipo de medicina, prohibieron algunas formas de curación por considerarlas mágicas y supersticiosas.

La medicina española introdujo nuevas formas de curación y la incorporación de otras plantas como la manzanilla, el romero, la sábila y el albácar, hoy en día muy utilizadas por los pueblo indígenas.

En este momento el estudio científico de las plantas medicinales es ya una preocupación de varias instituciones y existen investigadores que consideran la herbolaria como una alternativa útil para resolver algunos problemas de salud.

Si bien la humanidad ha utilizado las plantas para curarse durante toda su historia, la incidencia de los productos de origen vegetal en la terapéutica ha variado a lo largo de los tiempos, de acuerdo con los avances del conocimiento científico tanto sobre estos productos como sobre las demás herramientas terapéuticas.

Históricamente los productos de origen vegetal han pasado de tener un papel hegemónico en el arsenal terapéutico occidental a un discreto segundo plano, para volver a tener, en las últimas décadas, una presencia cada vez mayor.

Según otros autores, en Norteamérica más de un tercio de la población consume plantas medicinales (Mendoza Patiño N y Figueroa-Hernández JL. Herbolaria. Rev Fac Med UNAM 48(6), 248-249, 2006).

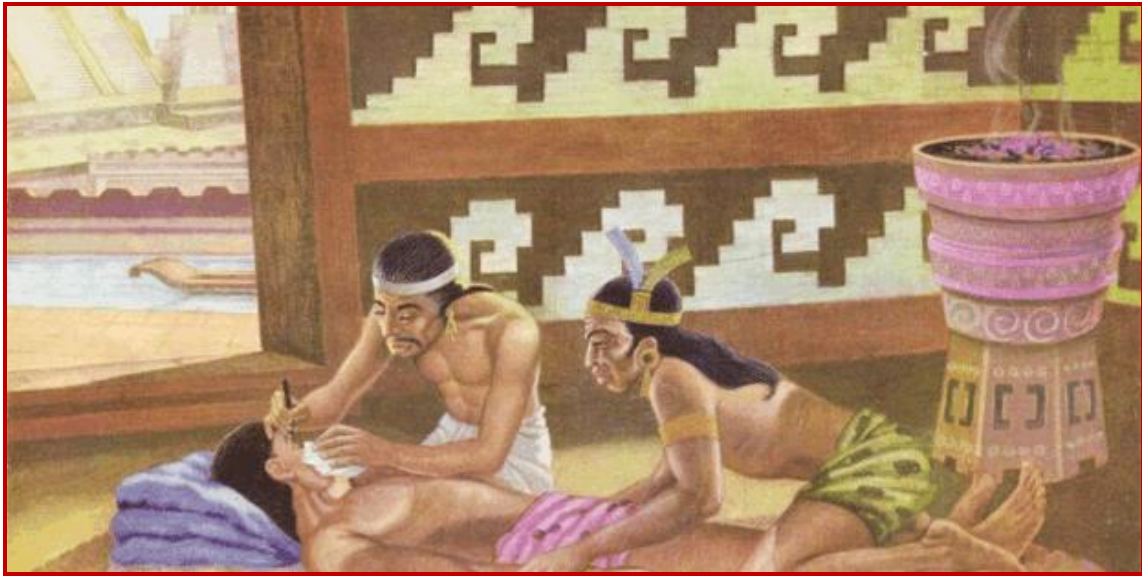


Figura 2. Chamanes mexicanos practicando la medicina

El comercio de las plantas medicinales.

En el mercado mundial, el 50% de las plantas son usadas en alimentación humana, 25% en cosmética, 20% en la industria farmacéutica y un 5% en otros rubros.

Se estima que en el mundo se utilizan unas 10.000 especies vegetales como medicinales, en su mayor parte en sistemas de medicina tradicional.



México, en especial, tiene una riquísima variedad de plantas medicinales, con un total que asciende a casi 10,000 especies distintas y muchas de ellas se usan tradicionalmente como remedios caseros.

Los mercados mexicanos son unos de los pocos legados culturales de la temprana posconquista de México (Bye y Linares, 1987), donde aún se puede encontrar una amplia diversidad de plantas medicinales procedentes de varias partes del país. La venta de plantas en los mercados fortalece las interacciones y relaciones entre la gente y los vegetales, ya que los mercados son una fuente de información de especies útiles de plantas mexicanas (Bye y Linares, 1983).

Si bien se han realizado estudios sobre plantas medicinales en mercados (Senties, 1984; García, 2002; Martínez–Moreno y col., 2006), ninguno ha estudiado específicamente las raíces con perfil farmacológico en México. Se incluyen raíces en los estudios de Bye y Linares (1987, 1990) y Linares y col. (1988), así como datos acerca de las raíces con actividad medicinal en mercados de Venezuela, Brasil y Paraguay, se han publicado por Gil y col. (2003), Almeida y col. (2006) y Basualdo y col. (1991).

En el Instituto de Química y la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México se ha investigado la fitoquímica y su relación con el tipo de uso de algunas raíces con aplicación medicinal. Ejemplos *son los realizados con la familia Asteraceae, Roldana sessilifolia* (Hook. & Arn, Robins. & Brett.) Cuyo rizoma es muy utilizado (con el de otras plantas) como té contra la esterilidad femenina (Delgado y col., 1991); *Iostephane heterophylla*, los rizomas son usados en cataplasmas para curar heridas e inflamaciones y para problemas artríticos y reumáticos (Aguilar y col., 1993).

Usos de las salvias en la medicina tradicional mexicana.

Diversas especies del género salvia se utilizan etnobotánicamente en diferentes estados del país (con diferentes nombre comunes) para el tratamiento de hinchazones, espasmos, vomito, dolores reumáticos, etc.

En Baja California, diversas especies se utilizan en el Valle de Guadalupe y Ensenada como un cocimiento o té para tratar la tos y gripe (Las plantas medicinales en México, Maximino Martínez, 1967, Editorial Botas).

En México, como en todo el mundo, existe un amplio cúmulo de especies vegetales, cuya acción terapéutica aún no se ha confirmado. Es por eso que la investigación fitoquímica representa un recurso viable para encontrar nuevos tratamientos contra las enfermedades degenerativas, como el cáncer, la artrosis, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Alzheimer, la diabetes, etcétera.



Figura 3. Planta del género Salvia

Toda esta información nos da un respaldo sólido para llevar a cabo un estudio sistemático sobre las raíces medicinales en México para la búsqueda de componentes bioactivos, específicamente en plantas del género Salvia, con la cual se realizó este trabajo por tener un gran número de especies endémicas con uso etnobotánico en nuestra región.

HIPÓTESIS



La literatura científica nos indica que los metabolitos secundarios de la familia de los terpenos, ácidos fenólicos, polifenoles, flavonoides y antocianinas, han sido identificados de manera mayoritaria en las plantas del género *Salvia* con un excelente perfil bioactivo (Lu Y y col., 2002; Ulubelen A y col., 1996; Gohari AR y col., 2010; Atta-ur-Rahman. 2008; Chang H.M y col., 1990).

De un amplia gama de actividades biológicas, el potencial antioxidante y antimicrobiano de la raíces de estas plantas se atribuye a la presencia de compuestos polifenólicos y de diterpenos con funcionalización química variada.

REFERENCIAS

1. Lu Y, Foo LY: Polyphenolics of *Salvia* - a review. *Phytochemistry* 2002, 59:117–140.
2. Ulubelen A, Sönmez U, Topcu G, Johansson CB: An abietane diterpene and two phenolics from *Salvia forskahlei*. *Phytochemistry* 1996, 42:145–147.
3. Gohari AR, Saeidnia S, Malmir M, Hadjiakhoondi A, Ajani Y: Flavones and rosmarinic acid from *Salvia limbata*. *Nat Prod Res* 2010, 24:1902–1906.
4. Atta-ur-Rahman: *Studies in natural products chemistry*. Elsevier B V 2008, 35:753.
5. Chang H. M., Cheng K. P., Choang T. F., Chow H. F., Chui K. Y., Hon P. M., Tan F. W. L., Yang Y., and Zhong Z. P. (1990), Structure elucidation and total synthesis of new tanshinones isolated from *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Danshen). *J. Org. Chem.* 55, 3537–3543.

OBJETIVO GENERAL Y PARTICULARES



Objetivo General

Determinar el perfil químico y biológico de los componentes de la raíz de *Salvia clevelandii*, mediante un estudio sistemático fitoquímico y experimentos de tipo bioensayo.

Objetivos Particulares

Utilizando como selección en este estudio a la especie vegetal de *Salvia clevelandii*, se plantean los siguientes objetivos particulares:

1. Realizar un estudio cualitativo colorimétrico preliminar, para la identificación de algunos metabolitos secundarios.
2. Llevar a cabo una evaluación antioxidante con los extractos obtenidos de la raíz, utilizando la técnica de la reducción del radical DPPH y de la decoloración oxidativa del β -caroteno.
3. Establecer el perfil antimicrobiano de los extractos, mediante diferentes experimentos utilizando cepas específicas para este estudio.
4. Evaluar el comportamiento de los materiales vegetales en un estudio de inhibición de la enzima Xantina Oxidasa.
5. Cuantificar el contenido de compuestos polifenólicos y flavonoides, para poder establecer una posible correlación con los resultados de actividad antioxidante.
6. Mediante metodologías cromatográficas conocidas y técnicas de espectroscopía de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas, identificar, aislar y caracterizar estructuralmente a metabolitos secundarios de interés con perfil bioactivo.

ANTECEDENTES



4. ANTECEDENTES

Nuestro país cuenta con una gran diversidad en cuanto a flora se refiere, tanto es así que existen especies únicas, pero a pesar de que existen estas especies y otras que han sido introducidas, son muy pocos los estudios realizados para lograr conocer las especies existentes; comúnmente nuestra población ha sabido aprovechar las propiedades más comunes que presenta nuestra flora para darle usos económicos, culinario, en la empresa cosmética, pero sobre todo, un uso medicinal.



Figura 4. Alusión a la medicina natural

4.1. FAMILIA LAMIACEAE Y EL GÉNERO SALVIA

4.1.1. Familia *Lamiaceae*.

Según la clasificación botánica, la familia Lamiaceae, está compuesta actualmente por 224 géneros y aproximadamente 3000 especies que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza, siendo habituales en regiones de clima cálido y templado y muy raramente en climas fríos. Desde el punto de vista taxonómico, la diversidad existente de esta familia botánica en el Mediterráneo y Asia central, contempla la posibilidad de que las primeras plantas hayan aparecido en estas áreas del planeta durante los inicios y la primera mitad del periodo cretáceo hace aproximadamente 140 millones de años.

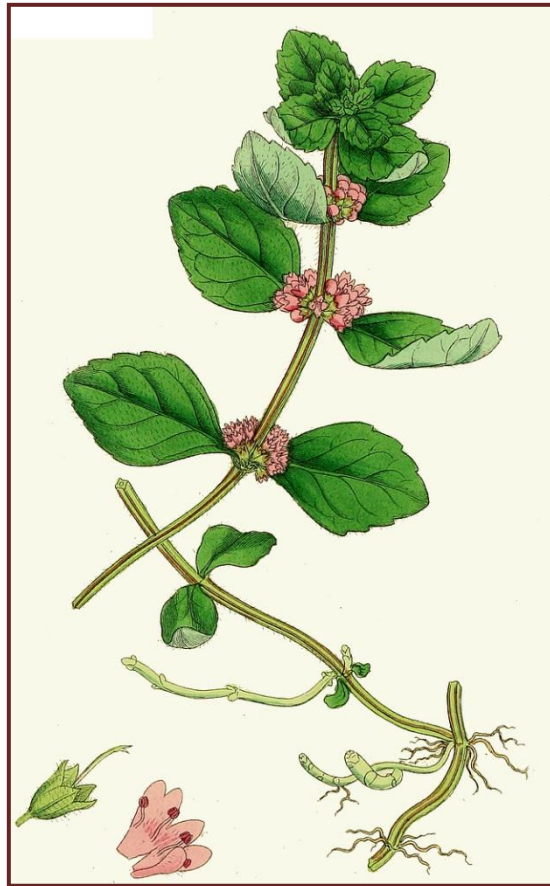


Figura 5. *Mentha arvensis*, familia *Lamiaceae*.

4.1.2. Género *Salvia*.

Salvia es el género más diverso de la familia Lamiaceae, con cerca de 1000 especies distribuidas alrededor del mundo (Walker et al., 2004; Wester y Claben-Bockhoff, 2007). En Centro y Sudamérica está representado por cerca de 500 especies (Epling, 1939; Standley y Williams, 1973; Walker y Elisens, 2001).

De acuerdo con la clasificación de Bentham (1876), el género *Salvia* se divide en 4 subgéneros: *Calosphace*, *Leonia*, *Salvia* y *Sclarea*.

Las formas de crecimiento en *Salvia* incluyen hierbas anuales y perennes, arbustos y raramente arbustos trepadores; las flores presentan cáliz y corola bilabiados, el ovario se divide en 4 lóculos y el estilo es ginobásico (Ramamoorthy,

2001). La característica diagnóstica de *Salvia* respecto a los otros géneros de Lamiaceae es la presencia de 2 estambres (Wood y Harley, 1989; Pool, 2001, Ramamoorthy, 2001; Pool, 2007), en los cuales la parte estéril del conectivo funciona como una palanca, lo que permite que el polen se adhiera a la cabeza o cuerpo de los polinizadores, principalmente abejas o colibríes Walker y Sytsma, 2007; Wester y Claßen-Bockhoff, 2007).



Figura 6. *Salvia officinalis*

Son arbustos de 70 cm de altura aproximadamente, es leñoso en su base y herbáceo en las partes superiores. Presenta un gran número de tallos tomentosos de color grisáceo. Las hojas son grandes, estrechas, pecioladas, oblongas y ovaladas, o más raramente lanceoladas, con la nervadura bien marcada. Tienen un aroma característico, las flores son de colores muy diversos agrupadas en espigas de verticilos bastante separados de hasta 10 flores cada uno, con corola de hasta 3 cm, cuyo labio superior es casi recto. El cáliz no es pegajoso y es el doble de corto que la corola. La floración generalmente comienza en mayo, extendiéndose durante todo el verano.

4.1.3. Estudios sobre el género *Salvia* en México.

México es considerado como una de las áreas con mayor diversidad del género en el mundo (Ramamoorthy, 1984; Walker et al., 2004), con aproximadamente 300 especies, que en un porcentaje importante (85–88%) son endémicas (Ramamoorthy, 1984; Dieringer et al., 1991; Ramamoorthy y Elliott, 1998). Villaseñor (2004) indica que *Salvia* es el segundo género más diverso en la República Mexicana con 292 especies, superado marginalmente por *Mammillaria* (*Cactaceae*), que tiene 306. Las especies mexicanas de *Salvia* se incluyen dentro del subgénero *Calosphace*, con excepción de 3, distribuidas en el Noreste de México del subgénero *Leonia* (sección *Heterosphace*) y 12 bajacalifornianas que pertenecen a la sección *Audibertia* (Epling, 1938, 1939; Walker y Elisens, 2001; Walker et al., 2004). Hasta el momento no se ha definido claramente a qué subgénero pertenece esta última sección, ya que está relacionada con especies del Viejo Mundo de los subgéneros *Leonia* y *Salvia*, pero también con las especies americanas del subgénero *Calosphace* (Bentham, 1876; Epling, 1938; Walker et al., 2004).

La mayor diversidad de especies del género *Salvia* se presenta en las zonas montañosas de México, principalmente en las del centro–sur del país (Espejo y Ramamoorthy, 1993). En consecuencia, los bosques templados y en particular los de coníferas y encinares, son los tipos de vegetación que albergan la mayor proporción de especies de *Salvia* (Ramamoorthy y Lorence, 1987). No obstante, también se encuentran en los bosques tropicales caducifolios y subcaducifolios, zonas áridas y desérticas (Dávila et al., 1993; Fernández et al., 1998; Ramamoorthy y Elliot, 1998).

Aunque Fernald (1900) fue el primero en hacer un compendio de las salvias mexicanas y centroamericanas, la obra clásica que ofrece una revisión completa del subgénero *Calosphace*, es la de Epling (1939), en la cual se citan 229 especies para México, agrupadas en 52 secciones.

Estudios complementarios que describen nuevas especies o que incluyen información de la distribución geográfica de especies ya conocidas son los de Epling (1940, 1941, 1944, 1947, 1951, 1960), Epling y Mathias (1957), Epling y Jativa (1963, 1966, 1968), Ramamoorthy (1984), Espejo y Ramamoorthy (1993), Walker y Elisens (2001), Klitgaard (2007), Turner (2008, 2009) y recientemente Bedolla-García y col (2011).

A pesar de la sobresaliente diversidad de *Salvia*, son pocos los estudios que ofrecen información monográfica actualizada de sus especies, como el de Espejo y Ramamoorthy (1993), quienes hacen una revisión de la sección *Sigmoideae* y aportan información detallada de 11 especies, todas endémicas de México. Recientemente Turner ha revisado varias secciones del género. Para la sección *Farinaceae* se documentan 14 especies de *Salvia*, de las cuales 13 son endémicas del país (Turner 2008). Este autor presenta información muy general de 14 especies de la sección *Scorodonia* y 28 de la sección *Uliginosae*, todas con distribución en México; en estos estudios propone 7 nuevas especies (Turner 2009). Posteriormente, para la sección *Peninsularis* incluye 3 especies, de las cuales 2 son nuevas para la ciencia (Turner 2010). Por otro lado, en la flora fanerogámica del Valle de México, Ramamoorthy (2001) presenta claves y descripciones para las 33 especies *Salvia*. Finalmente, Domínguez y col. (2002) documentaron la diversidad y distribución de 75 especies de *salvia* para el estado de Chiapas.

En 1998, Ramamoorthy y Elliot indican que los estados mexicanos con mayor riqueza de salvias son Oaxaca (63 especies), Guerrero (51), Puebla (50), Jalisco (49) y Michoacán (48).

4.2. VEGETACIÓN EN BAJA CALIFORNIA

4.2.1. Vegetación en Baja California.

De un total de 450 especies vegetales catalogadas como de importancia económica a nivel nacional, 211 se encuentran en Baja California, de las cuales el 47 por ciento son comestibles, el 29% son medicinales, el 10% son forrajeras, el 10% son industriales y el 4% sirven para otros usos.

Wiggins (1980) refiere una flora de 2958 especies para la península de Baja California y sus islas; otras estimaciones posteriores sobrepasan las 3000 especies (Peinado y delgadillo, 1990), y un nivel de endemismo de más de 700 especies (Peinado y *col* 1994).

El Estado de Baja California comprende dos regiones fitogeográficas: la Región Californiana o también llamada Mediterránea, y la Región del Desierto Central o Desierto Sonorense. Las comunidades vegetales en que se divide la primera son cinco, mientras que la segunda se divide en cuatro, tres de las cuales se encuentran en la entidad.

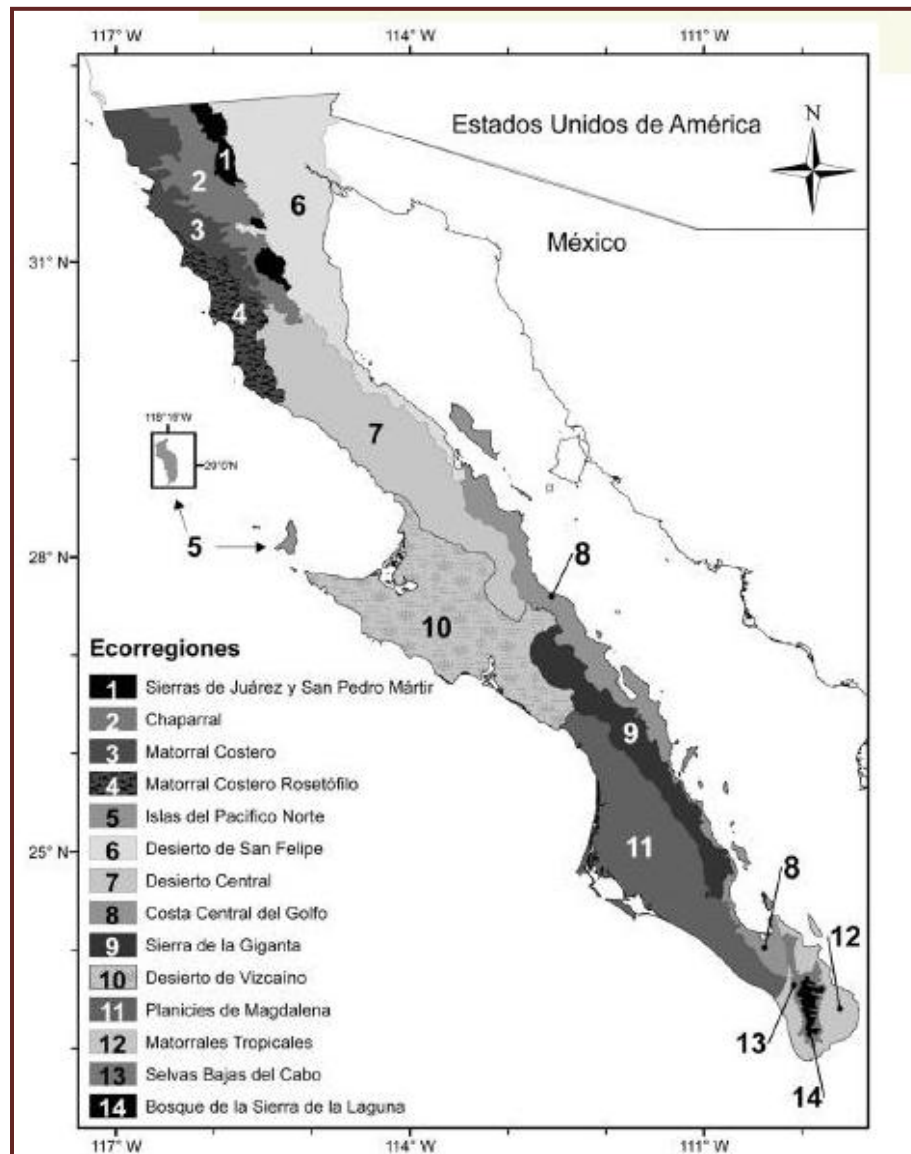


Figura 7. Ecorregiones de la Península de Baja California

4.2.2. Región Californiana o Mediterránea.

Ocupa la porción Noroeste del Estado, desde el límite Internacional con los Estados Unidos de América hasta la altura de El Rosario, Baja California, y de la costa del Pacífico a las sierras de Juárez y San Pedro Mártir, además de Isla Guadalupe. Presenta un clima tipo mediterráneo, con inviernos templados y moderadamente húmedos, alternados con veranos secos y cálidos. La niebla constituye un factor climático importante para el desarrollo biológico de los

organismos de la región, la primavera es la época de floración y crecimiento de especies anuales, aunque es posible encontrar varias de ellas durante los meses fríos y húmedos. Esta región florística cuenta con aproximadamente 795 géneros y 4,452 especies de plantas vasculares nativas, las comunidades vegetales presentes en esta región son: marismas, dunas, matorral costero, chaparral y bosque de coníferas.

Una de las comunidades vegetales pertenecientes a la región mediterránea, es la de matorral costero, el cual presenta una vegetación en forma discontinua a lo largo del litoral Pacífico, desde la línea internacional hasta El Rosario, y se considera como una transición entre la vegetación desértica y el chaparral. De esta manera, el matorral costero en el Estado ocurre en terrenos cercanos y en línea de costa.



Figura 8. Distribución de clima mediterráneo en el mundo.

Las plantas del matorral costero son de poca altura y oscilan entre los 0.5 m y los 2.0 m, donde dominan las especies arbustivas y decíduas, las cuales establecen comunidades abiertas representadas por las familias Asteraceae, Lamiaceae y Polygonaceae. Delgadillo (1999) identificó para la Sierra de San Pedro Mártir,

incluyendo la vegetación de chaparral de contacto, un total de 74 familias, 286 géneros y 735 taxa: 584 son especies y 251 con categorías infraespecíficas (subespecie y variedad). Las familias más numerosas fueron: Asteraceae, Poaceae, Fabaceae, Scrophulariaceae, Polygonaceae, Brassicaceae, Cyperaceae, Polemoniaceae y Lamiaceae.



Figura 9. Chaparral

4.2.3. Familia *Lamiaceae* y *Salvia* en Baja California

A partir de los registros de diferentes autores que han colectado en la Sierra de San Pedro Mártir, así como la base de datos del Herbario BCMEX, de la Facultad de Ciencias (UABC), se estima una flora exclusiva al bosque de coníferas de aproximadamente 580 taxa, incluidos 151 subespecies y variedades, en 72 familias.

Las diez familias con el mayor número de taxa en la sierra San Pedro Mártir Baja California.

Familias	Taxa	%
<i>Asteraceae</i>	83	14.3
<i>Poaceae</i>	66	11.3
<i>Fabaceae</i>	38	6.5

<i>Scrophulariaceae</i>	26	4.4
<i>Cyperaceae</i>	23	3.9
<i>Polygonaceae</i>	22	3.7
<i>Brassicaceae</i>	21	3.6
<i>Polemoniaceae</i>	21	3.6
<i>Lamiaceae</i>	15	2.5
<i>Polemoniaceae</i>	14	2.4
Total	329	56.7

Tabla 1.-Taxa San Pedro Mártir (Delgadillo Rodríguez, 2004)

En el año 2000, se publicó *Fray Pedro Font el Diario Íntimo*, por Julio Cesar Montané. Donde cita algunas especies de salvias que se encontró a lo largo de su expedición; " Las zonas áridas son ricas en plantas resinosas. De allí que Font haya observado esta característica en un sitio de transición con el Bosque de Coníferas, un sitio aún más adecuado para la propagación de plantas con olores sugerentes. Entre ellas podemos encontrar al género *Salvia* el cual se encuentra distribuido en los lugares fríos y templados preferentemente, aunque también se localizan en las zonas cálidas muy soleadas. El género salvia presenta 19 especies en California. Podemos citar como salvias olorosas, distribuidas donde Font da la cita a: *Salvia apiana* (Jepson), entre el bosque y el chaparral alto y bajo. *Salvia pachyphylla* (Epling), entre el desierto y el chaparral cercano a las zonas boscosas. *Salvia hiptoides* (Mart y Gral). *Salvia eremostachya* (Jepson). *Salvia munzii* (Epling), en las zonas boscosas y de transición. Podemos decir que por lo general son hierbas o arbustos aromáticos, con tallos glandulares. Las flores se presentan en espigas o bien en racimos alargados y bifurcados. "(Julio Cesar Montané y Col., 2000)

Otras de las *Salvias* que podemos encontrar en Baja California son *leucophylla*, *chionocephala*, *clevelandii* entre otras, las cuales pertenecen a la vegetación de tipo chaparral de la serie del chamizo encontradas en el norte de Baja California

entre los límites con los bosques de coníferas y el matorral costero de la costa del pacífico de esta península mexicana.

4.3. METABOLITOS SECUNDARIOS DE ESPECIES VEGETALES

4.3.1. Química de productos naturales.

Cuando se habla de productos naturales se hace referencia a los extractos o sustancias que se obtiene de plantas, generalmente de aquellas que tiene un uso medicinal o nutricional. De manera particular, se les llama productos naturales a los metabolitos secundarios obtenidos de organismos vivos tales como bacterias, algas, hongos, animales y vegetales.

La sabiduría popular conoce las cualidades curativas de muchas plantas de su medio y, a través del tiempo ha estimulado a la ciencia para descubrir los principios activos de especies botánicas lo que ha propiciado la fabricación industrial de medicamentos.

En la década de los cincuenta nuestro país fue pionero en el desarrollo de productos naturales con la producción de esteroides a partir de la “cabeza e negro” y el “barbasco”.



Figura 10. Árbol de barbasco y cabeza de negro. Productos naturales base de esteroides

Varios productos naturales han sido seleccionados por los químicos debido a sus notables propiedades fisiológicas. Por ejemplo la morfina, generada por la adormidera (*Papaver somniferum*) siendo una analgésico potente; la atropina,

principio tóxico de la belladona (*Atropa belladonna*) agente bloqueador de la transmisión sináptica de la acetilcolina; la cocaína, aislada a partir de la planta de la coca (*Erythroxylon coca*), que fue el primer anestésico local efectivo.

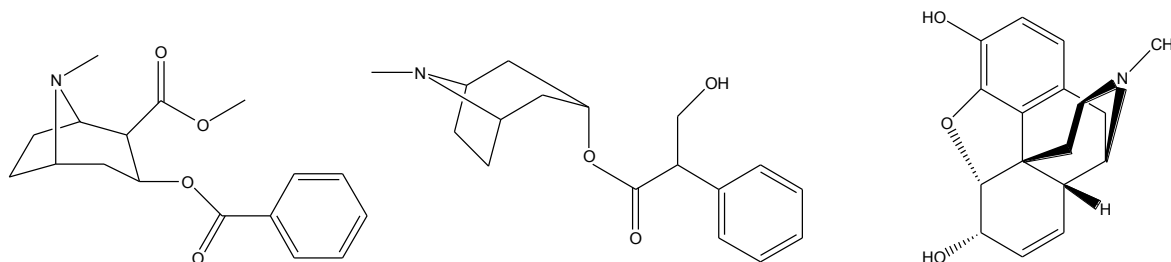


Figura 11. Cocaína, Atropina y Morfina (respectivamente). Alcaloides importantes en la industria farmacológica.

Es muy larga la lista de compuestos químicos vegetales que ofrecen respuesta valiosa a severos problemas de salud pública. Por ejemplo la quinina que salvo cientos de miles de vidas en la primera mitad del siglo pasado y que ahora, sintetizada, mantiene libre de malaria a muchas zonas tropicales. Otro ejemplo es el taxol, alcaloide extraído de una especie de *Taxus* del noroeste de Estados Unidos que ha sido exitosamente utilizado en el tratamiento de fases avanzadas de cáncer ovárico.

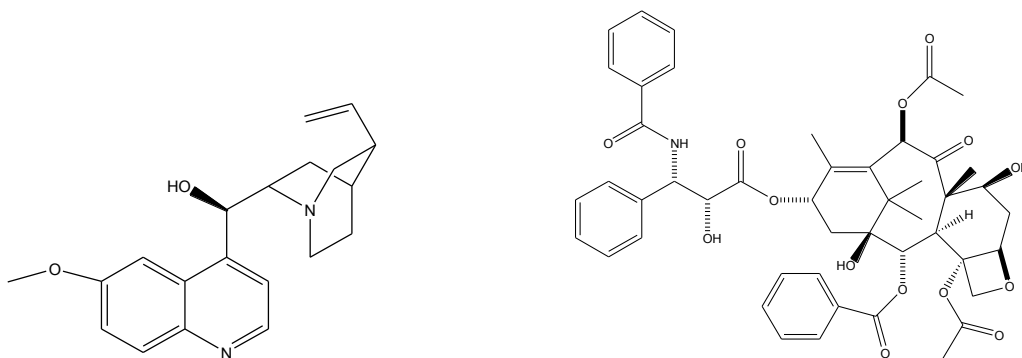


Figura 12. Quinina y taxol (respectivamente). Compuestos químicos importantes de origen vegetal.

4.3.2. Identificación de Metabolitos secundarios.

Los métodos químicos para la determinación de las estructuras de compuestos obtenidos de plantas han sido sumamente complicados y requieren de cantidades grandes de producto. En consecuencia, la química orgánica ha tenido nuevos impulsos a medida que las estructuras se hacían más y más complejas y la disponibilidad de los compuestos era menor.

Ello condujo al desarrollo de una serie de técnicas físicas de separación, purificación e identificación: RMN, EM, IR, UV, Rayos X. técnicas cromatográficas, solas o combinadas con métodos espectroscópicos tales como EM-CG, o HPLC, frecuentemente acoplado con una base de datos (“librería”) de EM. Las bases de datos también se asocian con otras técnicas espectroscópicas (UV, IR y RMN).



Figura 13. Equipo de Resonancia Magnética Nuclear

4.4. IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE LAS RAÍCES EN LA BIOSÍNTESIS DE METABOLITOS

4.4.1. Fisiología de la raíz

La raíz es el órgano subterráneo de la planta, crece generalmente en dirección a la gravedad y sus células carecen de clorofila y no realizan la fotosíntesis. Por ello, deben tomar el alimento, la savia elaborada, procedente de las hojas. En ocasiones se encuentran raíces aéreas o acuáticas.

Las principales funciones de la raíz son:

- La fijación de la planta al sustrato.
- La absorción de agua y minerales del suelo.
- La conducción de esas sustancias (savia bruta) hacia las hojas.
- Algunas raíces también cumplen funciones de almacenamiento de sustancias de reserva, como las raíces tuberosas de zanahorias, nabos y rábanos.



Figura 14. Morfología externa de la raíz y su entorno

Las raíces crecen a causa de un tejido de crecimiento (meristemo) que hay en la punta de cada ramificación. Posteriormente, a medida que la raíz envejece, crece en grosor, se reviste de un tejido aislante hecho de corcho (corteza) y puede ramificarse.

En la zona terminal de cada ramificación, el tejido de crecimiento se reproduce continuamente produciendo el crecimiento de la raíz en longitud.

Para facilitar su penetración en el suelo, el meristemo está protegido por una envuelta resistente (la cofia). Tras la zona de crecimiento existe una zona de elongación donde las células jóvenes recién formadas se alargan. Solamente en esta zona donde las células son jóvenes sus paredes celulares son suficientemente finas para absorber el agua y las sales del suelo y para poseer unas prolongaciones denominadas pelos absorbentes: es lo que se denomina zona pilífera que está situada inmediatamente después de la zona de elongación.

4.4.2. Estructura de la raíz

Se pueden distinguir las siguientes capas en la raíz:

- **Epidermis:** capa de células protectoras. En la zona pilífera, sus células disponen de pelos absorbentes: es la única zona absorbente de la raíz. En las raíces de más de un año, la epidermis se engruesa y se reviste de corcho para protegerse de la humedad.
- **Cilindro cortical:** capa constituida por células con finas paredes celulares. Está separada de la siguiente capa por la endodermis y la banda de Caspari, que controlan las sustancias que se desplazan desde la epidermis a los vasos conductores del interior.
- **Cilindro vascular o medular:** formado por células de relleno dentro de los que están los haces de xilema (transportan agua y sales minerales desde la raíz a las hojas) y de floema (transportan agua con productos orgánicos desde

las hojas hasta el resto de la planta), dispuestos de forma separada. Si la raíz tiene más de un año, se acumulan los haces de xilema de años sucesivos que acumulan una sustancia resistente (la lignina). Esto forma madera.

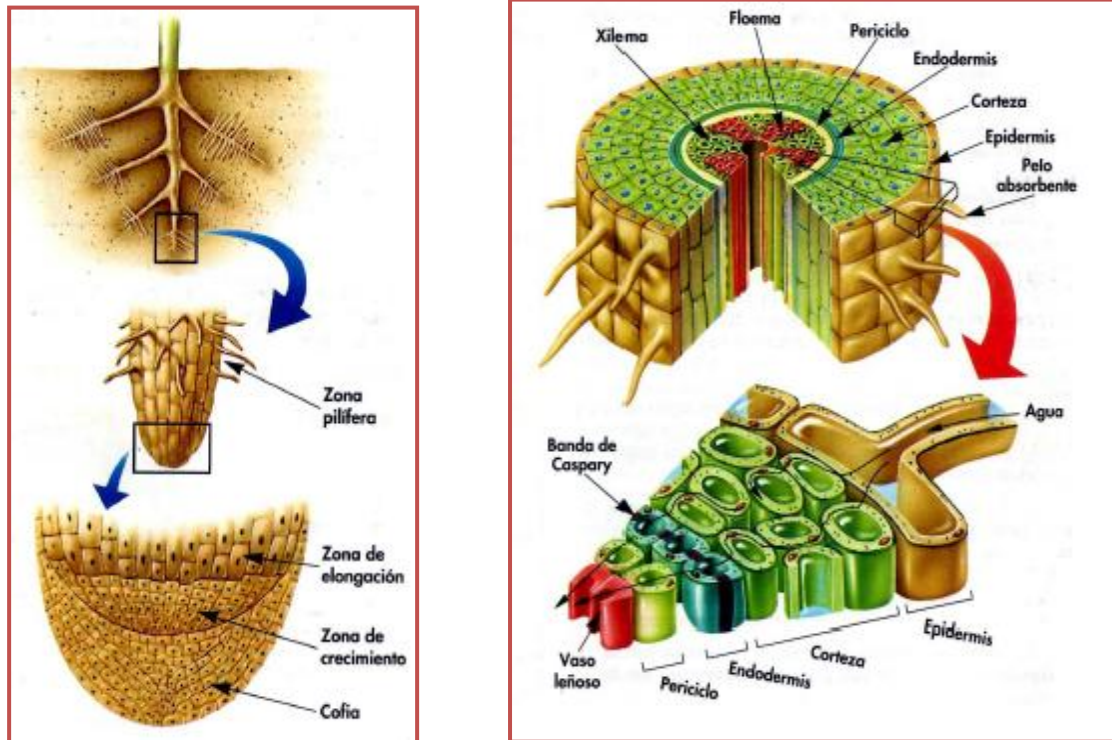


Figura 15. Morfología interna de la raíz

4.4.3. Metabolismo en las plantas

El reino vegetal es el gran productor de sustancias nutritivas que posibilitan la vida humana, al mismo tiempo le brinda productos que le ayuda a prevenir y curar enfermedades.

Existen dos tipos fundamentales de metabolismo en las plantas: el metabolismo primario, que se considera esencial para la vida y es común a todos los seres vivos; y el metabolismo secundario, que se considera no- esencial para la vida.

En los vegetales el metabolismo secundario es muy importante puesto que da lugar a productos (denominados metabolitos secundarios) que resultan de sumo

interés desde el punto de vista farmacológico. La mayoría de los principios activos que se obtienen de las plantas medicinales producen del metabolismo secundario.

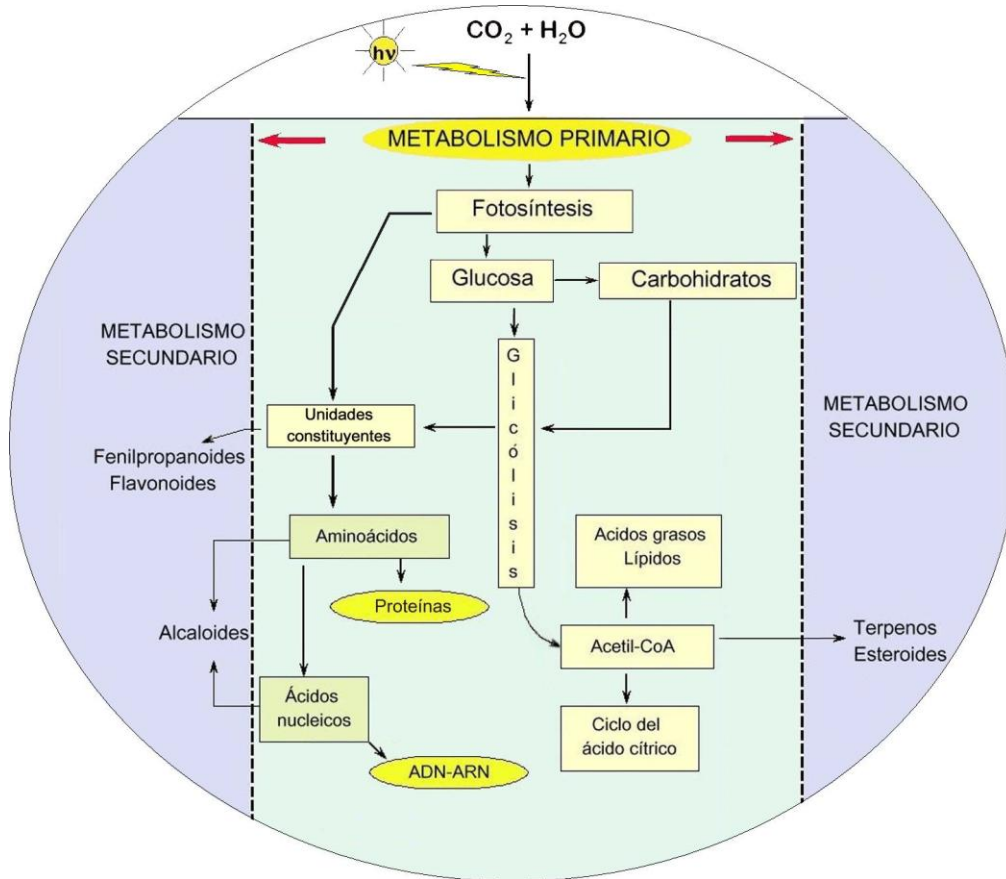


Figura 16. Elementos básicos del metabolismo primario y en relación con el metabolismo secundario de plantas.

En el esquema anterior se muestra un panorama resumido de la generación de metabolitos primarios y secundarios.

En los organismos vivos se pueden diferenciar 3 rutas biosintéticas que dan lugar a los metabolitos secundarios:

- Ruta del ácido shikímico (Taninos y fenilpropanoides).
- Ruta del acetato- malonato (Policétidos).
- Ruta de acetato- mevalonato (Terpenos o isoprenoides).

Hay metabolitos secundarios que proceden de más de una ruta biosintética, como son los flavonoides que proceden de la ruta del ácido shikimico y la de pólícétidos y los alcaloides que requieren de las rutas del ácido shikimico y ácido mevalónico.

4.4.4. Metabolismo en la raíz

El estudio de los mecanismos mediante los cuales las plantas pueden interaccionar con su entorno es muy complejo, debido principalmente a la gran diversidad de estrategias que estas utilizan para tal fin. Las plantas en si aprovechan todos sus órganos constitutivos para activar estos mecanismo y transmitir información a su entorno, siendo éstos específicos para cada órgano, y estos a su vez, son los que definirán el tipo de información transmitida. Así, los mecanismos que pueden ser activados en los órganos reproductivos, como la emisión de compuestos volátiles, pueden ser muy diferentes a aquellos activados o acumulados en la raíz, órgano de la planta encargado de la absorción de los requerimientos nutricionales esenciales para el crecimiento, y el que se encuentra en contactos directo con el suelo, soporte de la población biótica y algunos factores abióticos del ambiente donde la planta se desarrolla.

El sistema radicular (tipo de planta, estructura del suelo y la interacción entre ambos) en conjunto posee, de manera diferencial, una resaltante habilidad para secretar compuestos con una gran diversidad de propiedades físicas y químicas a la rizósfera, como una respuesta al estrés o fluctuaciones de tipo tanto bióticas como abióticas donde estas se encuentran, definiéndose como rizósfera a los gradientes longitudinales y radiales donde ocurre la expansión de las raíces durante su crecimiento, adquisición de agua, nutrientes, exudación, y subsiguiente crecimiento microbial, localizada desde la superficie de la raíz hasta 2 mm de distancia de esta, siendo la zona del suelo que más sufre los efectos producidos por los compuestos liberados por la raíz. Sin embargo, esta distancia no es absoluta, siendo dependiente de las propiedades del suelo, como lo es el tamaño de partícula, contenido de agua y la capacidad reguladora del pH. Otras definiciones más especializadas surgen de las actividades que ha sido posibles

registrar en esta zona, donde el concepto de volumen de suelo que está influenciado por la actividad propia del sistema de raíz de la planta, suele ser la definición más específica y concertada. A partir de este concepto de rizósfera, se define el fenómeno de rizodeposición, referida como la liberación de toda forma de carbono a partir de las raíces. Los productos de la rizodeposición pueden ser categorizados como exudados, secreciones y grasas. La diferencia existente entre exudados y secreción, es que para el exudado, los compuestos son pasivamente liberados, mientras que en la secreción lo son activamente. En las secreciones se incluyen a los carbohidratos poliméricos y enzimas. Los exudados incluyen compuestos de peso molecular altos, como mucílago, un material gelatinoso en la superficie de las raíces; y dentro de los compuestos de bajo peso molecular, se encuentran ácidos orgánicos, azúcar, fenólicos simples, aminoácidos, flavonoides e incluso vitaminas, y son éstos los de mayor interés al momento de evaluar las transmisión de información al medio por parte de las plantas.

Las raíces exudan una variedad importante de compuestos de, donde se incluyen azúcares y polisacáridos simples (tales como arabinosa, fructuosa, glucosa, maltosa, manosa y oligosacaridos), aminoácidos (tales como arginina, asparagina, cisterna y glutamina), ácidos orgánicos (tales como ácido acético, ascórbico, benzoico, ferúlico y málico) y compuestos fenólicos, muchos de los cuales poseen actividades y funciones demostradas. Dentro de los compuestos exudados con mayores pesos moleculares encontramos los flavonoides, enzimas, ácidos grasos, reguladores del crecimiento, esteroides, carbohidratos, alcaloides, poliacetilenos, etc. Así, existe una gran diversidad estructural en los exudados de la raíz, que van desde moléculas relativamente sencillas hasta moléculas más complejas estructuralmente, como flavonoides y alcaloides.

4.4.5. Estudios previos sobre raíz

En la actualidad, investigadores de países como Perú, Ecuador, Chile, Costa Rica y México se encuentran realizando numerosos estudios sobre la caracterización nutricional de raíces y tubérculos de usos conocidos o potenciales para ser

incluidos como cultivos comerciales, tal es el caso de Espín y *col.* (2004) quienes determinaron las potencialidades nutricionales y características fitoquímicas de diferentes especies de Perú y Ecuador, en las cuales se determinaron las potencialidades nutricionales y características fitoquímicas, para las especies, oca (*Oxalis tuberosa*), melloco (*Ullucus tuberosus*), mashua (*Tropaeolum tuberosum*), zanahoria blanca (*Arracacia xanthorrhiza*), miso (*Glycine max*), jícama (*Pachyrhizus erosus*) y para achira (*Canna* sp.), y encontraron que la mayoría de estas raíces y tubérculos, son buenas fuentes de almidón y de metabolitos secundarios con potencial de aplicación en diferentes áreas de la industria.

4.5. ESTUDIOS FITOQUÍMICOS DE SALVIAS

4.5.1. Estudios fitoquímicos de la familia *Lamiaceae*.

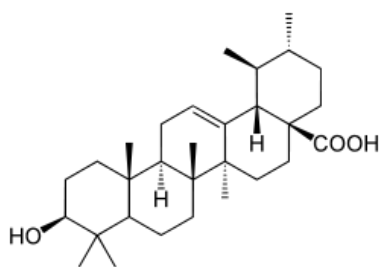
La familia *Lamiaceae* ha sido estudiada, aislándose numerosos metabolitos secundarios tales como esteroides, flavonoides, sesquiterpenos, diterpenos, y triterpenos entre otros. Algunos de los compuestos aislados de plantas principalmente de géneros como *Ajuga*, *Rabdosia*, *Teucrium*, *Scutellaria*, *Stachys*, *Leonurus*, *Ballota* y *Salvia*, han presentado una amplia variedad de funciones biológicas de interés medicinal y agroquímico. Las principales actividades encontradas son como: antitumorales, antiplasmódicas, antivirales, bactericidas o inhibidores del desarrollo de insectos.

4.5.2. Estudios fitoquímicos de salvia.

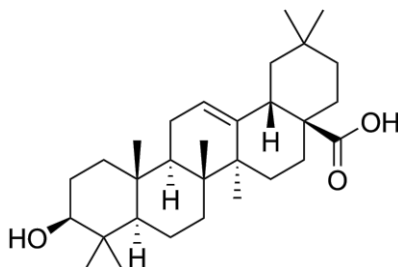
Se deriva de la palabra en latín *salvare*, "para curar", y por siglos las salvia han sido valorados por sus cualidades medicinales y culinarias. Se presentan en muchas formas: perennes, bienales, anuales y arbustos de hoja perenne o caduca. También destacan por su notable resistencia a plagas y enfermedades, la tolerancia y la sequía.

Estudios fitoquímicos de diferentes especies del género *Salvia*, han proporcionado el aislamiento de compuestos interesantes, tales como: esteroides, flavonoides, derivados triterpénicos con esqueletos: lupano, oleanano, damarano y ursano así

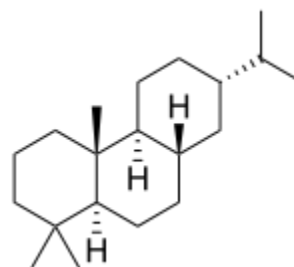
como algunos compuestos fenólicos. Pero los metabolitos secundarios más característicos y variados aislados de este género son diterpenos, habiéndose descrito dentro del mismo, más de 200 diterpenos de tipo abietano. Tales compuestos han sido aislados tanto de la parte aérea como de la raíz de plantas provenientes de los subgéneros de *Salvia*: *Audibertia*, *Jungia*, *Leonia*, *Salvia* y *Sclarea*, siendo estos 2 últimos los más ricos en metabolitos secundarios.



Ácido ursólico

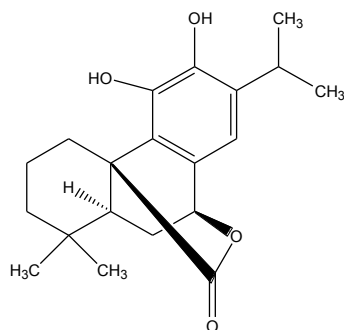


Ácido oleanólico

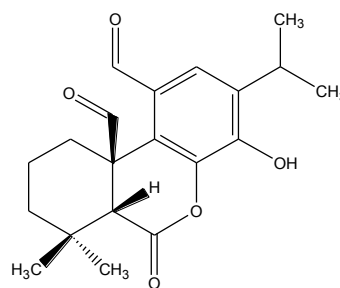


Abietano

También el grupo de Esquivel y *col.* realizaron un estudio preliminar de un extracto de *S. Pachyphylla* de origen californiano, aislando sólo compuestos que ya habían sido aislados de otras especies de *Salvia* como *S. canariensis*, como carnosol y ácido carnósico.



Carnosol

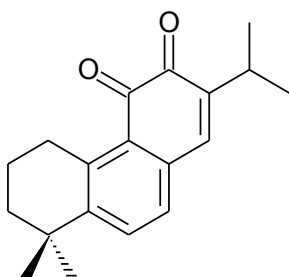
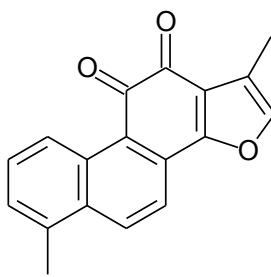
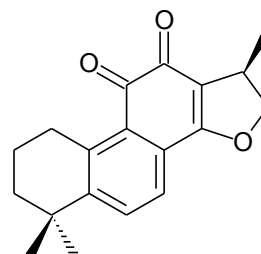


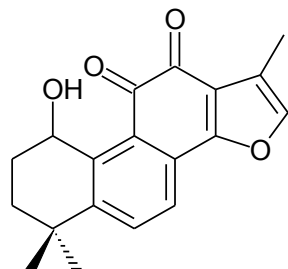
Acido carnosico

La presencia del compuesto criptotanshinona fue un interesante hallazgo químico en los estudios fitoquímicos de la parte aérea y raíz de la *Salvia axillaris*, una de las plantas más primitivas del subgénero *Jungia* y muy relacionada con las plantas del subgénero *Audiberti*.

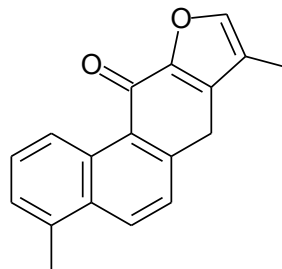
Muchas especies del género *Salvia* han sido utilizadas en la medicina tradicional, y en la actualidad, su uso se extiende a la farmacología (Gerald, S. *Chemistry in Britain*, 684, 1985), la cosmética (Bergwein, K.; *Amer. Perfum. Cosmet.*, 83, 41, 1968) y a la conservación de alimentos (Gwenether; *"The Essential Oils"*, D. Van Nostram Company Inc., New York, 38, 710, 1964). Algunas especies del género *Salvia* y concretamente *Salvia officinalis*, ha sido objeto de interés desde muy antiguo en el mundo occidental (Funt Quer, P. "Plantas Medicinales". El Dioscorides Renovado. Editorial Labor, S.A) 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 la mítica y antiquísima droga china conocida como Dan Shen, sin duda es la especie de *Salvia* más profundamente investigada hasta el momento (Chang y col, 1986), y siendo aún objeto de atención debido a los diferentes tipos de actividad biológica que presenta. Esta amplia gama de actividades biológicas ha sido confirmada y atribuida a una serie de diterpenoquinonas con esqueleto básico de abietano como: miltirona **(1)**, tanshinona **(2)**, criptotanshinona **(3)**, hidroxitanshinona **(4)** o isotanshinona II **(5)**.

**(1)****(2)****(3)**



(4)



(5)

4.5.3. Estudios previos de *Salvia clevelandii*.

Salvia clevelandii es un arbusto de hoja perenne con flores de lavanda en azul. Es endémica de colinas secas del condado de San Diego y San Antonio de las Minas, Ensenada, Baja California. Las hojas gris-verdes tienen intenso aroma.

La mayoría de su población está por debajo de los 4000 pies de altura en zonas de matorral costero y chaparral. Fue descrita por Asa Gray en 1874 y llamado así por Daniel Cleveland, coleccionista de este tipo de ejemplares (Betsy Clebsch, 2008).

En un estudio de la composición química de la flora con perfil medicinal utiliza en Latinoamérica, Iván C. Guerrero y col han realizado estudios fitoquímicos de los extractos de las partes aéreas de *Salvia pachyphylla* y *Salvia clevelandii*.

Salvia pachyphylla es utilizada por las comunidades indígenas por sus propiedades en el tratamiento de los síntomas de gripe. Los principales metabolitos secundarios aislados a partir de estas especies y los efectos citotóxicos contra las cinco líneas celulares cancerígenas humanas fueron reportados para ocho de los compuestos obtenidos: carnosol, rosmanol, 20-deoxocarnosol, ácido carnósico, isorosmanol, 7-metoxi-rosmanol, 5,6-dideshidro-O –metil-sugiol, 8-β-hidroxi-9,13-abietadien-12-uno, 12-dioxoabieta-8,13-dieno, y 11,12-dihidroxi-20-norabieta-5, 8, 11,13-tetraen-1-ona y pachyphyllona (Iván Córdova y col, 2006).



Figura 17. *Salvia clevelandii*

METODOLOGÍAS



RECOLECCIÓN Y GENERACIÓN DE EXTRACTOS



RECOLECCIÓN E IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA

La raíz de *Salvia clevelandii* fue recolectada el 1 de marzo del 2012 por el equipo del Laboratorio de Investigación Química de Productos Naturales, con la ayuda del Dr. José Delgadillo Rodríguez (Botánico) y del Dr. Martin Ortiz Acosta (Geólogo), en San Antonio de las Minas, Ensenada, Baja California en la vegetación matorral chaparral, a una altura de 345 metros y localizada con las coordenadas de 31°58 05 N y 116°37 31 O.



Figura 18. Lugar de recolección de la Salvia.

Su *voucher specimen* se identificó en el herbario BCMEX de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Baja California campus Ensenada, como BCMEX8715.

GENERACIÓN DE EXTRACTOS

Tratamiento del material vegetal.

El material vegetal fresco se lavó y se dejó en secado a temperatura ambiente. Después se trituro al máximo para poder tener una mejor superficie de contacto con el disolvente, se obtuvieron trozos de aproximadamente 5 cm de largo por 1 cm de ancho y 5 mm de espesor.

Del material vegetal seco y triturado se obtuvo un peso final de 447 gramos, de los cuales se tomaron 301 gramos para realizar la maceración.



Figura 19. Raíz seca y triturada

Obtención del crudo

La maceración se inició el día 3 de abril del año 2012 utilizando 2.5 litros de etanol al 95%, con agitación continua.

Durante 1 mes que se mantuvo la raíz en maceración, se le adiciono en una ocasión un litro de etanol al 70% y se realizaron un total de 5 destilaciones a presión reducida del disolvente utilizando un Rotaevaporador Buchi R-210; Al final de todo este proceso se logró obtener 16.4 gramos de extracto crudo.



Figura 20. Maceración etanólica de la raíz de *S. clevelandii*

Partición del crudo

Para generar las fracciones de diferentes polaridades a partir del extracto crudo, se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

Completamente seco el extracto, se redisolvió en una disolución metanol/ agua 2:3 utilizando como referencia 0.5 litros por cada 20 gramos de extracto, para los 16.4 gramos obtenidos se requirió un total de 410 mililitros.

Mililitros totales	Mililitros de metanol	Mililitros de agua
410	164	246

Tabla 2. Mililitros utilizados para redissolver el extracto

Ya redissuelto el material, se procedió a realizar las extracciones con *n*-hexano y acetato de Etilo:

Fracción No polar	Fracción Polaridad media	Fracción Polar
1. <i>n</i> -hexano 2:1*	1. AcOEt 2:1	Fracción sobrante
2. <i>n</i> -hexano 1:1	2. AcOEt 1:1	
3. <i>n</i> -hexano 1:1	3. AcOEt 1:1	

* En relacion con la mezcla Metanol/Agua

Tabla 3. Fracciones obtenidas



Figura 21. Obtención de los tres extractos de la raíz.

PRUEBAS COLORIMÉTRICAS



En la búsqueda de plantas con principios activos, en ocasiones el recolector tiene que viajar hasta el lugar donde se encuentra el espécimen y hasta puede que no conozca a la especie y tendrá que decidir que parte de la planta debe recolectar para obtener en mayor cantidad el principio que está buscando. En dichas situaciones, son muy útiles en el campo las pruebas químicas sencillas, sensibles, específicas, rápidas y que requieren equipo mínimo, económico y fácil de transportar.

Resulta conveniente realizar pruebas preliminares que permitan dar preferencia a las plantas de mayor provecho. En estudios preliminares se pueden utilizar muestras de 1 a 1000 gramos hablando de material fresco y de miligramos tratándose de extractos para orientarse a localizar cualitativa o cuantitativamente uno o varios principios activos. Los métodos pueden ser:

- A.** Histológicos, o sea, observación del comportamiento de cortes de tejido frente a ciertos reactivos que formen colores, den precipitados, etc.
- B.** Químicos, tratamiento de extractos con agentes cromógenos, sustancias que forman precipitados, etc.
- C.** Fisicoquímicos, uso de cromatografía, localización de ciertas bandas de absorción en el infrarrojo.
- D.** Biológico, ver el efecto de extractos sobre cultivos de microorganismos, grupos de ratones, embriones, órganos aislados, tejidos, etc.

Es ventajoso utilizar varios de estos métodos, procurando que no falte el biológico. Hay numerosas investigaciones sobre las condiciones óptimas para estudios preliminares. Farnsworth ha presentado un cuidadoso compendio de ellas. En todos los casos se recomienda verificar el comportamiento de los reactivos y la reproductividad y limitaciones de las técnicas mediante el empleo de sustancias y extractos testigos. Así, Wall y colaboradores usaron soluciones de cianidina a diferentes concentraciones para determinar la presencia del núcleo α -benzopirano, característico de los flavonoides. Arthur y Cheung en un estudio hecho en Hong Kong de 332 especies, compararon sus precipitados con los

obtenidos al añadir igual cantidad de reactivo a soluciones patrón de sulfato de quinina a diferentes concentraciones.

Para asegurar la reproducibilidad de las pruebas cualitativas de principios activos se recomienda indicar si el material vegetal está seco; que cantidad de este se extrajo; el peso del extracto obtenido y el volumen de la solución de la que se tomaron las alícuotas para las pruebas y la composición exacta de los reactivos empleados.

Todas las pruebas se realizaron a los tres extractos de la raíz de *Salvia clevelandii*, RSCH, RSCA y RSCM.

Prueba	Método (s)
Alcaloides	Mayer Dragendorff Wagner
Taninos	Cloruro férrico Gelatina
Esteroides y triterpenoides	Lieberman – Burchard
Flavonoides	Shinoda
Antocianinas	Cambio de pH
Carbohidratos	Benedict
Saponinas	Espuma
Glucósidos antraquinónicos	Borntrager

Tabla 4. Pruebas colorimétricas realizadas

En todas las pruebas se realizaron controles de todos los disolventes involucrados en ella.

ALCALOIDES

La mayoría de los alcaloides, con excepción de los alcaloides de amonio cuaternario y N- óxidos de amina, son solubles en disolventes orgánicos poco polares como cloroformo y mezclas de este, pero pueden formar sales solubles en agua en presencia de ácidos minerales diluidos, como el ácido clorhídrico al 5% en agua. Esta propiedad ácido base se aprovecha para realizar pruebas de precipitación en medio ácido, utilizando para ello sales de metales pesados como el ioduro de potasio (reactivo de Dragendorff), el ioduro de potasio y mercurio (reactivo de reactivo de Mayer), entre otros.

Mayer (+): precipitado color crema

Dragendorff (+): precipitado café- rojo

Wagner (+): precipitado café- rojo

Procedimiento.

1. Pesar 1mg del extracto a evaluar (1 mg por cada prueba que se vaya a realizar)
2. Disolver en 1 mL de ácido clorhídrico al 5% (concentración de 1mg/ mL)
3. Calentar a baño maría por 5 minutos.
4. Agregar 2 gotas del reactivo (un reactivo para cada tubo)
5. Observar los cambios

El estándar para esta prueba se realizó con sulfato de quinina.

TANINOS

Estos polifenoles tiene la propiedad de unirse a las proteínas y precipitarlas. Por esta razón, la prueba más empleada para la determinación de este grupo de metabolitos secundarios emplea la gelatina, el cual produce un precipitado blanco que produce coloraciones verdes, azules o negras tras la adición de cloruro férrico al 10% en agua.

Cloruro férrico (+): coloración verde, azul o negra

Gelatina (+): precipitado blanco

Procedimiento Cloruro férrico.

1. Pesar 1mg del extracto a evaluar
2. Disolver en 1 mL de disolvente afín al extracto (concentración de 1mg/ mL)
3. Agregar 2 gotas del reactivo
4. Observar los cambios

Procedimiento reactivo gelatina.

1. Preparar una solución de concentración 0.5mg/ mL del reactivo de gelatina en agua.
2. Pesar 1mg del extracto a evaluar
3. Disolver en 1 mL de disolvente afín al extracto (concentración de 1mg/ mL)
4. Agregar 3 gotas del reactivo
5. Observar los cambios

El estándar para estas pruebas se realizó con ácido gálico.

ESTEROIDES Y TRITERPENOIDES

Los esteroides, biogenéticamente muy relacionados con los triterpenoides, y con un esqueleto cíclico base igual que los triterpenoides tetracíclicos, de ciclopentanoperhidrofenantreno.

La reacción del colesterol con diferentes ácidos fuertes del tipo Brönsted y Lowry da como resultado coloraciones verdes- azules y violetas. Liebermann (1885) aprovecho este fundamento para proponer la reacción colorimétrica que lleva su nombre. Esta reacción ha sido utilizada durante años para la determinación cualitativa y cuantitativa de colesterol (Burke et al., 1974). Inicialmente, el cloroformo se utilizó como disolvente, para esta reacción, en la actualidad, esta prueba puede realizarse en un medio constituido por ácido sulfúrico, ácido acético o cloroformo y anhídrido acético (Burke y col., 1974; Clavo- Valdivieso y Ramírez-Vega, 2002).

Esteroides y triterpenoides (+): coloraciones azul- verde y violeta.

Procedimiento.

1. Pesar 1mg del extracto a evaluar
2. Disolver en 1 mL de disolvente afín al extracto (concentración de 1mg/ mL)
3. Se adiciona 1 mL de anhídrido acético y se mezcla ligeramente
4. Agregar 3 gotas del ácido sulfúrico concentrado
5. Observar los cambios

Los estándares utilizados para esta prueba fueron colesterol para esteroides y β -caroteno para triterpenoides.

FLAVONOIDES

Los flavonoides con el núcleo benzopirona (p. ej. flavonas, flavonoles, flavanonas, etc.) producen coloraciones rojizas cuando a sus disoluciones acuosas o alcohólicas se les adiciona magnesio seguido de HCl concentrado, al poner en contacto ácido clorhídrico con magnesio metálico se genera hidrogeno, el cual reduce al flavonoide desarrollando los colores mencionados.

Flavonoides (+): tonalidades de rojo

Procedimiento.

1. Pesar 1mg del extracto a evaluar
2. Disolver en 2 mL de disolvente afín al extracto (concentración de 0.5 mg/mL)
3. En un tubo adicionar unas limaduras de magnesio
4. Agregar 3 gotas del ácido clorhídrico concentrado
5. Observar los cambios

El estándar utilizado para esta prueba fue la hesperidina/ diosmina, extraídas de un medicamento comercial 50/ 450 mg.

ANTOCIANINAS

Las antocianinas se comportan como indicadores ácido-base debido al proceso:

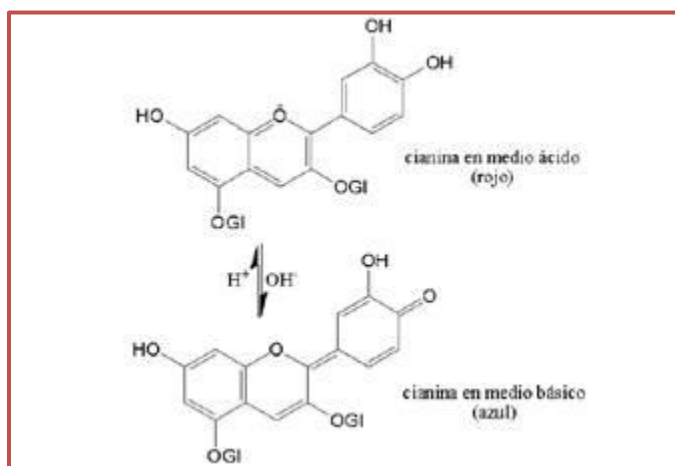


Figura 22. Cambio de coloración en diferentes medios

A pH ácido presentan coloraciones rojas, violetas y moradas; mientras que a pH alcalino presentan coloraciones verdes y azules.

Con esta prueba se pueden diferenciar entre las antocianinas y las betacianinas (pigmentos nitrogenados de colores rojos y violeta de plantas del orden Centrosperma).

Antocianinas (+): pH ácido, rojo, violeta o morado

Antocianinas (+): pH alcalino, verde o azul

Procedimiento.

1. Pesar 1mg del extracto a evaluar
2. Disolver en 1 mL de disolvente afín al extracto (concentración de 1 mg/ mL)
3. Separar en 2 la solución anterior (0.5 mL en cada tubo)
4. A un tubo adicionar 1 mL de hidróxido de sodio al 10%
5. Observar coloración
6. Al otro tubo restante, adicionar 6 gotas de ácido sulfúrico concentrado
7. Observar coloración

El estándar utilizado para esta prueba fue una solución acuosa/ etanólica de arándanos.

CARBOHIDRATOS

El reactivo de Benedict está constituido por una disolución de sulfato de cobre II, citrato de sodio y carbonato de sodio. Al tratar el azúcar con estos reactivos, experimentan una reacción de oxidación. El cobre II en disolución acuosa, de color azul, se reduce a cobre I, el cual precipita como óxido de cobre I, de color rojo.

Carbohidratos (+): precipitado café- rojo

Procedimiento.

1. Pesar 1mg del extracto a evaluar
2. Disolver en 1 mL de disolvente afín al extracto (concentración de 1mg/ mL)
3. Agregar 3 gotas del reactivo de Benedict
4. Calentar a baño de agua hirviendo
5. Observar los cambios

Los estándares utilizados en esta prueba fueron los carbohidratos lactosa y fructosa.

SAPONINAS

Son glucósidos cuya aglicona consiste en un núcleo esteroidal o triterpénico, esta característica estructural les confiere un carácter anfótero que les permite actuar como tensoactivos. Aprovechando esta propiedad una de las técnicas más utilizadas para su identificación es la prueba de formación de espuma.

Saponinas (+): espuma estable por lo menos 30 minutos.

Procedimiento.

1. Pesar 1mg del extracto a evaluar
2. Disolver en 1 mL de disolvente afín al extracto (concentración de 1mg/ mL)

3. Agitar vigorosamente
4. Observar los cambios

El estándar utilizado para esta prueba fue saponina.

GLUCÓSIDOS ANTRAQUINÓNICOS

Los glucósidos antraquinónicos contienen una aglicona derivada de la antraquinona. Están presentes el ruibarbo y los géneros *Aloe* y *Rhamnus*; tienen un efecto laxante purgante.

Las antraquinonas y sus formas reducidas, pueden reconocerse en muestras vegetales a través del denominado Ensayo de Bornträger.

En este ensayo, se utiliza una solución de ácido clorhídrico acuoso diluido, este tratamiento no solo hidroliza los glicósidos antracénicos, sino que también oxida las antronas y antranoles hasta antraquinonas; se extrae con cloroformo y cuando la fase clorofórmica se separa y se pone en contacto con una solución acuosa diluida de un álcali, esta fase pierde su color amarillo, y la fase acuosa se torna de color rojo si la muestra contiene antraquinonas.

Glucósidos antraquinónicos (+): anillo rosa- rojo en la superficie de la fase acuosa.

Procedimiento.

1. Pesar 1mg del extracto a evaluar
2. Disolver en 1 mL de disolvente afín (concentración de 1mg/ mL)
3. Adicionar 1 mL de ácido clorhídrico al 5%
4. Adicionar 1 mL de cloroformo
5. Adicionar 4 gotas de amoníaco al 10%
6. Observar los cambios

El estándar utilizado para esta prueba fue ácido carmínico.

AISLAMIENTO DE METABOLITOS SECUNDARIOS



ASLAMIENTO DE METABOLITOS SECUNDARIOS

De los tres extractos obtenidos con la partición del crudo etanólico, se inició con la separación cromatográfica del extracto de mediana polaridad (acetato de etilo, RSCA), esto debido a que es conocido que en este rango de polaridad es donde se pueden encontrar los metabolitos secundarios de mayor interés biológico, ya que en los componentes de baja polaridad encontramos por lo general las grasas y ceras, mientras que en polaridades muy altas los azúcares y otros compuestos que en su mayoría son conocidos y ya descritos en la literatura.

Se comenzó con el fraccionamiento cromatográfico del extracto de acetato de etilo utilizando cromatografía de capa fina (TLC) para poder encontrar la mejor mezcla eluyente y utilizarla como fase móvil.

Se probaron diversas mezclas eluyentes hasta encontrar la combinación de *n*-hexano/acetato de etilo al 30 %, con la que obtuvimos la una mejor separación de los compuestos.

Para confirmar esta mezcla como ideal en la separación, se utilizó una cámara de luz ultravioleta y oleum como sistema revelador.



Extracto Acetato de etilo (RSCA)



Hexano/ Acetato de etilo 30%.

Una vez seleccionada esta fase móvil, y debido a que se obtuvo una muy buena separación visible de cuatro puntos con buena resolución en la TLC, se decidió realizar una cromatografía preparativa de sílica gel, 20 cm x 20 cm. A esta placa se le etiquetó como PREP1. Se utilizaron 110 mg de RSCA disueltos en 1.5 mL del disolvente, se cargó toda la disolución de extracto en la preparativa utilizando 150 mL de la fase móvil de *n*-hexano / Acetato de etilo 30%.

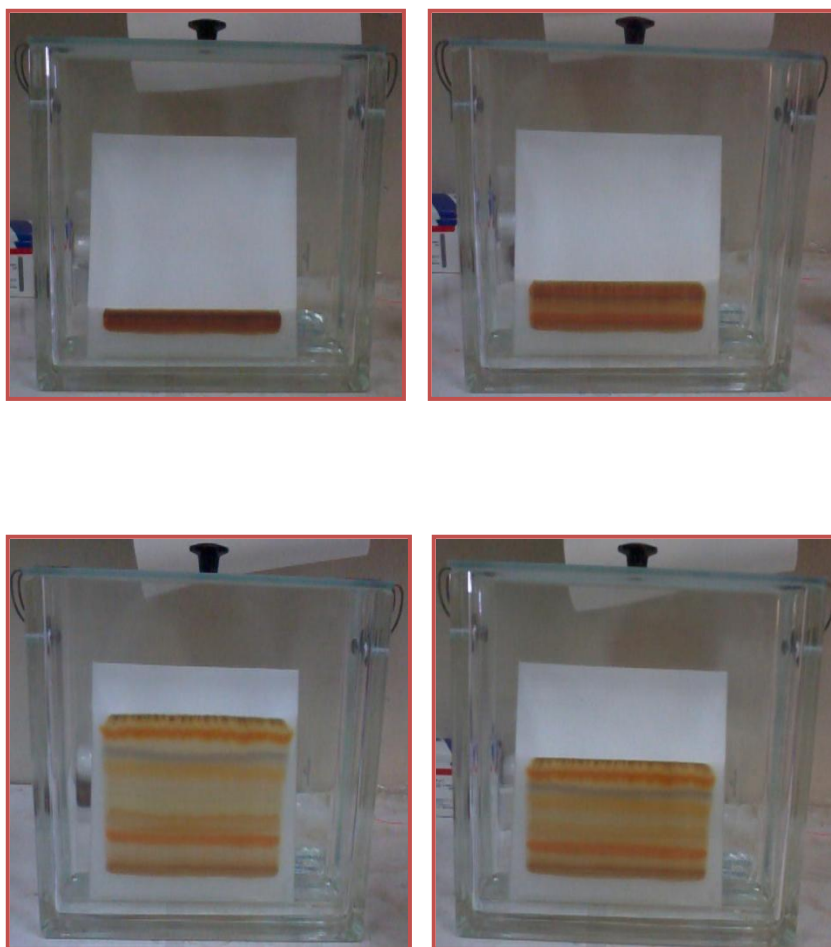


Figura 23. Desarrollo de la Cromatografía preparativa (CP) con el extracto de RSCA

Se obtuvieron las cuatro bandas más relevantes y con buena separación de acuerdo al perfil observado en la TLC.

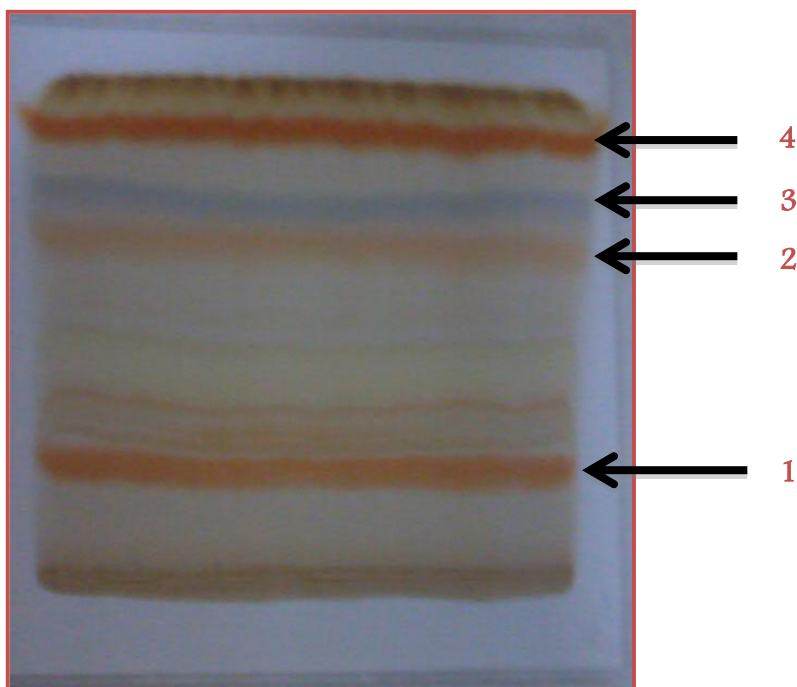


Figura 24. Principales bandas para separación

Estando bien identificadas las bandas de interés, se realizó un raspado de la silica con una espátula; Una vez obtenido el polvo del raspado, se hizo la extracción del producto utilizando acetato de etilo como disolvente y concentrando después con rotaevaporador.

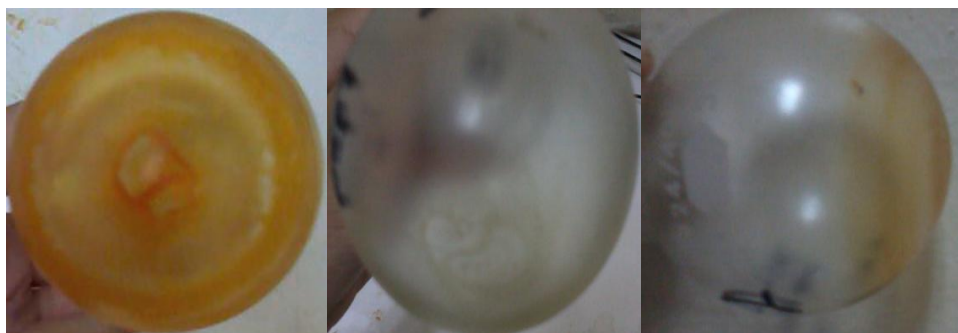


Figura 25. Productos de la CP

EVALUACIÓN QUÍMICA Y BIOLÓGICA



EVALUACIÓN QUÍMICA Y BIOLÓGICA *IN VITRO* DE EXTRACTOS.

Los 3 extractos a evaluar pertenecen a diferentes polaridades *n*-hexano, acetato de etilo y metanol/ agua), como ya se revisó anteriormente en el apartado de su extracción, dichos extractos fueron estudiados con los siguientes ensayos químicos y biológicos *in vitro*:

A. Evaluación química.

- Determinación de Fenoles totales
- Determinación de Flavonoles totales
- Reducción del radical libre DPPH
- Decoloración oxidativa del β -caroteno

B. Evaluación biológica.

- Inhibición de la xantina oxidasa
- Actividad antibacteriana
- Actividad antifúngica

Todos los ensayos se realizaron por triplicado, con algunas pocas excepciones que se mencionaran al describir la técnica.

DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES

El contenido de fenoles fue determinado acondicionando al método descrito por Ivanova y *col* (2005). Los métodos usados comúnmente para determinar y cuantificar fenoles totales en alimentos y vegetales son el ensayo de la vainillina que consiste en la determinación de compuestos flavan-3-ol, dihidrochalconas y procianidinas que contienen una unión simple en la posición 2,3 y poseen grupos hidroxilos en la posición meta del anillo (Martínez-Valverde y *col*, 2000) y el método de Folin-Ciocalteu.

El método de Folin-Ciocalteu se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes, ya que el reactivo contiene molibdato y tungstato de sodio, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula.

Procedimiento.

1. Se pesa 1mg de extracto y se disuelve en 1ml de etanol.
2. Se realizan 10 diluciones por triplicado para el ensayo.
3. A todos los tubos se les adicionan 3 ml de agua destilada.
4. Se toman 100 μ l del extracto y se adicionan al primer tubo, realizando diluciones seriadas y desechando el sobrante del último tubo.
5. Se adicionan 500 μ l del reactivo de Folin-ciocalteau y se deja reposar la disolución por 3 minutos.
6. Se agregan 2 ml de disolución de carbonato de sodio al 20%.
7. Se mezcla todo y se deja reposar por 1 hora a en condiciones ambientales de luz y temperatura.
8. Se determina la absorbancia a 650 mn.

DETERMINACIÓN DE FLAVONOLES TOTALES

La presencia de hidroxilos fenólicos en diferentes posiciones de la molécula puede establecerse estudiando el comportamiento del espectro UV metanólico al añadirle los denominados reactivos de desplazamiento: metóxido de sodio (NaOMe), acetato de sodio (NaOAc), cloruro de aluminio (AlCl_3) con y sin HCl, y ácido bórico (H_3BO_3), formándose quelatos.

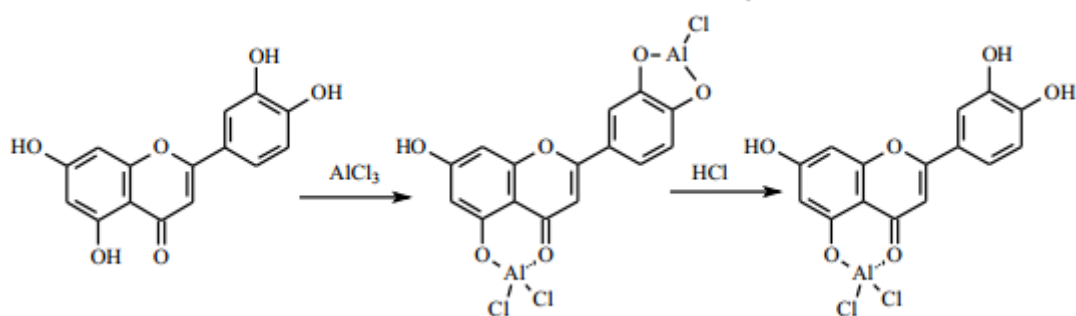


Figura 26. Reacción de flavonoles con cloruro de aluminio

Para cuantificar los flavonoides se determinó la absorbancia, a 428 nm del complejo flavonoides-aluminio, obtenido por reacción del extracto con una disolución metanólica de AlCl_3 al 2%.

Procedimiento.

1. Se pesa 1mg del extracto y se disuelve en 1 ml de metanol teniendo una concentración de 1mg/ml.
2. Se prepara una disolución de AlCl_3 al 2% en metanol.
3. Se realizan 10 diluciones por triplicado.
4. Al primer tubo se adicionan 500 μl de la disolución extracto/metanol y se continúan con las diluciones seriadas en los 9 tubos restantes, desechando los 500 μl del último tubo.

5. Se agrega 1 ml de disolución de AlCl_3 al 2 % a todos los tubos.
6. Se incuban por 1 hora a temperatura ambiente.
7. Se determina la absorbancia a 448 nm.

REDUCCIÓN DEL RADICAL LIBRE DPPH.

Este método consiste en determinar la actividad antioxidante de los compuestos en términos de su capacidad donadora de hidrógenos o neutralizadora de radicales utilizando el método descrito por Cuendet (1997).

En este trabajo se realizó la determinación espectrofotométrica utilizando el método descrito por Pérez y colaboradores (2010).

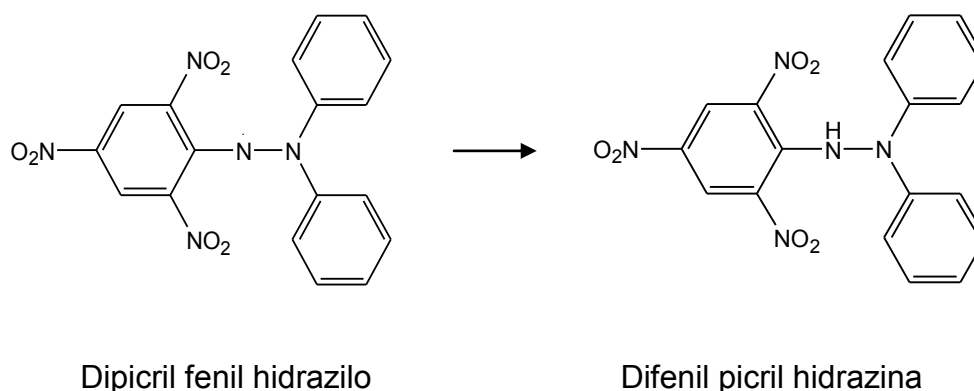


Figura 27. Reducción del radical DPPH

En esta técnica, los compuestos activos reducen el radical difenil picril hidrazilo (DPPH, por sus siglas en inglés) al compuesto incoloro dipicril fenil hidrazina.

Procedimiento.

1. Se prepara una disolución de DPPH 125 μM en etanol. Se utiliza esta concentración con el propósito de cumplir con la Ley de Beer.

2. Para los extractos, se pesa 1mg y se disuelve en 1ml de etanol. Utilizar un Sonificador para ayudar a disolver los extractos con los que se presentan problemas.
3. Una vez disueltos todos los extractos, se agregan 500 μ l de etanol a todos los tubos (10 tubos por triplicado más 2 controles).
4. Se añaden 500 μ l del extracto al primer tubo, para realizar después diluciones seriadas en los 9 tubos restantes, tomando 500 μ l y pasándolos al siguiente tubo y así sucesivamente, en el décimo tubo se desechan los 500 μ l.
5. Se añaden 500 μ l de solución de DPPH 125 μ M a todos los tubos.
6. Se dejan en reposo por 30 minutos en la oscuridad.
7. Se realiza la lectura en una celda de cuarzo a 517 nm utilizando un blanco de etanol.
8. La curva de calibración y control positivo se realizan con el antioxidante Quercetina.

Se promedian las absorbancias obtenidas para realizar los cálculos y obtener el % de reducción de DPPH, con el cual se realiza la gráfica correspondiente y se obtiene la C_{50} .

DECOLORACIÓN OXIDATIVA DEL β -CAROTENO

Esta técnica se considera colorimétrica ya que la oxidación sucesiva del β -caroteno debido al medio oxidativo que se genera, conlleva a la pérdida de coloración de la disolución utilizada en el experimento a tiempo 0. Cuando la muestra a evaluar presenta actividad antioxidante significa que esta efectúa una protección del β -caroteno frente a la oxidación y por lo tanto la decoloración de la disolución será lenta o nula.

Procedimiento.

1. Se somete a burbujeo con aire el agua destilada.
2. Se realiza una disolución de β - caroteno (0.5 mg de β -caroteno disuelto en 1 mL de cloroformo).
3. Se prepara la emulsión con 25 μ L de ácido linoléico y 200 μ L de Tween 20.
4. A esta emulsión preparada se le adiciona 1 mL de la solución de β -caroteno (1 mL por cada 100 mL de emulsión preparada).
5. Se agita y se deja evaporar el cloroformo.
6. Una vez evaporado, se adicionan 100 mL de agua destilada (previamente en constante burbujeo de aire durante 1 hora).
7. Agitar vigorosamente hasta la formación total de la emulsión.
8. Pesar 2 mg de extracto y hacer una disolución con concentración 2 mg/ mL en el disolvente que más le favorezca al extracto.
9. Se toman 350 μ L de la disolución del extracto y se adicionan a cada tubo (cada extracto por triplicado), posteriormente a cada tubo se agregan 2.5 mL de la emulsión.

10. Posteriormente se mide la absorbancia a 470 nm inmediatamente después de agregar la emulsión (t=0 minutos). Las subsecuentes lecturas de absorbancia fueron registradas en intervalos de 15 minutos manteniendo los tubos en baño maría a 50 °C por 120 minutos.

Las absorbancias obtenidas se promediaron para realizar los correspondientes cálculos, el porcentaje de actividad antioxidante se determinó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Actividad antioxidante} = 100 [1 - (Am^0 - Am^{120}) / (Ac^0 - Ac^{120})]$$

Dónde:

Am^0 = absorbancia de la muestra a 0 minutos.

Am^{120} = absorbancia de la muestra a 120 minutos.

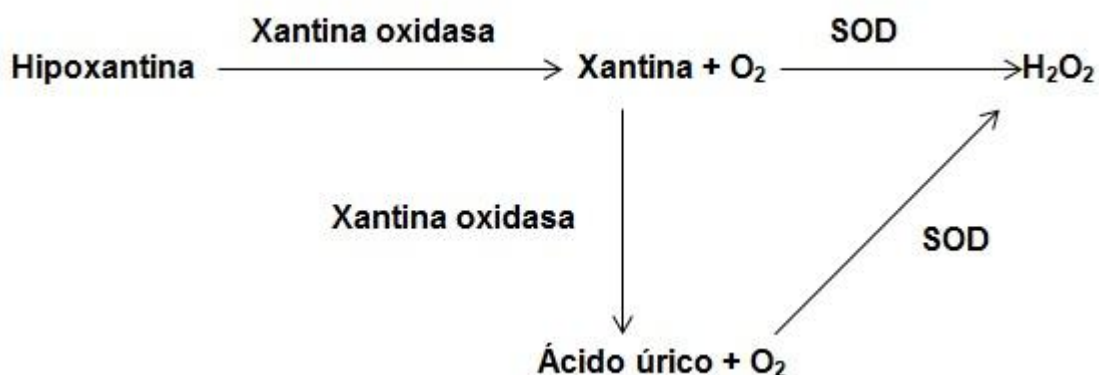
Ac^0 = absorbancia del control a 0 minutos.

Ac^{120} = absorbancia del control a 120 minutos.

Para el control positivo, se utiliza α - tocoferol utilizando como disolvente metanol y como control negativo se utilizan los 4 disolventes utilizados en esta prueba, *n*-hexano, acetato de etilo, agua y metanol.

INHIBICIÓN DE LA XANTINA OXIDASA

La xantina oxidasa (XO), es una enzima clave que cataliza la oxidación de hipoxantina o xantina hasta ácido úrico. Durante la reoxidación de la XO, el oxígeno molecular actúa como un aceptor de electrones produciendo radical superóxido y peróxido de hidrógeno. La XO es de alta importancia biológica como generador de radicales peróxidos; luego la inhibición de XO es un medio terapéutico para prevenir la artritis y la gota.



Esquema 1. Esquema de la acción metabólica de la Xantina oxidasa

La gota es una enfermedad de hombres adultos, ya que sólo el 5% se presenta en mujeres. Se encuentran antecedentes familiares positivos en el 10-15% de los casos. La prevalencia en caucásicos corresponde al 0.13-0.37%, sin que existan estudios epidemiológicos en México.

Aunque la causa más común de enfermedad por depósito de cristales es el ácido úrico, debe tenerse presente la posibilidad de que otros cristales provoquen problemas articulares.

Esta enfermedad es resultado de la ausencia de uricasa para degradar ácido úrico hasta allantoina. El ácido úrico es el metabolito terminal de las purinas en el hombre, por catabolismo de ácidos nucleicos (hipoxantina, guanina, adenina y xantina), convertidas en ácido úrico mediante xantino-oxidasa.

El alopurinol inhibe la xantina-oxidasa mediante su metabolito activo el oxipurinol y disminuye la síntesis de ácido úrico; aunque la experiencia de su uso durante 25 años ofrece una seguridad satisfactoria, se debe ponderar su uso, ya que se administrará por largos periodos, incluso de por vida, y puede presentar hipersensibilidad, con lesiones cutáneas y hepatotoxicidad.

Procedimiento.

El amortiguador concentrado se prepara pesando 3.402 g de fosfato monobásico de potasio y 4.35 g de fosfato dibásico de potasio, ambos disueltos en 50 mL de agua destilada cada uno (las concentraciones de cada disolución son 0.5 M). Se mezclan ambas soluciones de fosfatos hasta llegar a un pH de 7.8, de no ser posible, ajustar con NaOH 1M. Se pesó 1.9 mg de Xantina y se disuelve en 50 mL de amortiguador 1:10. Se utiliza una disolución enzimática de xantina oxidasa 19 μ U/mL. Como control positivo se utiliza 1 mg/mL de alopurinol.

Los extractos se preparan a partir de 2 mg/mL, disolviéndolos completamente en agua o ayudando con el disolvente de su extracción, una vez verificado que la cantidad a utilizar de disolvente no tenga una inhibición significativa de la enzima. Por lo general se utilizan 40 μ L y el resto de agua destilada para llevar a 1 mL. Si el extracto es muy activo a esas concentraciones se hacen más diluciones.

El ensayo se hizo por cuadruplicado, descartando el valor menos cercano a los demás, para quedar con un número total de resultados de 3. Se tomaron las absorbancias en un espectofotómetro UV a 219 nm a 24 °C de temperatura.

1. Control enzimático: 250 μ L amortiguador, 200 μ L xantina y 50 μ L xantina oxidasa
2. Control disolvente: 150 μ L amortiguador, 200 μ L xantina, 100 μ L disolvente y 50 μ L xantina oxidasa.
3. Control positivo: -- μ L Amortiguador, 200 μ L xantina, 25-2 μ L alopurinol y 50 μ L xantina oxidasa. La cantidad de amortiguador se ajusta dependiendo de los μ L de alopurinol empleados, hasta llegar a un total de 500 μ L en la celda.

4. Extractos: -- μL amortiguador, 200 μL xantina, 100-2 μL extracto y 50 μL xantina oxidasa. La cantidad de amortiguador se ajusta dependiendo de los μL de extracto empleados, hasta llegar a un total de 500 μL en la celda.

Cálculos: $100 - x = \%$ de Inhibición de Xantina Oxidasa

Dónde: $x = (\text{Promedio abs de extracto}) (100\%) / \text{Actividad enzimática}$.

Dado a que se realiza este ensayo a diferentes concentraciones, se realiza una curva (concentración vs % inhibición). Se obtiene la ecuación de la recta y así obtener la concentración necesaria para obtener el 50% de inhibición de la acetilcolinesterasa (IC50 del extracto).

ENSAYOS ANTIMICROBIANOS Y ANTIFUNGICOS

El interés por las pruebas de sensibilidad *in vitro* de los agentes antibacterianos y antifúngicos ha aumentado en los últimos años debido al incremento del número de cepas resistentes y a la disponibilidad de nuevos agentes antibacterianos y antimicóticos. Estas pruebas permiten obtener datos confiables para orientar la terapia en padecimientos relacionados.

La cuantificación de la actividad *in vitro* de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante algunas de las variantes de los métodos de dilución y reportando la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de 24 horas de incubación a 37°C.

Procedimiento

1. Un día anterior a realizar el bioensayo, se resiembran las cepas en medios de cultivo nuevos, para tener cultivos jóvenes de 24 hrs.

Hongos y levaduras: Medio RPMI

Bacterias: Mueller-Hinton

2. Se esteriliza el siguiente material:
 - Placa Petri (grande)
 - Puntillas para micropipeta (diferentes volúmenes, según los requerido en el ensayo).
 - Tubos de ensayo con tapa de rosca que contengan 4 mL de agua destilada para cada cepa
 - Jeringas para dispensador.
3. Se pesa 6 mg de extracto en un eppendorf.
4. Al día siguiente se verifica que haya crecimiento en las placas inoculadas el día anterior.
5. Se disuelve el extracto de la siguiente manera:
 - a. Se adiciona 50 μ L de DMSO y se agita en vortex.
 - b. En caso de no disolverse, se coloca en ultrasonido por 10 minutos.
 - c. Se agrega por duplicado 725 μ L de medio de cultivo correspondiente y se agita en vortex.
6. Al encender la campana se limpia con etanol al 70% v/v y se coloca dentro únicamente el material que se va a utilizar y previamente estéril.
7. El espectrofotómetro se calibra de la siguiente manera:
 - a. Se coloca el blanco en el espectrofotómetro con la marca impresa en el tubo en forma de diamante hacia el operador.
 - b. Se presiona el botón “zero set” y en absorbancia con la rosca “zero” se ajusta a 0.
 - c. En transmitancia, se ajusta a 100%.
8. Con técnica aséptica se toma un inóculo y este se resuspende en tubo de ensayo con agua destilada previamente esterilizada.

9. Se ajustó la suspensión al 0.5 de McFarland, tomando las lecturas de absorbancia o transmitancia.

Tipo	Longitud de onda	Lectura
Bacterias	625 nm	0.08 a 0.1 de absorbancia
Levaduras	530 nm	85% de transmitancia

Tabla 5. Especificaciones de espectrofotometría para cada microorganismo

- a. En caso de levaduras, si se tiene una transmitancia menor a 85%, agregar más inóculo al tubo hasta obtener una transmitancia de 85.0 – 85.9%
 - b. Si la lectura de transmitancia es mayor a 86%, en condiciones asépticas tomar un tubo con agua destilada estéril y agregar agua lo suficiente para llegar al rango de 85.0 – 85.9% (Nota: el tubo con agua destilada estéril que se abrió ya no se descarta).
10. Se abrió una placa de 96 pocillos y con pipeta multicanal se colocó en todos los pozos 100 µL de medio de cultivo.
11. Se adicionó al primer pocillo de cada hilera 100 µL de extracto previamente disuelto.
12. Se realizaron diluciones con la pipeta multicanal. Se tomaron 100 µL del primer pocillo y se pasaron al segundo pocillo, se agitó con puntilla, se tomaron 100 µL del segundo pocillo y se pasan al 3er pocillo, así sucesivamente hasta terminar. Del último pocillo se tomaron 100 µL y se desecharon para obtener la concentración de extracto deseada.
13. Para levaduras: Se tomó un tubo vacío estéril y se adicionó 950 µL de medio de cultivo y 50 µL de la solución de la cepa previamente ajustada. A

un segundo tubo, se agrega 5 veces 950 μL de medio de cultivo y 100 μL de la solución del primer tubo. Se repite en un tercer tubo.

14. Con un dispensador en el número 4 acoplado a una jeringa previamente estéril, se coloca la solución de la cepa 1:50 en cada pocillo EXCEPTO en los pocillos de control negativo. Se incubó a 37°C.
15. Con ayuda de lámpara de luz clara se toma lectura visual a las 24 horas anotando resultados. Se confirman los resultados con una lectura a las 48 horas.
16. Se aseguran las placas y se envuelven con papel estraza para esterilizar en autoclave.
17. Se utiliza una placa de 96 pozos para una sola especie de microorganismo y diferentes extractos.
18. Las lecturas visuales se realizan a las 24 y 48 hrs.
19. Se reporta como concentración mínima inhibitoria.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS



PRUEBAS COLORIMÉTRICAS



Los resultados obtenidos de la realización de las pruebas fitoquímicas preliminares se muestran en la siguiente tabla:

Prueba	Método (s)	Resultados		
		RSCH	RSCA	RSCM
Alcaloides	Mayer	Negativo	Negativo	Negativo
	Dragendorff	Negativo	Negativo	Negativo
	Wagner	Negativo	Negativo	Negativo
Taninos	Cloruro férrico	Positiva	Positiva	Negativo
	Gelatina	Positiva	Positiva	Negativo
Esteroides y triterpenoides	Lieberman – Burchard	Positiva	Positiva	Negativo
Flavonoides	Shinoda	Negativo	Negativo	Negativo
Antocianinas	Cambio de pH	Positiva	Positiva	Positiva
Carbohidratos	Benedict	Positiva	Negativo	Positiva
Saponinas	Espuma	Negativo	Negativo	Positiva
Glucósidos antraquinónicos	Borntrager	Negativo	Negativo	Negativo

Tabla 6. Resultados de las pruebas fitoquímicas preliminares

De las 8 pruebas para identificación de posibles metabolitos secundarios, la fracción con mayor número de pruebas positivas fue RSCH, siendo positivo para taninos, esteroides y triterpenoides, antocianinas y carbohidratos, RSCA resulto positiva para taninos, esteroides y triterpenoides así como para antocianinas, y finalmente RSCM solo fue positiva para antocianinas, carbohidratos y saponinas.

Las 3 fracciones coincidieron en el contenido de antocianinas, lo cual explicaría su coloración.

RSCH y RSCA presentaron el mismo resultado para taninos y esteroides y triterpenoides.

RSCH y RSCM fueron positivas para carbohidratos y la única que presento actividad distinta fue RSCM positivo a saponinas con el método de espuma, sin embargo, en esta fracción, al ser la más polar, podemos encontrar la mayor parte de los azúcares, los cuales al ser agitados presentan espuma sin necesidad de la presencia de saponinas.

EVALUACIÓN QUÍMICA Y BIOLÓGICA



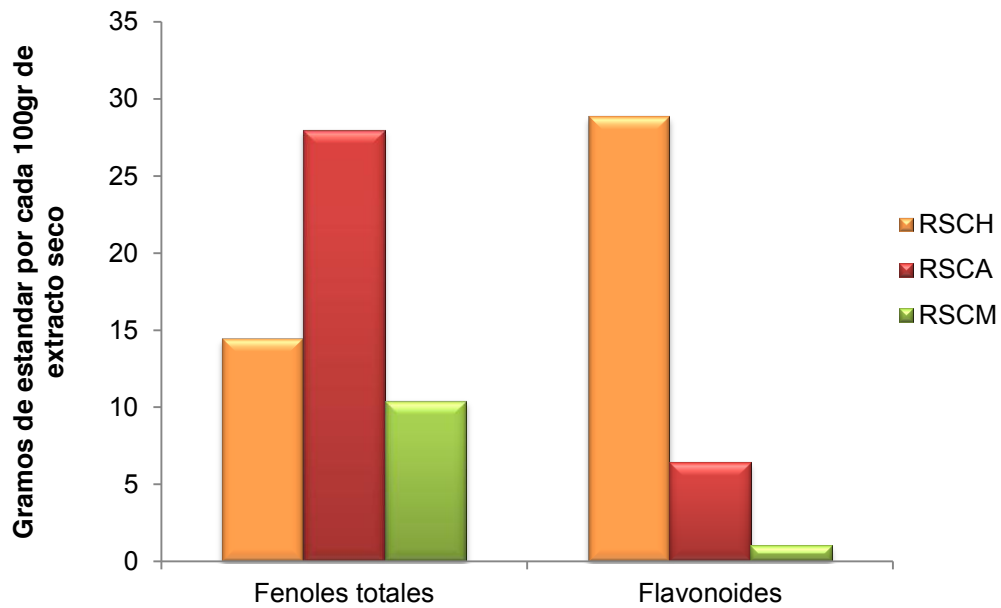
8. Análisis cuantitativo de compuestos polifenólicos totales y flavonoides.

Fenoles totales		Flavonoides	
g ag/100g ext		gr q/100 gr	
RSCH	15	RSCH	29
RSCA	28	RSCA	6
RSCM	10	RSCM	1

Tabla 7. Resultados técnicas de fenoles y flavonoides

gr ag/100gr: Gramos equivalentes de ácido gálico por cada 100 gramos de extracto seco

gr q/100gr: Gramos equivalentes de quercetina en 100 gr de extracto seco.



Gráfica 1. Resultados técnicas de fenoles y flavonoides

Como observamos en los resultados, el extracto de RSCA presenta un alto contenido de fenoles, 28 gr ag/100gr, mientras que las otras dos fracciones presentan un contenido moderado pero muy bajo con respecto al de RSCA.

En relación al estudio de flavonoles, la mayor concentración la encontramos en la fracción RSCH con una cantidad de 29 gr q/100gr seguido de RSCA con 6 gr q/100gr y por ultimo RSCM con una cantidad mucho menor.

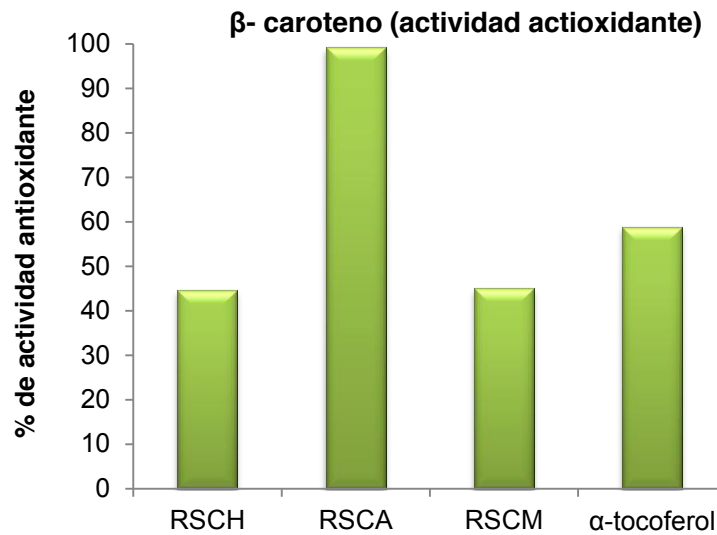
⌘ Actividad antioxidante por la técnica de reducción del DPPH y el método de la decoloración oxidativa del β -caroteno

β - caroteno		DPPH	
Muestra	% AA	Muestra	CE ₅₀ (μ g/ mL)
RSCH	45	RSCH	32
RSCA	99	RSCA	10
RSCM	45	RSCM	41
*Control	59		

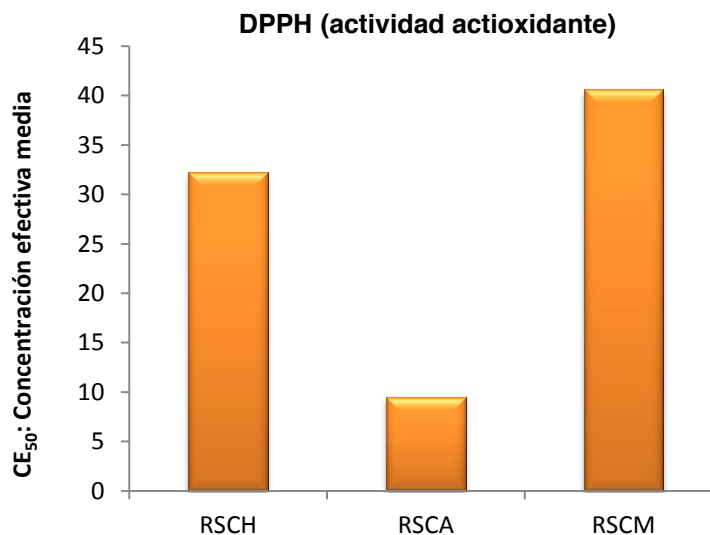
Tabla 8. Resultados técnicas actividad antioxidante por los métodos de β -caroteno y DPPH

% AA: % de actividad antioxidante, CE₅₀: Concentración efectiva media

*Control= α -tocoferol



Gráfica 2. Resultados actividad antioxidante por el método de β -caroteno



Gráfica 3. Resultados actividad antioxidante por el método de DPPH

Al analizar los resultados de actividad antioxidante obtenidos por el método de decoloración oxidativa del β -caroteno la fracción con mejor resultados fue RSCA con un 99% de actividad antioxidante, superando por mucho la actividad que

presento el control positivo (58%), con respecto a los resultados de actividad antioxidante con la técnica de reducción del radical libre DPPH, una vez más, el mejor resultado se observó de la fracción RSCA con una concentración efectiva media de 10 µg/ml.



Figura 28. Actividad antioxidante por el método de DPPH

⌘ Actividad antibacteriana

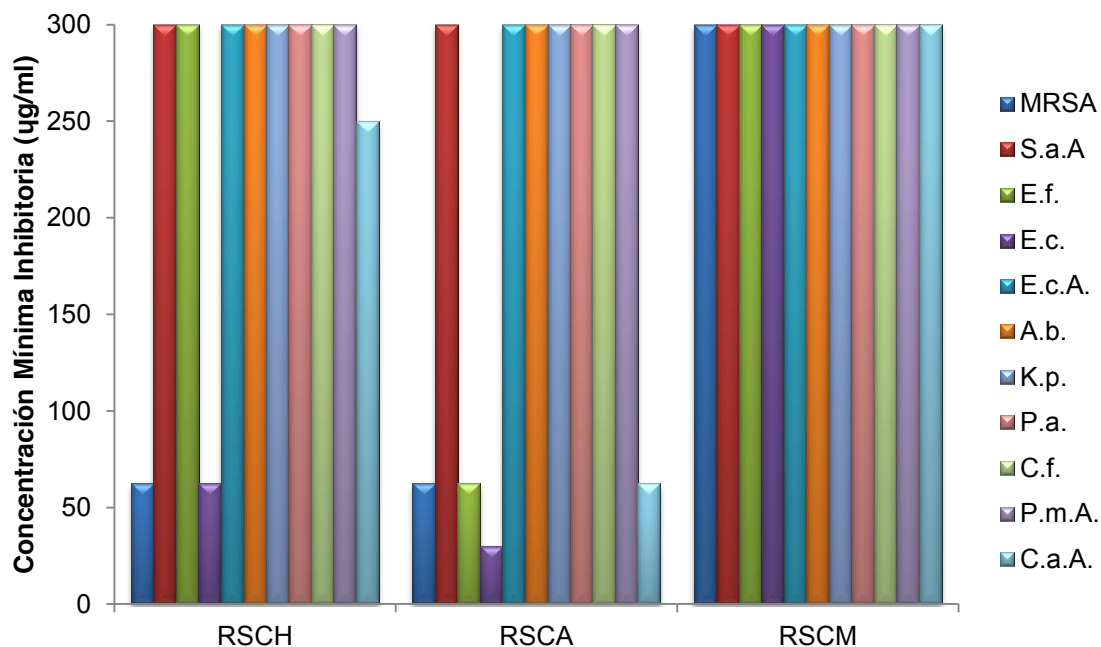
	RSCH	RSCA	RSCM
Cepa	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) (µg/ mL)		
MRSA	62.5	62.5	>1000
S.a.A	>1000	>1000	>1000
E.f.	125	62.5	>1000
E.c.	62.5	<31.25	>1000
E.c.A	>1000	>1000	>1000
A.b.	>1000	>1000	>1000
K.p.	>1000	>1000	>1000
P.a.	>1000	>1000	>1000
C.f.	>1000	>1000	>1000
P.m.A	>1000	>1000	>1000
C.a.A	250	62.5	>1000

Tabla 9. Resultados ensayos antimicrobianos

RSCH: raíz *Salvia clevelandii* hexano; **RSCA:** raíz *Salvia clevelandii* acetato de etilo; **RSCM:** raíz *Salvia clevelandii* metanol/ agua; **MRSA:** *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina; **S.a A:** *Staphylococcus aureus* ATCC 12598; **E.f.:** *Enterococcus faecalis*; **E.c.:** *Escherichia coli*; **E.c.A:** *Escherichia coli* ATCC 25922; **K.p.:** *Klebsiella pneumoniae*; **A.b.:** *Acinetobacter baumannii*; **P.a.:** *Pseudomonas aeruginosa*; **C.f.** *Citrobacter freundii*; **P.m.A:** *Proteus mirabilis* ATCC 12453; **C.a.A:** *Candida albicans* ATCC 10231;



Figura 29. Bacterias utilizadas en los ensayos antimicrobianos



Gráfica 4. Resultados ensayos antimicrobianos

La fracción más activa en los ensayos antimicrobianos fue la RSCA, presentando buena actividad con cuatro de las cepas utilizadas en el estudio, 62.5 µg/ml contra *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina, *Enterococcus faecales* y *Candida albicans* ATCC 10231, mientras que obtuvo una concentración menor a 31.25 µg/ml contra *Escherichia coli*.

La fracción RSCH tuvo una buena actividad contra las cepas *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina y *Escherichia coli*, con una concentración de 62.5 µg/ml para ambas.

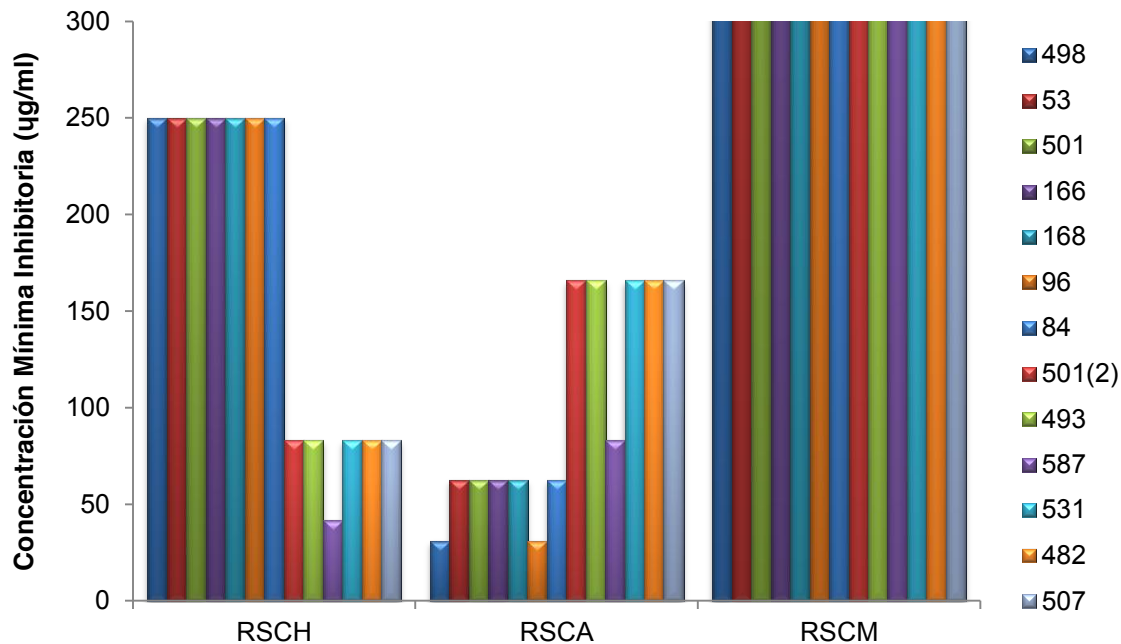
RSCM no presento en estos experimentos ningún resultado de relevancia

🔗 Actividad antifúngica

	RSCH	RSCA	RSCM
Cepa	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) (µg/ mL)		
498	250	<31.25	>1000
53	250	62.5	>1000
501	250	62.5	>1000
166	250	62.5	>1000
168	250	62.5	>1000
96	250	<31.25	>1000
84	250	62.5	>1000
501	83	166	>666
493	83	166	>666
587	41.5	83	>666
531	83	166	>666
482	83	166	>666
507	83	166	>666

Tabla 10. Resultados ensayos antifúngicos

RSCH: raíz *Salvia clevelandii* hexano; **RSCA:** raíz *Salvia clevelandii* acetato de etilo; **RSCM:** raíz *Salvia clevelandii* metanol/ agua; **498:** *C. albicans*; **53:** *C. albicans*; **501:** *C. albicans*; **166:** *C. tropicalis*; **168:** *C. tropicalis*; **96:** *C. parapsilosis*; **84, 501, 493, 587, 531, 482, 507:** *C. glabrata*



Gráfica 5. Resultados ensayos antifúngicos

La fracción RSCH mostro resultados con concentraciones por debajo de 250 µg/ml frente a todas las cepas, encontrándose concentraciones de 83 µg/ml y destacando una de 41.5 µg/ml contra la cepa *Candida glabrata*, mientras que RSCM fue la menos bioactiva arrojando datos de concentraciones mayores a 700 µg/ml, presentando así la actividad más pobre.

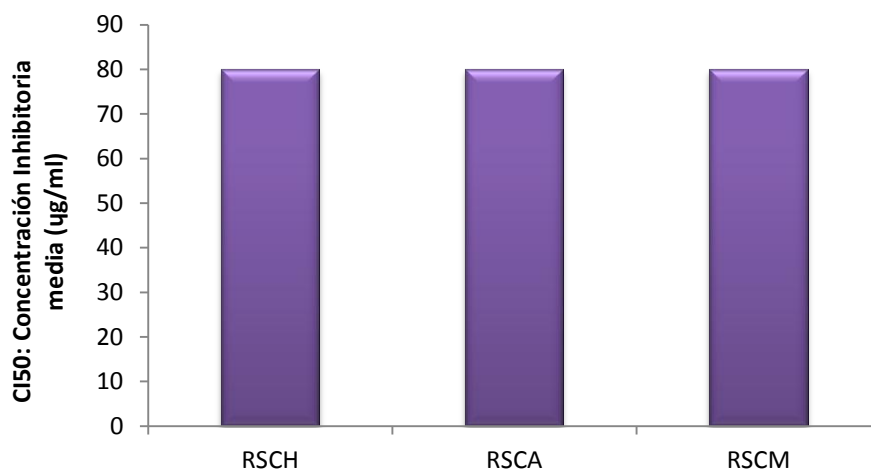
La fracción que presento un mejor perfil en este bioensayo fue de nuevo RSCA con concentraciones de 166 µg/ml, las más grandes, 62.5 µg/ml y destacando notoriamente con <31.25 unidades contra las cepas *Candida albicans* y *Candida parapsilosis*.

8. Inhibición de la xantina oxidasa

	CI_{50} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
RSCH	> 80
RSCA	> 80
RSCM	> 80

Tabla 11. Resultados ensayo de inhibición de la enzima xantina oxidasa

CI_{50} : Concentración Inhibitoria media



Gráfica 6. Resultados ensayo de inhibición de la enzima xantina oxidasa

Todas las fracciones presentaron una baja actividad en este bioensayo presentando concentraciones mayores a 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$, considerándose de poco interés frente a los resultados encontrados en la literatura

AISLAMIENTO DE METABOLITOS SECUNDARIOS



De la cromatografía preparativa obtuvimos 4 bandas mayoritarias, las cuales fueron etiquetadas de la siguiente manera:

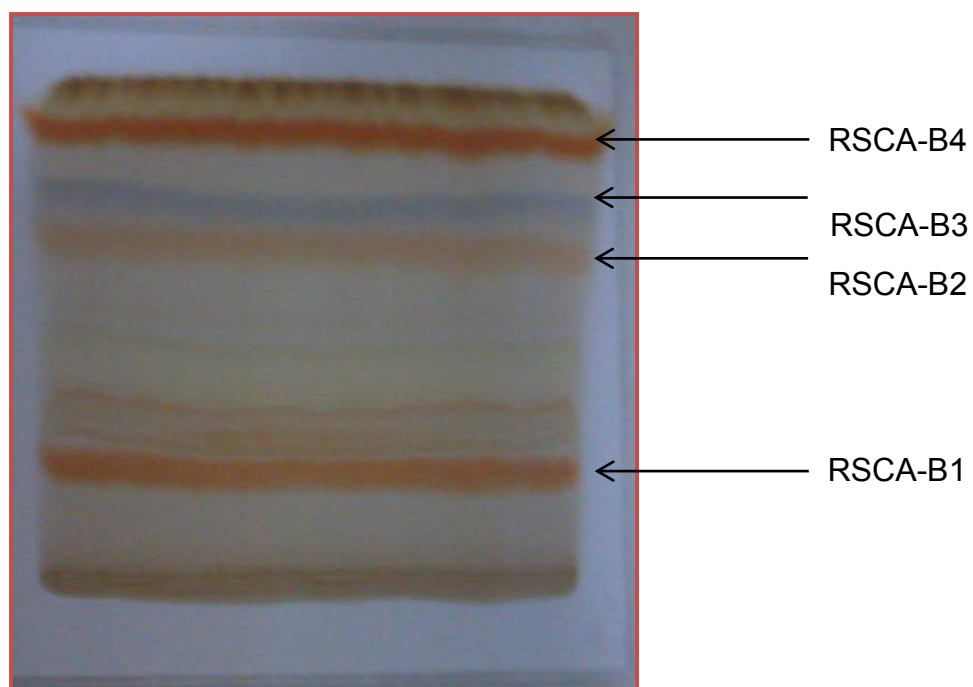


Figura 30. Principales bandas para separación

Banda	Cantidad (miligramos)
RSCA-B1	17.5
RSCA.B2	6.4
RSCA-B3	9.2
RSCA-B4	9.1

Tabla 12. Miligramos de producto obtenido de la CP

Una de las bandas de aspecto mayoritario que se analizaron para su caracterización fue la RSCA-B1. Este compuesto se aisló en una cantidad de 17.5 mg como un sólido color anaranjado.

La información obtenida del análisis con espectrometría de masas, nos indica la presencia de un ion molecular a m/z 312.20, con fragmentos característicos a 254 y 281. Esta información confirma un compuesto con fórmula molecular de $C_{19}H_{20}O_4$.

En el espectro de RMN 1H se observan señales a 7.52 y 7.66 δ cpm constantes de acoplamiento de $J = 8.0$ y 8.4 Hz respectivamente, correspondientes a protones vecinales de la región aromática; a 1.31 δ se identifica la presencia de dos metilos anulares característicos de esqueletos de diterpenos de tipo abietano; y dos tripletes a 4.95 y 4.49 δ que indican la presencia de hidrógenos diasteroméricos. El resto de las asignaciones de protón se presentan en la siguiente tabla:

No. Protón	δ_H m (J Hz)	No. Protón	δ_H m (J Hz)
H-1	3.22 s ancho, 2H	H-16b	4.49, t, 1H (Hz)
H-2	1.79 m, 2H	H-17a	3.79, d
H-3	1.66, m 2H	H-17b	3.79, d
H-6	7.52, d, 1H (8.0 Hz)	H-18	1.31, s
H-7	7.66, d, 1H (8.4 Hz)	H-19	1.31, s,
H-15	3.76, m, 1H	O-H	
H-16a	4.95, t, 1H, (9.2 Hz)		

Tabla 13. Asignaciones de señales para protón

En el espectro de RMN ^{13}C realizado al compuesto de interés, se observaron 19 átomos de carbono (9 singletes, 3 dobletes, 5 tripletes y 2 cuartetos), donde destaca la posible presencia de dos carbonilos de tipo cetónico a 183.7 y 176.4 δ .

Todas las señales fueron confirmadas con experimentos DEPT y de correlación heteronuclear HSQC. Cabe mencionar que estos datos están de acuerdo con una estructura de diterpeno quinónica, para esta sustancia.

A continuación se muestra en la siguiente tabla, el resto de la señales de carbono 13:

Carbono	δ_c (m)	Carbono	δ_c (m)
C-1	29.7 (t)	C-11	183.7 (s)
C-2	19.2 (t)	C-12	176.4 (s)
C-3	37.7 (t)	C-13	127.7 (s)
C-4	34.9 (s)	C-14	173.2 (s)
C-5	144.0 (s)	C-15	43.4 (d)
C-6	132.7 (d)	C-16	77.2 (t)
C-7	122.8 (d)	C-17	64.2 (t)
C-8	128.1 (s)	C-18	31.8 (q)
C-9	125.6 (s)	C-19	31.9 (q)
C-10	153.3 (s)		

Tabla 14. Asignaciones de señales para carbono

Después de analizar detenidamente los experimentos bidimensionales COSY y HMBC, y de revisar la información encontrada en la bibliografía con respecto a esqueletos de tipo tanshinonas, se deduce que la estructura molecular de este compuesto es el producto natural conocido como: **17-hidroxi-critotanshinona**.

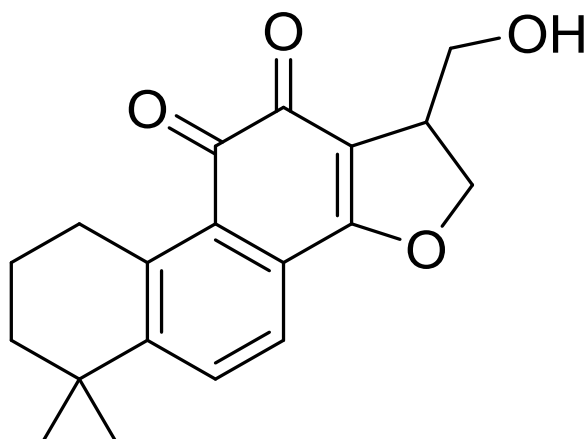


Figura 31. 17-hidroxi-critotanshinona

CONCLUSIONES



- I. El resultado del análisis cuantitativo de polifenoles totales y flavonoides, sugiere que la pruebas colorimétricas realizadas con estándares de productos naturales para la identificación cualitativa de metabolitos secundarios, funciona solo cuando estos se encuentran en la planta en concentración mayoritaria.
- II. Los estudios de actividad antioxidante utilizando las técnicas de la decoloración oxidativa del B-caroteno y la reducción del radical libre DPPH, muestran que el extracto obtenido de la extracción con acetato de etilo (RSCA), es el más eficiente para frenar procesos de oxidación.
- III. La relación de la mayor abundancia de flavonoides que se observa en el extracto hexánico de la raíz (RCSH), con los resultados obtenidos de este extracto en los ensayos de la decoloración oxidativa del B-caroteno y la reducción del DPPH, sugiere que existen en la raíz otros productos naturales con mejor perfil antioxidante que los flavonoides y los compuestos polifenólicos.
- IV. Los resultados obtenidos de los bioensayos antibacterianos y antifúngicos, indican que el extracto RSCA fue el mejor candidato para la identificación, purificación y caracterización de metabolitos con perfil antimicrobiano.
- V. Los datos espectroscópicos y los experimentos de correlación homonuclear COSY ^1H - ^1H y heteronuclear a uno y tres enlaces HSQC y HMBC, permitieron deducir que el metabolito aislado de la raíz de *S. clevelandii* es un compuesto de la familia de las tanshinonas conocido como: **17-hidroxi-criptotanshinona** con la estructura molecular de: 14,16-epoxi-17-hidroxi-20-nor-abieta-5(10),6,8,13-tetraeno-11,12-diona.
- VI. Los resultados observados de los estudios *in vitro* realizados con los extractos de la raíz de *Salvia clevelandii*, confirman que los productos naturales de polaridad media, son en general los de mayor bioactividad en las plantas del genero salvia.

BIBLIOGRAFÍA



1. Aguilar M.I., Delgado G., Bye R. & Linares M.E., 1993. "Bisabolenes, Polycyclic diterpenoids and other constituents from the roots of *Iostephane heterophylla*". *Phytochemistry*, 33: 1161–1163.
2. Amorin, J.L. (1988) *Rev. Inf. Fcia. y Bioq.* N° 329, Bs. As. pág. 80.
3. Andrade-Cetto A and Heinrich M. (2005) Mexican plants with hypoglycemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology* 99(3) 325-348.
4. Bais, H.; Vepachedu, R.; Gilroy, S.; Callaway, R.; Vivanco, J.; *Science* 2003, 301, 1377
5. Barboza, G.E.; N. Bonzani; E.M. Filippa; M.C. Luján; R. Morno; M. Bugatti; N. Decolatti & L. Ariza Espinar (2001) "*Atlas histo-morfológico de plantas de interés medicinal de uso corriente en Argentina*". Museo Botánico Córdoba. Serie Especial I: 79-81.
6. Brenda Y. Bedolla-García. *Acta Botanica Mexicana* 95: 51-63 (2011) DOS NUEVAS ESPECIES DE SALVIA (LAMIACEAE) DEL CENTRO OCCIDENTE DE MÉXICO
7. Boelcke, O. (1992) "*Plantas vasculares de la Argentina, nativas y exóticas*", Ed. Hemisferio Sur, Buenos Aires, págs. 240-1.
8. Bonzani, N. & L. Ariza Espinar (1992) *Acta Farm. Bonaerense* 11: 129-37.
9. Brummitt, R.K. (1992) "*Vascular plant families and genera*", Royal Botanical Gardens, Kew, UK., pág. 490.
10. Bruneton, J. 2001. *Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas Medicinales*. Segunda Edición. Acribia. Zaragoza.
11. Bye R. & Linares M., E., 1983. "The role of plants found in the Mexican markets and their importance in ethnobotanical studies". *Journal of Ethnobiology*, 3(2): 1–13.
12. Cabrera, A.L. Colección Científica INTA 4 (5): 153-90. Cronquist, A. (1993) "*The evolution and classification of flowering plants*", Second Edition, The New York Botanical Garden, pág. 425.
13. Cabrera, A.L. y E.M. Zardini (1978) "*Manual de la flora de los alrededores de Buenos Aires*", Ed. Acme, 2da. ed., Buenos Aires, págs. 530-755.
14. Crespo, Susana (1979) "*Labiatae*", en Flora ilustrada de Entre Ríos (A. Burkart, dir.), Colección Científica INTA 6 (V): 295-346.
15. Cabrera, A.L. & A. Willink (1973) "*Biogeografía de América Latina*", Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. OEA. Washington, D.C. Serie Biológica, Monografía N° 13, pág. 110.

16. Cambi, V.N.; P.M. Hermann; E.E. Bontti; M.F. Haussaire & D.H. Sánchez (1999) *Acta Hort.* 501: 57-61.
17. Carlos M. Fernández Andreu y col. REV CUBANA MED TROP 1999;51(1):55-7
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ". Determinación de la concentración mínima inhibitoria de fluconazol frente a *Cryptococcus neoformans*.
18. Chien, M.K.; Youg, P.T.; Ku, W.H.; Chen, H.T.; Yeh, H.C. *Acta Chim. Sin.*, 36, 199, 1978.
19. CHANG H.M.; But, P.P.H.; In "Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica"; Eds. World Scientific: Singapore, 1, 255, 1986.)
20. Chessi Edmund. El mundo de las plantas peligrosas. Series en Iberlibro. Barcelona ultramar. 1998
21. Delgado G., Reza Garduño R.G., Toscano R.A., Bye R. & Linares M.E., 1988. "Secondary metabolites from the roots of *Ligusticum porteri* (Apiaceae). X ray structure of Z 6.6', 7.3a' Diligustilide". *Heterocycles*, 27(6): 1305–1312.
22. Dimitri, M.J. (1988) "*Labiadas*", en "Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería", (M.J. Dimitri, dir.), Ed. ACME, I (2): 925-9.
23. Dominguez, J.A. (1928) "*Contribuciones a la materia medica Argentina*", Ed. Peuser, Bs. As., págs. 117-443.
24. Dudareva, N.; Negre, F.; *Curr. Opin. Plant Biol.* 2005, 8, 113.
25. ERAZO S., González V., Zaldívar M. and Negrete R., Antibacterial activity of *Psoralea glandulosa*, L. *Int. J. Pharmacog* 3(1) 1-3, 1997.
26. ERAZO S., Zaldívar M., Backhouse N., Delporte C., Belmonte E., Miranda D.,
27. Valle T. and Negrete R., Actividad antimicrobiana de *Lophopappus tarapacanus*, especie autóctona chilena. I congreso Latinoamericano de Fitoquímica. Buenos aires, Argentina 8 al 10 de Mayo de 2002.
28. Evans, W.C. farmacognosia. 13 edición. Editorial interamericana- McGraw Hill. México, D.F. 1991
29. Gniazdowska, A.; Bogatek, R.; *Acta Physiol. Plantarum* 2005, 27, 395.
30. González Atilio, M. & A.J. Vallarino (1939) "*Plantas de la medicina vulgar del Uruguay*",
31. Talleres gráficos, Cerrito 580, pág. 69-70.
32. Guadalupe Cornejo–Tenorio* y Guillermo Ibarra–Manríquez. *Rev. Mex. Biodiv.* vol.82 no.4 México dic. 2011. Diversidad y distribución del género *Salvia* (Lamiaceae) en Michoacán, México. Diversity and distribution of the genus *Salvia* (Lamiaceae) in Michoacan, Mexico

33. Harbone, J.B. 1998. *Phytochemical Methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. Chapman and Hall. Londres.
34. Hauman, L. (1984) *Bol. Soc. Arg. Bot.* 23: 166-71.
35. Hieronymus, G. (1882) "*Plantae diaphoricae florum Argentinae*", Ed. Kraft, Bs. As., págs. 335-6.
36. Honda, G.; Koezuka, Y.; Tabada, M. *Chem. Pharm. Bull.*, 36, 408, 1988.)
37. Inderjit, D. S.; *Planta* 2003, *217*, 529
38. Irais Cosme Pérez, El uso de las plantas medicinales, revista intercultural, no.23, enero 2008.
39. Iván Cordova y col, 2006. Guerrero, Lucia S. Andrés, Leticia G. León, Rubén P. Machín, José M. Padrón, Javier G. Luis, and José Delgadillo. Abietane Diterpenoids from *Salvia pachyphylla* and *S. clevelandii* with Cytotoxic Activity against Human Cancer Cell Lines. *J. Nat. Prod.* (2006) 69, 1803-1805).
40. Junk, A. En *Dynamics of nutrient movement at the soil-root-interface*; Wasiel, Y.; Eshel, A.; Kafkafi, ??, eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2002, p. 587.
41. Kessler, A.; Baldwin, I.; *Science* 2001, *291*, 2141
42. Kuklinski, Claudia. Farmacognosia. España. Omega. 2000
43. *La investigación científica de la Herbolaria Medicinal Mexicana*. Secretaría de Salud, 1993. (29 autores)
44. Lara Ochoa Francisco, Marquez Alonso Carmen, plantas medicinales de México, composición, uso y actividad biológica. 1996
45. Lee, A.R.; Wu, W.L.; Liu, H.C.; Kings, M.L. *J. Nat. Prod.*, 50, 157, 1987.
46. Ma Teresa Boya, Serafin Valverde "AN ORTHOQUINONE ISOLATED FROM SALVIA AETHIOPIS". *Phytochemistry*, Vol. 20, No. 6, pp. 1367-1368, 1981
47. Martínez Crovetto, R. (1964) *Bonplandia* 1 (4): 279-333.
48. Ma, Y.; *Weed Biol. Manage.* 2005, *5*, 93.
49. Maximino Martínez, Las plantas medicinales en México, 1967. Editorial botas. Root exudates and their relevance to the allelopathic interactions. Alberto de J. Oliveros-Bastidas, Francisco A. Macías, Ceferino Carrera Fernández, David Marín, José M. G. Molinillo. Departamento de Química-Grupo de Química Ecológica, Facultad de Ciencias, Universidad de Los Andes, Mérida 5101-A, Venezuela, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Cádiz, Puerto Real 11510, Cádiz, España.
50. Nguyen, Ch.; *Agronomie* 2003, *23*, 375.
51. Olga lock de ugaz, Manual de fitoterapia, pontificia universidad católica de peru
52. Paré, P.; Tumlinson, J.; *Plant Physiol.* 1999, *121*, 325.

53. Parekh, J., Chanda S.; 2006. In vitro antimicrobial activity and phytochemical analysis of some indian medicinal plant. *Turkish journal of biology* 31: 53-58.
54. Rondina R.V.D, A.L Bandoni. & J.D. Coussio (2003) "Plantas silvestres argentinas con reconocidas propiedades medicinales o tóxicas. Base de datos (R.V.D. Rondina, A.L. Bandoni & J.D. Coussio, eds.) CYTED-OEA.
55. Sabina I. Lara-Cabrera y Sergio Zamudio. *Lat. Am. J. Pharm.* 22 (3): 265-78 (2003)
56. Recibido el 2 de enero de 2003
57. S. Kemp Daniel, Vellaccio Frank. Química orgánica, ediciones Omega, s.a., Barcelona, 1986
58. Rovira, A.; Harris, J.; *Plant Soil* 1961, 14, 199.
59. Segler, D.S. 2001. *Plant Secondary Metabolism*. Kluwer. Nueva York.
60. THEODULOZ, C., Pacheco, P. and Schmeda-Hirschmann, G. Xanthine oxidase inhibitory activity of chilean Myrtaceae. *Journal of ethnopharmacology*, 33: 253-255, 1991.
61. <http://www.conacyt.gob.mx/comunicacion/Revista/233/Articulos/Elchocolate/Elchocolate4.html>
62. Toursarkissian, M. (1980) "*Plantas medicinales de la Argentina*", Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires, págs. 63-4.
63. Uren, N. En *Types, amounts, and possible functions of compounds release into the rhizosphere by soil-grown plant*; Pinto, R.; Varanni, Z.; Nannipieri, P., eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, 2000, p. 19-40.
64. V., Giselle Lutz C., Carlos H. Herrera R. Química de Alimentos: Manual de laboratorio. Escrito por Nuria Bolaños
65. Villavicencio Miguel Ángel, Pérez Escandón Blanca Estela. *Plantas útiles del estado de Hidalgo*, Universidad Autónoma del estado de Hidalgo, México, 1995
66. Xifreda, C.C. (1999) "*Lamiaceae*" en "*Catálogo de la Plantas Vasculares de la República Argentina*" II. *Monographs in Systematic Botany* (F.O. Zuloaga & O. Morrone, eds.), Missouri Botanical Garden Press, St. Louis, Missouri, Vol. 74, págs. 770-7.
67. Watanabe, S.; *Aroma Res.* 2005, 6, 214.
68. Walling, L.; *J. Plant Growth Regul.* 2000, 19, 195.
69. Willians, C.A. y Grayer, R.J. 2004. Anthocyanins and other flavonoids. *Natural Products Reports* 21: 539-573.
70. Wu, W.L.; Chang, W.L.; Lee, A.R.; Liu, H.C.; King, M.L. *J. Med. Sci.*, 6, 159, 1985
71. Zuniga, G.; Massardo, F.; *Phytochemistry* 1991, 30, 3281.
72. <http://escuela.med.puc.cl/publ/cuadernos/2002/Usolnhibidores.html>
73. http://www.bajacalifornia.gob.mx/portal/nuestro_estado/recursos/flora.jsp

APÉNDICES



ANEXOS



TÉCNICAS EXPERIMENTALES



INSTRUMENTACIÓN

Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN), se realizaron en el espectrómetro BRUKER 400 MHz. Se utilizó CDCl_3 como disolvente, y TMS como referencia. Se utilizaron programas COSY, DEPT, HMQC, HMBC y ROESY convencionales. Los valores del desplazamiento químico (δ), se expresan en ppm, y las constantes de acoplamiento (J), se expresan en Hz. Las siguientes abreviaciones se utilizaron para explicar las multiplicidades: s= singlete; d= doblete; t= triplete; dd= doble de doblete; m= multiplete. En los experimentos de RMN ^{13}C , la multiplicidad de las señales se indica por las abreviaturas: q (CH_3), t (CH_2), d (CH), s (C).

Espectroscopia ultravioleta (UV)

Las mediciones de absorbancia del método de decoloración oxidativa del β -caroteno se realizaron en un espectrofotómetro THERMO SCIIENTIFIC, modelo Genesys 20, en celdas de cuarzo de 10 mm. Como disolvente se empleó metanol o agua destilada. Los valores de absorbancia (λ) se expresan en nm.

Las mediciones de absorbancia de las técnicas antioxidantes se realizaron en un espectrofotómetro BECKMAN DU' 7500, en celdas de cuarzo de 5 mm. Como disolvente se empleó DMSO (dimetilsulfóxido) o metanol. Los valores de absorbancia (λ) se expresan en nm.

Técnicas cromatográficas

- **Cromatografía en capa fina (CCF)**

Las cromatografías en capa fina fueron realizadas con placas FLUKA analytical de 0.2 mm, usado como agente visualizador luz ultravioleta (UV), A 254 nm. Las placas se revelaron usando una disolución de ácido sulfúrico/ ácido acético/ agua

en relación 1:20:4, una vez impregnada la silica con esta solución se calentó para así obtener el revelado.

- **Cromatografía en preparativa**

Estas se realizaron en placas de preparativa Analtech de 20 x 20 centímetros, con una fase estacionaria de Silica gel con un poro de 500µm.

Cromatografía de Gases - Espectrometría de Masas

Los espectros de masas, fueron realizados empleando las técnicas de ionización por impacto electrónico (EI), se empleó el equipo Agilent Technologies 5975C, con un voltaje de 70 Ev. Cromatografía de Gases - Espectrometría de Masas.

Los espectros de masas, fueron realizados empleando las técnicas de ionización por impacto electrónico (EI), se empleó el equipo Agilent Technologies 5975C, con un voltaje de 70 Ev.