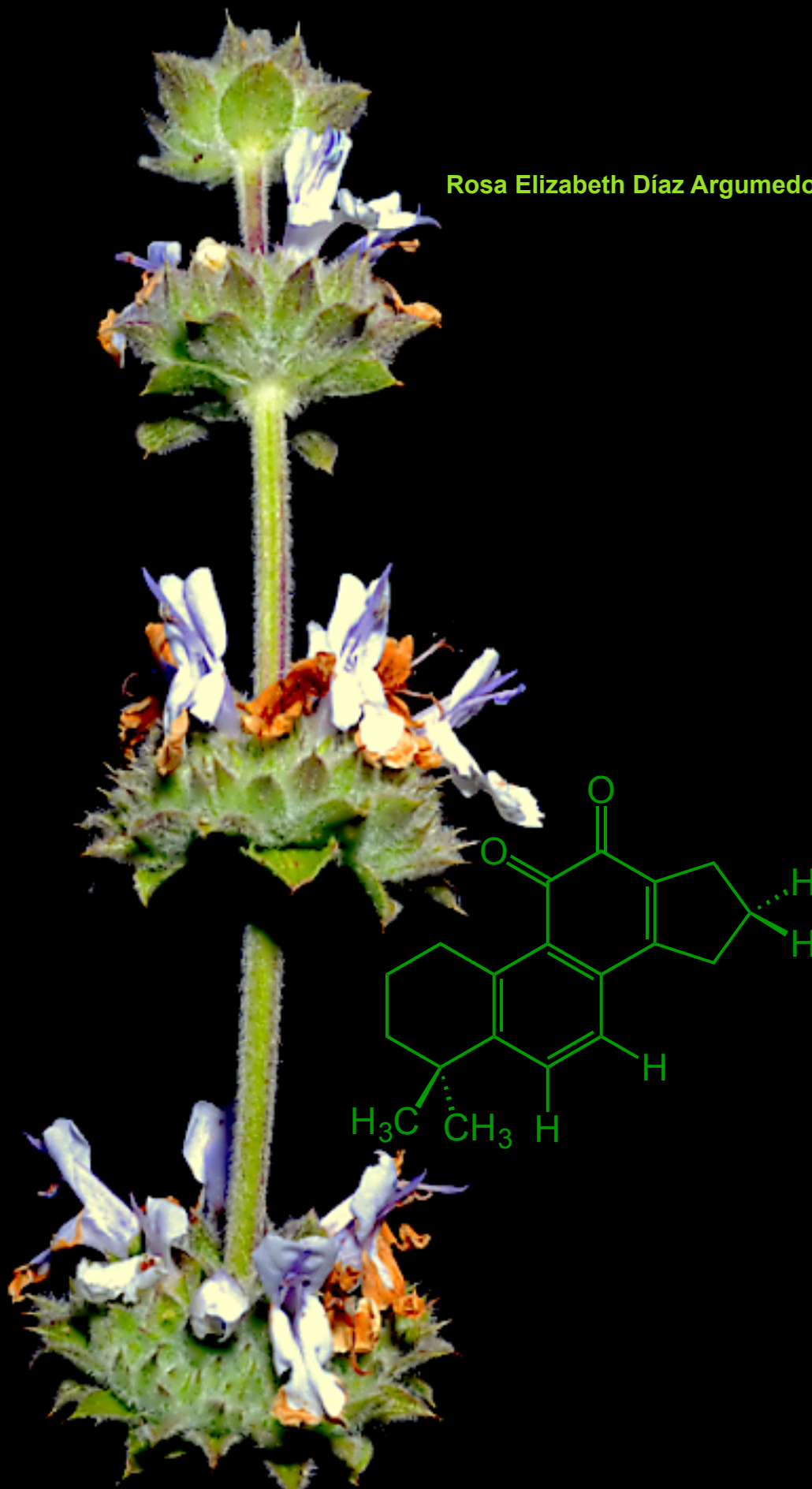


Rosa Elizabeth Díaz Argumedo



**Perfil antioxidante del extracto metanólico de la raíz de
*Salvia mellifera***

Tijuana, Baja California, a 18 de abril del 2017.

COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA

ASUNTO: Voto Aprobatorio

Habiendo fungido como Director de la tesis titulada **“Perfil antioxidante del extracto metabólico de la raíz de *Salvia mellifera*”**, elaborada por **Rosa Elizabeth Díaz Argumedo**, manifiesto a ustedes que reúne los requisitos académicos establecidos para ser considerada por el jurado de examen.

ATENTAMENTE



Dr. Iván Córdova Guerrero
Director de Tesis

C.c.p. Archivo

Tijuana, Baja California, a 18 de Abril del 2017.

COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA

ASUNTO: Voto Aprobatorio

Habiendo fungido como Co-Directora de la tesis titulada **“Perfil antioxidante del extracto metanólico de la raíz de Salvia mellifera”**, elaborada por **Rosa Elizabeth Díaz Argumedo**, manifiesto a ustedes que reúne los requisitos académicos establecidos para ser considerada por el jurado de examen.

ATENTAMENTE



Dra. Diana Bueno Gutiérrez
Co-Directora

C.c.p. Archivo

Tijuana, Baja California, a 18 de abril del 2017.

COMITÉ DE ESTUDIOS DE POSGRADO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA

ASUNTO: Voto Aprobatorio

Habiendo fungido como Sinodal de la tesis titulada **“Perfil antioxidante del extracto metabólico de la raíz de *Salvia mellifera*”**, elaborada por **Rosa Elizabeth Díaz Argumedo**, manifiesto a ustedes que reúne los requisitos académicos establecidos para ser considerada por el jurado de examen.

ATENTAMENTE



Dr. Victor García González
Sinodal

C.c.p. Archivo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA Y PSICOLOGÍA
MAESTRÍA EN SALUD PÚBLICA



**Perfil antioxidante del extracto metanólico de la raíz de
*Salvia mellifera***

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD

PRESENTA:

Rosa Elizabeth Díaz Argumedo

DIRECTOR
Dr. Iván Córdova Guerrero

Tijuana B.C., a 22 de mayo de 2017

DEDICATORIA.

A todos los indigenas de la frontera norte de México y sur de Estados Unidos, en especial al pueblo Chumash.



Circulo del sol del pueblo Chumash

AGRADECIMIENTOS.

**Al pueblo de México que con su aportación fue posible la obtención de
la beca CONACYT.**

A la Universidad Autónoma de Baja California.

A la Facultad de Medicina y Psicología Campus Tijuana.

A la Facultad de Medicina Campus Mexicali.

A la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería Campus Tijuana.

**Al Laboratorio de Productos Naturales y Química Medicinal y cada uno
de sus miembros, en especial a la M.C. Laura Díaz Rubio.**

**A mis asesores Dr. Iván Córdova Guerrero, Dra. Diana Bueno y Dr. Victor
García.**

**A mis maestros del Programa de la Maestría y Doctorado en Ciencias de
la Salud**

A mis compañeros y amigos.

A mi familia.

RESUMEN.

En esta Tesis de Maestría se evaluó el potencial antioxidante del extracto metanólico obtenido de la raíz de la planta *Salvia mellifera* por medio de dos métodos espectrofotométricos. El extracto fue fraccionado en 8 partes (R1, R2..., R8), siendo R1 no polar y R8 polar. Los valores se expresaron en concentración efectiva media (CE_{50}) de cantidad máxima y mínima a utilizar para observar un efecto antioxidante. Para el método DPPH los valores máximos y mínimos fueron 1.389 y 0.001 mg/mL, mientras que para el método ABTS se obtuvieron los valores 2.89 y 0.26 mg/mL, respectivamente. En general, las 8 fracciones presentaron una potente actividad antioxidante en comparación con los estándares utilizados, destacando R8 con los valores más bajos obtenidos en ambas pruebas, y por lo tanto, la que presentó mejor perfil antioxidante. Así mismo, se seleccionó R5 y R6 de polaridad media para la identificación de compuestos del tipo diterpeno, logrando el aislamiento e identificación de la molécula criptotanshinona, la cual fue caracterizada por medio de RMN. Como parte de las pruebas biológicas, se midió la viabilidad celular de macrófagos frente a R5 y R6. Sin embargo, la recristalización del extracto en los cultivos celulares evitó que fuera posible la permeabilización de la línea celular para medir el efecto antiinflamatorio. Se sugiere un cambio en la metodología para lograr observar la bioactividad en los extractos seleccionados, así como el seguimiento en la búsqueda de nuevas moléculas de interés farmacológico y la investigación de sus posibles efectos terapéuticos.

ÍNDICE DE CONTENIDO.

DEDICATORIA.	vii
AGRADECIMIENTOS.	viii
RESUMEN.	ix
ÍNDICE DE CONTENIDO.	x
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.	xvi
1.MARCO REFERENCIAL.	1
2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.	7
2.1. HIPÓTESIS.	8
3. JUSTIFICACIÓN.	9
4. OBJETIVOS.	13
4.1. Objetivo general.	14
4.2. Objetivos específicos.	14
5. MARCO TEÓRICO.	15
5.1. Sobre Salvia mellifera.	16
5.1.2. Familia Lameacea.	16
5.1.3. Género Salvia.	17
5.1.4. Orden taxonómico.	19
5.1.5. Sinonimia.	20
5.1.6. Etimología.	20
5.1.7. Descripción.	20
5.1.8. Aspectos ecológicos.	22
5.1.9. Usos tradicionales.	23
5.1.10 Usos ceremoniales.	24
5.1.11. Usos medicinales y culinarios.	25
5.1.12. Terpenos de Salvia mellifera.	26
5.2. Metabolismo de las plantas.	29
5.2.1. Productos primarios.	29

5.2.2. Metabolitos secundarios o productos naturales.	30
5.2.3. Terpenos.	33
5.2.4. Síntesis isoprenoide.	34
5.2.5. El isopreno activo o isoprenil-pirofosfato.	35
5.2.6. Sesquiterpenos.	36
5.2.7. Diterpenos.	37
5.3. Antioxidantes.	39
5.3.1. Oxígeno molecular (triplete).	40
5.3.2. Especies reactivas del oxígeno.	41
5.3.3. Especies reactivas al nitrógeno.	42
5.3.4. Otra fuente de radicales libres, las enzimas.	43
5.3.5. Radicales endógenos.	43
5.3.6. Estrés o daño oxidativo.	44
5.4. Sistema inmune.	46
5.4.1. Macrófagos.	46
5.4.2. Citocinas.	47
5.4.3. Lipopolisacaridos (LPS).	47
5.4.4. Inflamación.	49
5.4.5. Antiinflamatorios no esteroideos (AINES).	50
5.4.6. Ciclooxygenasa (COX) y oxido nitrico (NO).	52
5.5. Fundamentos de técnicas de perfil fitoquímico.	54
5.5.1. Alcaloides.	54
5.5.2. Taninos.	55
5.5.3. Esteroides y triterpenoides.	55
5.5.4. Flavonoides.	56
5.5.5. Antocianinas.	56
5.5.6. Carbohidratos.	56
5.5.7. Saponinas.	57
5.5.8. Glúcósidos Antraquinónicos.	57

5.6. Fundamentos de actividad antioxidante.	59
5.6.1. Ensayos basados en transferencia de electrones (ET).	60
5.6.2. Ensayo reducción del radical DPPH●.	60
5.6.3. Ensayo reducción del radical ABTS●+.	62
6. MÉTODOS.	64
6.1 Evaluación fitoquímica.	65
6.1.1. Obtención e identificación de <i>Salvia mellifera</i> .	65
6.1.2. Manejo de la muestra y maceración.	65
6.1.3. Partición del crudo.	66
6.1.4. Pruebas colorimétricas.	68
6.2. Aislamiento de metabolitos secundarios.	74
6.3. Evaluación química.	82
6.3.1. Reducción del radical libre DPPH.	82
6.3.2. Reducción del radical ABTS*.	83
6.4. Evaluación biológica.	86
6.4.1. Activación, siembra y proliferación de células.	86
6.4.2. Cultivo celular.	86
6.4.3. Capacidad citotóxica.	87
6.4.4. Capacidad antiinflamatoria. Ensayo con LPS.	89
6.5 Análisis Estadístico.	91
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	92
7.1. Perfil fitoquímico preliminar de RSM-A y RSM-H.	93
7.2. Obtención de metabolitos.	95
7.3 Actividad antioxidante.	99
7.3.1. Actividad antioxidante. Método DPPH.	102
7.3.2. Actividad antioxidante. Método ABTS.	103
7.4. Viabilidad celular MTT.	104
7.5. Capacidad antiinflamatoria. Prueba con LPS.	108
8. CONCLUSIONES	109
9. BIBLIOGRAFÍA	112

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.

Fig. 1. Distribución de la familia Lamiaceae en la República Mexicana (Martínez-Gordillo et al. 2013).	18
Fig. 2. Ilustración de <i>Salvia mellifera</i> (Moore 2003).	21
Fig. 3. Rafael, un chumash, en Soxtonoymu, Santa Ynez. Finales del siglo XIX.	24
Fig. 4. La concha del abulón como utensilio casero con hojas de <i>Salvia apiana</i> .	25
Fig. 5. Respuesta de defensa de la planta por medio de sus metabolitos secundarios. Una conceptualización ecológica de la función de los metabolitos secundarios (Sepúlveda-Jiménez et al. 2003).	31
Fig. 6. Vía de síntesis de los principales grupos de metabolitos secundarios y su relación con la fotosíntesis (Azcón-Bieto et al 2008).	32
Fig. 7. Estructura molecular simplificada del isopreno, unidad de los terpenos.	33
Fig. 8. Conjugación cabeza-cola de dos molecular de isoprenil-pirofosfato.	35
Fig. 9. Isoprenil-pirofosfato, precursor en la biosíntesis de los terpenos.	36
Fig. 10. Ruta biosintética de los terpenos.	38
Fig. 11. Síntesis y función de eicosanoides (Rivera-Ordoñez 2006).	51
Fig. 12. Mecanismos de reacción por transferencia de electrones (Huang et al. 2005).	60
Fig. 13. Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante (Alam et al. 2012).	61
Fig. 14. Estructura del ABTS●+ antes y después de la reacción con el antioxidante (Zulueta et al. 2009).	63
Fig. 15. Revelado de TLC de RSM-A (extracto de raíz fracción acetato de etilo).	74
Fig. 16. Cromatografía de capa fina del extracto RSM-A.	75
Fig. 17. Recolección de fracciones por el sistema de elución por gradientes de polaridad en columna cromatográfica	76
Fig. 18. Cromatografía comparativa de RSM-A.	77

Fig. 19. Cromatografía de las reuniones 1 a la 8 de RSM-A.	78
Fig. 20. Siembra de R5 en placa cromatográfica preparativa.	79
Fig. 21. Cromatografía del extracto crudo de RSM-A.	94
Fig. 22. Compuesto A. Criptotanshinona.	95
Fig. 23. Espectro de RMN del compuesto A aislado de R5 de RSM-A y reconstrucción de la molécula criptotanshinona.	96
Fig. 24. Resultados obtenidos por el método DDPH expresados en %AA (porcentaje de actividad antioxidante) de cada reunión (R1-R8) para la fracción RSM-A.	102
Fig. 25. Resultados obtenidos por el método ABTS expresados en %AA (porcentaje de actividad antioxidante) de cada reunión (R1-R8) para la fracción RSM-A.	103
Fig. 26. Cultivo celular RAW 264.7.	105
Fig. 27. Viabilidad celular de macrófagos (RAW 264.7) por el método MTT	108

Tabla 1. Orden taxonómico de <i>Salvia mellifera</i>	19
Tabla 2. Fracciones por polaridad del extracto crudo de RSM-A.	67
Tabla 3. Pesos secos de las reuniones 1-8 obtenidos por medio de la columna cromatográfica del extracto RSM-A.	79
Tabla 4. Pesos obtenidos de cada franja aislada de la reunión 5 (R5).	80
Tabla 5. Componentes de las fracciones AcOEt y n-Hexano encontrados en la raíz de <i>Salvia mellifera</i> .	93
Tabla 6. Actividad antioxidante del extracto RSM-A de la raíz <i>S. mellifera</i> . Método DPPH y ABTS	100
Tabla 7. Condiciones y resultados MTT en R5	104
Tabla 8. Condiciones y resultados MTT en R6.	105

LISTA DE ABREVIATURAS.

ABTS	Método basado en la decoloración del ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico.
AcOEt	Acetato de etilo.
Am0	Absorvancia de la muestra a 0 min.
Am120	Absorvancia de la muestra a 120 min.
B.C.	Baja California.
cm	Centímetro.
DCM	Diclorometano.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DPPH	Método basado en la estabilidad del radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil.
g	Gramo.
CE ₅₀	Concentración efectiva media
LPS	Lipopolisacáridos.
MeOH	Metanol.
Mg	Miligramos.
min	Minutos.
mL	Mililitros.
MTT	Ensayo basado en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol.
n-Hexano	Hexano.
°C	Grados centígrados.
R1, R2...	Reunión 1, Reunión 2 (...8).
RAW 264.7	Línea celular de macrófagos de leucemia murina.
RNM	Resonancia magnética nuclear.
RSM-A	Raíz Salvia mellifera fracción acetato de etilo.
RSM-H	Raíz Salvia mellifera fracción hexano.
TLC	Thin-layer chromatography por sus siglas en inglés.

UV	Ultravioleta.
v/v	Volumen/volumen.
µg	Microgramos.
µL	Microlitro.

1.MARCO REFERENCIAL.

El empleo etnofarmacológico de Salvias y los estudios que se han generado al respecto, no se limitan a una región específica, ya que el género es muy diverso en todo el globo terráqueo y su uso medicinal es reconocido por diferentes culturas. Por ejemplo, en América, de los estudios realizados en plantas nativas, enfocados en la obtención de moléculas con potencial farmacológico, se describió a *Salvia texana* con una mayor concentración de diterpenos aislados de su raíz (Gonzalez et al. 1989).

Otras especies de *Salvia* fueron puestas en la mira de grupos académicos interesados en la obtención de productos naturales, como es el caso de *Salvia apiana*, especie endémica de Baja California, que al igual que *Salvia mellifera* comparte una relación ecológica de hibridación (Epling 1947; González et al. 1992), ambas bien conocidas entre los pueblos indígenas por sus propiedades terapéuticas y a las cuales se les ha dado un valor cultural muy alto en la conformación de su visión universal.

Quizá sea la característica más notable de algunas Salvias descritas como medicinales es ser plantas muy aromáticas, resultado del desprendimiento de los terpenos altamente volátiles que producen. Dement y colaboradores en 1975, explicaron los mecanismos de volatilización de monoterpenos desprendidos de *Salvia mellifera* y su relación con la actividad metabólica durante la fotosíntesis. Observaron que estos compuestos contribuían significativamente a la composición de la atmósfera circundante.

Así pues, se estableció que existía una relación entre presión de vapor generada de los productos volátiles al interior de la hoja con respecto a los cambios de temperatura y la humedad del aire. Este trabajo llevó al aislamiento de dichos terpenos en diferentes estructuras de la planta, contribuyendo así al conociendo de sus componentes principales que fueron reportados con los siguientes porcentajes: 50% alcanfor, 25% 1,8-cineol, y en porcentajes menores α -pineno, β -pineno, canfeno, limoneno, cimeno, mirceno, β -felandreno y γ -terpineno.

Los estudios sobre *S. mellifera* continuaron con el apoyo de metodologías más especializadas, encontrando presencia de otras estructuras de terpenos, como triterpenos (González et al. 1990), diterpenos abiatanos (González et al. 1991), así como compuestos ya conocidos: ácido carnósico y carnosol (González et al. 1987), rosmanol (González et al. 1985), isorosmanol (Nakatani e Inatani 1983), galdosol (González et al. 1985), rosmadial (Nakatani e Inatani 1984), salvicanol (Bandaranayake 1980; Fraga et al. 1986) y dimetilsavicanol (Kelecom y Medimos 1989).

En 1992, con los nuevos diterpenos aislados de la parte aérea de la *S. mellifera*, junto con los compuestos ya conocidos, se propone la postulación de una ruta biogenética de diterpenos altamente oxidados, en el que los procesos enzimáticos de deshidrogenación y la participación de oxígeno en estado singlete juega un papel clave en la planta (González et al 1992).

Poco después se logró aislar nuevos terpenos por medio de la espectroscopia y correlación química: ácido 16-acetoxicarnosico, 16-hidroxirosmanol, 16-hidroxisorosmanol, 16-hidroxiepirosmanol, 11,12,16,20-tetrahidroxi-abieta-8,11,13-trieno, 16-hidroxi-20-20-deoxocarnosol y 16-hidroxi-rosmadial más los compuestos conocidos, ácido 16-hidroxycarnósico, ácido carnósico, carnosol, rosmanol, 7-O-metil-rosmadol, isorosmanol, epirosmanol, rosmadiol, pisiferol, salvicanol y demetilsalvicanol aislados de la parte aérea de *S. mellifera*, así como Criptotanshinona aislada de la raíz de la planta, y usado como punto de comparación para la configuración en el Carbono 15 (C-15) de los nuevos diterpenos, con base a las consideraciones biogenéticas más probables (Luis y Andrés1993).

Extraído de sus aceites esenciales, un nuevo tipo de sesquiterpeno eramofilano, el cual llamaron salvimelliferol, se sumó a la lista de compuestos identificados de la raíz de *S. mellifera*, así como los ya conocidos: salvicanol, pisiferanol, 8(14),15-isopimaradien-7 α -ol, β -sitosterol y el natural 5 α ,6-dihidro-salviasperanol (Luis y Andrés 1999). Pero hasta 2010, De Martino y colaboradores, identificaron por medio de cromatografía de gases acoplado a masas un total de 54 componentes del aceite esencial de *S. mellifera*, obteniendo una fracción de 14.2% de sesquiterpenos, y 76.1% de monoterpenos, siendo los compuestos oxigenados representativos con 57%, de los cuales destacan 1,8-cineol con 39.8% y alcanfor con 12.2%. Pineno fue reportado como el principal monoterpeno no oxigenado con una presencia de 9.2% (De Martino et al. 2010).

A medida que los trabajos de aislamiento de productos naturales fueron creciendo el interés por analizar su actividad biológica también fue en aumento. Por ejemplo, se había establecido una relación entre los diterpenos encontrados en algunas especies de *Salvia* y su actividad antimicrobiana (González et al. 1989), pero en 1993 la estructura de veintidós diterpenos abietatrienos de *S. canadiensis* y *S. mellifera* se evaluaron frente a tres cepas de bacterias y una levadura. Los resultados obtenidos mostraron que la agrupación catecol libre es esencial para la actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas. Los investigadores observaron que en presencia de un grupo hidroxilo adicional en C-6 o C-7, la actividad se redujo a menos de un tercio, y un grupo hidroximetileno en C-16 también produjo un rendimiento ineficaz, concluyendo que los compuestos en los que la agrupación catecol habían sido oxidados a una quinona exhibieron actividad mejorada (Moujir et al. 1993).

Más adelante, la bioactividad de veintidós diterpenoides (terpenos con esqueleto modificado y reorganizado químicamente por oxidación) aislados de diferentes especies de *Salvias* fue estudiada en las líneas celulares humanas HeLa (cáncer cérvico-uterino) y Hep-2 (carcinoma epidermoide). Para el caso de *Salvia mellifera*, los compuestos ferruginol, taxodiona, isotanshinona III y 7 α -hidroxiroileanona aislados de *S. mellifera*, tuvieron actividad citotóxica. Así mismo, roileanona y demetilsalvican-11-12-diona se observaron activos en las células HeLa y Hep-2 respectivamente. Por otro

lado, se observó la actividad antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas con los diterpenoides ferruginol, taxodiona, 7 α -hidroxi-roileanona y demetilsalvican-11-12-diona, no encontrándose actividad para cepas Gram negativas o *Candida albicans* (Moujir et al. 1996).

2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Las propiedades físico-químicas del extracto metanólico de raíz de *Salvia mellifera* son capaces de producir porcentajes altos de inhibición oxidativa para poderlos catalogar como antioxidantes fuertes?

¿De los compuestos aislados de tipo terpeno, es posible establecer un perfil con actividad biológica?

2.1. HIPÓTESIS.

La actividad antioxidante del extracto metanólico de la raíz de *Salvia mellifera* tiene un perfil antioxidante similar en comparación con los estándares considerados antioxidantes fuertes, así como un potencial de bioactividad debido principalmente a la presencia de compuestos del tipo terpeno.

3. JUSTIFICACIÓN.

El uso etnofarmacológico de plantas para el tratamiento de diversos padecimientos derivados de la oxidación celular y la necesidad de su caracterización farmacológica, promueven la evaluación de actividad antioxidante.

Los radicales libres y el daño oxidativo están relacionados con la muerte celular, siendo la peroxidación lipídica un mecanismo que lleva a la destrucción oxidativa de la membrana celular. Por lo cual, los radicales libres y el daño oxidativo pueden llevar a la inflamación aguda y crónica.

En la actualidad, gran parte de las enfermedades se relaciona con estrés oxidativo y con procesos de inflamación aguda y crónica, ejemplo son: artritis reumatoide, diabetes, obesidad y cáncer. Los efectos secundarios causados por los fármacos antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos (AINES) utilizados para tratar dichas enfermedades podrían dejar de ser una preocupación para la salud de los pacientes si existen más opciones terapéuticas y/o farmacéuticas para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la inflamación.

Con el fin de contribuir con el conocimiento de la flora de Baja California, se eligió la especie *Salvia mellifera*, debido a que el Género *Salvia*

es representativo en el territorio nacional y particularmente *S. mellifera* es encontrada en el territorio binacional México-Estados Unidos.

En el presente estudio, se realizó un análisis fitoquímico preliminar de la composición química y bioactividad a nivel antioxidante del extracto de la raíz de la planta. Este paso es importante, ya que permite establecer las características fisicoquímicas para lograr una búsqueda más efectiva en la obtención y aislamiento de otros compuestos de interés farmacológico, como fue el caso de los compuestos de tipo terpeno. La presencia de terpenos es bien conocida en este género, por lo que se esperaba lograr observarlos y obtener moléculas aisladas para su caracterización química.

Las propiedades farmacológicas de los terpenos, como se ha reportado en especies cercanas a *Salvia mellifera*, ha despertado gran interés debido a su uso medicinal tradicional, y que gracias a los estudios realizados en los últimos años, donde se ha logrado aislar e identificar moléculas con actividad biológica con resultados alentadores para su uso contra células de cáncer humano, es que se debe dar continuidad a la búsqueda y comprensión de los mecanismos de acción biológica de dichos compuestos.

En el caso de plantas endémicas, este conocimiento no sólo contribuye benéficamente al uso tradicional de los recursos naturales de la región norte de México, también promueve la apertura de nuevas líneas de

investigación enfocadas al aprovechamiento sustentable de la flora regional, a la conservación del conocimiento medicinal indígena, así como a la ampliación del conocimiento en materia farmacológica medicinal, hasta ahora aún insuficiente para lograr abarcar el estudio de la gran diversidad de especies del Género *Salvia* en todo el territorio nacional, así como el de la flora endémica con uso tradicional medicinal conocido por los diversos pueblos indígenas.

4. OBJETIVOS.

4.1. Objetivo general.

Determinar la bioactividad de los compuestos extraídos a partir de la raíz *Salvia mellifera* presentan porcentajes altos de inhibición oxidativa para poderlos catalogar como antioxidantes fuertes.

4.2. Objetivos específicos.

1. Establecer el perfil fitoquímico preliminar del extracto de raíz de *Salvia mellifera*.
2. Fraccionar y medir la actividad antioxidante del extracto de raíz de *S. mellifera*.
3. Comprobar la presencia de compuestos del tipo terpeno mediante el aislamiento e identificación de los metabolitos.
4. Determinar viabilidad celular con mejor perfil antioxidante en macrófagos.

5. MARCO TEÓRICO.

5.1. Sobre *Salvia mellifera*.

La revisión de la literatura ha evidenciado la importancia de estudiar los efectos medicinales de plantas que han sido utilizadas de manera tradicional en nuestro país. El hecho de que en Baja California existe una cantidad de salvia endémicas tanto de la región fronteriza norte de México y sur de Estados Unidos, ha despertado el interés por estudiar específicamente a *Salvia mellifera* y sus posibles acciones antioxidantes y antiinflamatorias.

A continuación se revisan conceptos importantes para el sustento teórico de la presente investigación sobre esta planta de uso tradicional medicinal.

5.1.2. Familia Lamiaceae.

La familia Lamiaceae (Labiatae nom. cons., y conocidas como labiadas) agrupa hierbas anuales y perennes, arbustos y árboles, de hojas simples y opuestas, con inflorescencias cimosas, flores gamosépalas y gamopétalas, sus corolas por lo regular son bilabiadas, presentan cuatro o dos estambres epipétalos, el estilo es con frecuencia ginobásico y los dos carpelos se dividen en dos por el desarrollo de un septo falso, los frutos en mericarpios con una semilla cada uno, su polen es tricolpado o hexacolpado, y su número cromosómico varía de 10 a 240 (Harley et al. 2004).

De sus características notables se destaca la amplia gama de compuestos químicos, entre ellos los de tipo terpeno que les confieren la propiedad de ser aromáticas (Richardson 1992) característica que se ha aprovechado para su uso culinario como condimentos y en la medicina popular como complemento terapéutico o medicinal y en la industria como insumo debido al uso de sus aceites esenciales (Heinrich et al 1992).

Respecto a su jerarquía taxonómica, estudios recientes sobre su análisis filogenético demuestran la necesidad de modificar y reagrupar varios géneros conferidos a las Lamiaceas, como es el caso del Género *Salvia* subgénero *Calosphace* (Walker et al. 2004; Jenks et al 2013; Martínez-Gordillo et al. 2013).

5.1.3. Género *Salvia*.

Son hierbas anuales, perennes, de formas arbustivas y con hojas enteras, lobuladas; sus racimos son generalmente de forma esférica caracterizados por sus abundantes flores de cáliz de dos labios (labiadas), de donde se distinguen 1 o 2 estambres con el conectivo alargado, articulados sobre un filamento corto.

Este género, se encuentra conformado por tres clados, uno de los cuales corresponde al subgénero *Colosphace*, más la sección *Audibertia*, considerados como grupos naturales y exclusivos al continente americano.

Su distribución abarca desde Estados Unidos hasta Argentina y Chile y con representantes también en las islas del Caribe, albergando alrededor de 500 especies solo del subgénero *Colosphace*, lo que lo convierte en el linaje más diverso del género.

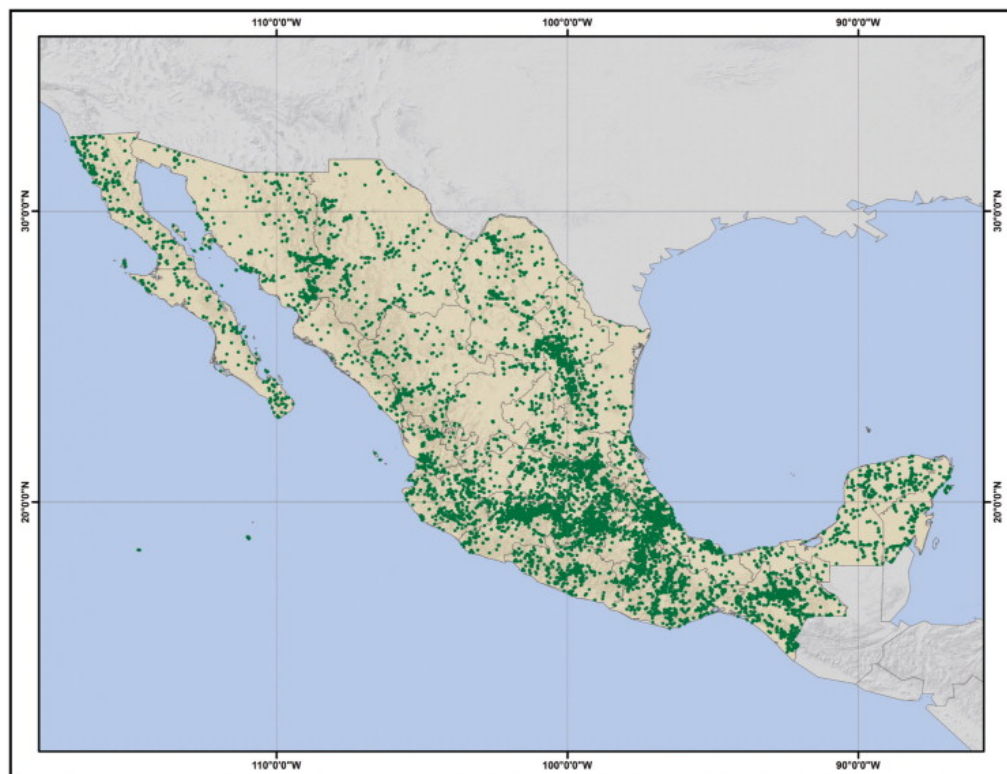


Fig. 1. Distribución de la familia Lamiaceae en la República Mexicana (Martínez-Gordillo et al. 2013).

En México existen 61 de las 106 secciones reconocidas (Epling 1939, 1940, 1941; Epling y Lewis 1942, 1947) siendo *Salvia* el género más diverso de la familia en el país, con 307 especies, de las cuales 232 son endémicas (Martínez-Gordillo et al. 2013). Esta gran diversidad ha dificultado el reconocimiento preciso de algunas especies, y hasta la fecha es tema

controversial las 106 secciones propuestas por Epling por ser considerada una clasificación muy amplia.

5.1.4. Orden taxonómico.

La tabla 1 muestra el orden taxonómico integrando por información publicada en la *Integrated Taxonomic Information System* (ITIS) (System 2010). Sin embargo, recientemente estudios moleculares realizados en especies integradas al subgénero *Calosphace* separan tres especies de *Audubertia*: *Salvia greatae*, *S. californica* y *S. mellifera* (Jenks et al 2013).

Tabla 1. Orden taxonómico de *Salvia mellifera*

Reino	Plantae
Subreino	Viridiplantae
Infrareino	Estreptofita
Superdivisión	Embriofita
División	Traqueofita
Subdivisión	Espermatofita
Clase	Magnoliopsida (dicotiledóneas)
Subclase	Asteridae
Superorden	Asteranae
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Subfamilia	Nepetoideae
Género	Salvia
Subgénero	Calosphace
Sección	Audubertia
Especie	Mellifera

5.1.5. Sinonimia.

Audibertia spinulosa. Nutt. ex Benth.

Audibertia stachyoides. Benth.

Audibertiella stachyoides. (Benth.) Briq.

Ramona stachyoides. (Benth.) Briq.

5.1.6. Etimología.

Salvia: nombre latino de la “salvia”, que procede del latín *salvus*, en español su significado es “salud” o *salvo*, refiriéndose a la acción de curar o aludir a las virtudes medicinales de las plantas de este género.

Mellifera: palabra del epíteto latino que significa “melífera”, es decir, que lleva o tiene miel.

5.1.7. Descripción.

Salvia mellifera fue descrita por Edward Lee Greene en 1892, considerada nativa de la región sur de Estados Unidos y noreste de México (Anderson y Anderson 1954). Crece cerca de la costa a 600 m de altura del nivel del mar en hábitats de matorral costero (González et al. 1990). En cuanto a su forma de crecimiento, predominan las hierbas perennes o arbustos. La mayoría presenta flores azules o moradas de 1.2 cm de largo

que afloran durante todo el año con una actividad máxima en octubre (Cornejo-Tenorio e Ibarra-Menríquez 2011).



Fig. 2. Ilustración de *Salvia mellifera* (Moore 2003).

El fruto es liso y de color café de 2 mm de largo; las raíces alcanzan poca profundidad formando sistemas raramente extensos (0.6 m) que por debajo del suelo se concentran apretados en 12.5 cm; su tiempo estimado de vida es de 20 a 30 años (Horton y Kraebel 1955).

Los arbustos suelen crecer entre 1 y 2 m de altura y en primavera es cuando la planta suele abrir sus brácteas (Munz y Keck 1973) Mientras la

planta es joven sus tallos son de color verdes a violeta, pero al envejecer se tornan café a gris. Su nombre en el idioma inglés es *Blank sage*.

5.1.8. Aspectos ecológicos.

Habita principalmente en ecosistemas como matorral costero, chaparral y desérticos de clima mediterráneo. Es capaz de crecer en suelos de piedra arenisca, granito, serpentina y basalto. Su presencia en dichos ecosistemas es de gran importancia ya que su forma arbustivas es aprovechada para alojar diferentes especies de insectos y arácnidos, así como la formación de avisperos y escondites para reptiles, aves y algunos mamíferos pequeños (Kinucan 1965).

Salvia mellifera suele relacionarse en procesos de hibridación con otras salvias, aunque este hecho es poco común. Se han encontrado híbridos con *S. apiana*, *S. leucophylla* y *S. columbariae* (González et al. 1990) hecho que se distingue sobre todo en zonas altamente perturbadas donde las especies comparten territorios con poco espacio disponible para su reproducción y por la tal, comparten los mismos vectores de polinización (Epling 1947; Grant y Grant 1964).

Su estrategia reproductiva puede ser sexual y asexual, así como reproducción vegetativa, esta última junto con la germinación de semillas dispersadas por el viento de verano, ocurren inmediatamente después de un

incendio, aunque en intervalos prolongados libres de fuego la exposición prolongada al sol (12 h) y temperaturas mayores a 23 °C también favorecen la germinación (Keeley 1986).

Los terpenos, son el principal constituyente de los aceites esenciales de algunas plantas y son de gran importancia dentro de sus mecanismos de defensa. Es el caso de las interacciones ecológicas alelopáticas, fenómeno biológico en el que las plantas producen compuestos que influyen en el crecimiento, supervivencia o reproducción de otras plantas. En *Salvia mellifera*, los terpenos cineol y alcanfor son responsables de la inhibición del crecimiento de otras plantas debido a la toxicidad que les producen sus compuestos altamente volátiles (Muller 1965).

5.1.9. Usos tradicionales.

Salvia mellifera fue una de las 150 especies de plantas utilizadas por los grupos étnicos de Norte América, como la etnia Tongva de lengua Chumash, antiguos habitantes de la zona noreste de México y gran parte de California, Estados Unidos. Esta etnia se acentó desde hace 15,000 años cohabitando con la planta y atribuyéndole un gran valor cultural como alimento, medicinal, como complemento esencial dentro de sus rituales y misticismo, así como para higiene personal y de limpieza para objetos dentro de su hogar (Timbrook 1990).

Dentro de sus usos y costumbres se sabe que ellos colocaban semillas de Salvia en ambos ojos durante la noche para retirar impurezas. Las mujeres tomaban té de raíz un día después de su cumpleaños para expulsar sus años anteriores y promover la salud del siguiente año, además la fumaban dentro de sus hogares ya que los aceites volátiles les proporcionaron confort y calidez. Para el higiene personal también fue útil como limpiador del cabello e inhibido del crecimiento de canas (Adams y García 2005b).



Fig. 3. Rafael, un chumash, en Soxtonoxmu, Santa Ynez. Finales del siglo XIX.

5.1.10 Usos ceremoniales.

La salvia fue muy valorada como implemento ceremonial, como ofrenda en los altares con racimos aflorados, quemada en forma de incienso para alejar los malos espíritus, enfermedades y malos pensamientos. Su uso

para limpiar y purificar objetos como utensilios, armas y sus viviendas también se encuentra documentado (Adams y García 2006).

5.1.11. Usos medicinales y culinarios.

Los Chumash de California, consideraban tan importante a la *Salvia* que sólo tomaban lo necesario para sus necesidades, almacenando las hojas secas para su uso posterior. En su práctica medicinal, las plantas eran prendidas con fuego para purificar el sistema nervioso central de los pacientes enfermos y se les daba de beber una infusión de las hojas para destruir agentes patógenos y reducir la inflamación (Walker y Hudson 1993). La maceración sobrante de la infusión se aprovechaba para frotar las heridas por golpes, mordeduras de serpiente o insectos, y remojar los pies doloridos e hinchados (Adams y García 2005a).



Fig. 4. La concha del abulón como utensilio casero con hojas de *Salvia apiana*.

Las semillas fueron utilizadas como alimento, recolectadas y secadas para elaborar una especie de pan que consumían durante el invierno, además usaban las hojas como condimentos en sus comidas. Se sabe que *Salvia mellifera* produce una rara miel de sabor picante y fuerte, muy apreciada por ser difícil de obtener ya que sólo es producida en condiciones climatológicas adecuadas durante un año de abundantes lluvias, la cual hasta hoy en día es altamente valorada por las etnias que aún sobreviven en la región de California en Estados Unidos.

5.1.12. Terpenos de *Salvia mellifera*.

Actualmente a *Salvia mellifera* no se le ha considerado con algún valor nutricional, sin embargo es conocida por su acción analgésica, debida a los componentes del tipo terpenos que produce durante el metabolismo secundario y que son bien conocidos en numerosas especies de *Salvias* (Moujir et al. 1993).

Por su volatilidad, los terpenos le confieren la característica aromática a estas plantas. Algunas formas de terpenos aisladas de *Salvia mellifera* son los diterpenoides, como el alcanfor, cineol y pineol que representan los porcentajes mayoritarios en la producción de metabolitos secundarios, así como el ácido carnósico, carnosol, rosmanol, 7-O-metil-rosmadol, isorosmanol, epirosmanol, rosmadiol, pisiferol, salvicanol y demetilsalvicanol,

en menores proporciones pero presentes en la parte aérea de la planta (Luis y Andrés 1999).

Por otro lado, algunos de los compuestos más relevantes para la fitoquímica medicinal hoy en día, son las tanshinonas. En la especie *Salvia miltiorrhiza* son los principales compuestos activos capaces de promover un efecto antiinflamatorio que ya era conocido pero de manera empírica con el uso del medicamento herbolario llamado “danshen” (Yang et al. 2006).

El “danshen” desde tiempo remotos en China, se emplea para el tratamiento de enfermedades con afectación inflamatoria crónica, principalmente reumatismo y enfermedades cardiovasculares (Duke y Ayensu 1985; Bae 2000). El uso de este medicamento herbolario tuvo tan buena aceptación que su popularidad se ha extendido a Japón, Estados Unidos y diferentes países de Europa.

La prueba científica para el uso de *Salvia miltiorrhiza* (danshen), se realizó en 2008, donde se examinaron los efectos de tres moléculas extraídas y purificadas de la raíz de la planta, la tanshinona I, criptotanshinona y 15,16-dihidrotanshinona, en las cuales se observó su protagonismo en el metabolismo de prostaglandinas (PG) y óxido nítrico (ON) cuando fueron sometidos los macrófagos con lipopolisacáridos (LPS) en un intento para estabilizar su mecanismo anti-inflamatorio y para conocer cuál era la relación entre el danshen y estos terpenos aislados de la planta. Los resultados demostraron que particularmente criptotanshinona y 15,16-dihidrotanshinona

son importantes constituyentes para la inhibición de las vías pro-inflamatorias (Jin et al 2008).

En la actualidad se ha reportado quino diterpenos de la raíz de otras especies de *Salvia*, como *S. apiana* y *S. mellifera* (Luis y Andrés 1998). Sin embargo, son pocos los trabajos realizados que aportan al entendimiento de la acción biológica de los extractos o compuestos aislados de estas plantas, o los mecanismos de acción celular y molecular, en donde los terpenos además de actuar como anti-inflamatorios pueden producir efectos citotóxicos, anti-microbianos, y antifúngicos, por tal razón han sido considerados principales compuestos activos en *Salvia* (González et al. 1992; Luis y Andrés 1993).

5.2. Metabolismo de las plantas.

Además de las algas verdes y algunas bacterias, las plantas verdes terrestres y acuáticas son el principal grupo de organismos catalogados como productores primarios, es decir, que permiten la entrada de energía a la biosfera al absorber energía solar y las materias primas para producir compuestos más complejos que les servirán de alimento y sustento. Por lo tanto, son la fuente de alimento para organismos heterótrofos y sustento de nuestra propia existencia.

5.2.1. Productos primarios.

Son procesos químicos pertenecientes al metabolismo primario de las plantas: la fotosíntesis, la respiración, el transporte de solutos, la translocación, la síntesis de proteínas, la asimilación de nutrientes, la diferenciación de tejidos, y en general la formación de carbohidratos, lípidos y proteínas que intervienen en estos procesos o son parte estructural de las plantas.

El metabolismo primario produce sustancias llamadas metabolitos primarios, estos son aminoácidos, nucleótidos, azúcares y acilglicéridos, todos ellos esenciales en la supervivencia, el crecimiento y la reproducción y están presentes en todas las plantas verdes (Taiz y Zeiger 2004), no así los metabolitos secundarios, que reúnen aproximadamente poco más de 20,000

diferentes sustancias identificadas (Sepúlveda-Jiménez y Ducoing 2003), sin embargo, sólo algunas especies o grupos taxonómicos determinados se encuentran reportados con algunas de estas sustancias. En la actualidad el reconocimiento de metabolitos secundarios específicos, considerados como marcadores taxonómicos de familias y géneros ha permitido la identificación y clasificación de más especies (García 2004).

5.2.2. Metabolitos secundarios o productos naturales.

El término de metabolismo secundario fue acuñado en investigaciones pasadas por considerarlos de importancia menor respecto a los metabolitos primarios y frecuentemente relacionados como subproductos de desecho de las plantas. En la actualidad los metabolitos secundarios han sido recategorizados según el marco conceptual en el que se les refiere. Un ejemplo desde un punto de vista ecológico, es catalogar a los metabolitos primarios como sustancias fisiológicamente eficaces, mientras que los metabolitos secundarios son catalogados como sustancias ecológicamente eficaces (Strasburger et al. 1994).

Sin embargo, los metabolitos secundarios también son protagonistas dentro de la fisiología de la planta, debido a que regulan el crecimiento, desarrollo e interacción con otros organismos (Raskin 1992). Cada compuesto se encuentra estrechamente relacionado con alguna o varias funciones particulares de la planta que lo produce y son numerosos los

reportes sobre el papel que desempeñan, pero aún se desconoce su funcionamiento particular aunque ya se les ha relacionado principalmente como agentes alelopáticos contra hongos, bacterias e incluso otras plantas.

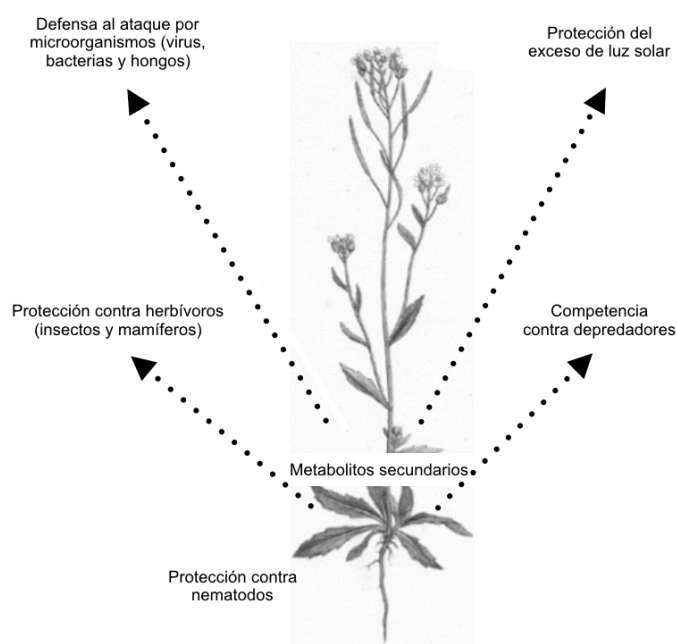


Fig. 5. Respuesta de defensa de la planta por medio de sus metabolitos secundarios. Una conceptualización ecológica de la función de los metabolitos secundarios (Sepúlveda-Jiménez et al. 2003).

Así mismos, se destaca su función de estos compuestos en la defensa propia de la planta, ya sea por toxicidad u otras formas de protección como la defensa contra radiación ultravioleta y desecación, reserva de material nitrogenado, fijación de N_2 atmosférico, formación de nódulos y la relación simbiótica entre las raíces de otra plantas (García, 2004). Dirzo menciona que si bien, en algunos casos en donde es claro el papel de defensa de los metabolitos secundarios contenidos en ciertas especies, considera cuestionable esta función en muchas otras especies, viendo estos atributos

5.2.3. Terpenos.

Estos metabolitos secundarios se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal y presentan una gran variedad estructural, de fórmula química base compuesta de hidrocarburos complejos (forma general C_nH_{2n-4}), esto les da características propias que les confiere efectos terapéuticos, por lo cual se han vuelto muy relevantes en materia de fitoquímica medicinal.

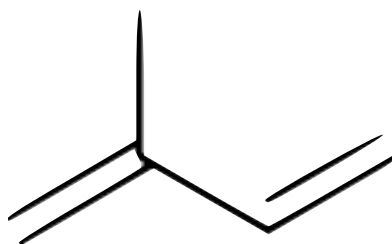


Fig. 7. Estructura molecular simplificada del isopreno, unidad de los terpenos.

Los terpenos son compuestos orgánicos derivados del isopreno (2-metilbuta-1,3-dieno), un hidrocarburo de 5 átomos de carbono, el cual está formado por dos dobles enlaces y unidos por cadenas orgánicas.

Según su estructura, los terpenos se clasifican en cinco categorías:

- Monoterpenos: formado por 2 unidades de isopreno.
- Sesquiterpenos: derivado del ácido mevalónico y esqueleto de 15 carbonos.

- Diterpenos: poseen 20 átomos de carbono agrupados por la unión de cuatro unidades de isopreno.
- Fitosteroles: mejor considerados como terpenoides por su esqueleto ciclopentano-perhidrofenantreno.
- Fitoestanoles: son fitoesteroles reducidos.

Todos los cientos de diferentes estructuras de hidrocarburos de las plantas son generadas a partir de dos vías metabólicas, biosíntesis isoprenoide y biosíntesis alcalina (Taylor y Calvin 1987).

5.2.4. Síntesis isoprenoide.

Los isoprenos son sintetizados a partir del isoprenil pirofosfato (IPP) (fig. 9). Los 5 carbonos de su estructura se combinan para formar elongaciones de un esqueleto de carbono que es la estructura principal de los terpenos de las plantas, así como del esteroles, la gibberilina, el ácido abscisico, el caroteno, el fitol, la quinona, el poliisopreno y el alcaloide isoprenol. La molécula IPP es sintetizada de acetil-CoA, que en principio es producida por la condensación de dos moléculas de acetil-CoA y seguido de una larga condensación de relaciones con acetil-CoA adicional para formar β -hidroxil- β -metilglutaril-CoA (HMG-CoA). La HMG-CoA es reducida en ácido mevalónico (AMV), el cual es fosforilizado y descarboxilado para formar IPP (Taylor y Calvin 1987).

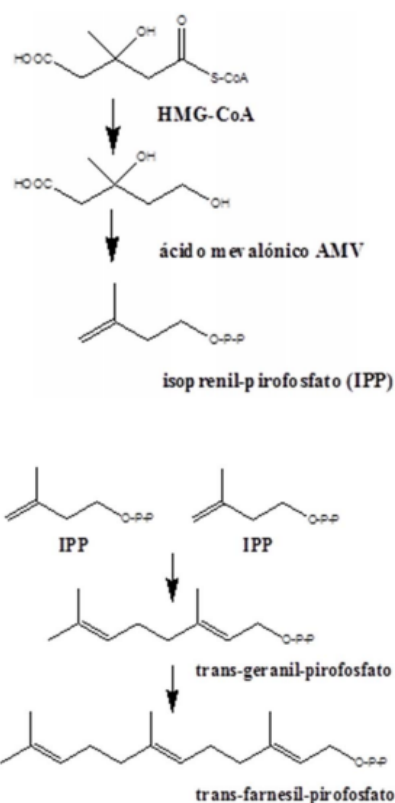


Fig. 8. Conjugación cabeza-cola de dos molecular de isoprenil-pirofosfato.

5.2.5. El isopreno activo o isoprenil-pirofosfato.

El isopreno activo o isoprenil-pirofosfato (IPP) es la molécula precursora en la síntesis de terpenos. En el primer nivel de síntesis dos moléculas de IPP se conjugan en el proceso “cabeza-cola” para formar trans-geranil-pirofosfato que posteriormente se transformará en trans-farnesil-pirofosfato y con este la cadena de polimerización enzimática de las unidades de isopreno (fig. 8). De acuerdo a la Regla Isoprénica de Wallach, la condensación de dos monómeros de isopreno puedan dar origen al precursor

pirofosfato de geranilo (GPP) que a su vez es el precursor de los monoterpenos. Al incorporar otra unidad más se formará el pirofosfato de farnesilo (FPP), precursor de los sesquiterpenos. Una unidad más de IPP formará el pirofosfato de geranilgeranilo (GGPP), compuesto base para la formación de diterpenos.

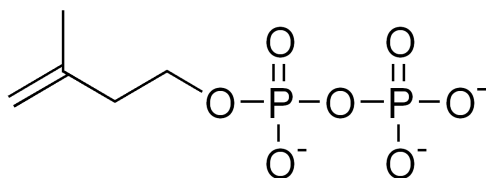


Fig. 9. Isoprenil-pirofosfato, precursor en la biosíntesis de los terpenos.

5.2.6. Sesquiterpenos.

Los sesquiterpenos o sesquiterpenoides son terpenos de 15 carbonos (es decir, terpenoides de un monoterpenoide y medio). Como los monoterpenoides, muchos sesquiterpenoides están presentes en los aceites esenciales. Además muchos sesquiterpenoides actúan como fitoalexinas, compuestos antibióticos producidos por las plantas en respuesta a la aparición de microbios, y como inhibidores de la alimentación ("antialimentario") de los herbívoros oportunistas (Montes-Belmont 2009).

5.2.7. Diterpenos.

Son metabolitos farmacológicamente importantes que pueden ser encontrados en plantas superiores, hongos, insectos y organismos marinos. Su esqueleto químico está compuesto de 20 átomos de carbono y son generados a partir de un tetraprenol denominado pirofosfato de geranilgeranilo (GGPP) el cual es producido a partir de la prenilación del pirofosfato de farnesilo (FPP). Un ejemplo de esta categoría son los quinoditerpenos como la tanshinona I, tanshinona IIA y criptotanshinona.

Los terpenos funcionan como antioxidantes, protegen a la membrana lipídica celular contra ataques de radicales libres, especies reactivas de oxígeno, grupos hidróxidos, peróxidos y radicales superóxidos, incluso previenen la aparición del cáncer en órganos como pulmones, glándulas mamarias, colon, estómago, próstata, páncreas, hígado y piel de ahí su importancia (Reddy et al. 1997).

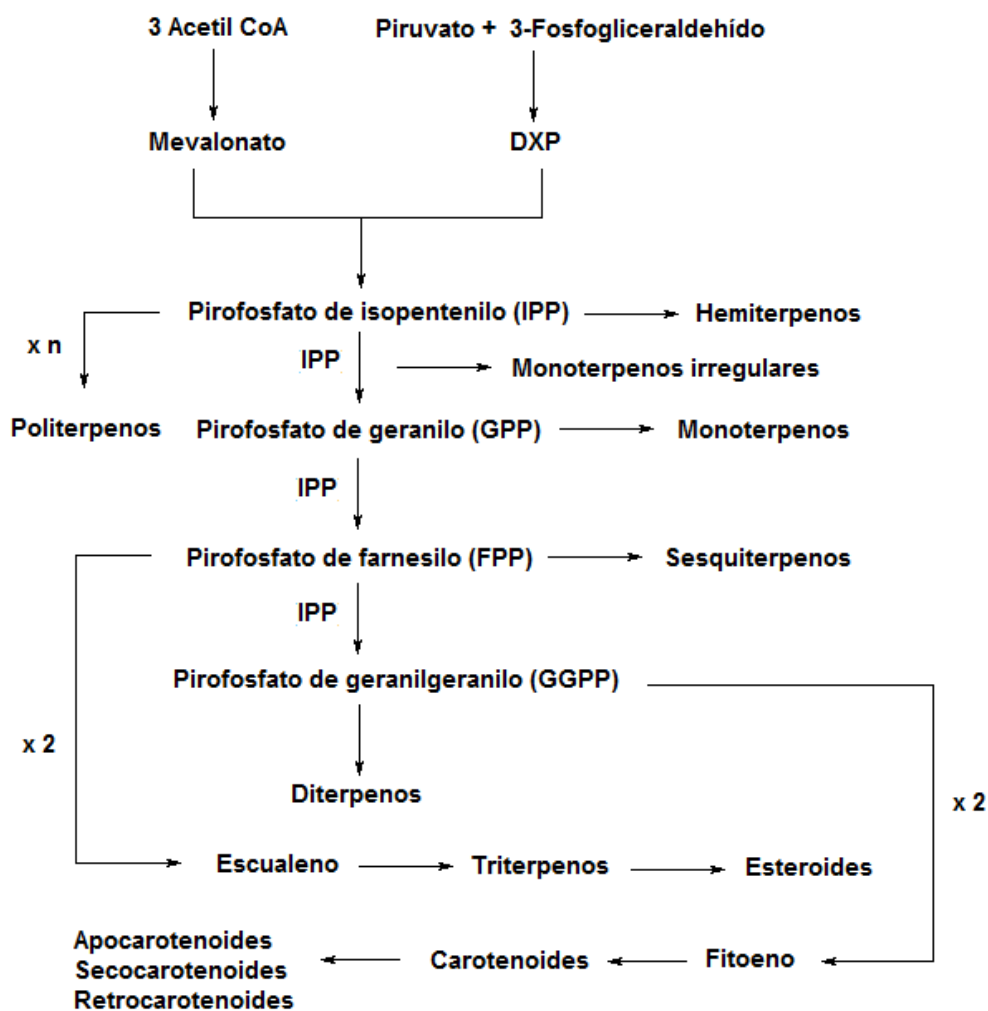


Fig. 10. Ruta biosintética de los terpenos.

5.3. Antioxidantes.

Todos los organismos aerobios emplean oxígeno diatómico (oxígeno molecular O_2) para fabricar en el interior de sus células, moléculas de energía en forma de adenocina trifosfato (ATP). Este proceso metabólico libera radicales libres, lo cual significaría daños continuos a la vida debido a la respiración. Sin embargo, existen mecanismos de defensa contra estas especies oxidativas, los antioxidantes. Considerados como cualquier sustancia que posee una afinidad mayor que cualquier otra molécula para interaccionar con un radical libre, los antioxidantes se pueden definir como: “toda sustancia que hallándose presente a bajas concentraciones respecto a las de una molécula oxidable (biomolécula), retarda o previene la oxidación de este sustrato” (García Bacallao et al. 2001).

Estudios clínicos y epidemiológicos han establecido la correlación inversa entre la ingesta de frutas y vegetales (principal fuente de antioxidantes) y la ocurrencia de eventos inflamatorios por enfermedades como cardiovasculares, desordenes relacionados con el envejecimiento y cáncer (Willet y Eat 2001). La inflamación se vuelve menos presente debido a que en el interior de las células los antioxidantes previenen el estrés oxidativo relacionado con estas enfermedades, retardando o inhibiendo tanto la oxidación de otras moléculas como la iniciación y/o propagación de reacciones en cadena de radicales libres.

Por su origen, existen dos categorías de antioxidantes, los exógenos y los endógenos, de esta última categoría se distinguen dos grupos, los enzimáticos y los no enzimáticos:

Los antioxidantes exógenos como las vitaminas E, C, los betacarotenos y flavonoides tienen entre sus funciones en los organismos mamíferos la neutralización del oxígeno singlete, la captura de radicales libres hidróxilo, la captura de O₂, la neutralización de peróxidos, y en el caso de los betacarotenos la regeneración de la forma oxidada de la vitamina E (Venero Gutiérrez 2002).

Los antioxidantes endógenos enzimáticos tienen una acción de cofactor, como la superóxido dismutasa (SOD) (acción en el cobre, sodio y magnesio), la catalasa (CAT) (acción sobre el hierro), el glutatión peroxidasa (GPx) (acción sobre el selenio). Por su parte, los antioxidantes endógenos no enzimáticos son el ácido tiotico (permite el transporte de metales por medio de las enzimas transferrina y ceruloplasmina), las coenzimas Q, y el glutatión que establece barreras fisiológicas para el oxígeno a su paso desde el aire hasta las células (Venero Gutiérrez 2002).

5.3.1. Oxígeno molecular (triplete).

El oxígeno molecular es encontrado en condiciones normales de presión y temperatura en su forma estable O₂. En su configuración

electrónica tiene dos electrones desapareados que ocupan dos orbitales moleculares degenerados, clasificados como anti-enlazantes, por lo que su enlace es débil. Estos orbitales desapareados pueden tener el mismo espín, por lo que el espín total S es 1 (Sharpe 1996). Esta configuración es conocida como triplete ($3\Sigma_gO_2$), ya que el espín posee tres alineaciones posibles en un campo magnético externo.

La configuración triplete le confiere al O_2 la particularidad de tener un momento magnético de espín nulo, por lo que el oxígeno es paramagnético, es decir, es atraído por los polos magnéticos de su imán. Esta configuración electrónica inusual evita que el oxígeno molecular reaccione directamente con muchas moléculas, no así con moléculas en estado doblete, tales como radicales con los que al interacciones se formaran nuevas especies reactivas (Vázquez y Ureña 1985).

5.3.2. Especies reactivas del oxígeno.

Por sus siglas ERO, son aquellas que incluyen radicales libres y especies no radicalarias pero que pueden participar en reacciones que llevan a la elevación de los agentes prooxidantes. De estas especies reactivas, las más frecuentes y entre ellas las más relevantes en los sistemas biológicos son: el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el radical hidroxilo ($HO^{\cdot}$) y los radicales formados en la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados (alcoxilo ($alkO^{\cdot}$) y alquilperoxilo ($alkOO^{\cdot}$). Entre las ERO no radicalarias se encuentran el

peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el ácido hipocloroso (HOCl). A continuación se enlistan las principales:

- Radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$)
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)
- Anión superóxido (O_2^-)
- Oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$)
- Oxígeno nítrico (NO)
- Peróxido (ROO)
- Semiquinona (Q)
- Ozono

5.3.3. Especies reactivas al nitrógeno.

Además de las ERO, existen también especies reactivas del nitrógeno (ERN) como el óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$) radical del dióxido de nitrógeno ($\text{NO}_2\cdot$), y formas no radicales, como el anión del peroxinitrito (ONOO^-), el ácido peroxinitroso (ONOOH), el anión del nitrosoperoxicarbonato (ONOOCO_2^-), el catión nitronium (NO_2^+), y el trióxido del dinitrógeno (N_2O_3), los cuales, junto con las ERO se generan continuamente en cantidades pequeñas en procesos celulares normales como la señalización celular, la neurotransmisión, la relajación del músculo, el peristaltismo, la agregación de las plaquetas, la modulación de la presión arterial, el control del sistema inmune, la fagocitosis, la producción de la energía celular, la regulación del

crecimiento celular, la síntesis de componentes biológicos importantes y el metabolismo de xenobióticos (Avello y Suwalsky 2006).

5.3.4. Otra fuente de radicales libres, las enzimas.

A escala biológica, una de las principales fuentes de radicales libres son las enzimas. Algunas de ellas producen radicales como intermediarios catalíticos, ocurre generalmente para las enzimas que metabolizan xenobióticos, los cuales son oxidados o reducidos por intercambio de un solo electrón para formar radicales intermediarios. Las más importantes enzimas del metabolismo de xenobióticos son:

- Citocromo P450: es una enorme y diversa superfamilia de hemoproteínas que actúan principalmente como función monoxigenasa.
- Peroxidasas, en particular prostaglandina H sintasa, y en poco grado la metamioglobina.
- Flavoproteínas: en particular las que se involucran en la cadena transportadora de electrones con función oxidasa.

5.3.5. Radicales endógenos.

Entre los radicales endógenos que actúan como intermediarios del metabolismo celular se encuentran: los derivados de coenzimas, por ejemplo la oxidación de un solo electrón del NAD(P)H puede producir NADP[•] que son

radicales derivados del glutatión (GSH), radical til ($\text{GS}^\bullet$). Este proceso ocurre cuando el GSH, la molécula tiolada más concentrada y soluble en la célula, reacciona con el radical anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) o el radical hidroxilo ($\text{HO}^\bullet$); este es un mecanismo de protección natural contra radicales más reactivos; y generalmente los radicales derivados de ácidos grasos poliinsaturados, donde estos últimos son blancos muy sensibles para la iniciación de una reacción en cadena mediada por radicales.

5.3.6. Estrés o daño oxidativo.

Aunque en temperaturas fisiológicas normales el O_2 es estable, las interacciones químico enzimático puedan dar origen a la producción de diferentes especies químicas o sustratos pro-oxidantes altamente reactivos, mejor conocidos como radicales libres. Cuando esto sucede los beneficios metabólicos de la incorporación del O_2 al organismo se vuelven tóxicos, capaces de producir daño celular. A esto se le conoce como estrés o daño oxidativo (Fridovich 1978).

Venereo-Gutiérrez, 2002 define el estrés oxidativo como: “la exposición de la materia viva a diversas fuentes que producen una ruptura del equilibrio que debe existir entre las sustancias o factores pro-oxidantes y los mecanismos antioxidantes encargados de eliminar dichas especies químicas, ya sea por un déficit de estas defensas o por un incremento exagerado de la producción de especies reactivas del oxígeno, que como

consecuencia, provocarán daño en la estructura o función de las células y por lo tanto del órgano, sistema o grupo celular especializado”.

Si bien, existe una estrecha relación entre factores como: dieta, estilo de vida, así como la exposición a radiación, metales, pesticidas, tóxicos, y algunos medicamentos; con la aparición y desarrollo de enfermedades como cáncer, diabetes, aterosclerosis, desórdenes neurodegenerativos y envejecimiento, hoy en día está bien documentado que casi todas las enfermedades están relacionadas al estrés oxidativo y al daño celular que comienza afectando a las macromoléculas esenciales.

En las estructuras lipídicas es donde se produce el mayor de los daños con la peroxidación lipídica, donde la estructura membranal es dañada por la degeneración de los ácidos grasos, en consecuencia hay formación de edema y muerte celular. En proteínas hay oxidación de los grupos aminoácidos como fenilalanina, tirosina, histidina y metionina y se forman entrecruzamientos de cadenas peptídicas y formación de grupos carbonilos. Finalmente en el ácido desoxirribonucleico (ADN), se originan mutaciones y carcinogénesis, pérdida de expresión de proteínas, modificaciones oxidativas en las bases nitrogenadas, reordenamiento cromosómico, y desmetilación de citocinas del ADN que activan genes (Domínguez et al. 2014).

5.4. Sistema inmune.

Junto con el sistema neuroendócrino, el sistema inmune actúa como barrera protectora contra ataques patógenos a través de mecanismos bien estructurados y complejos. Células como granulocitos, linfocitos, monocitos y macrófagos participan en los mecanismos de protección.

5.4.1. Macrófagos.

Los macrófagos son células residentes en los tejidos, que se originan a partir de los monocitos (glóbulos blancos) del plasma con un tiempo de vida largo (meses o incluso años). Según el tejido en el que se encuentran, los macrófagos tisulares reciben nombres diferentes: por ejemplo, los histiocitos (tipo de célula animal) del tejido conjuntivo, las células de Kupffer del hígado, las células de Langerhans de la piel, los osteoclastos (células multinucleadas que reabsorben hueso del tejido óseo), la microglía del sistema nervioso central o los macrófagos alveolares del pulmón. Los macrófagos tisulares junto con los mastocitos actúan como centinelas por su capacidad de detectar agentes infecciosos. Esta particularidad es conferida debido a que poseen receptores específicos capaces de detectar agentes infecciosos. La unión de estos receptores a sus ligandos activa a los macrófagos así como a monocitos y neutrófilos, proceso que puede inducirse además por la presencia de moléculas plasmáticas como las citocinas.

5.4.2. Citocinas.

Son moléculas de señalización que actúan cuando los mecanismos de defensa del sistema inmune y neuroendócrino fallan y la inflamación sistémica es iniciada en las células endoteliales. Las moléculas plasmáticas incluyen además de citocinas, el factor de necrosis tumoral (TNF- α), las interleucinas (IL), las caspasas, proteasas, leucotrienos, especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico (NO), ácido araquidónico, eicosanoides y el factor activador de plaquetas. Adicionalmente, la activación del complemento y las cascadas de coagulación pueden amplificar la cadena de eventos. Estas interacciones ocurren en el endotelio vascular y puede provocar daño microvascular, trombosis y pérdida de la integridad endotelial, lo que desencadena isquemia tisular (ruptura endotelial), responsable de la pérdida de función de órganos y la presencia de hipoxia tisular (choque séptico). (Gutiérrez-Quintanar, et al 2014).

5.4.3. Lipopolisacáridos (LPS).

Los lipopolisacáridos (LPS) son polímeros complejos con restos de ácidos grasos como parte lipófila y cadenas características de oligosacáridos y polisacáridos que forman gran parte de la capa externa de la membrana externa de bacterias Gram negativas. Estos compuestos han sido utilizados en diversos trabajos de investigación para probar experimentalmente algún fármaco o molécula con potencial antiinflamatorio en modelos *in vitro*.

El mecanismo de acción biológica *en vivo* en presencia de LPS (u otros componentes bacterianos o patógenos) consiste en que una vez rebasada la primera línea de defensa, los macrófagos inducen la liberación de mediadores proinflamatorios (TLF- α , IL-1, IL-6, eicosanoides, PAF, NO y especies reactivas al oxígeno), activando la respuesta inmune del hospedero a través del receptor TLR-4, ya que este receptor y sus ligados están estrechamente vinculados con la estructura de los LPS.

Sin embargo algunos microorganismos han evolucionado para controlar la expresión y la estructura de los LPS, como las bacterias *Helicobacter pylori*, *Francisella tularensis*, *Chlamydia trachomatis* y *Salmonella spp.* que han logrado producir estructuras variantes que son usadas para la modulación de la respuesta del sistema inmune de los hospederos durante la infección, causando fiebre al incrementar la tasa de calor corporal. Esta elevación de la temperatura provoca choque séptico y la muerte cuando las concentraciones de LPS son altas, en concentraciones relativamente bajas algunos LPS pueden encontrarse inactivos (Aldapa-Vega et al. 2016).

Cuando la respuesta inmune innata es activada TLR-4 (*Toll-like receptor 4* por sus siglas en inglés) se une a los LPS para dar inicio a una cadena de reacciones de fosforilación y ubiquitinación, que permiten la activación de NFL- α (factor de transcripción), cinasas de proteína por

nitrógenos (MAPK) y el factor de respuesta a interferón (IRF). Los TLR son una familia de receptores de detección de microorganismos patógenos, como TLR-4, que es una proteína transmembranal tipo I compuesta de 22 segmentos extracelulares, ricos en leucinas (LRR), un dominio transmembranal y un dominio receptor *tol*///IL-1 (dominio TLR).

Por lo tanto, los LPS, son utilizados como un estímulo para la producción inducida de inflamación *in vitro* en numerosos estudios.

5.4.4. Inflamación.

En el tratado sobre la historia de la inflamación escrito por Agustín Bullón Ramírez en 1983, se explica el concepto de inflamación desde sus orígenes. El autor menciona que este término fue usado por primera vez por los médicos griegos con el nombre de “flogosis” que significa calor o llama, término que no ha sido hallado en ninguna otra cultura antigua, sino en la medicina hipocrática y que referiría a dos momentos en una lesión, el rubor y el calor. Posteriormente la medicina greco-romana retomó el concepto de inflamación bajo los llamados signos cardinales de Aurelio Cornelio Celso (30 a.C.), los cuales son rubor, tumor, calor y dolor. Es así que desde sus inicios y gracias a una observación correcta, la “flagosis” o como hoy en día le conocemos por inflamación, ha sido capaz de soportar su significado sin alterarse por el camino de la evolución de la práctica médica durante más de tres milenios (de la Quintana 1983).

A pesar de los usos y desusos de la terminología médica a través del tiempo, si bien el proceso de inflamación es una característica inherente de daño en los tejidos por lesión, infección, trauma etc. La formación del edema es uno de los primeros estadios del proceso de inflamación que continúa con la extravasación de los fluidos, migración de leucocitos al sitio dañado y finalmente la liberación de proteínas pro-inflamatorias, pasos que componen el mecanismo de defensa de los tejidos. Si los síntomas se presentan en periodos de tiempo corto, la inflamación puede ser aguda, o crónica si la manifestación de estos es constante, siendo éste el caso de algunas enfermedades como artritis reumatoide, diabetes, obesidad y cáncer en donde el tipo de inflamación que se manifiesta es del tipo crónico degenerativo con afectaciones más severas para la salud y la integridad del organismo.

5.4.5. Antiinflamatorios no esteroideos (AINES).

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) son un grupo numeroso de fármacos de química variada que comparten acciones terapéuticas como antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos, que reducen los síntomas de inflamación, dolor y fiebre respectivamente, así como efectos secundarios adversos.

Los AINES actúan directamente en el sistema nervioso central y periférico con efectos directos en la inhibición de la síntesis de

prostaglandinas (PG) en donde es bloqueada su producción periférica y central impidiendo la sensibilización de las neuronas medulares y supramedulares que dan origen a la modulación (inbibición) central del dolor (Rivera-Ordóñez 2006). Por lo tanto, son fármacos completamente necesarios para controlar el dolor agudo y crónico, impidiendo o disminuyendo la partida de impulsos nociceptivos.

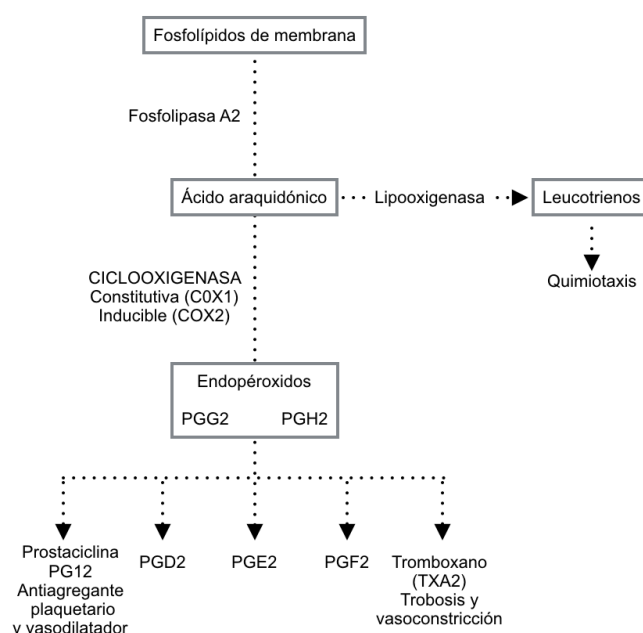


Fig. 11. Síntesis y función de eicosanoides (Rivera-Ordóñez 2006).

Los estímulos físicos, químicos, hipóxicos, hormonales entre otros, pueden iniciar la síntesis de PG, cuando en la membrana celular es liberado el ácido araquidónico por la acción de la fosfolipasa A2. Posteriormente el ácido araquidónico sigue otras rutas para formar los compuestos denominados como eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos,

prostaciclina y leucotrienos, todos sintetizados a partir de ácidos esenciales poliinsaturados de 20 átomos de carbono (Rivera-Ordoñez 2006).

Los compuestos eicosanoides cumplen su función en el organismo por la interacción con receptores específicos de la membrana celular, todos ellos relacionados con la proteína G y permiten el incremento de la AMP cíclico y calcio intracelular en el sistema adenil ciclasa producido en las neuronas y que permiten el impulso doloroso (McCormack 1994).

5.4.6. Ciclooxigenasa (COX) y óxido nítrico (NO).

Las COX o prostaglandina endoperoxidasa sintasa, son las enzimas que producen las PG a partir del ácido araquidónico. La COX por sí misma se canaliza en dos reacciones: en primer lugar actúa en forma de ciclooxigenasa al combinar el ácido araquidónico con dos átomos de oxígeno, de esta forma produce PGG₂. Posteriormente, actúa como una peroxidasa reduciendo la PGG₂ a PGH₂, así las PG obtienen diferentes especificaciones.

Existen dos isoformas de COX: la ciclooxigenasa 1 (COX-1), enzima constitutiva involucrada en funciones fisiológicas como el mantenimiento de la protección gástrica, flujo renal y otros como la agregación plaquetaria, migración de neutrófilos y en el endotelio vascular. Y la COX 2, una isoenzima inducida por los mediadores de la inflamación en condiciones patológicas.

La función de los fármacos no esteroideos disponibles en el mercado, es inhibir la actividad de ambas ciclooxigenasas, COX-1 y COX-2 y por lo tanto la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos.

En la regulación del proceso inflamatorio, tanto COX como NOS (sintasa) se asocian, debido a que ambos tienen isomorformas constitutivas e inductibles, al ser NOS un importante modulador de la actividad de COX. De hecho una gran cantidad de compuestos que afectan tanto a COX-2 como a NOS inducible o ambas, han sido estudiadas como agentes antiinflamatorios potenciales, un ejemplo es el fármaco diclofenaco (Salvemini et al. 1995).

5.5. Fundamentos de técnicas de perfil fitoquímico.

Para lograr una aproximación a la identificación de sus componentes y los métodos más adecuados que faciliten la fase de extracción y purificación, dentro de un estudio fitoquímico biodirigido, es importante el análisis fitoquímico preliminar cualitativo de los extractos a analizar por lo cual, la implementación de métodos más precisos y cuantitativos será más efectiva posteriormente. Los métodos colorimétricos son simples y permiten observar la presencia de moléculas estandarizadas para dicho fin. Los principales grupos de interés farmacológico son: alcaloides, taninos, esteroides y triterpenoides, flavonoides, antocianinas, carbohidratos, saponinas y glúcidos antraquinónicos. A continuación se menciona el fundamento teórico de las técnicas para estos grupos descrito por Carvajal Rojas et al. en 2009.

5.5.1. Alcaloides.

A excepción de los alcaloides de amonio cuaternario y N- óxidos de amina, la mayoría de los alcaloides son solubles en disolventes orgánicos poco polares como cloroformo y sus mezclas, sin embargo 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 un medio ácido, para ello se utilizan sales de metales pesados como el yoduro de potasio (reactivo de

Dragendorff), el yoduro de potasio y mercurio (reactivo de Mayer) son comúnmente utilizadas en la técnica de identificación de alcaloides.

5.5.2. Taninos.

Estos polifenoles tienen la propiedad de unirse a las proteínas y precipitarlas. Por esta razón, la prueba más empleada para la detección de este grupo de metabolitos secundarios emplea el reactivo de gelatina-sal, el cual produce un precipitado blanco en presencia de taninos, luego de haber extraído el extracto etanólico total con una solución acuosa de etanol (7:1). Estos precipitados formados como consecuencia de la presencia de taninos deben ser solubles en urea 10 M y producir coloraciones verdes, azules o negras tras la adición de cloruro férrico al 10% en agua.

5.5.3. 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 Brønsted y Lowry da como resultado coloraciones verdes- azules y violetas. Lieberman en 1885, aprovechó este fundamento para proponer la reacción colorimétrica que lleva ahora 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.

5.5.4. Flavonoides.

Los flavonoides con el núcleo benzopirona (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 hidrógeno, el cual reduce al flavonoide desarrollando los colores mencionados.

5.5.5. Antocianinas.

Compuestos que se comportan como indicadores ácido-base. En presencia de un pH ácido presentan coloraciones rojas, violetas y moradas, mientras que a un pH alcalino presentan coloraciones verdes y azules. Con esta prueba se observa diferencia entre las antocianinas y betacianinas (pigmentos nitrogenados de colores rojos y violeta de plantas del orden Centrosperma).

5.5.6. 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.

5.5.7. Saponinas.

Son glicósidos cuya aglicona consiste en un núcleo esteroideal o triterpénico; esta característica estructural les confiere un carácter anfótero que les permite actuar como tensioactivos. Aprovechando esta propiedad, las dos pruebas más empleadas en la detección de saponinas son la de hemólisis y la de formación de espuma, puesto que al ser tensioactivas las saponinas inestabilizan la membrana celular de los eritrocitos, induciendo su ruptura.

5.5.8. Glúcósidos 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. Sus formas reducidas, pueden reconocerse en muestras vegetales a través del denominado “Ensayo de Bornträger, en el que 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 es separada y es puesta 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.

5.6. Fundamentos de actividad antioxidante.

En la industria farmacéutica como alimentaria, el uso de antioxidantes es de gran importancia para prevenir el proceso de oxidación de los productos. Para esto se han desarrollado diferentes métodos que miden la resistencia de un lípido frente un agente oxidante en presencia de un antioxidante potente. Sin embargo, la actividad antioxidante no puede ser medida directamente, pero es posible determinarla por los efectos del compuesto antioxidante en un proceso de oxidación controlado.

El proceso de oxidación es lento y la formación de un radical procede de una cadena de reacciones que incluye los siguientes pasos: inducción, propagación y terminación. Durante la inducción, radicales alquilo son formados y sometidos a reacción con moléculas de oxígeno con las cuales se formarán hidroperóxidos y radicales de peróxido en la fase de propagación. En la fase de terminación dos radicales se asocian para formar un aducto estable (Brand-Williams et al 1995).

La actividad antioxidante de una muestra no puede ser determinada basándose sólo en un ensayo de prueba. En la práctica se realizan muchos modelos de test *in vitro* para evaluar la actividad antioxidante de la muestra de interés; sin embargo, es necesario considerar que las diferencias entre uno y otro método dificultan la comparación de resultados. Por lo cual, Huang et al 2005 categorizan los ensayos más relevantes en dos categorías: los

ensayos basados en la transferencia de electrones (ET) y los ensayos basados en transferencia de átomos de hidrógeno (HAT).

5.6.1. Ensayos basados en transferencia de electrones (ET).

En estos se involucra una reacción redox con el oxidante como un indicador del punto final de reacción. En el presente estudio se consideró usar los métodos ABTS y DPPH, ambos basados en transferencia de electrones.

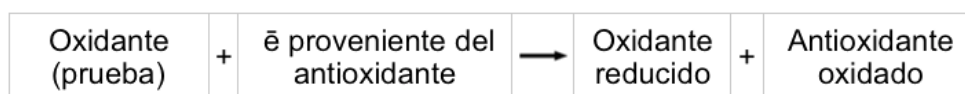


Fig. 12. Mecanismos de reacción por transferencia de electrones (Huang et al. 2005).

5.6.2. Ensayo reducción del radical DPPH•

El método de la reducción del radical libre DPPH•, propuesto originalmente por Blois en 1958, demostró por primera vez la capacidad del radical para aceptar un átomo de hidrógeno (H•) proveniente de una molécula de cisteína. La molécula 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo (DPPH) es conocido como un radical libre estable debido a la deslocalización de un electrón desapareado sobre la molécula completa, por lo cual la molécula no se dimeriza, como es el caso de la mayoría de los radicales libres. La

deslocalización del electrón también intensifica el color violeta intenso típico del radical, el cual absorbe en metanol a una longitud de onda de 517 nm. Cuando la solución de DPPH reacciona con el sustrato antioxidante que puede donar un átomo de hidrógeno, el color violeta se desvanece. El cambio de color es monitoreado espectrofotométricamente y es utilizado para la determinación de los parámetros para las propiedades antioxidantes.

El procedimiento original para el ensayo DPPH• ha sido adoptado por muchos laboratorios sin embargo, existen modificaciones a conveniencia para su uso. La revisión bibliográfica de Mishra et al en 2012, menciona que la mayoría de estudios están basados en un tiempo de reacción de 20-30 min en vez de un tiempo de reacción total de 120 min requerido para alcanzar el estado estacionario y completar la reacción redox.

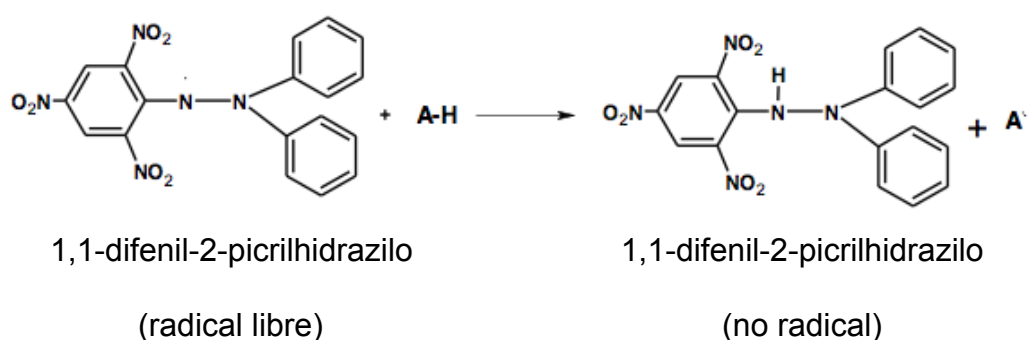


Fig. 13. Estructura del DPPH antes y después de la reacción con el antioxidante (Alam et al. 2012).

5.6.3. Ensayo reducción del radical ABTS^{•+}.

Gracias a la generación del ensayo ABTS^{•+} (ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbensotiazolin-6-sulfónico) estos métodos espectrofotométricos han sido aplicados para medir la actividad antioxidante total de soluciones o sustancias puras y mezclas acuosas. Este método ha sido modificado de su antiguo modelo, el cual estaba basado en la activación de la metilmioglobina con peróxido de hidrógeno en presencia de ABTS para producir un radical catión, en presencia o ausencia de antioxidantes. Sin embargo, la rápida reacción de los antioxidantes, conduce a la reducción del radical ferrilmioglobina, por lo cual este método fue criticado. La adaptación actual del ensayo consiste en la técnica de decoloración, en donde el radical es generado directamente en una forma estable antes de la reacción con los antioxidantes (Re et al. 1999).

La técnica mejorada para la generación del radical catión ABTS^{•+} implica la producción directa del cromóforo ABTS^{•+} verde-azul a través de la reacción entre ABTS y el persulfato de potasio ($K_2S_2O_8$). Este presenta tres máximos de absorción a las longitudes de onda de 645 nm, 734 nm y 815 nm. La adición de los antioxidantes al radical preformado lo reduce a ABTS. De esta manera, el grado de decoloración como porcentaje de inhibición del radical catión ABTS^{•+} está determinado en función de la concentración y el tiempo, así como del valor correspondiente usando el Trolox como estándar, bajo las mismas condiciones.

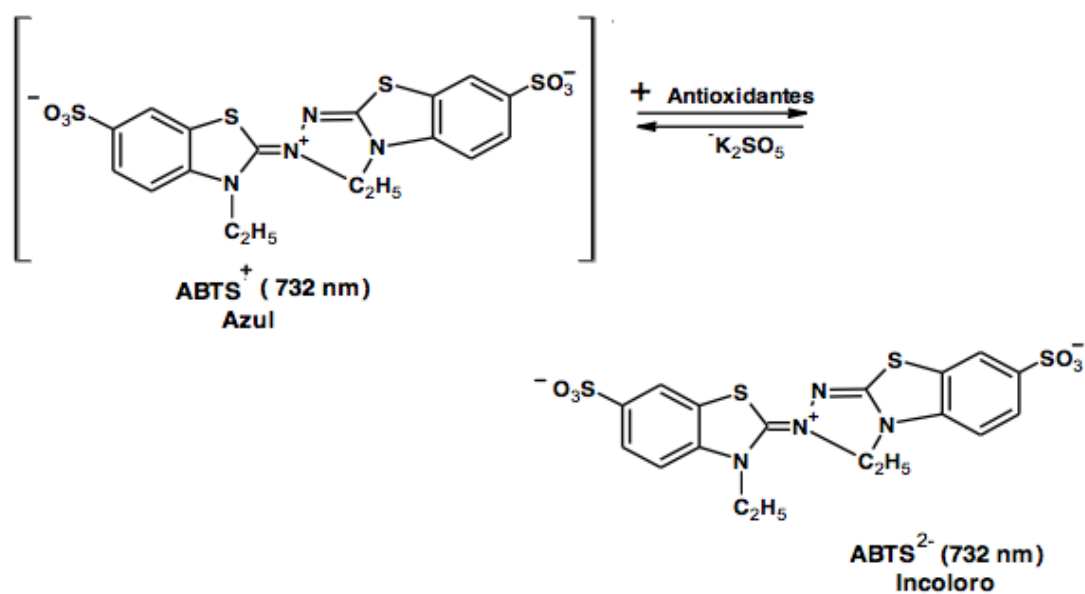


Fig. 14. Estructura del ABTS•⁺ antes y después de la reacción con el antioxidante (Zulueta et al. 2009).

6. MÉTODOS.

6.1 Evaluación fitoquímica.

El presente trabajo es un estudio experimental biodirigido, donde se busca demostrar la presencia de metabolitos activos en la raíz *Salvia mellifera* y evaluar su posible potencial antioxidante y antiinflamatorio en la línea celular RAW 264.7. Los pasos para obtener los resultados esperados se describen a continuación:

6.1.1. Obtención e identificación de *Salvia mellifera*.

Para la obtención de *S. mellifera*, se realizó una recolecta el 10 de marzo de 2012 en el municipio de Tijuana, a una altura de 140 m sobre el nivel del mar. El espécimen fue identificado *in situ* con las claves taxonómicas correspondientes en las siguientes coordenadas 32°30'10''Norte y 116°99'34''Oeste en una zona cercana a la carretera llamada Bulevar 2000. Para cotejar su identificación se consultó la base de datos taxonómicas en línea del Sistema Integrado de Información Taxonómica (ITIS 2014), que posee un acervo de especies para la región norte de América (Canadá, Estados Unidos y México).

6.1.2. Manejo de la muestra y maceración.

La raíz fue retirada del resto de la planta y lavada con agua corriente para retirar el exceso de tierra. El material vegetal fresco se dejó secar bajo el

sol durante tres semanas, para eliminar la mayor cantidad de agua. Una vez seca la muestra se trituró y se pesó, obteniendo 300 g peso seco, el cual fue procesado a través del método de maceración en 2 L de disolvente EtOH al 95% durante 5 días. Una vez obtenida la fase acuosa se retiró dejando solo la raíz a la cual se le incorporaron 2 L adicionales del solvente para una segunda y tercera maceración.

Los extractos acuosos se filtraron con papel filtro (Whatman de luz de malla de 90 mm) para retirar impurezas y proceder a su concentración a presión reducida con un rotaevaporador (modelo Buchi B-491). De esta forma se concentró y se obtuvo el extracto crudo de la raíz de *Salvia mellifera*.

6.1.3. Partición del crudo.

Los compuestos de interés para este trabajo de investigación son reportados de polaridad media, por lo cual, a partir del extracto crudo, se realizaron tres fracciones, de polaridades baja, media y alta por extracción líquido-líquido. El extracto crudo fue redissuelto en la mezcla de los solventes MeOH y H₂O a una proporción de 2:3 utilizando como referencia 500 mL por cada 20 g de extracto. Se agitó manualmente hasta observar una mezcla bien incorporada de todos los componentes y se procedió a realizar las extracciones con n-hexano, AcOEt y MeOH respectivamente.

Fase n-hexáno: En la primera fracción el extracto fue redisoluto con n-hexano grado reactivo a una proporción 2:3, recuperando la fase orgánica, la cual es apartada para repetir nuevamente este procedimiento pero a una proporción 1:1, este último paso se repitió una segunda vez y de esta forma, al concentrar todas las fases orgánicas se obtuvo la partición hexánica.

Fase AcOEt: En la segunda fracción el extracto fue redisoluto pero con el solvente AcOEt a una proporción 2:1, luego a 1:1 con repetición. La fase orgánica de esta separación dio la partición de acetato de etilo.

Fase MeOH: En la tercera fracción sólo se recuperó la fase orgánica de MeOH.

Tabla 2. Fracciones por polaridad del extracto crudo de RSM-A.

No.extracciones	Fracciones		
	No polar	Media Polar	Polar
1	n-hexano 2:1		
2	n-hexano 1:1		
3	n-hexano 1:1		
4		AcOEt 2:1	
5		AcOEt 1:1	
6		AcOEt 1:1	
7			Fracción sobrante
Etiqueta	RSM-H	RSM-A	RSM-M
Pesos seco obtenido (g)			

6.1.4. Pruebas colorimétricas.

Los siguientes métodos fueron empleados para la identificación de los posibles metabolitos presentes en las fracciones de raíz de *Salvia mellifera* con n-hexano (RSM-H) y fracción con acetato de etilo (RSM-A): Para alcaloides: Meyer, Dragendorff y Wagner; para la identificación de taninos: cloruro férrico y gelatina; para esteroides y triterpenoides: Lieberman-Burchard; para flavonoides: Shinoda; para antocianinas: cambio de pH; para carbohidratos: Benedict; para saponinas: espuma; para glucósidos antraquinónicos: Borntrager.

Alcaloides.

Especificaciones observables:

Mayer (+): precipitado color crema.

Dragendorff (+): precipitado café- rojo.

Wagner (+): precipitado café- rojo.

Procedimiento:

1. Pesar 1mg de extracto.
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 de ensayo).

5. Observar cambios.

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

Taninos.

Especificaciones observables:

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

Gelatina (+): precipitado blanco.

a) 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.

b) 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.

Especificaciones observables:

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. Adicionar 1 mL de anhídrido acético y mezclar ligeramente.
4. Agregar 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado.
5. Observar cambios.

Los estándares utilizados para la prueba: colesterol para esteroides y β -caroteno para triterpenoides.

Flavonoides.

Especificaciones observables:

Flavonoides (+): tonalidades de rojo.

Procedimiento:

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

5. Observar los cambios.

Estándar utilizado: hesperidina/ diosmina, extraídas de un medicamento comercial 50/ 450 mg.

Antocianinas.

Especificaciones observables:

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

Antocianinas (+): pH alcalino, verde o azul.

Procedimiento:

1. Pesar 1mg del extracto.
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. Adicionar en un tubo de ensayo 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: solución acuosa/etanolica de arándanos.

Carbohidratos.

Especificaciones observables:

Carbohidratos (+): precipitado café-rojo.

Procedimiento:

1. Pesar 1mg del extracto.
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 cambios.

Los estándares utilizados: carbohidratos lactosa y fructosa.

Saponinas.

Especificaciones observables:

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: saponina.

Glúcidos Antraquinónicos.

Especificaciones observables:

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

Procedimiento:

1. Pesar 1mg del extracto.
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 amoniaco al 10%.
6. Observar los cambios.

El estándar utilizado: ácido carmínico.

6.2. Aislamiento de metabolitos secundarios.

Se realizó a través de la técnica de separación cromatográfica en capa fina (en inglés thin layer chromatography o TLC) utilizando placas de silicagel en donde se aplicó una pequeña muestra del extracto obtenido de la raíz con el disolvente AcOEt (RSM-A) a una proporción 1:1 mg/ml. El extracto RSM-A fue seleccionado por poseer mediana polaridad, por lo cual posible encontrar los metabolitos secundarios de mayor interés biológico, mientras que en polaridades más bajas por lo general, se encuentran grasas y ceras, en polaridades muy altas se pueden observar azúcares.



Fig. 15. Revelado de TLC de RSM-A (extracto de raíz fracción acetato de etilo). La mancha color naranja indica la presencia de un compuesto de polaridad media.

La mezcla eluyente o fase móvil fue a una proporción de 7:3 n-Hexano/AcOEt (fase móvil universal), con la que se obtuvo la separación de los compuestos de la muestra sembrada. Se utilizó una cámara de luz

ultravioleta para identificar otros compuestos que no pueden ser observados a simple vista y una vez identificadas las franjas de los compuestos se procedió a revelar la placa con la mezcla oleum como sistema revelador. Una vez obtenida la primera TLC, se buscó un fase móvil que permitió separa las franjas que se observan de color naranja (compuestos del tipo terpeno) de polaridad media como se muestra en la figura 16.

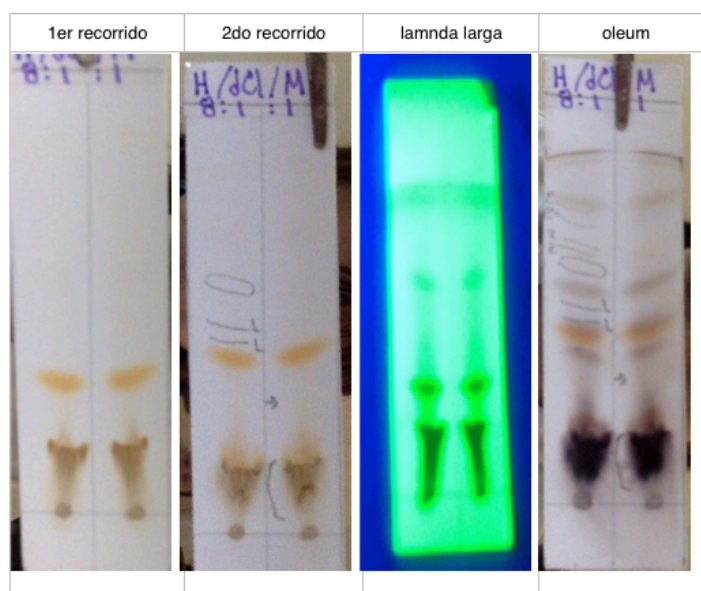


Fig. 16. Cromatografía de capa fina del extracto RSM-A.

De izquierda a derecha se observa el resultado de un 1er y 2do recorrido de la fase móvil, a continuación observación de luz de onda larga que demuestra la presencia de compuestos no visibles a simple vista, finalmente el revelado de la placa con el medio oleum.

La fase móvil que permitió la separación de los compuestos de polaridad media de los muy polares como se observa en le imagen anterior fue n-Hexano/AcOEt 7/2 más 70 μ L de Acetato en el primer recorrido y nuevamente 70 μ L en el segundo recorrido. Con estas especificaciones se

establecieron las condiciones para la preparación del extracto en una columna cromatográfica de silicagel. A continuación se describen los pasos:

1. Se utilizaron 3.26 g de RSM-A disueltos en 1mL de DCM y una columna preparada con la fase móvil n-Hexano/AcOEt proporción 7:3.
2. Sistema de elución por gradiente en el siguiente orden:
 - a) 200 mL n-Hexano.
 - b) 200 mL n-Hexano/AcOEt al 5, 10, 20, 30, 50, 80%.
 - c) 500 mL AcOEt.
3. Lavado con MeOH.



Fig. 17. Recolección de fracciones por el sistema de elución por gradientes de polaridad en columna cromatográfica

Previamente, en una columna cromatográfica preparada con sillita gel lavada con AcOEt y posteriormente con MeOH para asegurar la pureza del extracto, se incorporó la fase móvil n-Hexano/AcOEt proporción 7:3. Lista la

columna se procedió a la incorporación del extracto redissuelto (paso 1) dentro de la columna.

Una vez que el extracto estuvo en contacto con la superficie de la sílica se procedió con el sistema de elución por gradiente (paso 2), en donde se recuperaron cada fracción de gradiente en tubos de cristal. Finalizada esta parte se procedió a un lavado de la columna (paso 3). Cada fracción recuperada se caracterizó por medio de siembras en una TLC para establecer un perfil de similitud y facilitar su posterior purificación.

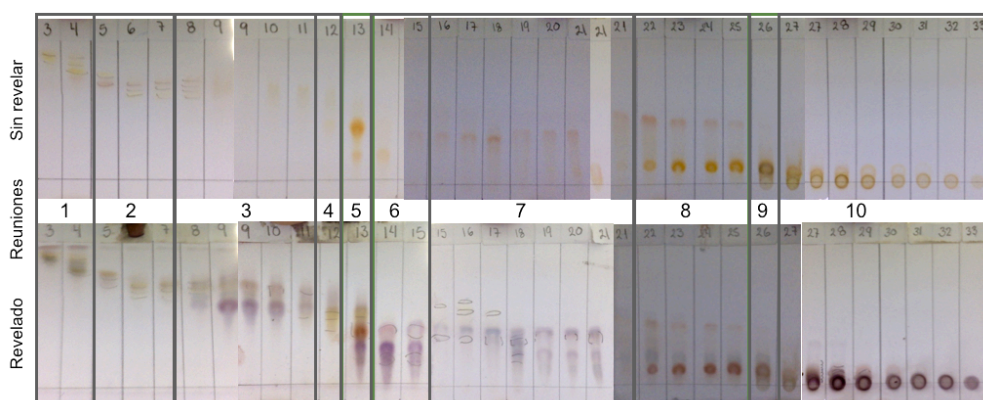


Fig. 18. Cromatografía comparativa de RSM-A.

Las 32 fracciones están agrupadas en 10 reuniones según su similitud. Se observa en la parte de arriba placas sin revelar, en la parte central el número de la reunión y en la parte de abajo las placas reveladas en oleum.

En total se obtuvieron 32 fracciones (Figura 19), de éstas una vez observada su similitud en la placa de cromatografía comparativa, se reagruparon en tan sólo 10 reuniones, de las cuales fueron consideradas de la 1 a la 8 para las pruebas antioxidantes y biológicas (9 y 10 fueron

incorporadas en la reunión 8). A continuación se muestra la placa cromatográfica revelada en oleum con las reuniones 1 a la 8 (Figura 19).

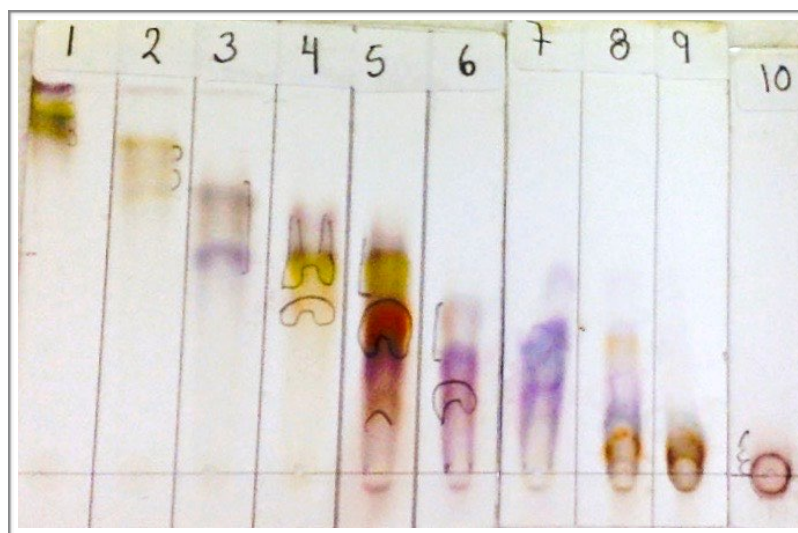


Fig. 19. Cromatografía de las reuniones 1 a la 8 de RSM-A.

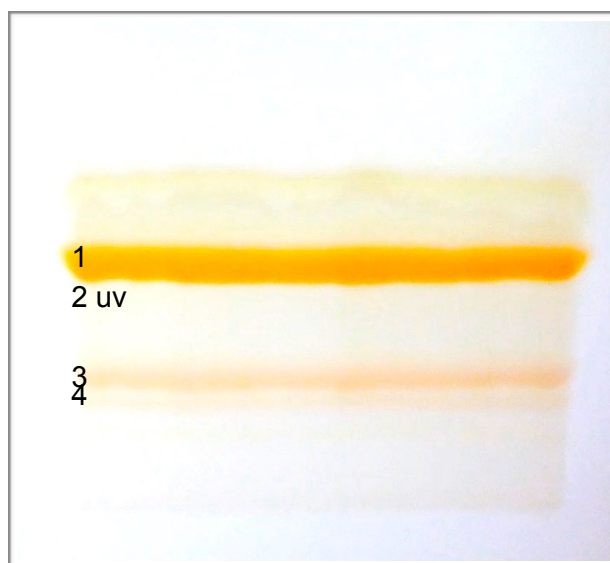
Obsérvese la reunión 5 con una coloración intensa naranja y roja, destacando la posibilidad de encontrar compuestos del tipo terpeno.

Posterior al agrupamiento de las fracciones en las 8 reuniones, cada una fue pesada y envasada y guardada en refrigeración hasta su posterior uso. Los pesos obtenidos para las 8 fueron los siguientes:

La reunión 5 (R5) fue considerada para la búsqueda y obtención de metabolitos del tipo terpeno. Para esto se tomó 110 mg de R5 redissuelto en 1.5 mL del MeOH el cual fue sembrado en una placa cromatografía preparativa de sílica gel (20 x 20 cm) como se muestra a continuación:

Tabla 3. Pesos secos de las reuniones 1-8 obtenidos por medio de la columna cromatográfica del extracto RSM-A.

Reunión	Peso seco (mg)	Observaciones
1	11.55	
2	8.64	
3	11.71	
4	3.46	
5	19.68	Durante la rotoevaporación se formaron cristales de coloración naranja intenso
6	26.95	
7	56.32	
8	242.24	

**Fig. 20.** Siembra de R5 en placa cromatográfica preparativa.

Se observa la separación de las franjas 1,3 y 4. La franja 2 es vista por medio de luz ultravioleta.

Se utilizó la fase móvil universal para separar los compuestos y se dejó dentro de la cámara cromatográfica hasta observar la separación de los compuestos (transcurridas 2:30 hrs). Posteriormente se raspó cada banda de

la sílica y se filtraron al vacío en un matraz kitasato. Finalmente fueron rotoevaporados y pesados obteniendo los siguientes valores que se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. Pesos obtenidos de cada franja aislada de la reunión 5 (R5).

Franja	Peso seco (mg)
1	41.6
2	5.3
3	4.5
4	0.7

Los números en la columna de franja son los compuestos recuperados de la placa cromatográfica en busca de la obtención de metabolitos puros.

Una muestra de cada franja fue nuevamente sembrada para comprobar su pureza en placas finas cromatográficas utilizando la misma fase móvil. La franja con mayor peso (franja 1) se utilizó para una segunda y tercera cromatografía de columna para lograr separar los compuesto de interés, de ésta se obtuvieron el compuesto A con 9.5 y B con 5.5 mg peso seco respectivamente. En el anexo 1 se observan los pasos a seguir a partir del extracto crudo hasta la obtención de los compuestos A y B.

Las reuniones 1 al 8 fueron consideradas para realizar las pruebas antioxidantes con los métodos DPPH y ABTS, mientras que el compuesto A de R5 fue analizado por CG-MS para su identificación y caracterización.

El extracto de RSM-A (raíz de *S. mellifera* fracción acetato de etilo) y sus reuniones 1-8, fueron evaluados por triplicado en los siguientes ensayos:

a) Evaluación química.

Reducción del radical libre DPPH.

Ensayo ABTS.

b) Evaluación biológica.

Viabilidad celular (MTT).

Estimulación de macrófagos por lipopolisacaridos para establecer un posible efecto antiinflamatorio.

6.3. Evaluación química.

A continuación se describe el procedimiento para la evaluación química por medio de dos métodos para probar la capacidad antioxidante del extracto RSM-A.

6.3.1. Reducción del radical libre DPPH.

Se preparó una disolución de DPPH 125 μ M en etanol. Esta concentración se utilizó con el propósito de cumplir con la Ley de Beer-Lambert-Bouguer que relaciona la absorción de luz con las propiedades del material atravesado. Posteriormente se pesó 1 mg de cada extracto (reunión 1-8) y se disolvieron en 1 ml de etanol. Se utilizó el agitador vórtex para ayudar a disolver los extractos, luego de esto se agregaron 500 μ l de etanol a los diez tubos por triplicado más 2 controles y se le añadieron 500 μ l del extracto al primer tubo, con el cual se realizaron las diluciones seriadas en los nueve tubos restantes, tomando 500 μ l del primero y pasándolos al siguiente tubo, mezclar y repetir para el resto de los tubos sucesivamente. A continuación se añadieron de los 500 μ l de solución de DPPH 125 μ M a cada tubo y se dejaron reposar por 30 minutos en la oscuridad.

Transcurrido el tiempo se realizó la lectura en una celda de cuarzo a 517 nm utilizando un blanco de etanol. La curva de calibración y control positivo se realizan con el antioxidante quercetina.

Las absorbancias obtenidas se promediaron para obtener el porcentaje de reducción de DPPH de esta forma se graficaron los resultados para obtener la ecuación de la recta a la cual se le realizó el despeje para obtener los valores de x para calcular la concentración efectiva media (EC_{50}), siendo $y=50$.

6.3.2. Reducción del radical ABTS*.

Preparación de la solución patrón ABTS: Se pesaron 0.33 mg de $K_2S_2O_8$ (persulfato de Potasio) y 0.019 g de ABTS disueltos en 5 mL de agua desionizada. Esta solución se aparta de la luz y se dejó reposar durante 18 horas. Posterior a este tiempo, se tomaron 150 μ L y se diluyeron en 15 mL de MeOH cuidando que no tuviera exposición con la luz.

Preparación de la solución patrón del extracto vegetal: Se pesó 1mg de cada reunión del extracto RSM-A por separado, a cada una se le adicionó 1 mL de metanol para obtener una concentración de 1 mg/mL y fueron apartadas para las pruebas.

A 10 tubos de ensayo se les agregó 100 μ L de MeOH, excepto al primero en donde solo se le agregó la solución patrón del extracto vegetal. Se realizaron diluciones seriadas tomando del primer tubo 0.5 mL los cuales fueron colocados en el segundo tubo, se agitó y se repitió el procedimiento

hasta el último tubo, el restante se descartó. Este paso se realizó por triplicado a cada una de las 8 reuniones de RSM-A por separado.

Se tomó una muestra de cada 20 µl de cada tubo y fueron pasados a una nueva gradilla con el mismo número de tubos que la anterior, a fin de tener una réplica de las diluciones anteriores. A este grupo de tubos se les adicionó a cada uno 980 µl de la solución patrón ABTS y se dejó reposar por 7 min. Mientras tanto se tomó la lectura de la absorbancia de la solución patrón, este dato fue importante para el cálculo del %AA.

Transcurrido el tiempo se tomó la lectura para todas las concentraciones a 734 nm, las cuales se promediaron para obtener los % AA con la sustitución de valores de la siguiente formula:

$$\% \text{ Actividad antioxidante} = (\text{Abs}_i - \text{Abs}_f / \text{Abs}_i) * (100)$$

Donde:

Abs_i = absorbancia de la solución patrón ABTS.

Abs_f = absorbancia de cada concentración promediada.

La actividad antioxidante se graficó para obtener la ecuación de la recta, los valores obtenidos a partir de esta adecuación se utilizaron para obtener la concentración efectiva o de inhibición media (CE50) para cada extracto.

La CE50 es la concentración del extracto que afecta el 50 % de los reactivos oxidables del ensayo y sus límites de confianza son del 95 % derivados del análisis estadístico.

6.4. Evaluación biológica.

6.4.1. Activación, siembra y proliferación de células.

Antes de iniciar con cada ensayo celular se calentaron a 37 °C a baño maría ISOTemp 210 el medio y las soluciones de FBS, PBS y tripsina. Se extrajeron dos viales de células RAW 264.7 del tanque de nitrógeno líquido, los cuales se descongelaron a temperatura ambiente aproximadamente por 10min. Se aspiró el medio y se agregó 5mL de PBS. Se observó bajo el microscopio que las células flotaran para proceder a la proliferación donde una vez sembradas en los platos de 24 pocillos a una densidad de 15,000 células/pocillo y con un volumen de 500µL de mezcla (medio ECM más suspensión celular) por pocillo, se incubó en una Incubadora de CO₂, Hepa class 100 forma series II, *Thermo Electron Corporation* por 48 horas.

6.4.2. Cultivo celular.

La línea celular empleada fue RAW 264.7 (macrofagos murinos) se necesitaron las soluciones de Suero Fetal Bovino (FBS *ScienCell™ Research Laboratories Cat. # 0025*) el cual está compuesto de 5 mL de una solución de penicilina/estreptomicina, 5 mL de suplemento de crecimiento para células endoteliales (ECGS *ScienCell™ Research Laboratories Cat. # 1052*) y 25mL de Suero Fetal Bovino (FBS *ScienCell™ Research Laboratories Cat. # 0025*) y Buffer Fosfato Salino (PBS).

6.4.3. Capacidad citotóxica.

Para medir el posible efecto citotóxico de un agente (extracto RSM-A o sus reuniones) sobre la línea celular RAW 264.7 se utilizó el método del MTT. Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) realizada por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazan), permitiendo determinar la funcionabilidad mitocondrial de las células tratadas. Este método ha sido muy utilizado para medir supervivencia y proliferación celular. La cantidad de células vivas es proporcional a la cantidad de formazán producido. Este método fue desarrollado por Mosmann en 1983 siendo modificado en 1986 por Francois Denizot y Rita Lang.

El proceso a seguir fue el siguiente: utilizando tripsina EDTA se disociaron las células y se resuspendieron en medio de cultivo suplementado (10 % de Suero fetal bovino y antibiótico). Para determinar el número de células requeridas por pozo, fue necesario realizar la técnica con células sin la sustancia a analizar y densidad óptica mayor ó igual a 1. Estas fueron sembradas en cajas de 96 pozos. En la mayoría de las líneas celulares el número de celular por pozo no excede a 50.000.

Se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂ durante 24 horas para permitir su adherencia. Se preparó el extracto disuelto en DMSO (0.2 %, concentración no tóxica) y pasado el tiempo de incubación se añadieron 20

μL de la sustancia problema por pozo. Posteriormente se incubaron nuevamente a 37 °C 5 % con CO₂ durante 24 horas para permitiendo que el extracto actuara en todas las células en caso de que su acción sea sobre una fase específica del ciclo. Al finalizar el tiempo de incubación, se descartó el medio de los pozos y se colocaron 100 μL de medio sin suero, ni rojo fenol por pozo, se añadieron 50 μL de MTT (mg/mL) en solución tampón libre de calcio y magnesio y son incubadas las células por 4 horas a 37 °C para permitir la formación de cristales de formazán, luego el sobrenadante fue eliminado y fueron añadidos 100 μL de isopropanol. Los cultivos se dejaron a temperatura ambiente para permitir que los cristales de formazán sean disueltos.

La lectura de densidad óptica (DO) se realizó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm y el porcentaje de viabilidad celular se obtuvo de la siguiente forma:

$$\% \text{ Viabilidad} = \text{DO células tratadas} \times 100 / \text{DO células control}$$

Cada ensayo fue realizado por triplicado, con controles negativos (solvente), controles positivos y células no tratadas las cuales obtienen una lectura de DO mayor ó igual a 1. Los valores de comparación se hicieron sobre una base de 50 % de inhibición de crecimiento (IC₅₀) en las células tratadas con los agentes específicos.

6.4.4. Capacidad antiinflamatoria. Ensayo con LPS.

Para poder llevar a cabo los ensayos, las líneas celulares fueron activadas y sembradas en un medio de cultivo donde se necesitó del medio celular DMEM, adicionado con SBF y antibiótico para asegurar asepsia. La densidad celular fue de 120.000 células por pozo (120.000 células/mL). Se tomaron 3 mg peso seco de R5 y R6 respectivamente. Estos 3 mg se disolvieron en RPMI, esto fue igual 20 mg sobre mililitro, equivalente al 5 % de DMSO.

Los macrófagos fueron estimulados a partir de 1000 mg/ mL de LPS en tres tiempos:

1. Cuatro horas antes.
2. Cero horas.
3. Cuatro horas después.
 - a) Los cultivos celulares se dejaron en ayuno durante una hora, posterior a esto se les cambió el medio RPMI por el medio OptiMEM.
 - b) Cada extracto fue adicionado en dos cajas de pocillos respectivamente y se dejaron incubando por durante 4 h a 37 °C para permeabilizar las células con el extracto.
- b) Transcurrido el tiempo, antes de adicionar el tratamiento se lavó cada placa de pocillos, de esta forma se adicionaron los LPS (1000 mg/mL).
- c) Se incubó por 16-24 h a 37 °C.
- d) Se adicionó MTT 2.1 mg/mL (30 µl), y se incubó por 4 h a 37 °C.

- e) Se adicionó buffer del lisis (50% dimetiformaldehído/ 20% SDS).
- f) Se realizó una lectura en espectrofotómetro a una longitud de onda de 560 nm.
- g) Finalmente se analizó el resultado con la incorporación de los datos obtenidos en gráficos.

6.5 Análisis Estadístico.

Para determinar la concentración de inhibición media (CE_{50}), los parámetros para las ecuaciones fueron obtenidos mediante el procedimiento regresión lineal. Para obtener los valores de la CE_{50} correspondiente a la concentración de RSM-A que inhibe el radical libre en un 50 %, se remplazó el valor “50” en las ecuaciones resultantes. Se obtuvo el valor $x = CE_{50}$, cuando $y = 0,5$ (Sholberg et al., 2003) despejando las ecuaciones de las regresiones lineales, con el sistema operativo *Numbers* (MacOS 10.12).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.1. Perfil fitoquímico preliminar de RSM-A y RSM-H.

Teniendo en cuenta que este no es un resultado contundente sino una aproximación al contenido químico del extracto de la raíz de *Salvia mellifera*, el análisis cualitativo de detección rápida de algunos metabolitos secundarios indicaron presencia de algunos de ellos (tabla 5) los cuales fueron confirmados por TLC, como es el caso de los taninos (coloración de un precipitado azul), de flavonoides (identificados por la tonalidad violeta) y carbohidratos, todos ellos sustancias altamente polares.

Tabla 5. Componentes de las fracciones AcOEt y n-Hexano encontrados en la raíz de *Salvia mellifera*.

Sustancia	Prueba	AcOEt	n-Hexano
Alcaloide	Meyer	-	-
	Dragendorff	-	-
	Wagner	-	-
Taninos:	Gelatina-sal FeCl ₃	+	+
Esteroles:	CCD Liebermann- Burchard	-	-
Flavonoides:	Cianidina HCl10%	-	-
Carbohidratos:	Carbohidratos:	+	-
Saponinas:	Espuma	-	-
Glucocidos:	:	-	-

Los signos + sugieren la presencia de los compuestos, mientras que el signo - indica la ausencia de los mismos.

En el caso de los terpenos, se observó en la TLC la coloración naranja a naranja-rojizo intenso (comp. per. Córdova-Guerrero 2016), lo cual es indicador de la presencia de estos compuestos (Fig. 22).



Fig. 21. Cromatografía del extracto crudo de RSM-A.

La bibliografía consultada, demuestra la evidencia de la presencia de compuestos del tipo terpeno mayormente concentradas en la raíz de algunas especies de este género de planta, por lo que era de esperar la observación de manchas naranja-rojo en el revelado de las placas cromatográficas, lo cual se logró cotejar con el aislamiento de un quino-diterpeno aislado de la R5 de RSM-A.

7.2. Obtención de metabolitos.

Como se describe en la sección métodos, la fracción RSM-A fue considerada para las pruebas biológicas y químicas, siendo la R5 seleccionada para el aislamiento e identificación de metabolitos por RMN. Sin embargo, de las dos moléculas aisladas (A y B), sólo se logró identificar A que se muestra en la figura 23 como una molécula quino (-)-criptotanshinona aislada de R5 e identificada por RMN.

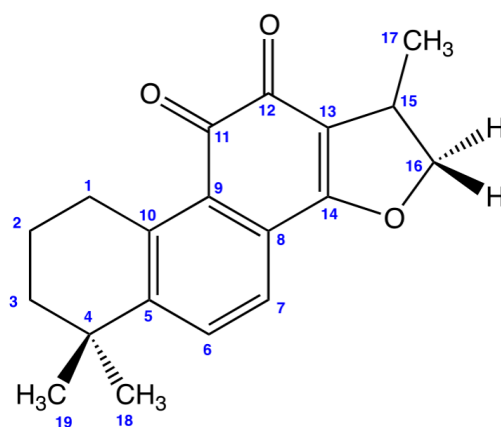


Fig. 22. Compuesto A. Criptotanshinona.

Esta molécula es perteneciente a una familia de quinonas diterpénicas llamadas tanshinonas, presentes en el “Danshen” la antigua droga usada en la medicina tradicional china. Los estudios que se han realizado con esta molécula han logrado demostrar su potencial acción inhibitoria de la topoisomeras I (Lee y Hong 1998) molécula clave en la reorganización del

ADN, así como toxicidad contra líneas celulares de cáncer humano (Lee et al. 1999).

La síntesis de análogos simplificados de ésta molécula ha logrado establecer su acción como inhibidor de la fosfatasa DCC25B (Huang et al 2005), la cual participa en la regulación del ciclo celular y se encuentra sobre expresada en una gran variedad de tumores.

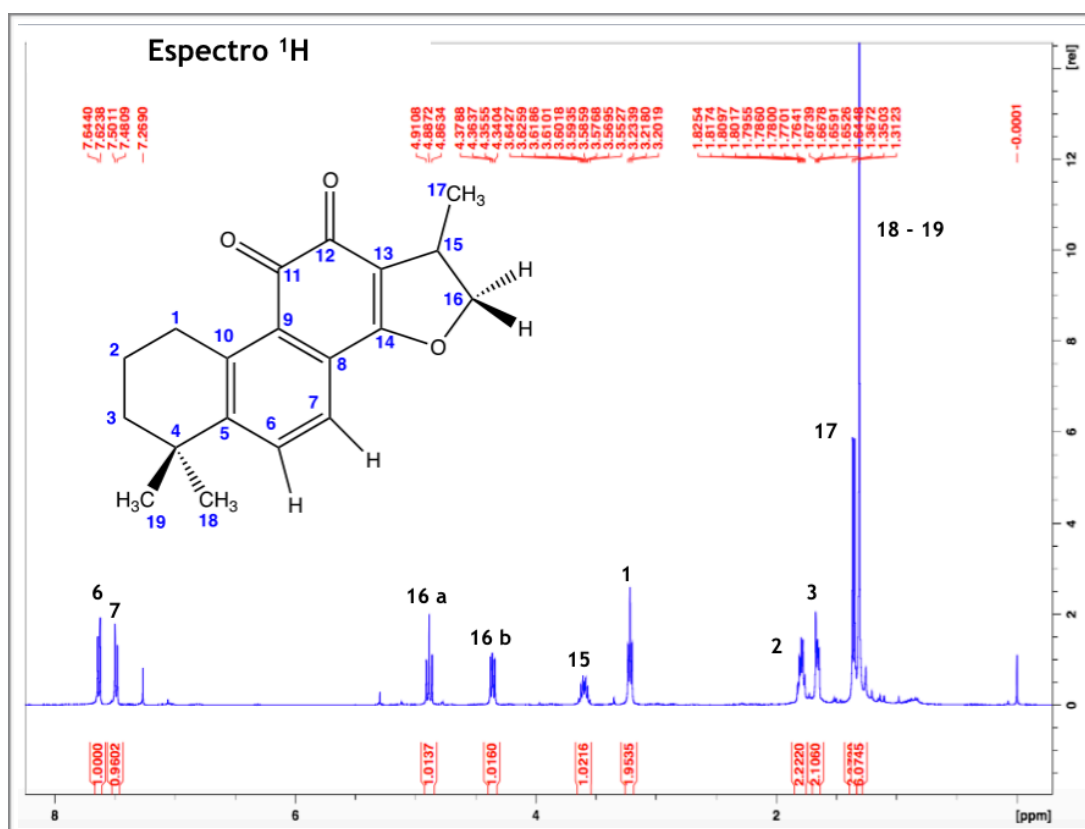


Fig. 23. Espectro de RMN del compuesto A aislado de R5 de RSM-A y reconstrucción de la molécula criptotanshinona.

Esta molécula ha sido caracterizada como agente citotóxico contra células A-549 (cáncer en pulmón) con éxito, siendo el anillo aromático y el grupo hidróxilo unido a este las características principales que le confieren la capacidad de ser un potente inhibidor y de acción citotóxica (Bonifazi 2012).

En la figura 24 se muestra en el espectro de resonancia una molécula de la familia de las antraquinonas, con 19 carbonos, el quino-diterpeno criptotanshinona (fórmula molecular $C_{19}H_{20}O_3$ y peso molecular de 296 g/mol).

La actividad antibacteriana para la criptotanshinona sobre cepas Gram negativas *Bacillus subtilis* también ha sido evaluada. El efecto actúa debido a los radicales superóxidos generados por la criptotanshinona, estos provocan lisis o rompimiento en la membrana de las bacterias (Dat et al. 2007).

Así mismo, la acción anticancerígena también está documentada para la criptotanshinona, según el estudio de de Dat y colaboradores, 2007, en donde usaron la fracción $CHCl_3$ de *Salvia miltiorrhiza*, la cual inhibió significativamente la expresión génica inducida por hipoxia a través de 12 diterpenos del tipo abietano, de los cuales la criptotanshinona inhibió potentemente la expresión de la enzima luciferina inducida por hipoxia en células AGS (adenocarcinoma gástrico) y Hep3B (hepatocarcinoma humano). Estos resultados sugieren que la actividad anticancerígena de las

tanshinonas es probable, al menos en parte, asociada con su inhibición de la acumulación de HIF-1 (factor 1 inducible por hipoxia).

HIF1A es un factor de transcripción con dominios HLH-PAS encontrado en células de mamíferos a concentraciones bajas de oxígeno y es importante debido a que participa esencialmente en la respuesta celular y sistémica (Ratcliffe 2003).

7.3 Actividad antioxidante.

De las fracciones n-Hexano y AcOEt, con base en las observaciones se seleccionó la fracción AcOEt debido a que la separación de los componentes tuvieron una distribución más amplia entre cada uno, lo cual permitió separar la muestra hasta el aislamiento de metabolitos con mejores oportunidades de purificación.

Por lo cual, a partir de la fracción RSM-A se realizaron todas las pruebas químicas y biológicas planteadas en este trabajo, obteniendo los siguientes resultados expresados como porcentajes de actividad antioxidante (%AA) y concentración media inhibitoria (CE_{50}) con relación a la concentración de R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7 y R8, valores obtenidos a partir de los métodos antioxidantes DPPH y ABTS respectivamente.

El estándar quercetina (fórmula molecular: $C_{15}H_{10}O_7$), es un flavonoide con elevada actividad antioxidante presente en diversas frutas y verduras de la dieta humana. Los valores encontrados para la molécula en CE_{50} obtenidos por el método DPPH son 0.003 mg/mL, mientras que para ABTS el valor es 100 mg/mL. Considerando dichos valores, se establece que para el método DPPH R6, R7 y R8 reportan valores iguales y/o muy cercanos al estándar, siendo estos a su vez, los valores más bajos a comparación del resto, lo cual es consistente en relación a la prueba ABTS, en donde al menos, R7 y R8 muestran valores en CE_{50} por debajo de 1 mg/mL.

Tabla 6. Actividad antioxidante del extracto RSM-A de la raíz *S. mellifera*.
Método DPPH y ABTS

Muestra (0.5 mg/mL)	% AA DPPH	CE ₅₀ (mg/mL)	% AA ABTS	CE ₅₀ (mg/mL)
Quercetina	—————	0.003	—————	100
R1	71	1.390	13	2.89
R2	73	0.007	21	11.13
R3	67	0.095	45	1.09
R4	94	0.002	33	1.33
R5	93	0.015	26	1.18
R6	94	0.003	28	1.37
R7	92	0.002	37	0.86
R8	95	0.001	76	0.26

El estándar utilizado fue quercetina para ambos métodos antioxidantes. R1-R8 muestran **%AA** (% actividad antioxidante) a una concentración de 0.5 mg/mL y la **CE₅₀** (concentración efectiva media) respectivamente.

Se observan para ambas pruebas que los valores máximos para DPPH es 1.389 y 2.89 mg/mL para ABTS, mientras que los valores mínimos fueron 0.001 y 0.26 mg/mL respectivamente, siendo R8 la reunión con valores más bajos para ambas pruebas y por lo tanto, la que presenta mejor perfil antioxidante.

Los resultados obtenidos de la R1 a la R8, son encontrados con un potencial perfil antioxidante, lo que supone que el extracto RSM-A puede ser catalogado en general como antioxidante.

Por otro lado, no es fácil establecer que este perfil antioxidante se deba a los mecanismos ejercidos por un grupo específico de compuestos presentes en la raíz de *Salvia mellifera*, ya que el efecto sinérgico del conjunto de metabolitos pudiera estar actuando para estabilizar o inhibir la oxidación, por lo cual el planteamiento de nuevos modelos para medir la actividad antioxidante de un extracto es necesario, así como la búsqueda y aislamiento de sus moléculas.

Se ha reportado que los compuestos con polaridades altas son los que presentan un mejor perfil antioxidante (Macías Villamizar et al 2011), y esto se puede observar en las reuniones R6, R7, y R8, quienes mostraron los valores mejor reportados para este caso y a su vez son el resultado de la integración de las fracciones más polares de RSM-A. Otro indicador que se considera en el análisis fitoquímico preliminar, es la presencia de flavonoides y taninos los cuales son compuestos reportados como buenos antioxidantes (Conde 2016; Reina et al. 2016).

Es importante mencionar que no existen publicaciones sobre la actividad antioxidante de extractos de raíz de *Salvia mellifera* por lo cual, es necesario ampliar las líneas de investigación para conocer mejor los mecanismos de acción químico-biológica que supondría la obtención de nuevos metabolitos secundarios de esta especie y sus respectivos estudios.

7.3.1. Actividad antioxidante. Método DPPH.

En la figura 24 se muestran los resultados obtenidos para la actividad antioxidante por medio del método DPPH sobre las reuniones de RSM-A.

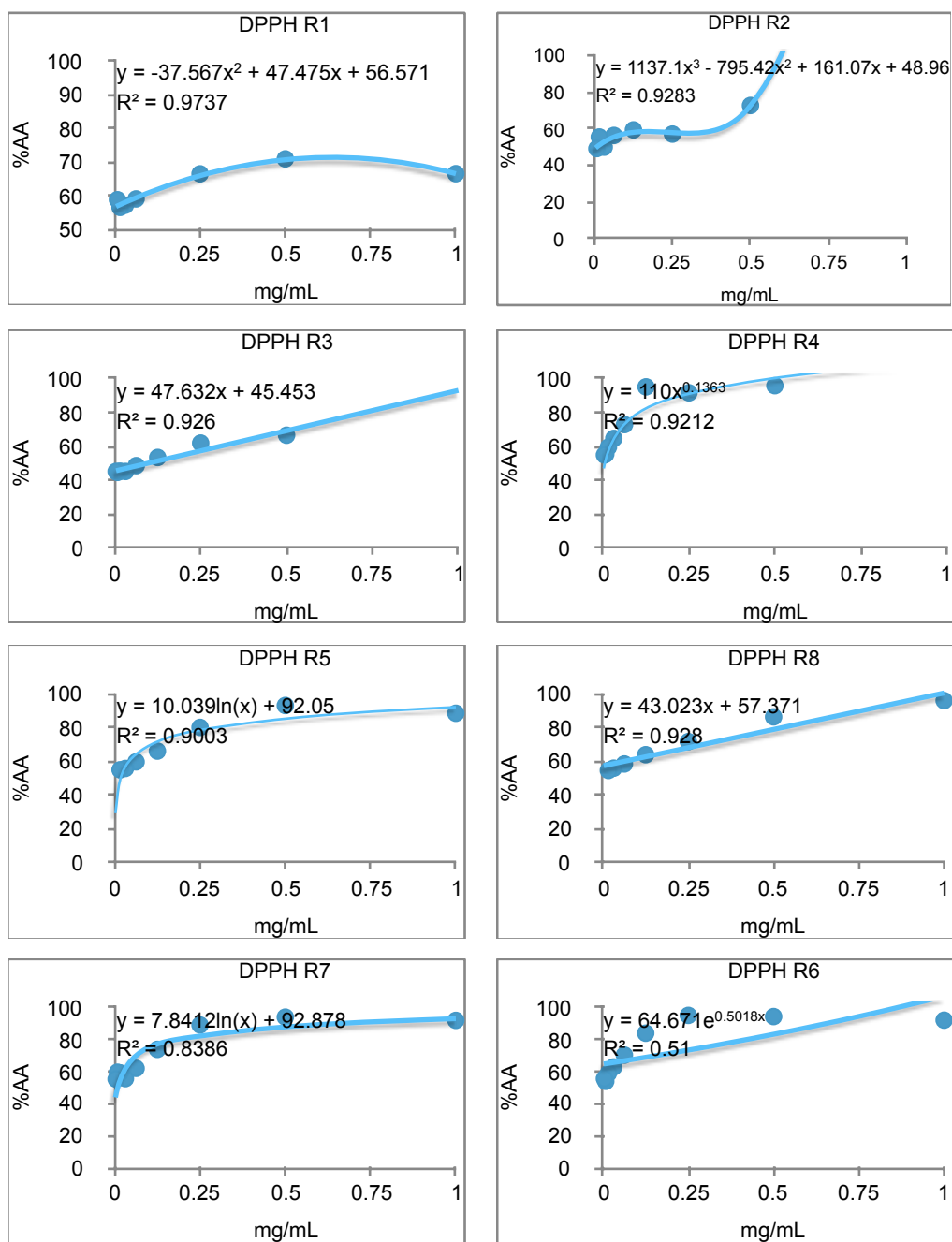


Fig. 24. Resultados obtenidos por el método DDPH expresados en %AA (porcentaje de actividad antioxidante) de cada reunión (R1-R8) para la fracción RSM-A.

7.3.2. Actividad antioxidante. Método ABTS.

En la fig. 25 se muestran los resultados obtenidos para la actividad antioxidante por medio del método DPPH sobre las reuniones de RSM-A.

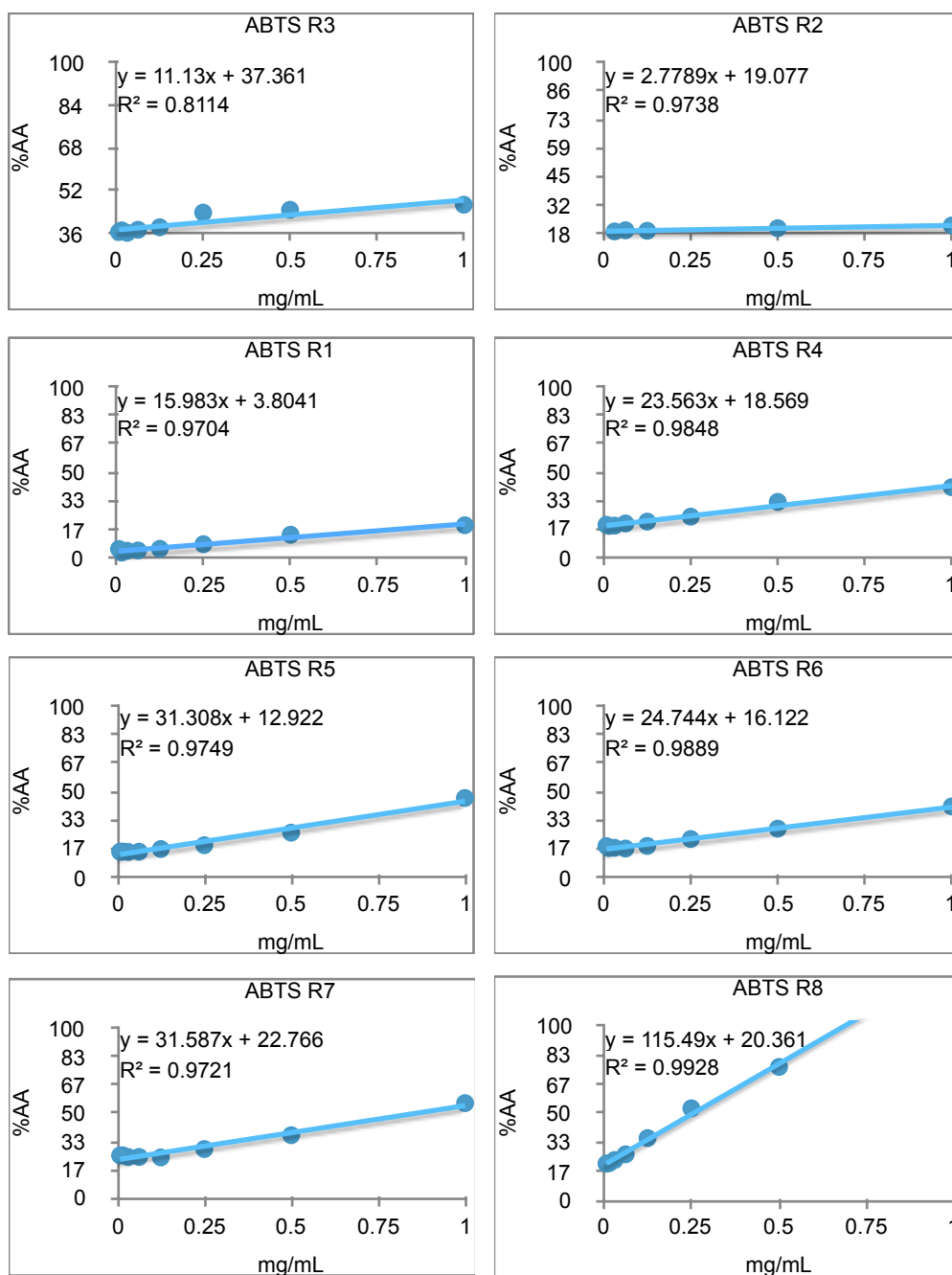


Fig. 25. Resultados obtenidos por el método ABTS expresados en %AA (porcentaje de actividad antioxidante) de cada reunión (R1-R8) para la fracción RSM-A.

7.4. Viabilidad celular MTT.

La prueba para medir la capacidad citotóxica de los extractos fue a través del método MTT, sin embargo posterior al tiempo de incubación para permeabilizar las células del cultivo celular con los extractos R5 y R6, se observó la formación de cristales, lo que causó que no fuera viable el cultivo.

Dichos cristales se habían observado anteriormente durante el proceso de purificación y aislamiento de compuestos como mayoritarios, por lo que se considera que podría tratarse de los compuestos A o B contenidos en ambas reuniones.

Tabla 7. Condiciones y resultados MTT en R5

R5 (mg/ml)	LPS	Condición	Media (%)	D.E. (%)
0	-	1	100.0	3.0
	+	2	101.5	3.1
0.033	-	3	95.1	3.6
	+	4	97.2	2.6
0.1	-	5	14.1	3.6
	+	6	14.7	2.2
0.33	-	7	8.4	0.2
	+	8	8.3	0.2
1	-	9	12.1	0.6
	+	10	11.5	0.8

LPS (lipolisacáridos), presencia de LPS (+), ausencia de LPS(-); D.E: (desviación estándar).

Tabla 8. Condiciones y resultados MTT en R6.

R6 (mg/ml)	LPS	Condición	Media (%)	D.E. (%)
0	-	1	100.0	1.9
	+	2	94.8	2.9
0.033	-	3	36.8	3.7
	+	4	29.0	2.8
0.1	-	5	10.8	0.3
	+	6	10.8	0.2
0.33	-	7	18.6	0.4
	+	8	18.2	0.4
1	-	9	37.7	0.6
	+	10	38.8	1.0

LPS (lipolisacáridos), presencia de LPS (+), ausencia de LPS(-); D.E: (desviación estándar).

En la figura 26 se observa dos fotografías tomadas después del tiempo de incubación para permeabilizar los macrófagos con R5 y R6. Los cristales que se formaron no permitieron medir correctamente la viabilidad celular, por lo que se recomienda buscar otros medios de disolución para ambos extractos, así como probar con concentraciones menores de estos.



Fig. 26. Cultivo celular RAW 264.7.

Después del tiempo de incubación para permeabilizar las células con el extracto R5 (izquierda) y R6 (derecha). Se observa en ambos casos el extracto cristalizado.

Los terpenos cryptotanshinona, tanshinona I y tanshinona IIA, extraídas son los mayores componentes del extracto de raíz de *Salvia miltiorrhiza* con significancia farmacológica, sin embargo su uso efectivo está limitado debido a la baja solubilidad y biodisponibilidad del agua. Yu y colaboradores, propusieron el método de Dispersión Solida (DS) ante esta problemática para alcanzar mejores tasas de solubilidad para dichos compuestos a través de un modelo convencional de solventes, en donde utilizaron diferentes vehículos para la separación por DS utilizando como estándar tablas convencionales comerciales el extracto. El mejoramiento de las tasas de solubilidad y la disolución de criptotanshinona, tanshinona I y tanshinona IIA se alcanzó con povidona K-30 (PVP K-30) el cual es un fuerte vehículo higroscópico soluble en agua, en alcoholes alifáticos de cadena corta y un amplio rango de solventes orgánicos (etanol, etilenglicol y glicerina, etc.) que funciona como coloide protector. También se probó el poloxamer, un copolímero (bloques de óxido de etileno y óxido de propileno) que posee propiedades termo-reversibles, es decir, que se presenta en estado líquido a temperatura ambiente, lo que facilita la administración y estado de gel a la temperatura del cuerpo y permite una mayor permanencia y la liberación prolongada de fármacos en el sitio de aplicación. Ambos vehículos mostraron mejoramiento de solubilidad a un pH de 6.8 buffer (Yu et al. 2012).

Por lo cual, la biodisponibilidad de fármacos de baja solubilidad en agua está limitada por su índice de disolución, que a su vez está determinados por la dimensión de la partícula y por lo tanto por su área

superficial específica y/o por el estado polimórfico del ingrediente activo, problemas que pueden ser superados por la reducción del tamaño de la partícula, según la Oficina Española de Patentes y Marcas en su publicación 2 109 377 (OEPM 1992). Por lo cual, métodos como el DS, es empleado para mejorar la absorción del fármaco en donde los polímeros son usados como aglutinantes y agentes para liberación modificada. Más recientemente, estos excipientes han sido usados en dispersiones sólidas para mejorar la solubilidad y de esta forma incrementar la biodisponibilidad (Bee y Rahman 2010).

En la figura 27 se muestran los valores gráficos obtenidos para medir la viabilidad celular por medio del método MTT en R5 y R6 sobre la línea celular RAW 264.7 cuando esta fue tratada con LPS para inducir un posible efecto antiinflamatorio. Los valores obtenidos no son representativos para R5 debido posiblemente a la insolubilidad de los extractos. Es recomendable ajustar el método para mejorar la permeabilidad del extracto en las células; sin embargo, R6 a la concentración de 0.033 mg/mL se exhibe menos citotóxica, lo cual tiene sentido debido a que el extracto fue mejor redissuelto en DMSO que R5. Sería importante ajustar la concentración de R6 para establecer un posible perfil antiinflamatorio viable.

7.5. Capacidad antiinflamatoria. Prueba con LPS.

El tratamiento con LPS se realizó con R5 y adicionalmente con R6 debido a su similitud polar y sus porcentajes de actividad antioxidante. Los resultados de la actividad antiinflamatoria usando el modelo de LPS en macrófagos se observan en la figura 27.

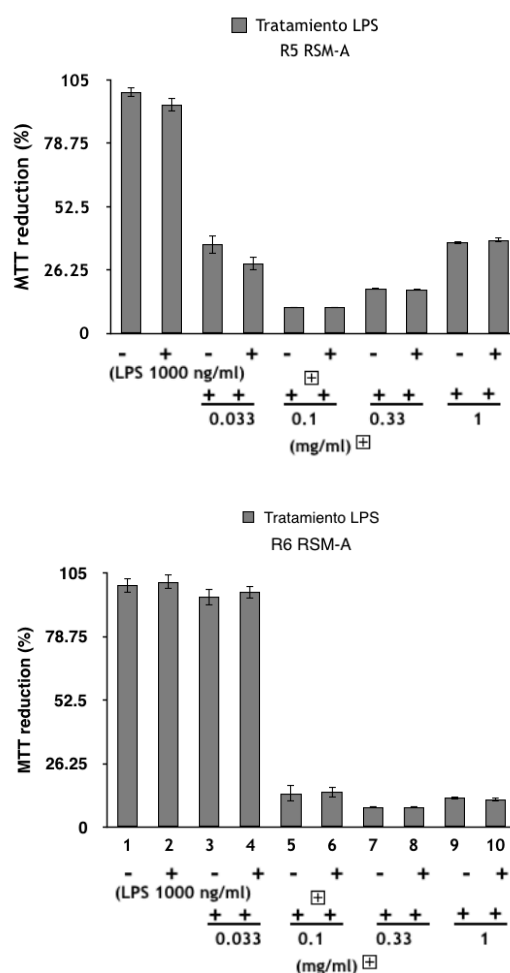


Fig. 27. Viabilidad celular de macrófagos (RAW 264.7) por el método MTT

8. CONCLUSIONES

Las propiedades físico-químicas del extracto de raíz de *Salvia mellifera* RSM-A, demostraron poseer un perfil antioxidante, siendo las reuniones más polares (R6, R7, R8) las de mejor respuesta con el método DPPH.

A continuación se enumeran las siguientes conclusiones:

1. Se encontró cualitativamente la presencia de flavonoides en las fracciones de raíz AcOEt y n-Hexano y carbohidratos en la fracción AcOEt por medio de las pruebas colorimétricas.
2. La cromatografía de capa fina reveló la presencia de compuestos del tipo terpeno para ambas fracciones, siendo utilizada la fracción RSM-A (AcOEt) para las pruebas químico-biológicas
3. De las 8 reuniones obtenidas de RSM-A, R5 se aisló y caracterizó la molécula criptotanshinona por medio del método de RMN
4. En la actividad antioxidante por medio de los métodos DPPH y ABTS muestran valores por debajo de los establecidos en el estándar quercetina siendo estos de 0.003 mg/mL y 100 mg/mL para ambos métodos respectivamente
5. Para DPPH R6, R7 y R8 reportan valores en CE_{50} iguales y/o muy cercanos al estándar, siendo estos a su vez, los valores más bajos a comparación del resto de las reuniones
6. Para ABTS R7 y R8 muestran valores en CE_{50} por debajo de 1 mg/mL

7. Para ambas pruebas los valores máximos para DPPH es 1.389 y 2.89 mg/mL para ABTS, mientras que los valores mínimos fueron 0.001 y 0.26 mg/mL respectivamente, siendo R8 la reunión con valores más bajos para ambas pruebas y por lo tanto, la que presenta mejor perfil antioxidante.
8. Los resultados obtenidos de las reuniones R1 a la R8, indican que el extracto RSM-A presenta propiedades antioxidantes. Es posible que esta respuesta se deba o este asociada a la presencia de compuestos como flavonoides y taninos, y/o al efecto sinérgico del conjunto de metabolitos que pudieran estar actuando para estabilizar o inhibir la oxidación.
9. La formación de cristales en los cultivos celulares provocó que no fuera posible la medición de viabilidad celular. Sin embargo, esta información sugiere la búsqueda de métodos más adecuados para hacer efectiva la solubilidad de los extractos de la raíz de *S. mellifera*.
10. Se recomienda ajustar la concentración de R6 para establecer un posible perfil antiinflamatorio viable, así como la búsqueda de nuevas moléculas bioactivas de interés farmacológico y sus posibles efectos terapéuticos.

9. BIBLIOGRAFÍA

1.
Adams, J.D. & Garcia, C. (2005a). Palliative care among Chumash people. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2, 143-147.
2.
Adams, J.D. & Garcia, C. (2005b). Spirit, mind and body in Chumash healing. *Evidence-based complementary and Alternative Medicine*, 2, 459-463.
3.
Adams, J.D. & Garcia, C. (2006). Women's health among the Chumash. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 3, 125-131.
4.
Aldapa-Vega, G., Pastelín-Palacios, R., Isibasi, A., Moreno-Eutimio, M. & López-Macías, C. (2016). Modulation of immune response by bacterial lipopolysaccharides. *Revista alergia Mexico (Tecamachalco, Puebla, Mexico: 1993)*, 63, 293.
5.
Anderson, E. & Anderson, B.R. (1954). Introgression of *Salvia apiana* and *Salvia mellifera*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 41, 329-338.
6.
Avello, M. & Suwalsky, M. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea (Concepción)*, 161-172.
7.
Bae, K. (2000). *The Medicinal Plants of Korea*; Kyo. Hak Publishing Co Ltd: Seoul, Korea.

8.

Bee, T. & Rahman, M. (2010). Estrategias de solubilización. Uso de la tecnología de polímeros para mejorar la biodisponibilidad Revisión de las Tecnologías Principales. In: *Pharmaceutical Technology*.

9.

Bonifazi, E.L. (2012). Síntesis de naftoquinonas relacionadas a lapachol y β -lapachona. Evaluación como agentes antitumorales. In: *Facultad de Ciencias Exactas y Naturales*. Universidad de Buenos Aires.

10.

Brand-Williams, W., Cuvelier, M.-E. & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28, 25-30.

11.

Burke, R., Diamondstone, B., Velapoldi, R. & Menis, O. (1974). Mechanisms of the Liebermann-Burchard and Zak color reactions for cholesterol. *Clinical chemistry*, 20, 794-801.

12.

CONDE, M.A. (2016). Uso potencial de taninos en recubrimientos comestibles: propiedades físicas y antioxidantes.

13.

Cornejo-Tenorio, G. & Ibarra-Manríquez, G. (2011). Diversidad y distribución del género *Salvia* (Lamiaceae) en Michoacán, México. *Revista mexicana de biodiversidad*, 82, 1279-1296.

14.

Dat, N.T., Jin, X., Lee, J.-H., Lee, D., Hong, Y.-S., Lee, K. *et al.* (2007). Abietane diterpenes from *Salvia miltiorrhiza* inhibit the activation of hypoxia-inducible factor-1. *Journal of natural products*, 70, 1093-1097.

15.

de la Quintana, P. (1983). *Historia de la Inflamacion*. Real Academia Nac. Medicina.

16.

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

17.

Dirzo, R. (1985). Metabolitos secundarios en las plantas. *Ciencias UNAM*, 36, 137-145.

18.

Domínguez, R., Pagano, M., Marschoff, E., González, S., Repetto, M. & Serra, J. (2014). Enfermedad de Alzheimer y deterioro cognitivo asociado a la diabetes mellitus de tipo 2: relaciones e hipótesis. *Neurología*, 29, 567-572.

19.

Duke, J.A. & Ayensu, E.S. (1985). *Medicinal plants of China*. Reference Publications.

20.

Epling, C. (1939). revision of Salvia, subgenus Calosphace.

21.

Epling, C. (1940). The Labiatae of the Yucatan Peninsula.

22.

Epling, C. (1941). Supplementary notes on American Labiatae-II. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 68, 552-568.

23.

Epling, C. (1947). Natural hybridization of *Salvia apiana* and *S. mellifera*. *Evolution*, 69-78.

24.

Epling, C. & Lewis, H. (1942). The centers of distribution of the chaparral and coastal sage associations. *The American Midland Naturalist*, 27, 445-462.

25.

Fridovich, I. (1978). The biology of oxygen radicals. *Science*, 201, 875-880.

26.

García Bacallao, L., Vicente García Gómez, L., Rojo Domínguez, D.M. & Sánchez García, E. (2001). Plantas con propiedades antioxidantes. *Revista cubana de investigaciones biomédicas*, 20, 231-235.

27.

Garcia, D.E. (2004). Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. *Pastos y Forrajes*, 27, 1-10.

28.

González, A.G., Abad, T., Jiménez, I.A., Ravelo, A.G., Aguiar, J.G.L.Z., San Andrés, L. *et al.* (1989). A first study of antibacterial activity of diterpenes

isolated from some *Salvia* species (Lamiaceae). *Biochemical Systematics and ecology*, 17, 293-296.

29.

González, A.G., Aguiar, Z.E., Grillo, T.A. & Luis, J.G. (1992). Diterpenes and diterpene quinones from the roots of *Salvia apiana*. *Phytochemistry*, 31, 1691-1695.

30.

Gonzalez, A.G., Aguiar, Z.E., Luis, J.G., Ravelo, A.G. & Domínguez, X.A. (1989). Minor quinone methide diterpenoids from the roots of *Salvia texana*. *Journal of Natural Products*, 52, 1231-1236.

31.

González, A.G., Andrés, L.D., Ravelo, A.G., Luis, J.G., Bazzocchi, I.L. & Wst, J. (1990). Terpenoids from *Salvia mellifera*. *Phytochemistry*, 29, 1691-1693.

32.

González, A.G., Andrés, L.D., Ravelo, A.G., Luis, J.G., Bazzocchi, I.L. & Wst, J. (1990). Terpenoids from *Salvia mellifera*. *Phytochemistry*, 29, 1691-1693.

33.

González, A.G., Andrés, L.S., Luis, J.G., Brito, I. & Rodríguez, M.L. (1991). Diterpenes from *Salvia mellifera*. *Phytochemistry*, 30, 4067-4070.

34.

González, A.G., Rodríguez, C.M. & Luis, J.G. (1987). Diterpenes from the flowers of *Salvia canariensis*. *Phytochemistry*, 26, 1471-1474.

35.

Grant, K.A. & Grant, V. (1964). Mechanical isolation of *Salvia apiana* and *Salvia mellifera* (Labiatae). *Evolution*, 196-212.

36.

Harley, R.M., Atkins, S., Budantsev, A.L., Cantino, P.D., Conn, B.J., Grayer, R. *et al.* (2004). Labiatae. In: *Flowering Plants· Dicotyledons*. Springer, pp. 167-275.

37.

Heinrich, M., Rimpler, H. & Barrera, N.A. (1992). Indigenous phytotherapy of gastrointestinal disorders in a lowland Mixe community (Oaxaca, Mexico): Ethnopharmacologic evaluation. *Journal of Ethnopharmacology*, 36, 63-80.

38.

Horton, J.S. & Kraebel, C.J. (1955). Development of vegetation after fire in the chamise chaparral of southern California. *Ecology*, 36, 244-262.

39.

Huang, D., Ou, B. & Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53, 1841-1856.

40.

Jenks, A.A., Walker, J.B. & Kim, S.-C. (2013). Phylogeny of New World *Salvia* subgenus *Calosphace* (Lamiaceae) based on cpDNA (psbA-trnH) and nrDNA (ITS) sequence data. *Journal of Plant Research*, 126, 483-496.

41.

Jin Jeon, S., Kun Ho Son, Yeong Shik Kim, Yong Hwan Choi & Kim, H.P. (2008). Inhibition of Prostaglandin and Nitric Oxide Production in

Lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 Cells by Tanshinones from the Roots of *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Arch Pharm Res*, 31, 758-763.

42.

Keeley, J. (1986). Seed germination patterns of *Salvia mellifera* in fire-prone environments. *Oecologia*, 71, 1-5.

43.

Kinucan, E.S. (1965). Deer utilization of postfire chaparral shrubs and fire history of the San Gabriel Mountains. Los Angeles, CA: California State College, Los Angeles. 61 p. Thesis.[11163].

44.

Lee, D.-S. & Hong, S.-D. (1998). Inhibition of DNA topoisomerase I by cryptotanshinone from *Salvia miltiorrhiza*. *Journal of microbiology and biotechnology*, 8, 89-91.

45.

Lee, D.-S., Lee, S.-H., Kwon, G.-S., LEE, H.-K., WOO, J.-H., KIM, J.-G. *et al.* (1999). Inhibition of DNA topoisomerase I by dihydrotanshinone I, components of a medicinal herb *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 63, 1370-1373.

46.

Luis, J.G. & Andres, L.S. (1999). An eremophylane-type sesquiterpene and diterpenes from roots of *Salvia mellifera*. *Natural Product Letters*, 14, 25-30.

47.

Luis, J.G. & Andrés, L.S. (1993). C-16 Hydrocylated abietane diterpenes from *Salvia mellifera*. *Phytochemistry*, 33, 635-638.

48.

Luis, J.G. & San Andrés, L. (1993). C-16 hydroxylated abietane diterpenes from *Salvia mellifera*. *Phytochemistry*, 33, 635-638.

49.

Macías Villamizar, V.c.E., Ericsson David Coy Barrera & Suárez, L.s.E.C. (2011). Análisis fitoquímico preliminar y actividad antioxidante, antiinflamatoria y antiproliferativa del extracto etanólico de corteza de *Zanthoxylum fagara* (L.) Sarg. (Rutaceae). *Rev Cubana Plant Med*, 16, 43-53.

50.

Martínez-Gordillo, M., Fragoso-Martínez, I., del Rosario García-Peña, M. & Montiel, O. (2013). Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo. *Revista mexicana de biodiversidad*, 84, 30-86.

51.

McCormack, K. (1994). Non-steroidal anti-inflammatory drugs and spinal nociceptive processing. *Pain*, 59, 9-43.

52.

Montes-Belmont, R. (2009). Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. *Revista mexicana de micología*, 29, 73-82.

53.

Moore, M. (2003). Medicinal plants of the mountain west. UNM Press.

54.

Moujir, L., Gutiérrez-Navarro, Á.M., Andrés, L.S. & Luis, J.G. (1993). Structure-Antimicrobial activity relationships of abietane diterpenes from *Salvia* species. *Phytochemistry*, 34, 1493-1495.

55.

Moujir, L., Gutiérrez-Navarro, A.M., San Andrés, L. & Luis, J.G. (1996). Bioactive diterpenoids isolated from *Salvia mellifera*. *Phytotherapy Research*, 10, 172-174.

56.

Muller, C.H. (1965). Inhibitory terpenes volatilized from *Salvia* shrubs. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 38-45.

57.

Munz, P.A. & Keck, D.D. (1973). A California flora, with supplement by PA Munz. Berkeley. CA: University of California Press.

58.

OEPM (1992). Proceso para la preparación de una dispersión sólida. In: *Traducción de patente europea* (ed. marcas, Oedpy) Madrid España.

59.

Raskin, I. (1992). Role of salicylic acid in plants. *Annual review of plant biology*, 43, 439-463.

60.

Ratcliffe, P.J. (2003). From Erythropoietin to Oxygen: Hypoxia-Inducible Factor Hydroxylases and the Hypoxia Signal Pathway. *Blood Purification*, 20, 445-450.

61.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26, 1231-1237.

62.

Reddy, B.S., Wang, C., Samaha, H., Lubet, R., Steele, V.E., Kelloff, G.J. *et al.* (1997). Chemoprevention of colon carcinogenesis by dietary perillyl alcohol. *Cancer Research*, 57, 420-425.

63.

Reina, F.D., Roche, L.A., Bianchi, M.A., Languasco, J.M. & Della Rocca, P. (2016). Análisis químico de las especias: tomillo y salvia. *Proyecciones*, 89.

64.

Richardson, P. (1992). The chemistry of the Labiatae: an introduction and overview. *Advances in Labiatae Science. Kew: Royal Botanic Gardens*, 291-297.

65.

Rivera-Ordóñez, A. (2006). AINES: Su mecanismo de acción en el sistema nervioso central. *Revista Mexicana de Anestesiología*, 29, 36-40.

66.

Salvemini, D., Settle, S., Masferrer, J., Seibert, K., Currie, M. & Needleman, P. (1995). Regulation of prostaglandin production by nitric oxide; an in vivo analysis. *British journal of pharmacology*, 114, 1171-1178.

67.

Sepúlveda-Jiménez, G., Porta-Ducoing, H. & Rocha-Sosa, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21, 355-362.

68.

Sepúlveda-Jiménez, G., Porta, H. & Ducoing, M.R. (2003). Sosa, 2003. La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21, 355-363.

69.

Sharpe, A.G. (1996). *Química inorgánica*. Reverté.

70.

Strasburger, E., Noll, F., Schenck, H. & Schimper, A. (1994). Fisiología del metabolismo material y energético. *Omega*, 252, 320.

71.

System, I.T.I. (2010). Integrated taxonomic information system on-line database. ITIS Partnership, T. Orrell, Acting Director, c/o Smithsonian Institution Washington, DC.

72.

Taiz, L. & Zeiger, E. (2004). Metabólitos secundários e defesa vegetal. *Fisiologia Vegetal 3ªed*, 309-334.

73.

Taylor, S. & Calvin, M. (1987). Hydrocarbons from plants: biosynthesis and utilization. *Comments Agric. & Food. Chem*, 1, 1-26.

74.

Timbrook, J. (1990). Ethnobotany of Chumash indians, California, based on collections by John P. Harrington. *Economic Botany*, 44, 236-253.

75.

Vázquez, F.L.T. & Ureña, Á.G. (1985). Reacciones del oxígeno atómico triplete con compuestos orgánicos: estudio cinético por quimiluminiscencia con reactor de flujo rápido de gases. Universidad Complutense.

76.

Venero Gutiérrez, J.R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Invest Biomed*, 31, 126-133.

77.

Walker, J.B., Sytsma, K.J., Treutlein, J. & Wink, M. (2004). *Salvia* (Lamiaceae) is not monophyletic: implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of *Salvia* and tribe *Mentheae*. *American Journal of Botany*, 91, 1115-1125.

78.

Walker, P.L. & Hudson, T. (1993). Chumash Healing: Changing Health and Medical Practices in an American Indian Society. Malki Museum Press.

79.

Willet, W. & Eat, D. (2001). be healthy—the harvard medical school guide to healthy eating Simon and Schuster. *New York*.

80.

Yang, M., Liu, A., Guan, S., Sun, J., Xu, M. & Guo, D. (2006). Characterization of tanshinones in the roots of *Salvia miltiorrhiza* (Dan-shen) by high-

performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, 20, 1266-1280.

81.

Yu, H., Subedi, R.K., Nepal, P.R., Kim, Y.G. & Choi, H.-K. (2012). Enhancement of solubility and dissolution rate of cryptotanshinone, tanshinone I and tanshinone IIA extracted from *Salvia miltiorrhiza*. *Archives of pharmacal research*, 35, 1457-1464.

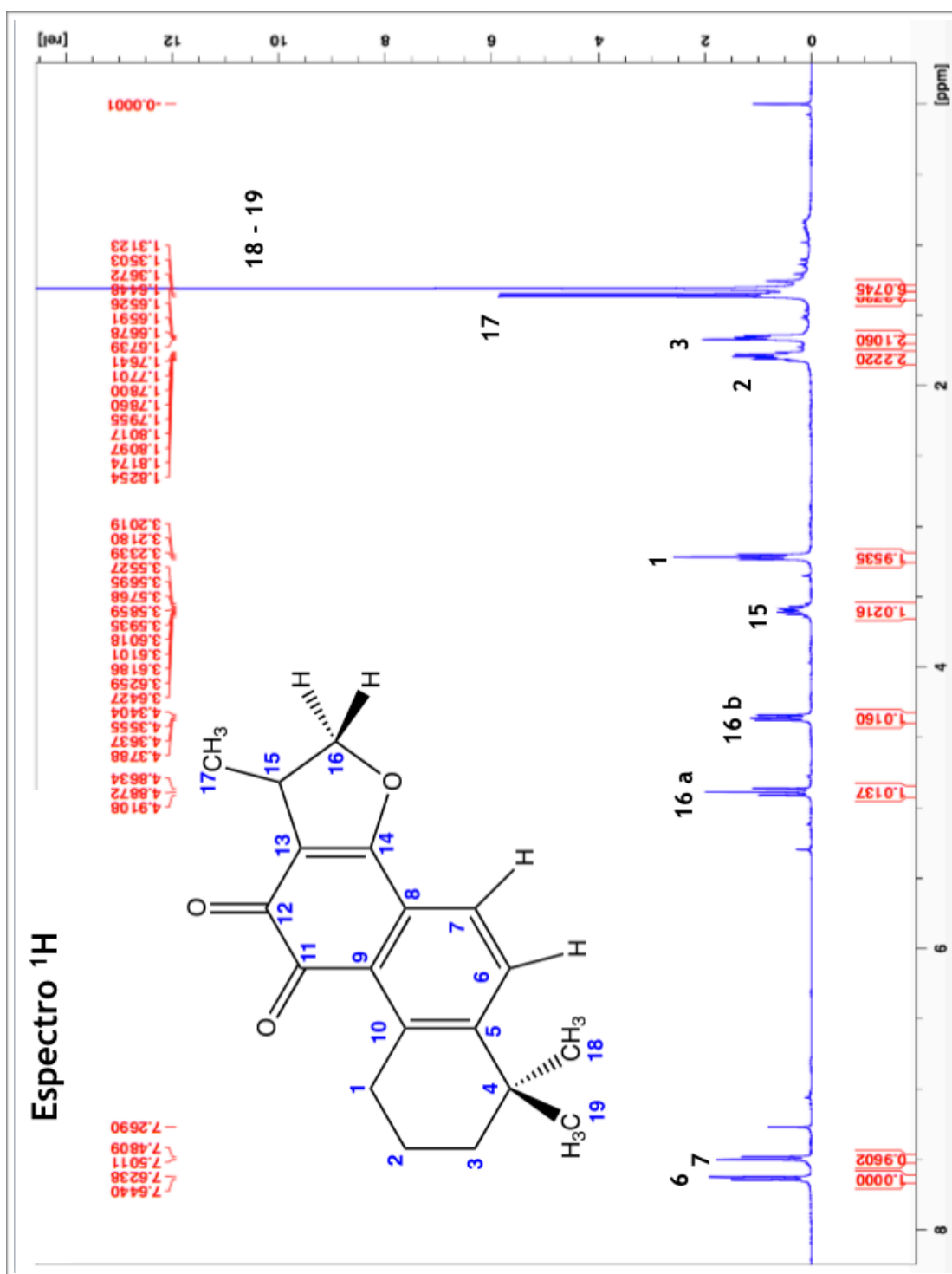
82.

Zulueta, A., Esteve, M.J. & Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114, 310-316.

10. ANEXOS

Anexo 1.

Espectro de RMN para el compuesto A aislados e RSM-A.



PROTÓN	δ_H^a	PROTÓN	δ_H^a
H-1	3.23 (m, 2H, $J_1 = 6.36$ Hz)	H-16 a	4.88 (1H, t, $J_1 = 9.44$ Hz; $J_2 = 6.04$ Hz)
H-2	1.79 (m, 2H)	H-16 b	4.36 (1H, dd, $J_1 = 9.32$ Hz; $J_2 = 6.04$ Hz)
H-3	1.66 (m, 2H)	H-17	1.35 (d, 3H)
H-6	7.62 (d, 1H, $J = 8.08$ Hz)	H-18	1.31 (3H, s)
H-7	7.48 (d, 1H, $J = 8.08$ Hz)	H-19	1.31 (3H, s)
H-15	3.59 (m, 1H, $J_1 = 6.76$ Hz; $J_2 = 9.32$)		

Anexo 2.

Evaluación química y biológica.

