

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA**

**Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería**



**“Estudio fitoquímico biodirigido del extracto hexánico  
de la raíz de *Salvia brandegeei*”**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

**IBQ. ROCÍO ROSARIO AYLLÓN GUTIÉRREZ**

Tijuana, B. C., abril de 2019

**Universidad Autónoma de Baja California**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA**

FOLIO No. 271

Tijuana, B. C., a 22 de Marzo 2019

C. Rocio Rosario Ayllón Gutiérrez  
Pasante de: Maestro en Ciencias  
Presente


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

Es propuesto, por el C. Dr. Iván Córdova Guerrero,


Quien será el responsable de la calidad de trabajo que usted presente, referido al  
tema "Estudio fitoquímico biodirigido del extracto hexánico de la raíz de *Salvia*  
*brandegeeii*"

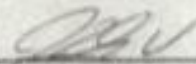
el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I.- INTRODUCCION
- II.- HIPOTESIS
- III.- OBJETIVOS
- IV.- GENERALIDADES
- V.- METODOLOGIAS
- VI.- RESULTADOS Y DISCUSIONES
- VII.- CONCLUSIONES
- VIII.- REFERENCIAS
- IX.- APENDICES
- XI.- ANEXOS

  
Dra. Rocio Alejandra Chávez Santoscoy  
Sub-Directora



  
Dr. Iván Córdova Guerrero  
Director de Tesis

  
Dr. José Luis Vázquez González  
Director

*A Matilda y a mi madre.*

# **AGRADECIMIENTOS**

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Baja California y su Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería por recibirme y permitirme continuar con mi preparación académica.

A CONACYT, por el apoyo económico brindado a lo largo de estos dos años.

Al Centro de Graduados e Investigación en Química del Instituto Tecnológico de Tijuana y al laboratorio de Fitopatología del Centro de Investigación Científica y Estudios Superiores de Ensenada (CICESE), por facilitarme el uso de sus instalaciones y equipo, que permitieron el desarrollo de esta tesis.

Al comité de evaluación de tesis: Dr. José Luis Mijangos, Dr. Daniel Chávez, Dra. Rufina Hernández, por su paciencia, su tiempo, y sus atinadas observaciones y consejos que me han ayudado a crecer académicamente.

Reitero los agradecimientos al Dr. Daniel Chávez por su invaluable apoyo para la caracterización estructural y por ser parte fundamental de mi formación académica desde hace casi 12 años y a la Dra. Rufina Hernández, a quien estimo y admiro profundamente, por sus enseñanzas y apoyo.

Al Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León y al Dr. Ricardo Salazar, por su apoyo para las evaluaciones enzimáticas presentadas en este documento.

Al Laboratorio de Química Medicinal y Productos Naturales, por recibirme y hacerme sentir parte del equipo desde el primer día. A Isabel, Eduardo, Ana, Manuel,

Denise, Lluvia, Arturo, Víctor, su apoyo, guía, y consejos han sido parte fundamental de este trabajo. Arturo, gracias también por su apoyo en EM y por su disposición para resolver siempre mis dudas. A Laura, por su infinita paciencia para apoyarme, guiarme, y compartir sus conocimientos conmigo, y quien tiene mi admiración, cariño, y respeto.

Por supuesto, al Dr. Iván Córdova, por depositar su confianza en mí y hacerme parte de su maravilloso equipo de trabajo. Su apoyo incondicional a lo largo de estos dos años, sus consejos, y su filosofía de vida han tenido un enorme impacto en mí, profesional y personalmente. Agradezco infinitamente que me permitiera ser parte de su familia de laboratorio.

Finalmente agradezco a mi familia. A mi mamá, te lo debo todo, eres mi mayor fortaleza e inspiración. A Matilda, fuiste parte de esto por nueve meses; mi nena, eres mi más grande motivación para superarme. A Armando, mi compañero de vida, gracias por todo el apoyo que me brindaste para alcanzar esta meta. Gracias a los tres por estar conmigo apoyándome, por su motivación, y por tolerar mis malos ratos con paciencia y comprensión, sobre todo gracias por su amor incondicional.

A mi mamá, mis tías, primas, suegra, y cuñadas, gracias por ser las mejores nanas para Matilda y permitirme seguir estudiando, no podría haberlo hecho sin su enorme apoyo, de todo corazón se los agradezco.

# RESUMEN

## RESUMEN

Las plantas son la principal fuente de compuestos farmacológicamente activos, el interés por el estudio fitoquímico de plantas tradicionalmente utilizadas con fines medicinales continúa en aumento. En el presente documento se muestra el desarrollo de un estudio cuyo objetivo fue el aislamiento, purificación y caracterización estructural de compuestos obtenidos a partir del extracto hexánico de la raíz de *S. brandegeei*, la evaluación de su capacidad antioxidante y su potencial para la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa.

La introducción destaca la importancia de las plantas medicinales a lo largo de la historia, la evolución de su uso con fines terapéuticos, su papel en el folclor de distintas culturas, así como su importancia en la farmacoterapia actual. De igual manera, se ilustra el papel de especies del género *Salvia* en las distintas farmacopeas. Posteriormente se presenta una primera parte de este trabajo, dedicada al rastreo, aislamiento, purificación y elucidación de productos naturales mayoritarios de la fracción hexánica de la raíz de *S. brandegeei*. Dos compuestos mayoritarios de tipo Tanshinona, Tanshinona IIA y Criptotanshinona, así como el compuesto  $\beta$ -sitosterol, fueron aislados y caracterizados mediante las técnicas analíticas de espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear.

En la segunda parte, se detallan los ensayos quimiobiológicos que permitieron la evaluación *in vitro* de capacidades antioxidante y anti enzimática exhibidas por las fracciones generadas a partir del extracto hexánico. Las fracciones más apolares mostraron un mejor perfil inhibitorio de acetilcolinesterasa y una mejor capacidad antioxidante según la técnica de ABTS, mientras que los compuestos de con mayor polaridad presentes en la fracción hexánica se desempeñaron como mejores antioxidantes en las técnicas de DPPH y  $\beta$ -caroteno.

Por último, se presentan las conclusiones que se generaron a partir de los resultados obtenidos en este trabajo.

# ÍNDICE GENERAL

## ÍNDICE GENERAL

Índice de figuras.....	i
Índice de tablas.....	v
Índice de diagramas y gráficas.....	viii
Abreviaturas y acrónimos .....	x
Introducción.....	1
Objetivos .....	8
Hipótesis .....	10
<b>CAPÍTULO 1. ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA RAÍZ DE <i>Salvia brandegeei</i></b> .....	<b>12</b>
Generalidades.....	13
Metodología .....	30
Discusión de resultados.....	41
<b>CAPÍTULO 2. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ENZIMÁTICA</b> .....	<b>65</b>
Generalidades.....	66
Metodología .....	80
Discusión de resultados.....	92
Conclusiones.....	114
Referencias .....	117
Apéndices: Técnicas experimentales.....	125
Anexos .....	130

# ÍNDICE DE FIGURAS

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 1.</b>	Presencia de residuos de plantas medicinales en la placa de los molares de fósiles de Neandertales como evidencia del uso de fitoterapia.....	<b>2</b>
<b>Fig. 2.</b>	Izq. Las lápidas de arcilla sumerias (2600 a.C.), consideradas los registros medicinales más antiguos. Fuente: Samuel N. Kramer. Der. Tratamiento de un paciente.....	<b>3</b>
<b>Fig. 3.</b>	Los trabajos “De Materia Medica” de Dioscórides e “Historia Naturalis” de Plinio el viejo, incorporan todo el conocimiento de esa época sobre plantas medicinales.....	<b>4</b>
<b>Fig. 4.</b>	Raíz de <i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge.....	<b>5</b>
<b>Fig. 5.</b>	Bosquejo botánico de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. (Lamiaceae).....	<b>14</b>
<b>Fig. 6.</b>	<i>Mentha aquatica</i> , planta perenne de la familia Lamiaceae.....	<b>17</b>
<b>Fig. 7.</b>	Izq. Hoja de <i>S. brandegeei</i> . Der. Cáliz violeta y pétalo pálido característicos de la flor de <i>S. brandegeei</i> .....	<b>19</b>
<b>Fig. 8</b>	Arbusto de <i>S. brandegeei</i> en su hábitat natural en Islas del Canal.....	<b>20</b>
<b>Fig. 9.</b>	Algunas Tanshinonas identificadas en Danshen. a) Criptotanshinona, b) Tanshinona IIA, c) Tanshinona I, d) Dehidrotanshinona, e) Tanshinona IIB...	<b>22</b>
<b>Fig. 10.</b>	a) Tanshinolactona, b) Neo-tanshinolactona.....	<b>22</b>
<b>Fig. 11.</b>	<i>Salvia común (Salvia officinalis)</i> .....	<b>23</b>
<b>Fig. 12.</b>	Algunos diterpenos presentes en <i>S. officinalis</i> . a) Sageona, b) Carnosol, c) Ácido carnósico, d) Rosmanol, e) Ácido rosmarínico,.....	<b>24</b>
<b>Fig. 13.</b>	Compuestos identificados de la parte aérea de <i>S. lavandulifolia</i> . a) Ácido ursólico, b) Galdosol.....	<b>25</b>
<b>Fig. 14.</b>	Flor de <i>S. mellifera</i> .....	<b>26</b>
<b>Fig. 15.</b>	Compuesto aislado de la parte aérea de <i>S. mellifera</i> , salvimelliferol.....	<b>27</b>
<b>Fig. 16.</b>	Nuevo diterpeno aislado de <i>S. munzii</i> .....	<b>27</b>

<b>Fig. 17.</b> Algunos de los diterpenos aislados de <i>S. munzii</i> . a) Taxodiona, b) Taxodona, c) Criptotanshinona, d) Ferruginol.....	<b>28</b>
<b>Fig. 18.</b> Nuevos diterpenos aislados de la raíz de <i>S. apiana</i> . a) 6,7-dihidroferruginol, b) 6,7-didehidrosemperivrol, c) 16-hidroxi-6,7-didehidroferruginol, d) 11,12,16-trihidroxi-20(10→5)abeo-abieta-1(10),6,8,11,13-pentaeno, e) 16-hidroxiroyleanona, y f)6-deoxo-5,6-didehidrolanugon Q.....	<b>29</b>
<b>Fig. 19.</b> Secado de la raíz de <i>S. brandegeei</i> .....	<b>32</b>
<b>Fig. 20.</b> Izq. Concentración del extracto crudo de la raíz de <i>S. brandegeei</i> ; Der. Extracto crudo seco de la raíz de <i>S. brandegeei</i> .....	<b>33</b>
<b>Fig. 21.</b> Extracto hexánico de la raíz de <i>S. brandegeei</i> .....	<b>33</b>
<b>Fig. 22.</b> Siembra de la columna de fraccionamiento del extracto hexánico.....	<b>34</b>
<b>Fig. 23.</b> Recolección de fracciones.....	<b>35</b>
<b>Fig. 24.</b> Izq. CCF de los extractos vista bajo luz UV de onda corta. Der. CCF utilizando el revelador químico óleum.....	<b>43</b>
<b>Fig. 25.</b> CCF del extracto hexánico.....	<b>44</b>
<b>Fig. 26.</b> CCF de las reuniones obtenidas a partir del extracto hexánico.....	<b>46</b>
<b>Fig. 27.</b> Estructura de Tanshinona IIA.....	<b>47</b>
<b>Fig. 28.</b> Tanshinona IIA aislada de la reunión 5.....	<b>47</b>
<b>Fig. 29.</b> Estructura enumerada de Tanshinona IIA para RMN.....	<b>48</b>
<b>Fig. 30.</b> Correlaciones homonucleares para Tanshinona IIA.....	<b>51</b>
<b>Fig. 31.</b> Comportamiento de correlación a dos y tres enlaces en el experimento RMN $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMBC para Tanshinona IIA.....	<b>52</b>
<b>Fig. 32.</b> Criptotanshinona.....	<b>54</b>
<b>Fig. 33.</b> Criptotanshinona aislada de la reunión 9.....	<b>54</b>
<b>Fig. 34.</b> Estructura enumerada de Criptotanshinona para RMN.....	<b>55</b>
<b>Fig. 35.</b> Correlaciones homonucleares para Criptotanshinona.....	<b>58</b>

<b>Fig. 36.</b> Comportamiento de correlación a dos y tres enlaces en el experimento RMN $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ HMBC para Criptotanshinona.....	<b>60</b>
<b>Fig. 37.</b> $\beta$ -Sitosterol.....	<b>62</b>
<b>Fig. 38.</b> $\beta$ -Sitosterol aislado de la reunión 8.....	<b>62</b>
<b>Fig. 39.</b> Estructura enumerada de $\beta$ -Sitosterol para RMN.....	<b>63</b>
<b>Fig. 40.</b> Estructura química del $\alpha$ -tocoferol.....	<b>77</b>
<b>Fig. 41.</b> Estructura química del ácido ascórbico.....	<b>77</b>
<b>Fig. 42.</b> Reducción del radical libre DPPH.....	<b>81</b>
<b>Fig. 43.</b> Oxidación del ABTS por persulfato de potasio para la generación de $\text{ABTS}^{\bullet+}$ , y su reacción con un compuesto antioxidante.....	<b>84</b>
<b>Fig. 44.</b> Reacción de Ellman.....	<b>89</b>
<b>Fig. 45.</b> Estructura de la Galantamina.....	<b>91</b>
<b>Fig. 46.</b> A: Tanshinona IIA, B: Criptotanshinona, C: Tanshinona I, D: Dehidrotanshinona.....	<b>108</b>

# ÍNDICE DE TABLAS

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Características de los miembros de la familia Lamiaceae.....	<b>15</b>
<b>Tabla 2.</b>	Algunas variedades de importancia culinaria y medicinal de la familia Lamiaceae.....	<b>16</b>
<b>Tabla 3.</b>	Condiciones para los experimentos de CG.....	<b>36</b>
<b>Tabla 4.</b>	Resultados de la partición del extracto crudo.....	<b>42</b>
<b>Tabla 5.</b>	Masa de las reuniones obtenidas del fraccionamiento cromatográfico del extracto hexánico.....	<b>45</b>
<b>Tabla 6.</b>	Asignaciones <sup>1</sup> HRMN para Tanshinona IIA.....	<b>49</b>
<b>Tabla 7.</b>	Asignaciones de <sup>13</sup> CRMN para Tanshinona IIA.....	<b>50</b>
<b>Tabla 8.</b>	Asignaciones de RMN para Tanshinona IIA.....	<b>53</b>
<b>Tabla 9.</b>	Asignaciones <sup>1</sup> HRMN para Criptotanshinona.....	<b>56</b>
<b>Tabla 10.</b>	Asignaciones de <sup>13</sup> CRMN para Critotanshinona.....	<b>57</b>
<b>Tabla 11.</b>	Asignaciones de RMN para Criptotanshinona.....	<b>61</b>
<b>Tabla 12.</b>	Asignaciones de <sup>1</sup> HRMN para β-Sitosterol.....	<b>64</b>
<b>Tabla 13.</b>	Principales fuentes endógenas de radicales libres.....	<b>70</b>
<b>Tabla 14.</b>	Principales fuentes exógenas de radicales libres.....	<b>71</b>
<b>Tabla 15.</b>	Principales antioxidantes y radicales libres sobre los que actúan.....	<b>78</b>
<b>Tabla 16.</b>	Diluciones seriadas.....	<b>81</b>
<b>Tabla 17.</b>	Resultados de evaluación de actividad antioxidante de las particiones por el método de reducción del radical libre DPPH.....	<b>93</b>
<b>Tabla 18.</b>	Resultados de evaluación de actividad antioxidante de las particiones por el método de reducción del radical catión ABTS• <sup>+</sup> .....	<b>94</b>
<b>Tabla 19.</b>	Resultados de evaluación de actividad antioxidante de las particiones	

	por el método de inhibición de blanqueamiento de $\beta$ -caroteno.....	96
<b>Tabla 20.</b>	Resumen de resultados de evaluación de actividad antioxidante de las particiones.....	97
<b>Tabla 21.</b>	Resultados de evaluación de actividad antioxidante de las particiones por el método de reducción del radical libre DPPH.....	98
<b>Tabla 22.</b>	Resultados de evaluación de actividad antioxidante de las reuniones del extracto hexánico de <i>S. brandegeei</i> . por el método de reducción del radical catión ABTS <sup>•+</sup> .....	102
<b>Tabla 23.</b>	Resultados de evaluación de actividad antioxidante de las reuniones del extracto hexánico de <i>S. brandegeei</i> por el método de inhibición de blanqueamiento de $\beta$ -caroteno.....	104
<b>Tabla 24.</b>	Resumen de resultados de evaluación de actividad antioxidante de las reuniones.....	106
<b>Tabla 25.</b>	Resumen de resultados antioxidantes para particiones y reuniones.....	109
<b>Tabla 26.</b>	Resultados de la evaluación de inhibición de acetilcolinesterasa.....	110
<b>Tabla 27.</b>	Resultados de porcentaje de inhibición de acetilcolinesterasa.....	111

# ÍNDICE DE DIAGRAMAS Y GRÁFICAS

## ÍNDICE DE DIAGRAMAS

<b>Diagrama 1.</b>	Fraccionamiento y rastreo de metabolitos de la reunión R5.....	<b>37</b>
<b>Diagrama 2.</b>	Fraccionamiento y rastreo de metabolitos de la reunión R8.....	<b>38</b>
<b>Diagrama 3.</b>	Rastreo de metabolitos en las reuniones R9 y R10.....	<b>39</b>
<b>Diagrama 4.</b>	Patologías relacionadas y afectaciones a los órganos atribuidas al estrés oxidativo.....	<b>72</b>

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

<b>Gráfica 1.</b>	Resultados de reducción del radical libre DPPH de las particiones y extracto crudo de <i>S.brandegeei</i> .....	<b>94</b>
<b>Gráfica 2.</b>	Resultados de reducción del radical catión ABTS <sup>•+</sup> de las particiones y extracto crudo de <i>S.brandegeei</i> .....	<b>95</b>
<b>Gráfica 3.</b>	Resultados de inhibición de blanqueamiento de $\beta$ -caroteno de las particiones y extracto crudo de <i>S.brandegeei</i> .....	<b>96</b>
<b>Gráfica 4.</b>	Resultados de reducción del radical libre DPPH de las reuniones del extracto hexánico de <i>S. brandegeei</i> .....	<b>100</b>
<b>Gráfica 5.</b>	Gráfica log <sub>10</sub> de los resultados de reducción del radical libre DPPH de las reuniones del extracto hexánico de <i>S. brandegeei</i> .....	<b>101</b>
<b>Gráfica 6.</b>	Resultados de reducción del radical catión ABTS <sup>•+</sup> de las reuniones del extracto hexánico de <i>S.brandegeei</i> .....	<b>103</b>
<b>Gráfica 7.</b>	Resultados de inhibición de blanqueamiento de $\beta$ -caroteno de las reuniones del extracto hexánico de <i>S. brandegeei</i> .....	<b>105</b>

# **ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS**

## ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

°	Grados
'	Minutos
“	Segundos
%	Porcentaje
α	Alfa
a.C.	Antes de Cristo
AcOEt	Acetato de etilo
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolin-6- sulfónico
ACo	Acetilcolina
ATCI	Yoduro de acetilcolina
ATP	Trifosfato de adenosina
β	Beta
B.C.	Baja California
C (en RMN)	Carbono
°C	Grados Celsius
CCF	Cromatografía en capa fina
CE <sub>50</sub>	Concentración efectiva media
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo deuterado
CG-EM	Cromatografía de gases-Espectrometría de masas
cm	Centímetros
col.	Colaboradores
COSY	Correlation Spectroscopy

$\delta$	Desplazamiento
dd	Doble de dobles
DCM	Diclorometano
Der.	Derecha
DMSO	Dimetilsufóxido
DPPH	Difenil picril hidrazilo
DTNB	ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico
EA	Enfermedad de Alzheimer
EM	Espectrometría de masas
Fig.	Figura
$\gamma$	Gama
g	Gramos
h	Hora
H (en RMN)	Protón
HCl	Ácido clorhídrico
Hz	Hertz
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
IC50	Concentración inhibitoria media
Izq.	Izquierda
$J$	Constante de acoplamiento
kg	Kilogramos
$\mu$ l	Microlitro
$\mu$ m	Micrometros

<b>μM</b>	Micromolar
<b>m</b>	Metro
<b>mg</b>	Miligramo
<b>MHz</b>	Mega Hertz
<b>ml</b>	Mililitro
<b>ml/min</b>	Mililitro por minuto
<b>mm</b>	Milímetros
<b>mM</b>	Milimolar
<b>msnm</b>	Metros sobre el nivel del mar
<b>m/e</b>	Masa/carga
<b>N</b>	Norte
<b>nc</b>	No calculado
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>núm.</b>	Número
<b>O</b>	Oeste
<b>ppm</b>	Partes por millón
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear de Protón
<b>RNS</b>	Especies reactivas de nitrógeno
<b>RSS</b>	Especies reactivas de azufre
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>RSBA</b>	Raíz <i>Salvia brandegeei</i> extracto acuoso
<b>RSBB</b>	Raíz <i>Salvia brandegeei</i> extracto butanol
<b>RSBC</b>	Raíz <i>Salvia brandegeei</i> extracto crudo
<b>RSBH</b>	Raíz <i>Salvia brandegeei</i> extracto hexano

<b>RSBD</b>	Raíz <i>Salvia brandegeei</i> extracto diclorometano
<b>s</b>	Segundo
<b>s.</b>	Siglo
<b>S.</b>	Salvia
<b>TMS</b>	Tetrametilsilano
<b>U/mL</b>	Unidad enzimática por mililitro
<b>UV</b>	Ultravioleta

# INTRODUCCIÓN

## INTRODUCCIÓN

El uso de plantas con el propósito de aliviar padecimientos es tan antiguo como la humanidad. El posible empleo de plantas con compuestos bioactivos en la prehistoria ha sido discutido entre antropólogos y arqueólogos; con pocas evidencias sustentables disponibles, se plantea la posibilidad del uso a prueba y error de plantas con fines medicinales y de conservación de alimentos por parte de las tribus nómadas. Algunas evidencias que sustentan estas teorías es la presencia de residuos de manzanilla y flor de la pluma (*Achillea millefolium*) en molares de neandertales (230 000 a 24 000 a.C.), ambas flores de gusto muy amargo para ser comidas y con propiedades para tratar padecimientos estomacales (Hardy, *et al.*, 2018). Otra prueba relevante fue el hallazgo de un “botiquín” entre las pertenencias de Ötzi “el hombre de hielo” (3300 a.C.) conteniendo más de diez productos vegetales y fúngicos con propiedades curativas, incluyendo dosis medidas del hongo *Piptoporus betulinus*, que posee propiedades antiparasitarias que, de acuerdo con la autopsia, aquejaban a este hombre de la Edad de Bronce; estos descubrimientos parecen indicar que el hombre prehistórico estaba consciente de la relación entre el consumo de hongos y plantas y la disminución de molestias y enfermedades (Archeological Institute of America, 2018; Wilford, 1998).



Fig. 1. Presencia de residuos de plantas medicinales en la placa de los molares de fósiles de Neandertales como evidencia del uso de fitoterapia.

Desde los inicios de la comunicación escrita, se ha documentado el uso de hierbas para el tratamiento de dolencias y afecciones; ya sean pociones, ungüentos, aceites o remedios, los humanos hemos tenido, desde nuestros inicios, una estrecha relación con los productos naturales. Los primeros registros de uso humano de productos naturales datan de alrededor del año 2600 a.C., lápidas de arcilla sumerias en escritura cuneiforme detallan el uso de aceite obtenido de ciprés para tratar tos, resfriados e inflamación (Dias, *et al.*, 2012), así como 12 recetas para la preparación de medicamentos utilizando más de 250 plantas diferentes, incluyendo la amapola y mandrágora, ambas con contenido de alcaloides (Petrovska, 2012).

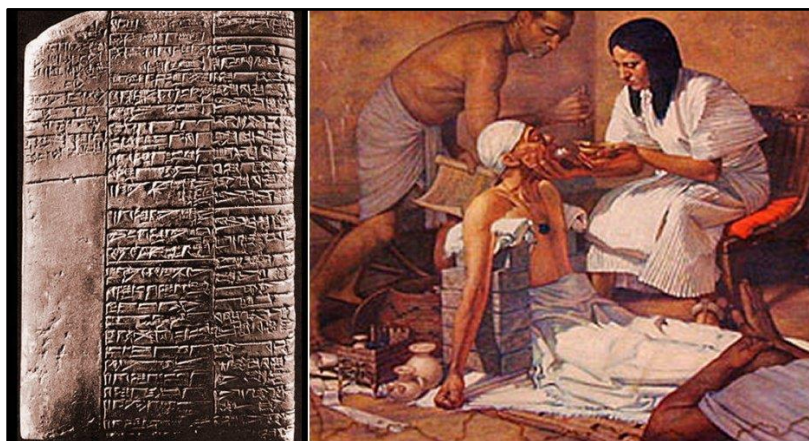


Fig. 2. Izq. Las lápidas de arcilla sumerias (2600 a.C.), consideradas los registros medicinales más antiguos. Fuente: Samuel N. Kramer. *Der. Tratamiento de un paciente.*

Las civilizaciones antiguas plasmaron sus conocimientos sobre plantas medicinales en una serie de textos, como el libro chino “Pen T’Sao” (2500 a.C.) sobre raíces y hierbas utilizadas hasta el día de hoy como remedios medicinales, incluyendo ginseng, canela, y efedra. El papiro de Ebers, escrito en Egipto alrededor del año 1550 a.C., es un compendio de 800 medicamentos a base de cerca de 700 plantas, entre las que destacan el aceite de ricino y el aloe.

Por parte de la civilización griega, resaltan los trabajos de Hipócrates (459-370 a.C.) sobre la clasificación de plantas medicinales según su efecto farmacológico, y la

colección de medicinas herbales “De Materia Medica” del médico Dioscórides, “padre de la farmacognosia” (año 100), que detalló el modo de recolección, preparación medicinal, y almacenamiento adecuado de cerca de 657 especies vegetales, y que sentó las bases de la farmacología europea hasta finales de la Edad Media.

Contemporáneo de Dioscórides, el romano Plinio el Viejo (año 79) escribió un compendio detallado de 1000 plantas medicinales en su libro “Historia naturalis”. El farmacista romano más prominente fue Galeno (131-200), quien compiló una lista de drogas con acción paralela.

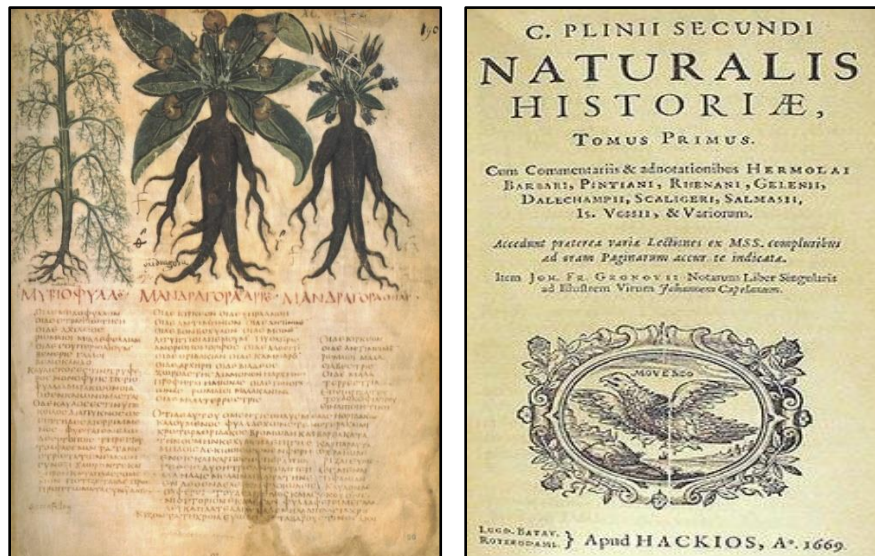


Fig. 3. Los trabajos “De Materia Medica” de Dioscórides (izq.) e “Historia Naturalis” de Plinio el viejo (der.) incorporan todo el conocimiento de esa época sobre plantas medicinales.

En el siglo VII los pueblos eslavos utilizaban diversas plantas aromáticas, incluyendo a *Rosmarinus officinalis* y *Lavandula officinalis*, para controlar insectos como mosquitos, pulgas, polillas, y arañas (Dias, *et al.*, 2012; Jamshidi-Kia, *et al.*, 2018; Petrovska, 2012).

Las culturas Mesoamericanas desarrollaron una vasta farmacopea. El uso de medicamentos elaborados a partir de plantas, minerales, y animales, quedó plasmado

en documentos como el Códice de la Cruz-Badiano, que refiere 227 plantas medicinales y los padecimientos tratados por ellas (Halberstein, 2005; Viesca, C. & Ramos de Viesca, M., 2012).

En el s.XIX se da un gran paso en materia de aislamiento de productos naturales cuando Friederich W. Sertürner separó exitosamente una sustancia cristalina del látex del opio (*Papaver somniferum*), a la que llamó morfina; si bien, el opio ya había sido empleado por la humanidad durante varios siglos como analgésico, la identificación del compuesto activo permitió establecer dosis terapéuticas de un compuesto definido (Klockgether-Radke, 2002). Actualmente, casi todas las farmacopeas prescriben medicamentos herbolarios de valor medicinal real; las fitopreparaciones presentan compuestos definidos, con acción verificada y eficiencia terapéutica.

Las plantas del género *Salvia* han sido utilizadas tradicionalmente como remedios para diversos padecimientos. *Salvia officinalis*, fue ampliamente utilizada en la zona mediterránea como diurético, anestésico local, y tratamiento para disentería (Kintzios, 2000). En Latinoamérica, se conoce su uso como tratamiento para desórdenes de diferentes clases, incluyendo úlceras, convulsiones, gota, padecimientos inflamatorios, mareos, entre otros; en la medicina tradicional europea, se emplea como tratamiento para la dispepsia, sudoración excesiva, desordenes cognitivos derivados de la edad, e inflamación cutánea (Ghorbani, 2017).

En la medicina tradicional china, el rizoma de *Salvia miltiorrhiza* Bunge, conocido como Danshen, ha sido utilizada como tratamiento preventivo o terapéutico para aliviar padecimientos como: enfermedades coronarias y vasculares, derrames cerebrales, hiperlipidemia, endangítis, artritis y hepatitis (Zhou, 2005). La fórmula medicinal Fufang Danshen, que tiene como ingrediente principal la raíz de *S. miltiorrhiza*, ha completado la Fase II



Fig. 4. Raíz de *Salvia miltiorrhiza* Bunge.

de ensayos clínicos en Estados Unidos de América para la evaluación de la seguridad y eficacia como medicamento en pacientes con angina de pecho (núm. NCT00797953) (U.S. National Library of Medicine, actualización 2012).

Entre los principales compuestos bioactivos identificados en Danshen, se encuentran las Tanshinonas, una clase de diterpenos de tipo abietano aislados por primera vez por Nakao y colaboradores en la década de 1930 (Nakao, *et al.*, 1934). Clasificados como hidrofílicos y lipofílicos, son los metabolitos de la segunda categoría los de gran interés: la Criptotanshinona, Tanshinona IIA, Tanshinona I, Dehidrotanshinona I, Isotanshinona I, Tanshinona IIB, Metiltanshinona, Isocriptotanshinona I y II, entre otras, han sido reportados como agentes altamente citotóxicos, anti agregantes plaquetarios, antiinflamatorios y cardioprotectores (Zhou, 2005).

México es considerado como un país megadiverso, con aproximadamente 300 especies, 85% de las cuales son endémicas. Salvia es el segundo género más diverso en la República Mexicana con 292 especies, y al menos 12 son consideradas endémicas y/o nativas de la región de Baja California (Villaseñor, 2004).

Existen registros de usos tradicionales de la vegetación única de Baja California por parte de los grupos indígenas de la región, con relación a sus propiedades curativas (Gobierno de B.C, 2015) y diversas publicaciones sobre metabolitos altamente bioactivos en el género Salvia, sin embargo, son pocos los reportes sobre el estudio y la caracterización fitoquímica de las especies de salvias de la región norte de Baja California (González, *et al.*, 1990; González, *et al.*, 1991; Luis & Grillo, 1993).

El interés en la utilización de plantas con propósitos medicinales, cosméticos y agrícolas ha incrementado en los últimos años, sin embargo, no todos los productos naturales son inocuos, y si bien las referencias etnobotánicas son un indicador

generalmente confiable sobre la seguridad de ciertas plantas, un estudio sistematizado y científico es indispensable para el uso seguro de productos naturales.

# OBJETIVOS

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la actividad enzimática colinesterasa y antioxidante del extracto hexánico de *Salvia brandegeei*.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Obtener extractos de distinta polaridad mediante procedimientos de solubilidad diferencial.
- Determinar el perfil antioxidante de los extractos de *S. brandegeei* mediante las técnicas de DPPH, ABTS, y  $\beta$ -caroteno.
- Evaluar la actividad enzimática colinesterasa del extracto hexánico y sus reuniones.
- Aislar y caracterizar estructuralmente los metabolitos secundarios utilizando métodos espectroscópicos (RMN) y espectrométricos (EM).

# HIPÓTESIS

## HIPÓTESIS

Los componentes del extracto hexánico de la raíz de *S. brandegeei* presentan un perfil bioactivo antioxidante e inhibidor de acetilcolinesterasa.

**CAPÍTULO 1**

**ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LA RAÍZ DE**  
***Salvia brandegeei***

# **GENERALIDADES**

# GENERALIDADES

## Aspectos generales del género *Salvia*

### Familia Lamiaceae

Lamiaceae (antes Labiatae) es una familia de plantas florales perteneciente al orden de los Lamiales (Cronquist, 1981), caracterizada por plantas frecuentemente aromáticas de uso amplio como hierbas culinarias, decorativas, y medicinales (Raja, 2012), está constituida actualmente por 240 géneros y 7200 especies taxonómicamente admitidas, distribuidas en zonas tropicales a templadas alrededor del mundo, con excepción de las regiones más frías (Harley, 2012).

En su mayoría, los miembros de la familia Lamiaceae son hierbas perennes, generalmente poseen hojas dentadas e inflorescencias terminales o laterales, de aspecto espigado, y flores de estilo ginobásico (Berry, 2018; Fernández & Rivera, 2006); crecen a manera de arbusto, árboles, o trepadoras, de fácil cultivo y propagación por esquejes (Raja, 2012). Provistas de glándulas secretoras de aceites esenciales, distribuidas por toda la planta (Fernández & Rivera, 2006), son frecuentemente aromáticas en su totalidad, por lo que son comúnmente conocidas hierbas de uso culinario, destacando la albahaca, menta,



Fig. 5. Bosquejo botánico de *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae)

romero, lavanda, orégano, mejorana, entre otras, y semillas como la chía (*Salvia hispánica*).

**Tabla 1.** Características de los miembros de la familia Lamiaceae.

<b>Taxonomía</b>	
<i>División</i>	Spermatophyta
<i>Subdivisión</i>	Angiospermae
<i>Clase</i>	Dicotyledoneae
<i>Subclase</i>	Gamopetalae
<i>Serie</i>	Bicarpelar
<i>Orden</i>	Lamiales
<i>Familia</i>	Lamiaceae
<b>Características vegetales</b>	
<i>Porte</i>	Generalmente hierbas y arbustos, algunos árboles
<i>Tallo</i>	Herbáceo, cuadrangulares
<i>Raíz</i>	Pivotante
<i>Hojas</i>	Simples, opuestas o decusadas, sésiles o pecioladas, sin estípulas
<b>Características de la flor</b>	
<i>Inflorescencia</i>	Verticilada
<i>Flor</i>	Hermafrodita, zigomorfa
<i>Cáliz</i>	Bilabiado, gamosépalo
<i>Androceo</i>	Cuatro estambres, didinamos
<i>Gineceo</i>	Bicarpelar, con cuatro óvulos
<i>Semilla</i>	Solitaria

Fuente: Cabral, 2010; Martínez-Gordillo, *et al.*, 2013; Raja, 2012.

El estudio de plantas de la familia Lamiaceae ha generado un gran interés en los últimos años, pues se ha reportado la presencia de compuestos con amplia actividad biológica importante, incluyendo su potencial como bioinsecticida, bactericida, fungicida, y actividades farmacológicas, desde la antioxidante, hasta potenciales tratamientos cardioprotectores, antidepresivos, ansiolíticos, y antitumorales (Di Sapio, 2012; Fernández & Rivera, 2006; Martínez-Vázquez, *et al.*, 2012; Ye, *et al.*, 2017).

**Tabla 2.** Algunas variedades de importancia culinaria y medicinal de la familia Lamiaceae

<b>Nombre de la droga/ planta</b>	<b>Parte empleada de la planta</b>	<b>Fuente biológica</b>	<b>Constituyente químico</b>	<b>Usos comunes</b>
<b>Tulsi (albahaca sagrada)</b>	Hojas frescas	<i>Ocimum sanctum</i>	Aceite esencial, eucaliptol	Agente saborizante, expectorante
<b>Menta (peppermint)</b>	Hojas y flores frescas	<i>Mentha piperita</i>	Mentol, limoneno	Agente saborizante, descongestionante
<b>Tomillo</b>	Hojas y flores secas	<i>Thymus vulgaris</i> <i>Thymus zygis</i>	Timol, carvacrol, $\alpha$ y $\beta$ terpineno	Agente saborizante
<b>Menta verde (spearmint)</b>	Parte aérea fresca de la planta en floración	<i>Mentha spicata</i> <i>Mentha cardiaca</i>	Carvona, eucaliptol	Agente saborizante
<b>Cóleos</b>	Raíz seca	<i>Coleus forskohlii</i>	Forskolina, coleonol-B, coleonol-C, desoxicoleonol	Uso terapéutico como vasodilatador y cardioestimulante, tratamiento para el glaucoma.

Fuente: Raja, 2012.

En la República Mexicana, Lamiaceae es una de las familias más diversas y abundantes, con 598 especies listadas, pertenecientes a 33 géneros, que representan el 8.23% de las especies y 13.55% de los géneros del mundo, con un endemismo de 66.2% (396 especies), siendo Baja California y Chiapas, los estados con mayor presencia de especies exclusivas, es decir, que crecen en un solo estado, aunque no sean endémicas.(Martínez-Gordillo, *et al.*, 2013; Martínez Gordillo, *et al.*, 2017)



Fig. 6. *Mentha aquatica*, planta perenne de la familia Lamiaceae. Fuente: Carl Farmer (2002)

### ***Salvia brandegeei***

*Salvia* L., es el género más grande de la familia Lamiaceae, con cerca de 1000 especies distribuidas de manera cosmopolita (Walker, 2004), cuyo crecimiento es

favorecido en el clima mediterráneo (Martínez-Gordillo, *et al.*, 2017), siendo las regiones de mayor abundancia Centro y Sudamérica (500 especies), el oeste de Asia (200 especies), y el este de Asia (100 especies) (Özler, *et al.*, 2011).

Las especies de salvia son hierbas perennes, de alturas entre 50 y 100 cm, con raíces lignificadas (Karamanos, 2000). Se distinguen del resto de las Lamiáceas por la morfología del androceo de sus flores, pues poseen dos estambres con una parte superior en forma de palanca que favorece la adhesión del polen a la cabeza y patas de los polinizadores (Cornejo-Tenorio & Ibarra-Manríquez, 2011).

Presenta hojas simples, pecioladas, opuestas y decusadas (Hernández- Agero, *et al.*, 2002; Karamanos, 2000). Las flores coloridas, con tonalidades que varían desde el rosa pálido hasta el azul intenso, son zigomorfas, pentámeras, con cáliz y corola bilabiados (Cornejo-Tenorio & Ibarra-Manríquez, 2011; Hernández- Agero, *et al.*, 2002; Rosua & Blanca, 1986).

Su periodo de floración comprende los meses de marzo a julio, variaciones que se dan de acuerdo con la especie, clima y altitud (Martínez-Gordillo, *et al.*, 2017; Rosua & Blanca, 1986).

Las plantas del género *Salvia* se dividen en cuatro subgéneros: *Salvia*, *Leonia*, *Sclarea* y *Calosphace*, que a su vez son separados en secciones. Esta clasificación propuesta por George Bentham sigue siendo la más aceptada y utilizada (El-Gazzar, *et al.*, 1968).

*Salvia* es el segundo género más abundante en la República mexicana con 307 especies diferentes, 232 de las cuales son endémicas (Martínez-Gordillo, *et al.*, 2013), con la mayor diversidad observada en zonas montañosas, principalmente del centro y sur del país, aunque también se encuentran presentes en regiones boscosas, desérticas y semidesérticas de México (Cornejo-Tenorio & Ibarra-Manríquez, 2011). La mayor

diversidad de salvias en México, y en general en el continente americano, pertenecen al subgénero *Calosphace*.

El norte de la península de Baja California se caracteriza por sus condiciones climatológicas de tipo mediterráneo, con temperaturas templadas la mayor parte del año, y lluvias invernales, lo que favorece el crecimiento de especies vegetales nativas, incluyendo por lo menos 12 especies del género *Salvia* (Villaseñor, 2004).

*Salvia brandegeei* (Fig. 7) es un arbusto perenne perteneciente a la familia Lamiaceae. Es nativa de las Islas del Canal, en California, y con distribución limitada en Baja California. En su hábitat natural, estos arbustos pueden llegar a medir entre 1 y 1.5 m de altura, y extenderse hasta 2 m de anchura.



Fig. 7. Izq. Hoja de *S. brandegeei*. Der. Cáliz violeta y pétalo pálido característicos de la flor de *S. brandegeei*.

[https://calphotos.berkeley.edu/cgi/img\\_query?enlarge=0000+0000+0606+1205](https://calphotos.berkeley.edu/cgi/img_query?enlarge=0000+0000+0606+1205)

Presenta hojas texturizadas, de color verde oscuro, con longitudes que rondan entre los 7 y 10 cm, y alrededor de 1 cm de ancho. Sus flores son vistosas, de cerca de 1 cm, presentan pétalos de tonos lavanda pálido, con un contrastante cáliz violeta.

Se trata de una salvia muy resistente a la sequía, con predilección por zonas soleadas, cercanas a la región costera californiana (California Flora Nursery, 2019; Calscape, 2019).



Fig. 8. Arbusto de *S. brandegeei* en su hábitat natural en Islas del Canal.

[https://calscape.org/Salvia-brandegeei-\(Santa-Rosa-Island-Sage\)?srchcr=sc58506f92e92be](https://calscape.org/Salvia-brandegeei-(Santa-Rosa-Island-Sage)?srchcr=sc58506f92e92be)

### **Estudios fitoquímicos de las especies del género *Salvia***

El uso de especies de *Salvia* como hierbas farmacéuticas abarca una gran gama de padecimientos que van desde molestias estomacales y dolores molares, hasta

diabetes, hipertensión y enfermedades inflamatorias. También ha sido reportado su empleo como expectorantes, ansiolíticos, psicotrópicos, entre otros (Karamanos, 2000). Dado el amplio uso medicinal de plantas del género *Salvia* alrededor del mundo, el interés por su estudio ha generado múltiples reportes sobre su composición química.

Los componentes fitoquímicos mayoritarios en especies de *Salvia* incluyen a los diterpenos, triterpenos, ácidos fenólicos, y flavonoides (Zhou, *et al.*, 2009). Los flavonoides, triterpenoides y monoterpenos se encuentran en mayor proporción en la parte aérea de estas plantas, principalmente en las flores y hojas. Los ácidos fenólicos y diterpenos tienen una distribución más amplia en las raíces (Xu, *et al.*, 2018).

De la gran diversidad de salvias que existen, sólo una fracción ha sido objeto de estudios fitoquímicos. Las especies *Salvia miltiorrhiza* Bunge y *Salvia officinalis* han generado el mayor número de reportes sobre composición química, debido al atractivo generado por su amplio uso medicinal.

La raíz de *Salvia miltiorrhiza* B., como ocurre en la mayoría de las salvias chinas, presenta una amplia diversificación de diterpenos de esqueleto abietano, compuestos que han exhibido actividades biológicas importantes, un ejemplo de ellas es el efecto cardioprotector de Danshen, que es atribuido a los diterpenos abietánicos liposolubles, conocidos como Tanshinonas (Xu, *et al.*, 2018). Alrededor de 40 compuestos de esta clasificación han sido identificados en Danshen, incluyendo Criptotanshinona, Tanshinona IIA, Tanshinona I, Dehidrotanshinona, Isotanshinona I, Tanshinona IIB, Metiltanshinona (Fig.9) entre otros, además de compuestos de estructura semejante, la Tanshinolactona y Neo-tanshinolactona (Fig. 10). Dentro de los compuestos hidrofílicos de Danshen, se encuentran el ácido rosmarínico, ácidos salvianólicos A, B, y C, entre otros (Zhang, *et al.*, 2012).

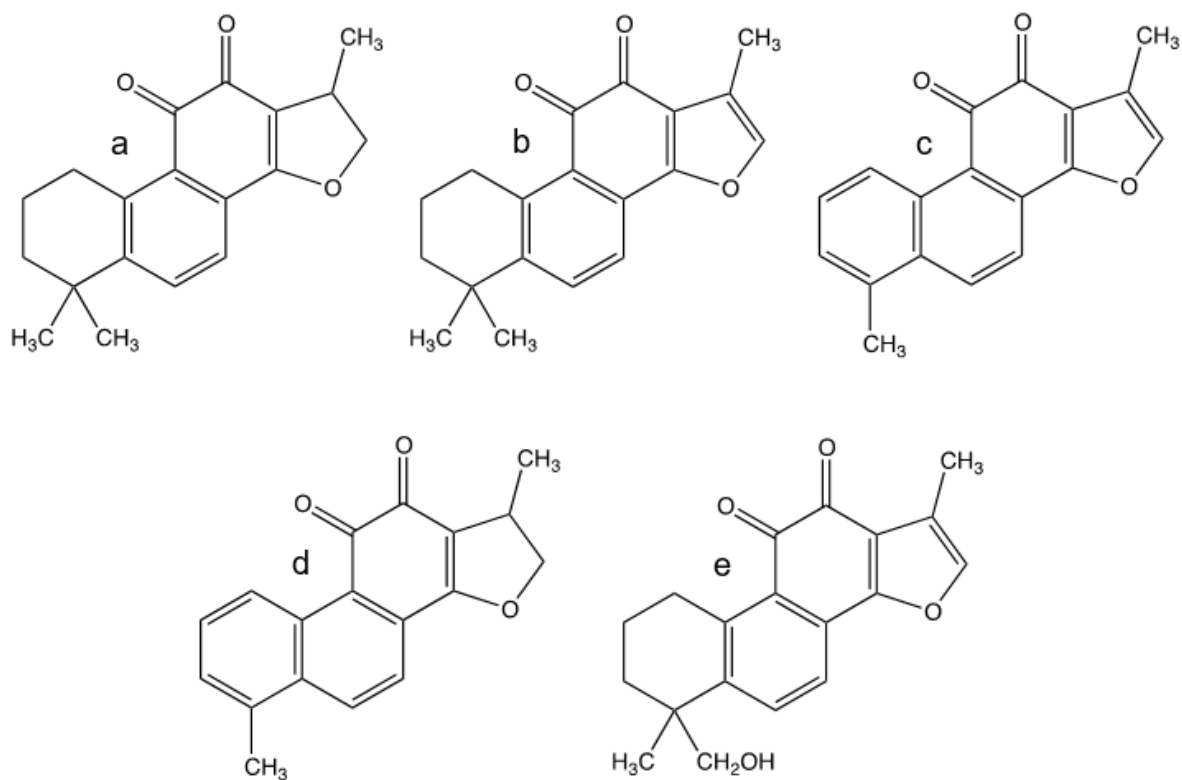


Fig. 9. Algunas Tanshinonas identificadas en Danshen. a) Criptotanshinona, b) Tanshinona IIA, c) Tanshinona I, d) Dehidrotanshinona, e) Tanshinona IIB.

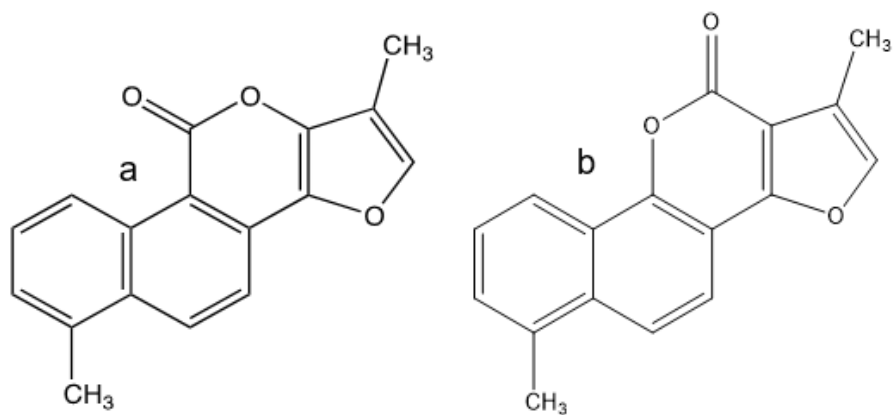


Fig. 10. a) Tanshinolactona, b) Neo-tanshinolactona

*Salvia officinalis* (fig. 11), por su parte, presenta una composición considerablemente conocida, con un vasto número de compuestos identificados, incluyendo alcaloides, glicósidos, compuestos fenólicos, esteroides, y terpenoides. Del aceite esencial de esta salvia, han sido caracterizados 120 compuestos diferentes, incluyendo una variedad de terpenoides como el alcanfor, cariofileno, pineno, y tujona (Ghorbani, *et al.*, 2017).



Fig. 11. Salvia común (*Salvia officinalis*).

<http://www.missouribotanicalgarden.org/PlantFinder/PlantFinderDetails.aspx?taxonid=257219&isprofile=0>

&

La composición química de la parte aérea de *S. officinalis* muestra la presencia de diterpenos, como sageona, carnosol, ácido carnósico, rosmanol y ácido rosmarínico (Cuvelier, *et al.*, 1994), y triterpenos, entre los que destacan la betulina, el ácido ursólico y el ácido oleanólico (Hernández, *et al.*, 2002).

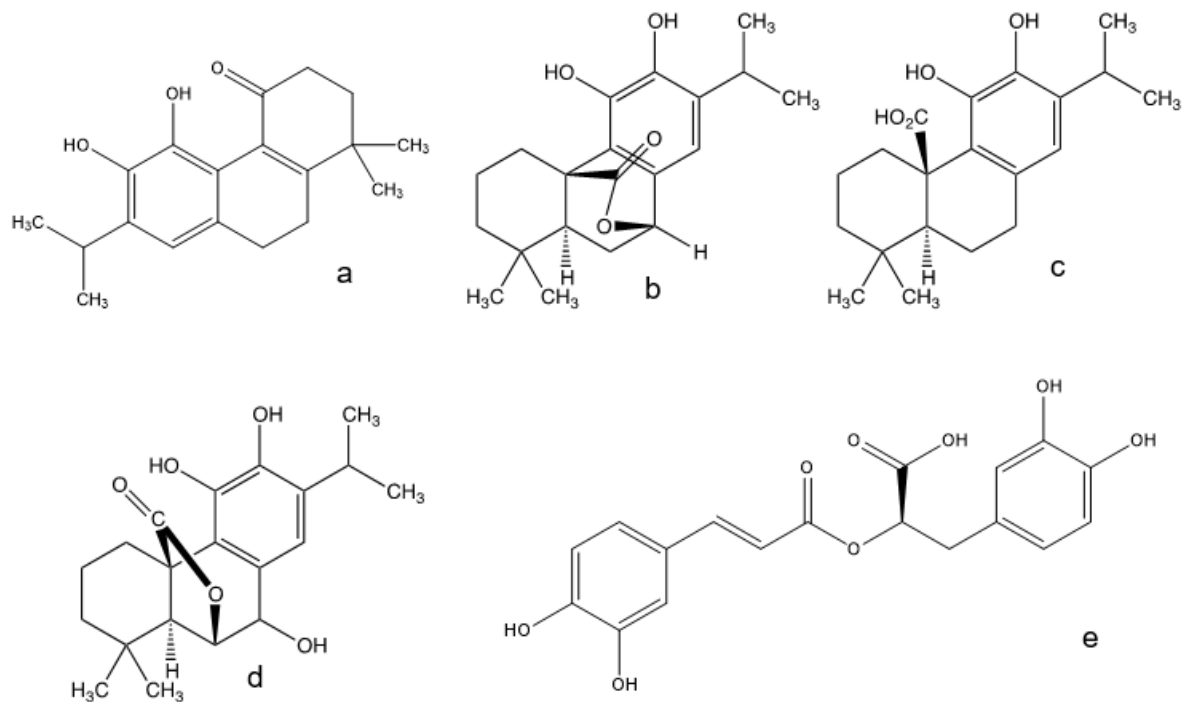


Fig. 12. Algunos diterpenos presentes en *S. officinalis*. a) Sageona, b) Carnosol, c) Ácido carnósico, d) Rosmanol, e) Ácido rosmarínico,

Además de *Salvia officinalis*, la salvia española (*Salvia lavandulifolia*) también es altamente apreciada en la farmacopea europea, y entre sus actividades biológicas reportadas, se encuentran un alto potencial para la inhibición de acetilcolinesterasa, efecto antiinflamatorio, actividad antioxidante y anti nociceptiva (Martínez-Francés, *et al.*, 2017). Su aceite esencial presenta un amplio conjunto de compuestos monoterpénicos, de los cuales 1,8-cineol y alcanfor son los que definen el quimiotipo (Porres-Martínez, *et al.*, 2013).

Dentro de los compuestos presentes en la parte aérea, se encuentran los compuestos ácido ursólico, ampliamente reportado como antitumoral (Wang, *et al.*, 2011) y neuroprotector (Jin, *et al.*, 2012) y el diterpeno galdosol (Escudero, *et al.*, 1983), con propiedades antimicrobianas (Kintzios, 2000) (Fig.13).

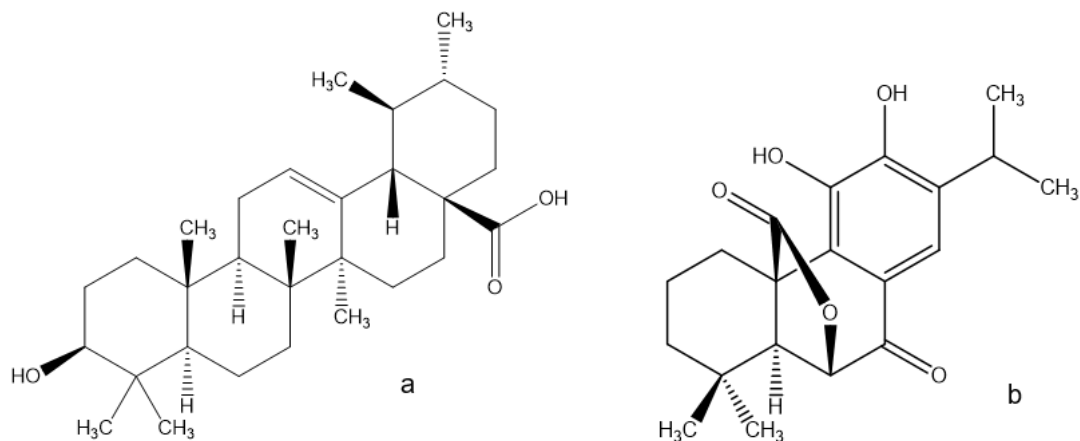


Fig. 13. Compuestos identificados de la parte aérea de *S. lavandulifolia*. a) Ácido ursólico, b) Galdosol.

### Estudios fitoquímicos de salvias de Baja California

La península de Baja California es hogar de una gran diversidad de plantas nativas y endémicas. Las salvias de la región crecen en arbustos en zonas rocosas y desérticas, expuestas a radiación solar prolongada.

El conjunto de especies *S. mellifera*, *S. munzii*, *S. brandegeei*, y *S. columbariae* comparten características morfológicas distintivas que las separan del resto de las salvias de la región, la más importante de ellas es el tipo de flor (Fig. 14), óptima para la polinización por abejas pequeñas (Neisess, *et al.*, 1987).

*Salvia mellifera* es una especie de importancia etnomédica entre las comunidades nativas de la región de Baja California. Su uso abarca desde decocciones para la tos, hasta infusiones para tratar padecimientos cardiacos (Bocek, 1984). Su aceite esencial presenta en su composición terpenos volátiles, mayoritariamente alcanfor, 1,8-cineol,  $\alpha$  y  $\beta$ -pineno, limoneno,  $\gamma$ -terpineno, entre otros (González, *et al.*, 1990).



Fig. 14. Flor de *S. mellifera*.

[https://www.calflora.org/cgi-bin/species\\_query.cgi?where-calrecnum=7311](https://www.calflora.org/cgi-bin/species_query.cgi?where-calrecnum=7311)

La composición química de la parte aérea, en un estudio realizado por González y colaboradores (González, *et al.*, 1990; González, *et al.*, 1991), también presenta compuestos de tipo terpenoide: lupeol, componente mayoritario del extracto acetónico, ácido carnósico, ácido oleanólico, salvicanol, carnosol, rosmanol, isorosmanol, galdosol, rosmadial, dimetilsalvicanol y dos nuevos triterpenos 3-ceto-13(28)-epoxi-ursan-11-eno, y 3,11-dioxo-ursan-12-eno. Posteriormente, se logró aislar los compuestos conocidos pisiferanol,  $\beta$ -sistosterol y 5- $\alpha$ ,6-dihidro-salviasperanol, así como un nuevo sesquiterpeno (Fig. 15) denominado salvimelliferol (Luis & Andrés, 1999).

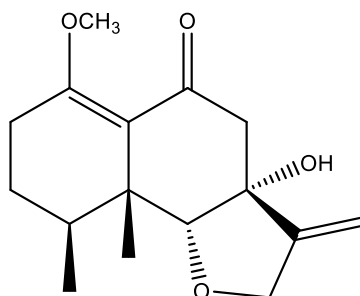


Fig. 15. Compuesto aislado de la parte aérea de *S. mellifera*, nombrado salvimelliferol.

Para *Salvia munzii*, otra salvia endémica de Baja California, se reporta la presencia de diterpenos en el extracto acetónico de la parte aérea: ácido carnósico, carnosol, 16-hidroxi-carnosol, isorosmanol, epirosmanol, rosmanol, 7-metoxirosmanol, 16-hidroxi-rosmanol, 16-hidroxi-isorosmanol, ácido 16-hidroxi-carnósico, 16-hidroxi-epirosmanol, y un nuevo diterpeno, 16-hidroxi-7-metoxi-rosmanol (Fig.16) fueron aislados y caracterizados por Luis y Grillo (Luis & Grillo, 1993a).

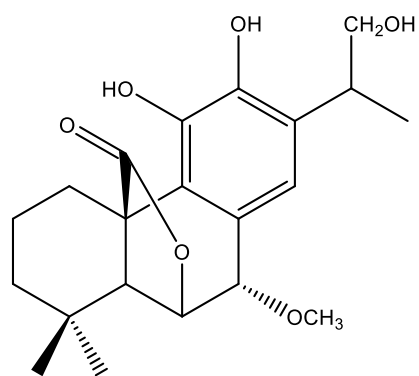


Fig. 16. Nuevo diterpeno aislado de *S. munzii*.

El mismo equipo de investigación llegó ese mismo año al aislamiento de un grupo de diterpenos conocidos, taxodiona, taxodona, criptotanshinona, 7 $\alpha$ -hidroxiroilenona, ferruginol, 6,7-didehidroferruginol, 6,7-didehidroempervirol, dimetilsalcicanol, ácido salvicanárico, entre otros, así como tres nuevos diterpenos abietanos: 5,6-didehidroxi-7-hidroxi-taxodona, 17-hidroxicriptotanshinona, y salvicanaraldehído (Luis & Grillo, 1993b).

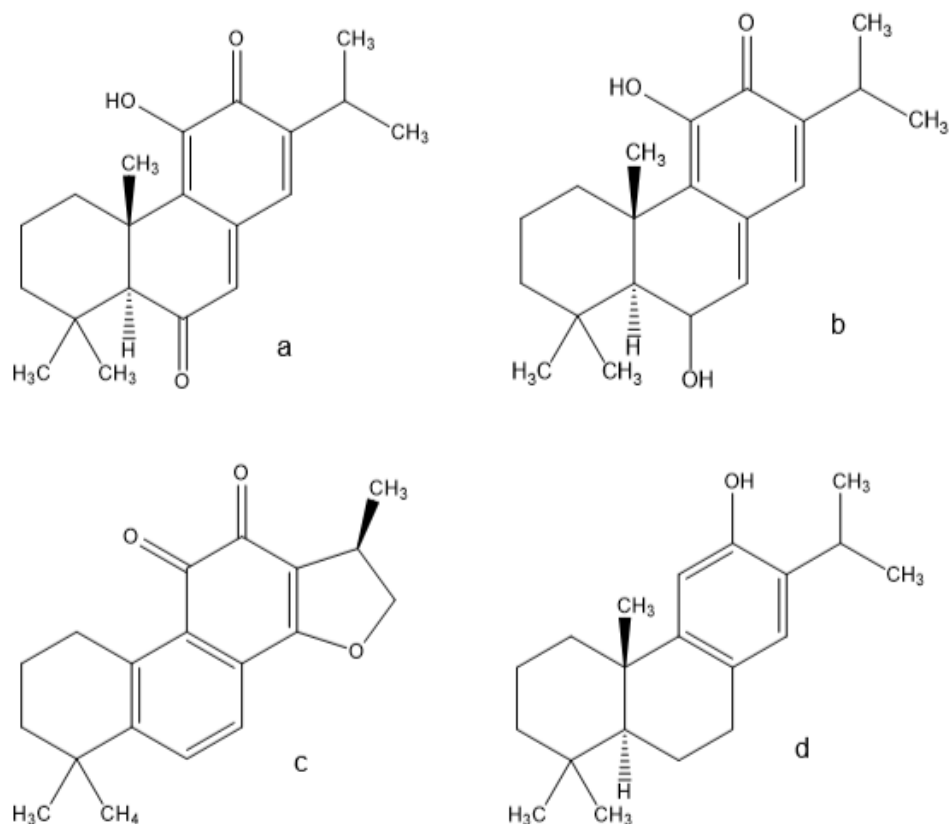


Fig. 17. Algunos de los diterpenos aislados de *S. munzii*. a) Taxodiona, b) Taxodona, c) Criptotanshinona, d) Ferruginol.

La salvia blanca (*S. apiana*), es también muy apreciada en las comunidades indígenas de la región de las Californias por sus propiedades medicinales, es principalmente utilizada como diurético. De su composición química, estudiada por González y colaboradores (González, *et al.*, 1992) destaca la presencia de compuestos triterpénicos como  $\alpha$ -amirin, ácido oleanólico, ácido ursólico, y ácido 16-hidrocarnósico, así como seis nuevos diterpenos (Fig. 18) aislados de la raíz de esta salvia: 6,7-dihidroferruginol, 6,7-didehidrosempervirol, 16-hidroxi-6,7-didehidroferruginol, 11,12,16-trihidroxi-20(10 $\rightarrow$ 5)abeo-abieta-1(10),6,8,11,13-pentaeno, 16-hidroxiroyleanona, y 6-deoxo-5,6-didehidrolanugon Q.

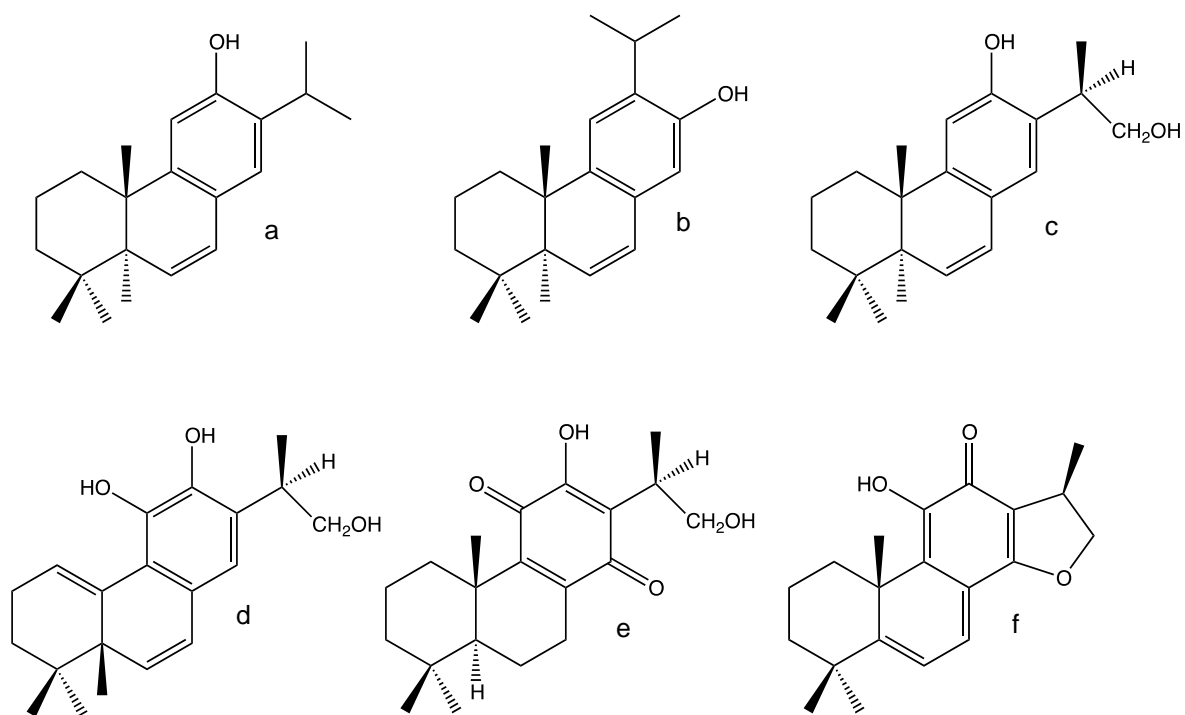


Fig. 18. Nuevos diterpenos aislados de la raíz de *S. apiana*. a) 6,7-dihidroferruginol, b) 6,7-didehidrosemperirol, c) 16-hidroxi-6,7-didehidroferruginol, d) 11,12,16-trihidroxi-20(10→5)abeo-abieta-1(10),6,8,11,13-pentaeno, e) 16- hidroxiroyleanona, y f) 6-deoxo-5,6-didehidrolanugon Q.

# **METODOLOGÍA**

## **METODOLOGÍA EXPERIMENTAL**

### **Generación de extractos**

#### **Recolección del material vegetal**

Previo a esta tesis, se realizó la recolecta de la raíz de *S. brandegeei*, en el mes de Julio del año 2015, en su hábitat natural, en el Ejido Punta Colonet, con localización geográfica 116°12'28"O y 31°04'24"N, y altitud de 20 msnm, ubicado en el municipio de Ensenada. La autenticación taxonómica se avaló por el Botánico, Dr. José Delgadillo Rodríguez.

#### **Tratamiento del material vegetal**

El material vegetal fresco se lavó y fue colocado sobre una superficie plana para su secado a temperatura ambiente (Fig. 19) por un tiempo aproximado de un mes. Posteriormente fue triturado a trozos de aproximadamente 5 cm de largo por 1 cm de ancho y 5 mm de espesor, esto con la finalidad de tener una mayor superficie de contacto con el disolvente.

Se obtuvo un peso final de material vegetal seco de 1.9 kg, que fueron destinados a maceración para la obtención del extracto.



Fig. 19. Secado de la raíz de *S. brandegeei*.

### **Obtención del extracto crudo**

El material vegetal seco fue sometido a maceración con metanol por dos semanas. Posteriormente fue filtrado y el disolvente evaporado a presión reducida a 37°C en un rotaevaporador. El proceso se llevó a cabo por triplicado, utilizando un total aproximado de siete litros de metanol para la maceración, y obteniéndose 258 g de extracto crudo.



Fig. 20. *Izq.* Concentración del extracto crudo de la raíz de *S. brandegeei*; *Der.* Extracto crudo seco de la raíz de *S. brandegeei*.

### Partición del extracto crudo

Para generar las particiones o extractos de diferentes polaridades a partir del extracto crudo, se tomaron 100 g del extracto crudo generado y se siguieron los procedimientos de solubilidad diferencial para conseguir la extracción más completa de las sustancias de interés presentes en el material (Kupchan, 1969).



Fig.21. Extracto hexánico de la raíz de *S. brandegeei*.

## Aislamiento y caracterización de metabolitos secundarios

### Aislamiento de metabolitos secundarios

Para el fraccionamiento cromatográfico del extracto hexánico de la raíz de *S. brandegeei*, se comenzó por identificar una mezcla eluyente que permitiera la adecuada separación de los compuestos presentes, esto se realizó mediante cromatografía en capa fina (CCF) utilizando diversas mezclas de solventes como fases móviles, se empleó luz ultravioleta de onda corta como revelador luminoso y oleum como revelador químico. Se determinó que la mezcla de *n*-hexano y acetato de etilo (AcOEt), permitía una separación adecuada de los componentes del extracto.

Se fraccionaron 14.5 g del extracto hexánico seco, en disolución con diclorometano (DCM), utilizando una columna cromatográfica con una altura de 46 cm de gel de sílice como fase estacionaria y mezcla de solventes *n*-hexano y AcOEt en gradiente de polaridad.

Las fracciones se recolectaron en tubos de ensayo; posteriormente se evaluó su perfil cromatográfico mediante CCF y se unieron las fracciones similares, generando las reuniones que fueron concentradas con rotaevaporador. Las reuniones obtenidas fueron almacenadas en viales de vidrio a 4°C.



Fig. 22. Siembra de la columna de fraccionamiento del extracto hexánico.



Fig. 23. Recolección de fracciones.

El rastreo y aislamiento de metabolitos secundarios de interés, se realizó mediante técnicas cromatográficas: cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), CCF, cromatografía preparativa y cromatografías en columna tipo flash. Asimismo, se emplearon técnicas de separación y purificación como percolados, precipitación disolvente-disolvente y recristalización.

El análisis cromatográfico se llevó a cabo en el cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas, se utilizó una columna de 30 m de largo, con un diámetro interno de 0.25 mm, y con grosor de la capa de 0.25  $\mu\text{m}$ . Como gas acarreador, se utilizó helio. Las condiciones del experimento para el análisis de las muestras se detallan en la tabla 3.

**Tabla 3.** Condiciones para los experimentos de CG

<b>Temperatura del inyector</b>	250°C
<b>Flujo</b>	1 ml/min
<b>Split</b>	1:20
<b>Temperatura inicial del horno</b>	120°C
<b>Gradiente de temperatura</b>	40°C/min
<b>Temperatura final del horno</b>	280°C
<b>Tiempo a la temperatura final</b>	10 min

Las cromatografías en capa fina se realizaron en placas de gel de sílice con revelador fluorescente, revelando con luz ultravioleta de ondas corta y larga, y el revelador químico óleum activado con calor.

Las cromatografías preparativas se realizaron sobre placas de gel de sílice de 20x20 cm con revelador fluorescente. Las placas fueron colocadas dentro de una cámara cromatográfica y fueron reveladas con luz ultravioleta de onda corta y larga. Una vez identificadas las bandas de interés, se realizó un raspado del gel de sílice con ayuda de una espátula, y el producto se recuperó por medio de percolados con el solvente adecuado y con rotaevaporación a 37°C para concentrar las muestras.

Para las cromatografías en columna, se seleccionaron las columnas del diámetro adecuado para la cantidad de muestra a fraccionar. Las muestras fueron disueltas en el disolvente apropiado para sus características de polaridad, *n*-hexano, DCM o acetona, y se sembraron en la columna con gel de sílice previamente compactada. La elución se inició empleando *n*-hexano al 100% seguido de mezclas de solventes en polaridad creciente. Finalmente, las columnas fueron barridas con metanol. Las reuniones obtenidas fueron concentradas con rotaevaporador. En los diagramas 1, 2, y 3 se resume el fraccionamiento sucesivo de las reuniones hasta llegar al aislamiento de metabolitos de interés.

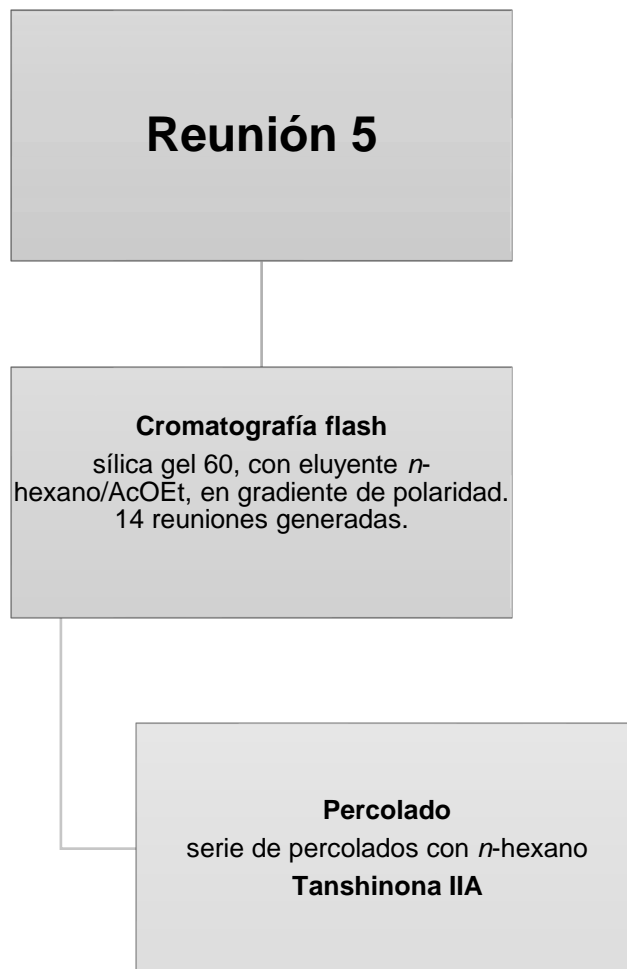


Diagrama 1. Fraccionamiento y rastreo de metabolitos de la reunión R5.

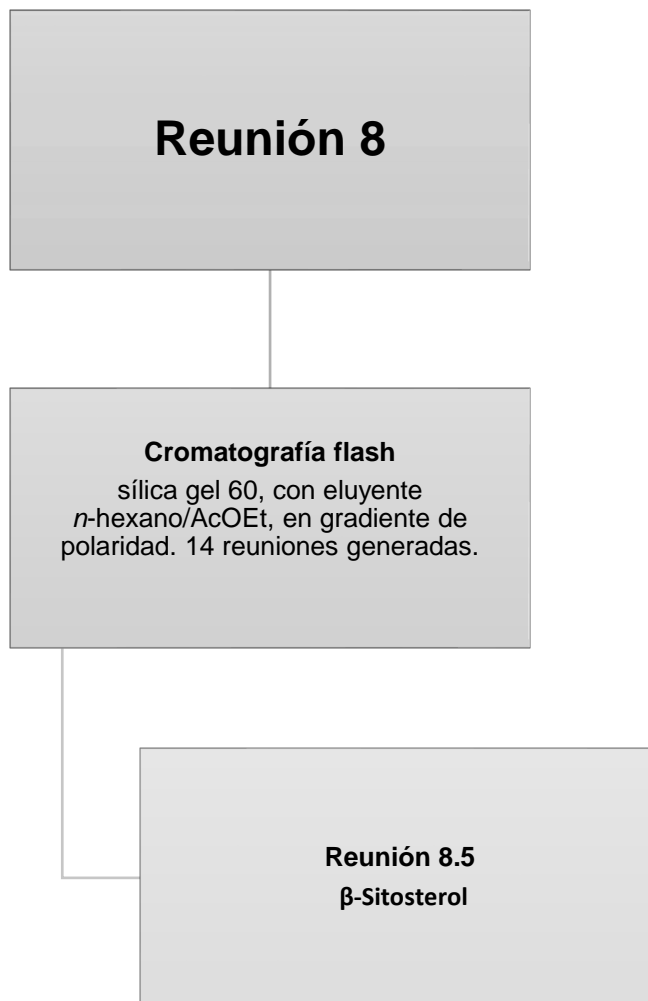


Diagrama 2. Fraccionamiento y rastreo de metabolitos de la reunión R8.

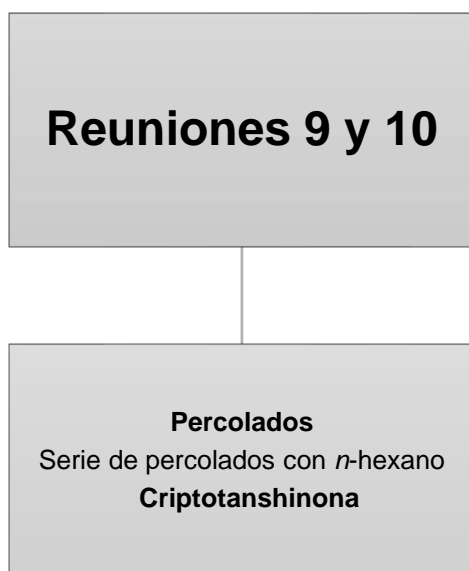


Diagrama 3. Rastreo de metabolitos en las reuniones R9 y R10.

### **Caracterización de productos naturales aislados**

La caracterización de los compuestos aislados se llevó a cabo empleando las técnicas de espectrometría de masas y de espectroscopía de resonancia magnética nuclear.

Para la obtención de los espectros de masas, se empleó la técnica de ionización por impacto electrónico, utilizando un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas de cuádruplo sencillo.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear fueron obtenidos en un equipo de alta resolución de 400 MHz. Se realizaron experimentos de RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ , y los experimentos bidimensionales mono y heteronucleares RMN  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY y RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC. Para el análisis, las muestras fueron solubilizadas en  $\text{CDCl}_3$ .

## **DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### Generación de extractos

De la partición por solubilidad diferencial de 100 g del extracto crudo se obtuvieron cuatro extractos de distintas polaridades. Las masas obtenidas se indican en la tabla 4.

**Tabla 4.** Resultados de la partición del extracto crudo.

<b>Extracto</b>	<b>Clave de identificación</b>	<b>Masa (g)</b>
<b>Crudo</b>	RSBC	258
<b>Agua</b>	RSBA	22
<b>Butanol</b>	RSBB	15
<b>DCM</b>	RSBD	45
<b><i>n</i>-Hexano</b>	RSBH	17

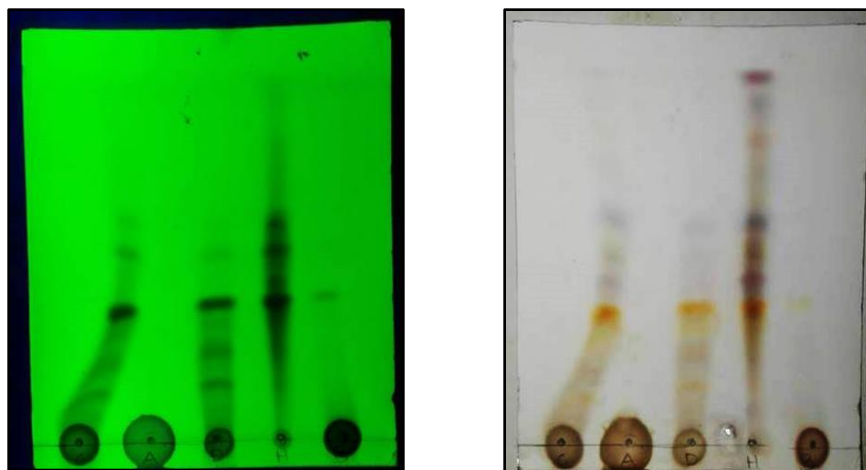


Fig. 24. *Izq.* CCF de los extractos vista bajo luz UV de onda corta, de izquierda a derecha: crudo, acuoso, butanólico, DCM, y n-hexánico. *Der.* CCF de los extractos utilizando el revelador químico óleum. Se utilizó una mezcla de *n*-hexano/AcOEt 30% como fase móvil para esta placa.

### **Fraccionamiento cromatográfico del extracto hexánico**

Para la identificación cualitativa preliminar de la composición química de los extractos, se realizó una CCF comparativa del crudo y las respectivas particiones (Fig. 24). El extracto hexánico RSBH presentó una interesante gama de compuestos apolares, que como era de esperarse, no se encontraron en las particiones de polaridad intermedia (RSBD) ni en las de polaridad alta RSBA y RSBB.

Previo al fraccionamiento cromatográfico del extracto hexánico, se realizó una identificación cualitativa utilizando CCF con diferentes mezclas eluyentes para encontrar una fase móvil que permitiera la separación adecuada de los compuestos presentes en dicho extracto. De igual manera se experimentó con diversos reveladores químicos, siendo el revelador óleum el que permitió observar un mejor perfil de la composición del extracto (Fig. 25)

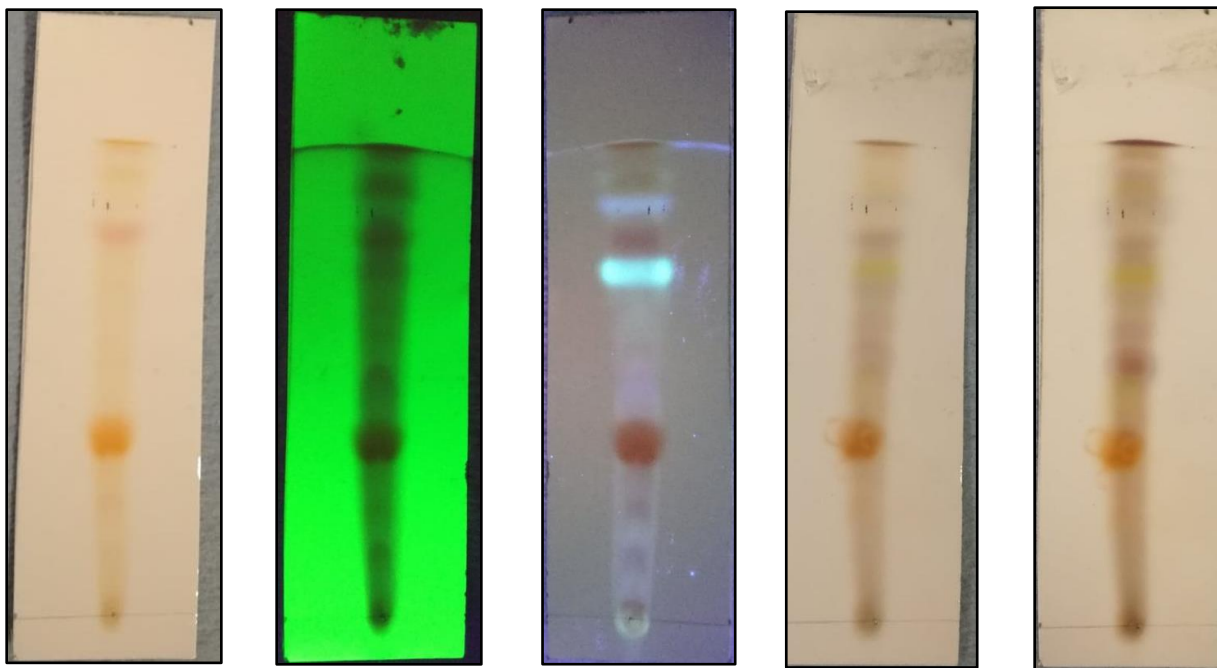


Fig. 25. CCF del extracto hexánico, utilizando como fase móvil *n*-hex/acOET 20%. De izquierda a derecha: sin revelador, bajo luz UV de onda corta, bajo luz UV de onda larga, revelada con óleum (primeras tonalidades), revelada con óleum (tonalidades finales).

La CCF eluída con la mezcla *n*-hexano/AcOEt 20% presentó la mejor separación de compuestos. Se pudo observar de manera preliminar la proporción de los metabolitos presentes: la placa eluída indicó la presencia de dos metabolitos posiblemente mayoritarios, mientras que al revelarlas bajo luz UV y revelador químico, fue posible distinguir cuatro compuestos presentes en mayor proporción. La CCF permitió identificar, de manera preliminar, los metabolitos mayoritarios del extracto hexánico, así como ubicar su polaridad aproximada.

La presencia de compuestos de tonalidades naranjas a rojas en la placa sin revelar sería el primer indicador de la presencia de compuestos de tipo Tanshinona en el extracto hexánico.

Del fraccionamiento cromatográfico del extracto hexánico se obtuvieron 110 fracciones, simplificadas en 13 reuniones, de acuerdo con su perfil cromatográfico evaluado mediante CCF. Las masas de las reuniones se detallan en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Masa de las reuniones obtenidas del fraccionamiento cromatográfico del extracto hexánico.

<b>Reunión</b>	<b>Masa (g)</b>
<b>R1</b>	0.364
<b>R2</b>	0.618
<b>R3</b>	0.708
<b>R4</b>	0.266
<b>R5</b>	1.052
<b>R6</b>	0.748
<b>R7</b>	2.678
<b>R8</b>	1.606
<b>R9</b>	1.367
<b>R10</b>	1.178
<b>R11</b>	0.586
<b>R12</b>	0.904
<b>R13</b>	0.802

Una vez definidas las reuniones, se realizó una CCF (Fig. 26) para identificar los compuestos mayoritarios y de interés; tomando en cuenta estas características, se seleccionaron las reuniones con las cuales se continuó el rastreo de metabolitos.

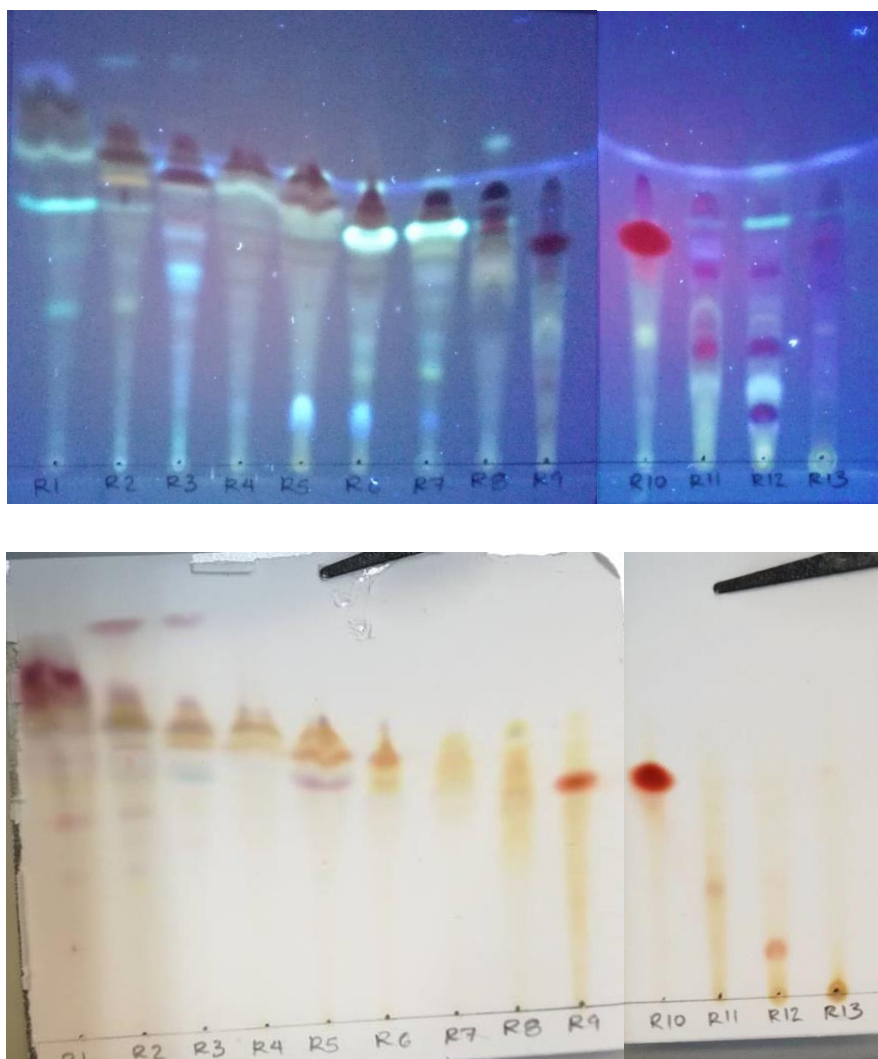


Fig. 26. CCF de las reuniones obtenidas a partir del extracto hexánico, FM *n*-hexano/AcOEt 30%; de izquierda a derecha se encuentran las reuniones 1-13. *Arriba*: Bajo luz UV de onda larga. *Abajo*: Revelada con óleo.

Las reuniones de mayor abundancia en masa fueron las reuniones intermedias identificadas como R5, R8, R9, R10. Las reuniones R5, R6, R8, R9 y R10 al ser reveladas con óleo, mostraron la presencia de compuestos mayoritarios de tonalidades naranjas a rojas, coloración característica de compuestos de tipo Tanshinona.

## Aislamiento y caracterización de metabolitos

### Tanshinona IIA

Como resultado del fraccionamiento cromatográfico sucesivo de la reunión R5, se aisló y caracterizó un primer compuesto, cuyas características se detallan a continuación.

**Nombre Químico:**

1,6,6-trimetil-6,7,8,9-tetrahidrofenantro[1,2-b]furan-10,11-diona

**Fórmula molecular:** C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>O<sub>3</sub>

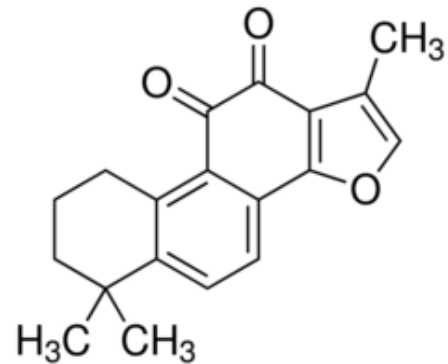


Fig. 27. Estructura de Tanshinona IIA

**Peso molecular:** 294.35 g/mol

**Aspecto físico:** Cristales rojizos (Fig. 28)

**Cantidad aislada:** 11.6 mg



Fig. 28. Tanshinona IIA aislada de la reunión 5.

El espectro de masas resultante del análisis por EM presentó un ión molecular de 294 *m/e*, correspondiente a la estructura de la Tanshinona IIA; de igual manera, se

podieron observar los fragmentos característicos para este compuesto: 279 *m/e*, 251 *m/z*, 233 *m/z*, y 165 *m/e*. El pico base fue coincidente con el ion molecular a 294 *m/e*. Los fragmentos de *m/e* 279 y 251, podrían interpretarse como la pérdida de un metilo, seguida de una descarboxilación.

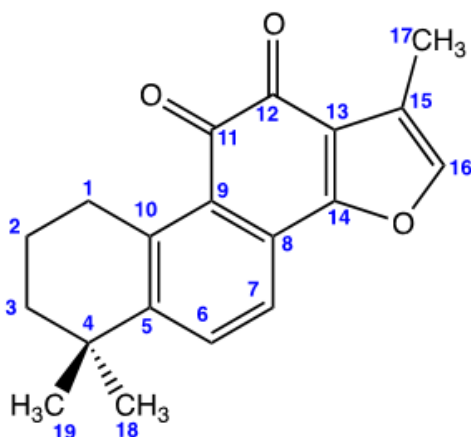


Fig. 29. Estructura enumerada de Tanshinona IIA para RMN.

En el espectro de resonancia magnética nuclear de protón RMN  $^1\text{H}$ , se observaron las señales características de los diterpenos de tipo abietano: una señal singulete a 1.31 ppm, con integración para seis hidrógenos, que corresponde a los metilos H-28 y H-19; continuando con los hidrógenos del mismo anillo, se encuentra la señal correspondiente al H-1, a 3.18 ppm, con multiplicidad triplete, y que presenta una constante de acoplamiento de 6.4 Hz, característica de los acoplamientos de tipo vecinal de libre giro. La señal a 1.79 ppm corresponde al hidrógeno H-2 y se observó como multiplete asociado al acoplamiento vecinal con los hidrógenos H-1 y H-3 a tres enlaces; en la misma zona, se observa la señal asignada al hidrógeno H-3, con un desplazamiento de 1.65 ppm, observado como un multiplete con integración para dos hidrógenos.

En la zona correspondiente a los hidrógenos aromáticos, se identificaron las señales correspondientes a H-6 y H-7, un par de dobletes que mostraron la misma constante de acoplamiento, 8.16 Hz, correspondiente a acoplamientos vecinales en sistemas aromáticos.

Los hidrógenos pertenecientes al sistema furano fueron asignados a las señales a un desplazamiento de 7.21 ppm para H-16, y 2.26 ppm para H-17, ambas señales se identificaron como singuletes integrando para uno y tres hidrógenos respectivamente.

En la Tabla 6 puede observarse un resumen de las asignaciones del espectro de RMN  $^1\text{H}$  para la Tanshinona IIA.

**Tabla 6.** Asignaciones RMN  $^1\text{H}$  para Tanshinona IIA.

<b>Hidrógeno</b>	<b><math>\delta_{\text{H}}</math> (ppm)</b>	<b>Multiplicidad</b>	<b>Integración</b>	<b>J(Hz)</b>
H-1	3.18	Triplete	2H	6.4
H-2	1.79	Multiplete	2H	-
H-3	1.65	Multiplete	2H	-
H-6	7.62	Doblete	1H	8.16
H-7	7.54	Doblete	1H	8.16
H-16	7.21	Singulete	1H	-
H-17	2.26	Singulete	3H	-
H-18	1.30	Singulete	6H	-
H-19	1.30	Singulete	6H	-

Para las asignaciones en RMN  $^{13}\text{C}$ , se tomó como apoyo la información obtenida a partir de los experimentos RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  DEPT. El espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  muestra dos señales a campo bajo, que corresponden a los carbonilos de la estructura C-11 y C-12, con desplazamientos de 183.7 y 175.8 ppm respectivamente. La zona de los carbonos aromáticos muestra las señales correspondientes a los carbonos C-5, C-6, C-7, C-8, C-9 y C-10.

En la región de campo alto se encuentran las señales pertenecientes a los carbonos de metilos C-18 y C-19, integrados en una señal a 31.9 ppm, y la señal respectiva al carbono C-17, observable a un desplazamiento de 8.8 ppm. Todas las asignaciones de carbonos se resumen en la tabla 7.

**Tabla 7.** Asignaciones de RMN  $^{13}\text{C}$  para Tanshinona IIA.

<b>Carbono</b>	<b><math>\delta_c</math> (ppm)</b>	<b>Carbono</b>	<b><math>\delta_c</math> (ppm)</b>
C-1	29.7	C-11	183.7
C-2	19.2	C-12	175.8
C-3	37.9	C-13	121.2
C-4	34.7	C-14	161.7
C-5	127.5	C-15	120.3
C-6	133.4	C-16	141.3
C-7	119.9	C-17	8.8
C-8	126.5	C-18	31.9
C-9	150.2	C-19	31.9
C-10	144.5		

El experimento bidimensional homonuclear RMN  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY mostró el acoplamiento entre los hidrógenos vecinales H-6 y H-7; además se observó la señal relativa al acoplamiento a cuatro enlaces del hidrógeno H-16 y los hidrógenos del metilo 17; por último, pudieron observarse las correlaciones a tres enlaces de los hidrógenos H-1 y H-2, y H-2 con H-3 (Fig.30).

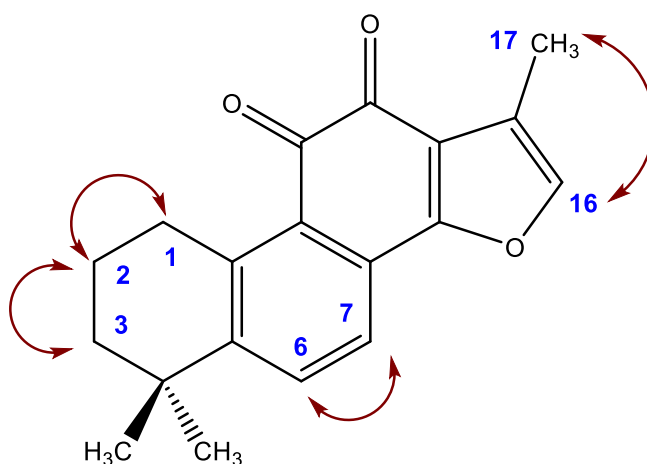


Fig. 30. Correlaciones homonucleares para Tanshinona IIA.

En el espectro del experimento bidimensional heteronuclear RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC, se observaron señales que confirmaron la presencia de los metilos 18 y 19, cuyos protones mostraron correlación con el carbono C-4. El hidrógeno aromático H6 presentó correlación a dos enlaces con el carbono C-5, así como una correlación a tres enlaces con el carbono C-10; por su parte el hidrógeno H-7 mostró un acoplamiento con ambos carbonos, además de correlaciones a tres enlaces con los carbonos C-9 y C-14. Resaltaron las señales correspondientes al metilo 17, en las que se identificó correlaciones de sus hidrógenos con los carbonos C-15 y C-16, a dos y tres enlaces, respectivamente. Las correlaciones mencionadas, así como el resto de las observadas, se presentan en la figura 31.

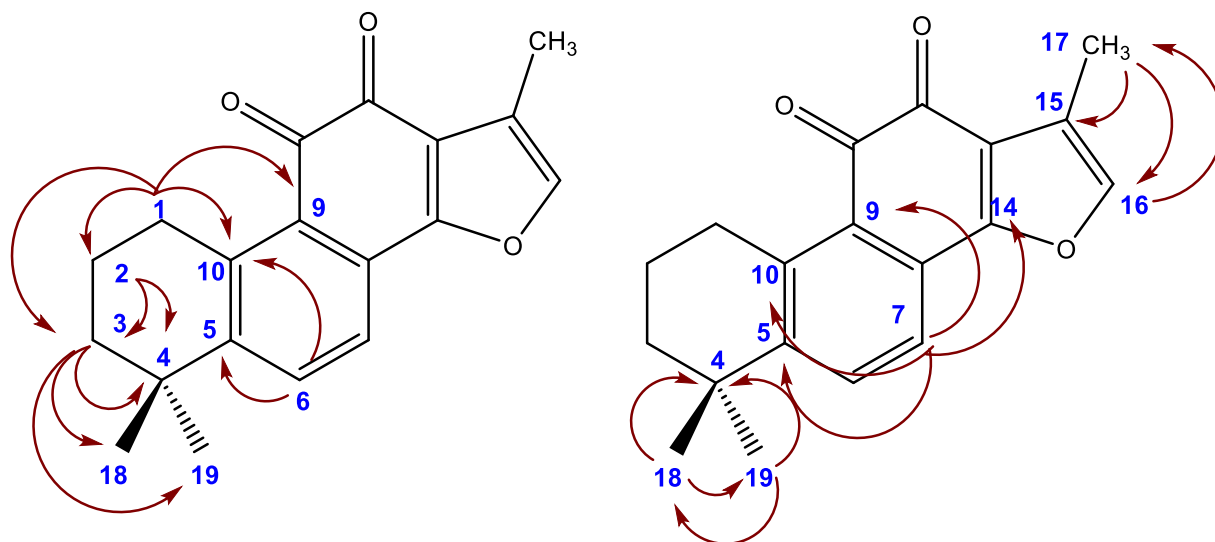


Fig. 31 Comportamiento de correlación a dos y tres enlaces en el experimento

RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC para Tanshinona IIA

Un resumen de todas las asignaciones de RMN para Tanshinona IIA, se presenta en la tabla 8.

**Tabla 8.** Asignaciones de RMN para Tanshinona IIA.

Posición	RMN <sup>1</sup> H				RMN <sup>13</sup> C	Bidimensional	
	δ <sub>H</sub>	Multiplicidad	Integración	J(Hz)	δ <sub>C</sub>	RMN <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H-COSY	RMN <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C HMBC
1	3.18	Triplete	2H	6.4	29.7	H-2	C-2, C-3, C-9, C-10
2	1.79	Multiplete	2H	-	19.2	H-1,H-3	C-1,C-3,C-4
3	1.65	Multipete	2H	-	37.9	H-2	C-1,C-4,C-18 y C-19
4	-	-	-	-	34.7	-	-
5	-	-	-	-	127.5	-	-
6	7.62	Dobleto	1H	8.16	133.5	H-7	C-5,C-10
7	7.54	Dobleto	1H	8.16	119.9	H-6	C-5,C-9,C-10, C-14
8	-	-	-	-	126.5	-	-
9	-	-	-	-	150.2	-	-
10	-	-	-	-	144.5	-	-
11	-	-	-	-	183.7	-	-
12	-	-	-	-	175.8	-	-
13	-	-	-	-	121.2	-	-
14	-	-	-	-	161.7	-	-
15	-	-	-	-	120.3	-	-
16	7.21	Singulete	1H	-	141.3	H-17	C-17
17	2.26	Singulete	3H	-	8.8	H-16	C-15,C-16
18	1.30	Singulete	6H	-	31.9	-	C-4,C-19
19	1.30	Singulete	6H	-	31.9	-	C-4,C-18

## Criptotanshinona

A partir de la reunión R9 se aislaron 5 mg de cristales de color naranja, insolubles en hexano.

### Nombre Químico:

1,6,6-trimetil-1,2,6,7,8,9-hexahidrofenantro[1,2-b]furan-10,11-diona

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

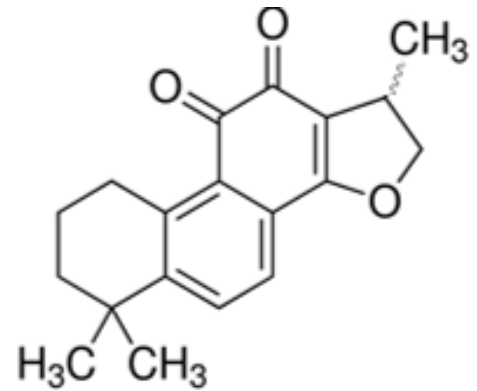


Fig. 32. Criptotanshinona.

**Peso molecular:** 296.36 g/mol

**Aspecto físico:** Cristales naranja (Fig. 33)

**Cantidad aislada:** 5 mg



Fig. 33.  
Criptotanshinona  
aislada de la reunión 9.

En espectrometría de masas se obtuvo un ion molecular de 296  $m/e$ , que relaciona la masa esperada para el compuesto Criptotanshinona. Se observaron además los iones característicos previamente reportados en la literatura: 253  $m/e$ , 165  $m/e$ , 128  $m/e$ , 43  $m/e$ , y 29  $m/e$ , siendo este último el pico base.

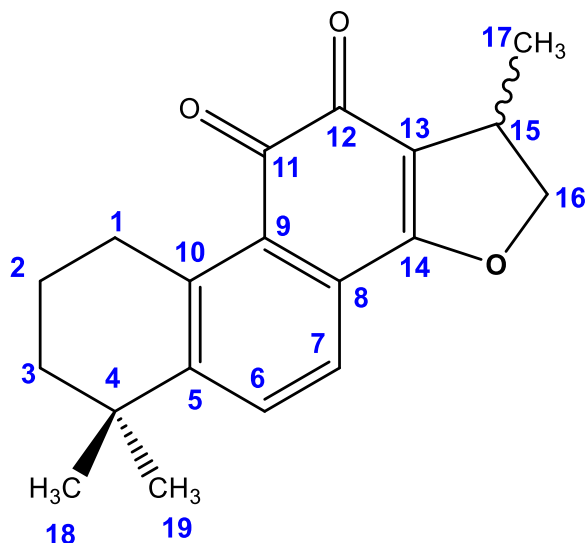


Fig. 34. Estructura enumerada de Criptotanshinona para RMN.

El espectro de RMN <sup>1</sup>H mostró evidencia de un esqueleto muy similar al de la Tanshinona IIA: el par de dobletes respectivos a los hidrógenos H-6 y H-7, un singulete con integración para seis hidrógenos correspondiente a los núcleos H-18 y H-19, así como las señales de multipletes para los hidrógenos H-2 y H-3, y un triplete correspondiente a H-1. La caracterización de los hidrógenos del sistema furano fue determinada con la identificación de la señal correspondiente al hidrógeno H-15; también se observó un desplazamiento a campo alto del hidrógeno H-17 y dos señales a 4.87 y 4.36 ppm, que confirman la presencia de hidrógenos diasterotópicos en la posición 16, ambas con multiplicidad doble de dobles con integración para un hidrógeno.

En la tabla 9 puede observarse un resumen de las asignaciones del espectro de RMN<sup>1</sup>H para la Criptotanshinona.

**Tabla 9.** Asignaciones RMN <sup>1</sup>H para Criptotanshinona.

Hidrógeno	$\delta_H$ (ppm)	Multiplicidad	Integración	J(Hz)
H-1	3.22	Triplete	2H	6.4
H-2	1.79	Multiplete	2H	-
H-3	1.66	Multiplete	2H	-
H-6	7.62	Doblete	1H	8.08
H-7	7.49	Doblete	1H	8.08
H-15	3.58	Multiplete	1H	-
H-16a	4.87	dd	1H	$J_1=9.32$ $J_2=nc$
H-16b	4.36	dd	1H	$J_1=9.32$ $J_2=6.04$
H-17	2.26	Singulete	3H	-
H-18	1.30	Singulete	6H	-
H-19	1.30	Singulete	6H	-

En el experimento de RMN <sup>13</sup>C se observaron 19 átomos de carbono en un espectro similar al de Tanshinona IIA. Los experimentos RMN <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C DEPT confirmaron la presencia de los carbonos de los metilos C-18 y C-19 a desplazamientos de 32.1 y 32.0 ppm, además de la señal de metilo perteneciente al carbono C-17 a 18.9 ppm. Las señales correspondientes a los carbonos C-15 y C-16 se observan a campo más alto en

comparación con estas mismas posiciones que también se observan en Tanshinona IIA, esto debido al aumento de densidad electrónica en Criptotanshinona.

Las señales para los carbonos C-6 y C-7 se observaron a desplazamientos de 132.7 y 122.6 ppm respectivamente, que fueron muy similares a sus homólogos en Tanshinona IIA. Por último, las señales correspondientes a los carbonilos C-11 y C-12 fueron identificadas a campo más bajo, con desplazamientos de 184.4 y 175.8 ppm respectivamente.

Todas las asignaciones para RMN  $^{13}\text{C}$  con los respectivos desplazamientos, se encuentran resumidas en la tabla 10.

**Tabla 10.** Asignaciones de RMN  $^{13}\text{C}$  para Criptotanshinona.

<b>Carbono</b>	<b><math>\delta_c</math> (ppm)</b>	<b>Carbono</b>	<b><math>\delta_c</math> (ppm)</b>
C-1	29.8	C-11	184.4
C-2	19.20	C-12	175.8
C-3	37.9	C-13	118.4
C-4	34.8	C-14	170.8
C-5	128.6	C-15	34.9
C-6	132.7	C-16	81.6
C-7	122.6	C-17	18.9
C-8	126.4	C-18	32.1
C-9	152.5	C-19	32.0
C-10	143.8		

En el espectro del experimento RMN  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY se observaron nuevamente las señales relativas al acoplamiento a tres enlaces del hidrógeno H-2 con H-1 y H-3; asimismo, se observó una correlación de acoplamiento entre los hidrógenos vecinales H-6 y H-7.

Unas de las señales características de Criptotanshinona, fueron las de los hidrógenos diastereotópicos H-16a y H-16b y del hidrógeno H-15, además del acoplamiento a tres enlaces de los núcleos de hidrógeno H-17 con el protón de la posición 15.

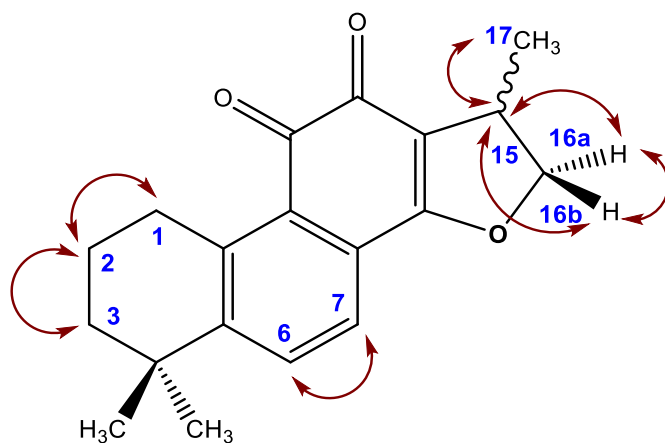
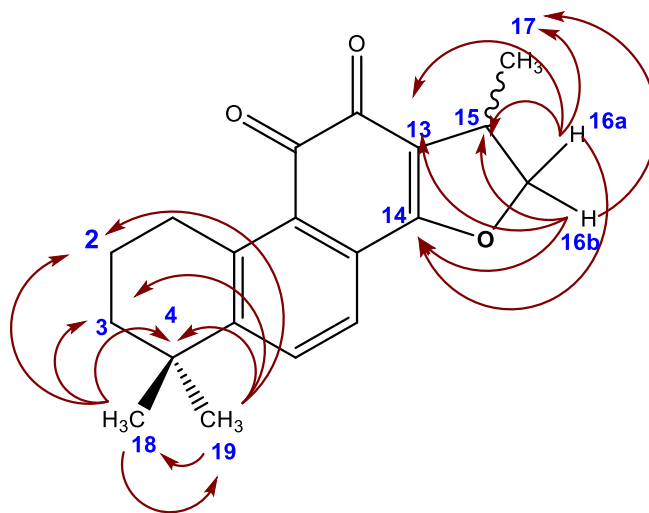


Fig. 35. Correlaciones homonucleares para Criptotanshinona.

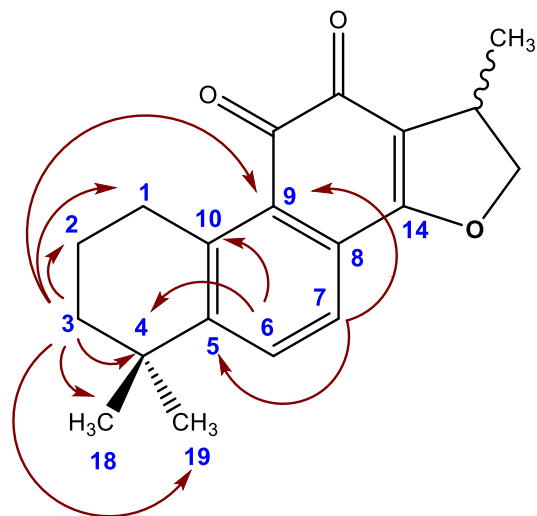
En el espectro del experimento RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC, fue posible observar las señales de correlación de los hidrógenos de las posiciones 18 y 19 con los carbonos C-2, C-3 y C-4 (Fig. 36 a). En el sistema aromático, el hidrógeno H-6 mostró un acoplamiento con los carbonos C-4 y C-10, mientras que H-7 muestra un acoplamiento a tres enlaces con los carbonos C-5, C-9 y C-14 (Fig. 36 b).

Del anillo alifático A, se observaron las señales de interacciones del hidrógeno H-1 con C-2, C-3, C-5, C-9, y C-10 (Fig. 36 c); H-2 a dos enlaces con C-1 y C-3, y a tres enlaces con C-4 y C-10 (Fig. 36 c), y el hidrógeno H-3 con los metilos C-18 y C-19 y con los carbonos C-1, C-2, C-4 y C-9 (Fig. 36 b).

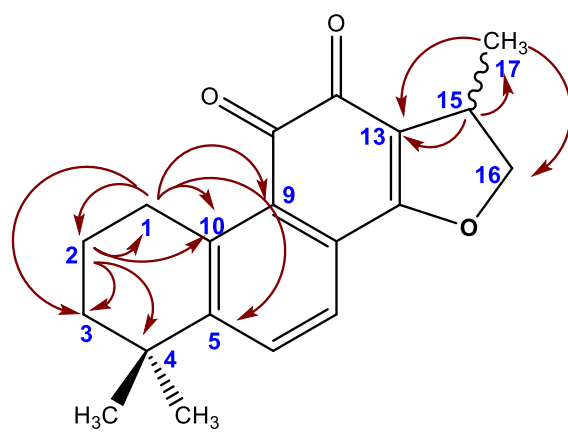
Las señales correspondientes al sistema furano fueron identificados con los hidrógenos diasterotópicos de la posición 16, ambos presentaron correlaciones con los carbonos C-13, C-14, C-15 y C-17 (Fig. 36 a). También fue posible apreciar las correlaciones del hidrógeno H-15 a dos enlaces con C-13 y C-17, y el hidrógeno H-17 con los carbonos C-13 y C-16, ambas a tres enlaces (Fig. 36 c). Todas las correlaciones observadas se presentan de manera ilustrativa en las figuras 1, 2, y 3. Un resumen de todas las asignaciones correspondientes a RMN de Criptotanshinona se presentan en la tabla 11.



a



b



c

Fig. 36. Comportamiento de correlación RMN  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC para Criptotanshinona.

**Tabla 11.** Asignaciones de RMN para Criptotanshinona.

Posición	RMN <sup>1</sup> H				RMN <sup>13</sup> C	Bidimensional	
	δ <sub>H</sub>	Multiplicidad	Integración	J(Hz)	δ <sub>C</sub>	RMN <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H-COSY	RMN <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C HMBC
1	3.22	Triplete	2H	6.4	29.8	H-2	C-2, C-3, C-5,C-9, C-10
2	1.79	Multiplete	2H	-	19.2	H-1, H-3	C-1,C-3, C-4,C-10
3	1.66	Multiplete	2H	-	37.9	H-2	C-1,C-2, C-4,C-9, C-18 C-19
4	-	-	-	-	34.8	-	-
5	-	-	-	-	128.6	-	-
6	7.62	Doblete	1H	8.08	132.7	H-7	C-4,C-10
7	7.49	Doblete	1H	8.08	122.6	H-6	C-5,C-9, C-14
8	-	-	-	-	126.4	-	-
9	-	-	-	-	152.5	-	-
10	-	-	-	-	143.8	-	-
11	-	-	-	-	184.4	-	-
12	-	-	-	-	175.8	-	-
13	-	-	-	-	118.4	-	-
14	-	-	-	-	170.8	-	-
15	3.58	Multiplete	1H	-	34.9	H-16a, H-16b, H-17	C-13,C-17
16 <sup>a</sup>	4.87	dd	1H	$J_1=9.3$ $J_2=nc$	81.6	H-15, H-16b	C-13,C-14, C-15,C-17
16 <sup>b</sup>	4.36	dd	1H	$J_1=9.3$ $J_2=6.0$		H-15, H-16a	C-13,C-14, C-15,C-17
17	2.26	Doblete	3H	-	18.9	H-15	C-13,C-16
18	1.30	Singulete	6H	-	32.0	-	C-2,C-3,C-4,C-19
19	1.30	Singulete	6H	-	32.0	-	C-2,C-3, C-4,C-18

## $\beta$ -Sitosterol

Resultante del fraccionamiento cromatográfico de la reunión 8, se llegó al aislamiento del compuesto  $\beta$ -sitosterol.

**Nombre Químico:**

24-etilcolest-5-en-3beta-ol

**Fórmula molecular:**  $C_{29}H_{50}O$

**Peso molecular:** 414.71 g/mol

**Aspecto físico:** Polvo blanco, ceroso (Fig. 38)

**Cantidad aislada:** 6 mg

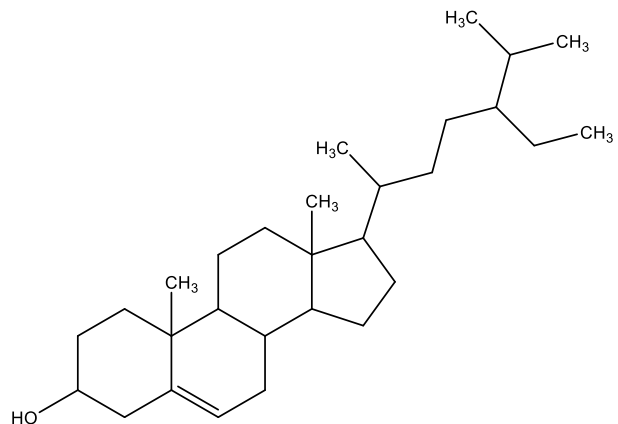


Fig. 37.  $\beta$ -Sitosterol



Fig. 38.  $\beta$ -Sitosterol aislado de la reunión 8.

El espectro de masas correspondiente muestra un ión molecular de 414  $m/e$ , congruente con la estructura del compuesto  $\beta$ -Sitosterol. El pico base pudo observarse a 43  $m/e$ , y los fragmentos característicos (NIST, 2008) a 329, 255, 213, 173, 95, 69, y 55  $m/e$  también son observables en el espectro.

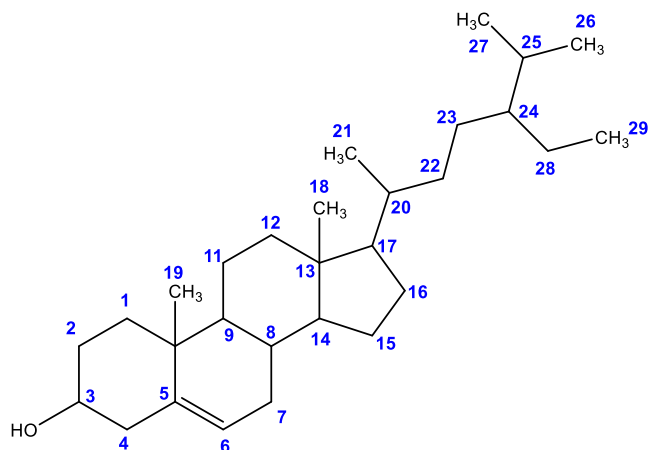


Fig. 39. Estructura enumerada  $\beta$ -Sitosterol para RMN.

El compuesto  $\beta$ -Sitosterol ha sido ampliamente reportado en la literatura científica, por lo que fue posible la comparación del espectro obtenido por el experimento de resonancia magnética nuclear de hidrógeno RMN  $^1\text{H}$  con los reportes previos para la elucidación estructural, incluyendo las comparaciones realizadas por Patra y colaboradores (Patra, et al., 2010) con programas informáticos predictivos, y la caracterización del compuesto aislado en el laboratorio previo al desarrollo de esta tesis.

Se realizó la asignación de las señales más características para el fitoesterol  $\beta$ -Sitosterol. El hidrógeno de la posición H-3, correspondiente al carbono unido al grupo hidroxilo, se identificó con un desplazamiento de 3.52 ppm, región característica de este tipo de hidrógenos, además, la señal se desdobló como un multiplete con integración para un hidrógeno. Otra señal representativa del  $\beta$ -sitosterol se observa a 5.36 ppm y es asignable al hidrógeno H-6 de la olefina.

Las señales de los metilos se observan en la región de alta energía: para H-21 se, se observó un doblete con integración para los tres hidrógenos, la multiplicidad y la

constante de acoplamiento de 8 Hz corroboran el acoplamiento vecinal con el protón H-20. A un desplazamiento de 1.01 ppm se observa un singulete con integración para 6 hidrógenos correspondiente a aquellos de las posiciones 26 y 27.

En la Tabla 12 se presenta un resumen de las asignaciones para las señales características del espectro de RMN  $^1\text{H}$  del  $\beta$ -Sitosterol.

**Tabla 12.** Asignaciones RMN  $^1\text{H}$  para  $\beta$ -Sitosterol.

Hidrógeno	$\delta_{\text{H}}$ (ppm)	Multiplicidad	Integración	J(Hz)
H-3	3.52	Multiplete	1H	-
H-6	5.36	Multiplete	1H	-
H-21	0.93	Doblete	3H	8.0
H-24	1.49	Multiplete	1H	-
H-26	1.01	Singulete	6H	-
H-27	1.01	Singulete	6H	-
H-28	1.29	Multiplete	2H	-

# **CAPÍTULO 2**

## **ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE Y ENZIMÁTICA**

# **GENERALIDADES**

## GENERALIDADES

### Radicales libres

En un átomo, los electrones se distribuyen alrededor del núcleo atómico en capas denominadas orbitales. Cada orbital tiene capacidad para albergar a dos electrones con espines opuestos. En los organismos vivos, predominan las sustancias que contienen sólo electrones apareados, lo que les confiere estabilidad (Paredes Salido, et al.,2002).

Un radical libre se define como un átomo o molécula que presenta uno o más electrones desapareados. La presencia de estos electrones no apareados genera inestabilidad en la estructura, lo que los convierte en especies químicas altamente reactivas. El radical libre puede donar o aceptar un electrón de una molécula estable para aparear su electrón, generando reacciones en cadena. Los radicales libres más importantes son los que contienen oxígeno, pues son altamente reactivos, por ende, son los principales responsables de especies oxidantes en las células de metabolismo aerobio, y son capaces de daño en moléculas biológicamente importantes (Dasgupta, et al., 2014; Lobo, et al., 2010; Paredes Salido, et al., 2002), pues al ser altamente electrofílicos, atacan sitios con alta densidad electrónica, particularmente compuestos nitrogenados- proteínas, aminoácidos, ADN, y ARN, y compuestos con dobles enlaces carbono-carbono, como ácidos grasos polinsaturados y fosfolípidos. (Knight,1998)

## **Radicales libres en sistemas biológicos**

Desde su definición, hace más de un siglo atrás, diversos estudios sobre radicales libres, han demostrado que estos compuestos no sólo son agentes de daño, sino que también juegan un papel importante en diversos procesos normales en organismos vivos (Volodymyr, 2014).

En concentraciones bajas, los radicales libres, son necesarias para el proceso de maduración de estructuras celulares, apoptosis de células defectuosas, y son utilizadas por las células como un sistema de señalización, además de ser empleadas por fagocitos como armas ante los ataques de microorganismos patógenos. (Galano, 2017; Pham-Huy, et al., 2008; Valko, et al., 2007)

### **Fuentes de radicales libres**

Los radicales libres pueden formarse por tres principales vías: 1) Homólisis de enlaces covalentes, que requiere energía (calor, luz ultravioleta, radiación ionizante) para efectuarse; 2) adición de un electrón a un átomo neutro, y 3) pérdida de un electrón por un átomo neutro. (Knight, 1998).

De la gran variedad de radicales libres presentes en los organismos vivos, la mayoría de ellos surgen a partir de:

- Especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés “reactive oxygen species”), que engloban a los radicales centrados en oxígeno, como el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) y el radical peroxilo ( $\text{ROO}\cdot$ ).

- Especies reactivas de nitrógeno (RNS por sus siglas en inglés “reactive nitrogen species”), como son el monóxido de nitrógeno ( $\bullet\text{NO}$ ) y el anión peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), entre otros.
- Especies reactivas de azufre (RSS por sus siglas en inglés “reactive sulfur species”), de las cuales las más importantes son los ácidos sulfénicos y los óxidos de disulfuro. (Galano, 2017).

Existen dos fuentes de radicales libres: fuentes endógenas y fuentes exógenas.

### **Fuentes endógenas de radicales libres**

Para la mayoría de los seres vivos, el oxígeno molecular es indispensable para vivir. En la respiración mitocondrial, la cadena de transporte de electrones constituye la última etapa en la formación de protones de alta energía para la formación de trifosfato de adenosina (ATP). (Rodríguez Perón, et al., 2001).

El oxígeno actúa como aceptor final de cuatro electrones en el proceso de fosforilación del ATP, produciendo dos moléculas de agua. Cuando la reducción del oxígeno es parcial, es decir, cuando el oxígeno recibe sólo uno o dos electrones, se forman intermediarios reactivos, como el radical superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) y el radical hidroxilo. (Cabiscol, 2014; Rodríguez Perón, et al., 2001).

Otra fuente importante de radicales libres son los peroxisomas, organelos citoplásmicos que realizan funciones importantes como la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos de cadena larga, y la degradación de ácido úrico. Las oxidasas del peroxisoma generan peróxido de hidrógeno, que, si bien es estable y no daña directamente especies propensas a la oxidación, si puede generar radicales libres como el radical hidroxilo, altamente reactivo y con capacidad de dañar biomoléculas. (Dasgupta, et al., 2014).

Múltiples procesos fisiológicos normales generan radicales libres, en la tabla 13 se resumen algunos de los más importantes.

**Tabla 13.** Principales fuentes endógenas de radicales libres.

<b>Proceso fisiológico</b>	<b>Información adicional</b>
<b>Respiración mitocondrial</b>	Proceso que genera el radical anión superóxido
<b>Autooxidación</b>	Se forma el radical superóxido a partir de la autooxidación de moléculas biológicas como la hemoglobina y la mioglobina.
<b>Reacciones enzimáticas</b>	Reacciones enzimáticas relacionadas a la lipoxigenasa, aldehído oxidasa, entre otras, pueden generar radicales libres.
<b>Iones metálicos</b>	Iones metálicos de cobre o hierro pueden generar radicales libres al reaccionar con peróxido de hidrógeno.
<b>Ejercicio extenuante</b>	Puede provocar la activación de la xantina oxidasa, que genera radicales libres.
<b>Infección</b>	El sistema inmunológico libera radicales libres para neutralizar microorganismos invasores.

Fuente: Dasgupta, et al., 2014.

### **Fuentes exógenas de radicales libres**

Los oxidantes, además, pueden proceder de agresiones oxidativas externas. La principal fuente externa de especies oxidantes es el humo del tabaco, pues presenta una alta concentración de sustancias perjudiciales, entre las que destacan especies reactivas de oxígeno, óxido de nitrógeno y óxido de azufre. (Paredes Salido, et al., 2002).

Otras fuentes exógenas de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno se citan en la tabla 14.

**Tabla 14.** Principales fuentes exógenas de radicales libres.

<b>Factor</b>	<b>Información adicional</b>
<b>Contaminación ambiental</b>	Partículas suspendidas en la contaminación ambiental, tienden a generar estrés oxidativo.
<b>Radiaciones ionizantes</b>	La exposición a radiación ultravioleta, rayos X, y radiaciones derivadas de terapias contra el cáncer, pueden provocar la formación de radicales libres en el cuerpo.
<b>Metales</b>	El aumento en la disponibilidad de metales de transición como ocurre en los procesos inflamatorios.
<b>Medicamentos</b>	La acción de fármacos con capacidad de generar anión superóxido por acción enzimática a través de la oxidorreducción cíclica de flavoproteínas
<b>Solventes industriales</b>	La inhalación de algunos solventes industriales, como cloroformo, pueden generar daño oxidativo.
<b>Ingesta de bebidas alcohólicas</b>	El exceso en el consumo de bebidas alcohólicas induce estrés oxidativo, principalmente en personas con alcoholismo,

Fuente: Dasgupta, et al., 2014; de la Peña, et al., 1997.

### **Estrés oxidativo**

El término estrés oxidativo se refiere al daño oxidativo resultante de la presencia elevada de radicales libres y otras especies oxidantes en el organismo, y la incapacidad del organismo para eliminar dicho exceso.

Este desequilibrio entre oxidantes y antioxidantes ha sido asociado al daño de una amplia gama de biomoléculas, el ADN y el ARN son particularmente susceptibles al daño oxidativo: las ROS interaccionan con las bases nitrogenadas formando especies oxidadas, si el ADN no es reparado antes de la replicación, puede ocasionar muerte celular, mutación de ADN, errores de replicación, e inestabilidad genómica. (Klaunig, et al., 2018). Otras estructuras susceptibles son lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Estos daños se traducen en diversos problemas de salud como afecciones cardiovasculares, algunos tipos de cáncer, enfermedades inflamatorias (artritis, vasculitis, etc.), diabetes, enfermedades neurodegenerativas, entre otros (Dasgupta, et al., 2014; Galano, 2017).

Dentro de los padecimientos neurodegenerativos más comunes relacionados al estrés oxidativo, se encuentra la enfermedad de Alzheimer.



Diagrama 4. Patologías relacionadas y afectaciones a los órganos atribuidas al estrés oxidativo. (Pham-Huy, et al., 2008)

## Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia entre adultos mayores, que conlleva el declive progresivo de funciones cognitivas, deterioro de la memoria, disminución de habilidades, y modificaciones al comportamiento, afectando la capacidad de una persona de funcionar de manera independiente.

La patogénesis del Alzheimer aún no es comprendida del todo, sin embargo, el estrés oxidativo parece ser un evento temprano en el desarrollo de la EA (Nunomura, et al., 2001). El sistema nervioso central es sumamente vulnerable al daño ocasionado por los radicales libres como resultado del alto consumo de oxígeno en el cerebro, niveles altos de lípidos oxidables, y baja concentración de glutatión (Christen, 2000; Markesbery, 1997; Smith, 2000).

Si bien, la terapia antioxidante se plantea como una posible terapia preventiva para la EA, los tratamientos sintomáticos actuales tienen como principio la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa.

El sistema colinérgico desempeña un rol central en el aprendizaje y la memoria. La “hipótesis colinérgica” plantea una estrecha relación entre la inhabilidad o pérdida de las neuronas colinérgicas en el prosencéfalo basal y la aparición de demencia en personas con EA (Muir, 1997; Zhou, et al., 2011). Las neuronas colinérgicas utilizan colina para dos propósitos: fosforilada para la producción de fosfatidilcolina, constituyente de la membrana celular, y acetilada para la generación del neurotransmisor acetilcolina (Muir, 1997); el envejecimiento y la EA están asociados a la disminución de la colina libre requerida para estos procesos metabólicos, lo cual genera una tendencia de las neuronas a utilizar la colina “de reserva” presente en estas biomoléculas, resultando en alteraciones en la composición de la membrana celular y deficiencias del neurotransmisor (Wurtman, 1992).

Debido a que la corteza cerebral de los pacientes de Alzheimer presenta una marcada disminución de los niveles del neurotransmisor acetilcolina (ACh), la farmacoterapia basada en inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa permiten el incremento localizado del neurotransmisor al bloquear su degeneración (Behl, 1999).

### **Antioxidantes**

La exposición a condiciones naturales que propician la formación de radicales libres, ha llevado a los organismos a desarrollar una serie de mecanismos de defensa que actúan de forma cooperativa para proteger al cuerpo de los daños potenciales del estrés oxidativo (Kabel, 2014; Valko, et al., 2007), estos sistemas de defensa incluyen mecanismos preventivos, mecanismos de reparación, barreras físicas, y defensas antioxidantes.

Los antioxidantes son moléculas con la capacidad de inhibir, retardar, o prevenir la oxidación de otras moléculas de importancia biológica, deteniendo las reacciones de oxidación en cadena mediante la neutralización de los radicales libres intermedios. (Kabel, 2014; Muñoz Juárez, et al., 2008).

## **Capacidad antioxidante**

La capacidad antioxidante celular está dada por éstos diversos mecanismos mediante los cuales la célula anula la reactividad y/o inhibe la generación de radicales libres, es decir, es la suma de las capacidades antioxidantes cada uno de los compuestos antioxidantes que actúan simultáneamente, así como las condiciones del microambiente donde se encuentran los compuestos, además de la sinergia o inhibición de la interacción entre ellos. (Avello, et al., 2006; Huang, et al., 2005; Kuskoski, et al., 2005).

Para que una molécula o compuesto sea un buen antioxidante, su reactividad química hacia los radicales libres es mayor que la de las especies de importancia biológica, además debe reaccionar rápidamente y encontrarse en cantidades suficientemente altas en el organismo. (Galano, 2017).

## **Clasificación de los antioxidantes**

Los compuestos antioxidantes pueden ser producidos por el propio organismo (antioxidantes endógenos), o bien adquiridos a través de los alimentos (antioxidantes exógenos).

Los antioxidantes endógenos pueden clasificarse como enzimáticos y no enzimáticos y los exógenos pueden dividirse en naturales o sintéticos.

## Antioxidantes enzimáticos

Dentro de los antioxidantes endógenos enzimáticos, existen tres principales grupos de enzimas: superóxido dismutasas, catalasa y glutatión peroxidasas.

Las superóxido dismutasas (SODs) contienen iones metálicos de cobre, zinc, manganeso, o hierro, y cataliza la dismutación del radical superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno, minimizando la acumulación de superóxido y radical hidroxilo (Aldred, et al., 2009; Harvey, 2008; Kabel, 2014), dos de las especies reactivas de oxígeno más importantes y dañinas.

La catalasa ( $\text{H}_2\text{O}_2$  oxidoreductasa) es una enzima antioxidante presente en la mayoría de los organismos aerobios; contiene cuatro grupos hemo (hierro) en su estructura que permiten a la enzima interactuar con el peróxido de hidrógeno catalizando su dismutación en agua y oxígeno. El peróxido de hidrógeno, molécula estable, funge como sustrato en reacciones que generan el altamente reactivo radical hidroxilo, la catalasa limita la acumulación de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , previniendo así, la formación de radicales libres (Díaz, 2003; Kabel, 2014).

Las glutatión peroxidasas son enzimas antioxidantes con selenio en su estructura, con la capacidad de reducir el peróxido de hidrógeno y otros hidroperóxidos orgánicos. (Kabel, 2014; Tabet, et al., 2007; Valko, 2007). El glutatión es, además, un antioxidante no enzimático con un grupo tiol como agente reductor capaz de reducir otros metabolitos o reaccionar directamente con los oxidantes (Kabel, 2014).

## Antioxidantes no enzimáticos

Los compuestos tipo vitamina E (tocoferoles y tocotrienoles), son los antioxidantes liposolubles más importantes: debido a su estructura, actúa reduciendo los peróxidos provenientes de la oxidación de ácidos linoleico y linolénico, protegiendo la membrana celular de las reacciones de oxidación en cadena (Badui, 2006; de la Peña, 1997).

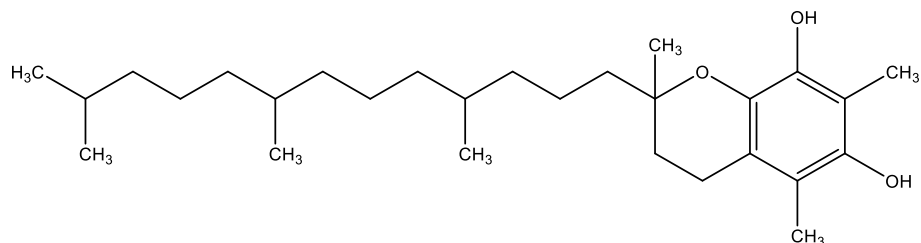


Fig. 40. Estructura química del  $\alpha$ -tocoferol

Los carotenoides son compuestos liposolubles que inhiben la peroxidación lipídica neutralizando los radicales oxígeno singlete y peróxilo, generados en los procesos de oxidación lipídica. (Stahl, et al., 2003)

El ácido ascórbico (vitamina C) actúa como antioxidante sobre los radicales superóxido, peróxilo, e hidroxilo, además se le atribuye la intervención en la regeneración del  $\alpha$ -tocoferol, evitando la formación del radical  $\alpha$ -tocoferóxilo (de la Peña, 1997).

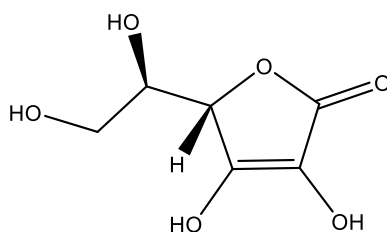


Figura 41. Estructura química del ácido ascórbico

Los bioflavonoides son fitomoléculas polifenólicas con propiedades antioxidantes, particularmente inhibiendo la peroxidación lipídica, y quelantes de metales oxidantes, además de favorecer la actividad de algunas enzimas antioxidantes (Heim, et al., 2002).

Algunos de los principales antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos se reúnen en la tabla 15.

**Tabla 15.** Principales antioxidantes y radicales libres sobre los que actúan.

ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS	ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS
<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Superóxido dismutasa</i> Responsable de neutralizar los radicales superóxido.</li> <li>- <i>Catalasa</i> Enzima catalizadora de la dismutación del peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno.</li> <li>- <i>Glutación peroxidasa</i> Enzima intracelular que reducen el peróxido de hidrógeno y otros peróxidos orgánicos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Vitamina E</i> Principal antioxidante liposoluble, previene la oxidación lipídica y protege la membrana celular.</li> <li>- <i>Glutación</i> Protege contra los efectos potencialmente dañinos de los metales pesados y limita la actividad de los radicales superóxido y peróxido.</li> <li>- <i>Melatonina</i> Potencializa la acción de la superóxido dismutasa y la glutación peroxidasa. Además, neutraliza el radical hidroxilo, y el oxígeno singlete.</li> </ul>

Fuente: Velázquez Paniagua, et al., 2004.

## **Clasificación por mecanismo de acción**

Según su actividad química, los antioxidantes pueden ser, también, clasificados como:

- Tipo I: Antioxidantes primarios (“scavengers” o captosres de radicales libres). Previenen la oxidación en cadena, reaccionando directamente con los radicales libres, generando especies neutras o menos reactivas.
- Tipo II: Antioxidantes secundarios. Retardan el proceso de oxidación mediante vías indirectas, como la quelación de metales y la regeneración de antioxidantes primarios (Galano, 2017).

# **METODOLOGÍA**

## METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### Reducción del radical libre DPPH

Para la evaluación de capacidad antioxidante de los compuestos con características polares, mediante el mecanismo de donación de átomos de hidrógeno, se realizó el ensayo de reducción del radical libre DPPH, siguiendo modificaciones al protocolo descrito por Stanislaw Burda (Burda, et al., 2001).

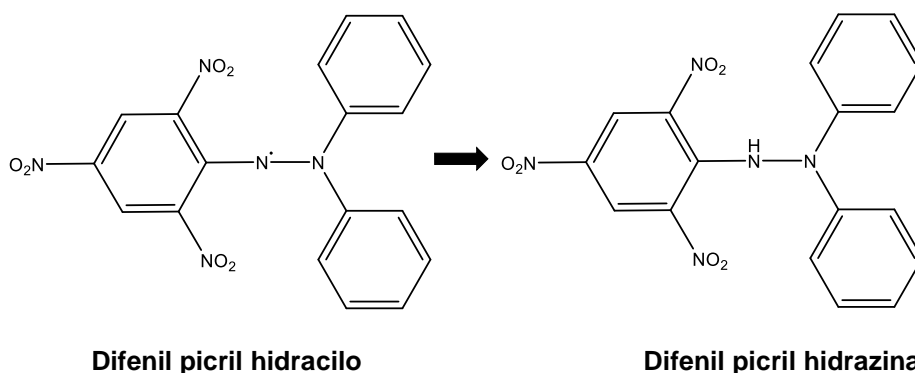


Fig. 42. Reducción del radical libre DPPH.

El método está fundamentado en la reducción del radical estable 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo o DPPH (Fig. 42), que, en solución alcohólica, presenta una coloración violeta intensa, debido a su electrón desapareado, con absorbancia a 517 nm; a medida que el radical se neutraliza, la coloración se pierde y la absorbancia disminuye. Dicha decoloración tiene relación estequiométrica con respecto al número de hidrógenos recibidos de los compuestos antioxidantes (Kedare, et al., 2011).

La cinética de la reacción ocurrida entre el DPPH y los antioxidantes no es lineal, por lo que comúnmente se reportan valores de  $CE_{50}$  para expresar la capacidad antioxidante (Huang, et al., 2005).

### Procedimiento

Se preparó una disolución metanólica de DPPH 125  $\mu$ M, a esta concentración, se cumple la ley de Lambert-Beer ( Kedare, et al., 2011).

Para los extractos a evaluar, se prepararon disoluciones metanólicas de concentración 1 mg/ml, y se realizaron 10 diluciones seriadas por triplicado, utilizando metanol como solvente, obteniendo las concentraciones descritas en la tabla 16. El volumen de muestra a analizar en cada tubo fue de 500  $\mu$ M.

**Tabla 16.** Diluciones seriadas

<b>[0.0012mg/ml]</b>	Tubo 10	Tubo 10	Tubo 10
<b>[0.0025mg/ml]</b>	Tubo 9	Tubo 9	Tubo 9
<b>[0.005mg/ml]</b>	Tubo 8	Tubo 8	Tubo 8
<b>[0.01mg/ml]</b>	Tubo 7	Tubo 7	Tubo 7
<b>[0.03mg/ml]</b>	Tubo 6	Tubo 6	Tubo 6
<b>[0.06mg/ml]</b>	Tubo 5	Tubo 5	Tubo 5
<b>[0.125mg/ml]</b>	Tubo 4	Tubo 4	Tubo 4
<b>[0.25mg/ml]</b>	Tubo 3	Tubo 3	Tubo 3
<b>[0.5mg/ml]</b>	Tubo 2	Tubo 2	Tubo 2
<b>[1mg/ml]</b>	Tubo 1	Tubo 1	Tubo 1

Posteriormente, se adicionaron 500 µl de solución DPPH 125 µM a todos los tubos, y se dejaron reposar por un periodo de 30 minutos en ausencia de luz.

Trascurridos los 30 minutos, se realizaron lecturas de absorbancia a 517 nm en espectrofotómetro a una longitud de onda de 517 nm, utilizando una celda de cuarzo Sigma spectrophotometer cuvet, ajustando como blanco el metanol, y registrando la absorbancia de la solución de DPPH 125 mM como referencia.

Se graficaron los datos obtenidos, con el fin de crear una curva de calibración, siendo la variable independiente la concentración, y la dependiente el porcentaje de actividad antioxidante, donde:

$$\% \text{ Actividad antioxidante} = \left[ 1 - \left( \frac{A_m}{A_c} \right) \right] \times 100$$

**A<sub>m</sub>**= Absorbancia promedio de la muestra

**A<sub>c</sub>**= Absorbancia de la muestra control (DPPH)

La concentración media efectiva CE<sub>50</sub> cada muestra evaluada, fue calculada a partir de la ecuación de la recta correspondiente.

## Reducción del catión radical ABTS<sup>•+</sup>

Para determinar la actividad antioxidante de compuestos donadores de protones, se llevó a cabo el ensayo de reducción del catión radical ABTS<sup>•+</sup> (Re, et al., 1999).

El método consiste en la generación del catión radical ABTS<sup>•+</sup>, haciendo reaccionar el ácido 2,2'-azino-bis-(3etilbenzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), con un fuerte oxidante, como el persulfato de potasio (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), lo que genera una solución con coloración azul-verde con absorbancia a 734 nm.

La adición de antioxidantes al radical catión preformado, lo reduce a ABTS neutro, provocando una decoloración de la disolución proporcional al porcentaje de inhibición del ABTS<sup>•+</sup>. El método puede utilizarse en el análisis y estudio tanto de antioxidantes hidrosolubles, como antioxidantes liposolubles (Re, et al., 1999).

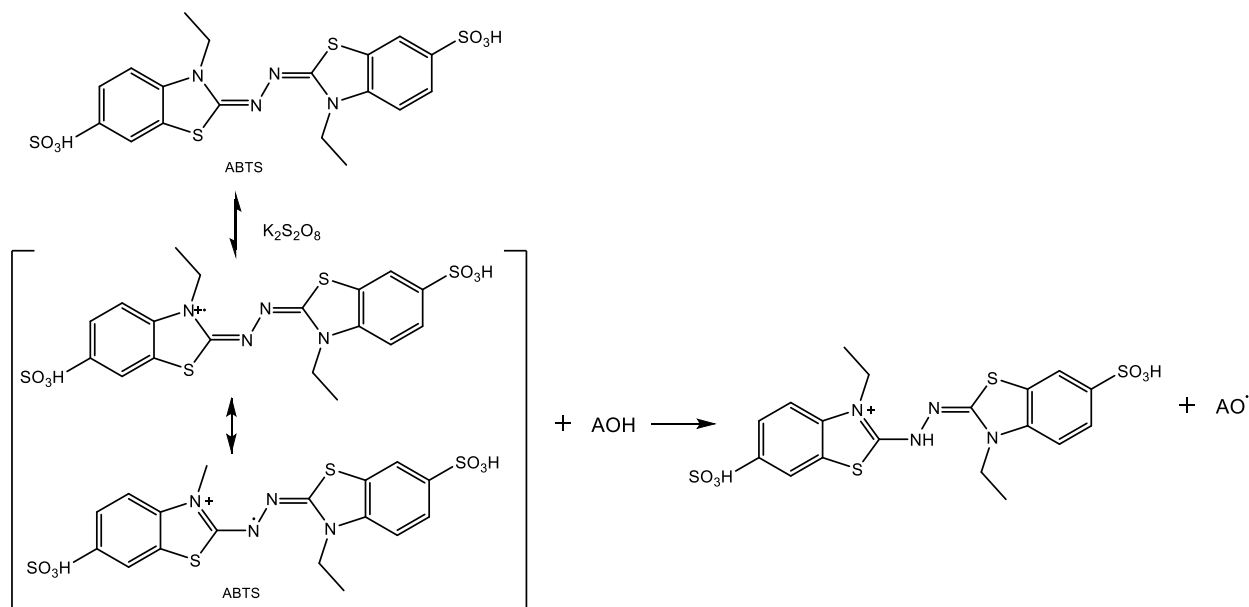


Fig. 43. Oxidación del ABTS por persulfato de potasio para la generación de ABTS<sup>•+</sup>, y su reacción con un compuesto antioxidante.

## Procedimiento

Para la generación del catión radical  $ABTS^{\bullet+}$ , se prepararon 5 ml de solución acuosa de ABTS 7.5 mM, y se adicionaron 0.0033 g de persulfato de potasio. Esta solución se dejó en reposo por 18 horas en condiciones de oscuridad.

Previo al cumplimiento de las 18 h, se prepararon las soluciones patrón 1 mg/ml de las muestras a evaluar, utilizando metanol como solvente, y se generaron 10 diluciones seriadas por triplicado, obteniendo las concentraciones descritas en la tabla 16. El volumen total en los tubos de las diluciones fue de 100  $\mu$ l. Una vez generadas las diluciones, 20  $\mu$ l de muestra de cada tubo fueron transferidos a una segunda serie de tubos.

Transcurridas las 18 h de reposo de la solución patrón de  $ABTS^{\bullet+}$ , se tomó una alícuota y diluyó en metanol suficiente para generar una solución 0.075 mM (75  $\mu$ M). De esta solución, 980  $\mu$ l fueron adicionados a cada uno de los tubos de la segunda serie (contenientes de 20  $\mu$ l de muestra).

Inmediatamente, se realizaron las lecturas de absorbancia en espectrofotómetro a una longitud de onda de 734 nm ajustando como blanco el metanol, y registrando la absorbancia de la solución de  $ABTS^{\bullet+}$  0.075 mM como referencia.

Se graficaron los datos obtenidos, siendo la variable independiente la concentración, y la dependiente el porcentaje de actividad antioxidante, donde:

$$\% \text{ Actividad antioxidante} = \left[ 1 - \left( \frac{A_m}{A_c} \right) \right] \times 100$$

**A<sub>m</sub>**= Absorbancia promedio de la muestra

**A<sub>c</sub>**= Absorbancia de la muestra control (DPPH)

La concentración media efectiva CE<sub>50</sub> cada muestra evaluada, fue calculada a partir de la ecuación de la recta correspondiente.

### **Decoloración oxidativa de β-caroteno**

Para la determinación de actividad antioxidante por mecanismo de donación de hidrógenos para compuestos liposolubles e hidrosolubles, se realizó el método de decoloración oxidativa inducida por calor, del β-caroteno, realizando modificaciones al protocolo descrito por Stanislaw Burda (Burda, et al., 2001).

El método se fundamenta en la pérdida de color amarillo del β-caroteno por su reacción con los radicales libres derivados de la oxidación del ácido linoleico en una emulsión. La presencia de antioxidantes en las muestras evaluadas disminuye la velocidad de decoloración del β-caroteno, lo que se determina colorimétricamente a una longitud de onda de 450 nm. Los resultados del ensayo son generalmente reportados como porcentaje de inhibición de decoloración de β-caroteno (Msaada, et al., 2017).

## Procedimiento

Para la preparación de la emulsión de  $\beta$ -caroteno, se disolvieron 0.2 mg de  $\beta$ -caroteno en 1 ml de DCM, y se adicionaron 20  $\mu$ l de ácido linoleico y 200  $\mu$ l de Tween 20. Una vez homogeneizada la solución, se colocó en oscuridad por 40 minutos o hasta que el solvente se evaporara.

Se preparó la solución de la muestra a evaluar, la concentración se determinó en función de la coloración de las muestras, con la finalidad de que no interfiriera con la absorbancia del  $\beta$ -caroteno. La solución se distribuyó en tres tubos de ensayo en alícuotas de 350  $\mu$ l, de esta manera el ensayo se realizó por triplicado.

Una vez evaporado el disolvente de la emulsión, se adicionaron 50 ml de agua destilada, previamente burbujeada por una hora, y se adicionaron 2.5 ml de solución a cada tubo de ensayo, así como a tres tubos con únicamente solución de  $\beta$ -caroteno, como control.

Las absorbancias de las muestras, en el tiempo  $T=0$  fueron registradas a una longitud de onda de 470 nm, utilizando agua destilada como blanco.

Las muestras fueron sometidas a un tratamiento térmico a 50°C por un periodo de 120 minutos, y una vez transcurrido, se realizó una segunda lectura de las muestras a 470 nm para  $T=120$ .

Se calculó el porcentaje de actividad antioxidante, en base a la siguiente fórmula:

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

$Am^0$  = Promedio de las absorbancias de la muestra a T=0 min.

$Am^{120}$  = Promedio de las absorbancias de la muestra a T=120 min.

$Ac^0$  = Promedio de las absorbancias de la solución control a T=0 min.

$Ac^{120}$  = Promedio de las absorbancias de la solución control a T=120 min.

### **Inhibición de la enzima acetilcolinesterasa**

Para la evaluación de la actividad inhibitoria de la enzima acetilcolinesterasa se empleó el método de Ellman, un ensayo basado en la determinación de tioles, siguiendo modificaciones a la metodología de Adewusi y col. (Adewusi, et al., 2011).

El método de Ellman es ampliamente utilizado para la medición indirecta de actividad de colinesterasa por medio de la cuantificación de la concentración del compuesto cromogénico ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB) formado a partir de la reacción del ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), y tiocolina, producto de la hidrólisis del sustrato acetilcolina por la enzima acetilcolinesterasa.

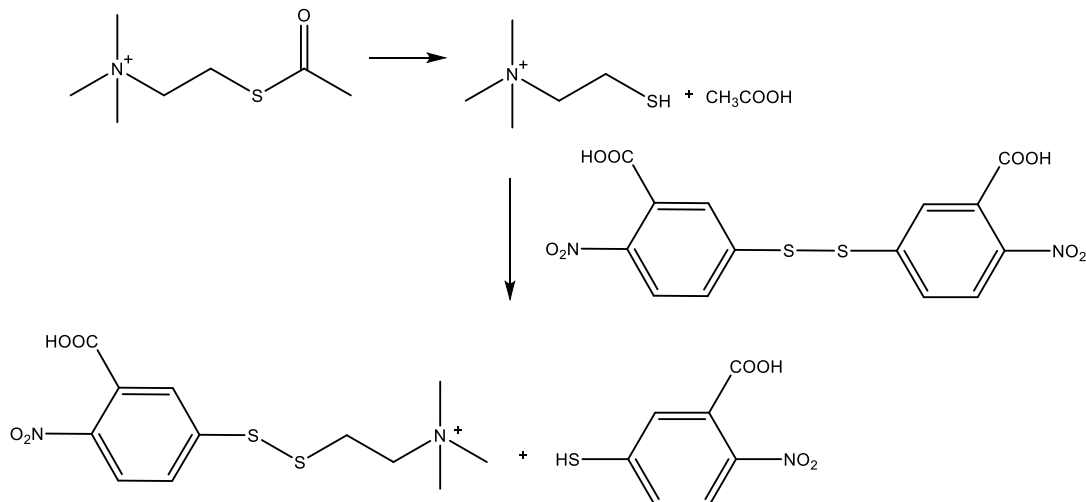


Fig. 44. Reacción de Ellman.

### Procedimiento

En una placa de 96 pocillos, se colocaron 75  $\mu$ l del amortiguador Trizma-HCl (50 nM, pH8). Posteriormente, se depositaron 75  $\mu$ l del analito, disuelto en DMSO, en el primer pocillo para realizar diluciones seriadas, obteniéndose concentraciones de 150 a 2.4  $\mu$ g/ml en amortiguador, y DMSO a una concentración final máxima de 0.15%.

A cada pocillo se le adicionaron 25  $\mu$ l de solución, en amortiguador, de yoduro de acetilcolina 15 mM, seguido de 125  $\mu$ l del reactivo de Ellman, DTNB 3 mM, también en amortiguador.

Se tomó lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm, las lecturas se realizaron por triplicado en intervalos de 45 s. Posterior a las lecturas, cada pocillo fue adicionado con 25  $\mu$ l de una solución de la enzima acetilcolinesterasa a una concentración de U/ml en amortiguador con albúmina sérica bovina 0.1 mg/ml y se

evaluó la absorbancia cinco veces en intervalos de 45 s a la misma longitud de onda que la primera lectura. Se utilizaron 6 pocillos de cada placa como control del 100% de actividad enzimática.

Para corregir la variación de absorbancia causada por la hidrólisis espontánea del sustrato, se restaron las absorbancias posteriores y previas a la adición de la enzima.

El porcentaje de inhibición enzimática se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inhibición} = [ 1 - (A \text{ muestra} / A \text{ control}) ] \times 100$$

A Muestra = diferencia de absorbancia entre el tiempo 0 y el tiempo 225 segundos en presencia de cualquier compuesto prueba o inhibidor.

A control = diferencia de absorbancia entre el tiempo 0 y el tiempo 225 segundos del control del 100% de actividad enzimática.

La concentración inhibitoria media (IC50) se calculó graficando el porcentaje de inhibición contra la concentración.

El ensayo se realizó por cuadruplicado, utilizando galantamina (Fig. 45) como control positivo.

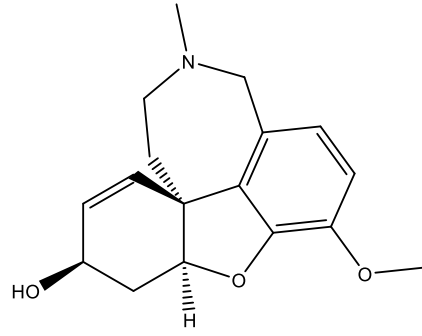


Fig.45 . Estructura de la Galantamina.

## **DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

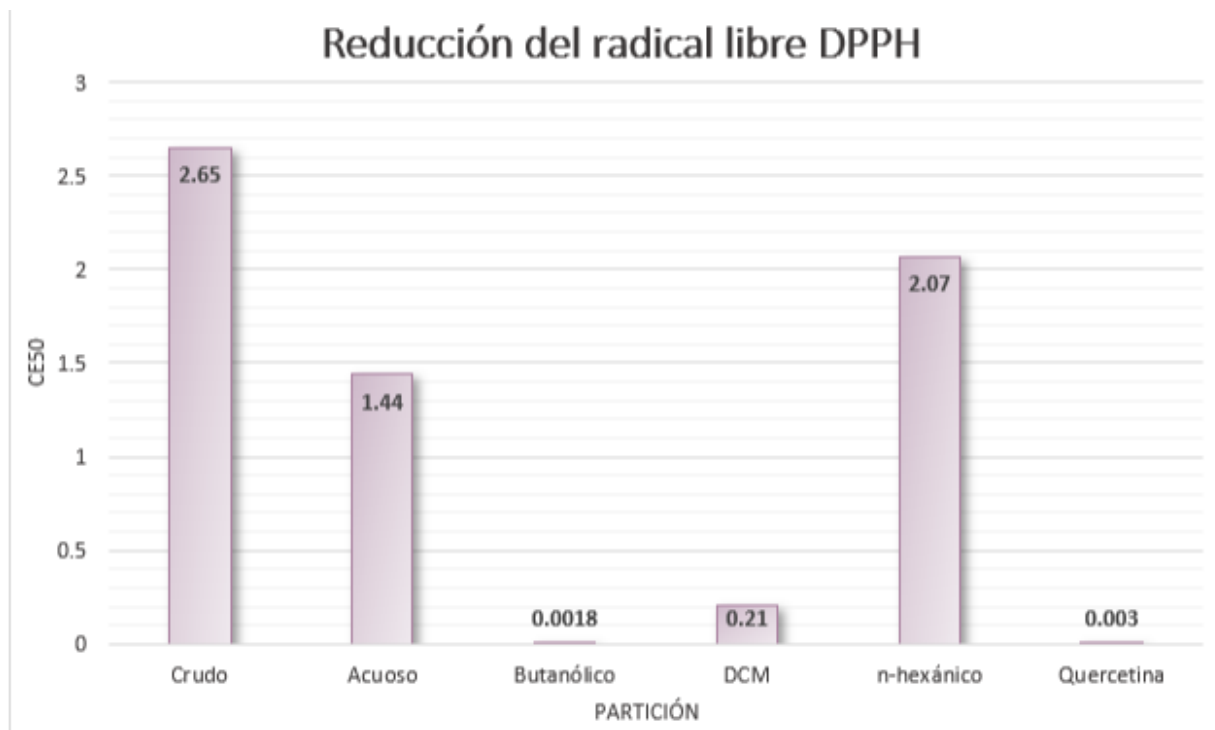
### Ensayos antioxidantes de las particiones del extracto crudo de raíz de *S. brandegeei*

Para el extracto crudo y las particiones (agua, butanol, DCM, y *n*-hexano) de la raíz de *S. brandegeei*, se llevaron a cabo las tres metodologías de ensayos antioxidantes.

#### Resultados del ensayo de reducción del radical libre DPPH

**Tabla 17.** Resultados de evaluación de actividad antioxidante de las particiones por el método de reducción del radical libre DPPH.

Partición	CE <sub>50</sub> (mg/ml)
Crudo	2.65
Acuoso	1.44
Butanólico	0.0018
DCM	0.21
<i>n</i> -hexánico	2.07
Quercetina	0.003

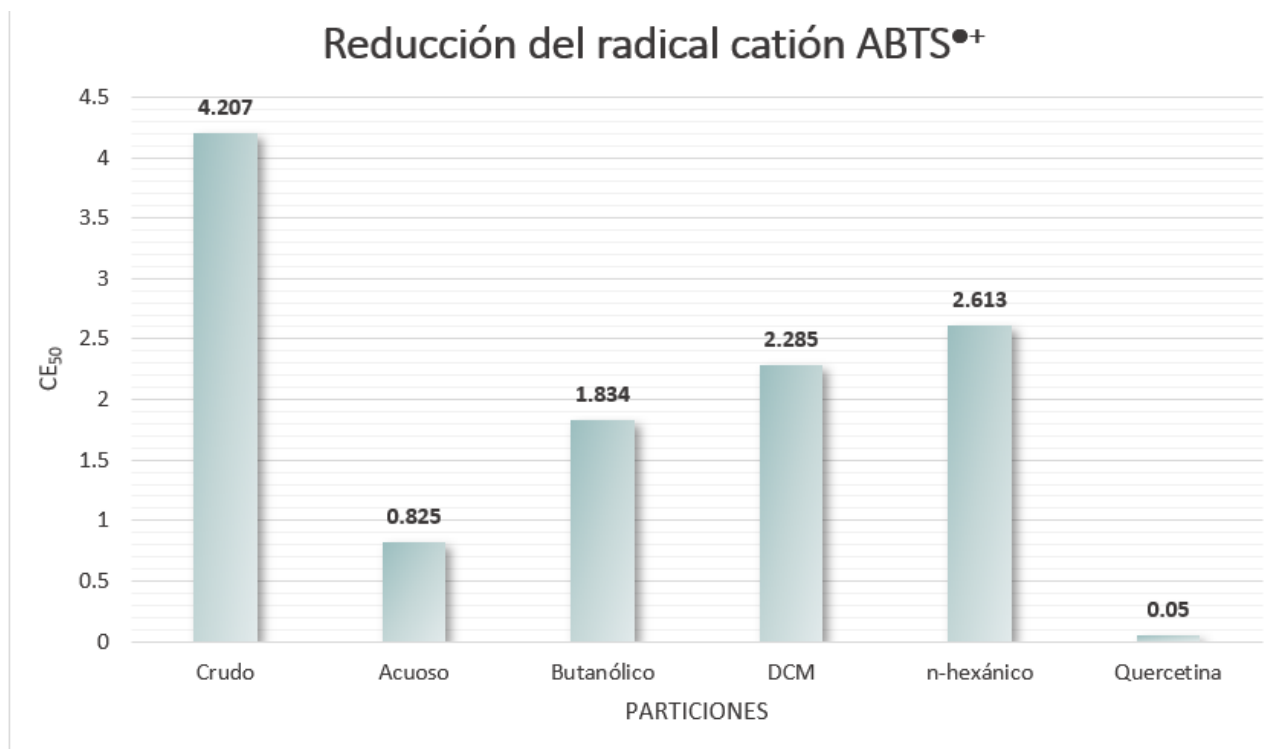


Gráfica 1. Resultados de reducción del radical libre DPPH de las particiones y extracto crudo de *S.brandegeei*.

### Resultados del ensayo de reducción del radical catión ABTS<sup>•+</sup>

**Tabla 18.** Resultados de evaluación de actividad antioxidante de las particiones por el método de reducción del radical catión ABTS<sup>•+</sup>.

Partición	CE <sub>50</sub> (mg/ml)
Crudo	4.207
Acuoso	0.825
Butanólico	1.834
DCM	2.285
n-hexánico	2.613
Quercetina	0.050



Gráfica 2. Resultados de reducción del radical catión ABTS<sup>•+</sup> de las particiones y extracto crudo de *S.brandegeei*.

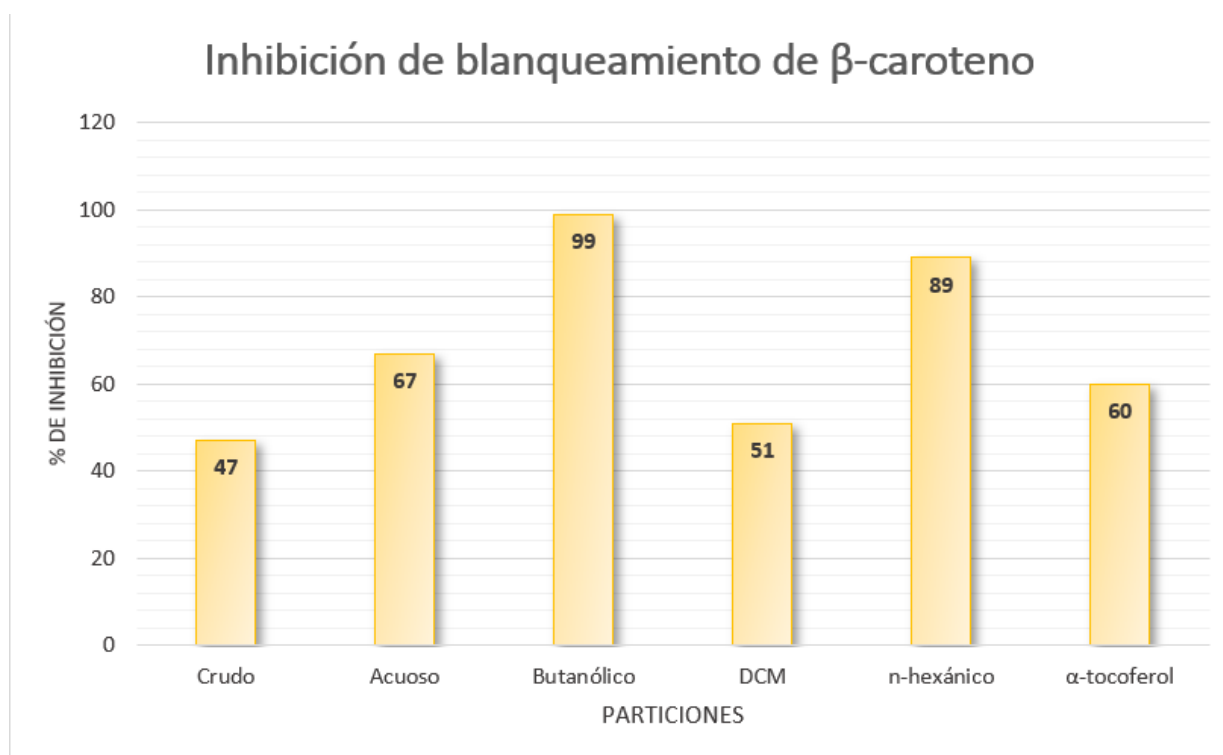
### Resultados del ensayo de inhibición de blanqueamiento de $\beta$ -caroteno

Para el extracto crudo y las particiones, se utilizaron muestras en solución de concentración 1mg/ml, el estándar,  $\alpha$ -tocoferol, también se evaluó a la misma concentración.

**Tabla 19.** Resultados de evaluación de actividad antioxidante de las particiones por el método de inhibición de blanqueamiento de  $\beta$ -caroteno.

Partición	% de inhibición <sup>1</sup>
Crudo	47
Acuoso	67
Butanólico	99
DCM	51
<i>n</i> -hexánico	89
$\alpha$ -tocoferol	60

<sup>1</sup> % de inhibición de blanqueamiento térmico oxidativo de  $\beta$ -caroteno.



Gráfica 3. Resultados de inhibición de blanqueamiento de  $\beta$ -caroteno de las particiones y extracto crudo de *S.brandegeei*.

**Tabla 20.** Resumen de resultados de evaluación de actividad antioxidante de las particiones.

Partición	DPPH	ABTS <sup>•+</sup>	β-caroteno
	CE <sub>50</sub> (mg/ml)	CE <sub>50</sub> (mg/ml)	% de inhibición
Crudo (RSBC)	2.65	4.207	47
Acuoso (RSBA)	1.44	0.825	67
Butanólico (RSBB)	0.0018	1.834	99
DCM (RSBD)	0.21	2.285	51
<i>n</i> -Hexano (RSBH)	2.07	2.613	89
Quercetina	0.003	0.050	-
α-tocoferol	-	-	60

Las plantas generan dos tipos de antioxidantes: polares (como los polifenoles), y no polares (como los tocoferoles); no existe una técnica adecuada para evaluar confiablemente ambos grupos de compuestos. Con el objetivo de englobar los distintos tipos y cinéticas antioxidantes, se llevaron a cabo tres técnicas distintas, DPPH, para evaluar la actividad de los antioxidantes polares donadores de átomos de hidrógeno; β-caroteno, que determina la efectividad de los antioxidantes apolares, donadores de hidrógeno; y ABTS, que tasa la capacidad de antioxidantes polares y apolares, donadores de electrones.

En el ensayo de reducción del radical libre DPPH, la partición butanólica presentó la mejor actividad, mostrando el menor CE<sub>50</sub>, es decir, requirió menor concentración de muestra para reducir el 50% de los radicales libres, superando al extracto crudo y al estándar utilizado, quercetina. La partición de DCM (RSBD) presentó la segunda mejor actividad en este ensayo, con una CE<sub>50</sub> por debajo de 1 mg/ml. El extracto crudo presentó

los valores más altos de  $CE_{50}$ , por lo tanto, la menor capacidad antioxidante en este experimento. Debido a la naturaleza polar de la solución DPPH, las particiones de polaridad media y media alta (butanólica y de DCM), presentaron las mejores actividades, mientras que la de polaridad más baja, presentó el menor efecto. Por sus características polares, se esperaba que el extracto acuoso presentara una mejor actividad en el ensayo de DPPH, sin embargo, al tratarse de un extracto crudo, la complejidad de su composición, así como la dinámica entre las moléculas que la componen, no permite generar una conclusión sobre la causa de la baja actividad que presentó en relación con particiones de menor polaridad.

En la evaluación de actividad antioxidante mediante la técnica de reducción del radical catión  $ABTS^{\bullet+}$ , ninguna de las particiones superó la actividad del estándar utilizado, quercetina, sin embargo, la partición acuosa mostró tener la mejor actividad antioxidante de entre las muestras evaluadas, requiriendo una concentración de 0.825 para inhibir el 50% de los radicales libres. En contraste con su resultado en el ensayo de DPPH, el extracto acuoso exhibió un mejor perfil como antioxidante donador de electrones, superando al resto de las particiones y al extracto crudo, que presentaron concentraciones medias efectivas por encima de 1 mg/ml. En extracto crudo mostró el desempeño más bajo en este ensayo, con una  $CE_{50}$  de 4.207 mg/ml, esto puede deberse a un posible antagonismo entre las estructuras presentes en el extracto crudo, o bien, la alta cantidad de estructuras presentes impide la interacción entre metabolitos con perfil antioxidante y radicales libres.

En el ensayo de blanqueamiento oxidativo de  $\beta$ -caroteno, la partición butanólica presentó un 99% de inhibición de decoloración de  $\beta$ -caroteno, superando al extracto crudo y al estándar utilizado,  $\alpha$ -tocoferol, uno de los antioxidantes naturales de mayor importancia. La partición de n-hexano, también exhibió una alta actividad antioxidante en este ensayo, inhibiendo en un 89% la decoloración del  $\beta$ -caroteno, esto podría ser un indicador de que los metabolitos presentes en la partición de baja polaridad tienen una actividad antioxidante más similar al  $\alpha$ -tocoferol, que a los polifenoles. La partición

acuosa también exhibió actividad por encima del estándar, mientras que la actividad más baja la presentó el extracto crudo.

### **Ensayos antioxidantes de las reuniones obtenidas del fraccionamiento cromatográfico del extracto hexánico**

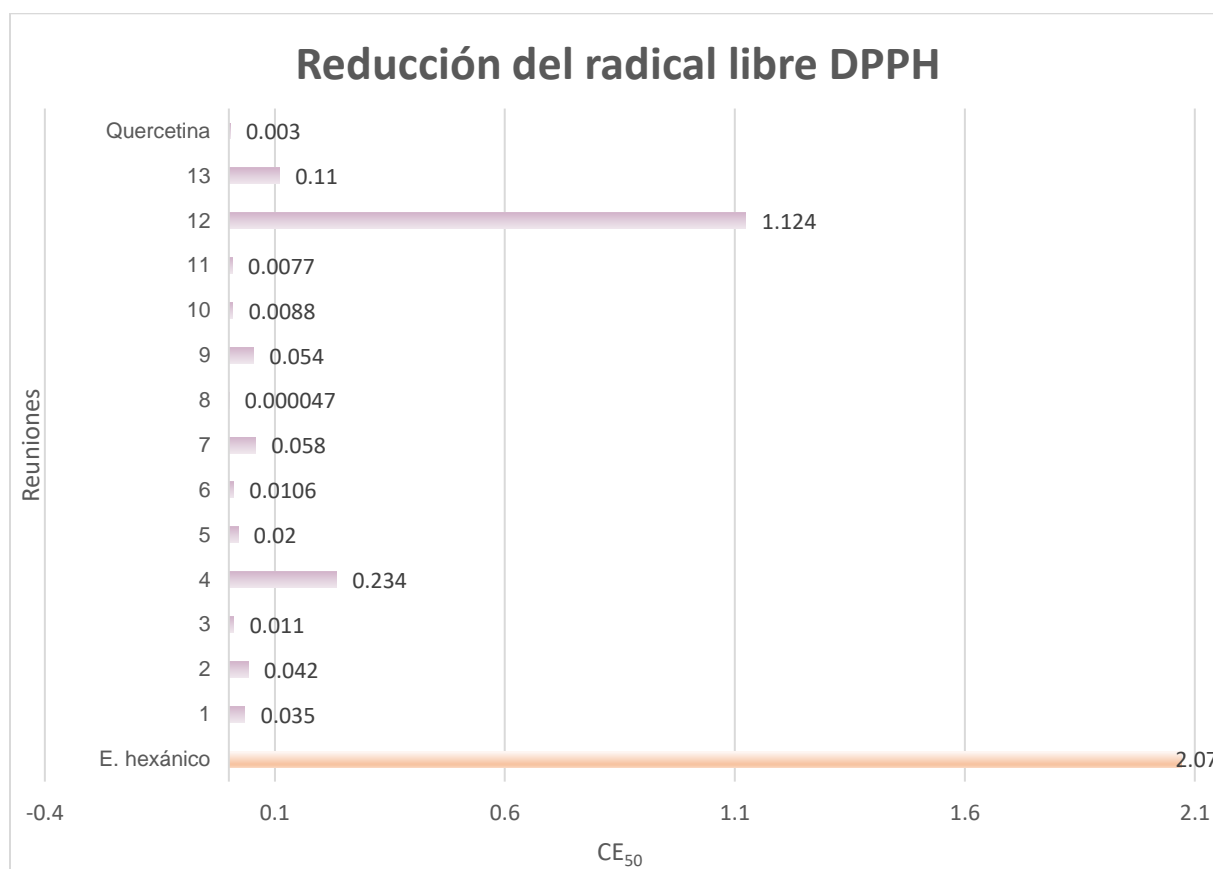
Se realizaron ensayos de actividad antioxidante mediante las técnicas descritas en la metodología, para las 14 reuniones obtenidas a partir del fraccionamiento cromatográfico del extracto hexánico de la raíz de *S. brandegeei*.

### **Resultados del ensayo de reducción del radical libre DPPH**

**Tabla 21.** Resultados de evaluación de actividad antioxidante de las particiones por el método de reducción del radical libre DPPH.

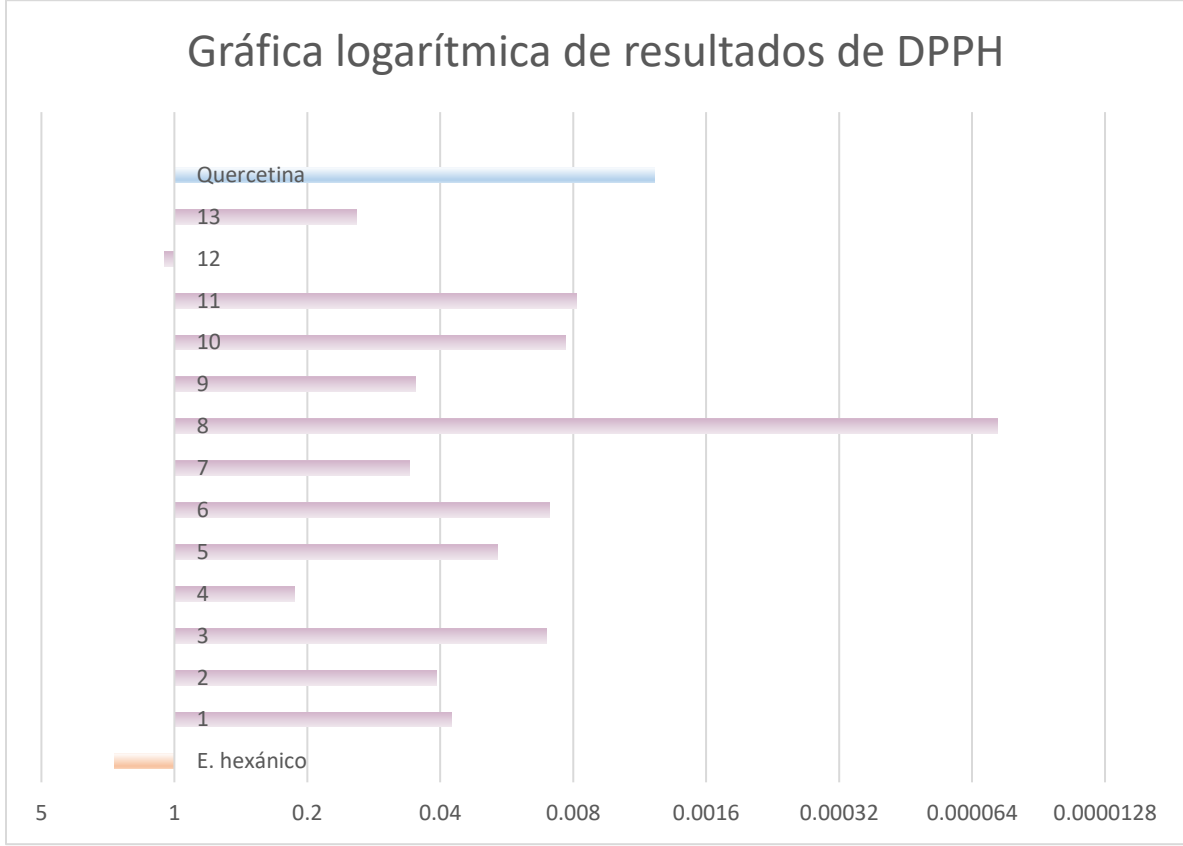
<b>Reunión</b>	<b>CE<sub>50</sub> (mg/ml)</b>
1	0.0355
2	0.0415
3	0.0110
4	0.2335
5	0.0200
6	0.1060
7	0.0580
8	4.7x10 <sup>-5</sup>
9	0.0540
10	0.0088
11	0.0077

12	1.1240
13	0.0110
<i>E. Hexánico</i>	2.0700
<i>Quercetina</i>	0.0030



Gráfica 4. Resultados de reducción del radical libre DPPH de las reuniones del extracto hexánico de *S. brandegeei*.

Con fines meramente ilustrativos, se presenta una gráfica logarítmica (Gráfica 5) que permite comparar más claramente los resultados obtenidos en este ensayo.

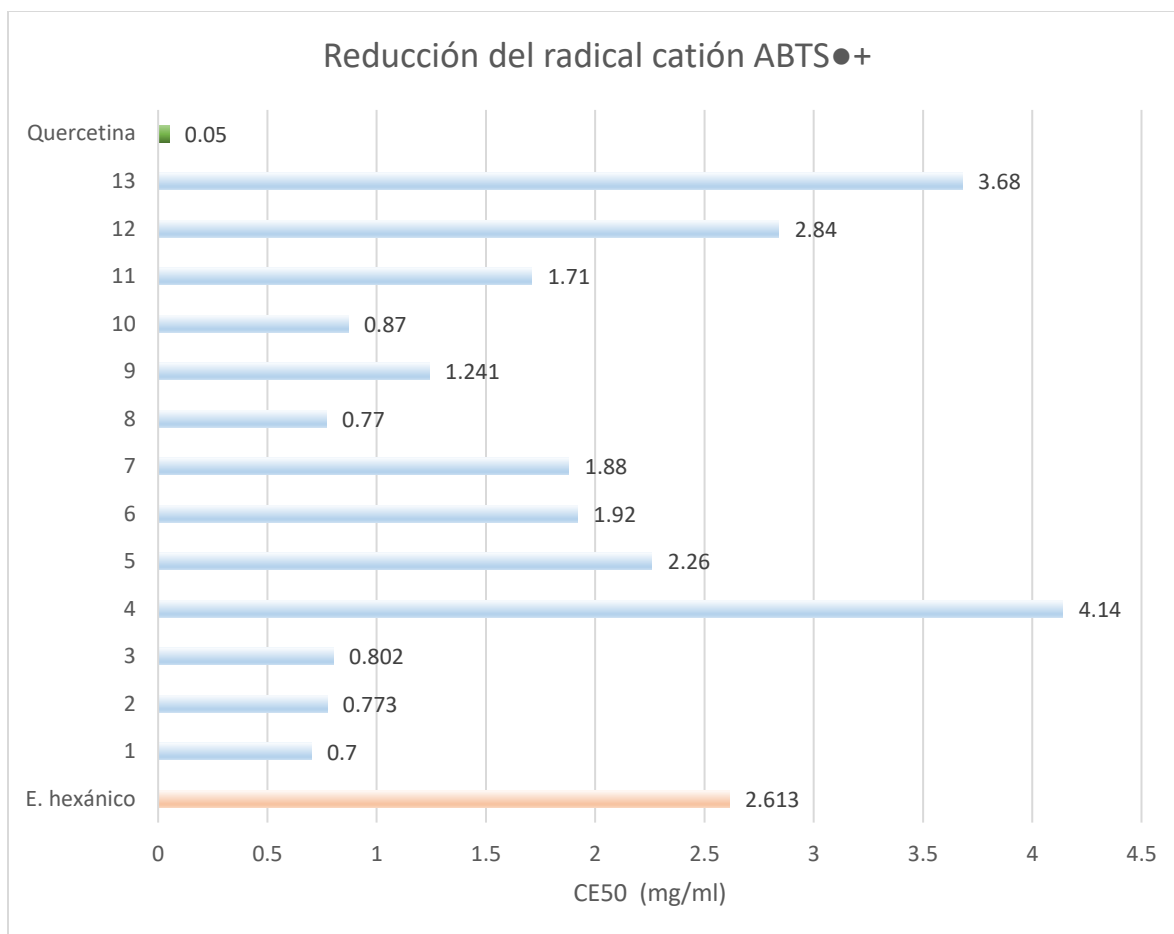


Gráfica 5. Gráfica log<sub>10</sub> de los resultados de reducción del radical libre DPPH de las reuniones del extracto hexánico de *S. brandegeei*.

## Resultados del ensayo de reducción del radical catión ABTS<sup>•+</sup>

**Tabla 22.** Resultados de evaluación de actividad antioxidante de las reuniones del extracto hexánico de *S. brandegeei*. por el método de reducción del radical catión ABTS<sup>•+</sup>.

Reunión	CE <sub>50</sub> (mg/ml)
1	0.6957
2	0.7725
3	0.8019
4	4.1400
5	2.2600
6	1.9200
7	1.8800
8	0.7690
9	1.2407
10	0.8700
11	1.7100
12	2.8500
13	3.6800
<i>E. Hexánico</i>	2.6130
<i>Quercetina</i>	0.0500



Gráfica 6. Resultados de reducción del radical catión ABTS<sup>•+</sup> de las reuiones del extracto hexánico de *S.brandegeei*.

### Resultados del ensayo de inhibición de blanqueamiento de $\beta$ -caroteno

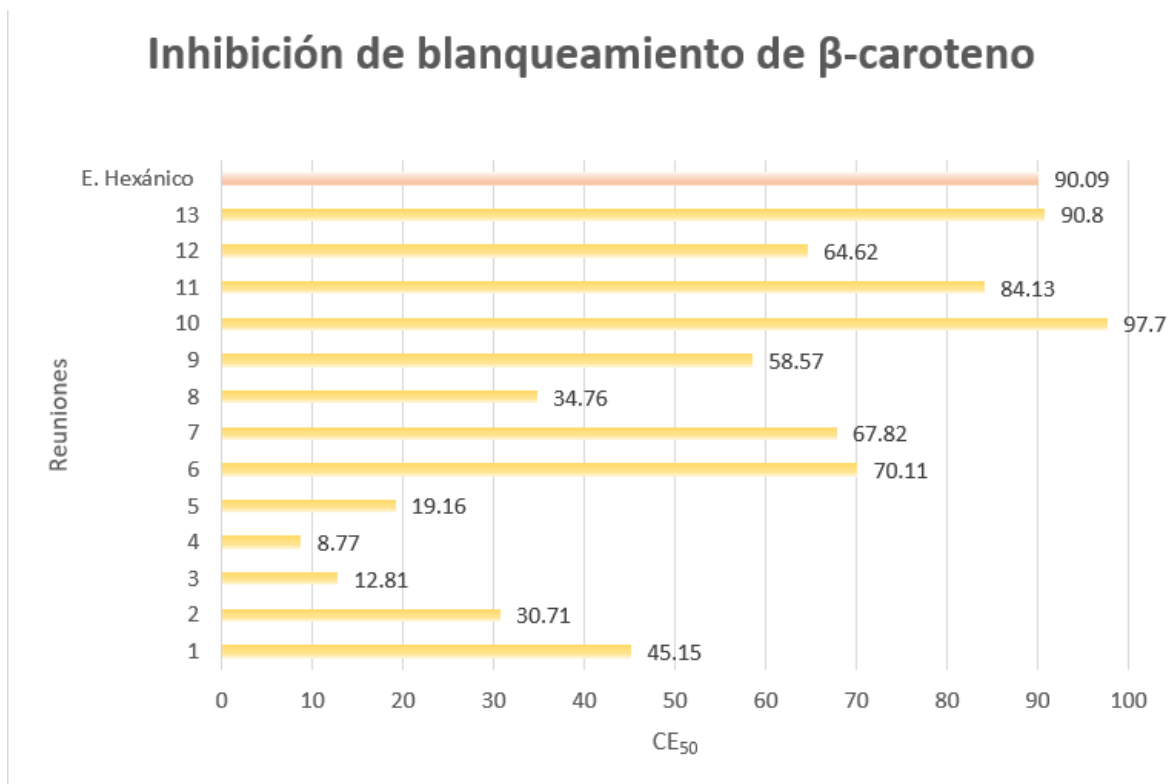
La actividad antioxidante de las reuiones por el método de  $\beta$ -caroteno, se evaluó a una concentración de 0.025 mg/ml para todas las muestras. Para la selección de esta concentración se consideraron las características de coloración intensa de las reuiones, se determinó que, a esta concentración, no se apreciaba interferencia en la lectura de absorbancias.

Debido a las características apolares de los compuestos presentes en el extracto hexánico, fue necesario adicionar acetona en proporción de 10% de volumen total de solvente adicionado a cada muestra, para ser evaluadas bajo las mismas condiciones.

**Tabla 23.** Resultados de evaluación de actividad antioxidante de las reuniones del extracto hexánico de *S. brandegeei* por el método de inhibición de blanqueamiento de  $\beta$ -caroteno.

Reunión	% de inhibición <sup>1</sup>
1	45.15
2	30.71
3	12.81
4	8.77
5	19.16
6	70.11
7	67.82
8	34.76
9	58.57
10	97.70
11	84.13
12	64.62
13	90.80
<i>E. Hexánico</i>	90.09

<sup>1</sup> % de inhibición de blanqueamiento térmico oxidativo de  $\beta$ -caroteno.



Gráfica 7. Resultados de inhibición de blanqueamiento de  $\beta$ -caroteno de las reuniones del extracto hexánico de *S. brandegeei*.

**Tabla 24.** Resumen de resultados de evaluación de actividad antioxidante de las reuniones.

<b>Reunión</b>	<b>DPPH CE<sub>50</sub></b>	<b>ABTS<sup>•+</sup> CE<sub>50</sub></b>	<b>β-caroteno % de inhibición<sup>1</sup></b>
R1	0.0355	0.6957	45.15
R2	0.0415	0.7725	30.71
R3	0.0110	0.8019	12.81
R4	0.2335	4.1400	8.77
R5	0.0200	2.2600	19.16
R6	0.1060	1.9200	70.11
R7	0.0580	1.8800	67.82
R8	4.7x10 <sup>-5</sup>	0.7690	34.76
R9	0.0540	1.2407	58.57
R10	0.0088	0.8700	97.70
R11	0.0077	1.7100	84.13
R12	1.1240	2.8500	64.62
R13	0.1100	3.6800	90.80
<i>E. Hexánico</i>	2.0700	2.6130	90.09
<i>Quercetina</i>	0.0030	0.0500	-

Para la reducción del radical libre DPPH, la reunión 8 presentó el mejor perfil antioxidante, requiriendo una concentración media efectiva de 4.7x10<sup>-5</sup>, superando a la quercetina. Las reuniones R10 y R11, presentaron CE<sub>50</sub> cercanas a la exhibida por el estándar. Las actividades más bajas las mostraron las reuniones R4, R13, y R12 esta última superando 1 mg/ml de CE<sub>50</sub>. No se observó una relación entre el incremento en la

polaridad de las reuniones y una mejora en su actividad antioxidante, sin embargo, la composición de las reuniones es desconocida, por lo que no es posible generar una explicación sobre el comportamiento de estas en los ensayos antioxidantes realizados.

Pese a que ninguna de las reuniones evaluadas superó al estándar utilizado, quercetina, las reuniones R1, R2, y R8, exhibieron un mejor perfil como antioxidantes donadores de electrones, evaluados mediante el ensayo ABTS<sup>•+</sup>. La reunión 8, vuelve a aparecer dentro de las reuniones con mejores resultados, lo cual podría ser un indicador de la presencia de estructuras con alta actividad antioxidante, o bien, que existe un efecto sinérgico entre los metabolitos que la componen que maximizan la capacidad antioxidante de la mezcla. Las concentraciones medias efectivas más altas, y por lo tanto, los resultados menos favorables, correspondieron a las reuniones R12, R13, y R4, esta última requiriendo una concentración de 4.14mg/ml para neutralizar el 50% de los radicales libres. Nuevamente, no se observó un indicador claro que relacione la polaridad de las muestras con su capacidad antioxidante, siendo las dos reuniones más apolares, y una reunión de polaridad media alta, las que presentaron un mejor desempeño en la prueba, que podría atribuirse a estructuras distintas a aquellas de tipo polifenólico.

En el ensayo de inhibición de decoloración de  $\beta$ -caroteno, las reuniones de mayor polaridad mostraron un mejor perfil antioxidante, particularmente la reunión R10, inhibiendo casi el 98% de oxidación del carotenoide a la concentración evaluada; por el contrario, la reunión R4, que previamente obtuvo los mejores resultados, presentó el porcentaje más bajo de inhibición.

Debido a que se trata de extractos multicomponentes, no es posible proponer una explicación estructural concreta ni atribuirle a un solo compuesto la actividad antioxidante, pues la capacidad de neutralizar radicales libres puede ser consecuencia de un efecto sinérgico de una variedad de compuestos distintos, o bien, la falta de

actividad no debe significar la ausencia de antioxidantes, sino que puede tratarse de un impedimento espacial para interactuar con los radicales libres.

Si bien, en la literatura científica la capacidad antioxidante es ampliamente atribuida a compuestos de tipo polifenoles, principalmente flavonoides y flavononas, los extractos de baja polaridad han demostrado un buen potencial antioxidante, tal es el caso del extracto hexánico de Danshen, evaluado por Gordon (Gordon, 1992) que superó la actividad antioxidante exhibida por sus contrapartes polares en la inhibición de oxidación de lípidos. En extractos de media y baja polaridad de salvias, la actividad antioxidante tiende a atribuirse principalmente a los compuestos de tipo Tanshinona (Gordon, 1992; Matkowski, et al., 2008; Zhu, et al., 2004), las Tanshinonas con anillo A aromático han mostrado la mejor capacidad antioxidante dentro de este grupo, Tanshinona I y Dehidrotanshinona han exhibido un alto perfil antioxidante comparado con Tanshinonas con anillo A alicíclico en estudios previos (Weng & Gordon, 1992) (Fig. 46)

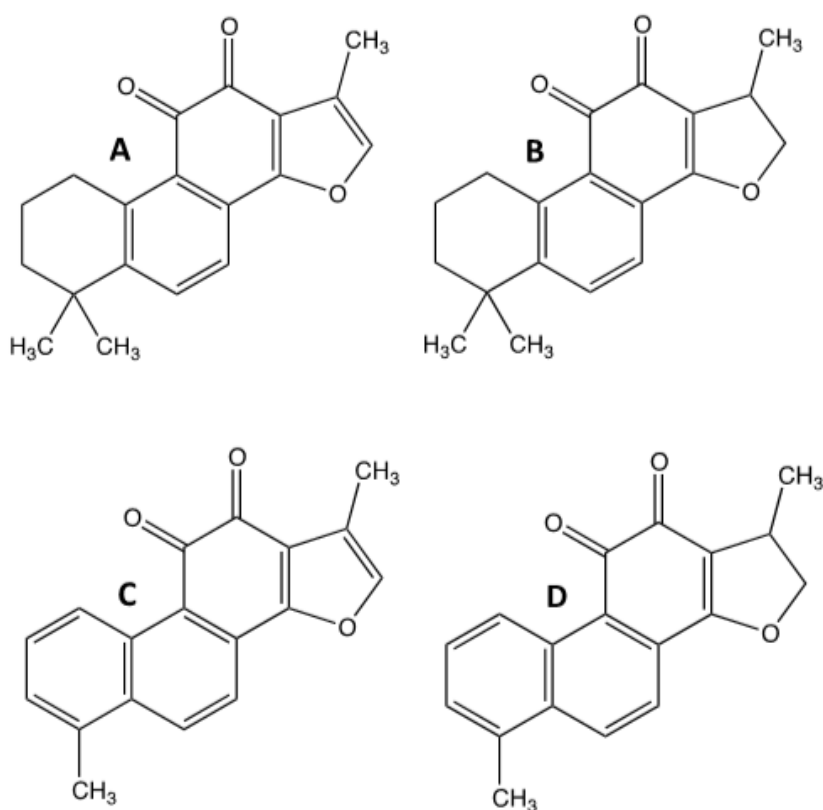


Fig. 46. A: Tanshinona IIA, B: Criptotanshinona, C: Tanshinona I, D: Dehidrotanshinona.

Ciertos diterpenos como la rosmariquinona, ferruginol, taxodiona y otros diterpenoides, particularmente quinónicos, presentes en diversas variedades de salvias, han sido evaluados como antioxidantes con resultados sobresalientes (Houlihan, et al., 1985; Kolak, et al., 2009; Saijo, et al., 2015)

Otro grupo de compuestos de actividad antioxidante relevante presentes en los extractos de baja polaridad de salvias son los compuestos triterpénicos: el ácido ursólico y el ácido oleanólico han sido estudiados por su capacidad para inhibir o retrasar la oxidación de lípidos, con resultados satisfactorios (Assimopoulou, et al., 2005).

La presencia de compuestos de estas clases en el extracto hexánico de *S. brandegeei* evaluado en esta tesis, podría explicar la actividad antioxidante observada particularmente en las reuniones R1 y R2, las reuniones más polares, así como la R8 de polaridad intermedia, que, en promedio, presentaron las actividades antioxidantes más importantes en los tres ensayos realizados.

### Resumen de los resultados obtenidos en los ensayos antioxidantes

**Tabla 25.** Resumen de resultados antioxidantes para particiones y reuniones.

Mayor actividad antioxidante	Ensayo DPPH	Ensayo ABTS <sup>•+</sup>	Ensayo β-caroteno
<b>Partición<sup>1</sup></b>	Butanólica	Acuosa	Butanólica
<b>Reuniones<sup>2</sup></b> (tres mejores resultados)	9,12,11	1,9,2	11,12,14

<sup>1</sup>Particiones generadas a partir del extracto crudo de la raíz de *S. brandegeei*.

<sup>2</sup>Reuniones obtenidas del fraccionamiento cromatográfico de la partición hexánica.

## Resultados de la evaluación de actividad inhibitoria de acetilcolinesterasa

Se evaluó la actividad inhibitoria sobre enzima acetilcolinesterasa por parte del extracto crudo de raíz de *Salvia brandegeei*, las particiones de distintas polaridades, y las reuniones del extracto hexánico. Los resultados se expresan en concentración inhibitoria media (CI50), expresada en µg/ml.

**Tabla 26.** Resultados de la evaluación de inhibición de acetilcolinesterasa.

Extracto evaluado	CI50(µg/ml)	Extracto evaluado	CI50(µg/ml)
Gal	0.46	R5	>150
RSBC	11.1	R6	>150
RSBA	>150	R7	>150
RSBB	>150	R8	>150
RSBD	6.2	R9	>150
RSBH	39.9	R10	48.4
R1	77.5	R11	>150
R2	18.1	R12	>150
R3	>150	R13	>150
R4	>150		

Los resultados de actividad inhibitoria de ACoE del extracto crudo y las particiones (RSBC, RSBA, RSBB, RSBD, RSBH) indican una mayor capacidad por parte del extracto de polaridad media (RSBD), seguido por el extracto crudo (RSBC), la posible presencia de compuestos inhibidores no competitivos podría explicar que la actividad sea mayor en el extracto crudo que en casi todas las particiones.

La partición RSBD, de diclorometano, es un extracto rico en compuestos de tipo Tanshinona; previo a este trabajo, fueron aislados de dicho extracto, tres Tanshinonas de tipo abietano: Tanshinona IIA, Criptotanshinona, y 17-Hidroxicriptotanshinona (Díaz, 2019). Dado que esta clase de diterpenos han sido reportados previamente como inhibidores de ACoE cuando se evalúan conjuntamente, es asumible una relación entre la presencia de estos compuestos y la alta actividad inhibitoria de la enzima en esta partición.

La reunión R2 mostró la mejor capacidad inhibitoria de ACoE de las muestras evaluadas, requiriendo una concentración de 18.1  $\mu\text{g/ml}$  de extracto para la inhibición del 50% de la enzima, seguida de la reunión R10 con CI50 de 48.4  $\mu\text{g/ml}$  y la reunión R1. El resto de las reuniones, así como las particiones evaluadas, la CI50 superó los 1501  $\mu\text{g/ml}$ , siendo esta la máxima concentración evaluada mediante este ensayo.

Para las muestras cuyo CI50 rebasó los 150  $\mu\text{g/ml}$ , se reportan los porcentajes de inhibición a la máxima concentración.

**Tabla 27.** Resultados de porcentaje de inhibición de acetilcolinesterasa.

<b>Extracto evaluado</b>	<b>%Inhibición(<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
<b>RSBA</b>	21.3
<b>RSBB</b>	30.6
<b>R3</b>	46.7
<b>R4</b>	45.0
<b>R5</b>	8.8
<b>R6</b>	13.0
<b>R7</b>	16.8
<b>R8</b>	15.6

<b>R9</b>	48.9
<b>R11</b>	34.5
<b>R12</b>	45.9
<b>R13</b>	4.2

Los porcentajes de inhibición calculados para las reuniones con IC50 mayor a 150  $\mu\text{g/ml}$  muestran poca actividad inhibitoria cuando se comparan con el control galantamina, sin embargo, la reunión R9 presenta un porcentaje cercano al 50% a la concentración máxima; las CCF realizadas muestran una similitud en la composición de las reuniones R9 y R10, de las cuales fue aislada la Criptotanshinona.

Existen pocas publicaciones acerca de la evaluación de actividad inhibitoria de ACoE por parte de extractos crudos de plantas que permitan una comparación adecuada de los resultados obtenidos con los previamente reportados por otros autores, y al ser mezclas multicomponentes, no se ha determinado alguna base molecular para la actividad de extractos en inhibiciones enzimáticas. Dentro de los pocos ensayos de extractos de salvia en actividad anti ACoE, Ozarowski y colaboradores (Ozarowski, et al., 2017) reportaron la evaluación inhibitoria de ACoE *in vivo* del extracto crudo de raíz de *S. miltiorrhiza* (ESM) en diferentes regiones de cerebro de rata. La presencia del ESM demostró tener un efecto estimulante sobre la memoria a largo plazo, lo que se atribuyó al incremento de acetilcolina.

Es mayor el interés por evaluar moléculas concretas que extractos. Los compuestos presentes en las raíces de salvia pueden dividirse en polares y apolares. Los compuestos apolares, principalmente las tanshinonas, son particularmente atractivas para su evaluación frente a acetilcolinesterasa. Kim y colaboradores (Kim, et al., 2007) evaluaron *ex vivo* tanshinonas mayoritarias en la raíz de *S. miltiorrhiza*: tanshinona IIA, criptotanshinona, y dihidrotanshinona. El ensayo se realizó siguiendo modificaciones a la metodología de Ellman, utilizando homogeneizados de cerebro de

rata como sustrato para las enzimas. Criptotanshinona y dihidrotanshinona demostraron tener un efecto inhibitorio significativo, con IC50 de 24.3 y 6.9  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente, mientras que Tanshinona IIA no presentó actividad relevante a las concentraciones evaluadas. Estos resultados presentan concordancia con los obtenidos en la presente tesis, donde la reunión R10, mayoritariamente Criptotanshinona de acuerdo con CCF realizadas, mostró el segundo mejor perfil inhibitorio de ACoE de las muestras evaluadas, con IC50 de 48  $\mu\text{g/ml}$ .

Para el compuesto Tanshinona IIA, existen reportes de baja actividad inhibitoria de ACoE, con IC50 que superan las concentraciones máximas evaluadas (Kim, et al., 2007; Zhou, et al., 2011). Las reuniones R5 y R6, de las cuales se obtuvo la Tanshinona IIA aislada, presentaron un bajo perfil inhibitorio, con IC50 mayores a 150  $\mu\text{g/ml}$ , resultados congruentes con lo reportado en la literatura científica.

En las reuniones R1 y R2, la actividad inhibitoria podría atribuirse a la presencia de otros compuestos congéneres de tanshinonas; de igual manera, en el extracto hexánico podrían estar presentes estructuras de tipo di y triterpenoides, particularmente los triterpenos pentacíclicos como el ácido ursólico y el ácido corosólico, con potencial de exhibir un rol en la inhibición de ACoE.

Los compuestos de tipo Tanshinona no deben descartarse como posible tratamiento para EA, pues han demostrado un perfil neuroprotector y potencializador de las señalizaciones colinérgicas (Kim, et al., 2007) particularmente en ensayos *in vivo*, además, el extracto crudo ESM, rico en Tanshinonas, ha presentado resultados significativos en el mejoramiento de la memoria. Los resultados reportados en la literatura, en congruencia con los obtenidos en la presente tesis, podrían ser un indicativo de que, si bien las Tanshinonas no presentan un perfil inhibitorio de ACoE sobresaliente, otros mecanismos de acción podrían generando un efecto protector o amplificador sobre el sistema colinérgico.

## **CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

El trabajo desarrollado en esta tesis permitió la generación de las siguientes conclusiones:

- A partir del estudio fitoquímico del extracto hexánico de la raíz de *S. brandegeei*, se logró el aislamiento, purificación, y caracterización de dos compuestos de tipo Tanshinona: Tanshinona IIA y Criptotanshinona, y el compuesto esteroideo  $\beta$ -Sitosterol. La caracterización de las estructuras se realizó mediante las técnicas analíticas de CG-EM y RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , y bidimensionales.
- Se realizaron ensayos para evaluar la capacidad antioxidante del extracto crudo y las particiones de la raíz de *Salvia brandegeei*, la partición de disolvente orgánico de mayor polaridad (RSBB) presentó un mejor perfil antioxidante al ser evaluado por las técnicas de DPPH y ABTS, mientras que los extractos de polaridad media (RSBD) y baja (RSBH) mostraron un mejor efecto en el ensayo de  $\beta$ -caroteno.
- Los resultados antioxidantes de las reuniones del extracto RSBH indican un mejor perfil de inhibición oxidativa por parte de los compuestos apolares presentes en las reuniones R1 y R2, y de polaridad intermedia R8, en los ensayos DPPH y ABTS; por el contrario, en el ensayo de  $\beta$ -caroteno, los compuestos de mayor polaridad dentro del extracto hexánico exhibieron un mejor carácter antioxidante, las reuniones R10 y R13 presentaron inhibiciones de más de 90% a la concentración evaluada.
- Se realizaron ensayos de inhibición de la enzima acetilcolinesterasa por parte de las particiones de distintas polaridades de la raíz de *S. brandegeei*, donde el

RSBC y RSBD presentaron los mejores resultados inhibitorios. En estudios fitoquímico previo de RSBD, se detectaron tres compuestos de tipo Tanshinonas, citados por la literatura científica como inhibidores de AcoE, lo que sugiere que la presencia de estos compuestos jugó un papel importante en el buen desempeño inhibitorio de la reunión.

## REFERENCIAS

## REFERENCIAS

1. Adewusi, E.A., Moodley, N., Steenkamp, V. (2011). "Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activity of 468 selected southern African medicinal plants". *S Afr J Bot.* (77); 638–644.
2. Aldred, E. M., Buck, C., Vall, K. (2009) "Chapter 7 - Free radicals" en *Pharmacology*: 41-52
3. Assimopoulou, A. N., Zlatanov, S. N., Papageorgiou, V.P. (2005). "Antioxidant activity of natural resins and bioactive triterpenes in oil substrates". *Food Chemistry.* (92); 721-727.
4. Archaeological Institute of America (2015). "Timely Remedies: The Ancient Medicine of Otzi the Iceman". Recuperado el 18 de febrero de 2019 desde: <https://www.archaeological.org/lectures/abstracts/19320>
5. Avello, M., Suwalsky, Ma. (2006). "Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección". *Atenea (Concepción)*. (494):161-172
6. Badui Dergal, S. (2006). "Capítulo 7- Pigmentos" en *Química de los alimentos*. (Cuarta edición): 417.
7. Behl, C. (1999) "Alzheimer's disease and oxidative stress: implications for novel therapeutic approaches". *Progress in Neurobiology*". (57); 301-323.
8. Berry, P. E. (2018) "Lamiales". *Contribución a la Enciclopedia Britannica*. <https://www.britannica.com/plant/Lamiales>
9. Bocek, B. R. (1984). "Ethnobotany of Costanoan Indians, California, based on collections by John P. Harrington". *Economic Botany.* (38): 240-255.
10. Burda, S., Oleszek, W. (2001) "Antioxidant and antiradical activities of flavonoids". *J. Agric. Food Chem.* (49): 2774—2779.
11. Cabiscol, E. (2014) "Oxidación celular y envejecimiento. Radicales libres: doctor Jekyll y mister Hyde". *SEBBM Divulgación: La ciencia al alcance de la mano*
12. Cabral, Elsa L. (2010) "Asterideas: Diversidad vegetal biotaxonomía de spermatofitos". *Publicación de la Universidad Nacional del Nordeste*.
13. California Flora Nursery (2019) "*Salvia brandegeei*". Recuperado el 4 de marzo de 2019 desde: <https://www.calfloranursery.com/plants/salvia-brandegei>
14. Calscape (2019). "*Salvia brandegeei*" Recuperado el 4 de marzo de 2019 desde: [https://calscape.org/Salvia-brandegeei-\(Santa-Rosa-Island-Sage\)?srchcr=sc584d10657cd1f](https://calscape.org/Salvia-brandegeei-(Santa-Rosa-Island-Sage)?srchcr=sc584d10657cd1f)
15. Cornejo-Tenorio, G., Ibarra-Manríquez, G. (2011) "Diversidad y distribución del género *Salvia* (Lamiaceae) en Michoacán, México". *Revista mexicana de biodiversidad.* (82): 1279-1296.
16. Christen, Y. (2000). "Oxidative stress and Alzheimer disease". *The American Journal of Clinical Nutrition.* (71); 621S–629S.
17. Cronquist, A. (1981) "An integrated system of classification of flowering plants". *Columbia University Press, Nueva York*.

18. Cuvelier, M. E., Berset, C., Richard, H. (1994). "Antioxidant Constituents in Sage (*Salvia officinalis*)". *J. Agric. Food Chem.* (42): 665-669
19. Dasgupta, A., Klein, K. (2014) "Antioxidants in Food, Vitamins and Supplements". En *Prevention and treatment of disease*. 1-18.
20. Di Sapio, O., Bueno, M., Busilacchi, H., Quiroga, M., Severin, C. (2012). "Caracterización Morfoanatómica de Hoja, Tallo, Fruto y Semilla de *Salvia hispanica* L. (Lamiaceae)". *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. (11): 249-268.
21. Dias, D. A., Urban, S., Roessner, U. (2012). "A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery". *Metabolites*. (2); 303–336.
22. Díaz, A. (2003) "La estructura de las catalasas". *Revista de educación bioquímica*. (22): 76-84
23. Díaz, L. J. (2019). "Caracterización fitoquímica de metabolitos bioactivos de tipo terpeno y flavonoide de la raíz de *Salvia brandegeei* y aproximación sintética de análogos flavónicos". Universidad Autónoma de Baja California. Tijuana, B.C., México.
24. El-Gazzar, A., Watson, L., Williams, W. T., Lance, G. N. (1968). "The taxonomy of *Salvia*: a test of two radically different numerical methods". *Botanical Journal of the Linnean Society*. (60): 237-250.
25. Escudero, J., Perez, L., Rabanal, R. M., Valverde, S. (1983). "Diterpenoids from *Salvia oxyodon* and *Salvia lavandulifolia*". *Phytochemistry*. (22): 585-587.
26. Fernández, J.L., Rivera, O. (2006). "Labiatae". G. Galeano & N. García (eds.): *Libro Rojo de Plantas de Colombia*. (3) : 385-582.
27. Galano, A. (2017). "Estrés oxidativo, radicales libres, antioxidantes y...¿Química computacional?". *Boletín de la Sociedad Química de México*. (11) :21-26.
28. Ghorbani, A., Esmaeilzadeh, M. (2017) "Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components". *Journal of Traditional and Complementary Medicine* (7) 433-440.
29. Gobierno del estado de Baja California (2015) "Flora de Baja California". Recuperado el 1 de Agosto de 2017, desde [http://www.bajacalifornia.gob.mx/portal/nuestro\\_estado/recursos/flora.jsp](http://www.bajacalifornia.gob.mx/portal/nuestro_estado/recursos/flora.jsp)
30. González, A.G., Andrés, L.S., Ravelo, A. G., Luis, J. G., Bazzocchi, I. L., West, J. (1990). "Terpenoids from *Salvia mellifera*". *Phytochemistry*. (29): 1691-1693.
31. González, A.G., Andrés, Luis, J. G., Brito, I., Rodríguez, M. L. (1991). "Diterpenes from *Salvia mellifera*". *Phytochemistry*. (30): 4067-4070.
32. González, A.G., Aguiar, Z. E., Grillo, T. A., Luis, J. G. (1992). "Diterpenes and diterpene quinones from the roots of *Salvia apiana*". *Phytochemistry*. (31): 1691-1695.
33. Gordon, M. (1992). "Antioxidant properties of extracts from tanshen (*Salvia miltiorrhiza* Bunge)". *Food Chemistry*. (44), 119–122.
34. Halberstein, R. A. (2005) "Medicinal Plants: Historical and Cross-Cultural Usage Patterns". *Annals of Epidemiology*. (15): 686-699.

35. Hardy K., Buckley S., Collins M.J., et al. (2012). "Neanderthal medics? Evidence for food, cooking, and medicinal plants entrapped in dental calculus". *Naturwissenschaften*. (99): 617-626.
36. Harley, R. M. (2012) "Checklist and key of genera and species of the Lamiaceae of the Brazilian Amazon". *Rodriguésia*. (63): 129-144.
37. Harvey, J. W.(2008) "Chapter 7 - The Erythrocyte: Physiology, Metabolism, and Biochemical Disorders" In *Clinical Biochemistry of Domestic Animals (sexta edición)*: 173-240
38. Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., Bobilya, D.J. (2002). "Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships". *The Journal of Nutritional Biochemistry*. (13): 572-584
39. Hernández, A.T.O, Carretero, A.M.E, Villar, del F.A.M. (2002). "Salvia. Fitoquímica, farmacología y terapéutica". *Farmacía profesional*. (16); 59-64.
40. Hernández-Agero, T., Carretero, M. E., Villar, A. M. (2002). "Salvia, fitoquímica, farmacología y terapéutica". *Farmacología*. (16): 60-63.
41. Houlihan, C. M., Ho, C., Chang. S. S. (1985) "The structure of rosmariquinone — A new antioxidant isolated from *Rosmarinus officinalis* L [sic]." *Journal of the American Oil Chemists' Society*. (62); 96-98.
42. Huang, D., Ou, B., Prior, R. (2005) "The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (53): 1841-1856
43. Jamshidi-Kia, F., Lorigooini, Z., Amini-Khoei, H. (2018). "Medicinal Plants: Past History and Future Perspective". *J. Herbmed Pharmacol*. (7): 1-7.
44. Jin, Y. R., Jin, J. L., Li, C. H., Piao, X. X. Jin, N. G. (2012). "Ursolic acid enhances mouse liver regeneration after partial hepatectomy". *Pharmaceutical Biology*. (50): 523–528.
45. Kabel, A. M. (2014). "Free radicals and antioxidants: role of enzymes and nutrition". *World Journal of Nutrition and health*. (2): 35-38.
46. Karamanos, A. J. (2000). "The cultivation of sage" en "Sage: The genus *Salvia*". Editor: Kintzios, S. E.. CRC Press.
47. Kedare, S. B., Singh, R.P. (2011). "Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay". *Journal of food science and technology*.(48):412-422.
48. Kim, D. H., Jeon, S. J., Jung, J. W., Lee, S., Yoon, B. H., Shin, B. Y., Ryu, J. H. (2007). Tanshinone congeners improve memory impairments induced by scopolamine on passive avoidance tasks in mice. *European Journal of Pharmacology*. (574); 140–147.
49. Kintzios, S. E. (2000). "The cultivation of sage" en "Sage: The genus *Salvia*". CRC Press.
50. Klaunig, J. E., Wang, Z. (2018) "Oxidative stress in carcinogenesis". *Current Opinion in Toxicology*. (7) :116-121.
51. Klockgether-Radke, A. P. (2002). "F. W. Sertürner and the discovery of morphine. 200 years of pain therapy with opioids". *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*. (37): 244-249.
52. Knight, J. A. (1998) "Free radicals: their history and current status in aging and disease". *Annals of clinical and laboratory science*. (28) :331-346.

53. Kolak, U., Kabouche, A., Öztürk, M., Kabouche, Z., Topçu, G., Ulubelen, A. (2009). "Antioxidant diterpenoids from the roots of *Salvia barrelieri*". *Phytochemical Analysis*. (20); 320–327.
54. Kupchan, S., M. (1969). "Recent Advances in the Chemistry of Terpenoid Tumor Inhibitors". University of Wisconsin.
55. Kuskoski, E. M., Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., Fett, R. (2005). "Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos". *Cienc. Tecnol. Aliment., Campinas*. (25): 726-732.
56. Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., Chandra, N. (2010) "Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health". *Pharmacognosy Reviews*. (4):118-126.
57. Luis, J. G., Andrés, L. S. (1999). "An eremophylane-type sesquiterpene and diterpenes from roots of *Salvia mellifera*". *Natural Products Letters*. (14): 25-30.
58. Luis, J.G., Grillo, T. A., (1993)(1). "Abietane diterpenes from *Salvia munzii*". *Phytochemistry*. (34): 863-864.
59. Luis, J.G., Grillo, T. A., (1993)(2). "New diterpenes from *Salvia munzii*: chemical and biogenetic aspects". *Tetrahedron*. (49): 6277-6284.
60. Markesbery, W. R. (1997). "Oxidative Stress Hypothesis in Alzheimer's Disease". *Free Radical Biology and Medicine*. (23); 134–147.
61. Martínez-Francés, V., Hahn, E., Ríos, S., Rivera, D., Reich, E., Vila, R., Cañigueral, S. (2017). "Ethnopharmacological and Chemical Characterization of *Salvia* Species Used in Valencian Traditional Herbal Preparations". *Frontiers in Pharmacology*. (8): 467
62. Martínez-Gordillo, M., Fragoso-Martínez, I., García-Peña, M. R., Montiel, O. (2013). "Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo". *Revista mexicana de biodiversidad*. (84): 30-86.
63. Martínez-Gordillo, M., Bedolla-García, B., Cornejo-Tenorio, G., Fragoso-Martínez, I., García - Peña, M. R., González-Gallegos, J., Lara-Cabrera, S., Zamudio, S. (2017). "Lamiaceae de México". *Botanical Sciences*. (95): 780-806.
64. Martínez-Vázquez, M., Estrada-Reyes, R., Martínez-Laurrabaquio, A., López-Rubalcava, C., Heinze, G. (2012) "Neuropharmacological study of *Dracocephalum moldavica* L. (Lamiaceae) in mice: sedative effect and chemical analysis of an aqueous extract". *J Ethnopharmacol*. (141):908-917.
65. Matkowski, A., Zielińska, S., Oszmiański, J. Lamer-Zarawska, E. (2008). "Antioxidant activity of extracts from leaves and roots of *Salvia miltiorrhiza* Bunge, *S. przewalskii* Maxim., and *S. verticillata* L". *Bioresource technology*. (99); 7892-7896.
66. Msaada, K., Jemia, M., Salem, N., Bachrouch, O., Sriti, J., Tammar, S., Bettaieb, I., Jabri, I., Kefi, S., Limam, F., Marzouk, B. (2017). "Antioxidant activity of methanolic extracts from three coriander (*Coriandrum sativum* L.) fruit varieties". *Arabian Journal of Chemistry*. (10): S3176-S3183

67. Muñoz-Juárez, M.A., Gutiérrez, D. M. (2008). "Determinación de actividad antioxidante de diversas plantas del árbol *Nicotina glauca*". *Artículo de difusión: Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro*. 1-4.
68. Muir, J. L. (1997). "Acetylcholine, Aging, and Alzheimer's Disease". *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. (56); 687–696.
69. Nakao M., Fukushima T. (1934) "On the chemical composition of *Salvia miltiorrhiza* (Chinese drug Tan-shen)" *Yakugaku Zasshi*. (54) 844–858.
70. Neisess, K. R., Scora, R. W., Kumamoto, J. (1987). "Volatile leaf oils of California Salvias". *Journal of Natural Products*. (50): 515-517.
71. NIST (National Institute of Standards and Technology) (2018). "β-sitosterol". Recuperado el 12 de marzo de 2019 desde: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C83465&Mask=200>
72. Nunomura A., Perry, G., Aliev, G., Hirai, K., Takeda, A., Balraj, E. K., Jones, P.K., Ghanbari, H., Wataya, T., Shimohama, S., Chiba, S., Atwood, C. S., Petersen, R. B., Smith, M.A. (2001) "Oxidative Damage Is the Earliest Event in Alzheimer Disease". *Journal of Neuro pathology & Experimental Neurology*. (60); 759–767.
73. Ozarowski, M., Mikolajczak, P. L., Piasecka, A., Kujawski, R., Bartkowiak-Wieczorek, J., Bogacz, A., Seremak- Mrozikiewicz, A. (2017). "Effect of *Salvia miltiorrhiza* root extract on brain acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase activities, their mRNA levels and memory evaluation in rats". *Physiology & Behavior*. (173); 223–230.
74. Özler, H., Pehlivan, S., Kahraman, A., Doğan, M., Celep, F., Başer, B., Yavru, A., Bagherpour, S. (2011) "Pollen morphology of the genus *Salvia* L. (Lamiaceae) in Turkey". *Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*. (206): 316-327.
75. Paredes Salido, F., Roca Fernández, J. J. (2002) "Influencia de los radicales libres en el envejecimiento celular". *Offarm*. (21): 96-100
76. Patra, A., Jha, S., Murthy, P. N., Manik, Sharone, A. (2010). "Isolation and characterization of stigmast-5-en-3β-ol (β-sitosterol) from the leaves of *Hygrophila spinosa* T. Anders". *International Journal of Pharma Sciences and Research*. (1): 95-100.
77. de la Peña Fernández, A., Redondo Bellón, P. (1997) "Radicales libres y mecanismos antioxidantes. Generalidades y aplicaciones en la práctica clínica". *Rev Clin Esp*. (197):434-446
78. Petrovska B. B. (2012). "Historical review of medicinal plants' usage". *Pharmacognosy reviews*. (6), 1-5.
79. Pham-Huy, L.A, He, H., Pham-Huy, C. (2008) "Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health". *International Journal of Biomedical Science: IJBS*. (4): 89-96.
80. Porres-Martínez, M., González-Burgos, E., Carretero Accame, M. E., Gómez-Serranillos, M. P. (2013). "Phytochemical composition, antioxidant and cytoprotective activities of essential oil of *Salvia lavandulifolia* Vahl". *Food Research International*. (54): 523-531.

81. Raja, R. R. (2012) "Medicinally potential plants of Labiatae (Lamiaceae) family: an overview". *Research journal of Medicinal Plants*. (6): 203-213.
82. Re, R., Pellegrini, N, Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. (1999) "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay". *Free Radical Biology and Medicine*. (26): 1231-1237.0
83. Rodríguez Perón, J. M., Menéndez López, J. R., Trujillo López, Y.(2001) "Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo". *Rev. Cubana de Medicina Militar* (30) :36-44.
84. Rosua, J.L., Blanca, G. (1986) "Revisión del género *Salvia* L. (*Lamiaceae* [sic]) en el mediterráneo occidental: la sección *Salvia*". *Acta botánica Malacita*. (11): 227-272
85. Saijo, H., Kofujita, H., Takahashi, K., Ashitani, T. (2015). "Antioxidant activity and mechanism of the abietane-type diterpene ferruginol". *Nat Prod Res*. (29); 1739-1743.
86. Smith, M. A., Rottkamp, C. A., Nunomura, A., Raina, A. K., Perry, G. (2000). "Oxidative stress in Alzheimer's disease". *BBA-Molecular Basis of Disease*. (1502); 139-144.
87. Stahl, W., Sies, H. (2003). "Antioxidant activity of carotenoids". *Molecular aspects of medicine*. (24): 345-351.
88. Tabet, F., Touyz, R. M. (2007). "Chapter 30 - Reactive Oxygen Species, Oxidative Stress, and Vascular Biology in Hypertension", en *Comprehensive Hypertension*. 337-347.
89. U.S. National Library of Medicine (2012). "Phase II Multi-Center Study of T89 to Treat Chronic Stable Angina (T89 phase 2)". Recuperado el 1 de Agosto de 2017, desde: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00797953>
90. Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M., Mazur, M., Telser, J. (2007) "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease". *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. (39) :44-84.
91. Velázquez Paniagua, M., Prieto Gómez, B., Contreras Pérez, R. (2004). "El envejecimiento y los radicales libres". *Ciencias* (75): 36-43.
92. Viesca T., C., Ramos de Viesca, M. (2012). "Código de la Cruz-Badiano". *Arqueología mexicana*. (42): 74-77
93. Villaseñor, J. L. (2004). *Boletín de la Sociedad Botánica de México* (75) 105–135.
94. Volodymyr, I. L.(2014) "Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification". *Chemico-Biological Interactions* (224);164-175.
95. Walker, J. B., Sytsma, K. J., Treutlein, J., Wink, M. (2004). "Salvia (Lamiaceae) is not monophyletic: Implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of Salvia and tribe Menthae". *American Journal of Botany* (91) :1115–1125.
96. Wang, X., Zhang, F., Yang, L., Mei, Y., Long, H., Zhang, X., Zhang, J., Qimuge-Suyila, Su, X.(2011)."Ursolic acid inhibits proliferation and induces apoptosis of cancer cells in vitro and in vivo", *J Biomed Biotechnol*. 2011:419343

97. Weng, X. C., Gordon, M. H. (1992). "Antioxidant activity of quinones extracted from tanshen (*Salvia miltiorrhiza* Bunge)". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. (40), 1331–1336.
98. Wilford, J. N. (1998). "Lessons in Iceman's Prehistoric Medicine Kit", Recuperado el 18 de febrero de 2019 desde: <https://www.nytimes.com/1998/12/08/science/lessons-in-iceman-s-prehistoric-medicine-kit.html>
99. Wurtman, R. J. (1992). "Choline metabolism as a basis for the selective vulnerability of cholinergic neurons". *Trends in Neuroscience*. (15); 117-122.
100. Xu, J., Wei, K., Zhang, G., Lei, L., Yang, D., Wang, W., Han, Q., Xia, Y., Bi, Y., Yang, M., Li, M. (2018). "Ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacology of Chinese *Salvia* species: A review". *Journal of Ethnopharmacology*. (225): 18-30.
101. Ye, Y. T., Zhong, W., Sun, P., Wang, D., Wang, C., Hu, L. M., Qian, J. Q. (2017). "Apoptosis induced by the methanol extract of *Salvia miltiorrhiza* Bunge in non-small cell lung cancer through PTEN-mediated inhibition of PI3K/Akt pathway". *Journal of Ethnopharmacology*. (200): 107-116.
102. Zhang, Y., Jiang, P., Ye, M., Sung-Hoon, K., Jiang, C., Lü, J. (2012). "Tanshinones: Sources, Pharmacokinetics and Anti-Cancer Activities". *Int J Mol Sci*. (13): 13621-13666.
103. Zhou L., Zuo Z., Chow M.S. (2005) "Danshen: An overview of its chemistry, pharmacology, pharmacokinetics, and clinical use". *J. Clin. Pharmacol*. (45) 1345–1359.
104. Zhou, Y., Xu, G., Choi, F.F., Ding, L.S., Han, Q.B., Song, J. Z., Qiao, C.F., Zhao, Q.S., Xu, H.X. (2009). "Qualitative and quantitative analysis of diterpenoids in *Salvia* species by liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry". *J Chromatogr. A*. (1216): 4847-4858.
105. Zhou, Y., Li, W., Xu, L., Chen, L. (2011). "In *Salvia miltiorrhiza*, phenolic acids possess protective properties against amyloid  $\beta$ -induced cytotoxicity, and tanshinones act as acetylcholinesterase inhibitors". *Environmental Toxicology and Pharmacology*. (31): 443–452.
106. Zhu, Y. Z., Huang, S. H., Tan, B. K. H., Sun, J., Whiteman, M., Zhu, Y.C. (2004). "Antioxidants in Chinese herbal medicines: a biochemical perspective". *Natural Product Reports*. (21); 478-489.

# APÉNDICES

## **TÉCNICAS EXPERIMENTALES**

## **Instrumentación**

### **Espectroscopia UV-vis**

Para las lecturas de absorbancia realizadas en los ensayos antioxidantes, se utilizó un equipo de espectrofotometría THERMO SCIENTIFIC, modelo Genesys 20, en celdas de cuarzo de 10 mm. Los disolventes empleados- metanol, DCM, acetona, agua destilada- variaron en concordancia con la técnica.

### **Espectrometría de Masas**

Los espectros de masas de los compuestos se obtuvieron en un equipo compuesto CG-EM, utilizando un cromatógrafo de Gases Thermo Scientific modelo TRACE 1310 y un espectrómetro de masas de ionización por impacto electrónico, de cuadrupolo sencillo Thermo Scientific modelo ISQ LT.

### **Resonancia Magnética Nuclear**

Los experimentos de resonancia magnética nuclear se realizaron en un equipo Bruker Avance III de 400 MHz utilizando  $\text{CDCl}_3$  como disolvente y TMS como referencia interna. Todos los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresan en ppm y las constantes de acoplamiento (J) se expresan en Hertz (Hz).

## **Técnicas cromatográficas**

### **Cromatografía de Capa Fina**

Se utilizaron placas FLUKA Analytical de 0.2 mm con indicador fluorescente de 254nm. Se empleó como agente visualizador luz ultravioleta a 254 y 365nm con una lámpara ultravioleta UVP UVGL-58 Handheld UV Lamp. Oleum y vainillina fueron seleccionados como reveladores químicos.

### **Cromatografía Preparativa**

Se emplearon placas preparativas marca Analtech de 20x20 cm, con una fase estacionaria de sílica gel con un poro de 500  $\mu\text{m}$  e indicador fluorescente de 254nm. La detección de los productos en las placas se hizo mediante una lámpara UVP UVGL-58 Handheld UV Lamp de luz ultravioleta a 254nm y 365nm.

### **Cromatografía de columna**

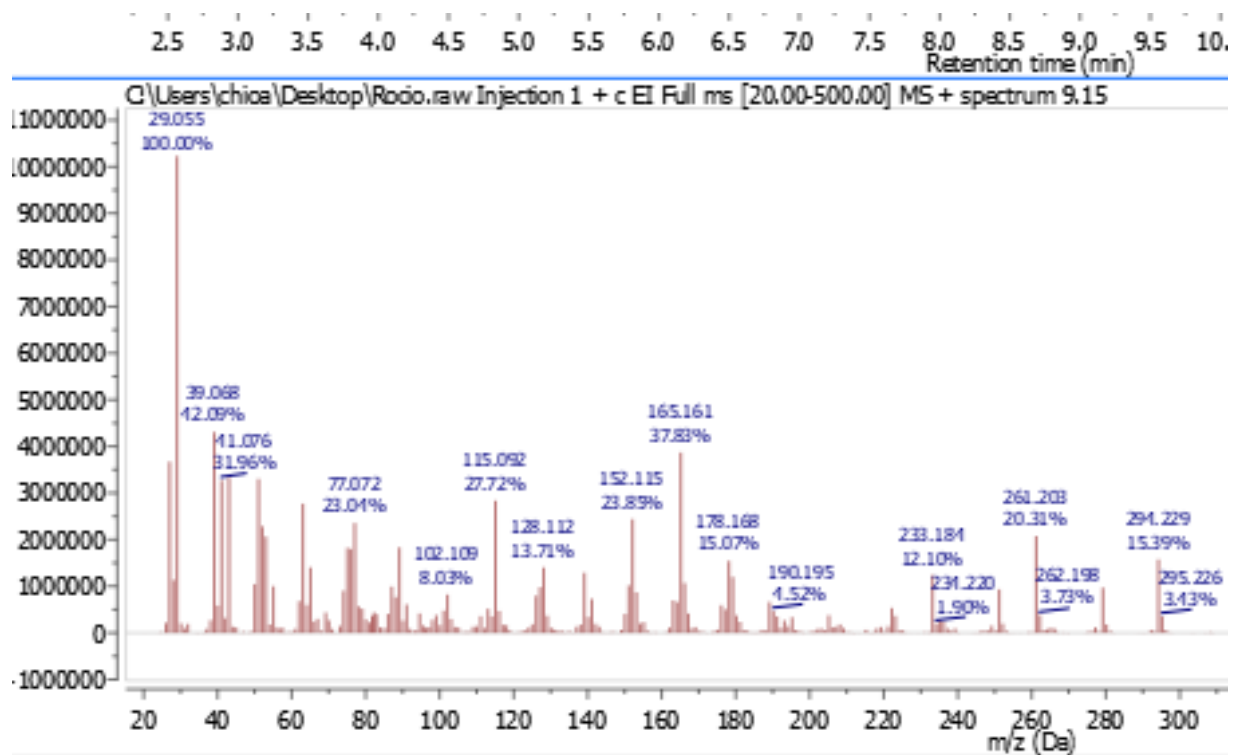
Se utilizó sílica gel grado técnico con tamaño de partícula de 0.063-0.040mm marca Aldrich Chemistry. La preparación previa de las columnas implicó un empaquetado con una mezcla de sílica gel y *n*-hexano. Los solventes de elución consistieron en mezclas de *n*-Hex/AcOEt en distintas proporciones, DCM, acetona y MeOH, de acuerdo a las características del extracto a separar.

## **Programas informáticos**

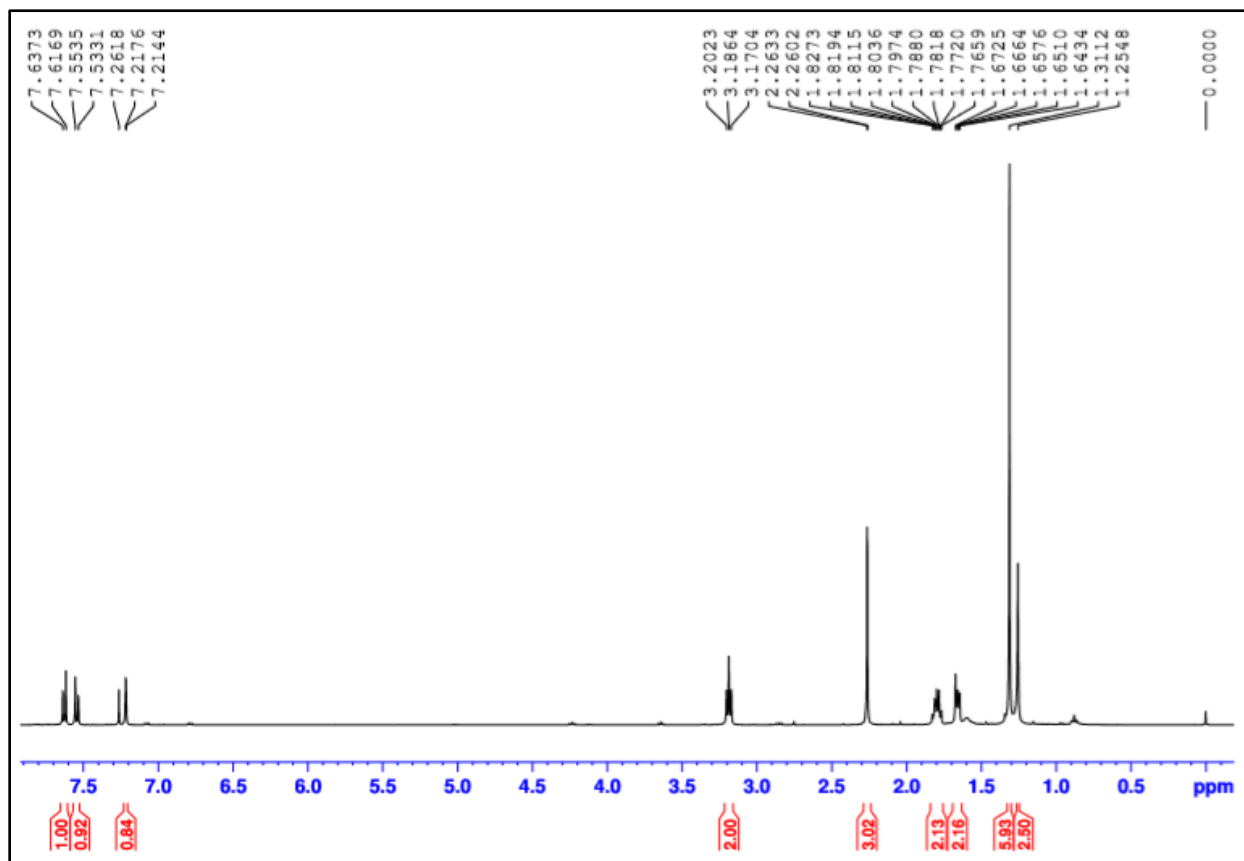
Para la realización y nomenclatura de las estructuras incluidas en el documento tesis, se utilizó el programa ChemDraw Professional 16.0 de Perkin Elmer.

## **ANEXOS**

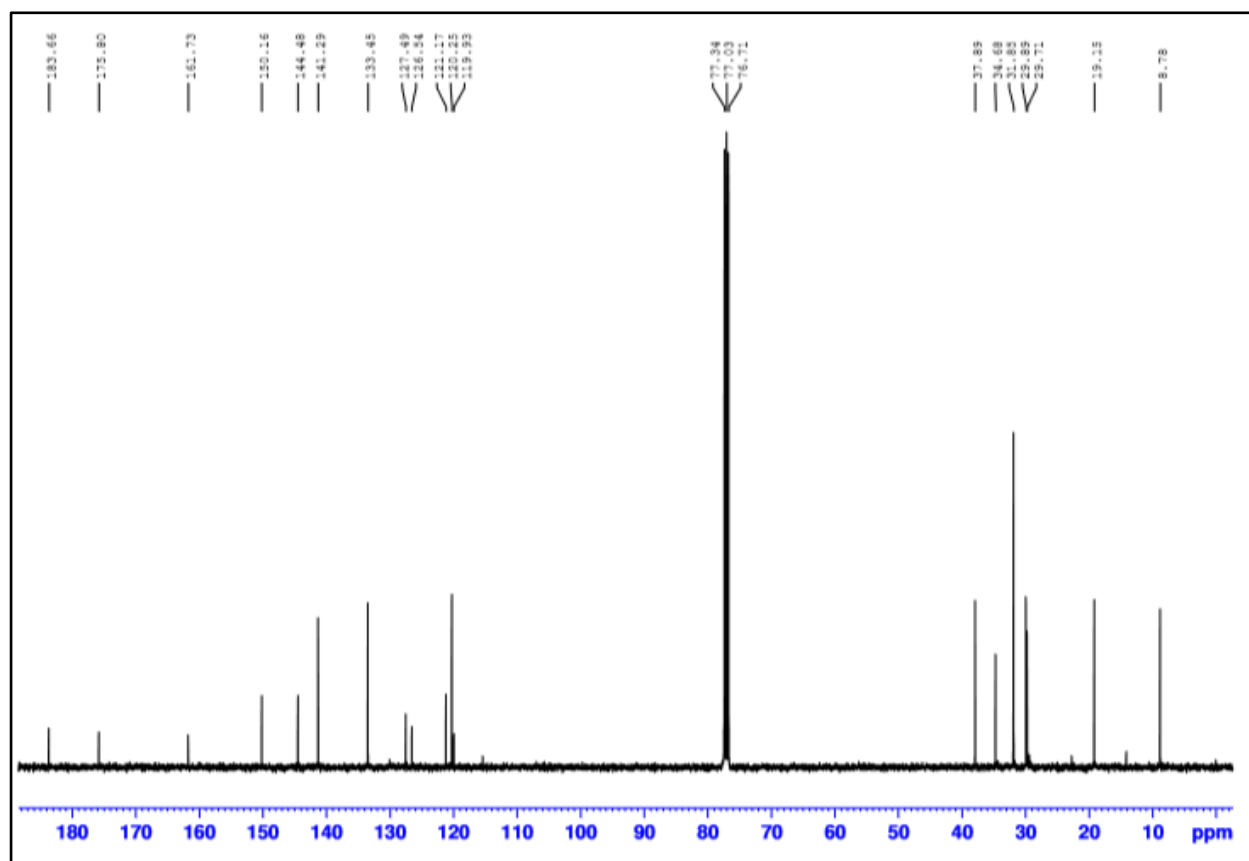
## ESPECTRO DE MASAS DE TANSHINONA IIA



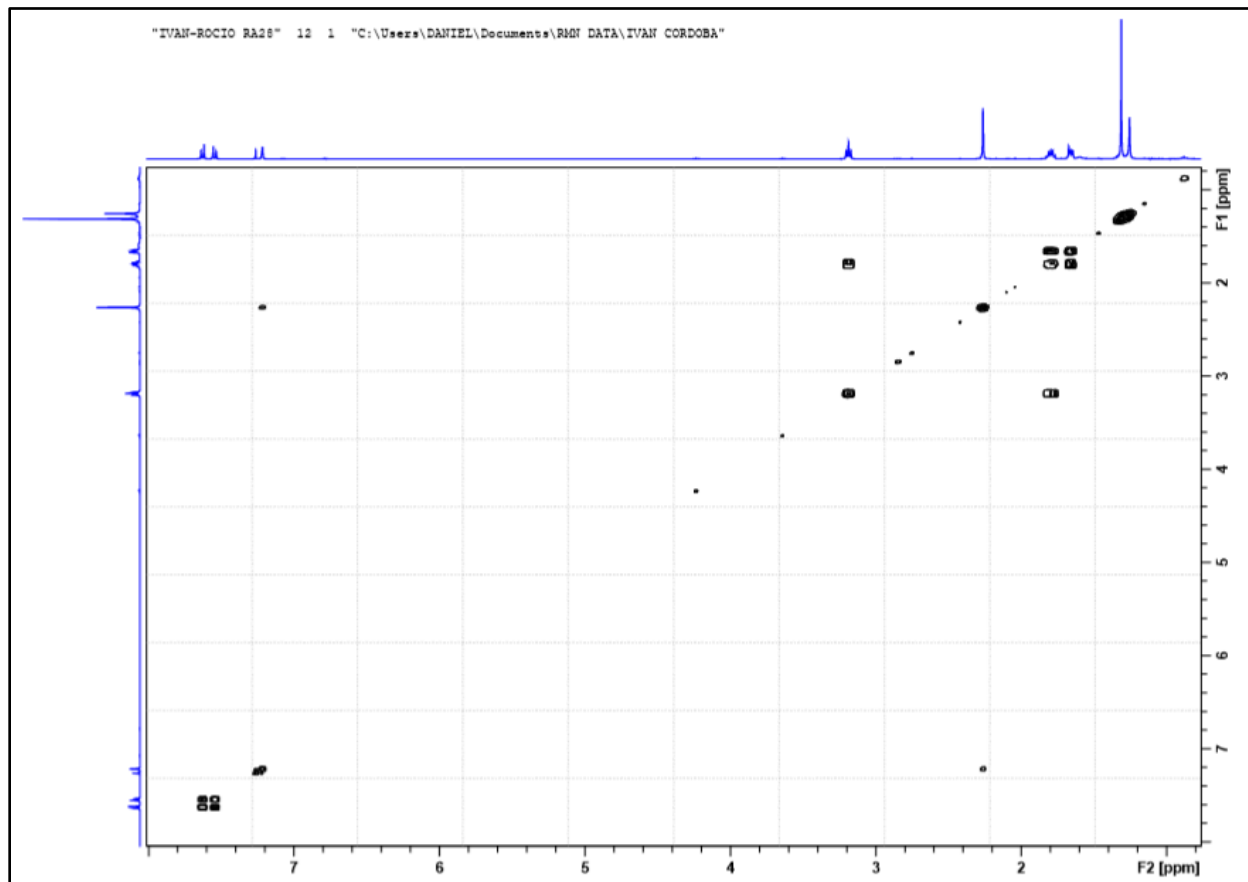
# ESPECTRO $^1\text{H}$ RMN DE TANSHINONA IIA



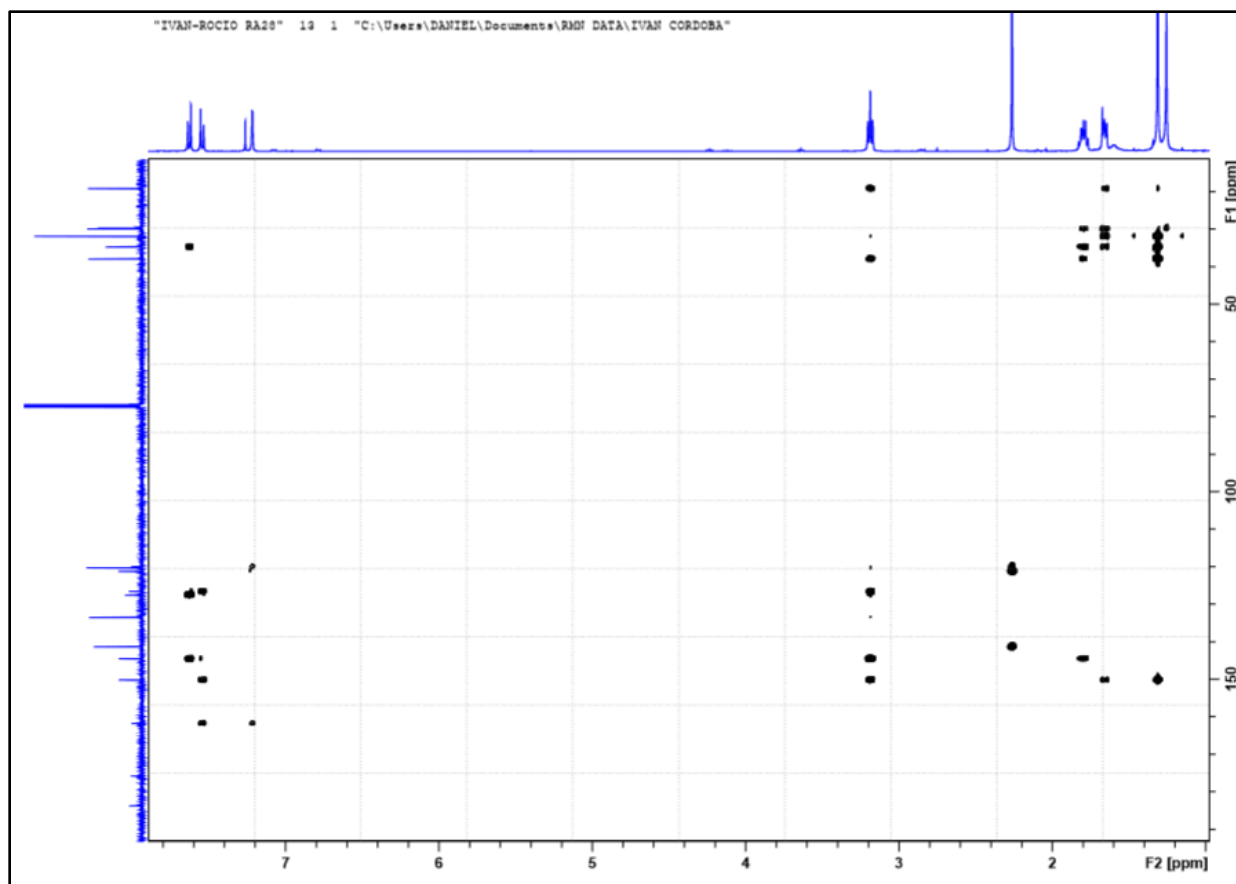
## ESPECTRO $^{13}\text{C}$ RMN DE TANSHINONA IIA



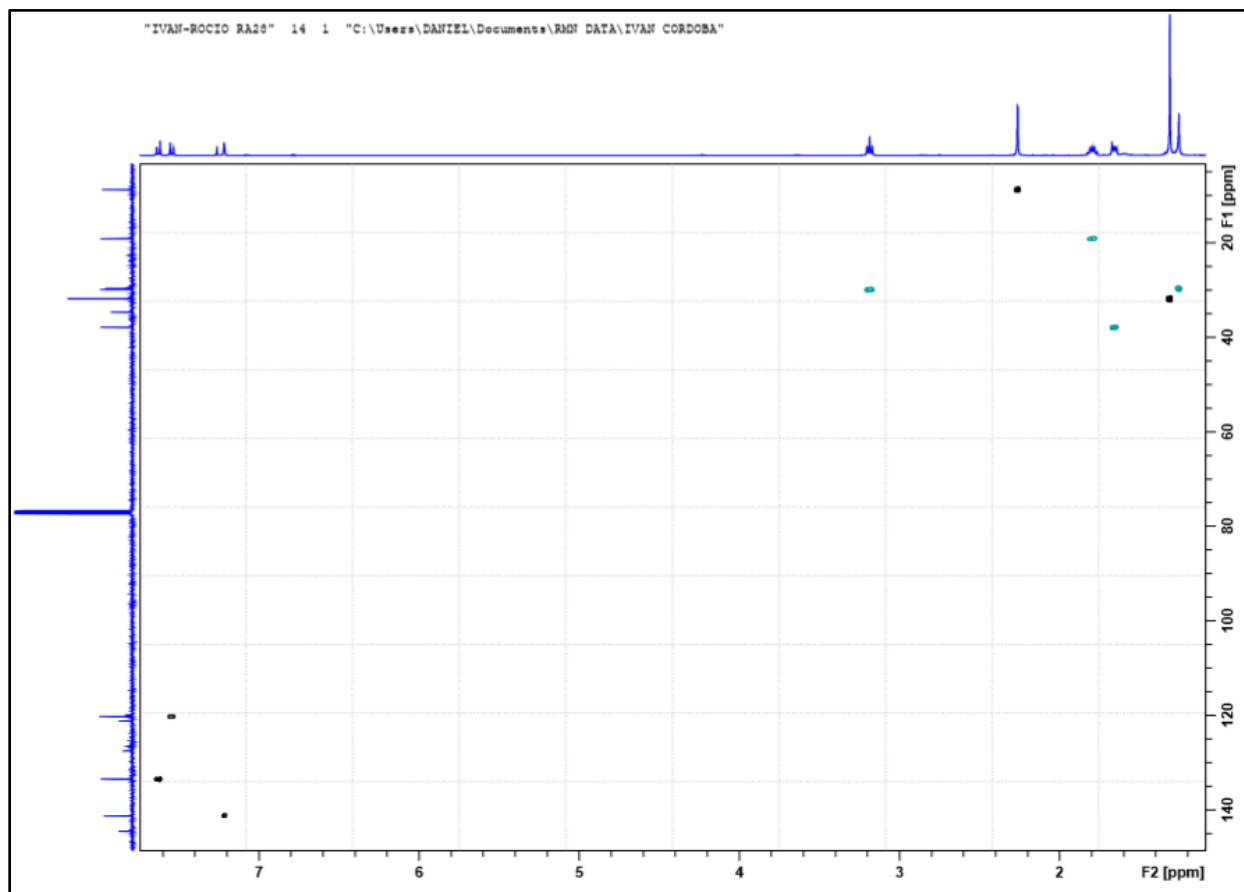
## ESPECTRO RMN COSY DE TANSHINONA IIA



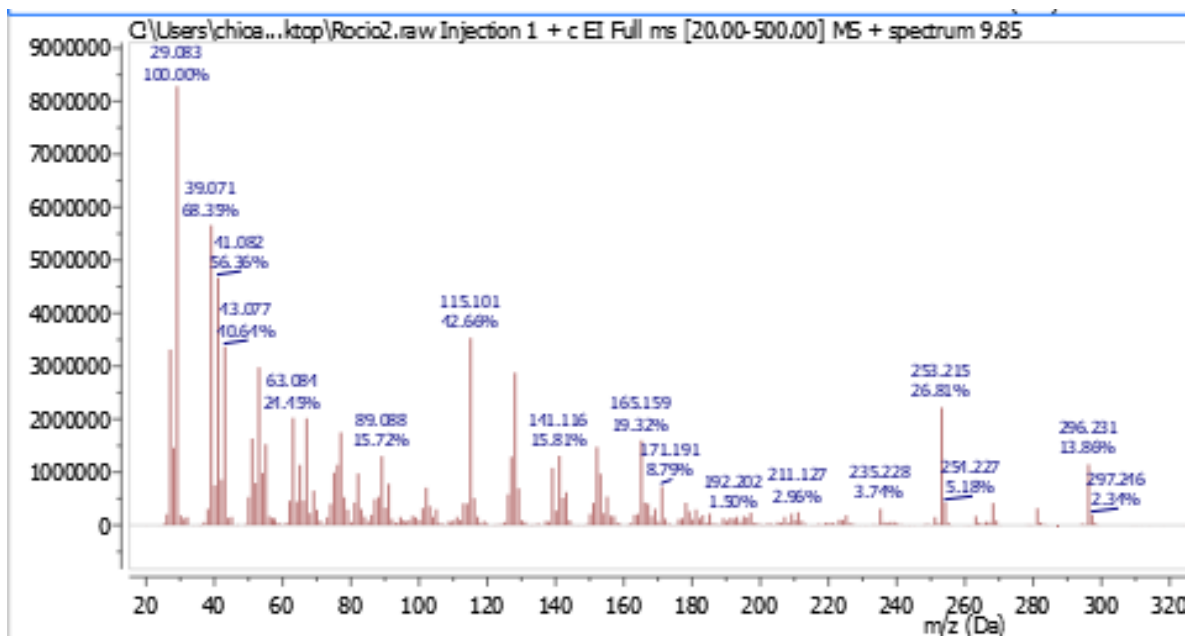
## ESPECTRO RMN HMBC DE TANSHINONA IIA



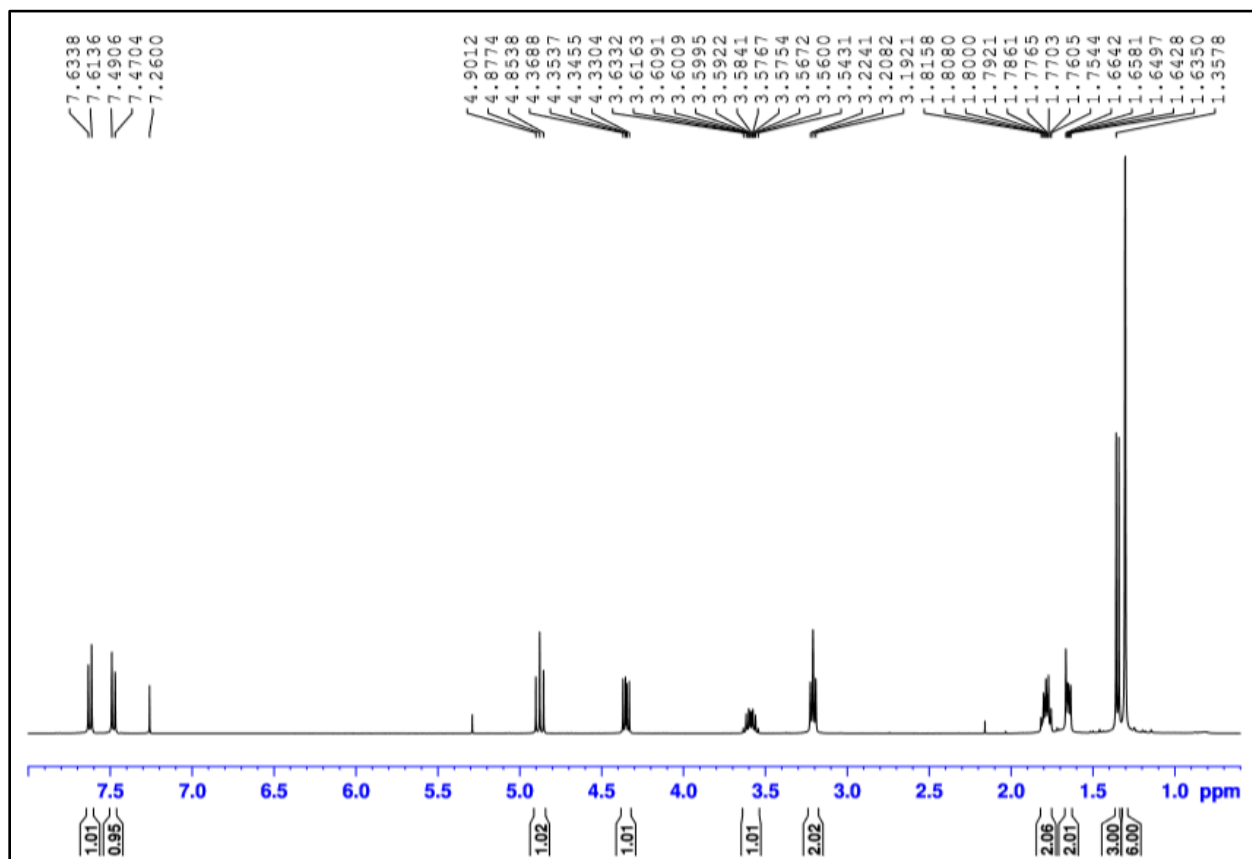
## ESPECTRO RMN HSQC DE TANSHINONA IIA



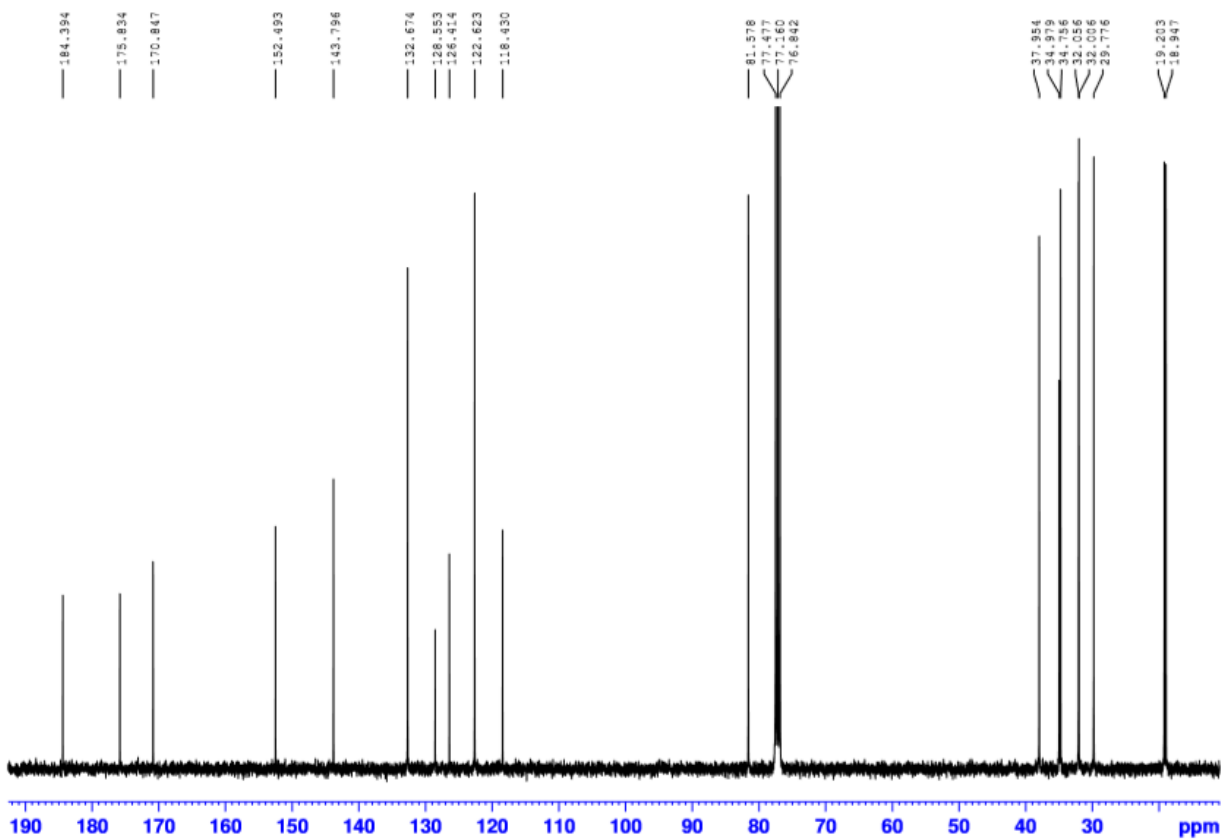
## ESPECTROS DE MASAS DE CRIPTOTANSHINONA



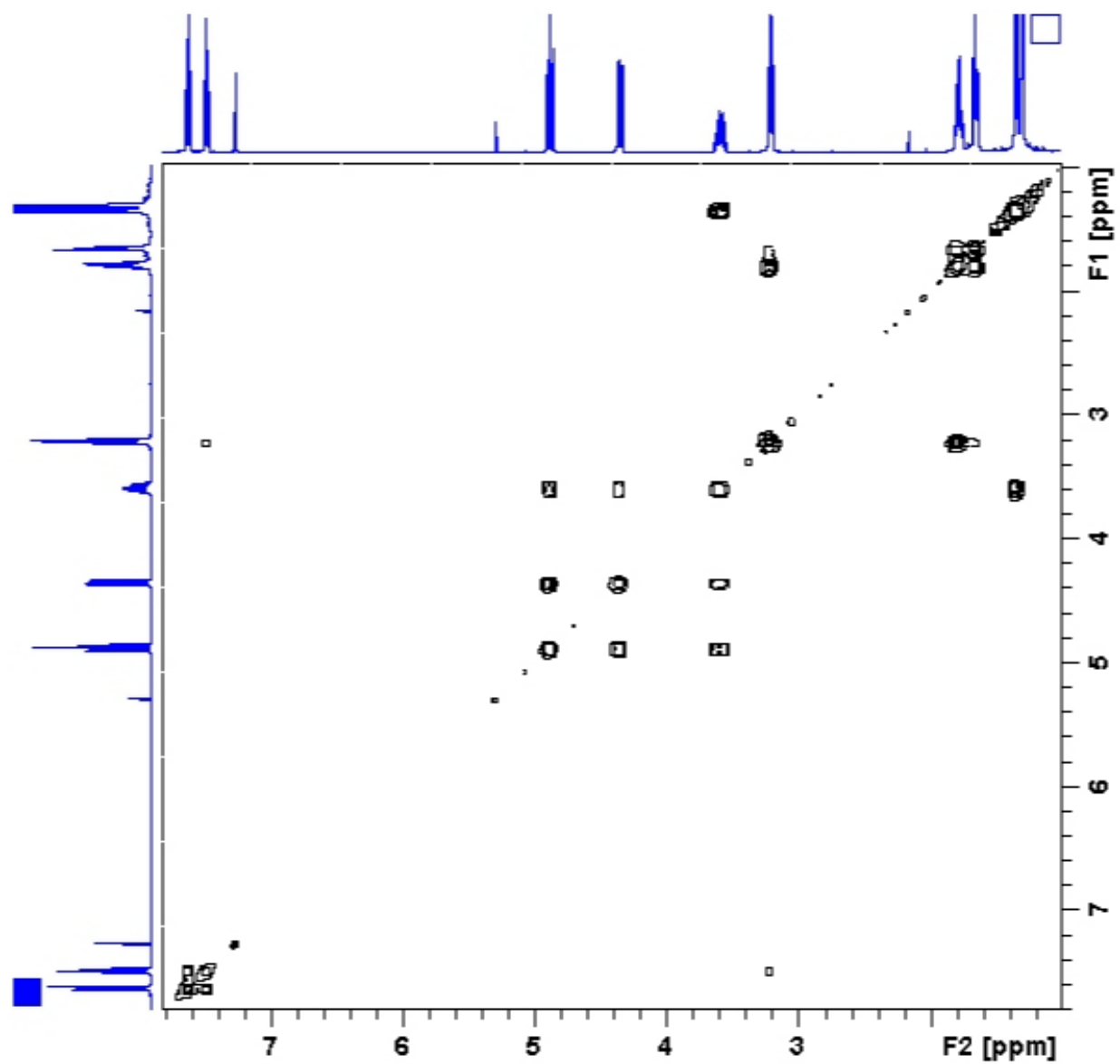
# ESPECTRO <sup>1</sup>H RMN DE CRITOTANSHINONA



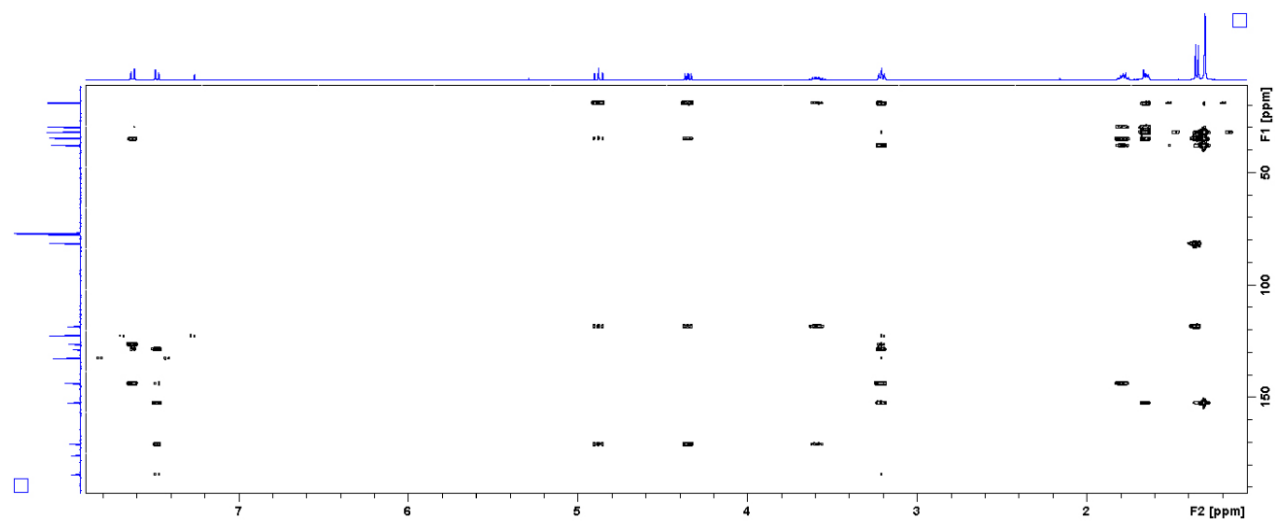
# ESPECTRO $^{13}\text{C}$ RMN DE CRITOTANSHINONA



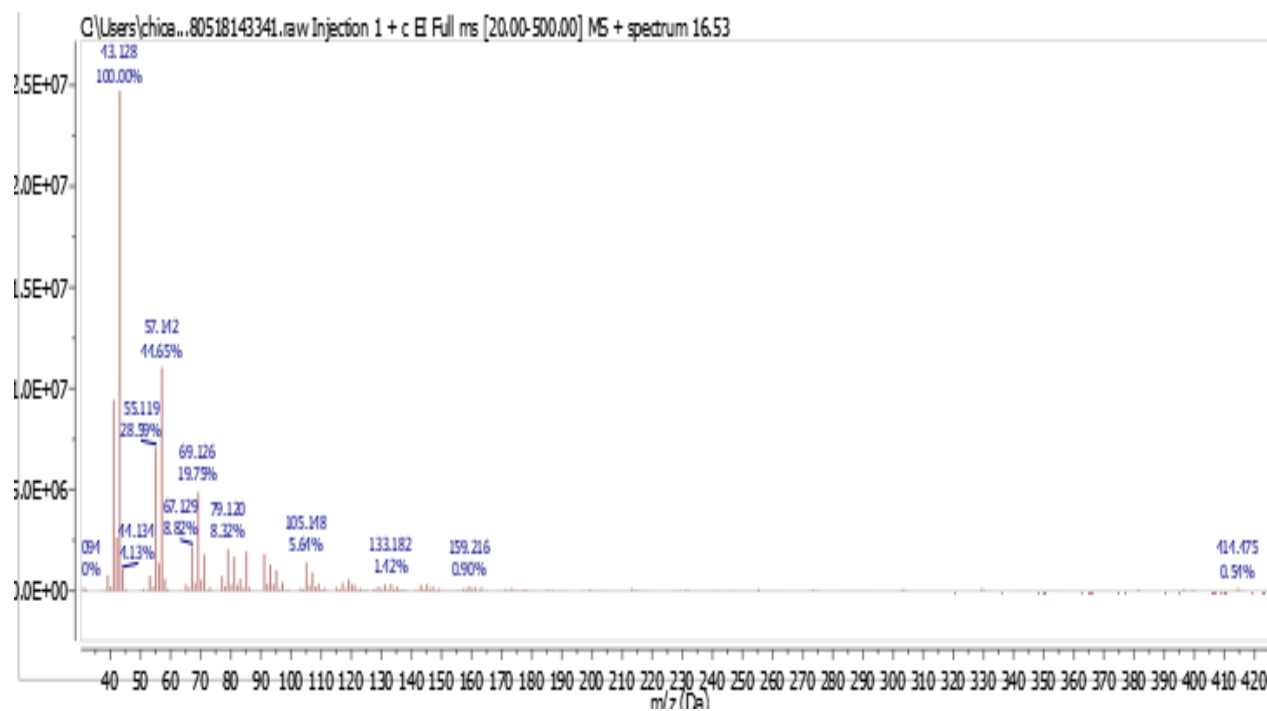
## ESPECTRO COSY RMN DE CRITOTANSHINONA



## ESPECTRO HMBC RMN DE CRITOTANSHINONA



## ESPECTROS DE MASAS DE $\beta$ -SITOSTEROL



# ESPECTRO <sup>1</sup>H RMN DE β-SITOSTEROL

