

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

Maestría en Ciencias Químicas



Tesis

“Evaluación de la actividad antioxidante y antitumoral de extractos obtenidos de la parte aérea de *Salvia pachyphylla* Munz ssp. *meridionalis* Taylor & Ayers”

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias Químicas

Presenta

Gabriela María Almada Taylor

Tijuana, B. C.

Abril de 2009

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California por permitirme cursar esta maestría.

Al Dr. Iván Córdova Guerrero director de este trabajo de tesis por su dedicación y colaboración para la culminación de esta tesis.

Al Dr. José Delgadillo Rodríguez y al Dr. José Guillermo Rodríguez Ventura por sus valiosas aportaciones para el enriquecimiento de este trabajo.

A todos los profesores de la Maestría en Ciencias Químicas que de alguna u otra manera contribuyeron en mi formación.

A la M. C. Alma Elia Leal Orozco por su gran disposición para la realización de los ensayos experimentales.

A mis compañeros del Laboratorio de Productos Naturales por su amistad y momentos de convivencia los cuales hicieron más agradable el desarrollo de esta tesis.

A mi esposo por su paciencia e incalculable apoyo.
A mi hijo por su contagiosa alegría durante la redacción de esta tesis.

ÍNDICE

Introducción	1
Aspectos generales de la medicina tradicional	1
Justificación	4
Objetivo generales	5
Objetivos particulares	5
Metas	6
CAPÍTULO I. Estudio fitoquímico de <i>Salvia pachyphylla</i>	7
1.1 Antecedentes	7
1.1.1 Descripción botánica de la especie	7
1.1.2 Usos	9
1.1.3 Estudios fitoquímicos y biológicos en especies de <i>Salvia</i>	11
1.2 Desarrollo experimental	21
1.2.1 Colecta e identificación taxonómica de la planta	21
1.2.2 Obtención de los extractos crudos de la parte aérea de <i>Salvia pachyphylla</i>	22
1.2.3 Estudio de identificación preliminar de metabolitos secundarios de los extractos de <i>Salvia pachyphylla</i> mediante cromatografía de capa fina	27
1.3 Resultados y discusión	28
1.3.1 Apariencia y cantidad de los extractos obtenidos	28
1.3.2 Identificación de metabolitos secundarios	30

1.3.3 Espectros infrarrojos	30
CAPÍTULO II. Actividad antioxidante de <i>Salvia pachyphylla</i>	32
2.1 Antecedentes	32
2.1.1 El proceso de oxidación en los seres vivos y el papel de los Antioxidantes	32
2.1.2 Los compuestos fenoles como parte de los antioxidantes	35
2.1.3 El uso del radical libre difenilpicrilhidrazilo (DPPH) para estimar la actividad antioxidante	36
2.1.4 Técnicas empleadas para el estudio de la actividad antioxidante	40
2.2 Desarrollo experimental	42
2.2.1 Estudio de decoloración oxidativa de β -caroteno	42
2.2.2 Determinación de actividad antiradicalaria	44
2.2.3 Cuantificación de compuestos fenólicos	45
2.3 Resultados y discusión	46
CAPÍTULO III. Actividad antitumoral de <i>Salvia pachyphylla</i>	55
3.1 Antecedentes	55
3.1.1 El proceso de cáncer	55
3.1.2 Estudios de citotoxicidad en especies de <i>Salvia</i>	57
3.1.3 Técnica empleada para el estudio de la actividad antitumoral	58
3.2 Desarrollo experimental	59
3.2.1 Determinación de la actividad antitumoral	59
3.3 Resultados y discusión	62

Conclusiones	67
Referencias bibliográficas	69
Apéndice. Espectros infrarrojos de extractos de <i>Salvia pachyphylla</i>	82

Lista de figuras

1. Planta y flor de <i>Salvia pachyphylla</i>	9
2. Estructura de ácido salvianólico	14
3. Estructura de ácido rosmarínico	14
4. Estructura de ácido cafeico	14
5. Estructura de ácido protocatechuico	15
6. Estructura de ácido danshensu	15
7. Estructura de ácido ursólico	16
8. Estructura de rosmanol	16
9. Estructura de carnosol	17
10. Estructura de 16-hidroxycarnosol	17
11. Estructura de abieta-8,11,13-trieno	17
12. Estructura de rosmadial	18
13. Estructura de ácido oleanólico	18
14. Estructura de pachyphylona	18
15. Estructura de 20-deoxocarnosol	19
16. Estructura de 11-hidroxi-20(8)-epoxi-9,13-abietadien-12-ona	19

17. Estructura de 11,12-dioxo-8,13-abietadieno	19
18. Estructura de 8 β -hidroxi-9,13-abietadien-12-ona	19
19. Estructura de 5,6-didehidro-o-metil-sugiol	20
20. Estructura de ácido carnósico	20
21. Estructura de 7-metoxirosmanol	20
22. Estructura de isorosmanol	20
23. Parte aérea de <i>Salvia pachyphylla</i> secada y triturada	23
24. Sistema de extracción Soxhlet	24
25. Eliminación de solvente a presión reducida mediante rotaevaporador	24
26. Liofilización de los extractos obtenidos	25
27. Obtención del extracto acuoso	26
28. Extractos obtenidos de <i>Salvia pachyphylla</i>	27
29. Estructura de difenilpicrilhidrazilo (radical libre)	37
30. Estructura de difenilpicrilhidrazilo (no radical)	37
31. Inhibición de la decoloración de β -caroteno en un sistema que contiene extractos de <i>Salvia pachyphylla</i>	49
32. Porcentajes de actividad antioxidante determinada con el método de	

β -caroteno/ácido linoleico de extractos obtenidos de <i>Salvia pachyphylla</i>	50
33. Porcentaje de inhibición del radical libre DPPH en presencia de los extractos evaluados frente a diferentes concentraciones	51
34. Curva de calibración utilizando ácido gálico como estándar a 750 nm	53
35. Esquema del experimento de citotoxicidad	62
36. Sulforrodamina B	62
37. Ensayo de citotoxicidad en línea celular de pulmón	63
38. Ensayo de citotoxicidad en línea celular de colon	64
39. Ensayo de citotoxicidad en línea celular de mama	64
40. Ensayo de citotoxicidad en línea celular de mama (hormona dependiente)	65
41. Ensayo de citotoxicidad en línea celular de cérvix	65

Lista de tablas

1. Cantidad obtenida de cada extracto generado	29
2. Resultados del estudio fitoquímico preliminar de extractos obtenidos de <i>Salvia pachyphylla</i>	30
3. Valores de absorbancia en la inhibición de la decoloración de β -caroteno en contacto con los extractos de <i>Salvia pachyphylla</i>	48
4. Valores de porcentaje de máxima actividad antioxidante (AOX) de los extractos de <i>Salvia pachyphylla</i> y de la referencia	49
5. Actividad de inhibición del radical libre DPPH de los extractos evaluados	52
6. Contenido de compuestos fenólicos en los extractos más polares de <i>Salvia pachyphylla</i>	53
7. Valores de inhibición del crecimiento frente a las distintas líneas celulares evaluadas	66

La salvia, junto con el romero, el espliego y el tomillo ha formado parte tradicionalmente de lo que se conoce como “El vinagre de los cuatro ladrones”.

Hubo una vez una ciudad que fue asolada por una gran peste. Los que enfermaban no esperaban salvarse. Los que estaban sanos, huían dejando todo y cundían el desorden y el caos. Nadie estaba a salvo del contagio excepto los cuatro ladrones, que se paseaban impunemente entre los apestados, saqueando las casas abandonadas.

Se cuenta que los cuatro ladrones son apresados en Toulouse y la condición para ser dejados en libertad fue la confesión del secreto por el cual ellos no se enfermaban a causa del contagio. Ese secreto era macerar las cuatro plantas mencionadas en vinagre y frotarse luego todo el cuerpo.

Esta historia viene a demostrar la propiedad principal de todas las salvias: su valor vulnerario y bactericida.

INTRODUCCIÓN

Aspectos generales de las plantas en la medicina tradicional

Las plantas siempre han sido fuente de alimento, vestido, material de construcción, energía y medicina para el género humano; es por lo tanto natural que el hombre desde las épocas primitivas comenzara a identificarlas y a seleccionarlas de acuerdo con sus necesidades, haciendo énfasis en aquellas que afectan la salud, ya sea en forma positiva o negativa. En América, mucho antes de la llegada de los europeos, ya se tenía un amplio conocimiento del empleo de plantas desde el punto de vista artesanal, alimenticio y medicinal (Romo, 2006).

El uso de la medicina tradicional es ancestral y data desde que el hombre tuvo conciencia de que podía emplear los recursos que le rodeaban para curar sus enfermedades. Dicha información ha sido transmitida de generación en generación en forma oral o a través de códices y otros escritos. México, al igual que otros países del mundo, tiene una información muy valiosa al respecto, la cual ha sido de sumo interés y ha servido de base en la búsqueda y producción de nuevos medicamentos.

Las plantas medicinales son y han sido fundamentales para las comunidades nativas de todos los países en desarrollo en la terapia de diversas enfermedades. Además, los productos naturales que derivan de estas especies terrestres, son cada vez más demandados por la población mundial, al grado que han sustituido a muchos de los medicamentos sintéticos que se conocen en el mercado.

El uso medicinal de las plantas (fitoterapia) nunca ha dejado de tener vigencia. Casi todas las culturas del mundo usan muchas de sus plantas locales como medicinas de una u otra forma. Muchos de los fármacos más importantes, con efecto terapéutico, provienen incluso hoy en día de la naturaleza o se sintetizan por el hombre imitando productos naturales. Así, una considerable cantidad de estos productos se han hallado e incorporado al arsenal terapéutico siguiendo las pistas dejadas por diversas culturas a través de su medicina popular (Córdova, 2006)

Sin embargo, a pesar del avance y el desarrollo tecnológico logrado actualmente en la producción de fármacos, el problema de la salud de la población mundial sigue sin resolverse, obligando a muchas poblaciones del planeta a resolver dicho problema mediante el empleo de plantas, animales y sustancias que tradicionalmente han sido empleadas en su medicina tradicional.

En las plantas tenemos, en principio, una fuente potencialmente inextinguible de productos naturales que pueden ayudarnos en el control y tratamiento de las enfermedades. A este respecto desde hace más de tres décadas Farnsworth y Bingel (1977) llegaron a las siguientes conclusiones:

1. Las plantas superiores son una fuente aun inexplorada y descuidada de fármacos potenciales para uso por parte del hombre.
2. Las plantas superiores son, de hecho, una importante fuente de fármacos usados actualmente por el hombre.

3. Las financiaciones gubernamentales y privadas a programas diseñados para descubrir nuevos fármacos de plantas superiores en base a su importancia histórica y actual, son insignificantes.
4. Los pocos programas de importancia que han sido organizados para estudiar plantas superiores como fuentes de nuevos fármacos, han sido calificados como fallidos, debido probablemente a defectos de respaldo a los mismos en algunos de los siguientes aspectos: a) liderazgo experimentado; b) personal con experiencia y bien entrenado; c) fondos adecuados por periodos de tiempo suficientes como para esperar que el programa rinda nuevos fármacos.
5. Aquellos pocos programas que han llegado con éxito a aportar fármacos comerciales derivados de plantas superiores, son generalmente considerados de muy alto costo. Sin embargo, un estudio cuidadoso de la productividad de algunos de esos programas, muestra claramente que son tanto o más productivos que los programas puramente sintéticos comparables.
6. Para que los programas encaminados al descubrimiento de nuevos fármacos a partir de plantas superiores tengan éxito, las firmas comerciales deben estar interesados en ellos y tener la voluntad de mantenerlos y participar en los mismos.

Considerando lo anterior, nos estamos aproximando a una nueva era en el desarrollo de fármacos a partir de plantas superiores y, por supuesto, de fuentes naturales en general, que constituyen una reserva aún inexplorada en espera de ser investigada. Para muchas clases de fármacos usados ampliamente en humanos, la síntesis de nuevas estructuras no ha producido entidades con nuevos mecanismos de

acción, así como tampoco especialidades con menores efectos secundarios o con actividad mejorada sobre fármacos ya disponibles. En este sentido parece que se ha llegado a un callejón sin salida y es así nuestro sentimiento que aquellos grupos preocupados en el desarrollo de nuevos fármacos, deberían iniciar programas importantes para la exploración en plantas superiores de estructuras biológicamente activas que, hasta ahora, han eludido la imaginación de los químicos sintéticos.

Justificación

La contigüidad con dos grandes masas oceánicas, la ubicación en la confluencia de dos grandes regiones geográficas, neoártica y neotropical, así como la variedad y complejidad de su topografía confieren al territorio mexicano una extraordinaria diversidad biológica y de ecosistemas (Delgadillo, 1997).

Por su diversidad biológica, a México se le reconoce como uno de los 7 países “megadiversos” del planeta (Flores y Gerez, 1994) y ocupa el cuarto lugar con respecto al número de especies de plantas. Además, con apenas 1.4 % de la superficie del planeta, posee cerca del 10 % del total de especies conocidas en el mundo y se considera que el porcentaje de endemismo oscila entre 44 y 63 % (Secretaría del Medio Ambiente, 1996).

México destaca por su riqueza florística y amplio conocimiento de las plantas medicinales que desde la época precortesiana conservan los mexicanos, principalmente en las comunidades rurales, por lo que existe actualmente un incremento por el interés en el estudio de las plantas mexicanas que representan un

potencial farmacológico. Se tiene registro de que comunidades indígenas del Norte de Baja California utilizan diversas especies de plantas para usos terapéuticos, tal es el caso de *Salvia pachyphylla* Munz ssp. *meridionalis* Taylor & Ayers (Lamiaceae) en afecciones respiratorias (Cortes, 1987).

Este proyecto surge del interés de desarrollar un estudio biodirigido de extractos generados de las partes aéreas de la especie *S. pachyphylla* ssp. *meridionalis*, con el propósito de evaluar su acción medicinal y su posible actividad antioxidante. Esta subespecie se distribuye en los bosques de coníferas de las sierras de Juárez y San Pedro Mártir.

Objetivo general

Se ha planteado como objetivo general la determinación de la actividad antioxidante y antitumoral de *Salvia pachyphylla* mediante técnicas fitoquímicas y espectrofotométricas.

Objetivos particulares

- Determinar el potencial antioxidante de la parte aérea de *Salvia pachyphylla* mediante el modelo de emulsión acuosa de β -caroteno y ácido linoleico.
- Establecer la capacidad antiradicalaria de los componentes de la parte aérea de *Salvia pachyphylla* mediante el método de decoloración del radical libre difenilpicrilhidracilo (DPPH).

- Cuantificar los compuestos fenólicos presentes en los extractos más polares obtenidos de la parte aérea de *Salvia pachyphylla*.
- Evaluar la actividad antitumoral de los extractos obtenidos frente a líneas celulares tumorales de origen humano.

Metas

- Establecimiento de un método sistemático que determine la capacidad antioxidante de plantas de nuestra región para así, establecer cuál de estas especies pudieran ser candidatos a estudios de mayor profundidad para la búsqueda de nuevas plantas medicinales o principios activos de origen natural.
- Identificación de los metabolitos secundarios presentes en cada uno de los extractos mediante técnicas cromatográficas, espectroscópicas y espectrométricas.
- Presentación del trabajo de tesis en congreso, así como publicación de los resultados en revista científica.

CAPÍTULO I

Estudio fitoquímico de *Salvia pachyphylla*

1.1 Antecedentes

1.1.1 Descripción botánica de la especie

Según la clasificación botánica, la familia de plantas Lamiaceae (= Labiatae), donde se encuentra la hierbabuena y la menta, está compuesta actualmente por 200 géneros y aproximadamente 3500 especies (<http://www.lib.utexas.edu/lsl/Mints/description.html>), ampliamente distribuidas en regiones de clima cálido y templado y muy raramente en clima frío. Desde el punto de vista taxonómico, la diversidad de esta familia en la región mediterránea y Asia Central, ha sido considerada como el centro de origen de las primeras especies durante los inicios y la primera mitad del periodo cretáceo, hace aproximadamente 140 millones de años (Hedge, 1992).

El género *Salvia* L. (del latín *salvare*) es uno de los géneros más abundantes de la familia, con más de 900 especies (Hedge, 1992) localizadas en varias regiones del mundo, principalmente en aquellas tropicales y subtropicales, entre ellas, la región mediterránea, Sur de África, América Central, Sudamérica y el Sudeste de Asia. Son plantas anuales (herbáceas), perennes, arbustivas (entre 30 y 150 cm), poseen atractivas flores en varios colores, por lo que su polinización es por insectos,

especialmente abejas que buscan el néctar. El género *Salvia* se ha organizado en cinco subgéneros: *Salvia*, *Leonia*, *Sclarea*, *Jungia* (formalmente *Calosphace*), y *Audibertia* y 102 secciones. Las salvias europeas y asiáticas pertenecen principalmente a los subgéneros *Salvia* y *Sclarea*. El subgénero *Leonia* se encuentra principalmente en América del Norte, mientras que el subgénero *Calosphace*, es más común en México, Centro y Sudamérica.

Salvia pachyphylla conocida también como salvia de la montaña del desierto, es una planta vascular con flores azul violeta a rosa con un aroma muy agradable. El cáliz de cada flor mide aproximadamente entre 9 y 12 mm, mientras que la corola en forma de tubo cilíndrico mide entre 13 y 23 mm de longitud. El periodo de florecimiento de esta planta se da entre mediados y finales del verano o iniciando el otoño. Presenta hojas verdes y grisáceas de forma lanceolada que miden entre 2 y 5 cm de longitud. Su distribución se da en el Sur de California, Suroeste de Nevada y Arizona, y en la montaña del Norte de Baja California (Figura 1).

El hábitat de esta especie son los bosques de coníferas de las sierras de Juárez y San Pedro Mártir. Dos subespecies han sido reconocidas, *eremopictus* y *meridionales*, quedando restringida esta última a nuestra región (Taylor y Ayers, 2006). Sus características morfológicas y fisiológicas están adaptadas a las condiciones climáticas de tipo mediterráneo, donde prevalece un periodo de sequía bien marcado, con temperaturas moderadamente altas en el verano y precipitaciones principalmente invernales, estando también adaptadas al fuego (Delgadillo, 2004; Delgadillo y Peinado, 2008).



Figura 1. Planta y flor de *Salvia pachyphylla*

1.1.2 Usos

Debido a sus propiedades, una gran diversidad de especies de la familia Lamiaceae han sido usadas para propósitos medicinales y culinarios, tales como el orégano (*Limpia berlandieri*), romero (*Rosmarinus officinalis*), tomillo (*Thymus vulgaris*), menta o yerbabuena (*Mentha piperita*, *M. viridis.*), mejorana (*Majorana hortensis*), marrubio (*Marrubium vulgare*), salvia (*Salvia officinalis*), poleo (*Hedeoma drummondii*), lavanda (*Lavandula* spp.), albahaca (*Ocimum basilicum*), y toronjil (*Melissa officinalis*) (Cano y Marroquín, 1994). Algunas incluso han sido empleadas como alucinógeno (poco frecuente entre los géneros pertenecientes a esta familia), como es el caso de la *Salvia divinorum* (Ortega *et al.*, 1982), que se usa como tal en algunas regiones de Oaxaca; otras tienen importancia por su contenido en aceites esenciales (Hanson,

1957). Por sus características aromáticas, son fuente de materia prima en la industria de los cosméticos (Cano y Marroquín, 1994).

La familia Lamiaceae incluye un gran número de plantas que son bien conocidas por sus propiedades antioxidantes, principalmente debido a los componentes fenólicos (Das y Pereira, 1990; Pokorny, 1991; Schwarz y Ternes, 1992).

Especies de esta familia se han usado desde hace mucho tiempo como plantas medicinales, presentando una amplia variedad de funciones biológicas de interés medicinal y agroquímico especialmente aquellas pertenecientes a los géneros *Agastache*, *Ajuga*, *Ballota*, *Leonorus*, *Nepeta*, *Rabdosia*, *Salvia*, *Saturea*, *Scutellaria*, *Sideritis*, *Stachys* y *Teucrium* (Wagner, 1977; Van Beek *et al.*, 1986). Otras especies de *Salvia* han sido usadas desde tiempos ancestrales para tratar más de 60 enfermedades que incluyen epilepsia, resfriados, bronquitis, tuberculosis, hemorragias, y desordenes menstruales (Foster *et al.*, 2000; Steinegger *et al.*, 1988). Algunas más debido a su actividad en contra de bacterias (Gonzales *et al.*, 1987; Ulubelen *et al.*, 1988; 1994; 1996; Lin *et al.*, 1989; Hadj *et al.*, 2006)

En el pasado muchas tribus nativas de Norteamérica han usado a *S. pachyphylla* para propósitos medicinales o ceremoniales. Actualmente los Navajos y Hopi de Arizona la usan como tabaco ceremonial y medicinal (Taylor y Ayers, 2006). En Baja California, *S. pachyphylla* ha sido reportada de uso medicinal por las comunidades indígenas de la Sierra de Juárez para el tratamiento de los síntomas de resfriados (Cortez-Rodríguez, 1987). Sin embargo no se reportan estudios previos de tipo fitoquímico.

1.1.3 Estudios fitoquímicos y biológicos en especies de *Salvia*

Los principales metabolitos secundarios constituyentes de especies del género *Salvia* son terpenos y flavonoides. Las partes aéreas de estas plantas contienen, por lo general, flavonoides, triterpenos, y monoterpenos, particularmente en las flores y hojas, mientras que los diterpenos son encontrados principalmente en las raíces. Sin embargo, hay indicios de que algunas especies de *Salvia* de América también contienen diterpenos en las partes aéreas y en ciertas especies de *Salvia*, triterpenos y flavonas están presentes en las raíces (Topcu, 2006).

Una de las plantas pertenecientes a *Salvia* más estudiadas, *S. officinalis* L., nativa del Sur de Europa así como de Asia Central y los Estados Unidos, es una planta decorativa. Sus componentes son principalmente diterpenos, triterpenos y taninos. Los extractos preparados de esta planta son usados como agentes antisépticos en la inflamación de la cavidad oral y gingivitis. Su utilización en la industria cosmética y alimenticia también es de importancia (Daniela, 1993). Sus aceites esenciales y/o sus constituyentes han mostrado varias actividades biológicas las cuales incluyen antioxidativa, antiinflamatoria, inmunomoduladora, inhibitoria de la colinesterasa (Kennedy *et al.*, 2006), anti-Alzheimer (Akhondzadeh *et al.*, 2003) y actividades tipo insulina, así como actividad inhibidora de la lipasa pancreática (Ninomiya *et al.*, 2004). Ha sido usada como tratamiento para ayudar a las mujeres con excesiva sudoración y otros síntomas de la menopausia (Foster y Tyler, 2000; Steinegger y Hansel, 1988). Otro remedio valioso es *S. sclarea* L., para síntomas asociados con la menopausia,

debido a sus acciones estimuladoras de estrógeno; su té es también sabido que se utiliza para aliviar algunos síntomas de la tuberculosis (<http://www.arsgrin.gov/duke/plants.html> y <http://www.innvista.com/health/herbs/sage.htm>) y sus aceites esenciales han sido usados en aromaterapia y en la industria cosmética para muchos propósitos (Tkachuk y Shapoval, 1987) además es también utilizada en la producción de vinos con un sabor moscatel. Otra *Salvia* bien conocida es *S. fruticosa* Miller encontrada en países mediterráneos, para quienes el nombre común es “salvia griega” y/o “salvia turca”. Las infusiones de sus hojas son usadas para bajar la presión sanguínea y los niveles de azúcar en la sangre y un estudio mostró que el tratamiento con *S. fruticosa* produce hipoglucemia por reducción de la absorción de glucosa en el intestino (Perfumi *et al.*, 1991). Debido a sus propiedades antisépticas, antibacterianas, antimicóticas, antioxidantes, y antiinflamatorias (Pitarokili *et al.*, 2003) es usada frecuentemente para tratar dolor de garganta y úlceras en la boca así como resfriados, tos y problemas digestivos.

Las especies de *Salvia* turcas están representadas por 90 especies, la mitad de las cuales son endémicas de Turquía (Davis, 1982). Los téis preparados de algunas especies de *Salvia*, especialmente de *S. officinalis*, *S. triloba* L., y *S. dichroantha* Stapf., han sido usadas en contra de resfriados, dolor de garganta, bronquitis, dolor de estómago y desordenes menstruales (Baytop, 1984) en la medicina tradicional. En estudios de citotoxicidad *S. hypargeia* Fisch. et Mey., especie endémica de Turquía mostró ser una de las especies más activas en contra de varias líneas celulares de cáncer (Ulubelen *et al.*, 1999). Además, se han aislado compuestos con alta actividad

citotóxica de *S. kronenburgii* Rech. f., otra de las especies endémicas de Turquía (Topcu *et al.*, 2004).

La otra especie de *Salvia* también muy estudiada es el tradicional ingrediente chino *S. miltiorrhiza* Bunge, sus extractos de raíz llamado “Danshen” (en China) y “Tanshen” (en Japón) son usados en la fitoterapia oriental. Poseen un amplio rango de actividades biológicas, incluyendo efectos en enfermedades del corazón, tales como angina de pecho e infarto de miocardio (Chang y But 1986; Nan *et al.*, 2001) y en enfermedades de hígado (Nan *et al.*, 2001; Qi, 1991) debido a su actividad antioxidante en contra del daño peroxidativo de microsomas y hepatocitos. Existen numerosos reportes en cuanto a sus propiedades farmacológicas y se han aislado numerosos compuestos (Adams *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2005; Yuan *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2007). Los principales compuestos involucrados en estas actividades son diterpenos llamados tanshinonas (tanshinona I, IIA, IIB, criptotanshinona) y varios ácidos fenólicos: salvianólico (Figura 2), rosmarínico (Figura 3), cafeico (Figura 4), protocatechuico (Figura 5) y ácido danshensu (Figura 6). *S. przewalskii* Maxim es usada como un sustituto de *S. miltiorrhiza*; la composición química de *S. przewalskii* con respecto a las tanshinonas y compuestos fenólicos es comparable a *S. miltiorrhiza*, así como sus actividades farmacológicas (Skala y Wysokinska, 2005).

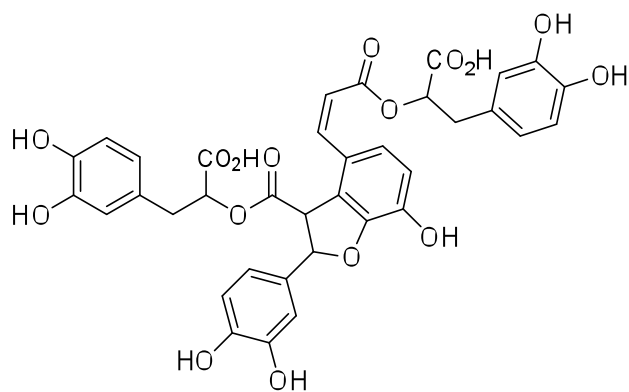


Figura 2

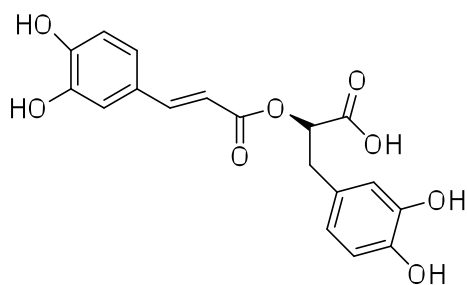


Figura 3

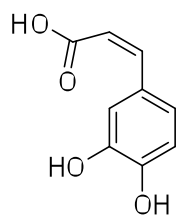


Figura 4

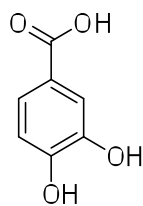


Figura 5

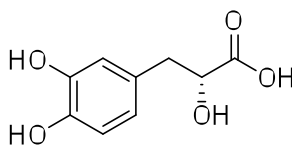


Figura 6

En África, las salvias son usadas para bajar la fiebre y en problemas digestivos. Se han investigado tres especies de *Salvia* surafricanas estrechamente relacionadas (*S. stenophylla* Burchell ex Benth., *S. repens* Burchell ex Benth., y *S. runcinata* L. f.) debido a sus propiedades antioxidante (ensayo con DPPH), antiinflamatoria (ensayo con 5-lipoxigenasa y ciclooxigenasa), antimalárica (ensayo con hipoxantina), antimicrobiana (ensayo de difusión en disco y microdilución) y citotóxica (ensayo basado en la sal de tetrazolio), las cuales han confirmado el uso de estas especies en la medicina tradicional en el Sur de África (Kamatou, *et al.*, 2005).

Un extracto obtenido por maceración con acetona de la parte aérea de *S. clevelandii*, nativa de la península de Baja California (México) y California (E.U.A.) fue sometido a una cromatografía en gel de sílice aislándose ácido ursólico (Figura 7),

rosmanol (Figura 8), carnosol (Figura 9), los diterpenos 16-hidroxycarnosol (Figura 10), abieta-8,11,13-trieno (Figura 11), rosmadial (Figura 12) y el triterpeno ácido oleanólico (Figura 13). El mismo procedimiento pero en *S. pachyphylla* llevó al aislamiento de un diterpeno no descrito hasta ese momento al que se denominó *pachyphyllona* (Figura 14) (Córdova, 2006) así como a los compuestos ya conocidos 20-deoxocarnosol (Figura 15), 11-hidroxi-20(8)-epoxi-9,13-abietadien-12-ona (Figura 16), 11,12-dioxo-8,13-abietadieno (Figura 17), 8 β -hidroxi-9,13-abietadien-12-ona (Figura 18), 5,6-didehidro-O-metil-sugiol (Figura 19), carnosol, rosmanol, ácido carnósico (Figura 20), 7-metoxirosmanol (Figura 21), isorosmanol (Figura 22) y el triterpeno ácido ursólico.

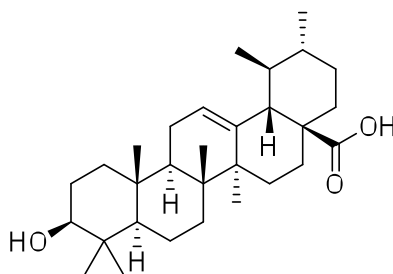


Figura 7

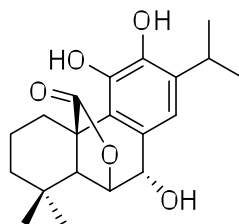


Figura 8

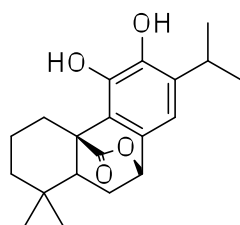


Figura 9

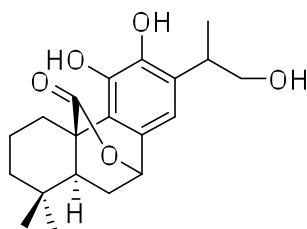


Figura 10

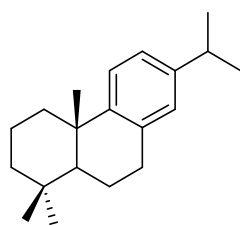


Figura 11

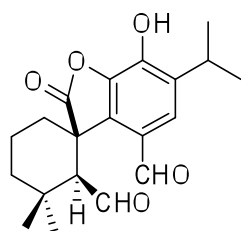


Figura 12

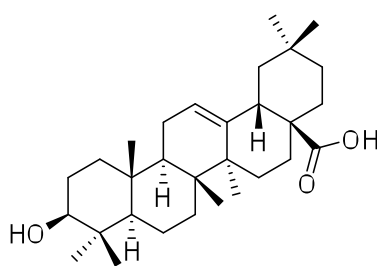


Figura 13

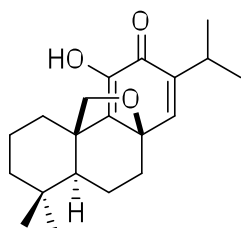


Figura 14

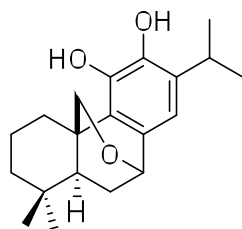


Figura 15

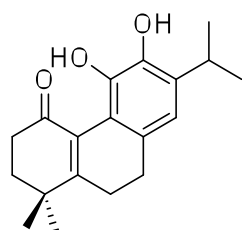


Figura 16

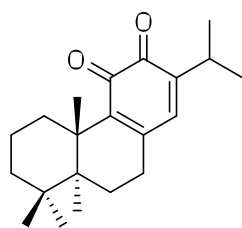


Figura 17

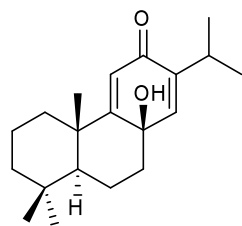


Figura 18

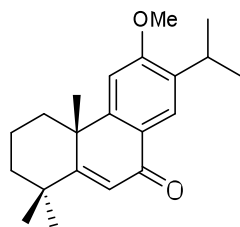


Figura 19

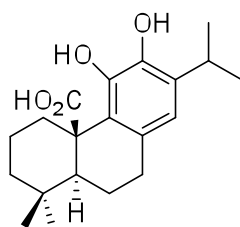


Figura 20

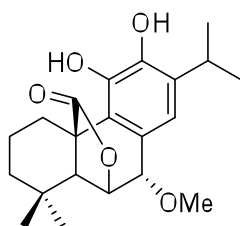


Figura 21

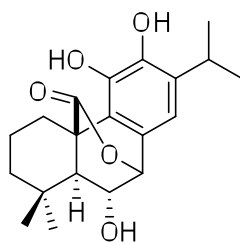


Figura 22

Además de la diversidad dentro del género *Salvia*, hay también diferencias en la composición de antioxidantes entre las raíces y la parte aérea de la planta. Mientras que en las hojas, ácidos fenólicos y flavonoides son acompañados por antioxidantes diterpenoides de tipo abietano, en las raíces, prevalecen ácidos rosmarínico, cafeico y salvianólico (Cuvelier *et al.*, 1994; Lu y Foo, 2002).

A pesar de todo lo anterior descrito, se considera que el género *Salvia* ha sido poco estudiado fitoquímicamente y si lo comparamos con otros géneros de la familia Lamiaceae solo se ha estudiado menos del 10 % de las especies existentes, mostrando poseer un rico contenido en estructuras diterpénicas las cuales han demostrado tener interesantes propiedades farmacológicas, tales como antioxidante (Lima *et al.*, 2005), antiinflamatoria (Hosseinzadeh *et al.*, 2003), analgésica (Hosseinzadeh *et al.*, 2003), antipirética (Hernández *et al.*, 1995), hemostática (Hernández *et al.*, 1995), hipoglicémica (Alarcón *et al.*, 2002), antitumoral (Ulubelen *et al.*, 1992; Topcu *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2000), antituberculosa (Ulubelen *et al.*, 1997) y actividad cardiovascular (Ulubelen, 2003) todo esto atribuido particularmente a sus triterpenos, más que a cualquier otro componente.

1.2 Desarrollo experimental

1.2.1 Colecta e identificación taxonómica de la planta

La colecta del material vegetal en su hábitat natural se llevó efectuó aleatoriamente durante la temporada de otoño en el mes de Septiembre de 2006 en la región de la Sierra Juárez en el Municipio de Ensenada, Baja California. La determinación taxonómica la realizó el Dr. José Delgadillo Rodríguez. Un ejemplar (*voucher specimen* 9783) fue depositado en el herbario BCMEX de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Baja California.

La sierra Juárez es un macizo montañoso formado por granodioritas que se continúan hacia el Sur formando la sierra de San Pedro Mártir. La sierra Juárez es una continuación de las montañas de Cuyamaca y Palomar, en el condado de California, formada de terrenos muy accidentados y con una altitud que va de los 1000 a los 1600 m. Su vertiente Este es muy accidentada, al igual que la sierra San Pedro Mártir y a una distancia relativamente corta de 35 km, cae de los 1200 a por debajo del nivel del mar, en el área conocida como Laguna salada.

Las sierras Juárez y San Pedro Mártir, son parte de la provincia climática del noroeste (zona montañoso) y tienen un rango de temperatura del orden de 10-15 °C. La sierra Juárez tiene en su mes más caluroso una temperatura media inferior de 22 °C y ha sido clasificado tipo mediterráneo (Delgadillo, 1997).

1.2.2 Obtención de los extractos crudos de la parte aérea de *Salvia pachyphylla*

La parte aérea de la planta (tallos, hojas y flores) fue secada al aire durante una semana a temperatura ambiente bajo sombra y posteriormente triturada, obteniéndose una consistencia como la que se muestra en la figura 23.

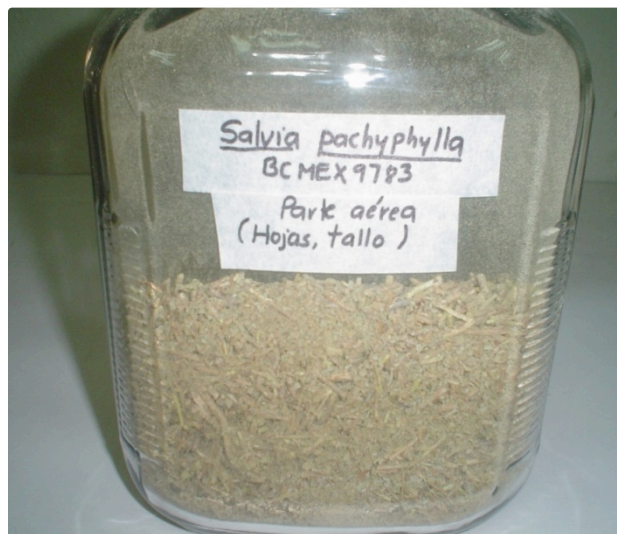


Figura 23. Parte aérea de *Salvia pachyphylla* secada y triturada

La trituración de 1.3 K de hojas y ramas secas del tallo de *Salvia pachyphylla* se realizó utilizando una licuadora Oster modelo 465-42, posteriormente se procedió a la extracción.

Para la obtención de los extractos crudos se montaron 4 equipos de extracción Soxhlet conteniendo cada uno de 75–80 g de material seco envuelto en toallas de papel absorbente y 250 mL de disolvente. Las hojas y ramas secas y pulverizadas fueron extraídas secuencialmente en el aparato Soxhlet usando disolventes de diferente grado de polaridad en orden creciente empezando con *n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo y finalmente metanol (Figura 24). Los disolventes fueron eliminados a sequedad usando un rota evaporador BÜCHI, modelo R-215 bajo las condiciones de 40 °C y 80–120 rpm (Figura 25).



Figura 24. Sistema de extracción Soxhlet



Figura 25. Eliminación de solvente a presión reducida mediante rotaevaporador

Los extractos generados fueron sometidos a liofilización (Figura 26) durante 48 h bajo temperatura de $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Figura 26. Liofilización de los extractos obtenidos

Para la obtención del extracto acuoso se empleó la siguiente técnica:

1. Se añadió 2 L de agua destilada a 100 g del material vegetal seco y molido.
2. Se calentó a $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 minutos manteniendo el conjunto en agitación constante cada 5 minutos (Figura 27).
3. Se filtró y se lavó el residuo con agua (2 x 100 mL) reuniendo las tres disoluciones.

4. Se concentró hasta obtener una tercera parte del volumen inicial en rota evaporador a presión reducida, manteniendo la temperatura como máximo entre 60 y 70 °C.
5. El residuo obtenido no requirió liofilización.

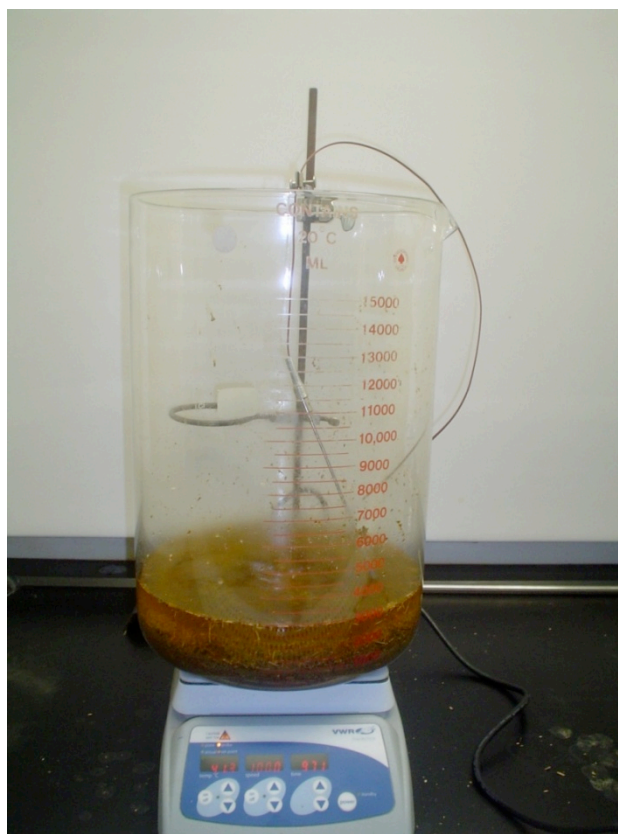


Figura 27. Obtención del extracto acuoso

Una vez obtenidos los extractos crudos, estos fueron rotulados como exto. *n*-Hex, exto. CH₂Cl₂, exto. AcoEt, exto. MeOH y exto. acuoso; protegidos de la luz con

papel aluminio y mantenidos en envase hermético con atmosfera de gas nitrógeno y en refrigeración hasta su uso (Figura 28).



Figura 28. Extractos obtenidos de *Salvia pachyphylla*

1.2.3 Estudio de identificación preliminar de metabolitos secundarios de los extractos de *Salvia pachyphylla* mediante cromatografía de capa fina

La identificación preliminar de grupos químicos presentes en cada uno de los extractos obtenidos se realizó mediante el uso de cromatografía de capa fina, técnica utilizada para separar los componentes puros que forman parte de una mezcla.

Como material adsorbente se empleó placas de gel de sílice (fase estacionaria) y como fase móvil, en el caso de los extractos de mediana y baja polaridad (acetato de etilo, diclorometano y *n*-hexano) se usó una mezcla de *n*-hexano-acetato de etilo en

una proporción 7:3 y en el caso de los extractos más polares (acuoso y metanol) se utilizó una mezcla de *n*-hexano-metanol en proporción 3:7.

La presencia de manchas coloreadas fue corroborada mediante la utilización de las siguientes soluciones químicas reveladoras: solución de vainillina para la identificación de terpenoides, reactivo de Dragendorff para la identificación de alcaloides, solución de sulfato de cobre-citrato de sodio para la identificación de compuestos fenólicos y solución de fenol-ácido sulfúrico para la identificación de azúcares, así como mediante el uso de radiación ultravioleta.

1.3 Resultados y discusión

1.3.1 Apariencia y cantidad de los extractos obtenidos

Los extractos generados de la extracción mostraron las siguientes características:

- ❖ Extracto *n*-hexano: Posee un color muy oscuro, su consistencia es dura y compacta. Absorbe fácilmente la humedad. Al pulverizarse se torna color marrón.
- ❖ Extracto diclorometano: Es un polvo muy fino de color amarilloso que al disolverse en diclorometano se torna verde oscuro. Es de fácil manejo debido a su consistencia y muy estable.

- ❖ Extracto acetato de etilo: Tiene un color negruzco. Posee una consistencia de tipo resina, muy pegajoso, higroscópico y de difícil disolución, aún en acetato de etilo.
- ❖ Extracto metanol: Tiende a absorber humedad del ambiente. De color oscuro que al pulverizar tiende a aclarar el tono hacia un color verdoso.
- ❖ Extracto acuoso: Es un polvo de tipo poroso y apariencia brillante el cual fue obtenido directamente después de la eliminación del agua mediante rotación y evaporación. A simple vista lucen como cristales gruesos, muy ligeros de color café naranja y muy fácil manejo.

Las cantidades obtenidas se muestran en la siguiente tabla (1):

Tabla 1. Cantidad obtenida de cada extracto generado

Extracto	Cantidad obtenida (g)
<i>n</i> -Hexano	60.3
Diclorometano	27.9
Acetato de etilo	24.2
Metanol	90.9
Acuoso	14.5

1.3.2 Identificación de metabolitos secundarios

Tabla 2. Resultados del estudio fitoquímico preliminar de extractos obtenidos de *Salvia pachyphylla*

Compuestos	Prueba	Extractos				
		<i>n</i> -Hex ¹	DCM ²	AcoEt ³	MeOH ⁴	Acuoso
Alcaloides	Dragendorff	+	+	+	-	-
Terpenoides	Vainillina/ácido fosfórico	+	+	+	-	-
Compuestos fenólicos	Sulfato de cobre/citrato de sodio	-	-	-	+	+
Azúcares	Fenol/ácido sulfúrico	-	-	-	+	+

¹*n*-Hex: Extracto *n*-hexano. ²DCM: Extracto diclorometano. ³AcoEt: Extracto acetato de etilo. ⁴MeOH: Extracto metanol.

1.3.3 Espectros infrarrojos (Ver sección apéndice)

Extracto *n*-hexano:

IR (NaCl) $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1} : 3413, 2917, 1714, 1424, 1361, 1221, 1091, 905.

Extracto diclorometano:

IR (NaCl) $n_{\text{máx}}$ cm^{-1} : 3413, 2924, 1687, 1454, 1364, 1029.

Extracto acetato de etilo:

IR (NaCl) $n_{\text{máx}}$ cm^{-1} : 3380, 2926, 1701, 1515, 1270, 1031.

Extracto metanol:

IR (NaCl) $n_{\text{máx}}$ cm^{-1} : 3351, 2935, 1698, 1604, 1517, 1369, 1267, 1031.

Extracto acuoso:

IR (NaCl) $n_{\text{máx}}$ cm^{-1} : 3368, 2932, 1602, 1517, 1403, 1263, 1066.

Los espectros de infrarrojo (en pastilla de KBr) presentaron las señales características de los grupos funcionales asociados con los principales metabolitos secundarios encontrados en los extractos obtenidos. Por ejemplo, entre el intervalo de la región de 3413 y 3350 cm^{-1} (tensión de O-H) se encuentra un grupo OH de un alcohol confirmado con la señal entre 1030 y 1066 cm^{-1} que representa la tensión C-O. Puede observarse cerca de los 1600 cm^{-1} el sistema C=C olefínico, alrededor de los 2900 cm^{-1} la tensión de C-H de metilos y metilenos confirmados con sus flexiones en 1424, 1361 (para el extracto hexánico), 1454, 1364 cm^{-1} (para el extracto de diclorometano), 1515 cm^{-1} (para el extracto de acetato de etilo), 1517, 1369 cm^{-1} (para el de metanol) y en 1517, 1403 cm^{-1} (para el acuoso). Se observa también la presencia de grupos carbonilos (cetonas y aldehídos) entre 1714 y 1700 cm^{-1} aproximadamente.

CAPÍTULO II

Actividad antioxidante de *Salvia pachyphylla*

2.1 Antecedentes

2.1.1 El proceso de oxidación en los seres vivos y el papel de los antioxidantes

La oxidación es esencial para muchos organismos vivientes para la producción de energía como combustible en diversos procesos biológicos (Yang *et al.*, 2002). Sin embargo, el oxígeno es descrito en algunas ocasiones como un “arma de doble filo” debido a que así como es ingrediente vital en reacciones intracelulares, es también responsable de la formación de especies oxígeno-reactivas (Sadler *et al.*, 1999). Estas especies reactivas, tales como radicales superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH), son producidos como resultado de muchas reacciones bioquímicas generados mediante diferentes vías endógenas y exógenas; tales vías incluyen: la respiración aeróbica, la generación de leucocitos polimorfonucleares y macrófagos además de peroxisomas y son considerados como la principal causa de daño oxidativo siendo responsables de procesos de oxidación en el cuerpo y por otro lado entre las fuentes exógenas de radicales libres se encuentran: el humo del tabaco, la radiación ionizante, ciertos contaminantes, solventes orgánicos y pesticidas, entre otros (Sadler *et al.*, 1999). Estas especies reactivas causan cambios oxidativos en biomoléculas, tales como carbohidratos, ADN, lípidos y proteínas pudiendo provocar

la desnaturalización de proteínas, mutaciones, disrupción de las membranas, inactivación enzimática, daño celular y destrucción de tejido dando inicio a enfermedades degenerativas. Entre estos radicales libres, el radical hidroxilo es uno de los más agresivos encontrados en los seres vivos, además, el daño oxidativo causado por estos radicales libres, podría iniciar y promover el progreso de un número de enfermedades crónicas, entre las cuales se encuentran cáncer, enfermedades cardiovasculares, arterioesclerosis, diabetes (Yildirim *et al.*, 2000) e inflamación.

El mecanismo por el que los radicales libres producen sus efectos transcurre mediante una reacción radicalaria en la que se forman especies reactivas oxigenadas, que son los que producen los efectos nocivos. La utilización de antiradicales permite que no se produzcan las especies reactivas oxigenadas (por esto se les llama antioxidantes), de forma que se impiden las consecuencias de su actividad (Visioli *et al.*, 2000; Kris-Etherton *et al.*, 2002). Estos antiradicales actúan principalmente en reacciones de terminación de cadenas de radicales libres, impidiendo o retardando la oxidación de lípidos y otras moléculas cediendo átomos de hidrogeno de forma que se neutralizan los radicales libres, siendo ésta la principal característica de un antioxidante: su habilidad para atrapar radicales libres.

La inhibición de los procesos de oxidación es muy importante en el mantenimiento de alimentos ya que la degradación oxidativa de los lípidos es uno de los principales factores que limitan su vida, ya que reduce la calidad organoléptica y seguridad, además de reducir las propiedades nutricionales debido a la destrucción de vitaminas oxígeno-sensibles. Para limitar estos efectos indeseables, se han propuesto varios métodos. Además de los procesos físicos, tales como la remoción del oxígeno y

la refrigeración, el uso de sustancias que disminuyan los rangos de oxidación juegan un papel muy importante (Vichi, Zitterl-Eglseer, Jugl, y Franz, 2001). Los antioxidantes sintéticos tales como hidroxitolueno butilado (BHT), hidroxianisol butilado (BHA), propilgalato (PG), y ter-butilhidroquinona (TBHQ) han sido usados para proteger los productos alimenticios en contra de la degradación oxidativa de las moléculas orgánicas. Sin embargo la mayoría de los utilizados comercialmente son de origen sintético y han demostrado ser altamente inestables bajo las condiciones de trabajo y en ciertos casos ocasionan efectos adversos sobre la salud de animales de experimentación, por lo que en las últimas décadas, han venido creando cierta preocupación y un deseo general de remplazarlos con una alternativa natural más estable, eficaz, versátil y/o menos tóxica. Para cumplir con este objetivo, se han obtenido diferentes tipos de compuestos a partir de rutas sintéticas o fuentes naturales. Así por ejemplo, entre los compuestos de origen natural se encuentran: carotenoides, vitaminas C y E, tocoferoles, tocotrienoles, flavonoides y licopenos, entre otros. Sin embargo, los tocoferoles, el ácido ascórbico y sus derivados que son usados como alternativas al BHA y BHT son mucho menos efectivos, por lo que la búsqueda de nuevos antioxidantes serviría como potentes candidatos para combatir no solo el proceso de carcinogénesis sino también el mismo envejecimiento.

Actualmente existe un gran interés en los antioxidantes, particularmente aquellos que intentan prevenir el presumible efecto negativo de los radicales libres en el cuerpo humano y prevenir el deterioro de grasas y otros constituyentes de los alimentos. En ambos casos, hay una preferencia marcada por los antioxidantes naturales que por aquellos obtenidos de fuentes sintéticas (Abdalla y Roozen, 1999), por lo que hay un

incremento paralelo en el uso de métodos para estimar la eficiencia de tales sustancias como antioxidantes (Sánchez-Moreno, 2002; Schwarz, *et al.*, 2001).

2.1.2 Los compuestos fenólicos como parte de los antioxidantes

Las fuentes naturales de antioxidantes son principalmente compuestos fenólicos (entre los que se encuentran simples fenoles, taninos, flavonoides, lignanos y fenilpropanoides) los cuales son un grupo importante, producto del metabolismo secundario de plantas, sintetizados como resultado de una adaptación a condiciones de estrés bióticas y abióticas (infección, sequía, frío, intensa luz visible, inundación) aislados de plantas, aunque también pueden ser encontrados en frutas, vegetales, nueces, semillas, hojas y raíces. Los compuestos fenólicos no pueden ser producidos por el cuerpo humano por lo que debieran ser adquiridos a través de la dieta diaria.

Desde el punto de vista químico se caracterizan por la presencia de uno o más anillos tipo benceno. Ellos se relacionan directamente con algunas características de los alimentos como son el sabor, color, la palatabilidad y el valor nutricional. Entre estos compuestos se encuentran los ácidos fenólicos y flavonoides como el ácido cumárico y la quercetina y los taninos. Estos fenoles con peso molecular relativamente alto tienen un poder antioxidante 20 veces más fuerte que la vitamina E (Weisburger, 1999). Los compuestos fenólicos poseen una estructura química especialmente adecuada para ejercer una acción antioxidante actuando como captadores de radicales libres neutralizando peligrosas especies reactivas de oxígeno e iones metálicos quelantes. Además, debido a su reactividad, se encuentran en la mayoría de los casos

combinadas con un ácido orgánico, un azúcar o bien, con ellas mismas para formar un polímero.

En años recientes los compuestos fenólicos han atraído el interés de investigadores debido a que han mostrado ser poderosos antioxidantes que pueden proteger el cuerpo humano de radicales libres. Esta actividad antiradicalaria de flavonoides y fenoles está basada principalmente en propiedades redox de sus grupos hidroxilo y relaciones estructurales entre diferentes partes de su estructura química.

2.1.3 El uso del radical libre difenilpicrilhidrazilo (DPPH) para estimar la actividad antioxidante

Uno de tales métodos muy popular en la actualidad está basado en el uso del radical libre difenilpicrilhidrazilo (Figura 29). Esta molécula se caracteriza como un radical libre estable en virtud de la deslocalización del electrón libre sobre la molécula como un todo, por lo que la moléculas no se dimerizan, como sucedería en el caso de la mayoría de los otros radicales libres. Esta deslocalización también da lugar a una intensa coloración violeta, caracterizada por una banda de absorción en la solución de metanol centrada en aproximadamente 520 nm (Molyneux, 2004).

Cuando una solución de DPPH es mezclada con aquella sustancia capaz de donar un átomo de hidrogeno, se da lugar a la forma reducida (Figura 30) con la correspondiente pérdida del color violeta (aunque se esperaría encontrar un color amarillo claro residual del grupo picril aún presente).

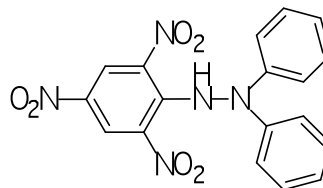
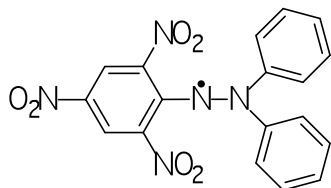
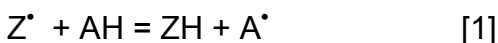


Figura 29. Difenilpicrilhidrazilo (radical libre) **Figura 30.** Difenilpicrilhidrazina (no radical)

Representando el radical DPPH por Z^\bullet y la molécula donadora por AH, la reacción primaria es



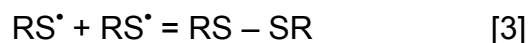
Donde ZH es la forma reducida y A^\bullet es el radical libre producido en este primer paso. Este radical sufrirá subsecuentes reacciones las cuales controlan la estequiometría general, esto es, el número de moléculas de DPPH reducidas (decoloradas) por una molécula del reductor.

La reacción [1] es por tanto llevada a cabo para proveer el enlace con las reacciones que toman lugar en un sistema oxidante, tal como la auto-oxidación de un lípido u otra sustancia insaturada; la molécula Z^\bullet DPPH representa así los radicales libres formados en el sistema cuya actividad es ser suprimida por la sustancia AH.

El método DPPH resumido anteriormente fue introducido hace poco más de 50 años por Marsden Blois, mientras trabajaba en la Universidad Stanford (Blois, 1958) para lo cual usó como modelo antioxidante el aminoácido cisteína. Representando el radical DPPH por Z^\bullet y la molécula cisteína por RSH, la reacción inicial es entonces

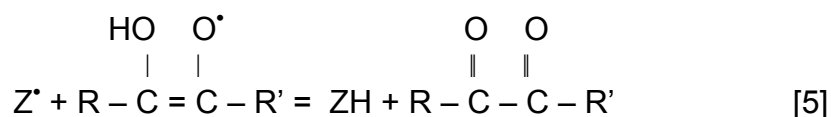
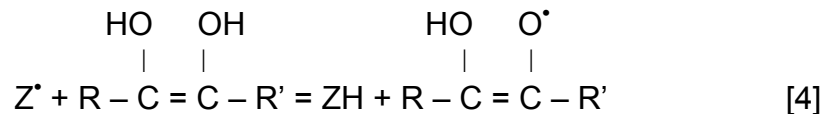


El radical libre RS^{\bullet} evidentemente reacciona entonces con otra molécula de la misma clase que fue producida por una reacción paralela a [2]



Esto, por lo tanto, lleva a la reducción de dos moléculas de DPPH por dos moléculas de cisteína, manteniéndose una relación estequiométrica 1:1.

Sin embargo, si la molécula tiene dos sitios adyacentes para la abstracción de hidrógeno los cuales están conectados internamente, como en el caso del ácido ascórbico (Vitamina C), entonces podrá haber una siguiente reacción de abstracción de hidrogeno después de la primera:



Esto lleva a una estequiometria 2:1, es decir, dos moléculas de DPPH reducidas por una molécula de ácido ascórbico. La misma estequiometria es mostrada en la reacción con hidroquinona (1,4-dihidroxibenceno) que da lugar a la producción de quinona (1,4-benzoquinona) por un mecanismo similar de dos pasos.

El método original de Blois ha sido seguido por varios investigadores (Kim *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2002). El más recientemente método introducido por Brand-Williams y colegas (Brand-Williams *et al.*, 1995) ha sido usado como punto de referencia por

varios grupos de investigadores (Gómez-Alonso *et al.*, 2003; Lebeau *et al.*, 2000; Yopez *et al.*, 2002). Este trabajo más reciente indicó que la figura originalmente sugerida por Blois fue demasiado simplificada, esto debido a la complejidad de las reacciones que siguen a la inicial [ecuación 1], la estequiometría general no necesita ser necesariamente un número entero como 1 ó 2. Además, el paso inicial [ecuación 1] podría ser reversible, como puede ser demostrado añadiendo la forma reducida ZH al final de la reacción (Bondet *et al.*, 1997). Sin embargo, el trabajo de Blois sigue siendo útil y de obligada referencia en este tipo de estudios.

Un parámetro que ha sido introducido (Brand-Williams *et al.*, 1995; Bondet *et al.*, 1997) para la interpretación de los resultados del método de DPPH, es la *concentración eficiente* (efficient concentration) o valor EC_{50} (algunas veces llamado también valor IC_{50}). Éste se define como la concentración de sustrato que causa el 50 % de la pérdida de la actividad (color) del DPPH. A menor EC_{50} , mayor es el poder antioxidante de una sustancia. Otro parámetro es el poder o *eficiencia antiradicalaria*, AE ($AE=1/EC_{50}$) y se refiere a la concentración de antioxidante relativa requerida para disminuir la concentración inicial de DPPH en un 50 %. Mientras más elevado sea AE, mayor es la actividad antiradicalaria.

En los casos donde el sustrato a evaluar no posee una masa molar definida, como es el caso de los extractos obtenidos de plantas, los resultados son presentados en equivalentes de DPPH por gramo de extracto.

2.1.4 Técnicas empleadas para el estudio de la actividad antioxidante

Existen numerosas técnicas disponibles para evaluar la actividad antioxidante de compuestos y mezclas complejas, tales como extractos de plantas. Aunque hay varios métodos, la utilización de un solo procedimiento no es suficiente para identificar todos los posibles mecanismos que caracterizan un antioxidante. Por lo tanto, los extractos obtenidos mediante extracción Soxhlet fueron estudiados para determinar su posible actividad antioxidante mediante dos ensayos complementarios denominados método de decoloración de β -caroteno y método de decoloración de DPPH.

1) Método de decoloración de β -caroteno

Para la determinación de la actividad antioxidante mediante el método de decoloración de β -caroteno según el procedimiento descrito por Burda (2001) y Wanasundara (1996) con algunas modificaciones; se usó como modelo de prueba la oxidación inducida mediante calor de un sistema de emulsión acuosa de β -caroteno y ácido linoleico. En este ensayo, la capacidad antioxidante es determinada mediante la medición de la inhibición de los compuestos orgánicos volátiles y los dieno-hidroperóxidos conjugados derivados de la oxidación del ácido linoleico (Dapkevicius, Venskutonis, Beek y Linssen, 1998).

2) Método de decoloración de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazilo)

El método se basa en la reducción del radical libre DPPH por los antioxidantes que se encuentren presentes en la muestra a evaluar mediante la habilidad para donar iones hidrogeno.

El radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo es un radical libre estable ampliamente usado. Posee una coloración púrpura que se pierde progresivamente cuando se añade la muestra que contiene sustancias antioxidantes, el grado de decoloración de la solución de DPPH indica la eficiencia de la sustancia agregada o del extracto como nuestro caso.

Alcanza una absorción máxima a 517 nm. Los antioxidantes presentes en la muestra reaccionan con el DPPH y lo convierten a 2,2-difenil-1-picrilhidracina. Cuando es reducido al derivado hidracina vía reacciones de transferencia de átomo de hidrogeno o electrón, esta absorción máxima tiende a disminuir, lo cual se traduce en una disminución de la concentración de DPPH debida a la cesión de electrones de la especie antioxidante.

3) Cuantificación de compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos se refieren a un grupo de sustancias que poseen en común un anillo aromático con uno o más sustituyentes hidroxilos y que se encuentran frecuentemente como glicósidos, combinados con unidades de azúcar. Son relativamente polares y tienden a ser solubles en agua.

El procedimiento a seguir se basa en el método con reactivo de Folin-Ciocalteu el cual es una mezcla de ácido fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{10}$) y de ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) que se reduce, por oxidación de los fenoles, a una mezcla de óxidos azules de tungsteno (W_8O_{23}) y de molibdeno (Mo_8O_{23}). La coloración azul producida posee una absorción máxima aproximadamente a los 760 nm y es proporcional a las tasas de compuestos fenólicos.

2.2 Desarrollo experimental

2.2.1 Estudio de decoloración oxidativa de β -caroteno

Para el estudio de la actividad antioxidante mediante el método de decoloración de β -caroteno se siguió la siguiente metodología:

1. Se agregó a un matraz 0.02 mL de ácido linoleico, SIGMA-ALDRICH, Inc., St. Louis, MO, USA y 0.2 mL de emulsificador Tween 20. Se añadió 1 mL de solución de β -caroteno trans- β -caroteno, 95 %, Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, Wis. 53233, USA (0.2 mg de β -caroteno disuelto en 1 mL de cloroformo) y se dejó evaporar el cloroformo.
2. Posteriormente se transfirió al matraz 50 mL de agua destilada la cual había sido mantenida en constante burbujeo de aire durante 1 h alcanzándose una saturación de oxígeno disuelto de 9.7 mg/L.

3. Se agitó el matraz vigorosamente hasta que se formó una emulsión acuosa. Se tomó una alícuota de 5 mL y se colocó en un tubo que contenía 2 mg del extracto a evaluar.
4. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 470 nm en un espectrofotómetro HACH DR/4000U inmediatamente después de poner en contacto la emulsión de β -caroteno con la el extracto a evaluar (tiempo = 0 min). Las subsecuentes lecturas de absorbancia se registraron a intervalos de 15 min manteniendo los tubos en baño María a 50 °C hasta que el color del β -caroteno en la muestra control desapareció (120 min después). El mismo procedimiento fue repetido para la vitamina E usada como referencia y para el control (muestra sin extracto).
5. La actividad antioxidante fue calculada como porcentaje de inhibición de la oxidación contra muestra control usando la siguiente ecuación:

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

Donde:

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

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

Ac^0 = absorbancia de la muestra control a 0 min.

Ac^{120} = absorbancia de la muestra control a 120 min.

Las capacidades antioxidativas de los extractos fueron comparadas con aquellas de la vitamina E y la muestra control.

2.2.2 Determinación de actividad antiradicalaria

La habilidad de donar un átomo de hidrogeno o electrón de los extractos fue medida del blanqueamiento de las soluciones de etanol coloreadas de púrpura.

La capacidad atrapadora de radicales libres (CARL) se midió aplicando el método descrito por Burda y Oleszek (2001) con algunas modificaciones:

1. Para cada uno de los cinco extractos a evaluar se prepararon las siguientes concentraciones disueltas en metanol mediante la técnica de dilución: 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.12, 0.06, 0.03, 0.015, 0.007 y 0.003 mg/mL.
2. Cada concentración se añadió a un tubo que contenía 2 mL de solución de DPPH en metanol (7.5 mg/250 mL).
3. La solución resultante se dejó en reposo durante 5 minutos y posteriormente se midió la absorbancia a 517 nm usando metanol como blanco.
4. El ensayo se repitió dos veces, mientras que cada concentración fue ensayada por triplicado, los resultados obtenidos fueron promediados y la actividad antiradicalaria fue calculada como porcentaje de DPPH remanente mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad antiradicalaria} = 100 \times [1 - A_m / A_c]$$

Donde:

A_m = Absorbancia de la muestra extracto.

A_c = Absorbancia de la muestra control (sin extracto).

A partir del gráfico de Este porcentaje *versus* la concentración de la muestra se obtiene el EC_{50} .

2.2.3 Cuantificación de compuestos fenólicos

La concentración de fenoles solubles total en los extractos más polares (acuoso y metanólico) fue medida por espectrofotometría, basándose en una reacción colorimétrica de óxido-reducción. El agente oxidante utilizado fue el reactivo de Folin-Ciocalteu.

Preparación de la curva de calibración:

Para la curva de calibración se utilizó una solución estándar de ácido gálico (0.1 mg/mL) de la cual se tomaron volúmenes de 0 μ L a 160 μ L en intervalos de 20 μ L y se completó el volumen de cada uno a 500 μ L agregando agua destilada.

Determinación de fenoles en una muestra:

Se pesaron 5 mg de extracto y se disolvió en 1 mL de agua destilada (metanol en el caso del extracto MeOH). Se agregaron 9 mL más de agua destilada y de esta solución se tomaron 100 μ L para después completarse un volumen final de 500 μ L con agua destilada.

Procedimiento:

A cada una de las soluciones de los estándares y extractos se le adicionó 250 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu 1 N y se colocó en baño con ultrasonido durante 5 minutos. Posteriormente se añadió 1250 μL de solución de Na_2CO_3 al 20 % y se dejó en reposo por 2 horas.

La absorbancia fue medida a 760 nm y los resultados se expresaron en mg de ácido gálico por g de extracto (mg GA/g extracto).

Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

2.3 Resultados y discusión

Los extractos de *S. pachyphylla* obtenidos mediante extracción Soxhlet fueron estudiados para evaluar su posible actividad antioxidante por dos métodos complementarios: sistema β -caroteno/ácido linoleico y capacidad atrapadora de radicales libres, debido a que las sustancias activas de los extractos de plantas evaluados son diferentes. La cuantificación de compuestos fenólicos se realizó únicamente en los extractos más polares (acuoso y MeOH).

Estos ensayos difieren entre sí en términos de sustratos, pruebas y de las condiciones de reacción.

Los radicales hidroperóxidos del ácido linoleico atacan y oxidan el β -caroteno, el cual se decolora rápidamente, registrándose una disminución en los valores de las lecturas de absorbancia. La presencia de extractos con actividad antioxidante puede retardar el proceso de decoloración por acción sobre los radicales libres que se forman

en el sistema (Jayaprakasha *et al.*, 2001). Esta actividad antioxidante, la cual reflejó la habilidad de los extractos de *S. pachyphylla* para inhibir el blanqueamiento (decoloración) del β -caroteno, fue cuantificada y comparada con el control, el cual no contenía compuesto antioxidante demostrándose que la adición de los extractos de *S. pachyphylla* inhibió la oxidación del ácido linoleico. Como se muestra en la figura 31, la cual representa los resultados de los porcentajes de actividad máxima, se puede reconocer que los extractos mostraron mayor potencial antioxidante que la vitamina E (α -tocoferol) utilizada como referencia y se identifica que los extractos acetato de etilo y diclorometano tuvieron una mejor respuesta en la inhibición de la oxidación del sistema β -caroteno/ácido linoleico, mostrándose el extracto *n*-hexano con menor capacidad antioxidante.

En la tabla 3 se presentan los promedios de los valores de absorbancia registrados en intervalos de 20 minutos, los cuales muestran el proceso de la inhibición de la decoloración del β -caroteno al estar en contacto con los extractos de *S. pachyphylla* y con la vitamina E usada como referencia. En la tabla 4 se ilustran los valores de porcentaje de máxima actividad antioxidante y en la figura 32 se presenta una gráfica de barras comparativa de los porcentajes de actividad antioxidante de cada uno de los extractos estudiados.

Tabla 3. Valores de absorbancia en la inhibición de la decoloración de β -caroteno en contacto con los extractos de *Salvia pachyphylla*

Tiempo (minutos)							
Muestra	0	20	40	60	80	100	120
Extracto <i>n</i> -Hex	0.669	0.336	0.294	0.273	0.264	0.255	0.253
Extracto DCM	0.701	0.648	0.633	0.626	0.623	0.621	0.618
Extracto AcoEt	0.643	0.597	0.583	0.552	0.569	0.564	0.563
Extracto MeOH	0.721	0.632	0.584	0.549	0.523	0.499	0.474
Extracto Acuoso	0.664	0.626	0.612	0.587	0.569	0.553	0.537
Vitamina E	0.843	0.564	0.441	0.403	0.391	0.390	0.378
Control	0.761	0.465	0.335	0.296	0.276	0.265	0.255

Tabla 4. Valores de porcentaje de máxima actividad antioxidante (AOX) de los extractos de *Salvia pachyphylla* y de la referencia

Muestra	% AOX
Extracto <i>n</i> -Hex	17.84
Extracto DCM	83
Extracto AcoEt	84
Extracto MeOH	51
Extracto Acuoso	74
Vitamina E	8.29

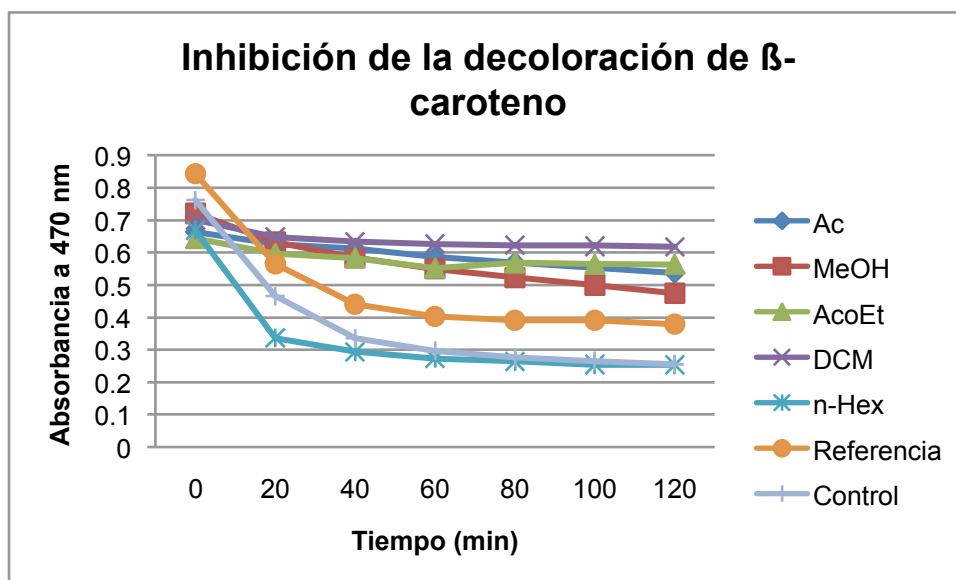


Figura 31. Inhibición de la decoloración de β-caroteno en un sistema que contiene extractos de *Salvia pachyphylla*

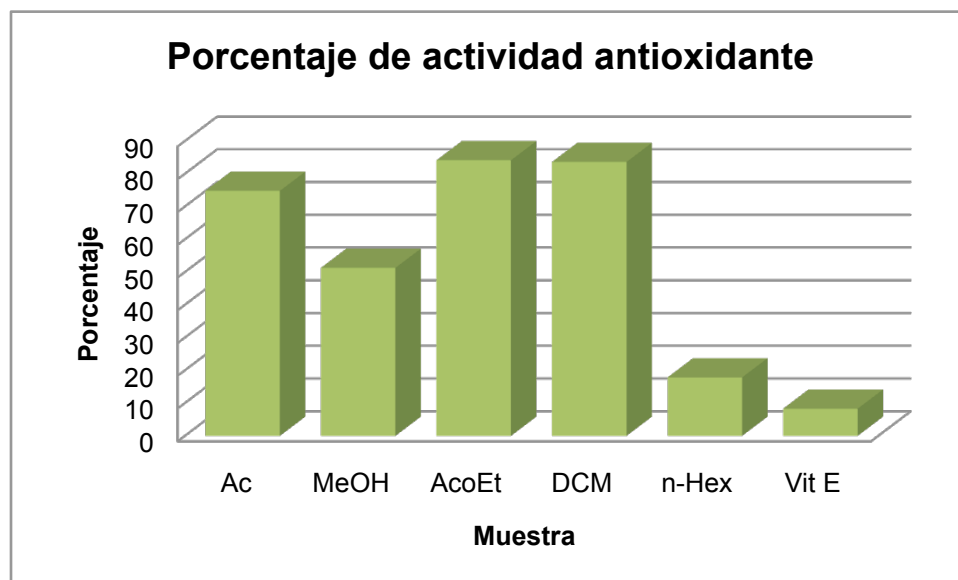


Figura 32. Porcentajes de actividad antioxidante determinada con el método de β -caroteno/ácido linoleico de extractos obtenidos de *Salvia pachyphylla*.

La capacidad atrapadora de radicales libres (CARL) fue expresada como porcentaje de reducción de la absorbancia inicial del ion DPPH por los extractos estudiados. Todos los extractos mostraron un CARL superior al 80 % evidenciando un alto potencial antioxidante de *S. pachyphylla*. Estas capacidades atrapadoras de DPPH de los extractos se muestran en la figura 33. Los valores de EC_{50} para estos extractos también fueron calculados (Tabla 5), estos valores indican la concentración de la muestra (mg extracto/mL etanol) requerida para atrapar el 50 % del radical DPPH. Todos los extractos demostraron tener actividades antiradicalarias significantes. El extracto de mayor potencial inhibitorio fue el AcoEt ($EC_{50}= 0.28$). La efectividad de antioxidantes como atrapadores del radical DPPH se ve reflejada en el siguiente orden descendiente: extracto AcoEt (0.28 mg/mL) > extracto *n*-hexano (0.41 mg/mL) >

extracto acuoso (0.51 mg/mL) > extracto diclorometano (0.65 mg/mL) > extracto metanol (1.03 mg/mL).

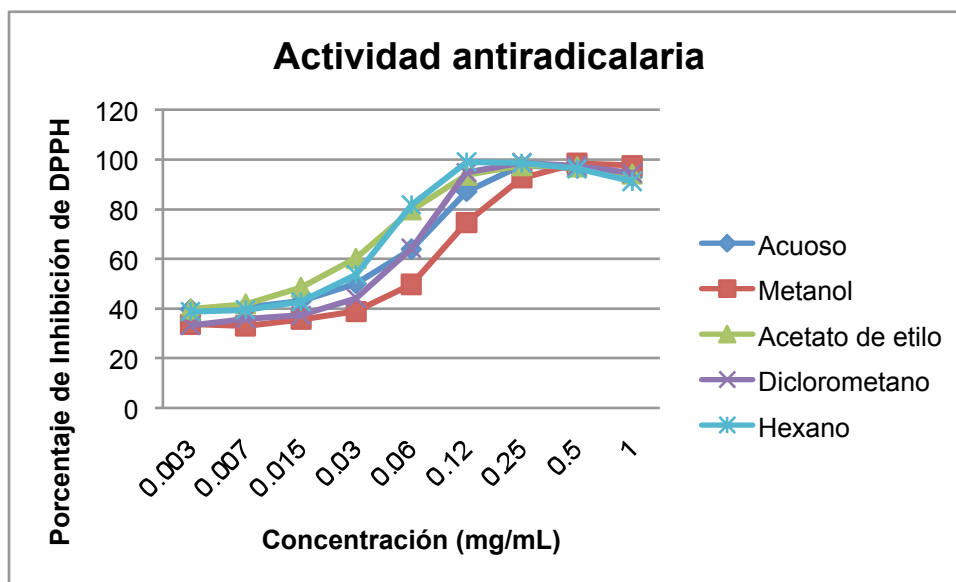


Figura 33. Porcentaje de inhibición de radical libre DPPH en presencia de los extractos evaluados frente a diferentes concentraciones

Tabla 5. Actividad de inhibición del radical libre DPPH de los extractos evaluados

Extracto	EC₅₀¹	AE²
<i>n</i> -Hex	0.41	2.43
DCM	0.65	1.53
AcoEt	0.28	3.57
MeOH	1.03	0.97
Acuoso	0.51	1.96

¹ Concentración eficiente (EC₅₀) (mg muestra/mg DPPH): cantidad de muestra o extracto necesaria (medida) como la concentración de solución stock agregada a la mezcla reacción) para bajar la concentración inicial de DPPH (60 µg) en un 50 %.

² Eficiencia antiradicalaria (AE) = 1/EC₅₀.

El contenido total de fenoles fue estimado como equivalentes de ácido gálico (EAG), expresados como mg de ácido gálico/g de extracto. Estos datos cuantitativos fueron calculados de su respectiva curva de calibración.

La curva de calibración obtenida para este ensayo se presenta en la figura 34. Los resultados (Tabla 6) muestran que, ambos extractos evaluados (MeOH y acuoso) contienen compuestos fenólicos en cantidades significativas.

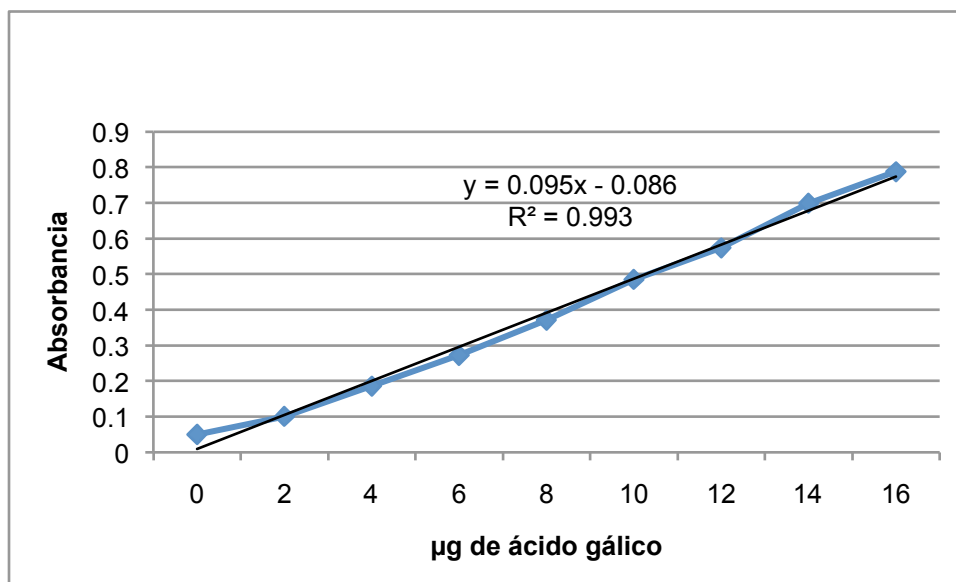


Figura 34. Curva de calibración utilizando ácido gálico como estándar a 760 nm

Tabla 6. Contenido de compuestos fenólicos en los extractos más polares de *Salvia pachyphylla*

Extracto	mg GA / g extracto ¹
MeOH	62
Acuoso	54

¹ Contenido total de fenoles estimados como miligramos de equivalentes de ácido gálico de ácido gálico por gramo de extracto.

Varios estudios han reportado relación entre el contenido fenólico y la actividad antioxidante. Algunos autores encontraron una correlación entre el contenido de compuestos fenólicos y la actividad antioxidante, mientras que otros no encontraron

relación. Velioglu, Mazza, Gao y Oomach (1998) reportaron una fuerte relación entre el contenido total fenólico y la actividad antioxidante en algunas frutas, vegetales y granos. Sin embargo, en el estudio realizado por Kähkönen *et al.* (1999) no se encontró correlación entre la actividad antioxidante y el contenido fenólico en algunos extractos de plantas que poseen compuestos fenólicos. En el presente trabajo, esta correlación fue encontrada para el extracto acuoso en la prueba de DPPH y en la prueba de decoloración de β -caroteno, mientras que para el extracto metanol no se encontró dicha correlación. Este hecho puede ser explicado de diversas formas, de hecho, el contenido total de compuestos fenólicos no incorpora todos los antioxidantes. Además, el sinergismo entre los antioxidantes en la mezcla hace a la actividad antioxidante no únicamente dependiente de la concentración, sino también de la estructura y la interacción entre los antioxidantes.

CAPÍTULO III

Actividad antitumoral de *Salvia pachyphylla*

3.1 Antecedentes

3.1.1 El proceso de cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades en las cuales el organismo produce un exceso de células malignas, con crecimiento y división más allá de los límites normales.

Este proceso puede ser resultado de eventos endógenos como errores en la replicación del ADN, la inestabilidad intrínseca de ciertas bases del ADN o el ataque de radicales libres generados durante el metabolismo celular. También puede ser resultado de procesos exógenos como radiaciones ionizantes, radiaciones ultravioleta y carcinógenos químicos. Aunque las células tienen mecanismos para reparar las alteraciones producidas, a veces hay errores en dichos mecanismos y los cambios introducidos en el genoma permanecen. Durante Esta transformación hay una serie de procesos en los que se alteran los genes implicados en el funcionamiento normal de la célula, responsables de mantener el equilibrio entre la proliferación y la muerte celular. El resultado consiste en la activación de estos genes, estimulando la proliferación o la protección contra la muerte celular (oncogenes) y en la activación de genes que normalmente actuarían inhibiendo la proliferación (genes supresores de tumor).

Finalmente una vez superados los controles de nacimiento y muerte celular el proceso de malignidad de la célula se “fija” cuando ésta es capaz de inmortalizarse y de obtener suficiente cantidad de oxígeno y nutrientes para mantener su elevado rango de proliferación. La célula maligna formará una nueva población de células genéticamente diferentes a la original, constituyendo el tumor.

Varios estudios experimentales y epidemiológicos han mostrado que los micronutrientes antioxidantes presentes en los alimentos pueden inhibir el proceso de carcinogénesis afectando los eventos moleculares ya sea en su inicio, en la promoción o en la fase de progresión (Henning *et al.*, 2004; Hercberg *et al.*, 2004; Visioli *et al.*, 2004; Davis y Utus, 2004).

La apoptosis es un proceso esencial para el mantenimiento de la homeostasis en organismos multicelulares y es inducida por señales regulatorias tales como hormonas, citocinas y factores de crecimiento (Hayashi, 1998) jugando un papel crucial en una variedad de condiciones fisiológicas y patológicas. De hecho, los fármacos anticáncer modularían los reguladores extrínsecos e intrínsecos de apoptosis y sensibilizarían a las células cancerosas a apoptosis mientras, idealmente, evitarían el efecto citotóxico en células normales.

La quimioterapia ha demostrado su utilidad en el tratamiento de ciertas forma de cáncer; las plantas superiores han sido una fuente útil de compuestos antitumorales de importancia clínica, en consecuencia resulta importante rastrear los productos antitumorales de origen natural mediante modelos *in vivo* y/o *in vitro*, entre los que destacan los ensayos de citotoxicidad como uno de los indicadores de actividad

antitumoral inicial. A pesar de la gran variedad de plantas mexicanas, el porcentaje de especies estudiadas por su actividad antineoplásica, es bajo.

3.1.2 Estudios de citotoxicidad en especies de *Salvia*

Un diterpeno aislado de *Salvia prionitis* Hance exhibió no únicamente actividad antibacteriana, antituberculosis y antipirética sino también propiedad citotóxica cuando se evaluó *in vitro* en contra de líneas celulares (Zhang *et al.*, 1999). Sucesivamente este producto natural ha sido modificado estructuralmente para dar un compuesto nuevo, llamado *salvicina*, el cual mostró una marcada actividad antitumoral en líneas celulares de tumores sólidos (Qing *et al.*, 2001). La *salvicina* fue considerada un prometedor compuesto para desarrollar un nuevo fármaco anticancerígeno y ha sido seleccionado para estudios preclínicos.

En un estudio para examinar la actividad antiproliferativa *in vitro* de los extractos metanólicos crudos de seis especies de *Salvia*: *Salvia dominica* L., *S. lanigera* Desf., *S. menthaefolia* Ten., *S. palaestina* Benth., *S. sclarea* L. y *S. spinosa* L.; *S. menthaefolia* exhibió una marcada actividad antiproliferativa en contra de nueve líneas celulares de cáncer, mostrando bajos valores de EC_{50} , mientras que los extractos de *S. spinosa*, *S. sclarea* y *S. dominica* registraron un grado de actividad citotóxica dependiente del tipo de línea celular. Finalmente el extracto de *S. palaestina* reveló un moderado efecto antiproliferativo únicamente en contra de 3 de las nueve líneas celulares probadas (Fiore *et al.*, 2006).

Los aceites esenciales de *Salvia fruticosa* y los tres principales componentes exhibieron actividad citotóxica en contra de células Vero y altos niveles de actividad antiviral en herpes simplex (Sivropoulou *et al.*, 1997).

Una serie de triterpenos altamente hidroxilados fueron aislados de especies de *Salvia* endémicas de Turquía, *S. kronenburgii* (Topcu *et al.*, 2004; Topcu y Ulubelen, 1999) y el compuesto más abundante del extracto, 1 β -2 α ,3 β ,11 α -tetrahidroxiurs-12-eno, fue encontrado altamente citotóxico cuando se probó contra líneas celulares tumorales de riñón, pulmón y mama, además mostró actividad moderada en contra de una serie de líneas celulares de las 60 líneas tumorales del Instituto Nacional del Cáncer (Topcu *et al.*, 2004).

Estos hallazgos fortalecen la evidencia de que las especies de *Salvia* podrían ser consideradas como una fuente natural de agentes antitumorales potenciales.

3.1.3 Técnica empleada para el estudio de la actividad antitumoral

Los ensayos de actividad antitumoral *in vitro* desempeñan un papel significativo tanto en la evaluación aleatoria de nuevos productos (*random screening*) como en el diseño racional de nuevos compuestos anticancerígenos. Los ensayos *in vitro* se pueden clasificar en dos grupos según estén basados: a) en células o b) en dianas moleculares. Las técnicas modernas de biología molecular permiten caracterizar e introducir una variedad de dianas moleculares (enzimas, ARN, ADN, etc.) en diferentes líneas celulares para el desarrollo racional de nuevos fármacos. Su objetivo consiste en la realización de un diseño experimental para evaluar la citotoxicidad de productos

químicos de origen sintético o natural frente a líneas celulares tumorales de origen humano.

3.2 Desarrollo experimental

3.2.1 Determinación de la actividad antitumoral

El estudio fue realizado en el laboratorio BIOLAB del Instituto Universitario de Bio-Orgánica “Antonio González” en Tenerife, España bajo la dirección del Dr. José Manuel Padrón.

El procedimiento consistió de 3 partes:

Parte 1. Cultivo de células, tripsinización, viabilidad y recuento celular.

Las células se cultivaron en frascos estériles especialmente tratados para el cultivo celular. Éstas fueron mantenidas en un medio de cultivo suplementado con 5 % de suero fetal bovino inactivado por calor y 2 mM en *L*-glutamina; los medios de cultivo más habituales son DMEM (por sus siglas en inglés Dulbecco's Modified Eagle's Medium) y RPMI 1640 (Roswelll Park Memorial Institute). Las células se mantuvieron en incubación a 37 °C, 95 % de humedad y 5 % de atmósfera de CO₂.

Las células adheridas a la superficie del frasco formando una monocapa fueron recogidas mediante tripsinización. Para esto se aspiró el medio de cultivo, las células fueron lavadas con 2 – 3 mL de medio PBS (Phosphate buffered saline) estéril, luego se retiró el medio PBS y se añadió 0.5 – 1 mL de disolución tripsina – EDTA

(Ethylenediaminetetraacetic acid). Se incubaron durante 1 minuto y se transfirieron a un tubo de 15 mL estéril.

Posteriormente se determinó la densidad de células viables usando una cámara hemocitométrica de Neubauer y la viabilidad mediante la tinción vital de azul de tripán (colorante de exclusión), el cual es uno de los más comunes. El azul de tripán es un coloide que se introduce en el interior de las células que presentan roturas en su membrana. Así pues, las células que aparecieron coloreadas de azul fueron consideradas no viables.

Parte 2. Siembra, establecimiento de controles y adición de productos para el examen de citotoxicidad.

Para la realización de los ensayos de citotoxicidad, las células se cultivaron en placas de 96 pocillos de fondo plano en diferentes densidades tal como se muestra en la figura 35, de la placa de 96 pocillos las filas superior e inferior y la última columna de la derecha fueron descartadas debido al efecto de evaporación del disolvente. De este modo la primera columna de la izquierda contuvo únicamente medio de cultivo (blanco), la segunda columna se destinó a cultivar las células que no fueron expuestas a los extractos (control), y las columnas siguientes contuvieron las células que fueron expuestas a concentraciones decrecientes del extracto. Para cada extracto se utilizaron tres filas, es decir, una serie de diluciones del extracto fue evaluada por triplicado.

Los extractos fueron disueltos en DMSO (Dimetil sulfóxido) a una concentración de 250 µg/mL. Esta disolución stock fue conservada a – 70 °C.

Los extractos fueron probados contra 6 líneas celulares tumorales de origen humano clasificadas como A2780, SW1573, WiDr, T-47D, HBL-100 y HeLa correspondientes a línea celular de ovario, línea celular de pulmón, línea celular de colon, línea celular de mama, línea celular de mama (hormona dependiente) y línea celular de cérvix respectivamente. Estas líneas celulares son ejemplos de tumores sólidos, y son equivalentes a las del programa de *screening* anticanceroso del Instituto Nacional de Cáncer (N.C.I. – E.U.A.).

Parte 3. Determinación de IG_{50} mediante el método colorimétrico SRB.

Tras exponer las células durante 48 h a una serie de diluciones seriadas del extracto, se procedió a la determinación de IC_{50} con la técnica de la sulforrodamina B (SRB), la cual es un ensayo colorimétrico, no radiactivo, de cuantificación espectrofotométrica basado en la unión electrostática de la SRB (Figura 36) a los aminoácidos básicos fijados con ácido tricloroacético (TCA). Esta técnica es sensible, rápida y sencilla en comparación con otras como por ejemplo bromo deoxiuridina (BrdU) o MTT y sus variantes el XTT o el MTS.

Los valores de absorbancia fueron obtenidos a 492 nm usando un lector Bio-Tek's Elx800 NB. El porcentaje de crecimiento de los niveles de concentración de los extractos fue calculado con respecto a la diferencia de la absorbancia inicial y final de los extractos evaluados. A partir de estos datos se calculó el parámetro IG_{50} , definido como la concentración necesaria para reducir en un 50 % el crecimiento de las células tratadas comparadas con las células sin tratamiento.

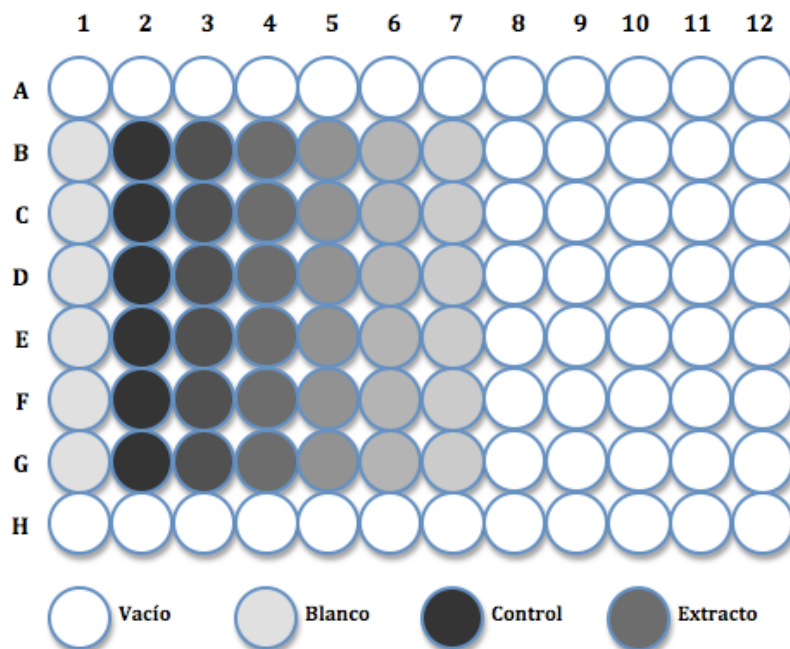


Figura 35. Esquema del experimento de citotoxicidad

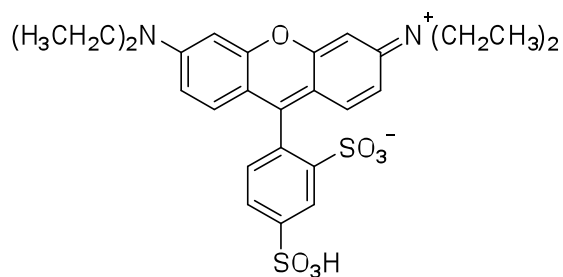


Figura 36. Sulforrodamina B

3.3 Resultados y discusión

En los resultados de los bioensayos antiproliferativos que se muestran en la tabla 7, se pudo establecer que los extractos diclorometano y *n*-hexano presentaron una mayor actividad biológica en las seis líneas celulares ensayadas dentro del rango

aproximado de 5 a 10 μM . Como puede observarse también en esta tabla, los extractos polares acuoso y metanol fueron los menos bioactivos; preliminarmente estos datos nos sugieren que los metabolitos muy polares de *Salvia pachyphylla* tales como azúcares y otros componentes polihidroxilados no fueron bioactivos en estos estudios celulares presumiblemente por carecer de funcionalidades químicas que pudieran fortalecer o auxiliar a los mecanismos anticancerosos de tipo citostático o citotóxico. Otra posibilidad pudiera deberse a que son principalmente hidrosolubles y la falta de fragmentos lipofílicos no favorece el coeficiente de partición para que estos productos puedan desplazarse o transportarse hacia los sitios específicos de acción.

Por otro lado se observó que la línea celular de cáncer de ovario A2780 presentó una mayor sensibilidad a los extractos analizados y la de cáncer de colon WiDr mostró una mayor resistencia en estos bioensayos.

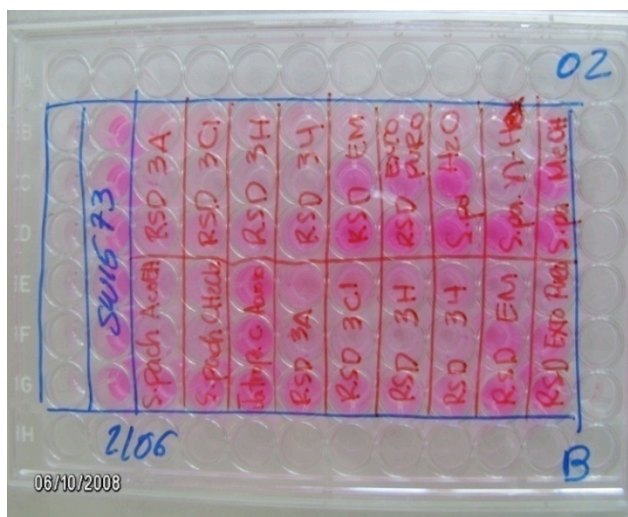


Figura 37. Ensayo de citotoxicidad en línea celular de pulmón

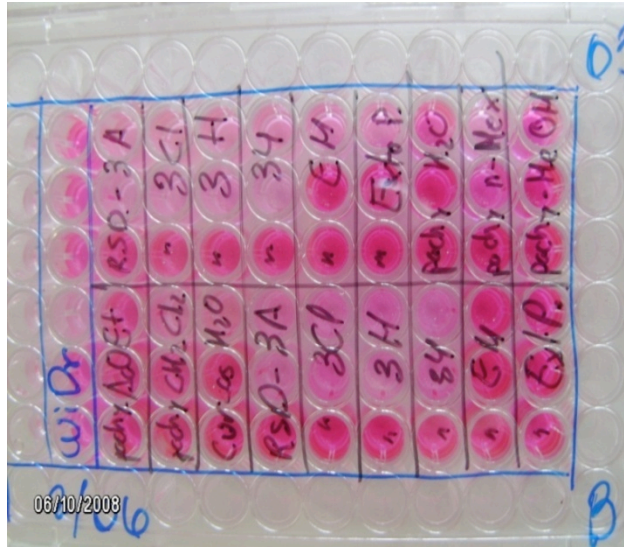


Figura 38. Ensayo de citotoxicidad en línea celular de colon

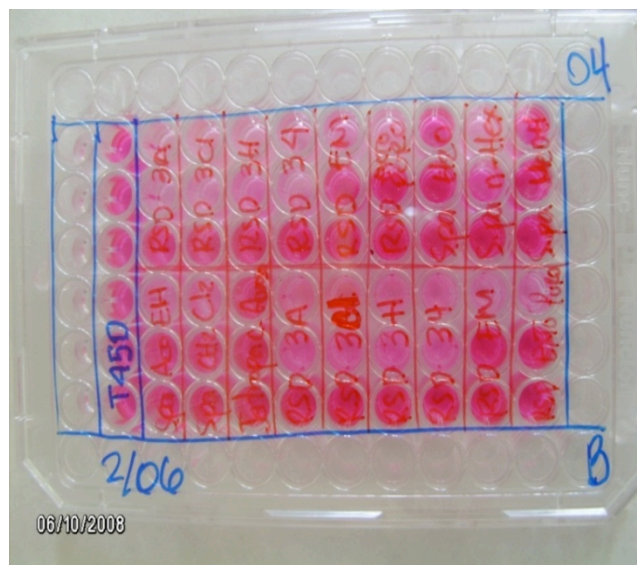


Figura 39. Ensayo de citotoxicidad en línea celular de mama

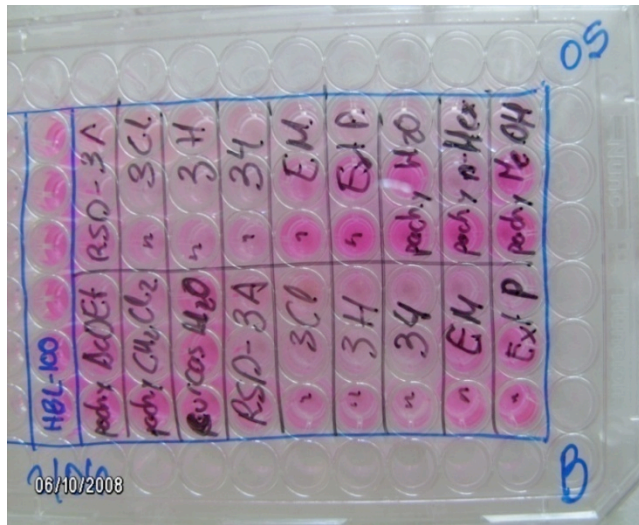


Figura 40. Ensayo de citotoxicidad en línea celular de mama (hormona dependiente)

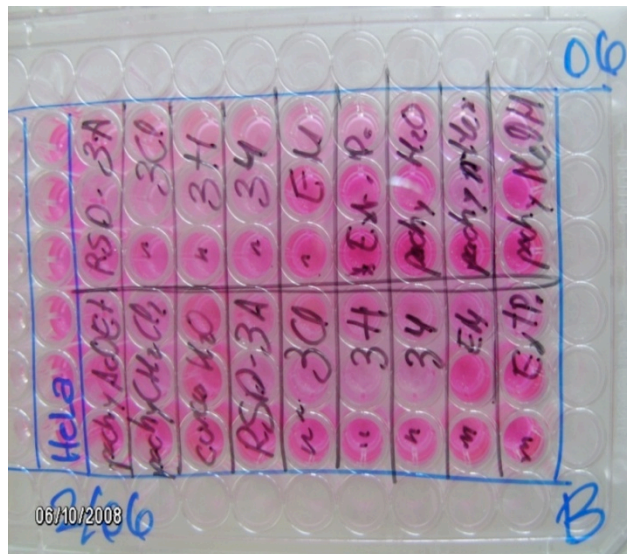


Figura 41. Ensayo de citotoxicidad en línea celular de cérvix

Tabla 7. Valores de inhibición del crecimiento frente a las distintas líneas celulares evaluadas

GI₅₀ (µg/mL)¹						
Extracto	A2780²	SW1573³	WiDr⁴	T-47D⁵	HBL-100⁶	HeLa⁷
<i>n</i> -Hex	6.0	6.6	8.6	11	5.9	6.1
DCM	5.4	7.7	9.9	9.9	6.7	8.3
AcoEt	6.5	15	53	38	18	40
MeOH	34	70	182	161	64	71
Acuoso	52	74	209	200	55	77

¹Concentración necesaria para reducir en un 50 % el crecimiento de las células. ²Línea celular de cáncer de ovario. ³Línea celular de cáncer de pulmón. ⁴Línea celular de cáncer de colon. ⁵Línea celular de cáncer de mama. ⁶Línea celular de cáncer de mama (hormona dependiente). ⁷Línea celular de cáncer de cérvix.

CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio mostraron que la actividad antioxidante no está simplemente relacionada con los compuestos fenólicos totales determinados en los extractos más polares (acuoso y metanol). Los siguientes hechos deben ser tomados en cuenta: el hecho de que puedan ocurrir interacciones entre los componentes de los extractos. El sinergismo entre los antioxidantes en la mezcla hace que la actividad antioxidante no dependa únicamente de la concentración, sino también de la estructura.

Cabe señalar que la actividad antioxidante medida por un solo ensayo individual refleja únicamente la reactividad química bajo condiciones específicas aplicados en dicho ensayo, por lo que es necesario el uso de diferentes pruebas para evaluar la inhibición de diferentes mecanismos de oxidación.

Pensamos que los resultados presentados en este estudio resultan muy novedosos debido a la especie estudiada ya que la literatura no revela ninguna referencia en previos trabajos en la actividad antioxidante de *S. pachyphylla*.

En relación a los bioensayos antitumorales realizados con las diferentes líneas celulares, el presente estudio demostró que los extractos de *n*-hexano y diclorometano tienen capacidad de inhibir el porcentaje de crecimiento celular tumoral, al presentar valores menores de IC₅₀, sugiriendo la presencia de compuestos bioactivos.

Se observó que la línea celular de cáncer de ovario, A2780 resultó ser la más sensible con valores para los extractos más activos de entre 5.4 y 6.5 μM y la línea celular que mostró mayor resistencia fue la de colon, WiDr.

Al presentar los extractos de diclorometano y *n*-hexano una mayor capacidad para capturar al radical DPPH y una mayor actividad en la inhibición de proliferación de células cancerosas, nos permite establecer que estos productos son los mejores candidatos para su aislamiento e identificación de los metabolitos secundarios de *Salvia pachyphylla*.

En un trabajo futuro se sugiere un mayor número de estudios para determinar con certeza si existe una correlación entre las actividades antioxidante y antitumoral que presentaron en común los productos naturales que conforman los extractos con mayor actividad.

Los productos naturales, como fuente de agentes quimioterapéuticos, han sido una alternativa, hasta ahora alentadora. Durante las últimas décadas, el enfoque sobre la inducción de apoptosis de nuevas sustancias ha tomado gran interés en la comunidad científica, demostrando, muchos autores esta propiedad en distintas plantas (Liu *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 1992).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdalla, A. E. y Roozen, J. P. (1999). Effect of plant extracts on the oxidative stability of sunflower oil and emulsion. *Food Chemistry*, 64:323-329.
- Adams, J. D., Wang, R., Yang, J. y Lien, E. J. (2006). Preclinical and clinical examinations of *Salvia miltiorrhiza* and its tanshinones in ischemic conditions. *Chin. Med.*, 1:3.
- Akhondzadeh, S., Noroozian, M., Mohammadi, M., Ohadinia, S., Jamshidi, A. H. y Khani, M. (2003). *Salvia officinalis* extract in the treatment of patients with mild to moderate Alzheimer's disease: a double blind, randomized and placebo-controlled trial. *Journal of Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 28:53-59.
- Alarcón-Aguilar, F. J., Román-Ramos, R., Flores-Sáenz, J. L. y Aguirre-García, F. (2002). Investigation on the hypoglycaemic effects of extracts of four Mexican medicinal plants in normal and alloxan-diabetic mice. *Phytother. Res.*, 16:383-386.
- Baytop, T. (1984). Therapy with medicinal plants of Turkey; University of Istanbul Pub. (No. 3255): Istanbul, pp. 156-158.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181:1199-1200.

- Bondet, V., Brand-Williams, W. y Berset, C. (1997). Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie/Food Science and Technology*, 30:609-615.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E. y Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie/Food Science and Technology*, 28:25-30.
- Burda, S. y Oleszek, W. (2001). Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J. Agricul. Food Chem.*, 49:2774-2779.
- Cano y Cano, G. y J. S. Marroquín. (1994). Taxonomía de plantas superiores. Ed. Trillas, México, D. F. pp. 290-291.
- Córdova Guerrero, I. (2006). Tesis doctoral Estudio fitoquímico de *S. pachyphylla* y *S. clevelandii*. Aproximación sintética de diterpenos y sus derivados: evaluación de actividades biológicas. Universidad de La Laguna.
- Cortés-Rodríguez, E. A. (1987). Estudio comparativo de los grupos indígenas Kumaii y Paipai del norte de Baja California. Tesis de licenciatura en Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, Baja California.
- Cuvelier, M. E., Berset, C. y Richard, H. (1994). Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis*). *J. Agric. Food Chem.*, 42:665-669.
- Chang, H. M. y But, P. (1986). *Pharmacology and applications of chinese material medica*; World Scientific Publising Co.; Singapore, Vol. 1, pp. 225-268.

- Daniela, T. (1993). *Salvia officinalis* L. I. Botanic characteristics, composition, use and cultivation. *Cesk Farm.* 42:111-116.
- Dapkevicius, A., Venskutonis, R., Beek, T. A. y Linssen, P. H. (1998). Van Antioxidant activity of extracts obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77:140-146.
- Das, N. P. y Pereira, T. A. (1990). Effects of flavonoids on thermal autoxidation of palm oil: structure-activity relationships. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 67:255-258.
- Davis, P. H. (1982). Flora of Turkey and East Aegean Islands; *Edinburgh University Press: Edinburgh*, 7:401-461.
- Davis, C. D. y Uthus, E. O. (2004). DNA methylation, cancer susceptibility, and nutrients interactions. *Exp. Biol. Med.* (Maywood), 229:988-995.
- Delgadillo, J. (1997). Florística y ecología del norte de Baja California. Universidad Autónoma de Baja California, Mexicali, B. C. 405 pp.
- Delgadillo, J. (2004). El bosque de coníferas de la Sierra de San Pedro Mártir. Instituto Nacional de Ecología, México, D. F. p. 125.
- Delgadillo, J. y Peinado, M. (2008). Diversidad vegetal de los bosques de coníferas de las sierras Juárez y San Pedro Mártir, Baja California. VI Simposio Internacional sobre Flora Silvestre en Zonas Áridas, CIB-UNISON-CONAFOR, La Paz, Baja California Sur. 12 al 15 de Marzo, 2008. pp. 96-117.

Dr. Duke's Phytochemical and Ethnobotanical Databases at
<http://www.arsgrin.gov/duke/plants.html> y
<http://www.innvista.com/health/herbs/sage.htm>.

Farnsworth, N. R. y Bingel, A. S. (1977). Problems and prospects of discovering new drugs from higher plants by pharmacological screening. In: New natural products and plant drugs with pharmacological, biological or therapeutic activity. Ed. Wagner, H. y Wolff, P. pp. 1-22.

Fiore, G., Nencini, C., Cavallo, F., Capasso, A., Bader A., Giorgi, G. y Micheli, L. (2006). *In vitro* antiproliferative effect of six *Salvia* species on human tumor cell lines. *Phytotherapy Research*, 20:701-703.

Flores-Villela, O. y Gerez, P. (1994). Biodiversidad y conservación en México: Vertebrados, vegetación y uso del suelo. Conabio y Universidad Nacional Autónoma de México, México, D. F. pp. 439.

Foster, S. y Tyler, V. E. (2000). *Tyler's Honest Herbal*; 4th ed., The Haworth Press; Binghamton, NY, pp. 327-329 y 414-415.

Gómez-Alonso, S., Fregapane, G., Salvador, M. D. y Gordon, M. H. (2003). Changes in phenolic composition and antioxidant activity of virgin olive oil during frying. *J. Agric. Food Chem.*, 51:667-672.

Gonzales, A. G., Abad, T., Jiménez, I. A., Ravelo, A. G., Luis, J. G., Aguiar, Z., San Andrés, L., Plasencia, M., Herrera, J. R. y Moujir, L. (1987). A first study of

- antibacterial activity of diterpenes isolated from some *Salvia* species. *Biochem. Syst. Ecol.*, 17:293-296.
- Hadj, Karima, Ali, M., Ammar, S., Michel, L., Millet-Clerc, J., Chaumont, J. P., Mighri, Z. y Aouni, M. (2006). Antimicrobial y antioxidant activities of the methanolic extracts of three *Salvia* species from Tunisia. *Natural Product Research*, 20:1110-1120.
- Hanson, I. W. y Hocking, G. M. (1957). Garden sage. *Economic Botany*, 11:64.
- Hayashi, N. (1998). Apoptosis in liver disease. *Internal. Medicine*, 37:191-192.
- Hedge, I. C. (1992). A global survey of the biogeography of the labiatae. In: Harley, R. M. & Reynolds, T. (eds.). *Advances in Labiatae science: Kew: Royal Botanic Garden, Kew.* pp. 7-17.
- Henning, S. M., Niu, Y., Lee, N. H., Thames, G. D., Minutti, R. R., Wang, H., Go, V. L. y Heber, D. (2004). Bioavailability and antioxidant activity of tea flavonols after consumption of green tea, black tea or a green tea extract supplement. *Am. J. Clin. Nutr.*, 80:1558-1564.
- Hercberg, S., Galan, P., Preziosi, P., Bertrais, S., Mennem, L., Malvy, D., Roussel, A. M., Favier, A. y Briancon, S. (2004). The SU.VI.MAX study: a randomized, placebo-controlled trial of the health effects of antioxidant vitamins and minerals. *Arch. Intern. Med.*, 164:2335-2342.
- Hernández-Pérez, M., Rabanal, R. M., de la Torre, M. C. y Rodríguez, B. (1995). Analgesic, antiinflammatory, antipyretic and haematological effects of

- aethiopinone, an o-naphthoquinone diterpenoid from *Salvia aethiopis* roots and two hemisynthetic derivatives. *Planta Med.*, 61:505-509.
- Hosseinzadeh, H., Haddadkhodaparast, M. H. y Arash, A. R. (2003). Antinociceptive, anti-inflammatory and acute toxicity effects of *Salvia leriifolia* Benth seed extract in mice and rats. *Phytother. Res.*, 17:422-425.
- Jayaprakasha, A. L., Singh, R. P. y Sacariah, K. K. (2001). Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. *Food Chem. Toxicol.*, 73:285-290.
- Jiang, R. W., Lau, K. M., Hon, P. M., Mak, T. C. W., Woo, K. S. y Fung, K. P. (2005). Chemistry and biological activities of caffeic acid derivatives from *Salvia miltiorrhiza*. *Curr. Med. Chem.*, 12:237-246.
- Kähkönen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J. P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., *et al.* (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 47:3954-3962.
- Kamatou, G. P., Viljoen, A. M., Gono-Bwalya, A. B., Zyl, R. L., Vuuren, S. F., Lourens, A. C., Baser, K. H. C., Demirci, B., Lindsey, K. L., Staden, J. V. y Steenkamp, P. J. (2005). *J. Ethnopharmacol.*, 102:382-390.
- Kennedy, D. O., Pace, S., Haskell, C., Okello, E. J., Milne, A. y Scholey, A. B. (2006). Effects of cholinesterase inhibiting Sage (*Salvia officinalis*) on mood, anxiety and performance on a psychological stressor battery. *Neuropsychopharmacol.*, 31:845-852.

- Kim, J.-K., Noh, J. H., Lee, S., Choi, J. S., Suh, H., Chung, H. Y., Song, Y.-O. y Choi, W. C. (2002). The first total synthesis of 2,3,6-tribromo-4,5-dihydroxybenzyl methyl ether (TDB) and its antioxidant activity. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 23:661-662.
- Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., Griel, A. E. y Etherton, T. D. (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am. J. Med.*, 113:71-88.
- Lebeau, J., Furman, C., Bernier, J.-L., Duriez, P., Teissier, E. y Cotelle, N. (2000). Antioxidant properties of di-tert-butylhydroxylated flavonoids. *Free Radic. Biol. Med.*, 29:900-912.
- Lima, C. F., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Fernandes-Ferreira, M. y Pereira-Wilson, C. (2005). The drinking of *Salvia officinalis* infusion improves liver antioxidant status in mice and rats. *J. Ethnopharmacology*, 97:383-389.
- Lin, L.-Z., Wang, X.-M., Huang, Y. y Cordell, G. A. (1989). Antibacterial, antituberculous and antiphlogistic activities. *Phytochemistry*, 28:3542-3543.
- Lin, Y., Chiang, H., Kan, W., Hone, E. y Shih, S. (1992). Immunomodulatory activity of various fractions derived from *Physalis angulata*. *Amer. J. Chin. Med.*, 20:233-243.
- Liu, J., Shen, H. M. y Ong, C. N. (2000). *Salvia miltiorrhiza* inhibits cell growth and induces apoptosis in human hepatoma HepG(2) cells. *Cancer Lett.*, 153:85-93.

- Lu, Y. y Foo, L. Y. (2002). Polyphenolics of *Salvia* – a review. *Phytochemistry*, 59:117-140.
- Molyneux, Philip. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 26:211-219.
- Nan, J.-X., Park, E.-J., Kang, H.-C., Park, P.-H., Kim, J.-Y. y Sohn, D. H. (2001). Anti-fibrotic effects of a hot water extract from *Salvia miltiorrhiza* roots on liver fibrosis induced by biliary obstruction in rats. *Journal of Pharm. Pharmacol.*, 53:197-204.
- Ninomiya, K., Matsuda, H., Shimoda, H., Nishida, N., Kasajima, N., Yoshino, T., Morikawa, T. y Yoshikawa, M. (2004). *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 14:1943-1946.
- Ortega, A., Blount, J. F. y Marchand, P. S. (1982). Salvinorin, a new trans-Neoclerodane diterpene from *Salvia divinorum* (Labiatae). *Journal of the Chemistry Society, Perkin Transactions*, 1: 2505-2508.
- Perfumi, M., Arnold, N. y Tacconi, R. (1991). Hypoglycemic activity of *Salvia fruticosa* Mill. from Cyprus. *Journal of Ethnopharmacolog*, 34:135-140.
- Pitarokili, D., Tzakou, O., Loukis, A. y Harvala, C. (2003). Volatile metabolites from *Salvia fruticosa* as antifungal agents in soilborne pathogens. *J. Agric. Food Chem.*, 51:3294-3301.
- Pokorny, J. (1991). Natural antioxidants for food use. *Trends in Food Science and Technology*, 9:223-227.

- Qi, X. G. (1991). Protective mechanism of *Salvia miltiorrhiza* and *Paeonia lactiflora* for experimental liver damage. *Chin. J. Integr. Trad. West. Med.*, 11:102-104.
- Qing, C., Jiang, C., Zhang, J. S. y Ding, J. (2001). Induction of apoptosis in human leukemia K-562 and gastric carcinoma SGC-7901 cells by salvicine, a novel anticancer compound. *Anticancer Drugs*, 12:51-56.
- Romo de Vivar Romo, A. (2006). Química de la flora mexicana. Universidad Nacional Autónoma de México. 223 pp.
- Sadler, M. J., Strain, J. J. y Caballero, B. (1999). Diet and antioxidant defense. *Encyclopedia of Human Nutrition*, 95-105.
- Sanchez-Moreno, C. (2002). Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Sci. Tech. Int.*, 8:121-137.
- Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca. (1996). Programa de áreas naturales protegidas de México. México, D. F. pp. 138.
- Schwarz, K. y Ternes, W. (1992). Antioxidative constituents of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis*. II. Isolation of carnosic acid and formation of other phenolic diterpenes. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschun*, 195:99-103.
- Schwarz, K., Bertelsen, G., Nissen, L. R., Gardner, P. T., Heinonen, M. I., Hopia, A., Huynh-Ba, T., Lambelet, P., McPhail, D., Skibsted, L. H. y Tijburg, L. (2001). Investigation of plant extracts for the protection of processed foods against lipid

- oxidation. Comparison of antioxidant assays based on radical scavenging, lipid oxidation and analysis of the principal antioxidant compounds. *Eur. Food Res. Technol.*, 212:319-328.
- Sivropoulou, A., Nikolaou, C., Papanikolaou, E., Kokkini, S., Lanaras, T. y Arsenakis, M. (1997). Antimicrobial, cytotoxic, and antiviral activities of *Salvia fruticosa* essential oil. *J. Agric. Food Chem.*, 45:3197-3201.
- Steinegger, E. y Hansel, R. (1988). Lehrbuch der Pharmakognosie, 4th Ed; Springer-Verlag: Berlin, pp. 343-345.
- Taylor, R. M. y Ayers, T. J. (2006). Systematics of *Salvia pachyphylla* (Lamiaceae). *Madroño*, 53:11-24.
- Tkachuk, V. G. y Shapoval, V. V. (1987). Effect of *Salvia sclarea* essential oil on indices of the hematopoietic, immune and enzyme systems. *Vranch Delo*, 5:83-84.
- Topcu, G., Tan, N., Gokdill, G. y Ulubelen, A. (1997). Terpenoids from *Salvia glutinosa*. *Phytochemistry*, 45:1293-1294.
- Topcu, G. y Ulubelen, A. (1999). Terpenoids from *Salvia kronenburgii*. *J. Nat. Prod.*, 62:1605-1608.
- Topcu, G., Turkmen, Z., Ulubelen, A., Schilling, J. K. y Kingston, D. G. I. (2004). Highly hydroxylated triterpenes from *Salvia kronenburgii*. *J. Nat. Prod.*, 67:118-121.
- Topcu, G. (2006). Bioactive triterpenoids from *Salvia* species. *J. Nat. Prod.*, 69:482-487.

- Ulubelen, A., Evren, N., Tuzlaci, E. y Johansson, C. (1988). Diterpenoids from the roots of *Salvia hypargeia*. *J. Nat. Prod.*, 51:1178-1183.
- Ulubelen, A., Topcu, G., Tan, N., Lin, L.-J. y Cordell, G. A. (1992). Microstegiol, a rearranged diterpene from *Salvia microstegia*. *Phytochemistry*, 31:2419-2421.
- Ulubelen, A., Topcu, G., Eri, C., Sönmez, U., Kartal, M., Kurucu, S. y Bozok-Johansson, C. (1994). Terpenoids from *Salvia sclarea*. *Phytochemistry*, 36:145-147.
- Ulubelen, A., Sönmez, U., Topcu, G. y Bozok-Johansson, C. (1996). An abietane diterpene and two phenolics from *Salvia forskahlei*. *Phytochemistry*, 42:145-147.
- Ulubelen, A., Topcu, G., Bozok-Johansson, C. (1997). Norditerpenoids and diterpenoids from *Salvia multicaulis* with antituberculous activity. *J. Nat. Prod.*, 60:1275-1280.
- Ulubelen, A., Topcu, G., Chai, H.-B. y Pezzuto, J. M. (1999). Cytotoxic activity of diterpenes isolated from *Salvia hypargeia*. *Pharm. Biol.*, 37:148-151.
- Ulubelen, A. (2003). Cardioactive and antibacterial terpenoids from *Salvia* species. *Phytochemistry*, 64:395-399.
- Van Beek, T. A. y A. E. de Grott. (1986). Terpenoid antifeedants Part I: An overview of terpenoid antifeedants of natural origin. *Recl. Tray. Chim. Pays-Bass*, 105:513-527.
- Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L. y Oomah, B. D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in select fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46:4113-4117.

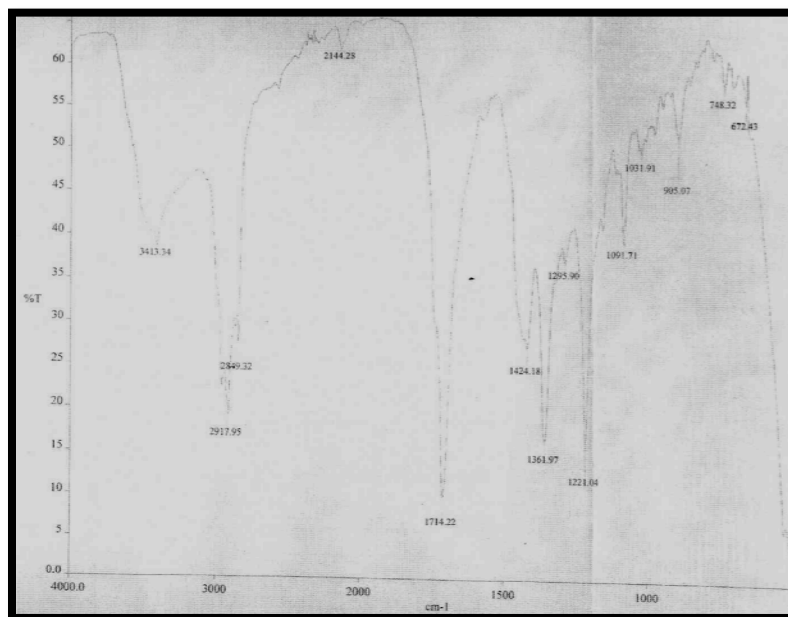
- Vichi, S., Zitterl-Eglseer, K., Jugl, M. y Franz, Ch. (2001). Determination of the presence of antioxidants deriving from sage and oregano extracts added to animal fat by means of assessment of the radical scavenging capacity by photochemiluminescence analysis. *Nahrung/Food*, 45:101-104.
- Visioli, F., Borsani, L. y Galli, C. (2000). Diet prevention of coronary heart disease: the potential role of phytochemicals. *Cardiovasc. Res.*, 47:419-425.
- Visioli, F., Grande, S., Bogani, P. y Galli, C. (2004). The role of antioxidants in the Mediterranean diets: focus on cancer. *Eur. J. Cancer Prev.*, 13:337-343.
- Wagner, H. (1977). Pharmaceutical and economic use of the Labiatae and Rutaceae families. *Rev. Latinoam. Quim.*, 8:16-25.
- Wanasundara, U. N., Amarowicz, R. y Shahidi, F. (1996). Partial characterization of natural antioxidants in canola meal. *Food Research International*, 28 (6):525-530.
- Weisburger, J. H. (1999). Mechanism of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes, and tea. *Food Chem. Toxicol.*, 37:943-948.
- Yang, J. H., Lin, H. C. y Mau, J. L. (2002). Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chem.*, 77:229-235.
- Yepez, B., Espinosa, M., López, S. y Bolaños, G. (2002). Producing antioxidant fractions from herbaceous matrices by supercritical fluid extraction. *Fluid Phase Equil.*, 194:879-884.
- Yildirim, A., Mavi, A., Oktay, M., Kara, A. A., Algur, Ö. F. y BilaloğUlu, V. (2000). Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of tilia (*Tilia argentea* Desf

- ex DC), sage (*Salvia triloba* L.), and black tea (*Camelia sinensis*) extracts. *J. Agric. Food Chem.*, 48:5030-5034.
- Yuan, D., Pan, Y., Fu, W., Makino, T. y Kano, Y. (2005). Quantitative analysis of the marker compounds in *Salvia miltiorrhiza* root and its phytomedicinal preparations. *Chem. Pharm. Bull.*, 53:508-514.
- Zang, J. S., Ding, J. y Tang, Q. M. (1999). Synthesis and antitumor activity of novel diterpenequinone salvicine and the analogs. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 9:2731-2736.
- Zhao, G. R., Xiang, Z. J., Ye, T. Y., Yuan, Y. J. y Guo, Z. X. (2007). Antioxidant activities of *Salvia miltiorrhiza* and *Panax notoginseng*. *Food Chem.*, 99:767-774.
- Zhu, Q. Y., Hackman, R. M., Ensunsa, J. L., Holt, R. R. y Keen, C. L. (2002). Antioxidative activities of colong tea. *J. Agric. Food Chem.*, 50:6929-6.

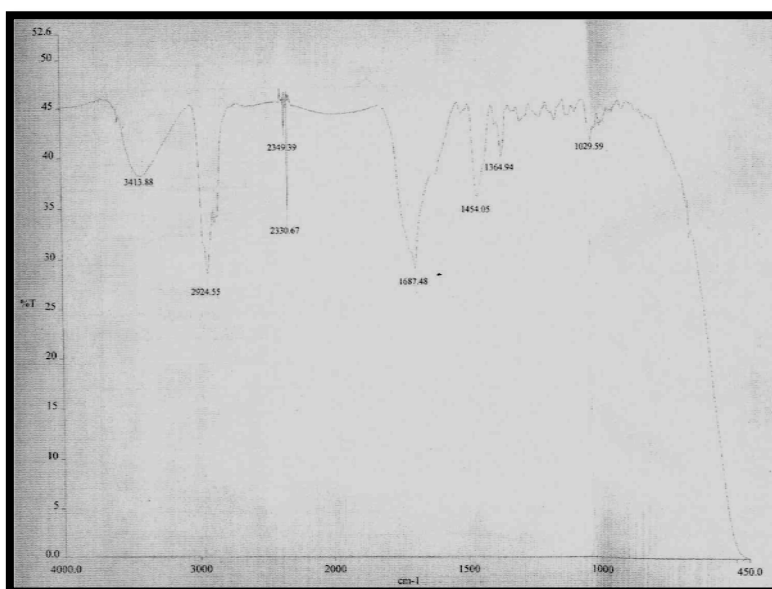
APÉNDICE

Espectros infrarrojos de *Salvia pachyphylla*

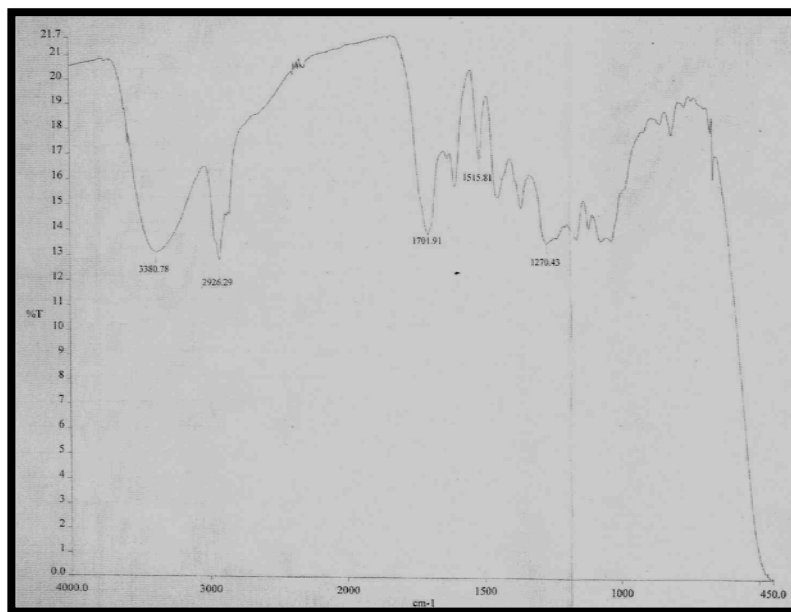
Extracto *n*-hexano



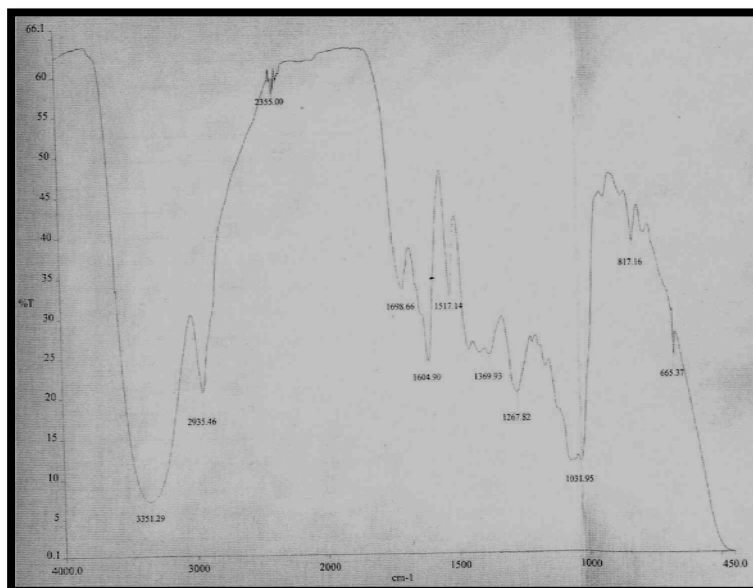
Extracto diclorometano



Extracto Acetato de etilo



Extracto Metanol



Extracto acuoso

