

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería  
Laboratorio De Química Medicinal y Productos Naturales



**"Estudio fitoquímico biodirigido de extractos de la raíz  
de *Salvia apiana*"**

Tesis que para obtener el título de:  
**Bioingeniero**

PRESENTA:  
**Vásquez Ríos Diego Saúl**

Director de tesis:  
**Dr. Iván Córdova Guerrero**



Tijuana, B.C.,

Noviembre, 2017

# **AGRADECIMIENTOS**

## AGRADECIMIENTOS:

A todas aquellas personas que con su ayuda han colaborado en la realización del presente trabajo, en especial al Dr. Iván Córdova Guerrero, director de investigación, por la orientación, la motivación, y todo el apoyo recibido.

Especial reconocimiento merece el interés mostrado por mi trabajo y las sugerencias recibidas de parte de Laura Díaz y Eduardo Noriega, amigos con los que me encuentro en deuda por las enseñanzas recibidas.

A cada uno de mis compañeros investigadores del Laboratorio de Química Medicinal y Productos Naturales, quienes dedicaron parte de su tiempo para brindarme su apoyo.

También quisiera expresar mi agradecimiento a Abigail Sandoval Martínez, quien inspiró en mí la confianza necesaria para superar todos los obstáculos que se presentaron la realización de este trabajo.

Por último, pero sin restarle importancia agradezco a Dios y a mi familia por creer en mí y apoyarme en todo momento, a mis padres Ignacio Vázquez Hernández y María Guadalupe Ríos Aguilar, por todo el esfuerzo y sacrificio que realizaron para que yo pudiese tener las herramientas necesarias para crecer en mi formación personal y académica. Les estaré eternamente agradecido.

*Sin duda no hay progreso*

*-Charles Darwin*

# RESUMEN

## RESUMEN

A manera de ampliar el conocimiento etnobotánico de la flora nativa del suroeste de Estados Unidos y el noroeste de México, el presente estudio describe los resultados del aislamiento y purificación de metabolitos secundarios obtenidos de la raíz de *Salvia apiana* a partir de particiones con los solventes n-hexano, acetato de etilo y metanol mediante técnicas de cromatografía, espectrometría de masas y espectroscopía de resonancia magnética nuclear, la evaluación del potencial antioxidante de dichas particiones utilizando técnicas de reducción del radical DPPH, decoloración oxidativa del  $\beta$ -caroteno y decoloración con el radical ABTS, el potencial biológico en actividad antifúngica y actividad antimicrobiana mediante pruebas in vitro en diferentes cepas específicas para este estudio, la evaluación inhibición de la enzima Xantina oxidasa y la cuantificación del contenido de compuestos polifenólicos, para poder establecer una posible correlación con los resultados de actividad antioxidante.

A excepción de la técnica del radical catiónico ABTS, los resultados mostrados por los métodos de la decoloración oxidativa del  $\beta$ -caroteno y la reducción del radical libre DPPH indican que los componentes del extracto de acetato de etilo presentan un mejor efecto de inhibición oxidativa.

Se pudo determinar que el extracto de n-hexano presentó una mejor actividad antifúngica frente a las cepas seleccionadas en este estudio. Contrario a el ensayo antimicrobiano el extracto de acetato de etilo quien presento un mejor perfil antimicrobiano.

Los estudios espectroscópicos y de espectrometría de masas realizados con la muestra aislada E2, sugieren que la estructura molecular de este compuesto es el producto natural diterpénico conocido como criptotanshinona.

La importancia del uso de las plantas con fines terapéuticos y la búsqueda de nuevos metabolitos bioactivos que sean antioxidantes y efectivos contra bacterias y levaduras resistentes a medicamentos tradicionales es de gran ayuda para distintos campos de las ciencias naturales y médicas.

# ÍNDICE

## INDICE

Agradecimientos: .....	3
Resumen.....	6
Abreviaturas Y Acrónimos .....	11
Introducción .....	14
Antecedentes Históricos De Plantas Medicinales .....	14
Hipótesis.....	21
Objetivos .....	23
Objetivo General .....	23
Objetivo Particular.....	23
Antecedentes .....	25
Generalidades De La Familia <i>Lamiaceae</i> .....	25
Especies Del Género <i>Salvia</i> .....	25
Descripción De <i>Salvia Apiana</i> .....	27
Usos Medicinales Del Género <i>Salvia</i> .....	28
Estudios Fitoquímicos Realizados A <i>Salvia Apiana</i> .....	30
Materiales Y Métodos .....	33
Lugar De Recolecta.....	33
Tratamiento Del Material Vegetal.....	34
Obtención Del Extracto Crudo.....	34
Partición Del Extracto Crudo .....	35
Evaluación Química Y Biológica De Extractos <i>In Vitro</i> .....	37
Determinación De Fenoles Totales Por El Método De Folin-Cicalteu .....	38
Reducción Del Radical Libre Dpph.....	39
Decoloración Oxidativa Del B-Caroteno.....	40
Inhibición De La Xantina Oxidasa. ....	42
Ensayos Antimicrobianos Y Antifúngicos .....	44
Pruebas Colorimétricas .....	48
Determinación Alcaloides .....	49
Determinación Taninos .....	50
Determinación Esteroides Y Triterpenoides .....	51
Determinación Flavonoides .....	52
Determinación Antocianinas.....	53
Determinación Carbohidratos.....	54

Determinación Saponinas .....	55
Determinación Glucósidos Antraquinónicos.....	56
Discusión De Resultados .....	58
Resultados De Pruebas Colorimétricas.....	58
Resultados De Actividad Antimicrobiana .....	59
Resultados De Actividad Antifúngica.....	61
Resultados De Inhibición De La Xantina Oxidasa .....	62
Análisis Cuantitativo De Compuestos Polifenólicos Totales. ....	63
Resultados De Actividad Oxidativa Por El Método De La Decoloración Oxidativa Del B-Caroteno.....	64
Resultados De Actividad Antioxidante Por La Técnica De Reducción Del Radical Libre Dpph. ....	65
Resultados De Neutralización Del Radical Catiónico Abts.....	66
Aislamiento De Metabolitos Secundarios .....	67
Caracterización De Metabolitos Secundarios .....	68
Caracterización Estructural De Metabolito E1.....	69
Caracterización Estructural Del Metabolito E2.....	70
Conclusiones .....	74
Índice De Contenido (Tablas, Figuras y Graficas).....	76

# **ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS**

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>S.</b>	<i>Salvia</i>
<b>Abs</b>	Absorbancia
<b>Ac</b>	Absorbancia del control
<b>Ac0</b>	Absorbancia del control a 0 minutos.
<b>Ac120</b>	Absorbancia del control 120 minutos.
<b>Am</b>	Absorbancia de la muestra.
<b>Am0</b>	Absorbancia de la muestra a 0 minutos.
<b>Am120</b>	Absorbancia de la muestra a 120 minutos.
<b>B.C.,</b>	Baja California
<b>cm</b>	Centímetro
<b>cm<sup>3</sup></b>	Centímetros cúbicos
<b>DPPH</b>	Dipicril fenil hidrazilo (por sus siglas en inglés)
<b>EM</b>	Espectrometría de masas
<b>EM-CG</b>	Espectrometría de masas- cromatografía de gases
<b>g</b>	Gramo
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentración media inhibitoria media
<b>CE<sub>50</sub></b>	Concentración efectiva media
<b>Kg</b>	Kilogramo
<b>L</b>	Litro
<b>M</b>	Molar
<b>mg</b>	Miligramos
<b>min</b>	Minutos
<b>mL</b>	Mililitros
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>pH</b>	Potencial de hidrógeno
<b>t</b>	Tiempo
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>VIS</b>	Visible
<b>v/v</b>	Volumen/volumen
<b>p/p</b>	Peso/peso
<b>p/v</b>	Peso/volumen

---

<b><i>et al.</i></b>	Y otros más
<b><math>\beta</math></b>	Beta
<b><math>\mu\text{g}</math></b>	Microgramos
<b><math>\mu\text{M}</math></b>	Micromolar
<b><math>\mu\text{L}</math></b>	Microlitro
<b>CMI</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>Mm</b>	Milímetros

# INTRODUCCIÓN

## INTRODUCCIÓN

### ANTECEDENTES HISTÓRICOS DE PLANTAS MEDICINALES

Desde tiempos ancestrales el hombre ha tenido el instinto de recurrir a las plantas en la búsqueda de sus distintas propiedades, tanto para mitigar su hambre, como para buscar hacia la cura de distintos males que lo afectaban.

En 1960 al norte de Irak, Ralph Solecki descubrió una tumba de hace 60,000 años de antigüedad en la cueva “Shanidar”, se hizo el hallazgo de los restos de un *Homo Neanderthal* con residuos de polen de una variedad de flores distintas. Se realizaron diferentes pruebas para identificar las flores a las que pertenecía dicho polen, sugiriendo que pudiesen haber sido elegidas por sus propiedades medicinales específicas, identificando así las especies: milenrama (*Achillea millefolium*), aciano (*Centaurea cyanus*), abrepuños espinoso (*Centaurea solstitialis*), cardo de San Bernabé, (*Senecio jacobaea*), carqueja (*Baccharis halimifolia*), jacinto (*Muscari armeniacum*), las cuales estuvieron bien identificadas en las muestras de polen que se recogieron; en la actualidad son reconocidas y utilizadas por sus propiedades curativas como plantas medicinales diuréticas, estimulantes, astringentes, así también como anti-inflamatorias.

El hecho de que los restos de un *Homo Neanderthal* estuviesen



**Ilustración 1** “Flower Burial” El “entierro floral” de la Cueva Shanidar

rodeados por el polen de diferentes plantas con propiedades curativas, hizo surgir la teoría de que el occiso pudiese haber sido un chamán al que se le atribuían poderes místicos actuando como curanderos<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Pearsall, Deborah, M. (2013). *Paleoethnobotany: A Handbook of Procedures*. Academic press. revised, p.253

## Mesopotamia

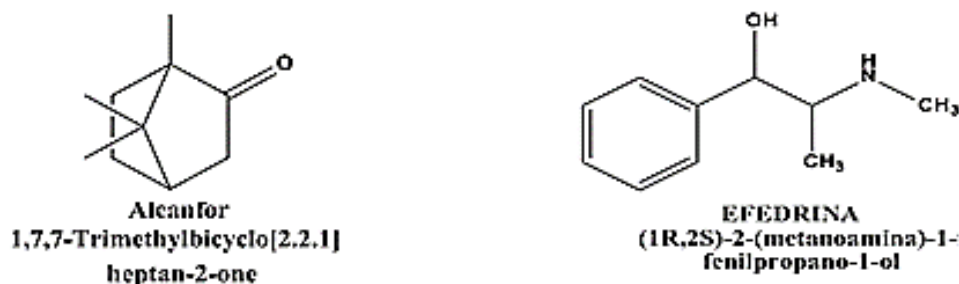
Una tabla de arcilla del año 3000 a.C. fue descubierta en territorios de Mesopotamia, correspondientes a la civilización sumeria (asentada entre los ríos Tigris y Éufrates). La tabla yacía enterrada en las ruinas de Nippur, fue escrita por un médico Sumerio anónimo, quien describe el uso de plantas como remedios para más de una docena de enfermedades; las plantas que describe la tabla con propiedades curativas son: acacia, mirto, asafétida, álcali y tomillo, y arboles como el sauce, pera e higo, de las cuales solo se utilizaban ramas, raíces, semillas, corteza y savia. Dichos textos son los más antiguos de los que se tiene registro de plantas para usos terapéutico<sup>2</sup>.



*Ilustración 2. Tabla de arcilla encontrada en las ruinas de Nippur*

## Antigua China

Desde tiempos muy remotos, la cultura china ha realizado importantes investigaciones sobre las propiedades curativas que poseen ciertas especies de plantas, esto ha llevado al descubrimiento de nuevos remedios naturales. Las contribuciones de esta cultura a la medicina moderna llevaron al descubrimiento de importantes metabolitos secundarios como lo son: alcanfor, efedrina, ginseng y el ruibarbo entre otros<sup>3</sup>.



*Ilustración 3. Estructura química del alcanfor y la efedrina*

<sup>2</sup> Teall, Emily, K. (2014). *Medicine and Doctoring in Ancient Mesopotamia*, [online] Grand Valley Journal of History, disponible en: <http://scholarworks.gvsu.edu/gvjh/vol3/iss1/2> [ 14 abril. 2016].

<sup>3</sup> Hulse, Joseph, H. (2016). *Bioteconlogías: historia pasada, situación presente y perspectivas futuras*. Revista colombiana de ciencias pecuarias, revisado, p.19(3).

Los textos farmacológicos más antiguos de los que se tiene evidencia son: el compendio titulado “*Pen ts'ao kang*” el cual no está concluido de forma definitiva, se atribuye a una codificación ordenada por el emperador Shenzung en el año 2697 a.C. en este se encuentran 8,160 fórmulas, que se preparaban a base de 1,892 sustancias, principalmente vegetales, aunque también drogas de origen animal<sup>4</sup>. Este formulario nunca fue superado por ningún otro pueblo ya que la obra iba ampliándose añadiendo nuevas fórmulas que se iban descubriendo con el paso de los años basándose en la creencia de que los remedios para cualquier mal se encontraban ocultos en la naturaleza. De esta forma, integraban la lista no sólo los remedios activos, sino también sustancias desconocidas o no estudiadas a las cuales les asignaban un remedio todavía por descubrir, pero en base a sus creencias debería existir. Así, por ejemplo, el acónito, la raíz del granado y la raíz mágica del ginseng (*Panax ginseng*), cuyos efectos medicinales estaban aún por comprobarse.



Ilustración 4 *Pen ts'ao kang mu*, vol.6

## Antiguo Egipto

El texto más antiguo e importante del que se tiene conocimiento de la cultura egipcia es el “*El Papiro de Ebers*” quien fuese escrito aproximadamente en el año 1550 a.C. cuenta con la invocación de distintas divinidades y unas 800 fórmulas para el tratamiento de enfermedades oculares, cutáneas, oídos y dientes. En él se describe algunas intervenciones quirúrgicas y una gran gama de condiciones patológicas que van desde el dolor de la picadura de una avispa hasta la mordedura de un cocodrilo, los remedios para estas

<sup>4</sup> Yaniv, Z. & Bachrach, U. (2005). Handbook Of Medicinal Plants. Psychology. CRC press, revised p.37

enfermedades estaban preparados en su mayoría a base de vegetales como cebollas, ajos, azafrán, mirra, cerveza, hojas de ricino, extracto de lirio, jugo de amapola, higos, semillas de lino, resina, incienso, cáñamo, opio, entre muchas otras<sup>5</sup>

El uso de plantas para aliviar enfermedades se describe también en “Los papiros de *Grpow y Deines*”, donde se relatan hasta 700 fórmulas para la preparación de remedios medicinales y perfumes<sup>6</sup>. Las aplicaciones de los remedios descritos en el papiro eran aplicadas de distintas formas, desde píldoras, polvos, supositorios, purés medicinales, inhalaciones, infusiones, ungüentos y aceites para uso externos, contiene una amplia variedad de árboles y plantas usadas como ingredientes para la elaboración de los remedios.



**Ilustración 6** Papiro de Ebers expuesto en la Biblioteca de la Universidad de Leipzig



**Ilustración 5.** “Dioscórides recibiendo la mandrágora” ilustración del Codex “Medicum Graecum”

## Antigua Grecia

Fueron plasmados varios escritos con Información detallada sobre las características que poseen ciertas plantas. La mayor de las aportaciones las hizo el médico de la Antigua Grecia Hipócrates de Cos a quien se le considera el padre de la medicina al clasificar los remedios por grupos en purgantes, narcóticos y febrífugos utilizando vegetales, minerales y algunas sales inorgánicas.

<sup>5</sup> Miroli, Alejandro. B. (1978). La medicina en el tiempo. Buenos Aires. El Ateneo

<sup>6</sup> Escotado, Espinoza, A. (2010). The General History of Drugs. Chile. Graffiti Milante Press

## Antigua América

La historia del Antiguo México revela el interés que tenían las culturas en el uso de las plantas para crear remedios naturales a enfermedades. La búsqueda de estos remedios era investigada por el propio emperador azteca Moctezuma Xocoyotzin (1466 - 1520) quien ordenaba a sus médicos experimentar con los prisioneros que habían sido capturados en guerra para probar la efectividad de algunas plantas<sup>7</sup>.



*Ilustración 7 Pintura del príncipe azteca Moctezuma Xocoyotzin*

No fue hasta después de la conquista española sobre el territorio americano cuando se comenzaron a revelar al mundo los conocimientos que poseían muchas culturas de este continente. Así, sirviéndose del alfabeto latino, algunos antiguos sacerdotes y sabios transcribieron textos de su arraigada tradición en la que se describían los usos de diversas plantas con propiedades medicinales. Un claro ejemplo es el texto “*El ritual de los Bacabes*” quien fuese escrito a finales del siglo XVI y “*Libellus*” también conocido como “*Códice De la Cruz-Badiano*” el cual fue escrito en 1552 por el médico indígena Martín de la Cruz, nativo de



*Ilustración 8 Ilustración de plantas medicinales del texto “Ritual de los bacabes”*

Xochimilco. Este texto es considerado hasta la fecha como uno de los legados fundamentales para la botánica y la medicina tradicional, representa quizás el más antiguo texto de medicina escrito en América.

<sup>7</sup> Challenger, A. & Caballero, J. (1998). Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de México: pasado, presente y futuro. México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad

Con el pasar de los años fueron muchos los productos de origen vegetal utilizados por el hombre para curar sus enfermedades, sin embargo, al ir adquiriendo mayores conocimientos gracias a la escritura, llegó el momento en que comenzó a cuestionarse sobre el contenido de aquellos preparados vegetales que consumía, sobre el principio activo. Tuvieron que pasar muchos años antes de que se pudieran aislar estos principios activos para poder dosificarlos bien.

No fue sino hasta finales del siglo XVIII cuando se crearon las condiciones apropiadas para que naciera la química de productos naturales. Los principios activos contenidos en plantas curativas conocidas desde la antigüedad comenzaron entonces a ser aislados y a establecer su fórmula molecular. En 1805, el farmacéutico alemán Sertürner aisló la morfina del opio. En 1820, Pelletier y Caventou aislaron de la quina los alcaloides quinina y cinchonina. Por la misma época, otros principios activos fueron aislados y analizados en cuanto a su contenido de carbono, oxígeno y algunos otros elementos como nitrógeno.

Han pasado ya cerca de 200 años desde que se inició la química de productos naturales, sin embargo, sólo alrededor del 10% de las especies de plantas que viven sobre la tierra han sido estudiadas en busca de principios activos.

Toda esta información nos da un respaldo sólido para llevar a cabo un estudio fitoquímico sobre las plantas medicinales en México en la búsqueda de componentes bioactivos, específicamente en plantas del género *Salvia*, género al cual pertenece la especie vegetal estudiada en este proyecto, no solo por su ya conocida propiedad medicinal, también por tener un gran número de especies endémicas con uso etnobotánico en nuestra región.

# HIPÓTESIS

## HIPÓTESIS

La identificación de metabolitos secundarios que presentan distintas especies del género *Salvia* han permitido relacionar la actividad biológica de estas plantas con su composición química. Estudios realizados a este género ha favorecido la identificación de muchos metabolitos secundarios con perfiles antioxidantes, antimicrobianos y antifúngicos<sup>8</sup>. Teniendo en cuenta lo antes mencionado se planteó la siguiente hipótesis

-Los extractos obtenidos de las particiones con n-hexano, acetato de etilo y metanol de la raíz de *Salvia apiana* presentan actividad antioxidante, así como actividad antimicrobiana y antifúngica.

-Los metabolitos secundarios que forman parte de la raíz de *Salvia apiana* presentan actividad antioxidante, antimicrobiana y antifúngica. Entre la diversidad de los productos naturales bioactivos de esta planta se encuentran las quinonas diterpénicas conocidas como tanshinonas.

---

<sup>8</sup> López De Ávila, L., Castaño Peláez, H. & Mejía Gómez, C. (2013). Efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Salvia officinalis* L. sobre microorganismos patógenos transmitidos por alimentos. *Actualidades Biológicas*, revised, p.35(98).

# **OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS**

## OBJETIVOS

### Objetivo General

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

### Objetivo Particular

Utilizando como selección en este estudio a la raíz de la especie *Salvia apiana*, se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- 1) Identificar metabolitos secundarios de *Salvia apiana*, mediante un estudio cualitativo colorimétrico preliminar,
- 2) Evaluar la capacidad antioxidante a particiones hexánicas, acetato de etilo y metanólicas obtenidas de la raíz de *Salvia apiana*, utilizando las técnicas de reducción del radical DPPH, decoloración oxidativa del  $\beta$ -caroteno y decoloración con el radical ABTS.
- 3) Establecer el perfil antimicrobiano a las particiones obtenidas de la raíz de *Salvia apiana* mediante diferentes experimentos utilizando cepas específicas para este estudio.
- 4) Evaluar la Inhibición de la enzima Xantina oxidasa con las particiones obtenidas anteriormente descritas.
- 5) Cuantificar el contenido de compuestos polifenólicos, para poder establecer una posible correlación con los resultados de actividad antioxidante.
- 6) Mediante metodologías cromatográficas y técnicas de espectroscopía de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas, purificar y caracterizar estructuralmente metabolitos secundarios bioactivos.

# ANTECEDENTES

## ANTECEDENTES

### GENERALIDADES DE LA FAMILIA LAMIACEAE

*Lamiaceae* es una familia muy abundante y de importancia económica en varias partes del mundo, cuenta actualmente con 236 géneros y 7173 especies<sup>9</sup>. La producción de medicamentos, el cultivo a gran escala de condimentos, la fabricación de aceites esenciales y cultivo de plantas ornamentales son algunos ejemplos del uso actual de las industrias sobre estas plantas.



**Ilustración 9:** Distribución de la familia *Lamiaceae* en el mundo

### ESPECIES DEL GÉNERO SALVIA.

En años recientes se han llevado a cabo revisiones taxonómicas de algunas de las secciones del género, en las cuales se han aportado especies nuevas, descripciones, claves y algunos apuntes sobre la distribución de las especies.

**Ilustración 10:** Distribución De La Familia *Lamiaceae* En México<sup>9</sup>



<sup>9</sup> González Galleg, J. (2014). Sistemática de *Salvia* sección *Membranaceae* (*Lamiaceae*) y diversidad de *Lamiaceae* en el occidente de México. Doctorado. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias.

México cuenta con 61 secciones, y 307 especies de Salvias, de las cuales 232 son endémicas del país<sup>10</sup>.

Generos de la familia Lamiaceae: riqueza y endemismo				
Genero	Num. De especies en el mundo	Num. de especies en Mexico	Num. de especies endemicas	Porcentaje de endemismo (%)
Acanthomintha	4	1	0	0
Aegiphila	116	10	1	10
Agastache	22	12	5	41.6
Asterohyptis	4	4	3	75
Callicarpa	40	2	1	50
Catoferia	4	3	1	33.3
Chaunostoma	1	1	0	0
Clinopodium	100	14	10	71.4
Cornutia	12	1	0	0
Cunila	20	6	5	83.3
Hedeoma	42	29	21	72.41
Hypenia	23	1	1	100
Hyptis	280	35	17	48.5
Lepechinia	40	10	6	60
Marsypianthes	5 o 6	2	1	50
Monarda	17	6	3	50
Monardella	30	9	2	22.2
Neoeplingia	1	1	1	100
Ocimum	30	3	0	0
Physostegia	12	2	0	0
Pogogyne	7	3	1	30
Poliomintha	8	8	5	62.5
Prunella	7	1	0	0
Salvia	900	307	232	75.57
Scutellaria	301	56	38	67.85
Stachys	300	41	29	70.7
Tetradlea	2	1	0	0
Teucrium	100	6	2	33.3
Trichostema	18	9	2	11.11
Vitex	250	4	2	50
Volkameria	25 o 30	2	0	0
Warnockia	1	1	0	0

Ilustración 11. Riqueza Y Endemismo De La Familia Lamiaceae<sup>10</sup>.

<sup>10</sup> Martínez Gordillo, M., Fragoso Martínez, I., García Peña, M. & Montiel, O. (2013). Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo. Revista Mexicana de Biodiversidad, 84(1), p.46.

## Taxonomía De *Salvia Apiana*

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Lamiales*

Familia: *Lamiaceae*

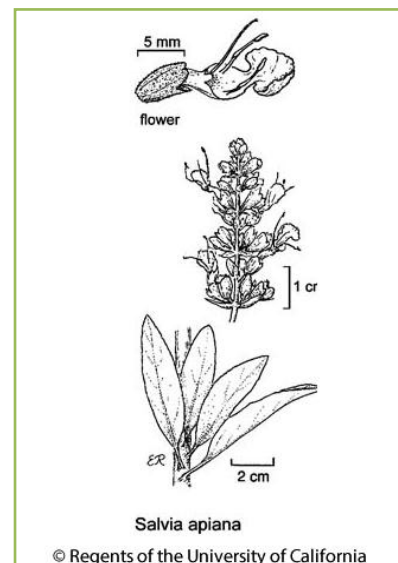
Subfamilia: *Nepetoideae*

Tribu: *Mentheae*

Género: *Salvia*

Especie: *S. apiana*

Nombre común: *Salvia blanca*.



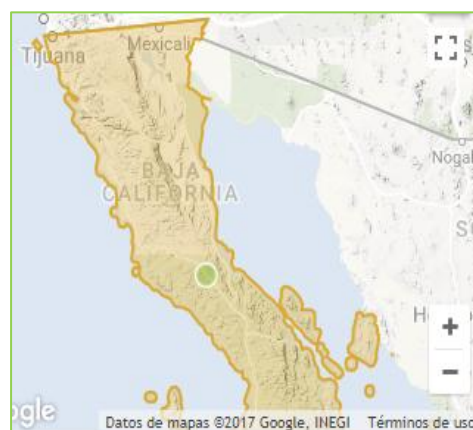
**Ilustración 12:** Ilustración de hojas, follaje y semilla de *salvia apiana*

## Descripción De *Salvia Apiana*

*Salvia apiana* es un sub-arbusto de menos de 1 metro de altura, sus hojas son simples y con vellosidades, generalmente de 4-8 cm de largo, lanceoladas y de base cónica, la inflorescencia se muestra en el racimo con de color blanco pálido, los frutos son de color marrón claro, núculas brillantes. Se vale de antófilos para polinizar sus flores, está dotada de unidades reproductivas hermafroditas.

## Distribución De *Salvia apiana*

*Salvia apiana* crece en alturas inferiores a 1.500 m, en matorrales costeros y chaparral. Se extiende desde el sur del estado de California hasta Baja California encontrándola en algunos municipios como Ensenada, Rosarito, Tijuana, Tecate



**Ilustración 13:** Distribución de *Salvia apiana* en el estado de Baja California

## USOS MEDICINALES DEL GÉNERO SALVIA

El uso de plantas del género *Salvia* como remedios naturales para aliviar enfermedades ha sido adoptado por distintas culturas alrededor del mundo. Algunas propiedades farmacológicas atribuidas a este género son: efectos hipnóticos, sedantes, alucinógenos, relajantes musculares, analgésicos, estimuladores de memoria, neuroprotectores, así como atenuación del síndrome de abstinencia de alcohol y morfina entre otros<sup>11</sup>.

La curiosidad de los científicos por saber si realmente poseen propiedades curativas llevo al estudio de género *Salvia*. A través de distintas técnicas químicas y biológicas se ha podido demostrar que varias especies de este género presentan actividad farmacológica.

### *Salvia Officinalis.*

Un informe del Hospital General de Newcastle describe que el aceite esencial de *Salvia officinalis* es capaz de inhibir a la acetilcolinesterasa, enzimas relacionadas con la pérdida de memoria en pacientes con alzheimer. Actualmente este aceite es investigado químicamente en busca de las moléculas responsables de este efecto farmacológico<sup>12</sup>.



Ilustración 14: *Salvia officinalis*

### *Salvia Microphyllia Kunth.*

Estudios farmacológicos realizados a *Salvia microphylla kunth* muestran que dicha planta contiene sustancias capaces de retardar el avance del contenido gastrointestinal, lo que propiciaría una mayor absorción de electrolitos y fluidos intestinales<sup>13</sup> y por lo tanto ser útil en el tratamiento de cuadros diarreicos.



Ilustración 15 *Salvia microphylla kunth*

<sup>11</sup> Sierra Pérez, C., R., González Canavaciolo, V., Marrero Delange, D. & Rodríguez Leyes, E. (2013). Lamiaceae: una revisión sobre sus efectos neurofarmacológicos y su presencia en Cuba. CENIC Ciencias Biológicas, revised, revised, p.44(1).

<sup>12</sup> Perry, E., Pickering, A., Wang, W., Houghton, P. & Perry, N. (1999). Medicinal plants and Alzheimer's disease: from ethnobotany to phytotherapy. J Pharm Pharmacol, revised, p.51(5)

### *Salvia Lavandulifolia*

Estudios clínicos aleatorizados de doble sesgo han demostrado que el extracto etanólico de la *Salvia officinalis*, y de *Salvia lavandulifolia* son eficaces en el tratamiento de alzhéimer de leve a moderada, en estudios sobre pacientes no mostraron ningún efecto adverso. La administración de *Salvia lavandulifolia* ha sido reportada eficaz en la mejora de la memoria y el estado de ánimo<sup>14</sup>.

### *Salvia Apiana*

El uso de la *Salvia apiana* como remedio a algunas enfermedades era usado por las tribus Cahuilla, Costanoan, Diegeño, Kawaiisu y Maidu de California, quienes usaban las semillas de *Salvia apiana* para limpiar y sanar sus ojos, las mujeres de la tribu Cahuilla bebían la infusión de las raíces de *Salvia apiana* después de dar a luz para remover la placenta y promover la cicatrización interna de la madre, también solían comer semillas de *Salvia apiana* para curar resfriados.



**Ilustración 16:** *Salvia lavandulifolia*

Actualmente se sabe que el uso de *Salvia apiana* ayuda a disminuir la sudoración, salivación, secreción de leche, secreción de la mucosa, disminución de la lactancia durante el destete, bacteriostático, astringente útil para el tratamiento de casi todos los dolores de garganta y bueno para tratar la menstruación abundante<sup>15</sup>.



**Ilustración 17:** *Salvia apiana*

<sup>13</sup> Tovar Hernández, J. C. (2007). Composición Química, Actividad Antibacteriana Y Tóxica De Aceites Esenciales De Seis Especies Medicinales De Lamiaceae, Licenciatura, Universidad Autónoma Del Estado De Hidalgo.

<sup>14</sup> Usano Alemany, J. (2016). Estudio Del Efecto De Los Factores Ambientales Y Agronómicos Sobre La Producción De Los Aceites Esenciales De *Salvia Lavandulifolia* VAHL. Doctorado. Universidad Complutense De Madrid.

<sup>15</sup> Stevens, M. & O'Brien, B. (2003). Plant Guide WHITE SAGE *Salvia Apiana* Jepson. [Online] United States Department Of Agriculture Natural Resources Conservation Service. Disponible En: [Http://Plants.USDA.Gov/Plantguide/Pdf/Cs\\_Saap2.Pdf](http://Plants.USDA.Gov/Plantguide/Pdf/Cs_Saap2.Pdf) [1 Abril. 2016]

## ESTUDIOS FITOQUIMICOS REALIZADOS A SALVIA APIANA

Uno de los estudios más completos que se ha realizado a *Salvia apiana* es el “*Volatile Constituents Of The Aerial Parts Of Salvia Apiana Jepson*” en él, se describe la identificación de algunos componentes volátiles encontrados en la parte aérea de la planta, dichos componentes se obtuvieron por extracción con éter dietílico, seguido de una destilación de alto vacío con un aparato de evaporación de disolventes. Los constituyentes volátiles aislados fueron analizados por GC y CC/MS. identificando 84 componentes (constituyen 95.1% del total de la planta) de los cuales 11 fueron identificados tentativamente. Los constituyentes mayoritarios que se identificaron fueron: 1,8-cineole (34.5%), camphor (21.7%),  $\beta$ -pinene (7.4%),  $\alpha$ -pinene (6.4%),  $\delta$ -3-carene (6.4%), camphene (3.9%), limonene (3.5%), myrcene (3.2%) y terpinolene (1.3%)<sup>16</sup>.

Otro estudio “*Potential Antiinfective Agents From Eriodictyon Angustifolium Nutt And Salvia Apiana Jeps*” describe algunos componentes aislados quienes tuvieron una fuerte acción como inhibidores a organismos como *S. aureus*, *B. Subtilis*, y *C. Albicans*. El artículo indica que el extracto de diclorometano de *S. apiana* dio una fracción de ácido a partir del cual se aislaron diterpenos abietano, ácido carnósico y su derivado 16-hidroxi, así como acetatos de éster metilo. Inestables como ácidos carboxílico libres estos compuestos conservan la actividad tras la metilación, pero pierden la actividad tras la acetilación. Dicha metilación sin previa acetilación lleva a la formación 11-methoxy-methylcarnosate, 12-methoxy-methylcarnosate, 16-hydroxy-methylcarnosate, 16-hydroxy-11-methoxy-methylcarnosate, 16-hydroxy-12-methoxy methylcarnosate y 11,12-dimethoxy-16-hydroxy-methylcarnosate. En cantidades de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  el 12-metoxi-methylcarnosate es inactivo, mientras que a cantidades de 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$  el 16-hidroxi-12-metoxi-methylcarnosate es activo e inhibía el crecimiento de *S. aureus*, *B. Subtilis*, y *C. Albicans*. De este resultado se dedujo que la introducción de un grupo 16-hidroxi aumentó la bioactividad de ácido carnósico<sup>17</sup>

---

<sup>16</sup> Takeoka, G., Hobbs, C. & Park, B. (2010). *Volatile Constituents Of The Aerial Parts Of Salvia Apiana Jepson*. Journal Of Essential Oil Research, P.22(3),

<sup>17</sup> Dentali, S. & Hoffmann, J. (1992). *Potential Antiinfective Agents From Eriodictyon Angustifolium And Salvia Apiana*. Pharmaceutical Biology, P.30(3).

El estudio “*Diterpenes And Diterpene Quinones From The Roots Of Salvia Apiana*” da a conocer el descubrimiento de nuevos compuestos naturales diterpenicos encontrados en la raíz de *Salvia apiana*. Los compuestos encontrados fueron: 6,7-didehydroferruginol, 6,7-didehydrosempervirol, 16-hydroxy-6,7-didehydroferruginol, 11,12,16-trihydroxy-20(10→5) abeo-abieta-1(10),6,8,11,13-pentaene, también compuestos diterpenos quinonas como: 16-hydroxyroyleanone y 6-deoxo-5,6-didehydrolanugon y los que ya fueron encontrados en la parte aérea como el ferruginol, miltiodiol, cryptotanshinona, lanugon Q y salvicanol<sup>18</sup>

En el artículo “*Cytotoxicity of Selected Medicinal and Nonmedicinal Plant Extracts to Microbial and Cervical Cancer Cells*”. Se informa que el extracto metanolico de la raíz de *Salvia apiana* inhibe el crecimiento de *S. aureus*, y que el extracto metanolico no es efectivo para inhibir el crecimiento de las células HeLa (células cancerígenas del cuello uterino)<sup>19</sup>

---

<sup>18</sup> González, A., Aguiar, Z., Grillo, T. And Luis, J. (1992). *Diterpenes And Diterpene Quinones From The Roots Of Salvia Apiana*. *Phytochemistry*, P.31(5).

<sup>19</sup> Booth, G., Malmstrom, R., Kipp, E. And Paul, A. (2012). *Cytotoxicity Of Selected Medicinal And Nonmedicinal Plant Extracts To Microbial And Cervical Cancer Cells*. *Journal Of Biomedicine And Biotechnology*, P.1(4).

# **MATERIALES Y MÉTODOS**

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Lugar De Recolecta

La raíz de *Salvia apiana* fue recolectada el día 1 de marzo del 2012 en San Antonio de las Minas, Ensenada, Baja California, en las coordenadas de 31°99 10 N, 116°63 55 O y una altura de 320 metros sobre el nivel del mar, fue autenticada por el Dr. José Delgadillo Rodríguez (taxónomo) y su comprobante de espécimen se encuentra registrado en el herbario BCMEX de la Universidad Autónoma de Baja California, campus Ensenada, Facultad de Ciencias. Las raíces fueron tomadas en la estación primaveral, fue tomada de ejemplares adultos en buenas condiciones.



**Ilustración 18:** Lugar de recolecta de raíz *Salvia apiana* San Antonio de las Minas, Ensenada, Baja California



**Ilustración 19:** Follaje de *Salvia apiana*

## TRATAMIENTO DEL MATERIAL VEGETAL

El material vegetal fresco recolectado se lavó y se dejó en secado a temperatura ambiente, después se procedió a triturar en trozos pequeños, esto con el fin de poder tener una mejor superficie de contacto con el disolvente al que fue expuesta, se obtuvieron trozos de aproximadamente 5 cm de largo por 1 cm de ancho y 5 mm de espesor.



*Ilustración 20: Raíz de Salvia apiana recolectada*

### Obtención Del Extracto Crudo.

El proceso de maceración realizo el día 10 de abril del año 2012 utilizando como disolvente 2.5 litros de etanol al 95%, con agitación continua. Durante 20 días que se mantuvo la raíz de *Salvia apiana* en maceración y se le adicionó en una ocasión 1 litro de etanol al 70% realizándose un total de 3 destilaciones a presión reducida del disolvente con un rotaevaporador Buchi R-210; obteniendo un total de 8.3 gr de extracto crudo.

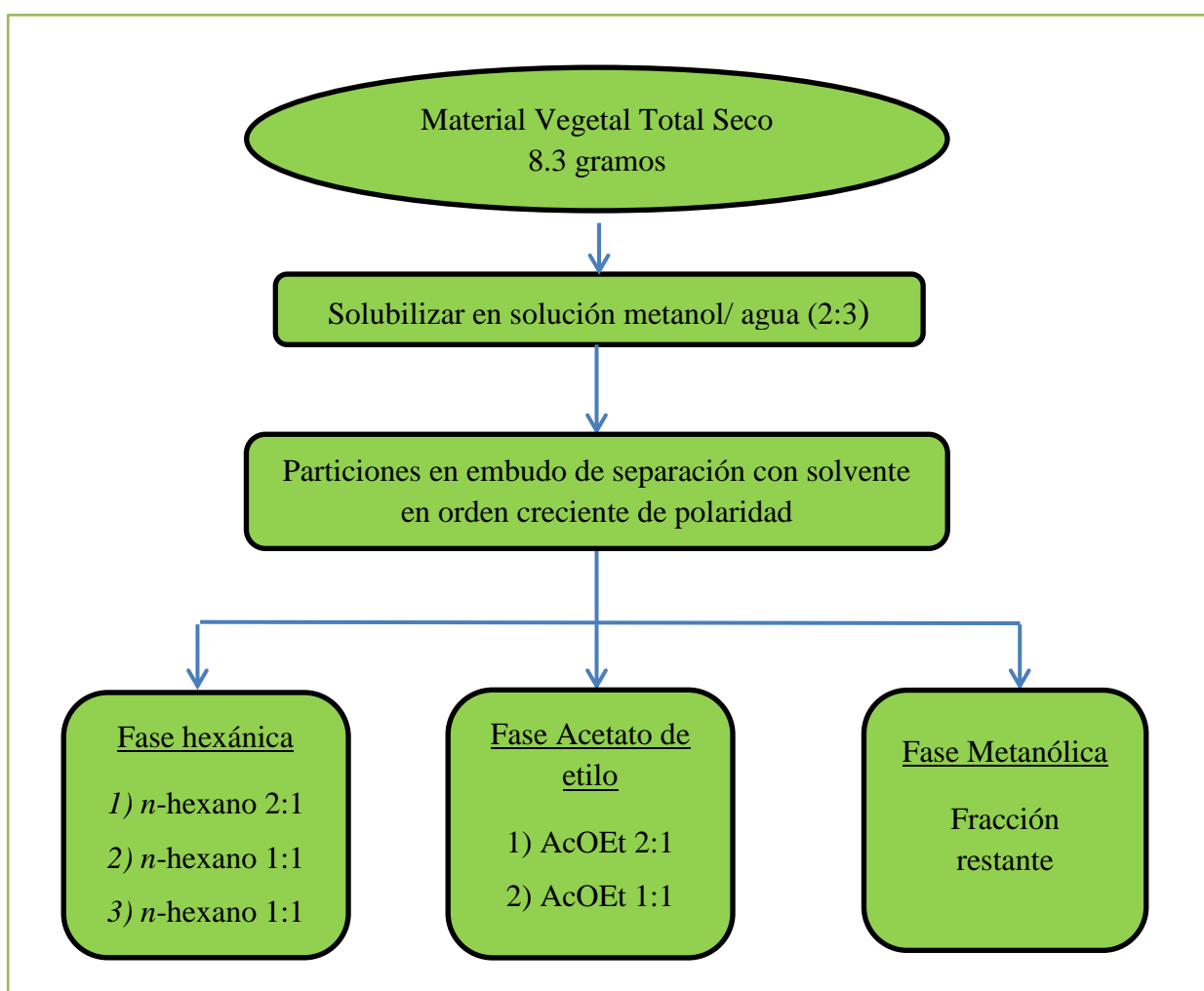


*Ilustración 21: Extracto crudo de la raíz de Salvia apiana*

## PARTICIÓN DEL EXTRACTO CRUDO

Una vez se obtuvo el extracto crudo se procedió a la generación de fracciones a distintas polaridades, para lograrlo se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

Completamente seco el extracto, se disolvió nuevamente en metanol/agua a concentraciones 2:3, utilizando como base 0.5 litros por cada 20 gr de extracto, para los 8.3 gr obtenidos del extracto crudo se requirió un total de 2.08 litros.



*Ilustración 22: Esquema de fraccionamientos realizados a la raíz de Salvia apiana*

**EVALUACIÓN  
QUÍMICA Y  
BIOLÓGICA DE  
EXTRACTOS *IN*  
*VITRO.***

## EVALUACION QUÍMICA Y BIÓLOGICA DE EXTRACTOS IN *VITRO*.

Los ensayos realizados a extractos obtenidos de la raíz de *Salvia apianan* son ensayos estándares que permiten evaluar la actividad de materiales vegetales, su fácil reproducción en el laboratorio y su simplicidad permitieron que los 3 extractos obtenidos (n-hexano, acetato de etilo y metanol/ agua), fueran evaluados con los siguientes ensayos químicos y biológicos *in vitro*:

### A) Evaluación química.

- Determinación de Fenoles totales.
- Reducción del radical libre DPPH.
- Decoloración oxidativa del  $\beta$ -caroteno.

### B) Evaluación biológica.

- Inhibición de la enzima xantina oxidasa.
- Actividad antibacteriana.
- Actividad antifúngica (con levaduras).

Todos los ensayos se realizaron por triplicado para comparar los datos obtenidos, promediar y obtener datos más exactos, con la excepción de algunos pocos ensayos que se mencionaran al describir la técnica.

## DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES POR EL MÉTODO DE FOLIN-CICALTEU

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 y molibdeno, siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula.

El contenido de fenoles fue determinado acondicionando peso y volumen proporcional al método descrito por Ivanova y colaboradores.<sup>20</sup> 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

### Procedimiento.

- Se pesó 1 mg de extracto y se disolvió en 1 mL de etanol.
- Se realizaron 10 diluciones por triplicado para el ensayo.
- A todos los tubos se les adiciono 3 mL de agua destilada.
- Se tomaron 100 µl del extracto y se adicionaron al primer tubo, realizando diluciones seriadas y desechando el sobrante del último tubo.
- Se adiciono 500 µl del reactivo de Folin-ciocalteau y se dejó reposar la disolución por 3 minutos.
- Se agregaron 2 mL de disolución de carbonato de sodio al 20%, se mezcló todo y se dejó reposar por 1 hora a en condiciones ambientales de luz y temperatura.
- Se determinó la absorbancia a 650 nm.

---

<sup>20</sup> Ivanova D, Gerova D, Chervenkov T, Vankova T. (2005). Polyphenols And Antioxidant Capacity Of Bulgarian Medicinal Plants. Journal Of Ethnopharmacology Reviced P.145(96).

## 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 Leu y colaboradores.<sup>21</sup> En esta técnica, los compuestos activos reducen el radical difícil picril hidrazilo (DPPH, por sus siglas en inglés) al compuesto incoloro dipicril fenil hidracina. Los antioxidantes actúan protegiendo al organismo de la acción de los radicales libres, causantes de los procesos de envejecimiento, y enfermedades como arterioesclerosis, artritis demencia, cáncer, entre otras<sup>22</sup>

### Procedimiento.

- Se preparó una disolución de DPPH 125  $\mu$ M en etanol. Se utilizó esta concentración con el propósito de cumplir con la Ley de Beer. se pesó 1mg de extracto y se disolvió en 1mL de etanol.
- Una vez disueltos todos los extractos, se agregaron 500  $\mu$ L de etanol a todos los tubos (10 tubos por triplicado más 2 controles).
- Se añadieron 500  $\mu$ L del extracto al primer tubo, para realizar diluciones seriadas en los 9 tubos restantes, se tomaron 500  $\mu$ L y se pasaron al siguiente tubo y así sucesivamente, el décimo tubo se desecho
- Se añadieron 500  $\mu$ L de solución de DPPH 125  $\mu$ M a todos los tubos y se dejaron en reposo por 30 minutos en la oscuridad.
- Se realizó la lectura en una celda de cuarzo a 517 nm utilizando un blanco de etanol.

Se realizó la curva de calibración correspondiente con la antioxidante quercetina, y se promediaron las absorbancias obtenidas para realizar los cálculos y obtener el % de reducción de DPPH, a partir de los cuales se obtuvo la gráfica correspondiente y se calculó la CE<sub>50</sub>.

---

<sup>21</sup> Mitscher, L.A., Leu, R.P., Bathala, M.S., Wu, W.N., & Beal, J.L. (1972). Antimicrobial Agents From Higher Plants. 1. Introduction, Rationale And Methodology. Lloydia, P.35,

<sup>22</sup> Castañeda B., Ramos E Y Ibáñez L. (2008). Evaluación De La Capacidad Antioxidante De Siete Plantas Medicinales Peruanas. Horizonte Medical, P.8 (1),

## DECOLORACIÓN OXIDATIVA DEL $\beta$ -CAROTENO.

Esta técnica se considera colorimétrica ya que la oxidación sucesiva del  $\beta$ -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  $\beta$ -caroteno frente a la oxidación y por lo tanto la decoloración de la disolución será lenta o nula la metodología para el ensayo <sup>23</sup>

### Procedimiento.

- Se sometió a burbujeo con aire el agua destilada.
- Se realizó una disolución de  $\beta$ -caroteno (0.5 mg de  $\beta$ -caroteno disuelto en 1 mL de cloroformo).
- Se preparó la emulsión con 25  $\mu$ L de ácido linoléico y 200  $\mu$ L de Tween20.
- A esta emulsión preparada se le adiciono 1 mL de la solución de  $\beta$ -caroteno (1 mL por cada 100 mL de emulsión preparada).
- Se agito y se dejó evaporar el cloroformo.
- Una vez evaporado, se adicionan 100 mL de agua destilada (previamente en constante burbujeo de aire durante 1 hora) y se agito vigorosamente hasta la formación total de la emulsión.
- Se pesaron 2 mg de extracto y se realizó una disolución con concentración 2 mg/mL en metanol
- Se tomaron 350  $\mu$ L de la disolución del extracto y se adiciono a cada tubo (cada extracto por triplicado), posteriormente a cada tubo se agregó 2.5 mL de la emulsión y se midió la absorbancia a 470 nm inmediatamente después de agregar la emulsión (t=0 minutos).

---

<sup>23</sup> Contreras, Villar, O. (2004) Relación Entre El Contenido De Caroteno, Color Y Características Botánicas Del Polen Corbicular, Licenciatura. Universidad Austral De Chile

- Las subsecuentes lecturas de absorbancia se registraron en intervalos de 15 minutos manteniendo los tubos en baño maría a 50°C por 120 minutos.
- Las absorbancias obtenidas se promediaron y para la obtención los correspondientes cálculos, el porcentaje de actividad antioxidante se determinó utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Actividad antioxidante} = 100 \left[ \frac{1 - (Am0 - Am120)}{(Ac0 - Ac120)} \right]$$

*Ecuación 1: Determinar actividad antioxidante β-caroteno*

Dónde:

**Am0** = Absorbancia de la muestra a 0 minutos.

**Am120** = Absorbancia de la muestra a 120 minutos.

**Ac0** = Absorbancia del control a 0 minutos.

**Ac120** = Absorbancia del control a 120 minutos.

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

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<sup>24</sup>.

### Procedimiento.

El amortiguador concentrado se preparó pesando 3.402 gr de fosfato monobásico de potasio y 4.35 gr de fosfato dibásico de potasio, ambos disueltos en 50 mL de agua destilada cada uno (las concentraciones de cada disolución fueron 0.5 M). Se mezclaron ambas soluciones de fosfatos hasta llegar a un pH de 7.8, Se pesó 1.9 mg de Xantina y se disolvieron en 50 mL de amortiguador 1:10. Se utilizó una disolución enzimática de xantina oxidasa 19  $\mu\text{M}/\text{mL}$ . Como control positivo se utilizó 1 mg/mL de alopurinol. Los extractos se prepararon a partir de 2 mg/mL, disolviéndolos completamente en agua o ayudando con el disolvente de su extracción. se utilizaron 40  $\mu\text{L}$  y el resto de agua destilada para llevar a 1 mL.

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

Control enzimático: 250  $\mu\text{L}$  amortiguador, 200  $\mu\text{L}$  xantina y 50  $\mu\text{L}$  xantina oxidasa

---

<sup>24</sup> Delporte Vergara C. (2006) Diseño De La Estandarización Química Y Evaluación De La Actividad Analgésica Tópica De Un Extracto Activo De Buddleja Globosa Hope, Buddlejaceae, Matico. Licenciatura, Universidad De Chile

Control disolvente: 150  $\mu\text{L}$  amortiguador, 200  $\mu\text{L}$  xantina, 100  $\mu\text{L}$  disolvente y 50  $\mu\text{L}$  xantina oxidasa.

Control positivo: --  $\mu\text{L}$  Amortiguador, 200  $\mu\text{L}$  xantina, 25 - 2  $\mu\text{L}$  alopurinol y 50  $\mu\text{L}$  xantina oxidasa. La cantidad de amortiguador se ajusta dependiendo de los  $\mu\text{L}$  de alopurinol empleados, hasta llegar a un total de 500  $\mu\text{L}$  en la celda

Extractos: --  $\mu\text{L}$  amortiguador, 200  $\mu\text{L}$  xantina, 100-2  $\mu\text{L}$  extracto y 50  $\mu\text{L}$  xantina oxidasa. La cantidad de amortiguador se ajusta dependiendo de los  $\mu\text{L}$  de extracto empleados, hasta llegar a un total de 500  $\mu\text{L}$  en la celda.

### **Cálculos:**

$$\% \text{ Inhibición de Xantina Oxidasa} = 100 - x$$

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

Dado a que se realizó este ensayo a diferentes concentraciones, se realizó una curva (concentración Vs. % inhibición de xantina oxidasa). Se obtuvo la ecuación de la recta para obtener la concentración efectiva media ( $\text{CE}_{50}$ ).

## ENSAYOS ANTIMICROBIANOS Y ANTIFÚNGICOS

El principal objetivo de las pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos y antifúngico es el proporcionar una guía para el manejo terapéutico de las enfermedades infecciosas a través de la sensibilidad o resistencia de bacterias patógenas aerobias y anaerobias facultativas a diferentes compuestos antimicrobianos.

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 37°C. Estas pruebas permiten obtener datos confiables para orientar la terapia en padecimientos relacionados. Estas pruebas permiten obtener datos confiables para orientar la terapia en padecimientos relacionados. las cepas seleccionadas para este ensayo son cepas patrón de control de calidad que cumplen con los límites establecidos<sup>25</sup>

Procedimiento.

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

- Hongos y levaduras: Medio RPMI

A. Bacterias: Mueller-Hinton

- Se esterilizo el siguiente material:

-Placa Petri (grande)

-Puntillas para micropipeta

-Tubos de ensayo con tapa de rosca que contengan 4 mL de agua destilada para cada cepa

-Jeringas para dispensador.

- Se pesaron 6 mg de extracto en un eppendorf.

---

<sup>25</sup> Cavalier Stephen, J. (2005) Manual De Pruebas De Susceptibilidad Antimicrobiana, Library Of Congress Cataloging-In-Publication, Universidad De Washington Data P.67

- Al día siguiente se verificó el crecimiento en las placas inoculadas el día anterior.
- Se disolvió el extracto de la siguiente manera:
  - a. Se adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de DMSO y se agita en vortex.
  - c. Se agregó por duplicado 725  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo correspondiente y se agito en vortex.
- Al encender la campana se limpió con etanol al 70% v/v y se colocó dentro únicamente el material estéril.
- Con técnica aséptica se tomó un inóculo y este se suspendió en tubo de ensayo con agua destilada previamente esterilizada.
- Se ajustó la suspensión al 0.5 de McFarland, tomando las lecturas de absorbancia o transmitancia.

*Tabla 1 ESPECIFICACIONES DE ESPECTROFOTOMETRÍA PARA CADA MICROORGANISMO*

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

- Se abrió una placa de 96 pocillos y con pipeta multicanal se colocó en todos los pozos 100  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo.
- Se adicionó al primer pocillo de cada hilera 100  $\mu\text{L}$  de extracto previamente disuelto.
- Se realizaron diluciones con la pipeta multicanal. Se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de primer pocillo y se pasaron al segundo pocillo, se agitó con puntilla, se tomaron 100  $\mu\text{L}$  del segundo pocillo y se pasan al 3<sup>er</sup> pocillo, así sucesivamente hasta terminar. Del último pocillo se tomaron 100  $\mu\text{L}$  y se desecharon para obtener la concentración de extracto deseada.

Para Levaduras:

- Se tomó un tubo vacío estéril y se adicionó 950  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo y 50  $\mu\text{L}$  de la suspensión de la cepa previamente ajustada para obtener

una concentración 1:20. A un segundo tubo, se agregó 5 veces 980  $\mu$ L de medio de cultivo y 100  $\mu$ L de la solución del primer tubo para obtener concentración de 1:50.

- Para Bacterias:
- Se tomó un tubo vacío estéril y se adicionó 980  $\mu$ L de medio de cultivo y 100  $\mu$ L de la suspensión de la cepa previamente ajustada para obtener una concentración 1:50. Se realizó esto por triplicado para obtener volumen suficiente de suspensión para el bioensayo.
- Con un dispensador en el número 4 acoplado a una jeringa previamente estéril, se colocó la solución de la cepa 1:50 en cada pocillo excepto en los pocillos de control negativo. Se incubó a 37°C.
- Con ayuda de lámpara de luz clara se tomó lectura visual a las 24hrs anotando resultados. Se confirmaron los resultados con lectura a 48hrs.
- Se aseguran las placas y se envuelven con papel estroza para esterilizar en autoclave.
- Se utilizó una placa de 96 pozos para una sola especie de microorganismo y diferentes extractos.
- Se reportó como concentración mínima inhibitoria.

# **PRUEBAS COLORIMÉTRICAS**

## PRUEBAS COLORIMÉTRICAS

El tamizaje fitoquímico o “screening” fitoquímico es una de las etapas iniciales de la investigación fitoquímica, que permite determinar cualitativamente los principales grupos de constituyentes químicos presentes en una planta, y a partir de allí, orientar la extracción y/o fraccionamiento de los extractos para el aislamiento de los grupos de mayor interés. El tamizaje fitoquímico consiste en la extracción de la planta con solventes apropiados y la aplicación de reacciones de coloración. Debe permitir la evaluación rápida, con reacciones sensibles, reproducibles y de bajo costo. Los resultados del tamizaje fitoquímico constituyen únicamente una orientación y deben interpretarse en conjunto con otras evidencias.

**Tabla 2: MÉTODOS COLORIMÉTRICOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS**

Metabolito	Método
Alcaloides	Dragendorff
	Wagner
Taninos	Cloruro férrico
Esteroides Y Triterpenos	Lieberman- Burchard
Flavonoides	NaOH 10%
Carbohidratos	Benedict
Saponinas	Espuma
	Rosenthaler
Glúcidos Antroquinonicos	Borntrager
	NH <sub>4</sub> OH-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Cumarinas	Erlich

En todas las pruebas colorimétricas hechas se les realizaron controles a todos los disolventes involucrados en ella.

## DETERMINACIÓN ALCALOIDES

Los alcaloides forman un grupo heterogéneo de principios activos de origen natural que se encuentran fundamentalmente en drogas vegetales. Son sustancias básicas que presentan nitrógeno en su estructura, generalmente formando parte de un anillo heterocíclico. En la naturaleza, suelen encontrarse formando sales y su biosíntesis generalmente es a partir de aminoácidos. Son de gran interés terapéutico puesto que frecuentemente están provistos de actividad farmacológica a baja dosis.

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 Mayer), entre otros. La metodología seguida fue descrita en el libro *Investigación en plantas de importancia médica*<sup>26</sup> (2016)

**Tabla 3: EXPERIMENTO COLORIMÉTRICO PARA IDENTIFICACIÓN DE ALCALOIDES**

Método	Resultado
DRAGENDORFF (+)	Precipitado café- rojo
WAGNER (+)	Precipitado café- rojo
MAYER (+)	Precipitado blanco

### Procedimiento.

- Se pesó 1mg del extracto a evaluar (1 mg por cada prueba a realizar).
- Se disolvió en 1 mL de ácido clorhídrico al 5% (concentración 1mg/mL).
- se calentó a baño maría por 5 minutos.
- Se agregaron 2 gotas del reactivo (un reactivo para cada tubo) y observaron los cambios.

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

<sup>26</sup> Rivas Morales, C., Oranday Cárdenas, M.A., Verde-Star, M.J. (2016). *Investigación en plantas de importancia médica*. OmniaScience, revised p.30

## DETERMINACIÓN TANINOS

Los taninos son glucósidos de polipéptidos solubles en agua presentes en muchas plantas, con un sabor agrio astringente, confiere sabor y olor indeseable a los alimentos, en medicina se prescriben por su acción astringente, hemostática, antiséptica y tonificante. La propiedad ya comentada de coagular las albúminas de las mucosas y de los tejidos, crean una capa seca, aislante y protectora que reduce la irritación y el dolor sobre la piel, los preparados a base de drogas ricas en taninos, como las decocciones, se emplean para detener pequeñas hemorragias locales; en inflamaciones de la cavidad bucal, catarros, bronquitis, quemaduras, hemorroides etc.<sup>27</sup>.

Químicamente los taninos son polímeros de polifenoles con 1 a 2% de hidróxidos fenólicos libres. La prueba “cloruro férrico” recibe este nombre ya que estos compuestos precipitan en presencia de cloruro férrico. Esta respuesta se debe al ataque producido por el Ion cloruro al hidrógeno del grupo hidroxilo provocando una ruptura de enlace y la unión del grupo fenóxido al hierro (formación de complejo). La metodología seguida fue descrita en el libro *Investigación en plantas de importancia médica*<sup>28</sup>

**Tabla 4: EXPERIMENTO COLORIMÉTRICO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE TANINOS**

Método	Resultado
Cloruro Férrico (+)	Coloración Verde, Azul O Negra

### Procedimiento

- Se pesó 1mg del extracto a evaluar.
- Se disolvió en 1 mL de disolvente afín al extracto (concentración 1mg/mL).
- Se agregaron 2 gotas del reactivo.
- Se observaron los cambios.

El estándar para estas pruebas se realizó con el estándar ácido gálico.

<sup>27</sup> Cuadrado Merino, L. F. (2004) Estudio Bromatológico Y Fitoquímico De La Jícama (Smallanthus Sonchifolia) Para Determinar El Tiempo Óptimo De Cosecha, Doctoral, Escuela Superior Politécnica De Chimborazo

<sup>28</sup> Rivas Morales, C., Oranday Cárdenas, M.A., Verde-Star, M.J. (2016). *Investigación en plantas de importancia médica*. OmniaScience, revised p.27

## DETERMINACIÓN ESTEROIDES Y TRITERPENOIDES

Grupo de sustancias que se biosintetizan siguiendo la llamada “regla del isopreno”, esbozada por Wallach en 1866. Pueden clasificarse como monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, según el número de unidades de isopreno. Los esteroides, biogénicamente muy relacionados con los triterpenoides, y con un esqueleto cíclico base igual que los triterpenoides tetracíclicos, de ciclopentano perhidrofenantreno<sup>29</sup>.

La reacción del colesterol con diferentes ácidos fuertes del tipo Brønsted y Lowry da como resultado coloraciones verdes- azules y violetas, Esta reacción ha sido utilizada durante años para la determinación cualitativa y cuantitativa de colesterol. La metodología seguida fue descrita en el libro *Investigación en plantas de importancia médica*<sup>30</sup>

**Tabla 5: MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESTEROIDES Y TRITERPENOS**

Método	Resultado
Lieberman (+) Burchard (+)	Coloraciones azul- verde y violeta.

### Procedimiento.

- Se pesaron 1mg del extracto a evaluar.
- Se disuelve en 1 mL de disolvente afín al extracto (concentración de 1 mg/mL).
- Se adicionaron 1 mL de anhídrido acético y se mezcló ligeramente.
- Se agregaron 3 gotas del ácido sulfúrico concentrado.
- Se observaron los cambios.

Los estándares utilizados para esta prueba fueron colesterol para esteroides y  $\beta$ -caroteno para triterpenoides.

<sup>29</sup> Martínez, Maby M, Ocampo, Diana M, Galvis, Jhon H, & Valencia, Andrea. (2011). Actividad antibacteriana y citotoxicidad in vivo de extractos etanólicos de *Bauhinia variegata* L. (Fabaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 16(4), 313-323. Recuperado en 20 de noviembre de 2017, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1028-47962011000400002&lng=es&tng=pt](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962011000400002&lng=es&tng=pt)

<sup>30</sup> Rivas Morales, C., Oranday Cárdenas, M.A., Verde-Star, M.J. (2016). *Investigación en plantas de importancia médica*. OmniaScience, revised p.27

## DETERMINACIÓN FLAVONOIDES

Los flavonoides son menudos antiinflamatorios, interviniendo con el metabolismo del ácido araquidónico, como apigenina, crisina, taxifolina, gopipina, etc. También, puede ser antialérgicos, hepatoprotectores, antiespasmódicos, disminuyen el colesterol, diuréticos, antibacterianos, citostáticos y captadores de radicales libres in vitro<sup>31</sup>. 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 hidrógeno, el cual reduce al flavonoide desarrollando los colores mencionados. La metodología seguida fue descrita en el libro *Investigación en plantas de importancia médica*<sup>32</sup>

**Tabla 6:** MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES.

Método	Resultado
Shinoda (+): NaOH 10% (+):	Tonalidades de naranja a rojo

### Procedimiento.

- Se pesó 1 mg del extracto a evaluar.
- Se disolvió en 2 mL de disolvente afín al extracto (concentración 0.5 mg/mL).
- En un tubo se adicionaron unas limaduras de magnesio.
- Se agregaron 3 gotas del ácido clorhídrico concentrado.
- Se observaron los cambios.

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

<sup>31</sup> Escobar Robles, C. S. (2007). Estandarización De Dos Extractos Del Rizoma De La Planta Zarzaparrilla (*Smilax Domingensis*), Proveniente Del Departamento De Santa Rosa, Para Desarrollo Fitofarmacéutico A Nivel De Laboratorio, Utilizando La Extracción Por Percolación De Lecho Estático Con 24 Horas De Reposo, Licenciatura, Universidad de San Carlos de Guatemala

<sup>32</sup> Rivas Morales, C., Oranday Cárdenas, M.A., Verde-Star, M.J. (2016). *Investigación en plantas de importancia médica*. OmniaScience, revised p.31

## DETERMINACIÓN ANTOCIANINAS

Las antocianinas son flavonoides estructuralmente relacionados con las flavonas. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza.

Son pigmentos hidrosolubles responsables de las coloraciones roja, rosa, azul o violeta de las flores y de los frutos; algunas veces de las hojas. Las antocianinas constituyen colorantes atóxicos, utilizables en la industria del medicamento para la actividad antiviral, citotóxica, espermicida, y en la industria alimenticia<sup>33</sup>.

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). La metodología seguida fue descrita en el libro *Investigación en plantas de importancia médica*<sup>34</sup>

**Tabla 7: MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ANTOCIANINAS**

Método	Resultado
NaOH 10% (+)	Azul

### Procedimiento.

- Se pesó 1mg del extracto a evaluar. y se disolvió en 1 mL de disolvente afín al extracto (concentración de 1 mg/mL).
- Se separó en 2 la solución anterior (0.5 mL en cada tubo).
- A un tubo de ensayo se le adiciono 1 mL de hidróxido de sodio al 10%. Y De observó la coloración.
- Al otro tubo restante, se le adicionaron 6 gotas de ácido sulfúrico concentrado y se observó la coloración.

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

<sup>33</sup> Escobar Robles, C. S. (2007). Estandarización De Dos Extractos Del Rizoma De La Planta Zarzaparrilla (Smilax Domingensis), Proveniente Del Departamento De Santa Rosa, Para Desarrollo Fitofarmacéutico A Nivel De Laboratorio, Utilizando La Extracción Por Percolación De Lecho Estático Con 24 Horas De Reposo, Licenciatura, Universidad de San Carlos de Guatemala

<sup>34</sup> Rivas Morales, C., Oranday Cárdenas, M.A., Verde-Star, M.J. (2016). *Investigación en plantas de importancia médica*. OmniaScience, revised p.32

## DETERMINACIÓN 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. Intervienen directamente en la supervivencia, crecimiento y reproducción de los seres vivos, la metodología seguida fue descrita en el libro *Investigación en plantas de importancia médica*<sup>35</sup>

**Tabla 8:** MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE CARBOHIDRATOS

Método	Resultado
Benedict (+)	Precipitado café- rojo

### Procedimiento.

- Se pesó 1 mg del extracto a evaluar.
- Se disolvió en 1 mL de disolvente afín al extracto (concentración de 1mg/mL).
- Se agregaron 3 gotas del reactivo de Benedict.
- Se calentó a baño de agua hirviendo.
- Se observaron los cambios.

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

<sup>35</sup> Rivas Morales, C., Oranday Cárdenas, M.A., Verde-Star, M.J. (2016). *Investigación en plantas de importancia médica*. OmniaScience, revised p.28

## DETERMINACIÓN 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.

Las saponinas relajan el intestino e incrementan las secreciones de las mucosas bronquiales, se emplean también como diuréticos y desinfectantes de las vías urinarias, en usos externos son analgésicas y cicatrizantes<sup>36</sup> La metodología seguida fue descrita en el libro *Investigación en plantas de importancia médica*<sup>37</sup>

**Tabla 9: MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE SAPONINAS**

Método	Resultado
Espuma (+)	Espuma estable por lo menos 30 minutos.
Rosenthaler (+)	Coloración violeta se considera positiva para saponinas triterpenoides.

### Procedimiento.

- Se pesó 1mg del extracto a evaluar.
- Se disolvió en 1 mL de disolvente afín al extracto (concentración de 1mg/mL).
- Se agito vigorosamente.
- Se observaron los cambios.

El estándar utilizado para esta prueba fue saponina.

<sup>36</sup> Escobar Robles, C. S. (2007). Estandarización De Dos Extractos Del Rizoma De La Planta Zarzaparrilla (*Smilax Domingensis*), Proveniente Del Departamento De Santa Rosa, Para Desarrollo Fitofarmacéutico A Nivel De Laboratorio, Utilizando La Extracción Por Percolación De Lecho Estático Con 24 Horas De Reposo, Licenciatura, Universidad De San Carlos De Guatemala

<sup>37</sup> Rivas Morales, C., Oranday Cárdenas, M.A., Verde-Star, M.J. (2016). *Investigación en plantas de importancia médica*. OmniaScience, revised p.27

## DETERMINACIÓN GLUCÓSIDOS ANTRAQUINÓNICOS

Estas sustancias pueden encontrarse en diferentes partes de la planta como hojas, tallos, madera y frutos en ciertas familias de plantas más abundantes en compuestos antracénicos como las rubiáceas, las ramnáceas y las poligonáceas.

El vegetal se pone en ebullición con una solución de KOH acuoso diluido, durante varios minutos, este tratamiento no solo hidroliza los glicósidos antracénicos, sino que también oxida las antronas y antranoles hasta antraquinonas. La solución alcalina se deja enfriar, se acidifica y se extrae con benceno, cuando la fase bencénica se separa y se pone en contacto con una solución acuosa diluida de un álcali, la fase bencénica pierde su color amarillo, y la fase acuosa se torna de color rojo si la muestra contiene antraquinonas. La metodología seguida fue descrita en el libro *Investigación en plantas de importancia médica*<sup>38</sup>

**Tabla 10: MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE SAPONINAS GLÚCIDOS ANTRAQUINONICOS**

Método	Resultados
Borntrager (+):	Anillo rosa- rojo en la superficie de la fase acuosa.

### Procedimiento.

- Se pesó 1mg del extracto a evaluar.
- Se disolvió en 1 mL de disolvente afín (concentración de 1mg/mL).
- Se adiciono 1 mL de ácido clorhídrico al 5%.
- Se adiciono 1 mL de cloroformo.
- Se adicionaron 4 gotas de amoniaco al 10%.

El estándar utilizado para esta prueba fue ácido carmínico.

<sup>38</sup> Rivas Morales, C., Oranday Cárdenas, M.A., Verde-Star, M.J. (2016). *Investigación en plantas de importancia médica*. OmniaScience, revised p.33

# **DISCUSIÓN DE RESULTADOS.**

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### RESULTADOS DE PRUEBAS COLORIMÉTRICAS

Los resultados obtenidos al realizar las pruebas preliminares colorimétricas se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla 11** RESULTADOS DE PRUEBAS COLORIMÉTRICAS REALIZADAS A PARTICIONES DE RAÍZ DE SALVIA APIANA

Prueba Colorimétrica	Método	Partición Acetato De Etilo	Partición n-Hexano
Alcaloides	Dragendorft	Negativa	Negativa
	Wagner	Negativa	Negativa
Taninos	Cloruro férrico	Positiva	Positiva
Esteroides Y Triterpenos	Lieberman-Burchard	Positiva	Negativa
Flavonoides	Shinoda	Negativa	Negativa
	NaOH 10%	Negativo	Negativo
Carbohidratos	Benedict	Positiva	Positiva
Saponinas	Espuma	Negativa	Negativa
	Rosenthaler	Negativa	Positiva
Glucósidos Antroquinonicos	Bornfrager	Negativa	Negativa
	Na4OH-H2SO4	Negativo	Negativo
Cumarinas	Erlich	Negativa	Negativa

Las ocho pruebas colorimétricas preliminares con las particiones n-hexano y acetato de etilo se realizaron con el fin de tener un posible perfil de los metabolitos secundarios que pudiesen presentar las dichas particiones. De las pruebas realizadas, la partición de acetato de etilo dio positivo para las pruebas de esteroides y triterpenos, carbohidratos y taninos, mientras que la partición n-hexano dio positivo para taninos, carbohidratos y saponinas por el método Rosenthaler y negativa por el método espuma.

Tanto la partición n-hexano como la partición de acetato de etilo dieron positivo para la prueba de taninos y carbohidratos por el método cloruro férrico. Este resultado era predecible ya que estos componentes generalmente se identifican en abundancia en las especies vegetales. De acuerdo a estas pruebas, también es normal esperar que solo la partición de acetato de etilo pueda dar positivo a los productos de tipo triterpeno, ya que, por su naturaleza polar, difícilmente se identificarían como parte de las extracciones hexánicas.

## RESULTADOS DE ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Los resultados obtenidos al realizar los ensayos antimicrobianos arrojaron los datos que se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 12:** RESULTADOS DE ENSAYO ANTIMICROBIANO REALIZADO A PARTICIONES DE LA RAÍZ DE SALVIA APIANA

Cepas	Concentración mínima inhibitoria (CMI) (µg/ mL)		
	Partición Acetato De Etilo	Partición n-Hexano	Partición Metanol/ Agua
MRSA	62.5	62.5	>1000
S.a. A	62.5	<31.25	>1000
E.f.	250	>1000	>1000
E.c.	<31.25	<31.25	>1000
E.c. A	62.5	62.5	>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	31.25	125	>1000
498	<31.25	125	>1000
53	125	500	250
501	<31.25	250	>1000
166	<31.25	250	>1000
168	<31.25	250	>1000
96	<31.25	250	>1000

**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; **498:** *C. albicans*; **53:** *C. albicans*; **501:** *C. albicans*; **166:** *C. tropicalis*; **168:** *C. tropicalis*; **96:** *C. tropicalis*.

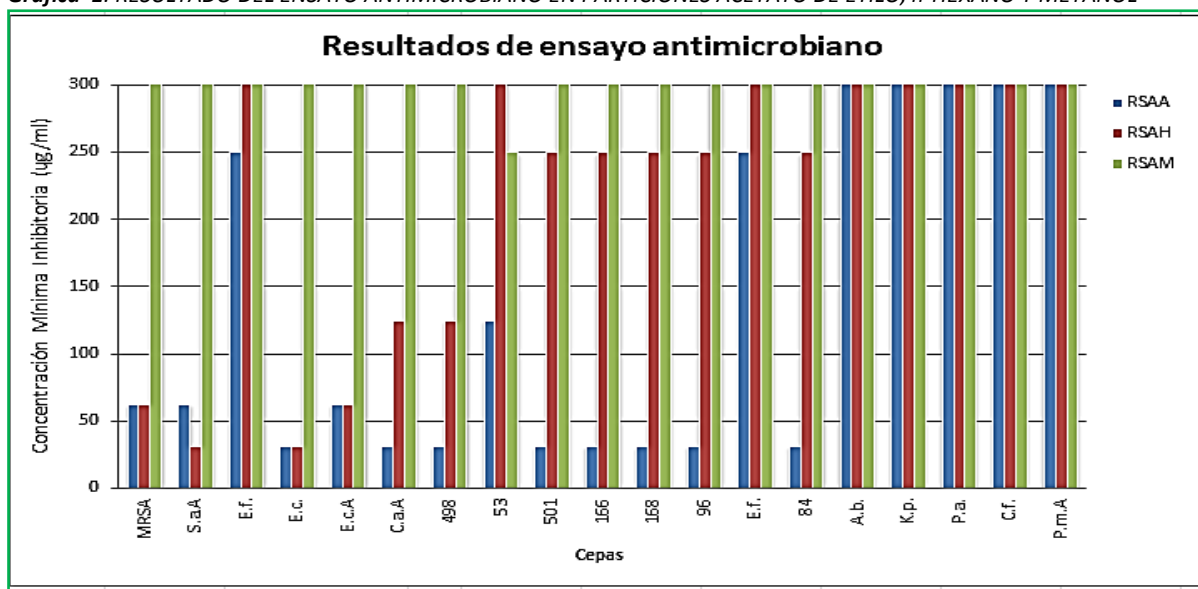
Los ensayos biológicos antibacterianos realizados a las particiones acetato de etilo, n-hexano y metanol, mostraron una variación muy significativa en los resultados obtenidos.

La partición acetato de etilo presentó un mejor perfil antimicrobiano ya que requirió una menor cantidad de extracto para inhibir el crecimiento de las cepas: *Candida albicans* ATCC 10231, 498, 53, 501, 166, 168, 96 y 84.

Con un comportamiento similar la partición de n-hexano se perfiló pudo frenar el crecimiento de las cepas *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina, *Escherichia coli* y *Escherichia coli* ATCC 25922. Sin embargo, cabe destacar que la muestra de n-hexano, presentó una CMI menor para la cepa *Staphylococcus aureus* ATCC 12598,

Finalmente es importante destacar que la partición metanólica fue la que presento una menor acción antimicrobiana frente a las cepas estudiadas, ya que las CMI calculadas, fueron superiores a los 1000 µg/mL, con excepción de la cepa 53, que fue inhibida por esta partición con 250 µg/mL de extracto alcohólico.

**Grafica 1: RESULTADO DEL ENSAYO ANTIMICROBIANO EN PARTICIONES ACETATO DE ETILO, n-HEXANO Y METANOL**



**RSAH:** raíz *Salvia apiana* hexano; **RSAA:** raíz *Salvia apiana* acetato de etilo; **RSAM:** raíz *Salvia apiana* 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; **498:** *C. albicans*; **53:** *C. albicans*; **501:** *C. albicans*; **166:** *C. tropicalis*; **168:** *C. tropicalis*; **96:** *C. tropicalis*;

## RESULTADOS DE ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Los resultados obtenidos al realizar los ensayos antifúngicos arrojaron los datos que se muestran en la siguiente tabla.

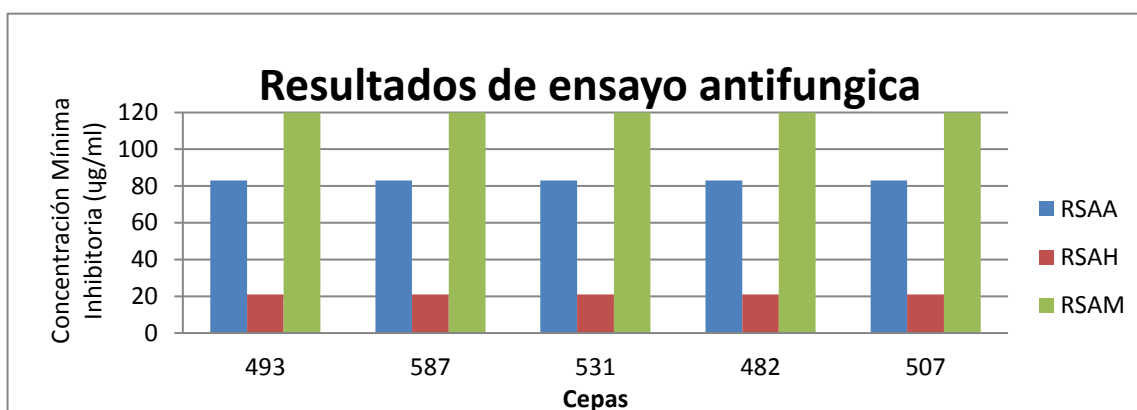
**Tabla 13:** RESULTADOS DEL ENSAYO ANTIFÚNGICO REALIZADO A PARTICIONES DE LA RAÍZ SALVIA APIANA:

CEPAS	Partición Acetato De Etilo	Partición n-Hexano	Partición Metanol/ Agua
	CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) (MG/ ML)		
493	83	21	>666
587	83	21	>666
531	83	21	>666
482	83	21	>666
507	83	21	>666

*C. parapsilosis*; 493, 587, 531, 482, *C. glabrata*; 507; los resultados se expresan en concentración mínima inhibitoria µg/ mL

Los resultados que demuestran que, de las particiones de acetato de etilo, n-hexano y metanol, la partición que tuvo un mejor perfil biológico fue la de acetato de etilo con una CMI de 21 µg / mL para las cepas 493, 587, 531, 482 y 507. El extracto hexánico presento un CMI de 21 µg / mL para las cepas 493, 587, 531, 482 y 507. Y similar que con el estudio antibacteriano y con levaduras, la partición alcohólica requirió valores mayores de CMI (666 µg/mL)

**Grafica 2:** RESULTADOS DE ENSAYO ANTIFÚNGICA EN PARTICIONES DE LA RAÍZ DE SALVIA APIANA



**RSAM:** raíz *Salvia apiana* hexano; **RSAA:** raíz *Salvia apiana* acetato de etilo; **RSAM:** raíz *Salvia apiana* metanol/agua; *C. parapsilosis*, 493, 587, 531, 482, *C. glabrata*, 507.

## RESULTADOS DE INHIBICIÓN DE LA XANTINA OXIDASA

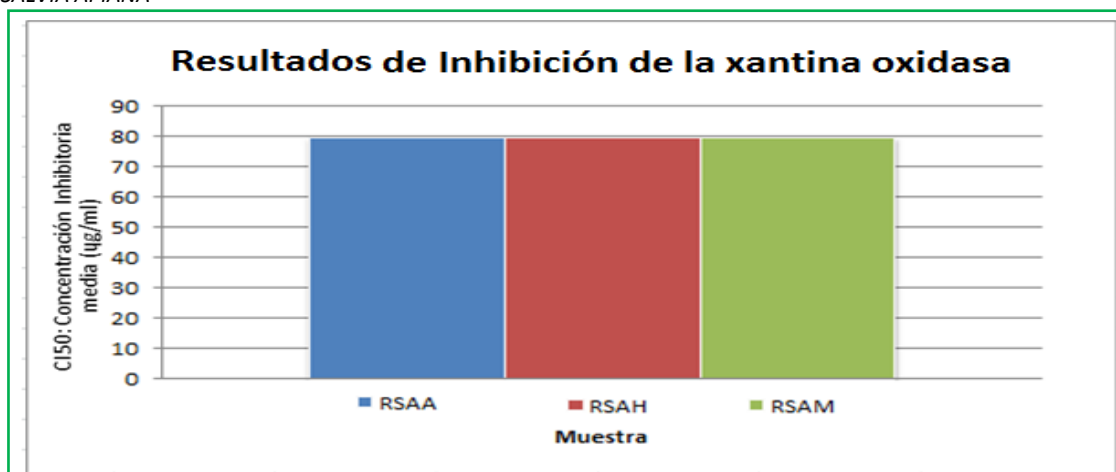
Los resultados del ensayo para inhibir a la xantina oxidasa arrojaron los mismos resultados para las particiones acetato de etilo, n-hexano y metanol, arrojando una  $CI_{50}$  mayor a 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de material vegetal para las tres particiones.

**Tabla 14:** RESULTADOS DE INHIBICIÓN DE LA XANTINA OXIDASA CON LAS PARTICIONES DE LA RAÍZ DE SALVIA APIANA

	Partición Acetato De Etilo	Partición n-Hexano	Partición Metanol/ Agua
Concentración Efectiva Media $CI_{50}$	> 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$	> 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$	> 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$
Desviación estándar	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$	0 $\mu\text{g}/\text{mL}$

El resultado se expresó en Concentración efectiva media ( $CI_{50}$ )  $\mu\text{g}/\text{mL}$

**Grafica 3:** RESULTADOS DEL ENSAYO DE INHIBICIÓN XANTINA OXIDASA REALIZADO EN PARTICIONES DE LA RAÍZ DE SALVIA APIANA



**RSAA:** raíz Salvia apiana acetato de etilo; **RSAH:** raíz Salvia apiana hexano; **RSAM:** raíz Salvia apiana metanol/ agua

## ANÁLISIS CUANTITATIVO DE COMPUESTOS POLIFENÓLICOS TOTALES.

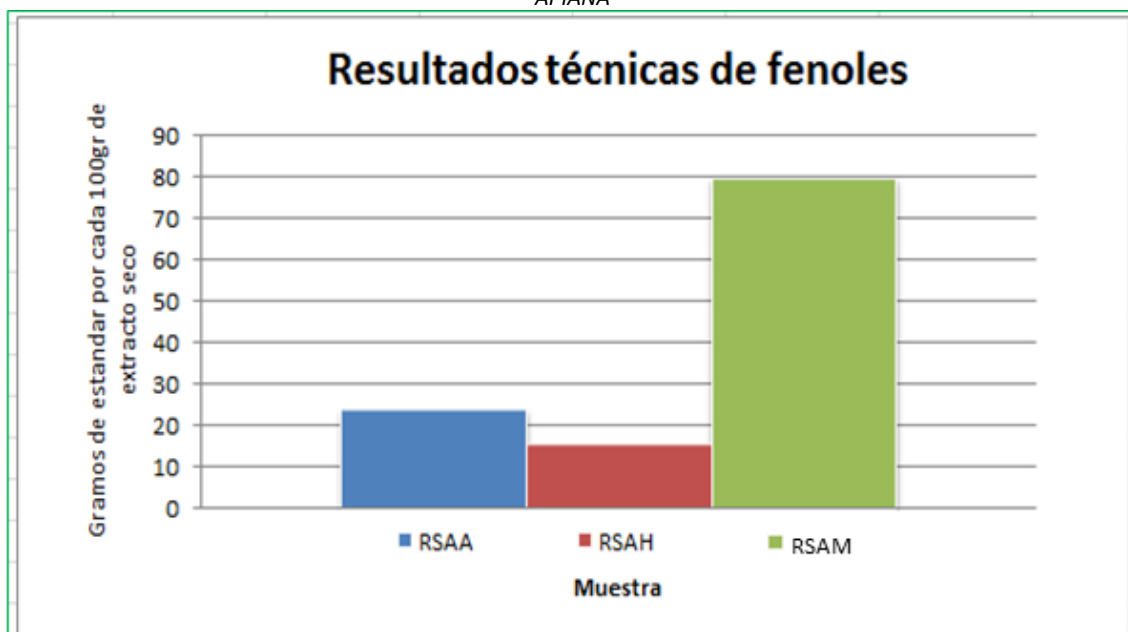
Los resultados obtenidos para la determinación de compuestos polifenólicos se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla 15:** RESULTADOS DEL ENSAYO PARA DETERMINACIÓN DE FENOLES EN PARTICIONES DE LA RAÍZ DE SALVIA APIANA

	Partición Acetato De Etilo	Partición n-Hexano	Partición Metanol/ Agua
	Gramos De Ácido Gálico Por Cada 100 Gramos De Extracto Seco (Mg GA/100 G Ext)		
Fenoles Totales	24.071375	15.3553903	12.2
Desviación estándar	0.8118683	1.2974768	0.6

La muestra que presentó una mayor cantidad de compuestos fenólicos fue la partición de acetato de etilo con un valor de 24.07 en las unidades de masa que se describieron anteriormente. Un resultado inesperado fue el de la partición alcohólica que presento la concentración más baja de estos componentes

**Grafica 4:** RESULTADOS DEL ENSAYO PARA DETERMINACIÓN DE FENOLES EN PARTICIONES DE LA RAÍZ DE SALVIA APIANA



**RSAH:** raíz *Salvia apiana* hexano; **RSAA:** raíz *Salvia apiana* acetato de etilo; **RSAM:** raíz *Salvia apiana* metanol/agua; Gramos de ácido gálico por cada 100 gramos de extracto seco (g ácido gálico/100g extracto seco)

## RESULTADOS DE ACTIVIDAD OXIDATIVA POR EL MÉTODO DE LA DECOLORACIÓN OXIDATIVA DEL $\beta$ -CAROTENO.

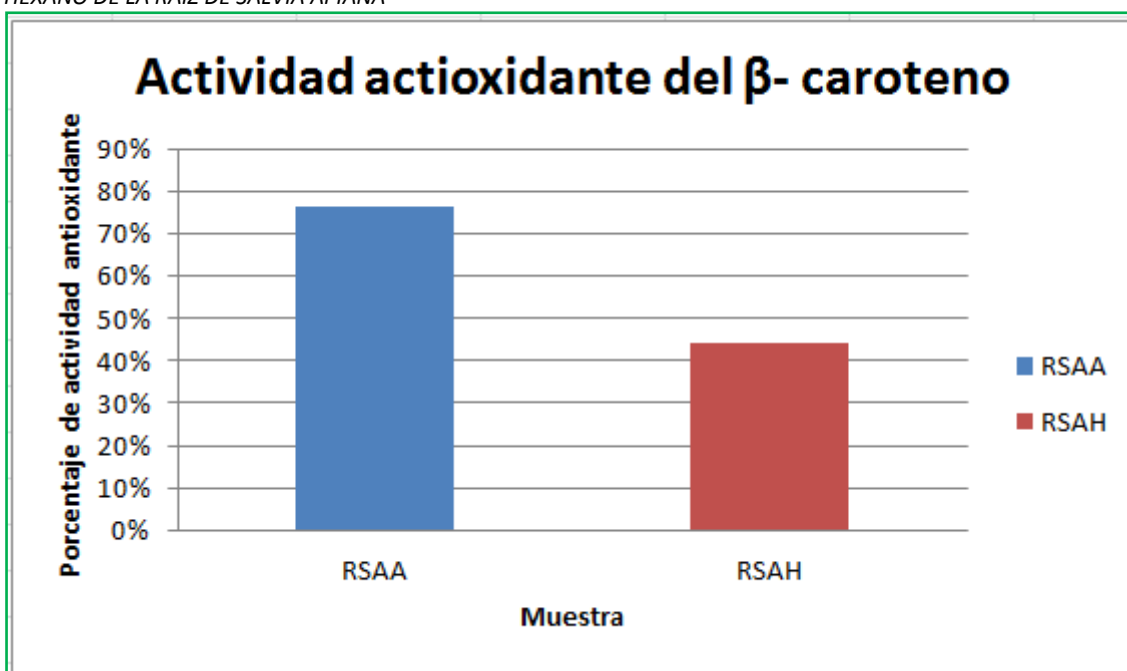
Los resultados obtenidos de los experimentos de la actividad antioxidante por el método de la decoloración oxidativa del  $\beta$ -caroteno, se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla 16:** RESULTADOS DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE  $\beta$ -CAROTENO EN PARTICIONES DE ACETATO DE ETILO Y n-HEXANO DE LA RAÍZ DE SALVIA APIANA.

Muestra	% Actividad Antioxidante
Partición Acetato De Etilo	76.36%
Partición n-Hexano	44.44%

Estos resultados indican que, de las dos particiones evaluadas, la de acetato de etilo fue la más activa con un 76.36 % de inhibición oxidativa, y la de n-hexano mostró un 44.44 %. Es un resultado esperado ya que el extracto de acetato de etilo es de mayor polaridad y en general los productos con mejor carácter antioxidante son de esta naturaleza estructural.

**Grafica 5:** RESULTADOS DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE  $\beta$ -CAROTENO EN PARTICIONES DE ACETATO DE ETILO Y n-HEXANO DE LA RAÍZ DE SALVIA APIANA



**RSAH:** raíz *Salvia apiana* hexano; **RSAA:** raíz *Salvia apiana* acetato de etilo; **RSAM:** raíz *Salvia apiana* metanol/aqua.

## RESULTADOS DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR LA TÉCNICA DE REDUCCIÓN DEL RADICAL LIBRE DPPH.

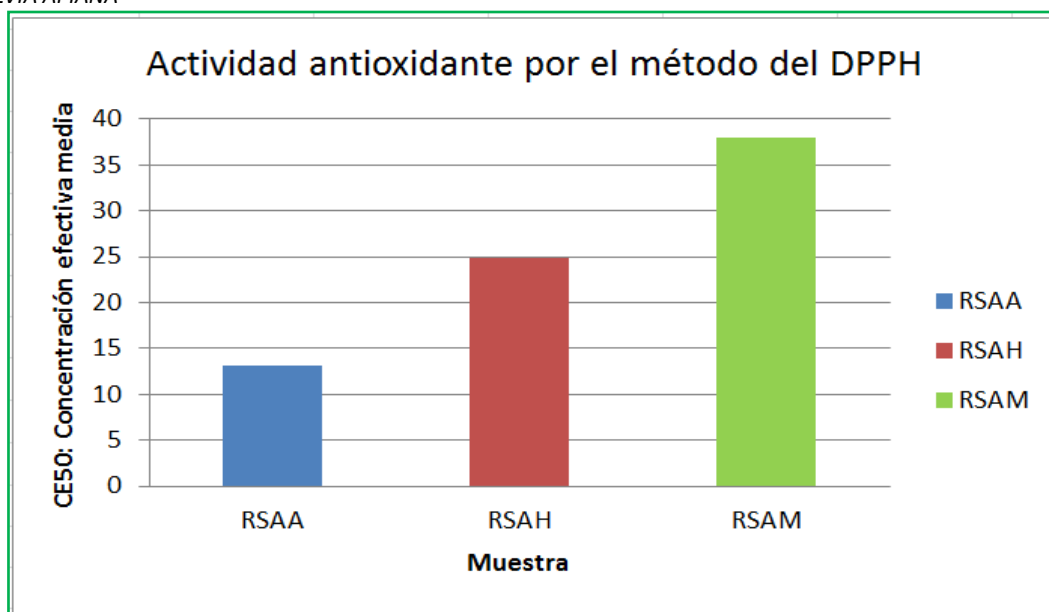
Los resultados obtenidos al realizar los ensayos para determinar la actividad antioxidante por la técnica de reducción del DPPH arrojaron los datos que se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla 17:** RESULTADOS DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DE DPPH, EN PARTICIONES DE RAÍZ DE SALVIA APIANA

Muestra	Partición Acetato De Etilo	Partición n-Hexano	Partición Metanol/ Agua
Concentración Efectiva Media CE <sub>50</sub>	13.1 µg/mL	24.8 µg/mL	37.9 µg/mL
Desviación Estándar	1.1 µg/mL	1.2 µg/mL	3.4 µg/mL

Este ensayo de la reducción del radical DPPH, mostró que, de las tres particiones evaluadas, la de acetato de etilo presentó una CE<sub>50</sub> de 13.1 µg/mL, seguida por la de n-hexano con 24.8 µg/mL, y por último la metanólica con una CE<sub>50</sub> de 37.9 µg/mL. Una vez más este resultado indica una relación de la polaridad los compuestos y su efecto antioxidante.

**Grafica 6:** RESULTADOS DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR EL MÉTODO DE DPPH, EN PARTICIONES DE RAÍZ DE SALVIA APIANA



- **RSAH:** raíz *Salvia apiana* hexano; **RSAA:** raíz *Salvia apiana* acetato de etilo; **RSAM:** raíz *Salvia apiana* metanol/agua; los resultados se expresan en Concentración efectiva media (CE<sub>50</sub>) µg/mL

## RESULTADOS DE NEUTRALIZACIÓN DEL RADICAL CATIONICO ABTS.

Los resultados obtenidos al realizar los ensayos para determinar la actividad antioxidante por la técnica de neutralización del radical catiónico ABTS se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla 18:** RESULTADOS DE ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE POR NEUTRALIZACIÓN DEL RADICAL ABTS REALIZADO EN PARTICIONES DE LA RAÍZ DE SALVIA APIANA

Muestra	Partición Acetato De Etilo	Partición n-Hexano
Concentración Efectiva Media CE <sub>50</sub>	0.52446 µg/mL	0.35886 µg/mL

En estos experimentos con la técnica del radical catiónico ABTS, se mostró que la partición de hexano tuvo una CE<sub>50</sub> a 0.358 µg/mL, mientras que de acetato de etilo fue más alta con un valor de 0.5244 µg/mL.

## AISLAMIENTO DE METABOLITOS SECUNDARIOS

De las particiones obtenidas a partir del extracto crudo, se procedió a realizar un fraccionamiento cromatográfico con la partición de acetato de etilo, debido a que en estos materiales polares se han identificado una gran variedad de metabolitos secundarios con amplio interés biológico.

También está documentado que, en los extractos de baja polaridad, generalmente se han encontrado productos Lipídicos ya conocidos. Por otro lado, los extractos hidroalcohólicos se reconocen por presentar agentes de alta polaridad de tipo hidrosoluble como los azúcares.

La mezcla eluyente que se encontró para la mejor resolución en TLC fue la que acetato de etilo /n-hexano / acetona 5:4:1. Como método de visualización se utilizó la luz ultravioleta y oleum como sistema revelador.

Después de haber seleccionado el eluyente en TLC, se procedió a realizar una cromatografía preparativa de Sílica gel como fase estacionaria, y se utilizaron 100 mg del extracto rotulado como RSAA.

Después del proceso de recorrido de la placa preparativa, se identificaron cuatro bandas coloridas con una buena resolución para proceder a la separación de estos productos.

Una vez extraídos los productos de la placa preparativa con eliminación del disolvente por rotaevaporación, se continuó a la caracterización estructural.

## CARACTERIZACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS

De la cromatografía preparativa realizada con la partición de acetato de etilo, se identificaron 4 componentes mayoritarios. Después de la purificación completa de estos 4 componentes se continuó con la determinación de su peso obteniendo los siguientes resultados:

**Tabla 19:** PESO DE COMPONENTES PUROS OBTENIDOS DE LA PARTICIÓN DE ACETATO DE ETILO

Etiquetado	Cantidad En Miligramos
E1	11.1 mg
E2	8.6 mg
E3	3.7 mg
E4	0.2 mg

*E1: etiquetado de componente puro aislado de la partición acetato de etilo, E2: etiquetado de componente puro aislado de la partición acetato de etilo, E3; etiquetado de componente puro aislado de la partición acetato de etilo E4; etiquetado de componente puro aislado de la partición acetato de etilo. mg: miligramos*

Como se puede observar los metabolitos E1 y E2 son los que se obtuvieron en una mayor cantidad para poder ser caracterizados estructuralmente.

## Caracterización Estructural De Metabolito E1

El componente puro con la etiqueta E1 fue analizado con un equipo de Resonancia Magnética Nuclear RMN-1H.

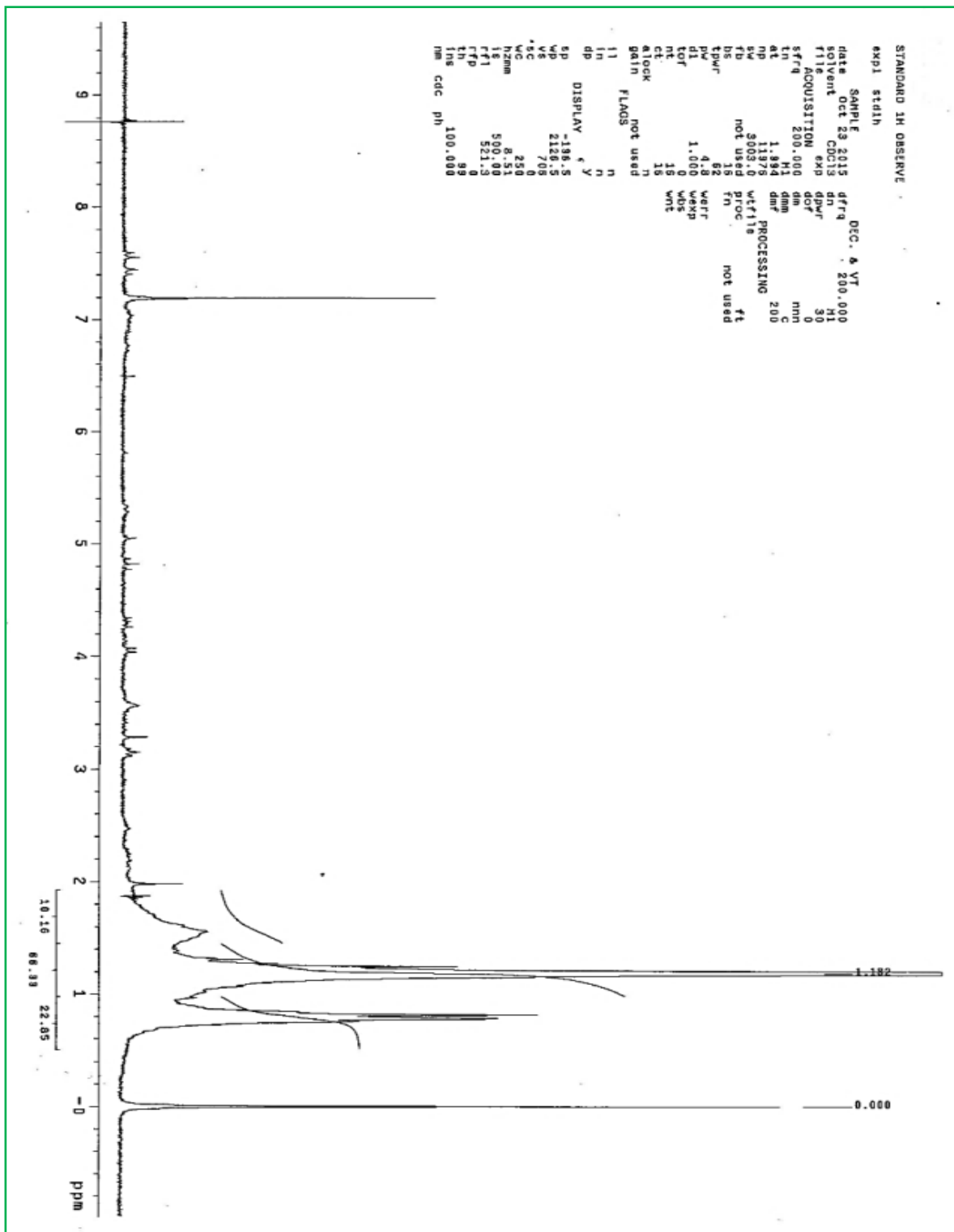


Ilustración 23: Resultados de Resonancia Magnética Nuclear RMN-1H del metabolito E1

## Caracterización Estructural Del Metabolito E2

El componente puro con la etiqueta E2 fue analizado con un equipo de Resonancia Magnética Nuclear RMN-1H

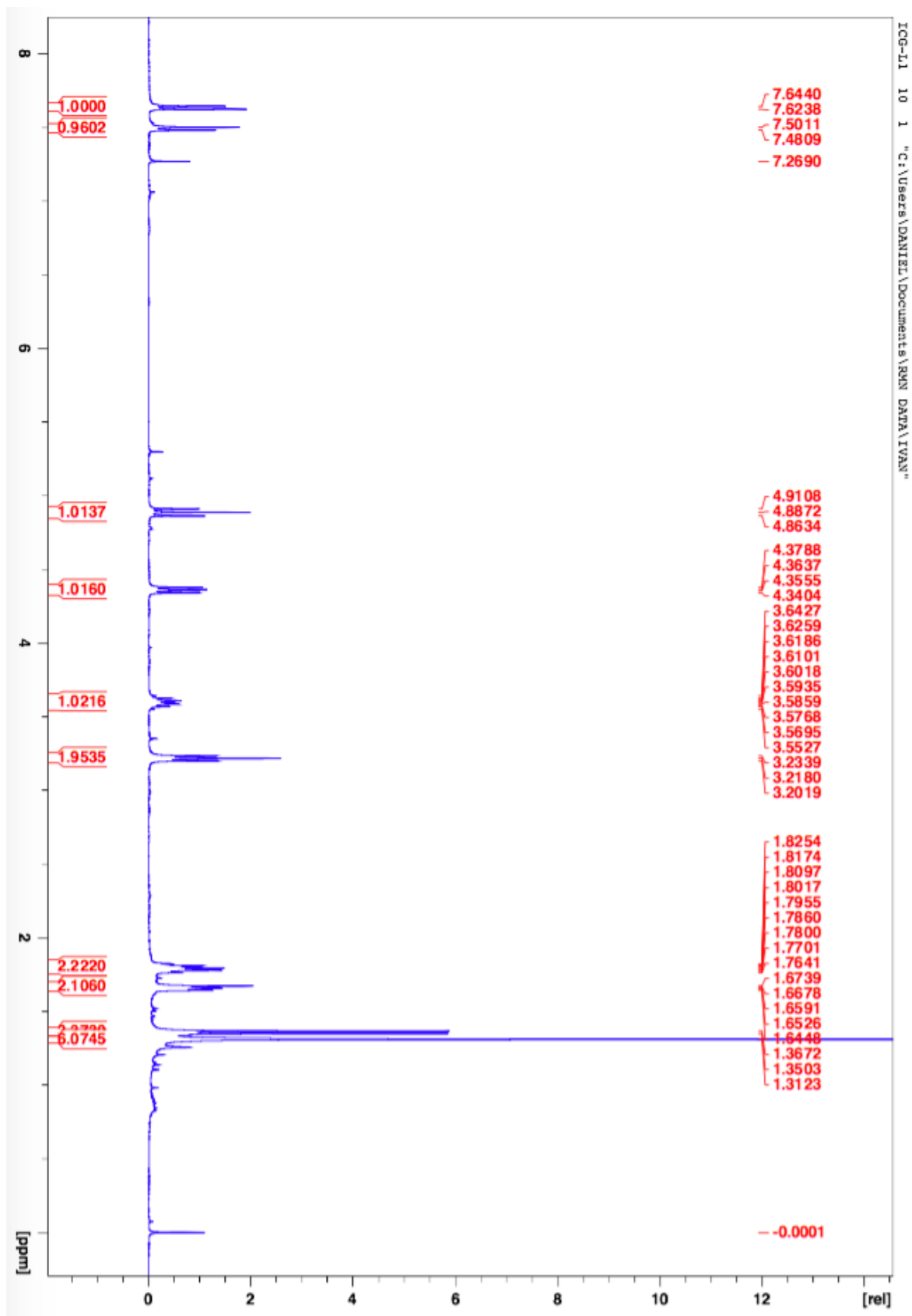


Ilustración 24: Resultados de Resonancia Magnética Nuclear RMN-1H Del Metabolito E2

## Caracterización Estructural Del Metabolito E2

El componente puro con la etiqueta E2 fue analizado con un equipo de Resonancia Magnética Nuclear RMN-C13

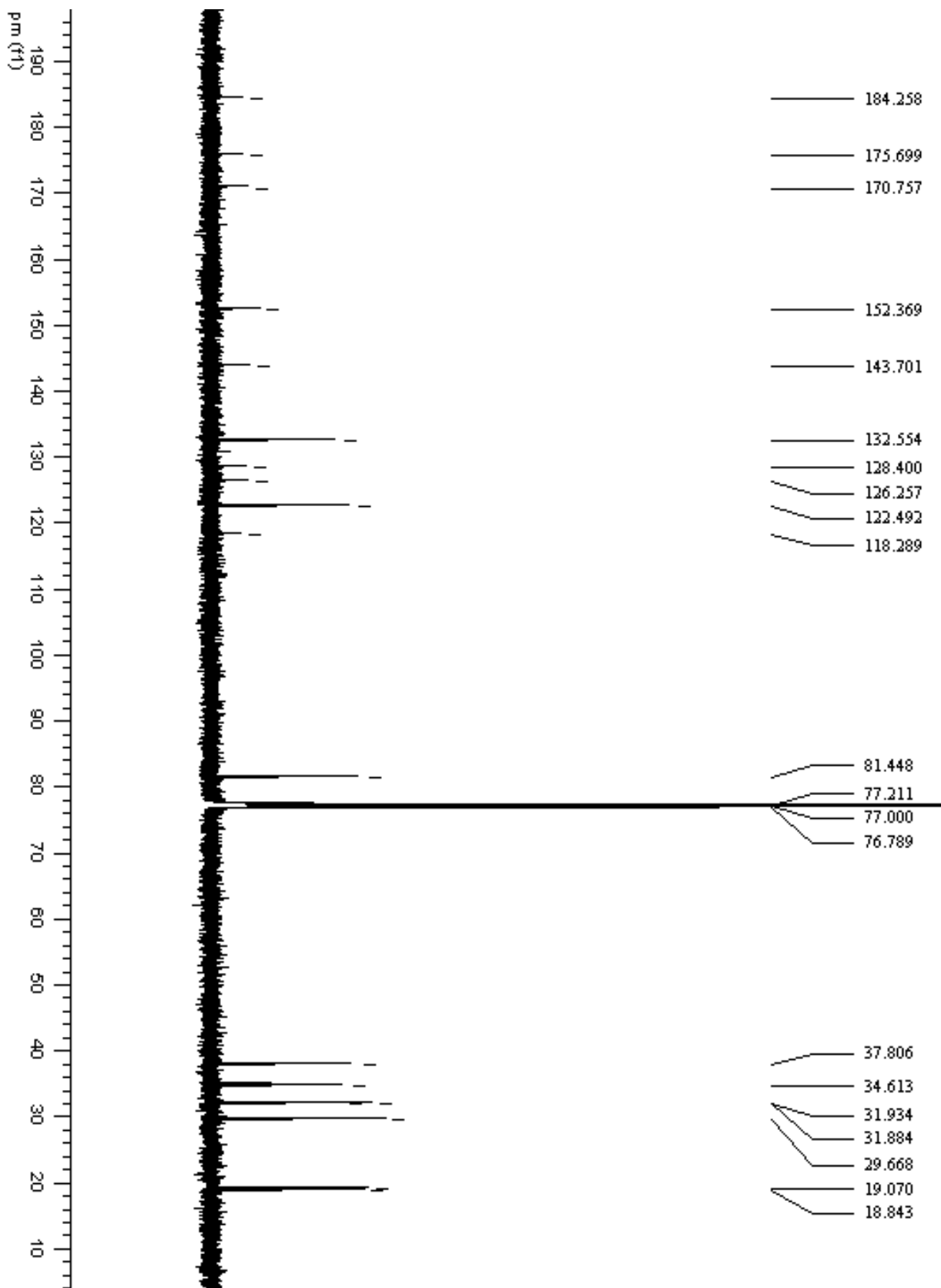


Ilustración 25: Resultados de Resonancia Magnética Nuclear RMN-C13 Del Metabolito E2

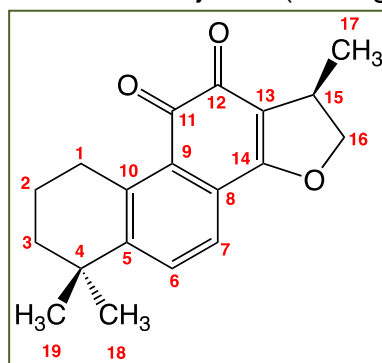
Analizando la información de los espectros de protón y carbono 13 donde destacan las señales de hidrógeno de los metilos Me-17, Me-18 y Me-19, los vinílicos H-6 y H-7 y la presencia de los carbonos carbonílicos C-11 y C-12, por análisis comparativo con los datos encontrados en la bibliografía respecto a esqueletos de tipo tanshinonas, se deduce que la estructura molecular que se obtuvo de la banda E2 es el producto natural conocido como criptotanshinona (R)-1,6,6-trimetil-1,2,6,7,8,9-hexahidrofenantro[1,2-b]furan-10,11-diona.

## DATOS FÍSICOS Y ESPECTROSCÓPICOS DE LOS PRODUCTOS AISLADOS DE *SALVIA APIANA*

(R)-1,6,6-trimetil-1,2,6,7,8,9-hexahidrofenantro[1,2-b]furan-10,11-dione  
(Criptotanshinona)

**Fórmula molecular:** C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>O<sub>3</sub>

**Aspecto físico:** Cristales anaranjados (8.6 mg)



-Figura 30 Molécula de Criptotanshinona

**EM *m/z* (%):** 296 [M]<sup>+</sup> (45), 281 (28), 253 (100), 207 (14), 165 (19), 57 (12).

**RMN <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>) δ:** 3.22 (2H, s ancho, H-1), 1.79 (2H, m, H-2), 1.66 (2H, m, H-3), 7.52 (1H 8.0 Hz, d, H-6), 7.66 (1H 8.4 Hz, d, H-7), 3.76 (1H, m, H-15), 4.95 (1H 9.2 Hz, t, H-16a), 4.49 (1H, t, H-16b), 3.79 (d, H-17a), 3.79 (d, H-17b), 1.31 (s, H-18), 1.31 (s, H-19).

**RMN <sup>13</sup>C (CDCl<sub>3</sub>) δ:** 29.7(t, C-1), 19.2 (t, C-2), 37.7 (t, C-3), 34.9 (s, C-4), 144.0 (s, C-5), 132.7 (d, C-6), 122.8 (d, C-7), 128.1 (s, C-8), 125.6 (s, C-9), 153.3 (s, C-10), 183.7 (s, C-11), 176.4 (s, C-12), 127.7 (s, C-13), 173.2 (s, C-14), 43.4 (d, C-15), 77.2 (t, C-16), 64.2 (t, C-17), 31.8 (q, C-18), 31.9 (q, C-19).

# CONCLUSIONES

## CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos de los ensayos realizados con un panel de distintas cepas bacterianas y de levaduras, se pudo establecer que el extracto de acetato de etilo de *Salvia apiana* presenta un mejor perfil antimicrobiano.

Con una CMI de 21  $\mu\text{g/mL}$ , la partición hexánica de *Salvia apiana*, presentó una mejor actividad antifúngica frente a las cepas seleccionadas en este estudio.

A excepción de la técnica del radical catiónico ABTS, los resultados mostrados por los métodos de la decoloración oxidativa del  $\beta$ -caroteno y la reducción del radical libre DPPH, 76.36 % y 13.1  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente, indican que los componentes del extracto de acetato de etilo presentan un mejor efecto de inhibición oxidativa.

La actividad antioxidante de los productos de mediana polaridad en la partición de acetato de etilo, puede estar relacionada con la cantidad de compuestos polifenólicos presentes en este extracto, de acuerdo al estudio realizado por el método de Folin-Ciocalteu.

Los estudios espectroscópicos y de espectrometría de masas realizados con la muestra aislada E2, sugieren que la estructura molecular de este compuesto es el producto natural diterpénico conocido como criptotanshinona.

# ÍNDICE DE CONTENIDO

## ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

<b>Ilustración 1</b> “Flower Burial” El "entierro floral" de la Cueva Shanidar _____	14
<b>Ilustración 2.</b> Tabla de arcilla encontrada en las ruinas de Nippur _____	15
<b>Ilustración 3.</b> Estructura química del alcanfor y la efedrina _____	15
<b>Ilustración 4</b> Pen ts'ao kang mu, vol.6 _____	16
<b>Ilustración 6.</b> “Dioscórides recibiendo la mandrágora” ilustración del Codex “Medicum Graecum” _____	17
<b>Ilustración 5</b> Papiro de Ebers expuesto en la Biblioteca de la Universidad de Leipzig _____	17
<b>Ilustración 7</b> Pintura del príncipe azteca Moctezuma Xocoyotzin _____	18
<b>Ilustración 8</b> Ilustración de plantas medicinales del texto “Ritual de los becabes” _____	18
<b>Ilustración 9:</b> Distribución de la familia Lamiaceae en el mundo _____	25
<b>Ilustración 10:</b> Distribución De La Familia Lamiaceae En México <sup>9</sup> _____	25
<b>Ilustración 11.</b> <i>Riqueza Y Endemismo De La Familia Lamiaceae</i> <sup>10</sup> . _____	26
<b>Ilustración 12:</b> <i>Salvia officinalis</i> _____	28
<b>Ilustración 13</b> <i>Salvia microphylla kunth</i> _____	28
<b>Ilustración 14:</b> <i>Salvia lavandulifolia</i> _____	29
<b>Ilustración 15:</b> <i>Salvia apiana</i> _____	29
<b>Ilustración 16:</b> Ilustración de hojas, follaje y semilla de salvia apiana _____	27
<b>Ilustración 18:</b> Distribución de <i>Salvia apiana</i> en el estado de Baja california _____	27
<b>Ilustración 20:</b> Lugar de recolecta de raíz <i>Salvia apiana</i> San Antonio de las Minas, Ensenada, Baja California _____	33
<b>Ilustración 21:</b> Follaje de <i>Salvia apiana</i> _____	33
<b>Ilustración 22:</b> Raíz de <i>Salvia apiana</i> recolectada _____	34
<b>Ilustración 23:</b> Extracto crudo de la raíz de <i>Salvia apiana</i> _____	34
<b>Ilustración 24:</b> Esquema de fraccionamientos realizados a la raíz de <i>Salvia apiana</i> _____	35
<b>Ilustración 25:</b> Resultados de Resonancia Magnética Nuclear RMN-1H del metabolito E1 ____	69
<b>Ilustración 26:</b> Resultados de Resonancia Magnética Nuclear RMN-1H Del Metabolito E2 ____	70
<b>Ilustración 27:</b> Resultados de Resonancia Magnética Nuclear RMN-C13 Del Metabolito E2 ____	71

## ÍNDICE DE GRAFIICAS

<b>Grafica 1:</b> Resultado Del Ensayo Antimicrobiano En Particiones Acetato De Etilo, N-Hexano Y Metanol .....	60
<b>Grafica 2:</b> Resultados De Ensayo Antifúngica En Particiones De La Raíz De Salvia Apiana.....	61
<b>Grafica 3:</b> Resultados Del Ensayo De Inhibición Xantina Oxidasa Realizado En Particiones De La Raíz De Salvia Apiana .....	62
<b>Grafica 4:</b> Resultados Del Ensayo Para Determinación De Fenoles En Particiones De La Raíz De Salvia Apiana .....	63
<b>Grafica 5:</b> Resultados De Actividad Antioxidante B-Caroteno En Particiones De Acetato De Etilo Y N-Hexano De La Raíz De Salvia Apiana.....	64
<b>Grafica 6:</b> Resultados De Actividad Antioxidante Por El Método De Dpph, En Particiones De Raíz De Salvia Apiana .....	65

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Especificaciones De Espectrofotometría Para Cada Microorganismo .....	45
Tabla 2: Métodos Colorimétricos Para La Identificación De Metabolitos .....	48
Tabla 3: Experimento Colorimétrico Para Identificación De Alcaloides.....	49
Tabla 4: Experimento Colorimétrico Para La Identificación De Taninos.....	50
Tabla 5: Método Colorimétrico Para La Identificación De Esteroides Y Triterpenos.....	51
Tabla 6: Método Colorimétrico Para La Identificación De Flavonoides.....	52
Tabla 7: Método Colorimétrico Para La Identificación De Antocianinas .....	53
Tabla 8: Método Colorimétrico Para La Identificación De Carbohidratos .....	54
Tabla 9: Método Colorimétrico Para La Identificación De Saponinas.....	55
Tabla 10: Método Colorimétrico Para La Identificación De Glúcidos Antraquinonicos.....	56
Tabla 11 Resultados De Pruebas Colorimétricas Realizadas A Particiones De Raíz De <i>Salvia Apiana</i> .....	58
Tabla 12: Resultados De Ensayo Antimicrobiano Realizado A Particiones De La Raíz De <i>Salvia Apiana</i> .....	59
Tabla 13: Resultados De Ensayo Antifúngico Realizado A Particiones De La Raíz <i>Salvia Apiana</i> : .....	61
Tabla 14: Resultados De Inhibición De La Xantina Oxidasa Con Las Particiones De La Raíz De <i>Salvia Apiana</i> .....	62
Tabla 15: Resultados Del Ensayo Para Determinación De Fenoles En Particiones De La Raíz De <i>Salvia Apiana</i> .....	63
Tabla 16: Resultados De Actividad Antioxidante B-Caroteno En Particiones De Acetato De Etilo Y N-Hexano De La Raíz De <i>Salvia Apiana</i> . .....	64
Tabla 17: Resultados De Actividad Antioxidante Por El Método De Dpph, En Particiones De Raíz De <i>Salvia Apiana</i> .....	65
Tabla 18: Resultados De Actividad Antioxidante Por Neutralización Del Radical Abts Realizado En Particiones De La Raíz De <i>Salvia Apiana</i> .....	66
Tabla 19: Peso De Componentes Puros Obtenidos De La Partición De Acetato De Etilo .....	68

