

Folio No.011/11
Tijuana, Baja California
Diciembre 20/11

C. VEGA GRANADOS DULCE KARINA
Pasante de Químico Industrial
Presente

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

Opción TESIS

es propuesto por el **Dr. Iván Córdova Guerrero**

quién será responsable de la calidad de trabajo que usted presenta, referido al tema:
"Estudio Fitoquímico Preliminar y Evaluación de Actividades Biológicas de tipo
Antioxidante, Anticolinesterasa y Antimicrobiano de *Salvia clevelandii*
el cual deberá desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

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



Dr. Iván Córdova Guerrero
Asesor

Q. Noemi Hernández Hernández
Sub- Director

Dr. Luis Enrique Palafox Maestre
Director

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA



"Estudio Fitoquímico Preliminar y Evaluación de Actividades
Biológicas de Tipo Antioxidante, Anticolinesterasa y Antimicrobiana de
Salvia clevelandii"

Que para obtener el título de

Químico Industrial

PRESENTA

Dulce Karina Vega Granados

Tijuana B.C

Enero del 2012

Índice de Tablas

Índice de Figuras

Índice de Anexos

Abreviaturas y Acrónimos

Introducción

Hipótesis

Objetivo General y Particulares

Capítulo I

Antecedentes

Metodología

Discusión de resultados

Capítulo II

Antecedentes

Metodología

Discusión de Resultados

Conclusión

Bibliografía

Apéndice

Anexos

Técnicas Experimentales

Tabla 1.- Taxa San Pedro Mártir

Tabla 2.- Disolventes Utilizados en C1

Tabla 3.- Fracciones Resultantes de C1

Tabla 4.- Fracciones Resultantes de C2

Tabla 5.- Fracciones Resultantes de C3

Tabla 6.- Disolventes Utilizados en C4

Tabla 7.- Fracciones Resultantes de C4

Tabla 8.- Disolventes Utilizados en C5

Tabla 9.- Fracciones Resultantes de C5

Tabla 10.- Fracciones Resultantes de C6

Tabla 11.- Disolventes Utilizados en C8

Tabla 12.- Fracciones Resultantes de C8

Tabla 13.- Resultados Decoloración Oxidativa del β -caroteno de C1

Tabla 14.- Resultados Reducción del Radical Libre DPPH

Tabla 15.- Resultados Actividad Anticolinesterásica Expresada como Concentración Inhibitoria Media (CI50) en microgramos/mililitro ($\mu\text{g/mL}$).

Tabla 16.- Resultados Actividad Antioxidante Expresada como Concentración Inhibitoria Media (CI50) de Xantina Oxidasa en microgramos/mililitro ($\mu\text{g/mL}$)



Tabla 17.- Resultados Actividad Antibacteriana Expresada como la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en microgramos/mililitro ($\mu\text{g/mL}$)

Tabla 18.- Resultados Actividad Antifúngica Expresada como la Concentración Mínima Inhibitoria (CIM) en microgramos/mililitro ($\mu\text{g/mL}$)

Figura 1.- Sierra Juárez, Baja California, México

Figura 2.- Diterpenos de tipo abietano aislados de *Salvia pachyphylla* (Córdova I. 2007)

Figura 3.- Fracciones de extracto etanolico de *Salvia clevelandii*

Figura 4.- Representación de Etnobotánica

Figura 5.- Quenopodio

Figura 6.- Papiro de Ebers Registro de medicina Egipcia

Figura 7.- Galeno

Figura 8.- Grabado de Indios Lavando Arenas Auríferas Tomado de la Historia

General y Natural de las Indias de Gonzalo Fernández de Oviedo.

Figura 9.- Imagen Extraída de *Historia de las cosas de Nueva España Vol. 1*

Figura 10.- Imagen Extraída de *Códice Badiano*

Figura 11.- Ejemplar Familia *Lamiaceae*

Figura 12.- Distribución del clima mediterráneo en el mundo

Figura 13.- Distribución de Grupos Étnicos en la Península de Baja California

Figura 14.- Imagen del Desierto Vizcaíno Baja California Sur

Figura 16.- *Salvia clevelandii*

Figura 17.- Equipo de resonancia magnética nuclear

Figura 18.-Carnosol

Figura 19.-Ácido carnósico

Figura 20.- Criptotanshinona

Figura 21.- Localización de San Antonio de las Minas, Ensenada, B.C

Figura 22.- *Salvia clevenadii* Cortada

Figura 23.- Columna C1

Figura 24.- Columna C2

Figura 25.- Columna C3

Figura 26.- Columna C4

Figura 27.- CCP con Óleum

Figura 28.- CP en UV

Figura 29.- Columna C5

Figura 30.- Columna C6

Figura 31.- Columna C8

Figura 32.- CCP de R8C4 con Óleum

Figura 33.- CP de R8C4 en UV

Figura 34.- Oxidación-Reducción

Figura 35.- Neutralización de Radical Libre

Figura 36.- Muerte Neuronal por Alzheimer

Figura 37.- Aterosclerosis

Figura 38.- Mutación en ADN

Figura 39.- Vitamina A

Figura 40.- Vitamina E

Figura 41.- Vitamina C

Figura 42.- Estructuras de Antioxidantes Naturales

Figura 43.- Estructuras Bacterianas

Figura 44.- Localización de San Antonio de las Minas, Ensenada, B.C

Figura 45.- *Salvia clevenadii* Cortada

Figura 46.- Columna C1

Figura 47.- Columna C2

Figura 48.- Columna C3

Figura 49.- Columna C4

Figura 50.- CCP con Óleum

Figura 51.- CP en UV

Figura 52.- Columna C5

Figura 53.- Columna C6

Figura 54.- Columna C8

Figura 55.- CCP de R8C4 con Óleum

Figura 56.- CP de R8C4 en UV

Figura 57.- Reducción del Radicar DPPH

Figura 58.- Hidrolisis de Acetilcolina

Figura 59.- Oxidación de Xantina

Figura 60.- Grafica de Resultados Decoloración Oxidativa del β -caroteno.

Figura 61.- Grafica Resultados Antioxidantes del Método Reducción del Radical Libre
DPPH

Figura 62.- Grafica de Resultados Actividad Anticolinesterásica

Figura 63.- Grafica de Resultados de Inhibición de Xantina Oxidasa

Figura 64.- Grafica de Resultados Antibacterianos

Figura 65.- Grafica Resultados Antifúngicos

°C	Grados centígrados
a. C.	Antes de Cristo
Ac	Absorbancia de la muestra control
Ac ⁰	Absorbancia de la muestra a 0 minutos.
Ac ¹²⁰	Absorbancia de la muestra a 120 minutos.
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Am	Absorbancia de la muestra.
Am ⁰	Absorbancia de la muestra a 0 minutos.
Am ¹²⁰	Absorbancia de la muestra a 120 minutos.
ATCI	Yoduro de acetilcolina
ATP	Adenosin trifosfato
B.C	Baja California
cm	Centímetro
cm ³	Centímetros cúbicos
d. C.	Después de Cristo
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	Dipicril fenil hidrazilo (por sus siglas en inglés)
DTNB	Ácido-5,5-ditio-2-nitrobenzóico
EM	Espectrometría de masas
EM-CG	Espectrometría de masas- cromatografía de gases
etc.	Etcétera
EtOH	Etanol
Fe	Fierro
g	gramo
HCl	Ácido clorhídrico
HDL	High density lipoprotein (por sus siglas en inglés)
HPLC	High-performance liquid chromatography (por sus siglas en inglés)
IC50	Concentración media inhibitoria

IL-6	Interleucinas-6
IR	Infrarrojo
Kg	Kilogramo
L	Litro
LDL	Low density lipoprotein (por sus siglas en inglés)
M	Molar
mg	Miligramos
min	Minutos
mL	Mililitros
Mn	Manganeso
mU	Miliunidades
NaOH	Hidróxido de sodio
nm	Nanómetros
pH	Potencial de hidrógeno
RMN	Resonancia magnética nuclear
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
Se	Selenio
t	Tiempo
UABC	Universidad Autónoma de Baja California
UV	Ultravioleta
UV	Ultravioleta
v/v	Volumen/volumen
Vol.	Volumen
vs	Versus
y col.	Y colaboradores
Zn	Zinc
A	Alfa
β	Beta
μ g	Microgramos
μ L	Microlitro

El uso de las plantas con fines curativos se remonta al principio de la historia de la humanidad. El hombre utilizaba a las plantas como alimento y medicina. Por medio de aciertos y errores aprendió a conocer las plantas que lo curaban: este conocimiento se transmitió de generación en generación y el cual fue incrementándose con la experiencia. Sin los recursos que le ofreció la naturaleza, el hombre no hubiera sobrevivido.

3000 a. C se escribió el libro más antiguo de plantas medicinales en China: los sumerios. Teofrasto escribió *La historia de las plantas*, una de las obras más importantes que existe sobre botánica, en la cual clasifican a las plantas de acuerdo a su modo de distribución, de hábito de crecimiento, de reproducción y de acuerdo a sus aplicaciones alimenticias y medicinales. Los asirios conocían poco más de 250 hierbas medicinales las cuales utilizaban como parte de sus ritos de purificación, entre ellas se encuentra el anís, la mariguana, la mandrágora, el ajo, el opio entre otros. En la Grecia antigua se usaban, entre otras, la canela, el ruibarbo, la genciana y la mostaza. Entre sus expediciones por África, Persia y la India, Alejandro Magno introdujo en Europa un sin número de plantas con propiedades curativas: muchas de las plantas las usaban en América tiempo antes de la llegada de los europeos.

Los conocimientos sobre las plantas medicinales de América, fueron transmitidos por los aborígenes a misioneros y viajeros españoles, quienes los inmortalizaron en diversas obras como las de: Gonzalo Fernández de Oviedo, *De la natural historia de las Indias e Islas y tierra firme del mar océano* publicada en 1535. En estas obras aparece la descripción de muchas plantas medicinales, entre ellas el achiote, guaco, tabaco y cacao. El maíz, la papa y el cacao eran la base de alimentación de las civilizaciones precolombinas en donde se tiene registro la utilización de condimentos como el chile y la vainilla.

Metabolitos secundarios de la familia Lamiaceae de Baja California

El bosque de coníferas en Baja California tiene elementos florísticos que merecen su consideración a cualquier nivel. Howell refiere que el noroeste de la península es una de las regiones con respecto a su riqueza florística. La flora de la península de Baja California cuenta con aproximadamente 3,100 taxa (especies, subespecies y variedades), incluidos en 155 familias botánicas.



Figura 1.- Sierra Juárez, Baja California, México

Entre ellas la familia lamiaceae que ha sido estudiada, aislándose numerosos metabolitos secundarios tales como esteroides, flavonoides, sesquiterpenos, diterpenos, y triterpenos entre otros.

Algunos de los compuestos aislados de plantas principalmente de géneros como *Ajuga*, *Rabdosia*, *Teucrium*, *Scutellaria*, *Stachys*, *Leonorus* *Ballota* y *Salvia*, han presentado una amplia variedad de funciones biológicas de interés medicinal y agroquímico. Las principales actividades encontradas son como: antitumorales, antiplasmódicas, antivirales, bactericidas o inhibidores del desarrollo de insectos.

Estudios recientes demuestran que compuestos de tipo abietatriénico juegan un papel importante en el mecanismo de defensa contra especies químicas altamente dañinas para las células como son los radicales libres del oxígeno y oxígeno molecular en su estado singlete, comportándose así como fitoalexinas de estrés lumínico. Esta conclusión está apoyada además por la observación de que la concentración de este tipo de diterpenos es muy alta en especies de *Salvias* de zonas desérticas las cuales están sometidas a una elevada dosis de irradiación solar, mientras que otras especies de *Salvias* de zonas húmedas y bosques de niebla, biosintetizan preferentemente diterpenos neoclerodánicos, pero no diterpenos abietatriénicos. Con esta premisa el presente trabajo se enfoca en el aislamiento y purificación de metabolitos secundarios así como el estudio biodirigido de un extracto etanólico de *Salvia Clevelandii*.

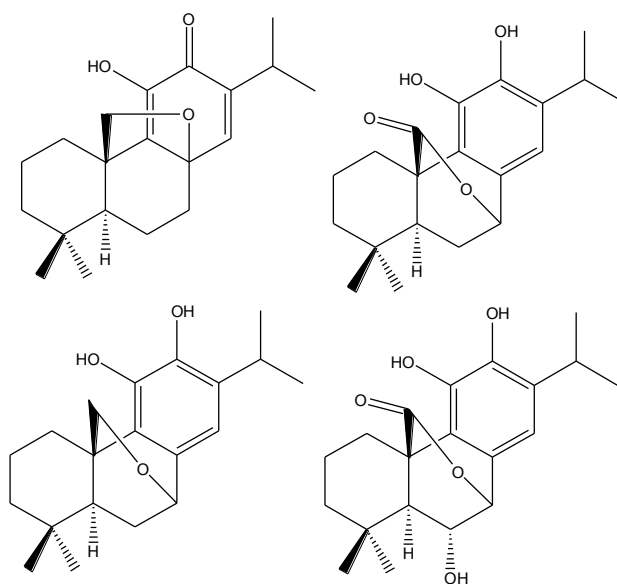


Figura 2.- Diterpenos de tipo abietano aislados de *Salvia pachyphylla* (Córdova I. 2007)

Hipótesis

Las fracciones del extracto etanolico de *Salvia clevelandii* tienen propiedades que favorecen a la inhibición de la oxidación y a la inhibición de proliferación de agentes patógenos como bacterias y hongos.



Figura 3.- Fracciones de extracto etanolico de *Salvia clevelandii*

Objetivo General

Realizar estudios biológicos a fracciones de un extracto etanolico de *Salvia clevelandii* para el aislamiento de metabolitos secundarios biodirigido, y estudio fitoquímico preliminar de una fracción del extracto.

Objetivos Particulares

- Encontrar las metodologías de estudios biológicos adecuados para evaluar las fracciones de *Salvia clevelandii*
- Evaluar la actividad antioxidante mediante los métodos: decoloración oxidativa del β -caroteno, reducción del radical libre DPPH, inhibición de la xantina oxidasa e inhibición de la acetilcolinesterasa.
- Evaluar la actividad antimicrobiana mediante los métodos: determinación de la concentración mínima inhibitoria antibacteriana y determinación de la concentración mínima inhibitorio antifúngica.
- Estudio fitoquímico preliminar mediante el aislamiento de algunos metabolitos secundarios, y caracterizarlos mediante técnicas de resonancia magnética nuclear.

Antecedentes sobre plantas medicinales

Desde la antigüedad se conocen plantas cuyos extractos han sido usados en pócimas o en curaciones y aún las plantas sin tratamiento se han empleado para los mismos fines. Al estudio y la interpretación de la historia de las plantas en las sociedades antiguas y actuales, se le conoce como etnobotánica.

Lo más destacable de esta ciencia, es su dedicación a la recuperación y estudio del conocimiento que las sociedades, etnias y culturas de todo el mundo han tenido y tienen, sobre las propiedades de las plantas y su utilización en todos los ámbitos de la vida. Constituye un marco para el estudio de las complejas relaciones humanidad-planta en sus dimensiones simultáneamente antropológicas, ecológicas y botánicas.



Figura 4.- Representación de Etnobotánica

A las plantas le eran atribuidas propiedades curativas de acuerdo a su forma, su color o el hábitat. Por ejemplo, los embriones de quenopodio (**Figura 5**), por parecerse a una lombriz, eran utilizados como antihelmínticos, y por su forma, las raíces de *Rauwolfia serpentina* lo eran para combatir los efectos de las mordeduras de serpientes. Independientemente de su aspecto, estas plantas son efectivas en los tratamientos indicados gracias a ciertos metabolitos secundarios presentes en ellas.



Figura 5.- Quenopodio

El nuevo mundo es particularmente rico en plantas, por ejemplo hay unas 80-100 especies con características alucinógenas y probablemente habrá más que no han sido descubiertas o de las que no se tiene registro. Las plantas que principalmente llaman la atención son aquellas que causan alteraciones visibles por ingestión, inhalación o contacto; existe una vasta información desde hace siglos, sobre la flora americana y su uso, que no solamente ha sido recopilada por europeos (principalmente alemanes) sino también por naturistas de este lado del globo.

Con el interés que ha despertado la medicina “naturista” a diario crece el número de escritos que ilustran la utilidad de las plantas para el tratamiento de diversas afecciones. Por desgracia la mayoría no están suficientemente documentados ni alertan contra los posibles efectos colaterales derivados del uso indiscriminado de materiales vegetales. Paralelamente, el interés ha evolucionado hacia el estudio científico de los componentes y los efectos de las plantas que tradicionalmente o “*di novo*”, muestran actividades biológicas interesantes y con ello la circulación de una serie de publicaciones periódicas reconocidas.

No hay que olvidar que la información sobre usos populares provienen frecuentemente de fuentes dudosas y puede resultar no del todo cierta, puesto que a veces es guardada como secreto y/o es posible que se confunda la clasificación botánica del vegetal. La etnobotánica trata de recopilar esos conocimientos de manera precisa. El término etnobotánica fue usado por primera vez por John Harshbergers en 1895, para referirse al estudio de las plantas utilizadas por las etnias y en especial, por los pueblos primitivos y/o aborígenes.

En la actualidad en el campo de productos naturales, la información cubre además, aspectos adicionales como estructura de los constituyentes químicos, actividad biológica, extracción y purificación, datos espectroscópicos, síntesis y biosíntesis. Ella está registrada en textos, catálogos, publicaciones periódicas e índices. Generalmente esos aspectos no son tratados de manera simultánea ni con igual intensidad en cada caso.

Algunas de las plantas más destacadas con propiedades favorecedoras al ser humano gracias a los estudios de la etnobotánica son la manzanilla antes del descubrimiento de la quina era empleado contra las fiebres, posee propiedades carminativas y calmantes. Su infusión es antiespasmódica estomacal y combate cólicos severos. El membrillo es muy útil contra las afecciones bronquiales como la tos, asma y resfriados. El eucalipto es excelente combatiendo afecciones del sistema respiratorio. Las espinacas son conocidas por sus propiedades tónicas laxantes y emolientes. El diente de león es utilizado como tónica y depurativo de la sangre y se emplea en enfermedades hepáticas y de la piel.

Estos conocimientos, generalmente los han acumulado determinados individuos, sacerdotes, hechiceros, curanderos, etc., quienes los han transmitido, de generación en generación, a determinados aprendices y a sus descendientes, principalmente de manera verbal. En ocasiones, historiadores, viajeros o curanderos, han dejado útiles descripciones de plantas medicinales y su utilidad.

Así, en la Biblia están descritas unas 200 plantas medicinales y sus aplicaciones. El papiro de Ebers (**Figura 6**), escrito hace aproximadamente unos 3500 años, contiene descripciones de enfermedades e indicaciones para tratarlas con plantas entre las que se ha identificado la *Scilla maritima*, empleada con el mismo fin que, 1 000 años después, la empleaba Hipócrates, quien además, conocía los usos del ajeno, cicuta, beleño, ruibarbo y manzanilla.



Figura 6.- Papiro de Ebers Registro de medicina Egipcia

En el año 372 a.c., Teofrasto, discípulo de Aristóteles, escribió diez libros *sobre la historia de las plantas* y otros ocho *sobre las causas de las plantas*: donde menciona los usos de la canela, el cornezuelo de centeno, el apio y el helecho macho. Hipócrates conocía el uso de la manzanilla y de la cicuta (con la cual se envenenó Sócrates) y son éstos de los primeros registros escritos. Dioscórides 77 a.C. escribió *Materia Medica*, una obra considerada por 15 siglos la cumbre de la botánica y farmacia.

En ella registró todas las plantas y medicinas conocidas por los griegos e incluyó desde la simple descripción hasta su utilización. Plinio 37-79 d.C. escribió un manual de 47 volúmenes de *Historia Natural* en el cual se indicaban usos y características de vegetales como la casia, anís, alheña, y helecho macho.

Galeno (**Figura 7**) 131-200 d.C., farmacéutico y médico griego, escribió veinte libros sobre medicina y farmacia, indicando empleo y aun adulteraciones de las plantas medicinales. En obras posteriores se recopilan estas informaciones y, unidas a otros conocimientos, forman la farmacia europea. En China, India y Japón se ha encontrado abundante información escrita sobre la flora medicinal.



Figura 7.- Galeno

La mayor parte de los conocimientos africanos sobre plantas medicinales, contenida transmitiéndose verbalmente entre unos cuantos elegidos: lo mismo ocurre con los conocimientos de muchas tribus de América. Si se logra difundir esta información y estudiarla científicamente, la humanidad obtendrá sorprendentes e importantes sustancias que, de lo contrario, permanecerán ignoradas por muy largo tiempo, pues la civilización tiende a romper la cadena de la tradición verbal que ha preservado esta información.

Los conocimientos sobre las plantas medicinales de América, fueron transmitidos por los aborígenes a misioneros y viajeros españoles, quienes los inmortalizaron en diversas obras como las de: Gonzalo Fernández de Oviedo, *De la natural historia de las Indias e Islas y tierra firme del mar océano* publicada en 1535.

En estas obras aparece la descripción de muchas plantas medicinales, entre ellas el achiote, guaco, tabaco y cacao. José de Acosta, publica en 1590 su *Historia natural y moral de las Indias*, reeditada en México en 1940 por el Fondo de Cultura Económica. En este libro se describen la yuca, camotes, aguacate, chicozapote, liquidámbar y muchos otros vegetales medicinales. De 1570 a 1577, el protomédico del Rey Felipe II, don Francisco Hernández, recorre México, y con sus observaciones forma una obra de la que solo se pudo publicar una parte con el título de *Historia Plantarum Novae Hispaniae*, la cual ha sido reeditada en castellano por la imprenta Universitaria de la Universidad Nacional Autónoma de México. Además de la descripción de las plantas, la obra contiene esquemas de ellas.

Con el título de *Quatro libros de la naturaleza y virtudes de las plantas y animales que están reunidos en el uso de la Medicina en la Nueva España y el método, y corrección y preparación que para administrarlas se requiere con lo que el Doctor Francisco Hernández escribió en lengua latina*, Francisco Ximénez publicó, en 1615, parte de la obra de Hernández. Los tomos correspondientes a la parte botánica han sido traducidos al castellano, anotados con referencias bibliográficas y publicados por el Instituto de Biología y la Imprenta Universitaria (Mexico, 1946).



Figura 8.- Grabado de indios lavando arenas auríferas tomado de la *Historia General y Natural de las Indias* de Gonzalo Fernández de Oviedo

Fray Bernardino de Sahagún, escribió a fines del siglo XVI su *Historia de las cosas de Nueva España*, en la que menciona muchas de las plantas empleadas con fines medicinales por los aztecas y zapotecas. La Editorial Robredo, de México, publicó en 1938 una edición moderna de dicha historia.

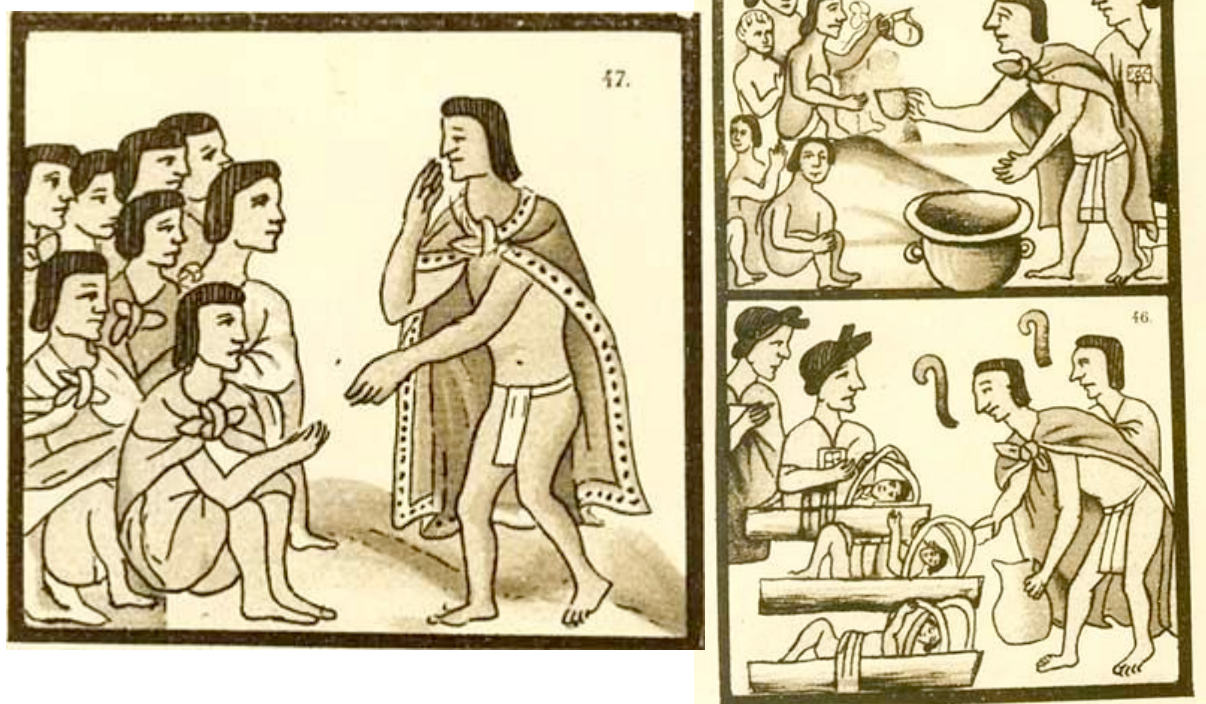


Figura 9.- Imagen Extraída de *Historia de las cosas de Nueva España Vol. 1*

En el Jardín Botánico de Madrid se conservan dos valiosos manuscritos sobre la flora mexicana y plantas de la Nueva España, que comprende los estudios hechos, de California a Costa Rica, por Martin de Sesse y Lacosta y José Mariano Mociño de 1789 a 1804, y la *Flora de Guatemala*. Alexander Hunboldt y Bonpland, Berlandier, Stephens, Spencer y otros naturalistas viajeros incluyeron en sus relatos valiosa información sobre plantas medicinales y su utilidad. Sin embargo, este tipo de información debe aceptarse con precaución, pues por diversas razones la descripción de dichas plantas es incompleta o está deformada y su empleo es muy genérico; el diagnostico de la enfermedad para la que es útil era incorrecto o muy general.

De aquí que la identificación correcta de una planta, determinación de su localización y verificación de su utilidad sea una valiosa aportación de biólogos y médicos. Con estos propósitos, en 1889 se creó en México un Instituto Medico Nacional, el cual trabajó hasta 1915 sobre las plantas medicinales utilizadas tradicionalmente por los indígenas. Los resultados se publicaron, primero en los once tomos de *La Naturaleza* (1889-1911); en los cuatro de *El Estudio* (1889-1894), publicación que cambió su nombre por *Anales del Instituto Medico Nacional* (1894-1913). Un resumen de estas investigaciones, se publicó con el título de *Datos para la materia médica mexicana*. La Farmacopea Mexicana, también menciona muchos de los resultados obtenidos en el Instituto Medico Nacional.

Métodos de Investigación Fotoquímica, Xorge A. Dominguez.

El Manuscrito o Códice Badiano dedicado a plantas medicinales mexicanas fue escrito por un indio xochimilca y traducido al latín. Colombia tiene un texto clásico: El Arcano de la Quina y La Flora de Santa Fe, redactado a finales del siglo XVIII. Para esa misma época, Perú y Chile disponen de un tratado sobre la coca y quinología. De la flora venezolana hay varias obras clásicas pero la más famosa es la de Henry Pittier (1926) que describe las plantas de acuerdo a su clasificación botánica y a su uso. En 1962 Blohm reseña las plantas venenosas de Venezuela y L. Schnee. de la Facultad de Agronomía, UCV, presenta un tratado de plantas comunes en Venezuela, su ubicación y descripción taxonómica (la tercera edición es de 1984).

Fitoquímica Orgánica, Deanna de Marcano y Masahisa Hasegawa.



Figura 10.- Imagen extraída de *Códice Badiano*

Familia Lamiaceae

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

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



Figura 11.- Ejemplar Familia Lamiaceae

Genero *Salvia*

El género *Salvia* es el más grande en la familia, denominadas comúnmente salvias. Una de las especies más reconocidas es *Salvia officinalis*, que es de gran interés por sus propiedades curativas como desinfectante y febrífugo. *Salvia*, representa cerca sobre 900 especies y se distribuye extensamente en varias regiones del mundo, como Sudáfrica, alrededor de toda América y Asia Sur-Oriental.

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

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

Estudios fitoquímicos de diferentes especies del genero *Salvia*, han proporcionado el aislamiento de compuestos interesantes, tales como: esteroides, flavonoides, derivados triterpénicos con esqueletos: lupano, oleanano, damarano y ursano así como algunos compuestos fenólicos. Pero los metabolitos secundarios más característicos y variados aislados de este género son diterpenos, habiéndose descrito dentro del mismo, más de 200 diterpenos de tipo abietano. Tales compuestos han sido aislados tanto de la parte aérea como de la raíz de plantas provenientes de los subgéneros de *Salvia*: *Audibertia*, *Jungia*, *Leonia*, *Salvia* y *Sclarea*, siendo estos 2 últimos los más ricos en metabolitos secundarios.

Muchas especies de este género han sido utilizadas en la medicina tradicional, y en la actualidad, su uso se extiende a la farmacología, la cosmética y a la conservación de alimentos. Algunas especies del género *Salvia* y concretamente *Salvia officinalis*, ha sido objeto de interés desde muy antiguo en el mundo occidental y su uso como planta medicinal se ha extendido hasta nuestros días. En este mismo sentido, pero referido al mundo oriental, merece especial mención *Salvia miltiorrhiza* Bunge.

Comúnmente este género es nativo de las regiones mediterráneas (**Figura12**), aunque se ha extendido a muchas otras partes del mundo. Muestra preferencia por los terrenos pocos productivos y fértiles, encontrándose en lugares rocosos y herbazales secos, desde el nivel de mar, hasta las zonas montañosas.

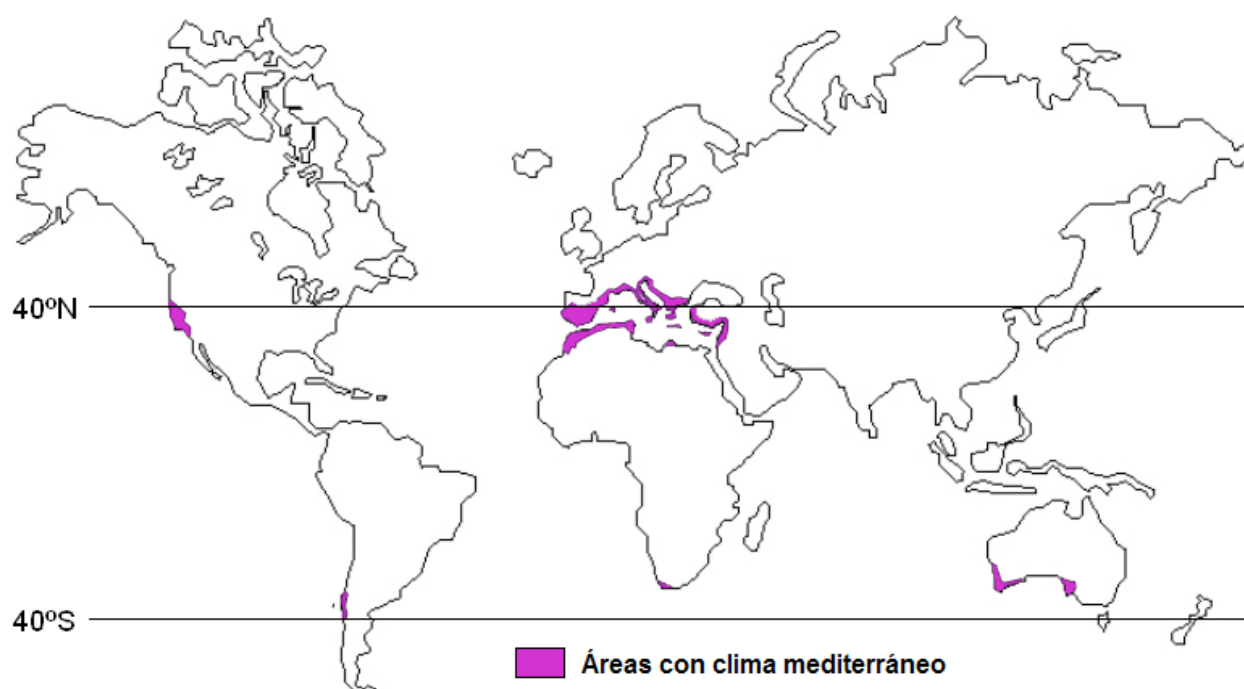


Figura 12.- Distribución del clima mediterráneo en el mundo

Etnobotánica en Baja California

Existe muy poca información específica para el área de Baja California, porque la mayoría de la informaron etnobotánica tuvo que ser extraída de trabajos de carácter antropológico, en los que el investigador al darse cuenta de la importancia del recurso vegetal en la cultura indígena, se vio obligado a incluir este tipo de observaciones.

Sin embargo, es indudable que los misioneros y exploradores fueron los primeros en asentar en sus diarios y bitácoras, los usos que los nativos le daban a la flora. En particular cabe citar la obra de Fray Luís de Sales (1960), *Noticia de la provincia de California 1794*, donde narra las experiencias de sus recorridos por el norte de la península, en especial aquellas derivadas de su convivencia con las bandas kamiai. La obra contiene notas etnobotánicas de los diferentes aspectos culturales del grupo, los que Sales describió con detalle.

Dentro del marco estricto de la etnobotánica, podemos citar a Roger Owen (1963), investigador que reporta un total de 67 plantas nativas de uso medicinal entre los indígenas pai pai, además de los métodos de preparación. Otra referencia importante es la de Leanne Hinton (1975), donde la autora completa su investigación lingüística en la comunidad cochimí de la Huerta, Baja California con la colecta e identificación de las plantas de uso más común. Incluye familias, géneros y especies de 46 plantas, así como su respectivo uso y preparación.

También podemos citar el trabajo que Judith Joel (1976), llevo a cabo en Santa Catarina, en el cual se incluyen datos sobre la preparación de los alimentos más tradicionales de los indígenas pai pai; los atoles de bellota y piñón, así como algunas observaciones sobre la temporada y modo de recolección de los mismos.

Estudio Comparativo de los Grupos Indígenas Kamiai y Pa Ipai del Norte de Baja California, Tesis profesional, Edna Alicia Corte Rodríguez.

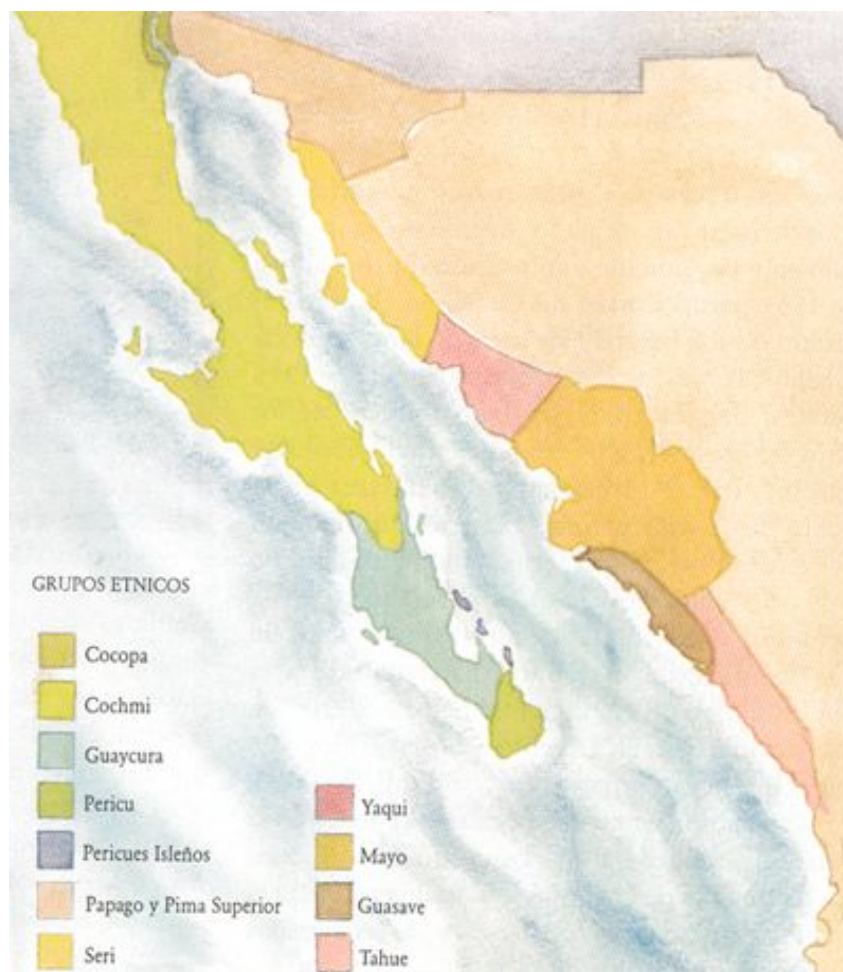


Figura 13.- Distribución de Grupos Étnicos en la Península de Baja California

Flora de Baja California

La Península de Baja California se encuentra ocupada por comunidades vegetales de características áridas y semiáridas. La mayor parte de su superficie la ocupan diferentes subregiones del Desierto Sonorense; dentro de la península, esta región fitogeográfica alberga unas 2000 especies de vegetales superiores. La Reserva de la Biosfera El vizcaíno se encuentra ubicada en la parte media de la Península de Baja California, en el extremo norte del estado de Baja California Sur, formando parte del Desierto Sonorense. Se declaró reserva por decreto presidencial del 30 de noviembre de 1988 y se le considera la mayor área protegida en América Latina, pues comprende una superficie aproximada de 2540000 hectáreas. En el área que comprende la reserva se localizan dos subregiones del Desierto Sonorense de acuerdo con Shreve y Wiggins (1964) y Wiggins (1980): una es el Desierto de Vizcaíno y la otra es el Desierto de la Costa del Golfo. La primera ocupa casi 95% del área en referencia, mientras que el resto es una estrecha franja que se ubica en las estribaciones orientales de las serranías al este de la reserva, en el borde de la costa del Golfo de California.

Listados Florísticos de México, Reserva de la Biosfera de Vizcaíno Baja California Sur, José Luis León de la Luz.



Figura 14.- Imagen del Desierto Vizcaíno Baja California Sur

El bosque de coníferas en Baja California tiene elementos florísticos que merecen su consideración a cualquier nivel. Howell (1957 en Axelrod 1978) refiere que el noroeste de la península es una de las regiones con respecto a su riqueza florística. La flora de la península de Baja California cuenta con aproximadamente 3,100 taxa (especies, subespecies y variedades), incluidos en 155 familias botánicas. De manera particular, las plantas de la Sierra de San Pedro Mártir han sido recolectadas por diferentes botánicos, quienes han contribuido a conocer el componente florístico del bosque de coníferas (Nelson y Goldman 1905-1906 en Goldman 1916, Wiggins 1980, Moran y Thorne 1967-1986, Delgadillo 1981-2002, Rebman 1994-2002).

Passini et al. (1989) recolectaron en el interior del bosque y reportaron 154 táxones, repartidos en 85 géneros y 44 familias. Por otra parte, Minnich y Franco-Vizcaíno (1997) refieren la presencia de 116 especies de plantas con flor en la pradera de Vallecitos, pero no hacen referencia a su colecta ni presentan un listado florístico. Moran y Thorne (1967-1986) recolectaron en la mayor parte de la zona boscosa de la Sierra y registrando 58 familias, 175 géneros y 331 taxa, de los cuales 29 fueron variedades y 23 subespecies.

Delgadillo (1999) identificó para la Sierra de San Pedro Mártir, incluyendo la vegetación de chaparral de contacto, un total de 74 familias, 286 géneros y 735 taxa: 584 son especies y 251 con categorías infraespecíficas (subespecie y variedad). Las familias más numerosas fueron: Asteraceae, Poaceae, Fabaceae, Scrophulariaceae, Polygonaceae, Brassicaceae, Cyperaceae, Polemoniaceae y Lamiaceae.

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

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

Tabla 1.-Taxa San Pedro Mártir

Familias	Taxa	%
<i>Asteraceae</i>	83	14.3
<i>Poaceae</i>	66	11.3
<i>Fabaceae</i>	38	6.5
<i>Scrophulariaceae</i>	26	4.4
<i>Cyperaceae</i>	23	3.9
<i>Polygonaceae</i>	22	3.7
<i>Brassicaceae</i>	21	3.6
<i>Polemoniaceae</i>	21	3.6
<i>Lamiaceae</i>	15	2.5
<i>Polemoniaceae</i>	14	2.4
Total	329	56.7

El bosque de coníferas de la Sierra San Pedro Mártir, Baja California, José Delgadillo Rodríguez.

Regiones Climáticas en Baja California

La península de Baja California presenta dos grandes regiones climáticas: la primera, al Noroeste, con un clima mediterráneo, con temperaturas templadas la mayor parte del año y lluvias en invierno; es en esta región donde se asienta la mayoría de la población; y la segunda, en la parte oriental, con un clima extremoso semiárido y escasas lluvias durante todo el año. Las dos regiones están divididas por las sierras La Rumorosa, Juárez y San Pedro Mártir.

En las costas del Golfo de California se presenta la menor incidencia de precipitación pluvial del país, con registros medios anuales cercanos a los 40 mm. La presencia de altitudes importantes, a lo largo de la cadena montañosa de Sierra de Juárez y San Pedro Mártir, ocasionan climas templados y semifríos, ambos subhúmedos en las cimas y mesetas altas.

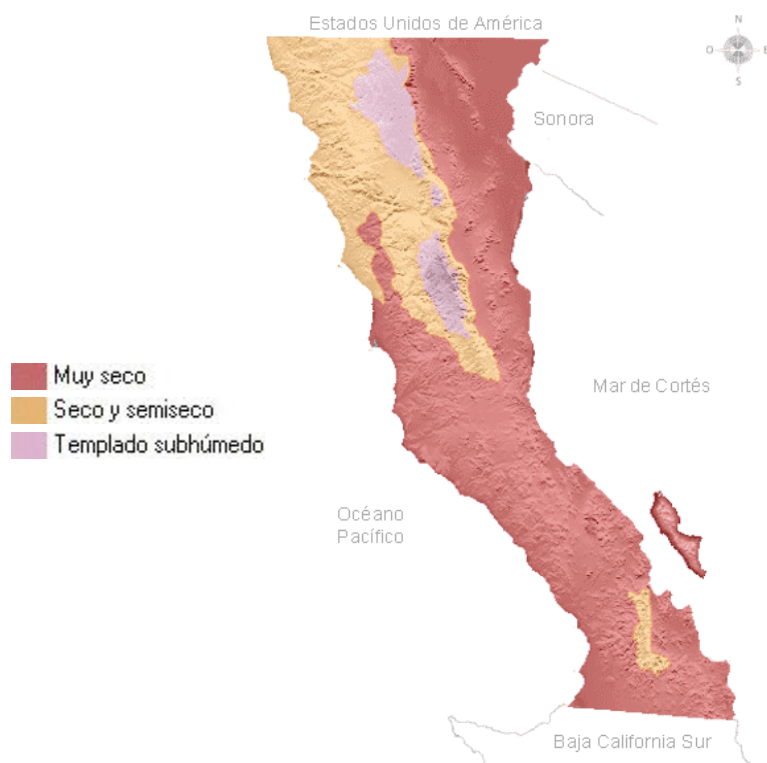


Figura 15.- Clima en Baja California

Salvias en Baja California

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

Fray Pedro Font el Diario Íntimo, Julio Cesar Montané.

Otras de las *Salvias* que podemos encontrar en Baja California son *leucophylla*, *chionocephala*, *clevelandii* entre otras. Las cuales pertenecen a la vegetación de tipo chaparral de la serie del chamizo encontradas en el norte de Baja California entre los límites con los bosques de coníferas y el matorral costero de la costa del pacífico de esta península mexicana.

Salvia clevelandii (**Figura 16**) es un arbusto de hoja perenne con flores de lavanda en azul. Es endémica de colinas secas del condado de San Diego y San Antonio de las Minas, Ensenada, Baja California. Las hojas gris-verdes tienen intenso aroma.

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



Figura 16.- Salvia Clevelandii

The New Book of Salvias: Sages for Every Garden, Betsy Clebsch.

Evolución de la Química de Productos Naturales

Hasta los comienzos del siglo XIX los compuestos orgánicos eran considerados como productos propios de los organismos vivos, que contaban con una “fuerza vital” para su formación. La síntesis de la urea por Wöhler (1828) marco el comienzo de la química sintética y ello condujo a la conjugación de química orgánica y productos naturales. De hecho, se desarrollo toda una química de productos naturales que ha pasado por diferentes etapas:

1. Utilización de las plantas enteras o parte de ellas en pócimas curativas y/o religiosas.
2. Tratamiento, cocción, maceración y mezclado para ciertas acciones específicas, lo que implica conocimiento acerca del uso de las especies y su aprovechamiento (alteración de su acción).
3. Extracción de los productos causantes de la acción. Aunque esto es con frecuencia, la justificación principal de la mayoría de los trabajos fitoquímicos, por razones de complejidad no se alcanza muchas veces, lográndose solamente en el mejor de los casos, aislar el (o los) componente(s) principal(es), que no necesariamente son los causantes de la acción en cuestión, e investigar su estructura, sus características espectroscópicas y su actividad biológica.
4. Determinación estructural. modificación de las estructuras y síntesis.
5. Estudio de la relación estructura química - actividad biológica y farmacológica, utilizando cada *día* más el método computacional.
6. Productos naturales con relación a otras disciplinas, por ejemplo, quimiotaxonomía, ecología química, biotecnología. etc.

Las fuentes de los metabolitos secundarios son plantas superiores silvestres o cultivadas, plantas inferiores, microorganismos, animales (insectos, principalmente) y desde hace un tiempo han cobrado importancia los productos naturales de origen marino. Los últimos dos casos son consecuencia del agotamiento de fuentes terrestres de fácil acceso y/o del interés por un campo menos explotado.

Los métodos químicos para la determinación de las estructuras han sido engorrosos y requieren de cantidades apreciables. La prueba final para la asignación de una estructura era su síntesis total. En consecuencia, la química orgánica ha tenido nuevos impulsos a medida que las estructuras se hacían más y más complejas y la disponibilidad de los compuestos era menor.

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

Fitoquímica Orgánica, Deanna de Marcano y Masahisa Hasegawa.



Figura 17.- Equipo de resonancia magnética nuclear

Aislamiento de Metabolitos de Salvias

Estudios fitoquímicos de diferentes especies del genero *Salvia*, han proporcionado el aislamiento de compuestos interesantes, tales como: esteroides, flavonoides, derivados triterpénicos con esqueletos: lupano, oleanano, damarano y ursano así como algunos compuestos fenólicos. Pero los metabolitos secundarios más característicos y variados aislados de este género son diterpenos, habiéndose descrito dentro del mismo, más de 200 diterpenos de tipo abietano. Tales compuestos han sido aislados tanto de la parte aérea como de la raíz de plantas provenientes de los subgéneros de *Salvia*: *Audibertia*, *Jungia*, *Leonia*, *Salvia* y *Sclarea*, siendo estos 2 últimos los más ricos en metabolitos secundarios.

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

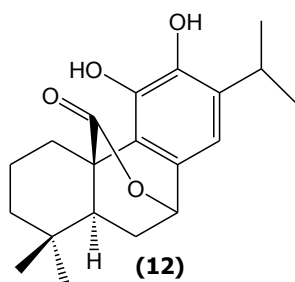


Figura 18.-Carnosol

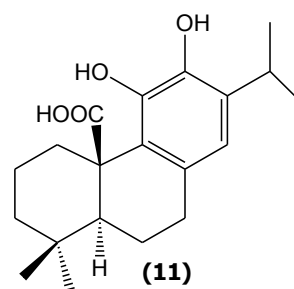


Figura 19.-Ácido carnósico

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

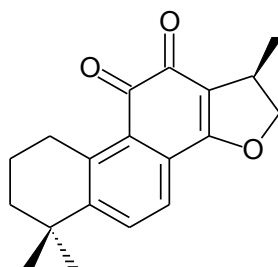


Figura 20.- Criptotanshinona

Recolección de Material Vegetal

La parte aérea de *Salvia clevelandii* fue recolectada el 5 de julio de 2010 por el Dr. José Delgadillo Rodríguez, en San Antonio de las Minas, Ensenada, Baja California en la vegetación matorral chaparral. Su *voucher specimen* se identificó en el herbario BCMEX de la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Baja California campus Ensenada, como BCMEX8715.



Figura 21.-Localización de San Antonio de las Minas, Ensenada, B.C

Tratamiento de Material Vegetal

La planta fue secada a temperatura ambiente en bolsas de papel para evitar la retención de la humedad. Una vez seca, se cortó en trozos de 1-2 cm de largo, con tijeras de jardinería.



Figura 22.-*Salvia clevelandii* cortada

Generación del Extracto

Se pesó 1 Kg de *Salvia clevelandii* seca y cortada, y se maceró en etanol. Se hicieron un total de tres maceraciones a partir del 27 de octubre del 2010 y finalizaron el 1 de diciembre de 2010, la primera con una duración de 5 días utilizando 6.5 L de etanol, la segunda maceración tuvo una duración de 8 días y se utilizó el etanol recuperado de la rotaevaporación de la primera maceración, más una cantidad de etanol nuevo, la tercera maceración tuvo una duración de 6 días y se utilizó el etanol recuperado de la rotaevaporación de la segunda maceración mas una cantidad de etanol nuevo. Después de la maceración se rotaevaporó el etanol obteniendo así el extracto crudo, del cual se obtuvieron 93.77g

Fraccionamiento del Extracto Crudo

Se comenzó el fraccionamiento del extracto crudo con cromatografía de columna (flash chromatography), utilizando sílica gel como fase estacionaria. La columna que se utilizó fue de 8 cm de diámetro la cual se empacó con de 47 cm de altura de sílica gel, posteriormente se adicionó 8 cm de sílica gel impregnada del extracto (cabeza), esta columna se etiquetó como C1 (**Figura 23**). Se utilizaron mezclas a diferente concentración de hexano y DCM para la elución del gradiente y para el gradiente mezclas a diferente concentración de hexano y acetato de etilo, finalmente se añadieron mezclas de hexano y etanol.

El monitoreo de la columna se hizo por cromatografía de capa fina de sílica gel, con una fase móvil de hexano/acetato de etilo al 30%. Las placas se observaron bajo luz UV y posteriormente fueron reveladas con óleo. De esta columna resultaron 130 fracciones divididas en 10 reuniones, las cuales fueron sometidas a pruebas de actividad antioxidante, mediante el método de decoloración oxidativa del β -caroteno.

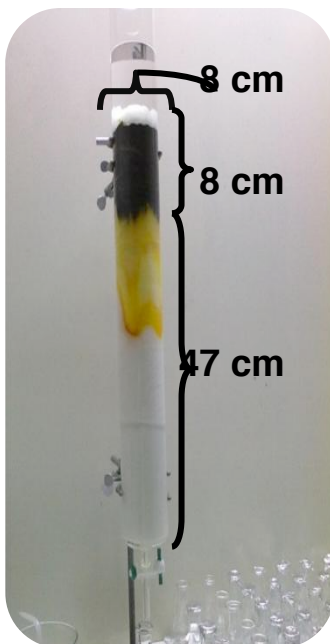


Figura 23.- Columna C1

Tabla 2.- Disolventes utilizados en C1

Disolvente	Concentración	Volumen
Hexano	100%	2500 mL
Hexano / DCM	5%	200 mL
Hexano / DCM	10%	200 mL
Hexano / DCM	15%	200 mL
Hexano / DCM	20%	200 mL
Hexano / DCM	25%	200 mL
Hexano / DCM	30%	200 mL
Hexano / DCM	35%	200 mL
Hexano / DCM	40%	200 mL
Hexano / DCM	45%	200 mL
Hexano / DCM	50%	200 mL
Hexano / DCM	55%	200 mL
Hexano / DCM	60%	200 mL
Hexano / DCM	65%	200 mL
Hexano / DCM	70%	200 mL
Hexano / DCM	75%	200 mL
Hexano / DCM	80%	200 mL
Hexano / DCM	85%	200 mL
Hexano / DCM	90%	200 mL
Disolvente	Concentración	Volumen

DCM	100%	200 mL
Hexano/ AcOEt	5%	200 mL
Hexano/ AcOEt	10%	200 mL
Hexano/ AcOEt	15%	200 mL
Hexano/ AcOEt	20%	200 mL
Hexano/ AcOEt	25%	200 mL
Hexano/ AcOEt	30%	200 mL
Hexano/ AcOEt	35%	200 mL
Hexano/ AcOEt	40%	200 mL
Hexano/ AcOEt	45%	200 mL
Hexano/ AcOEt	50%	200 mL
Hexano/ AcOEt	55%	200 mL
Hexano/ AcOEt	60%	200 mL
Hexano/ AcOEt	65%	200 mL
Hexano/ AcOEt	70%	200 mL
Hexano/ AcOEt	75%	200 mL
Hexano/ AcOEt	80%	200 mL
Hexano/ AcOEt	85%	200 mL
Hexano/ AcOEt	90%	200 mL

Disolvente	Concentración	Volumen
Hexano/ AcOEt	95%	200 mL
AcOEt	100%	200 mL
Hexano/ EtOH	145:5	150 mL
Hexano/ EtOH	140:10	150 mL
Hexano/ EtOH	135:15	150 mL
Hexano/ EtOH	130:20	150 mL
Hexano/ EtOH	125:25	150 mL
Hexano/ EtOH	120:30	150 mL
Hexano/ EtOH	110:40	150 mL
Hexano/ EtOH	100:50	150 mL
Hexano/ EtOH	90:60	150 mL
Hexano/ EtOH	80:70	150 mL
Hexano/ EtOH	60:90	150 mL
Hexano/ EtOH	50:100	150 mL
Hexano/ EtOH	35:115	150 mL
Hexano/ EtOH	20:130	150 mL
Hexano/ EtOH	5:145	150 mL
EtOH	100%	150 mL
MeOH	100%	200 mL

Tabla 3.- Fracciones Resultantes de C1

Columna C1	
Reunión	Peso de reunión (g)
R1C1	0.9347
R2C1	0.7699
R3C1	12.036
R4C1	6.8878
R5C1	6
R6C1	8.68
R7C1	6.55
R8C1	4.8
R9C1	1.2319
R10C1	19.7

Fraccionamiento de R5C1

La reunión R5C1 presentó la mayor actividad antioxidante por el método de decoloración oxidativa del β -caroteno. Se fraccionó por cromatografía utilizando una columna de sephadex tipo LH-20 con la finalidad de remover las clorofilas del extracto. La columna tenía una altura de 28 cm y 4 cm de diámetro y fue etiquetada como C2 (**figura 24**). Como fase móvil se utilizó una mezcla estabilizadora de hexano, metanol y cloroformo en relación 2:1:1. El monitoreo de la columna se llevó a cabo con cromatografía de capa fina de sílica gel, utilizando como fase móvil hexano/acetato de etilo al 35%, como revelador se empleo luz UV y óleum. De C2 resultaron 27 fracciones divididas en 3 reuniones.

Las columnas sephadex separan los compuestos por peso molecular, en la primera reunión se obtuvieron los compuestos con mayor peso molecular entre ellos las clorofilas. Esta información se corroboró en el monitoreo de cromatografía de capa fina por lo cual la R1C2 se descartó. En R2C2 se encontró una mezcla de restantes de clorofilas y compuestos de interés. R3C2 quedo libre de clorofilas.

Tabla 4 .- Fracciones Resultantes de C2

Columna C2	
Reunión	Peso de reunión (g.)
R1C2	2.3981
R2C2	2.4901
R3C2	3.243



Figura 24.- Columna C2

Fraccionamiento de R2C2

Para el fraccionamiento de R2C2, se empleó cromatografía de columna sephadex que tuvo una altura de 25 cm y 2 cm de diámetro. Esta columna se etiquetó como C3. Se utilizó una mezcla estabilizadora de hexano, metanol y cloroformo en relación 2:1:1 como fase móvil. El monitoreo de la columna se llevó a cabo con cromatografía de capa fina de sílica gel, utilizando como fase móvil hexano/acetato de etilo al 35%, como revelador se empleo luz UV y óleum.

Se obtuvieron 16 fracciones las cuales se dividieron en 3 reuniones. En la primera reunión de esta columna (R1C3) obtuvimos las clorofilas restantes de R2C2, por lo cual fue descartada y se unió con R1C2. La segunda reunión de esta columna (R2C3) se obtuvo una mezcla de clorofilas y una cantidad minoritaria de compuestos de interés, por lo cual se descartó, sin embargo esta no se unió a R1C2 y R1C3, que como mencionamos anteriormente son únicamente clorofilas, la tercera reunión (R3C3) se observaron compuestos de interés libres de clorofilas por lo cual se sumó a la reunión R3C2.

Tabla 5.- Fracciones resultantes de C3

Columna C3	
Reunión	Peso de reunión (g.)
R1C3	0.0149
R2C3	0.3621
R3C3	1.9451

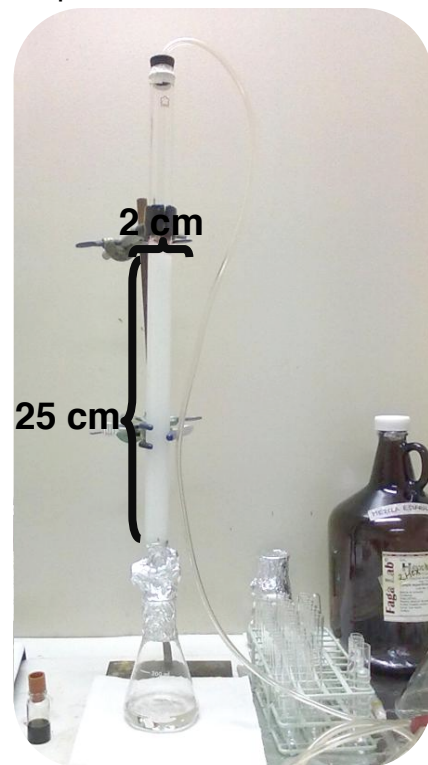


Figura 25.- Columna C3

Fraccionamiento de R3C2 y R3C3

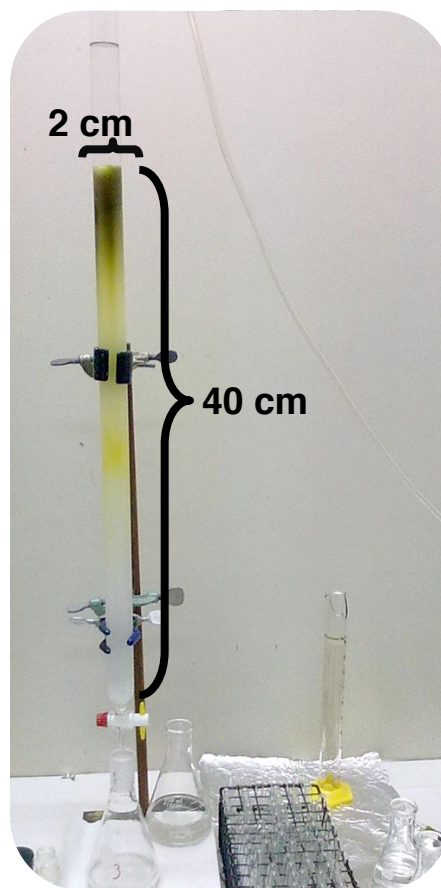
El fraccionamiento de la unión de R3C2 y R2C3 se llevó a cabo por cromatografía de columna sílica gel con una altura de 40 cm y 2 cm de diámetro. Esta columna fue etiquetada como C4. Tuvo como fase móvil de hexano/acetato de etilo a diferentes concentraciones y metanol. La columna fue monitoreada por cromatografía de capa fina de sílica gel, utilizando como fase móvil hexano/acetato de etilo al 35%, como revelador se empleó luz UV y óleo. En esta columna se obtuvieron 479 fracciones divididas en 16 reuniones.

Tabla 6.- Disolventes utilizados en C4

Disolvente	Concentración	Volumen
Hexano	100%	200 mL
Hexano / Acetato de etilo	2%	200 mL
Hexano / Acetato de etilo	5%	200 mL
Hexano / Acetato de etilo	10%	200 mL
Hexano / Acetato de etilo	20%	200 mL
Hexano / Acetato de etilo	30%	200 mL
Hexano / Acetato de etilo	40%	100 mL
Hexano / Acetato de etilo	50%	100 mL
Acetato de etilo	100%	100 mL
Metanol	100%	200 mL

Tabla 7.- Fracciones resultantes de C4

Columna C4	
Reunión	Peso de reunión (g)
R1C4	0.0431
R2C4	1.1217
R3C4	2.0297
R4C4	0.2972
R5C4	0.1915
R6C4	0.1669
R7C4	0.1183
R8C4	0.1893
R9C4	0.0192
R10C4	0.3233
R11C4	0.0496
R12C4	0.1271
R13C4	0.0767
R14C4	0.0773
R15C4	0.0883
R16C4	0.2468

**Figura 26.-** Columna C4

Separación de R2C4

Para la separación de R2C4 se empleó cromatografía preparativa de sílica gel, 20 cm x 20 cm. A esta preparativa se le etiquetó como PRE2. Se utilizaron 102 mg de R2C4 y 200mL una fase móvil de hexano/cloroformo/metanol en relación 8:1:1. De PRE2 resultaron 3 bandas visibles en UV, PRE2B3 fue el primer metabolito aislado.

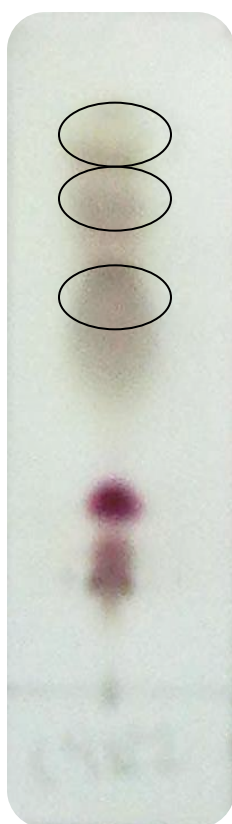


Figura 27.- CCP con óleo

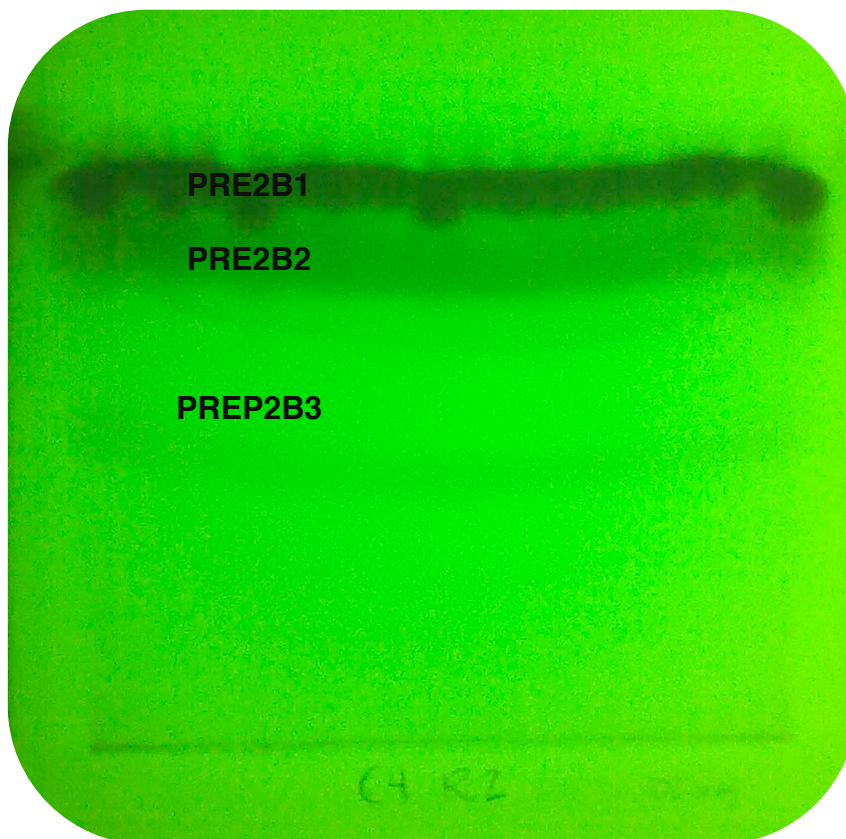


Figura 28.- CP en UV

Fraccionamiento de R3C4

Se seleccionó R3C4 debido a que fue la reunión más abundante de la columna anterior (C4). En el fraccionamiento se empleó cromatografía de columna sílica gel con una altura de 26 cm y 2 cm de diámetro (**figura 29**). A esta columna se le etiquetó como C5. Para la fase móvil se eligió una mezcla de hexano/acetato de etilo a diferentes concentraciones y por último se le realizó un lavado con metanol (**tabla 8**). La columna fue monitoreada por cromatografía de capa fina de sílica gel, utilizando como fase móvil hexano/acetato de etilo al 30%, como revelador se empleo luz UV y óleum. Se obtuvieron 149 fracciones divididas en 5 reuniones (**tabla 9**).

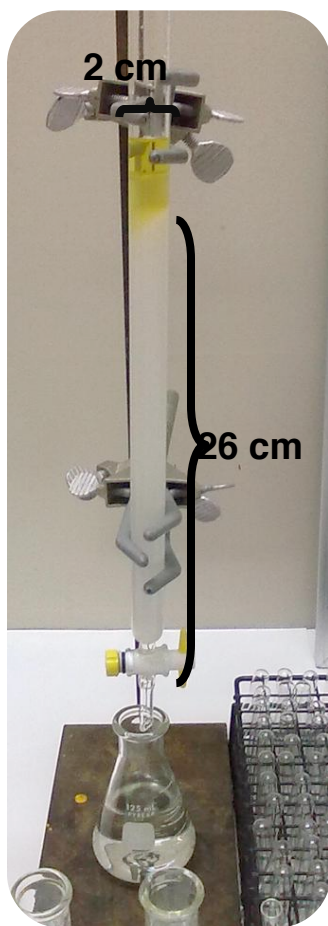


Figura 29.- Columna C5

Tabla 8.- Disolventes utilizados en C5

Disolvente	Concentración	Volumen
Hexano	100%	100 mL
Hexano / Acetato de etilo	2%	200 mL
Hexano / Acetato de etilo	5%	100 mL
Hexano / Acetato de etilo	8%	100 mL
Hexano / Acetato de etilo	10%	100mL
Hexano / Acetato de etilo	12%	100 mL
Hexano / Acetato de etilo	15%	100 mL
Hexano / Acetato de etilo	20%	100 mL
Hexano / Acetato de etilo	50%	100 mL
Acetato de etilo	100%	100 mL
Metanol	100%	50mL

Tabla 9.- Fracciones resultantes de C5

Columna C5	
Reunión	Peso de reunión (g)
R1C5	1.757
R2C5	0.076
R3C5	0.779
R4C5	0.1581
R5C5	0.1397

Fraccionamiento de R1C5

Se seleccionó R1C5 debido a que fue la reunión más abundante de la columna anterior (C5). Para el fraccionamiento se empleó cromatografía de columna sílica gel con una altura de 24 cm y 2 cm de diámetro (**figura 30**). A esta columna se le etiquetó como C6. Para la fase móvil se eligió una mezcla ternaria de hexano/cloroformo/metanol, en relación 90:5:5 y por último lavados con metanol. La columna fue monitoreada por cromatografía de capa fina de sílica gel, utilizando como fase móvil hexano/cloroformo/metanol, en relación 90:5:5, como revelador se empleo luz UV y óleum. Se obtuvieron 83 fracciones divididas en 3 reuniones.

Tabla 10.- Fracciones resultantes de C6

Columna C6	
Reunión	Peso de reunión (g)
R1C6	0.024
R2C6	1.5032
R3C6	0.208

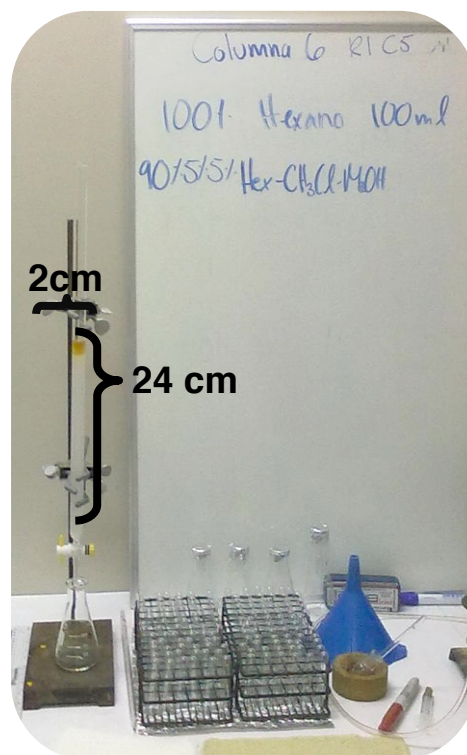


Figura 30.- Columna C6

Fraccionamiento de R2C6

Se seleccionó R2C6 debido a que fue la reunión más abundante de la columna C6. Para el fraccionamiento se empleó cromatografía de columna sílica gel con una altura de 33.5 cm y 2 cm de diámetro (**figura 31**). A esta columna se le etiquetó como C8. Para la fase móvil se eligió una mezcla de hexano/acetato de etilo a diferentes concentraciones y por último lavados con metanol. La columna fue monitoreada por cromatografía de capa fina de sílica gel, utilizando como fase móvil hexano/acetato de etilo al 6%, como revelador se empleo luz UV y óleum. Se obtuvieron 137 fracciones divididas en 5 reuniones, de las cuales R5C8 resulto ser el segundo metabolito aislado.

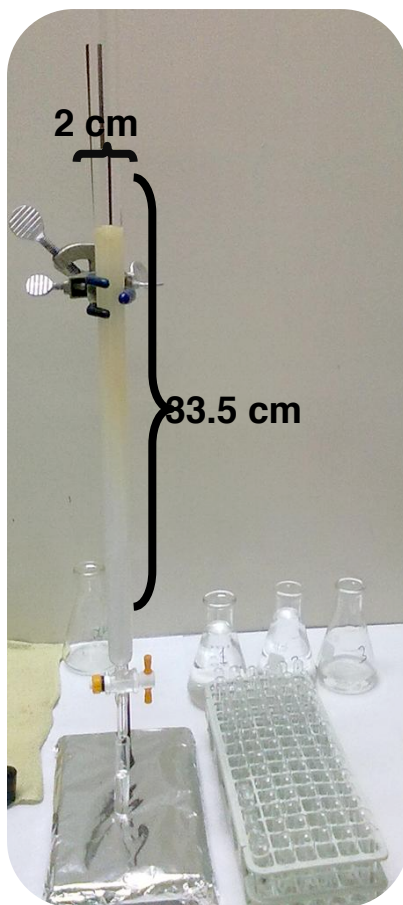


Figura 31.- Columna C8

Tabla 11.- Disolventes utilizados en C8

Disolvente	Concentración	Volumen
Hexano	100%	250 mL
Hexano / Acetato de etilo	3%	250 mL
Hexano / Acetato de etilo	6%	100 mL
Hexano / Acetato de etilo	50%	100 mL
Acetato de etilo	100%	50 mL

Tabla 12.- Fracciones resultantes de C8

Columna C8	
Reunión	Peso de reunión (g)
R1C8	0.1352
R2C8	0.850
R3C8	0.385
R4C8	0.0123
R5C8	0.0372

Separación de R8C4

La separación de R8C4 se llevó a cabo mediante cromatografía preparativa sílica gel, 20 cm x 20 cm. A esta preparativa se le etiquetó como PRE3. Se utilizaron 103 mg de R8C4 y 200mL de fase móvil con doble recorrido de 2,2,4-trimetilpentano/cloroformo/acetato de etilo en relación 8:1:1. De PRE3 resultaron 8 bandas visibles en UV, PRE3B8 fue un ftalato aislado.



Figura 32.- CCP de R8C4 con óleo

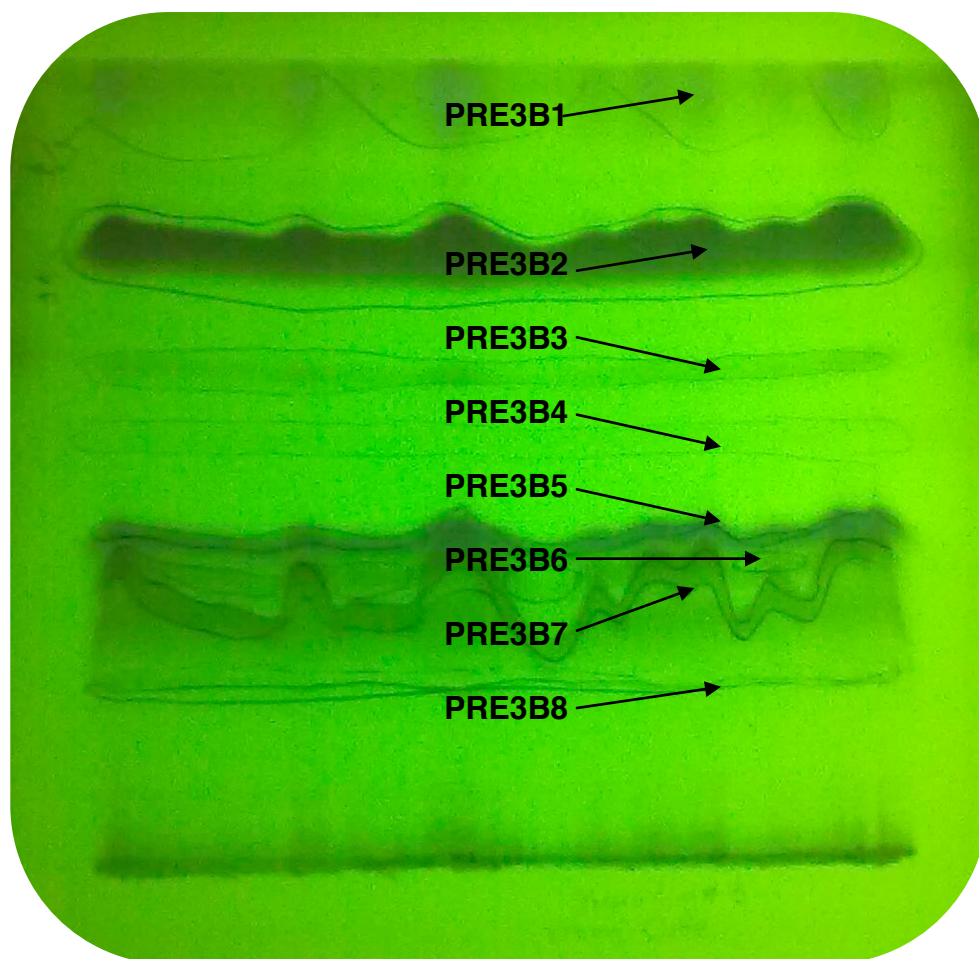


Figura 33.- CP de R8C4 en UV

Los Radicales Libres

El átomo es la partícula más pequeña de la materia que conserva sus propiedades químicas, el cual está formado por un núcleo (protones y neutrones) y por orbitales (electrones). En los átomos las orbitas de los electrones están ocupadas por pares de electrones que se desplazan en direcciones opuestas para poder equilibrar sus momentos angulares. Se concideran radicales libres a aquellas moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo lo cual los hace altamente inestables (Rodríguez Perón, **2001**).

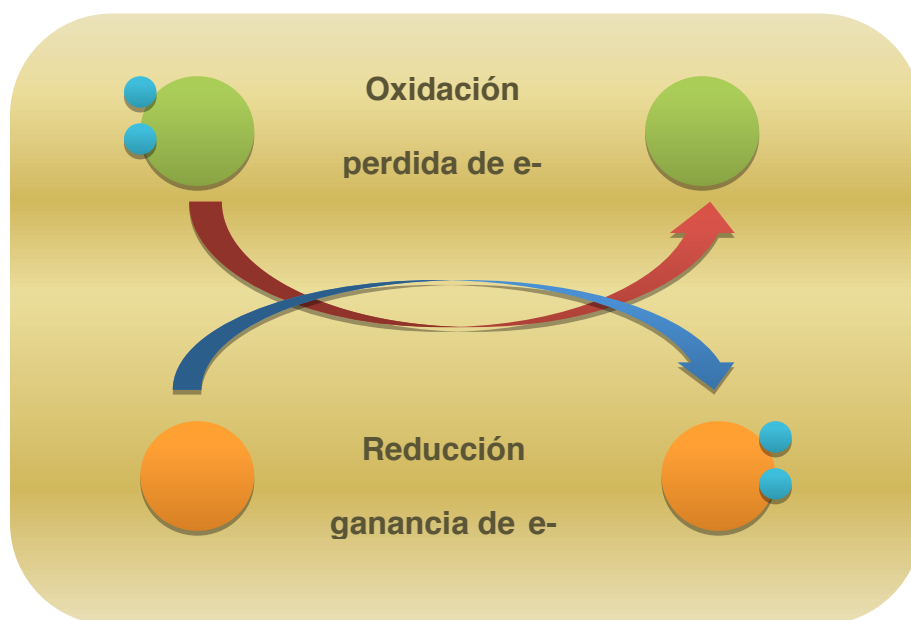


Figura 34.- Oxidación-Reducción

El cuerpo emplea antioxidantes para reducir a los radicales libres y el daño que estos pueden causar. Estos tienen la capacidad de neutralizar radicales libres sin perder su estabilidad. El organismo, en sus funciones habituales, como la respiración o la digestión, genera radicales libres. Pero además estamos expuestos a agentes externos que también los producen, como la contaminación o algunos productos químicos que contienen el agua o los alimentos.

Entre los antioxidantes endógenos se encuentran las enzimas superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa las cuales nos protegen de los radicales libres que nosotros producimos, pero al haber una producción exagerada de estos, los antioxidantes endógenos nos son insuficientes y es necesario recurrir a otro tipo de ayuda. Estos son los antioxidantes exógenos los cuales consumimos en los alimentos como la vitamina C, Vitamina E, β -caroteno, compuestos polifenólicos entre otros.

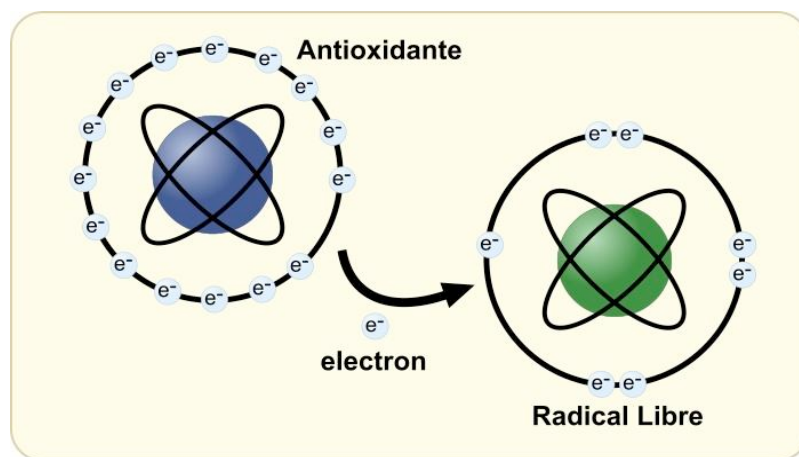


Figura 35.- Neutralización de Radical Libre

Las investigaciones en este campo han determinado, sin lugar a dudas, que la sobreabundancia de radicales libres en relación a la cantidad de antioxidantes desempeña un papel fundamental en el desarrollo de enfermedades relacionadas con la edad y en el proceso de envejecimiento. En otras palabras, cuando existen más radicales libres de los que el organismo puede manejar, envejecemos con mayor rapidez y enfermamos en este proceso.

Efecto de los radicales libres en las proteínas

Una proteína es una biomolécula formada por una o más cadenas de polipéptidos éstos a su vez están constituidos por aminoácidos en una secuencia específica. El orden de los aminoácidos en cada proteína es determinado por información genética codificada en el ADN de cada célula. Las proteínas tienen varias funciones en el organismo: estructural, catalítica, de defensa inmunitaria, regulatoria y pueden en algunos casos, cuando la ingesta de carbohidratos es insuficiente, pueden ser utilizados como fuente de energía.

El ataque de los radicales libres puede alterar la estructura terciaria o cuaternaria de las proteínas, lo que puede disminuir o anular sus funciones en el organismo. Por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer se asocia a la oxidación de las proteínas causando un deterioro crónico en las conexiones neuronales. De la misma manera, el envejecimiento externo es adjudicado a las reacciones de los radicales libres sobre las proteínas y las grasas en la piel.

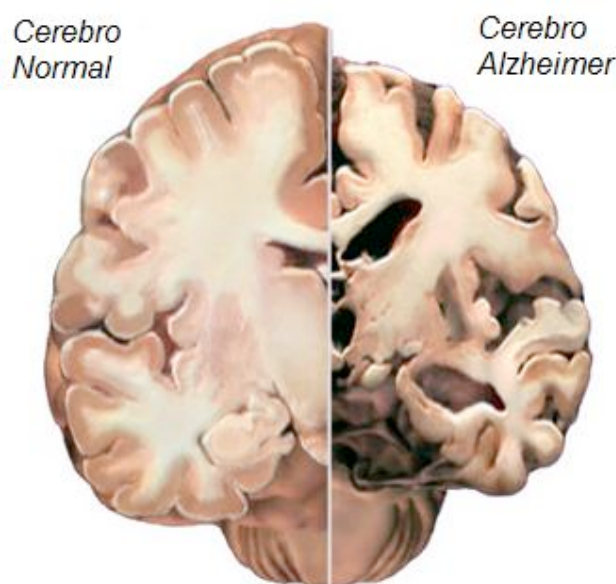


Figura 36.- Muerte Neuronal por Alzheimer

Efecto de los radicales libres en lípidos

Las membranas de todas las células y las envolturas que rodean a las células nerviosas están compuestas de lípidos. Los lípidos, especialmente los poliinsaturados resultan altamente vulnerables al ataque de la oxidación. Por ello, si los lípidos de estas membranas han sufrido oxidación, la selectividad a nutrientes y sustancias de desecho se pierde y el equilibrio en las células se pierde. En una escala mayor, el daño acumulado proveniente de la oxidación de las membranas acelera el envejecimiento del organismo.

En la actualidad, las enfermedades cardiovasculares son la causa más frecuente de muerte en el mundo. Las lipoproteínas son las moléculas encargadas del transporte de triglicéridos y colesterol en el organismo. Los niveles altos de triacilglicérols, aunados a diferentes factores como la función defectuosa de las células endoteliales y varios factores del proceso de inflamación, desempeñan un papel clave en la aterogénesis, enfermedad que puede provocar trastornos aún más graves como infarto agudo al miocardio o enfermedad vascular periférica.

El desarrollo de la arterosclerosis se inicia con un mal funcionamiento de las células endoteliales que forman las paredes de las arterias causado por diferentes factores como exceso de lipoproteínas, hipertensión, diabetes o sustancias tóxicas provenientes del ambiente.

El endotelio pierde su propiedad antitrombótica y se hace más permeable a las lipoproteínas. Se producen moléculas de adhesión llamadas selectinas, que promueven la adhesión de linfocitos T y monocitos. Éstos últimos se transforman en macrófagos residentes productores de especies de oxígeno reactivo que oxidan a las lipoproteínas de baja densidad LDL.

En el plasma las LDL se encuentran protegidas de la oxidación por sustancias como la vitamina E, C, y el β -caroteno, sin embargo, la oxidación es más probable cuando entran al espacio extracelular debido a dos factores: la concentración de sustancias antioxidantes es muy baja y enzimas como las lipoxigenasas, mieloperoxidasas y NADPH oxidasas presentes en los macrófagos facilitan su oxidación. La apolipoproteína apoB100 oxidada interfiere en la concentración intracelular de colesterol en los macrófagos que captan las LDL oxidadas causando una sobrecaptación de lípidos. Al morir éstas células liberan lípidos en la íntima y se convierten en los centros de las placas ateroscleróticas.

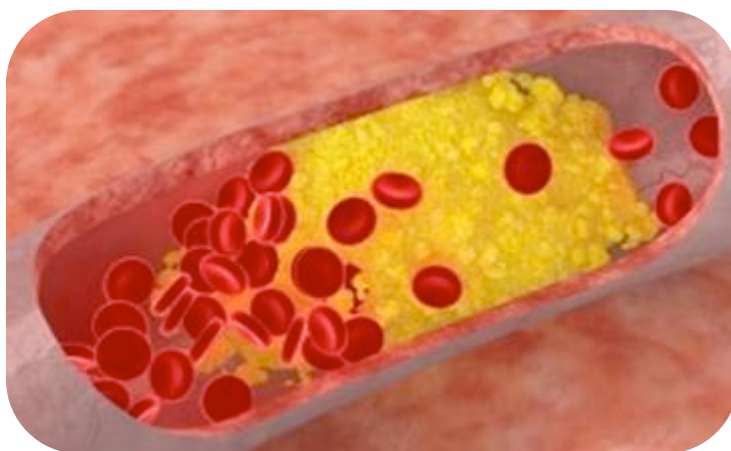


Figura 37.- Aterosclerosis

Efecto de los radicales libres en el ADN

Las instrucciones moleculares que dirigen la función de los organismos vivos están contenidas en el ADN. El ácido desoxirribonucleico permite transmitir información precisa de una generación a otra a través de los genes. La estructura química del ADN consiste en una serie específica de nucleótidos constituidos por un grupo fosfato, una desoxirribosa y una base que puede ser adenina, timina, guanina o citosina.

El código genético depende de una secuencia corta de 3 bases para codificar con 64 posibles combinaciones los 20 aminoácidos necesarios en el organismo. Cada secuencia (codón) codifica para un aminoácido en específico, existiendo varias posibilidades para cada uno.

En el proceso de replicación o transcripción del ADN las cadenas quedan expuestas a la acción de los radicales libres, causando mutaciones. Las mutaciones son el resultado de sustituciones, inserciones o deleciones de nucleótidos. El efecto de estos cambios se refleja en la síntesis de proteínas. En el mejor de los casos, las proteínas no pierden su función si el nuevo nucleótido no afecta en la codificación del aminoácido o el cambio afecta a la proteína en un sitio que no es importante para su función. Cuando el cambio de nucleótido provoca que la proteína pierda su estructura terciaria o cuaternaria o no se sintetiza completamente debido a la inserción de un codón de paro los resultados pueden ser la disminución o nulificación de su actividad.

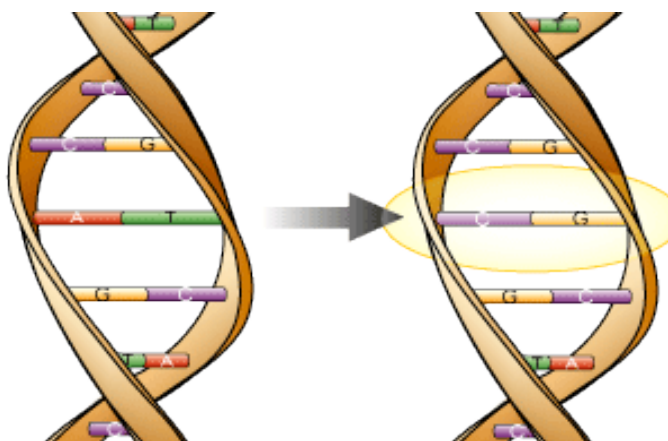


Figura 38.- Mutación en ADN

Estos cambios que pueden parecer insignificantes son los responsables del desarrollo de muchas enfermedades, entre ellas, el cáncer. Según la OMS, el cáncer es la principal causa de mortalidad a nivel mundial.

Hay tipos de cáncer con distintos mecanismos, sin embargo las células cancerosas comparten ciertas características: se vuelven indiferenciadas y dejan de cumplir sus funciones fisiológicas, se reproducen a mayor velocidad que las células normales, no responden a señales del proceso de apoptosis y pueden migrar a través de los vasos linfáticos e invadir tejidos sanos en todo el organismo.

Se ha descubierto que los antioxidantes previenen las modificaciones oxidativas del ADN que inician el cáncer. Asimismo, estas sustancias ayudan a hacer más lenta la progresión de esta enfermedad, ayudando al organismo a construir defensas que detengan o reviertan dicho crecimiento.

Antioxidantes Naturales

La tradición de la medicina herbal se remonta tan lejos como la propia historia de la humanidad. Actualmente representa una gran fuente de conocimiento a explorar por la ciencia mediante el análisis de los principios activos de las plantas medicinales, destacando aquellos que presentan actividades biológicas como antimicrobiana, antiinflamatoria, citotóxica, antialimentaria, antioxidante, entre otras. Existen sustancias antioxidantes reconocidas por la comunidad científica, sin embargo muchos de los principios activos solo son reconocidos por la medicina popular. De ahí la importancia de llevar a cabo estudios sistematizados para aprovechar óptimamente sus propiedades.

Antioxidantes Naturales, Jack Challem, Melissa Block, Ediciones Nowtilus, 2008

Los antioxidantes naturales se clasifican de acuerdo a su fuente. Se denominan *endógenos* si son sintetizados por las células del organismo, por ejemplo las enzimas superóxido dismutasa, catalasa, glutatión, glutatión peroxidasa, entre otras. Se consideran importantes también los oligoelementos como Zn, Se, Mn, Fe, etc., que son necesarios en el núcleo activo de las enzimas antioxidantes. Se denominan antioxidantes *exógenos* si éstos se obtienen a través de los alimentos.

Entre los más estudiados se encuentran las Vitamina A, E y C, compuestos polifénolicos, taninos y los flavonoides, entre otros.

La vitamina A tiene una fuerte acción antioxidante que se reconoce especialmente por la neutralización del oxígeno singlete por un mecanismo de transferencia de energía del radical, formación de un triplete de vitamina A y posterior disipación de esta energía con la regeneración de la vitamina. Con respecto a los β -carotenos y carotenoides, la vitamina A es menos eficiente en su acción antioxidante por presentar menor cantidad de insaturaciones en su estructura. Se ha demostrado su capacidad para neutralizar peróxidos lipídicos (García JC: Monografía. Especies reactivas del oxígeno. 1998). Existen plantas como la *Daucus carota sativa* (zanahoria), la *Curcubita maxima D* (calabaza) y otros frutos coloreados que contienen β -carotenos, precursores de la vitamina A.

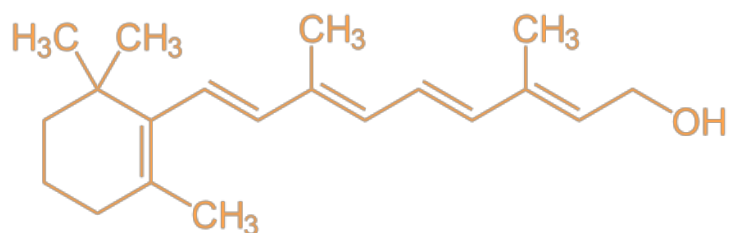


Figura 39.- Vitamina A

La vitamina E, también conocida como α -tocoferol, se denomina como antioxidante aunque su mecanismo molecular no está completamente esclarecido. Se considera un importante agente secuestrador de radicales peróxidos, oxígeno singlete y otras especies reactivas del oxígeno en las fases lipídicas biológicas como membranas y lipoproteínas, efecto considerado importante en determinados tejidos como el nervioso y muscular. Los aceites soya, algodón y maíz contienen vitamina E. Experimentos realizados en animales de laboratorio demuestran que los antioxidantes provenientes de la soya contribuyen a prevenir mutaciones celulares.

El aceite de la palma real contiene antioxidantes naturales como los tocoferoles, vitamina E y tocotrienoles que actúan como protectores contra el envejecimiento de las células.

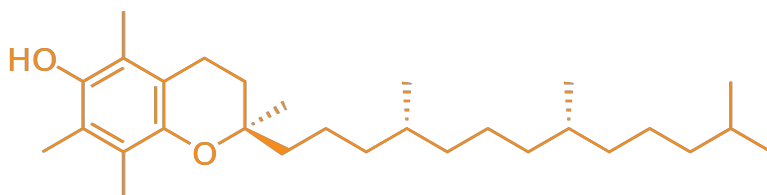


Figura 40.- Vitamina E

El ácido ascórbico (vitamina C) tiene un efecto mediado por la interacción directa con varias especies reactivas del oxígeno como el ozono y el óxido nítrico, éste neutraliza otras especies reactivas como el ácido hipocloroso y regenera la forma activa de otros antioxidantes directos. Además inhibe de forma directa la reacción de formación de especies reactivas del oxígeno mediada por el hierro de las ferroproteínas y el peróxido de hidrógeno. La guayaba tiene alto contenido de vitamina C (alrededor de 870 mg de ácido ascórbico en 100 cm³ de jugo fresco) y ésta se utiliza fundamentalmente en la cura de llagas. También existen otros cítricos como son naranja, toronja y otros que contienen vitamina C.

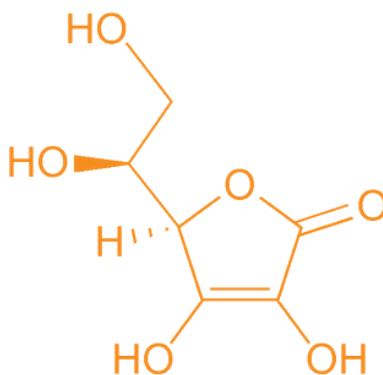


Figura 41.- Vitamina C

Los flavonoides son una familia muy diversa, sin embargo, se caracterizan por ser compuestos polifenólicos y ser solubles en agua. Hay cuatro tipos fundamentales de flavonoides que se derivan de los cuatro núcleos siguientes: flavona, isoflavona, flavonol y flavonona. Las geninas de los flavonoides naturales hasta ahora aislados de los vegetales son derivados con grupos -OH y -OCH₃, sustituidos generalmente en las posiciones 3, 5, 7, 3',4' y 5'. En los órganos vegetales están en forma de glucósidos, unidas a una o dos manosas, a una biosa, a una manosa y a una biosa o a una triosa. Los enlaces glucosídicos suelen estar en los -OH 3 y 7. En general el nombre de los glucósidos es caprichoso y elude a la especie botánica.

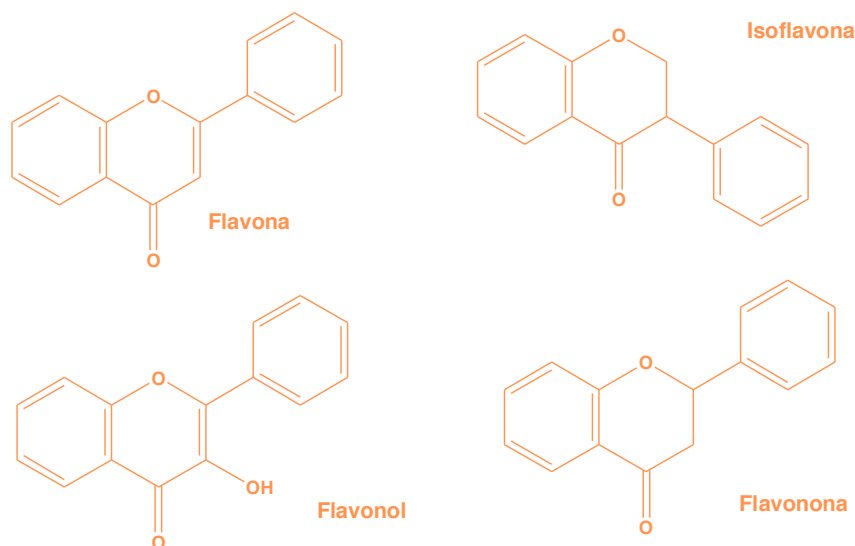


Figura 42.- Compuestos de familia flavonoides

La corteza de pino *Cubensis g.* contiene proantocianidinas oligoméricas, clase de flavonoide muy poderosa en su acción antioxidante; mantiene suave los tejidos conjuntivos y se le atribuyen propiedades antiinflamatorias y citotóxicas. Las semillas de uva *Vitis vinifera* L. contiene también proantocianidinas oligoméricas que tienen aplicaciones semejantes a la corteza de pino.

También el consumo regular de vino tinto y jugo de uvas con alto contenido de flavonoides, ayuda a disminuir el riesgo de enfermedades como la aterosclerosis coronaria y esto es atribuido a sus propiedades antioxidantes.

La uva negra contiene resveratrol para protegerse a sí misma de hongos, también contiene altos niveles de otros antioxidantes que evitan el deterioro del fruto. El resveratrol y los otros antioxidantes evitan el daño producido por el colesterol en las arterias.

Plantas con Propiedades Antioxidantes, Lic. Lourdes García Bacallao.

Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas son un conjunto de afecciones que tienen en común la pérdida de habilidades cognitivas y motoras, entre ellos el equilibrio, el movimiento, la memoria, el habla, la respiración y la función cardíaca, producida por el deterioro y muerte de las células del sistema nervioso. Entre ellas se encuentran el Alzheimer, enfermedad de Huntington, esclerosis lateral amiotrófica, atrofia muscular espinal y la enfermedad de Parkinson.

La enfermedad de Parkinson es una condición caracterizada por la destrucción de neuronas dopaminérgicas en la sustancia nigra pars compacta. Se caracteriza por la presencia de alteraciones motoras, como rigidez, temblor de reposo, alteración de los reflejos posturales alteraciones sensitivas, trastornos del sueño, alteraciones del ánimo y trastornos cognitivos, entre otros.

Algunos de estos trastornos están siendo tratados con inhibidores de la acetilcolinesterasa, utilizados también para tratar los síntomas de la enfermedad de Alzheimer. El mecanismo de acción de estos fármacos consiste en la inhibición de la acetilcolinesterasa, neurotransmisor encontrado en el sistema nervioso autónomo como modulador de la actividad sináptica. Al ser inhibida la enzima que la degrada, hay una mayor disponibilidad del neurotransmisor en las uniones neuromusculares.

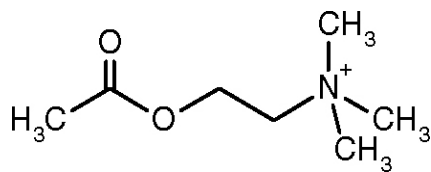


Figura 43.- Acetilcolina

Microorganismos patógenos

Los microorganismos son parte del equilibrio ecológico de la tierra. El cuerpo del ser humano sirve como albergue de bacterias y hongos, forman parte de la microbiota normal y desempeñan funciones importantes como la fijación de vitaminas y defensa contra otros microorganismos. Las infecciones ocurren cuando el sistema inmunológico del individuo está comprometido y no puede mantener un equilibrio contra la microbiota normal o cuando se expone el organismo a microorganismos patógenos.

Las enfermedades causadas por microorganismos son muy variadas y dependen del tipo de microorganismo que la provoque (bacterias, hongos, protozoarios, virus, etc.) y en que parte del organismo se aloja. La toma de muestra de fluidos biológicos juega un papel importante en el diagnóstico clínico. La identificación correcta del agente causal es crucial para el tratamiento que se recomienda.

Los antimicrobianos son sustancias de origen natural, sintético o semisintético que poseen acción tóxica selectiva sobre funciones de los microorganismos. Se clasifican según su estructura química, su uso terapéutico y su espectro o mecanismo de acción. El éxito de la terapia farmacológica depende de la elección del antimicrobiano, la dosis efectiva administrada por la vía correcta durante el tiempo necesario.

Se consideran tres grados de sensibilidad: bacterias sensibles, bacterias resistentes y bacterias moderadamente sensibles. Con el antimicrobiano adecuado y a la dosis habitual, las infecciones causadas por bacterias sensibles ofrecen una

respuesta terapéutica satisfactoria. Sin embargo, frecuentemente se observa la resistencia bacteriana a ciertos tratamientos. Esto se debe a que los microorganismos desarrollan mecanismos para neutralizar la acción tóxica de los antimicrobianos y es transmitida a otras bacterias a través del ADN o de material extracromosómico. Es por esto que la búsqueda de nuevos compuestos con perfil antimicrobiano es importante para mejorar y optimizar la terapia farmacológica.

Fracciones evaluadas

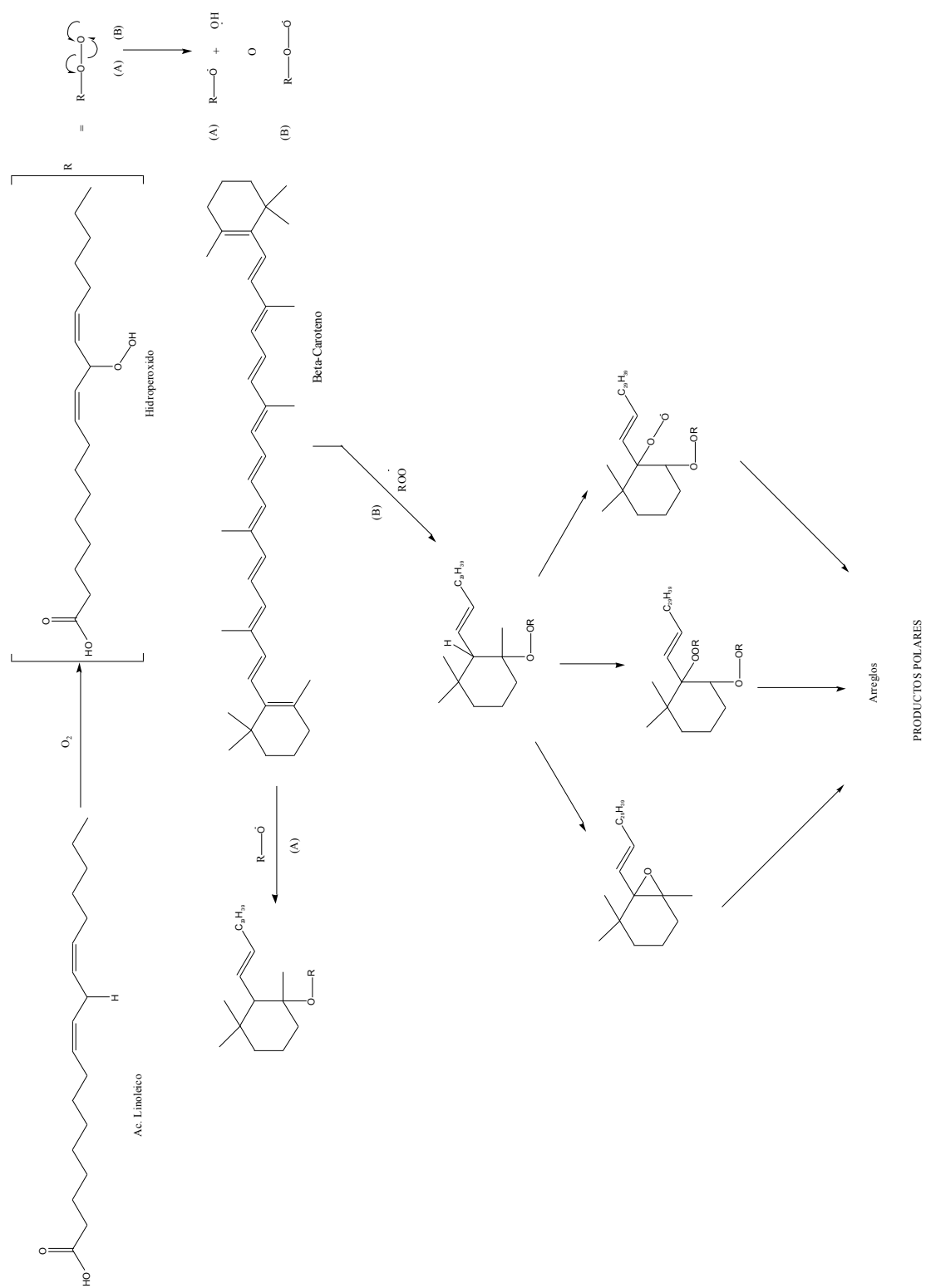
Las fracciones evaluadas fueron R1C1, R2C1, R3C1, R4C1, R5C1, R6C1, R7C1, R8C1 y R9C1. La fracción R10C1 fue descartada de las evaluaciones porque fue obtenida con metanol y los compuestos separados son mayormente los azúcares de la planta. Debido a que existe amplia información sobre ellos, su estudio no ayuda a cumplir el objetivo de este trabajo. Las evaluaciones fueron realizadas por triplicado, y en ensayos específicos las repeticiones fueron mayores de tres.

Las técnicas empleadas fueron:

- Decoloración oxidativa del β -caroteno
- Reducción del radical DPPH
- Inhibición de la acetilcolinesterasa
- Inhibición de la xantina oxidasa
- Evaluación antibacteriana
- Evaluación antifúngica

Decoloración oxidativa del β -caroteno

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



Esquema 1.- Mecanismo de oxidación de la técnica de β-caroteno.

Procedimiento

En un frasco ámbar (o protegido de la luz) se adicionó 0.02 mL de ácido linoléico, 0.2 mL de tween 20 y 1 mL de solución de β -caroteno (0.2 mg de β -caroteno disuelto en 1 mL de cloroformo). Se agitó y se dejó evaporar el cloroformo. Una vez evaporado, se adicionó 50 mL de agua destilada (previamente en constante burbujeo de aire durante 1 hora) y se agitó vigorosamente hasta la formación de una emulsión. Se tomó una alícuota de 5 mL y se transfirió a un tubo que con 2 mg del extracto a evaluar. Posteriormente se midió la absorbancia a 470 nm inmediatamente después de agregar la emulsión ($t=0$ minutos). Las subsecuentes lecturas de absorbancia fueron registradas en intervalos de 15 minutos manteniendo los tubos en baño maría a 50 °C por 120 minutos.

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

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

Donde:

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

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

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

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

Reducción del radical DPPH

La reducción del radical DPPH con compuestos antioxidantes se determinó aplicando el método descrito por Burda y Olezak (2001) con algunas modificaciones. En esta técnica, los compuestos activos reducen el radical difenil picril hidrazilo (DPPH, por sus siglas en inglés) al compuesto incoloro dipicril fenil hidrazina.

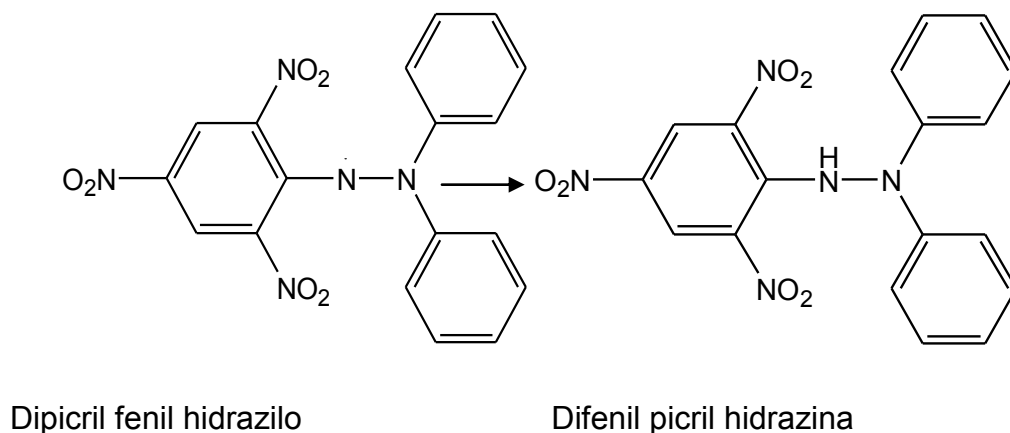


Figura 39.- Reducción del radical DPPH

Procedimiento

Para cada uno de los extractos a evaluar se prepararon las siguientes concentraciones: 1, 0.5, 0.25, 0.12, 0.06, 0.03 mg/mL de metanol. Cada una de estas concentraciones fue preparada en tubos de ensayo ámbar o bien, cubiertos de la luz. Se adicionaron 2 mL de la disolución de DPPH en MeOH (7.5 mg/ 250 mL). La disolución resultante se dejó en reposo durante 5 minutos y posteriormente se midió la absorbancia a 517 nm usando MeOH como blanco.

Las absorbancias obtenidas fueron promediadas, el porcentaje de actividad antirradicalaria se calculó con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Actividad antirradicalaria} = 100 [1 - A_m/A_c]$$

Dónde:

A_m = absorbancia de la muestra.

A_c = absorbancia de la muestra control (DPPH).

Inhibición de la Acetilcolinesterasa

Los Inhibidores de la acetilcolinesterasa son fármacos que aumentan la disponibilidad de acetilcolina en las sinapsis, a través de la inhibición de la acetilcolinesterasa. Existen cuatro fármacos que se han utilizado rutinariamente en la enfermedad de Alzheimer: Tacrina, Donepezilo, Rivastigmina y Galantamina. Estos medicamentos han demostrado utilidad en el manejo del estado cognitivo y conductual de pacientes con Alzheimer en etapas precoces y moderadamente avanzadas. La acetilcolinesterasa, enzima presente en la terminación postsináptica, hidroliza rápidamente a la acetilcolina lo que conlleva la repolarización de la membrana o de la placa basal en las conexiones neuromusculares y las prepara para la llegada de un nuevo impulso. La función normal de la acetilcolina depende de su rápida hidrólisis por la acetilcolinesterasa, que permite la brevedad y unidad de los impulsos propagados sincrónicamente. El ácido acético liberado pasa a sangre, mientras que la colina es recuperada por las neuronas para la síntesis de nuevas moléculas de neurotransmisor.

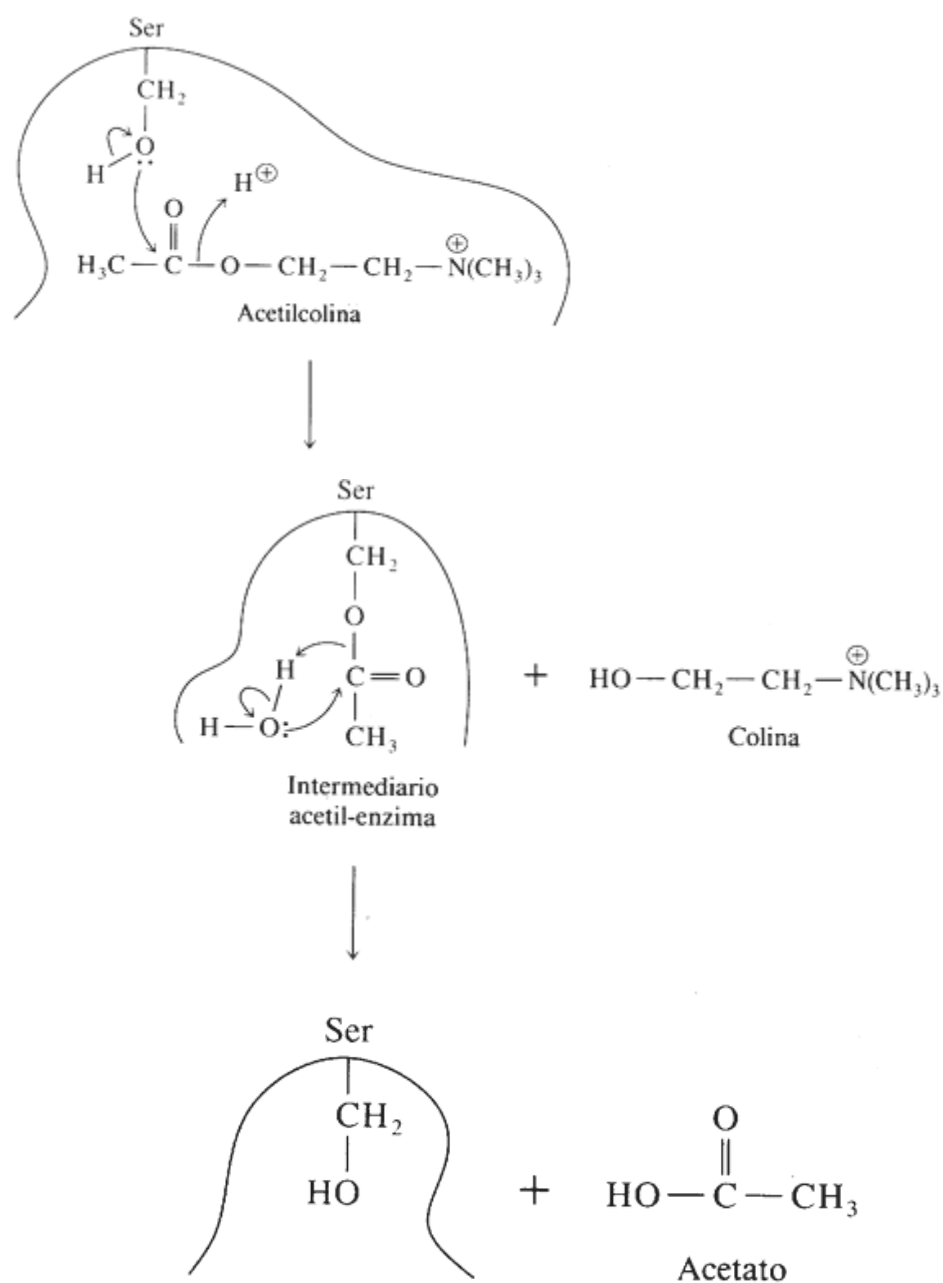


Figura 40.-Hidrólisis de acetilcolina

Procedimiento

Reactivos

- Amortiguador (Trizma HCl): Se pesan 788 mg de trizma HCl y se llevan a 90 mL con agua destilada, después con NaOH se lleva esta solución a pH= 8 y se afora a 100 mL con agua destilada
- DTNB (ácido-5,5-ditio-2-nitrobenzoico): Se pesó 3.2 mg de DTNB y se disolvió con 5 mL de amortiguador.
- ATCI (yoduro de acetiltiocolina): Se pesó 2.2 mg de ATCI y se disolvió 5mL de amortiguador.
- Albumina bovina sérica: Se pesó 1 mg de albúmina bovina sérica, se disolvió y se aforó a 10 mL con amortiguador.
- Enzima (acetilcolinesterasa): Se comienza con una solución de enzima con 3 μ U/mL, posteriormente se tomó una alícuota de 100 μ L y se le agregó 900 μ L de amortiguador. De estos 1000 μ L, se tomó 500 μ L y se aforó a 10 mL con albúmina bovina sérica.
- Extractos: Se pesó en un tubo 3 mg de extracto y se disolvió en 1.5 mL de disolvente (el disolvente dependerá del extracto: si es metanólico se utiliza metanol al 10 %, si es etéreo o aceite esencial se utiliza DMSO al 0.7%).

Se realizó el blanco por triplicado con los siguientes reactivos:

Tabla. Blanco

Amortiguador	920 µL
Acetilcolinesterasa	30 µL
DTNB	50 µL

Se realizó el control negativo (actividad enzimática) por triplicado con los siguientes reactivos:

Tabla. Control negativo

Amortiguador	870 µL
Acetilcolinesterasa	30 µL
DTNB	50 µL
ATCI	50 µL

Se realizaron las muestras (extractos) a diferentes concentraciones en diferentes tubos

Tabla. Concentraciones utilizadas.

	Concentración	del	extracto en	cada	tubo
Reactivo	400 µg/mL	300 µg/mL	200 µg/mL	100 µg/mL	50 µg/mL
Amortiguador	670 µL	720 µL	770 µL	820 µL	845 µL
Extracto	200 µL	150 µL	100 µL	50 µL	25 µL
A.colinesterasa	30 µL	30 µL	30 µL	30 µL	30 µL
DTNB	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL
ATCI	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL	50 µL

Inmediatamente después de colocar al último tubo el ATCI, se empieza a leer ordenadamente blancos, controles y extractos a 412 nm en un espectrofotómetro UV-visible y estas lecturas corresponderán al tiempo 0 (T0').

Después de 15 minutos de haber leído el primer tubo, se leerán de nuevo ordenadamente a la misma longitud y estas lecturas corresponderán al tiempo 15 (T15').

Se obtuvo la diferencia de estos datos para cada uno de los tubos, blancos controles y extractos (T15' - T0'). Esta diferencia en el control negativo corresponde al 100% de actividad enzimática. Para los extractos se comparó su diferencia de tiempos (T15' - T0') con el control negativo mediante una regla de tres, el resultado de esto dió el porcentaje de actividad enzimática del extracto. Este resultado se restó a 100 para obtener el porcentaje de inhibición de la acetilcolinesterasa que posee el extracto. Dado a que se realiza este ensayo a diferentes concentraciones, se puede realizar una curva (concentración vs % de inhibición). Se obtuvo la ecuación de la recta que arroja la concentración necesaria para obtener el 50% de inhibición de la acetilcolinesterasa (IC50 del extracto).

Inhibición de la Xantina Oxidasa

Los estudios realizados con la xantina oxidasa, enzima que cataliza la oxidación de la hipoxantina y la xantina a ácido úrico; muestran que ésta, al ser inhibida disminuye la acumulación de ácido úrico en las articulaciones, controlando la enfermedad denominada gota.

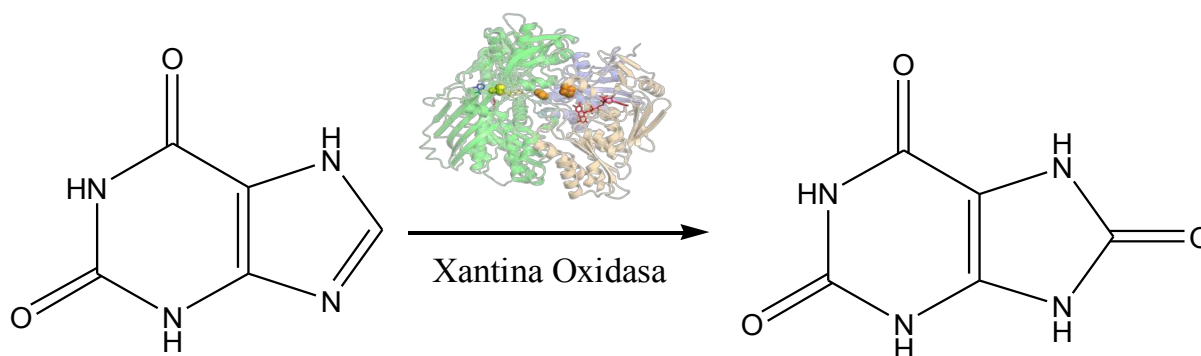


Figura 41.- Oxidación de Xantina

Actualmente se trata la enfermedad con el fármaco alopurinol (análogo de la hipoxantina), el cual reacciona con xantina oxidasa produciendo aloxantina, más soluble y de fácil excreción.

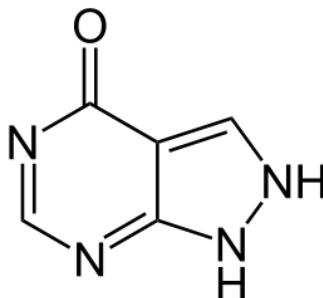


Figura.- Alopurinol

Procedimiento

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

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

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

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

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

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

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

Ensayos Antimicrobianos

El estudio de la sensibilidad de los microorganismos a los antimicrobianos es una de las funciones más importantes de los laboratorios de microbiología clínica. Su realización se desarrolla mediante las pruebas de sensibilidad o antibiograma, cuyo principal objetivo es evaluar en el laboratorio la respuesta de un microorganismo a uno o varios antimicrobianos, traduciendo, en una primera aproximación, su resultado como factor predictivo de la eficacia clínica. El antibiograma define la actividad *in vitro* de un antibiótico frente a un microorganismo determinado y refleja su capacidad para inhibir el crecimiento de una bacteria o población bacteriana. NO HICISTE PRUEBAS DE SENSIBILIDAD, SINO DE CONCENTRACION MINIMA INHIBITORIA QUE ES DIFERENTE

Procedimiento

1. Un día anterior a realizar el bioensayo, se resembraron las cepas en medios de cultivo nuevos.
Hongos y levaduras => Medio RPMI
Bacterias => Mueller-Hinton
2. Se esterilizó el siguiente material:
 - Placa Petri (grande)
 - 1 caja de puntillas amarillas
 - 1 caja de puntillas azules
 - Tubos de ensayo con tapa de rosca que contengan 4 mL de agua destilada para cada cepa
 - Jeringas para dispensador.

3. Se pesó 6 mg de extracto en un eppendorf.
4. Al día siguiente se verificó que haya crecimiento en las placas inoculadas el día anterior.
5. Se disolvió el extracto de la siguiente manera:
 - a. Se adicionó 50 μ L de DMSO y se agitó en vortex.
 - b. En caso de no disolverse, se colocó en el ultrasonido por 5 minutos.
 - c. Se agregó por duplicado 725 μ L de medio de cultivo correspondiente y se agitó en vortex.
6. Al encender la campana se limpió con etanol al 70% v/v y se colocó dentro:
 - a. Placa Petri* (grande)
 - b. Pipeta automática de 100 y 1000 μ L
 - c. Dispensador
 - d. Pipeta multicanal de 200 μ L
 - e. 1 caja de puntillas amarillas*
 - f. 1 caja de puntillas azules*
 - g. 1 vaso para residuos.
 - h. Jeringas para dispensador* *Estéril
7. El espectrofotómetro se calibró de la siguiente manera:
 - a. Se colocó el blanco en el espectrofotómetro con la marca impresa en el tubo en forma de diamante hacia el operador.
 - b. Se presionó el botón “zero set” y en absorbancia con la rosca “zero” se ajustó a 0.
 - c. En transmitancia, se ajustó a 100%.

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

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

14. Con un dispensador en el número 4 acoplado a una jeringa previamente estéril, se colocó la solución de la cepa 1:50 en cada pocillo EXCEPTO en los pocillos de control negativo. Se incubó a 37°C.
15. Con ayuda de lámpara de luz clara se tomó lectura visual a las 24 horas anotando resultados. Se confirmaron los resultados con una lectura a las 48 horas.
16. Se aseguraron las placas y se envolvieron con papel estraza para esterilizar en autoclave.

Resultados de Ensayos Antioxidantes

Ensayo de decoloración oxidativa del β -caroteno a las fracciones R1C1, R2C1, R3C1, R4C1, R5C1, R6C1, R7C1, R8C1 y R9C1:

Tabla 13.- Resultados decoloración oxidativa del β -caroteno de C1

C1	
Fracciones	%Antioxidante
R1C1	43
R2C1	17
R3C1	96
R4C1	48
R5C1	62
R6C1	11
R7C1	1
R8C1	18
R9C1	4

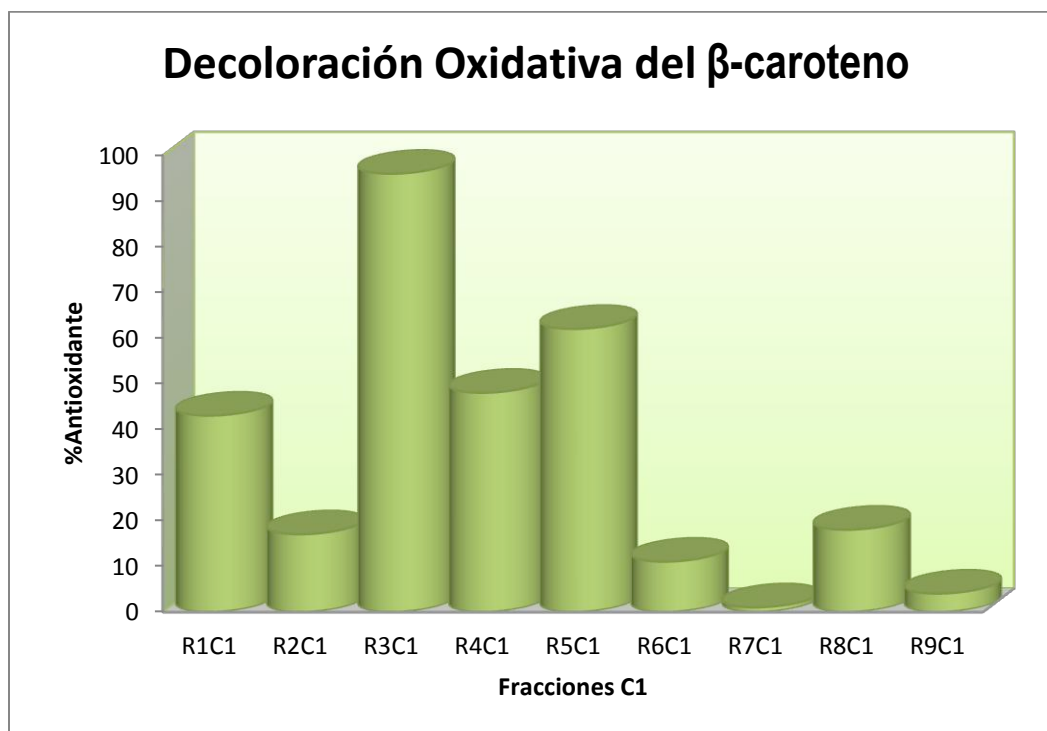


Figura 42.- Grafica de resultados decoloración oxidativa del β -caroteno.

Las fracciones con mejor porcentaje antioxidante por el método de decoloración oxidativa del β -caroteno fueron R3C1 Y R5C1, con estos resultados se analizó cual fracción de la columna 1 se seguiría fraccionando para el estudio fitoquímico preliminar. El gradiente de esta columna se hizo aumentando la polaridad de los disolventes. Las primeras fracciones (R1C1, R2C1Y R3C1) fueron arrastradas mayormente por hexano. Generalmente son las grasas y aceites de la planta que son compuestos no polares (ácidos grasos y glicerina). Se pueden considerar estas fracciones como el desengrasado de la planta. Esta clase de compuestos no suelen tener características farmacológicas, por lo tanto se decidió continuar con el fraccionamiento de R5C1 que tuvo un 62% de actividad antioxidante. La actividad antioxidante de esta fracción nos sugiere el contenido de compuestos de tipo polifenólico.

Ensayo de reducción del radical DPPH a las fracciones R1C1, R2C1, R3C1, R4C1, R5C1, R6C1, R7C1, R8C1 y R9C1:

Tabla 14.- Resultados reducción del radical libre DPPH

C1	
Fracciones	%Antioxidante
C1R1	34
C1R2	65
C1R3	37
C1R4	62
C1R5	55
C1R6	45
C1R7	75
C1R8	101
C1R9	77

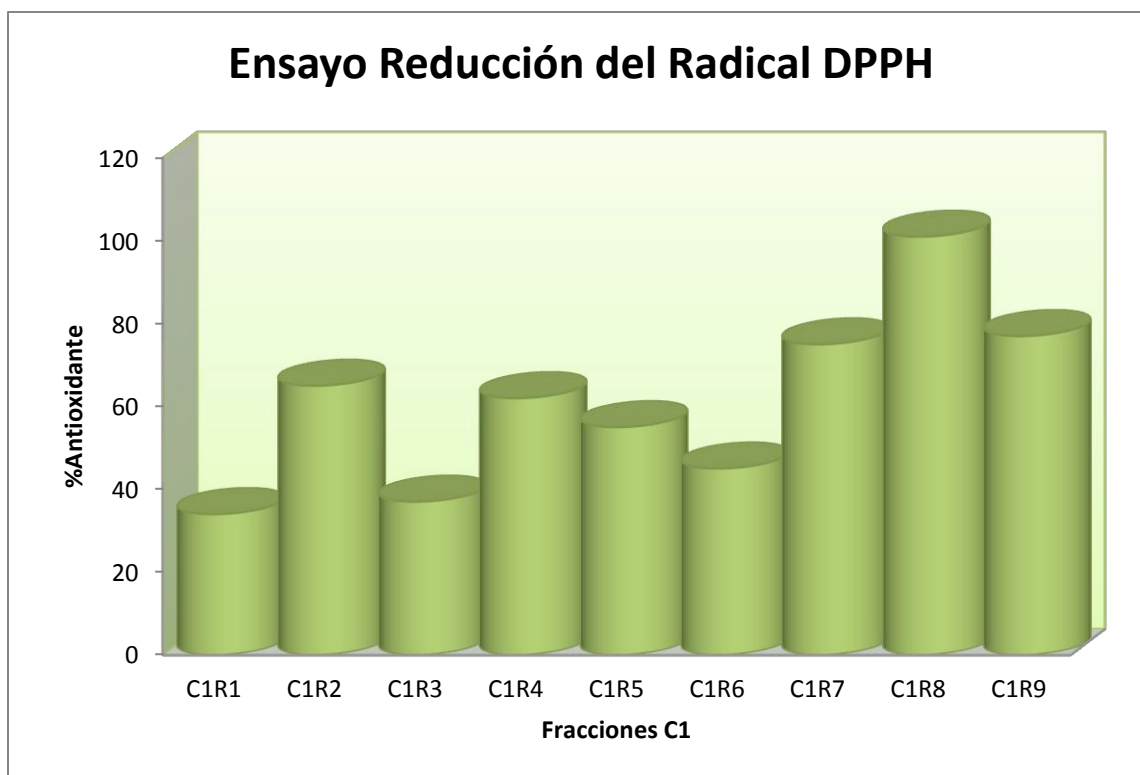


Figura 43.- Gráfica resultados antioxidantes del método reducción del radical libre DPPH

Los resultados del ensayo reducción del radical libre DPPH, muestran excelentes porcentajes antioxidantes principalmente para C1R8, C1R9 Y C1R7. Tales fracciones fueron obtenidas con acetato de etilo y etanol. Debido a los resultados de este ensayo, se podría pensar que en estas fracciones existen compuestos con características antioxidantes.

Ensayo de inhibición de la acetilcolinesterasa a las fracciones R1C1, R2C1, R3C1, R4C1, R6C1, R7C1, R8C1 y R9C1:

Tabla 15.- Resultados Actividad Anticolinesterásica expresada como Concentración Inhibitoria Media (IC₅₀) en µg/mL

C1	
Fracción	IC₅₀ µg/mL
C1R1	> 400
C1R2	>400
C1R3	> 400
C1R4	187.3 ± 13.7
C1R6	> 400
C1R7	>400
C1R8	307.3 ± 45.0
C1R9	200.8 ± 13.0

Galantamina	0.278 ± 0.01
--------------------	---------------------

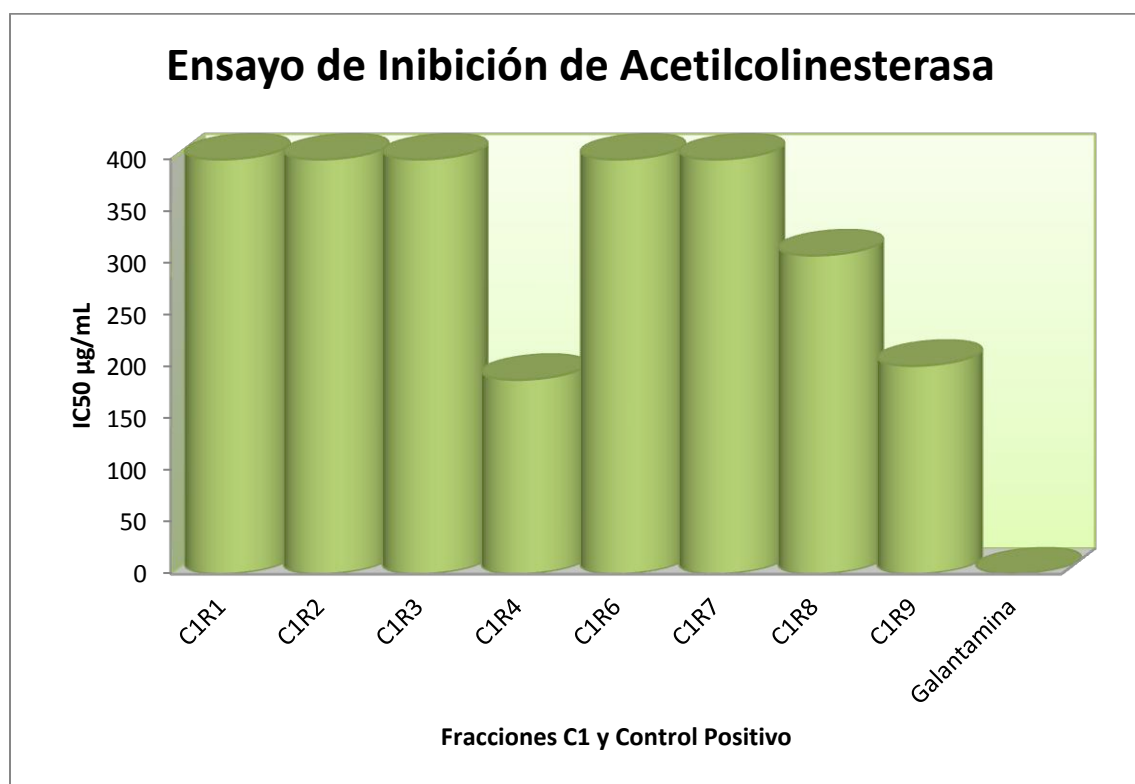


Figura 44.- Gráfica de resultados actividad anticolinesterásica

En los resultados del ensayo de inhibición de acetilcolinesterasa las fracciones C1R4, C1R8 y C1R9 muestran una inhibición favorable. Las concentraciones inhibitorias medias son mucho mayores a las del control positivo del ensayo, en este caso la galantamina. Sin embargo hay que considerar que no son compuestos puros, existe la posibilidad de encontrar compuestos potencialmente inhibidores de esta enzima una vez aislados. La bibliografía sugiere que la naturaleza de estos compuestos son organofosforados, carbamatos, algunos derivados de la fenantrina, piperidinas o fenotiazinas.

Ensayo de inhibición de la xantina oxidasa a las fracciones R1C1, R2C1, R3C1, R4C1, R6C1, R7C1, R8C1 y R9C1:

Tabla 16.- Resultados Actividad Antioxidante expresada como Concentración Inhibitoria Media (IC50) de Xantina oxidasa en µg/mL

C1	
Clave	IC50 µg/mL
C1R1	> 400
C1R2	> 400
C1R3	> 400
C1R4	> 400
C1R5	> 400
C1R6	339.6 ± 8.7
C1R7	94.8 ± 16.2
C1R8	11.9 ± 0.3
C1R9	11.7 ± 0.06

Alopurinol	0.842 ± 0.078
------------	---------------

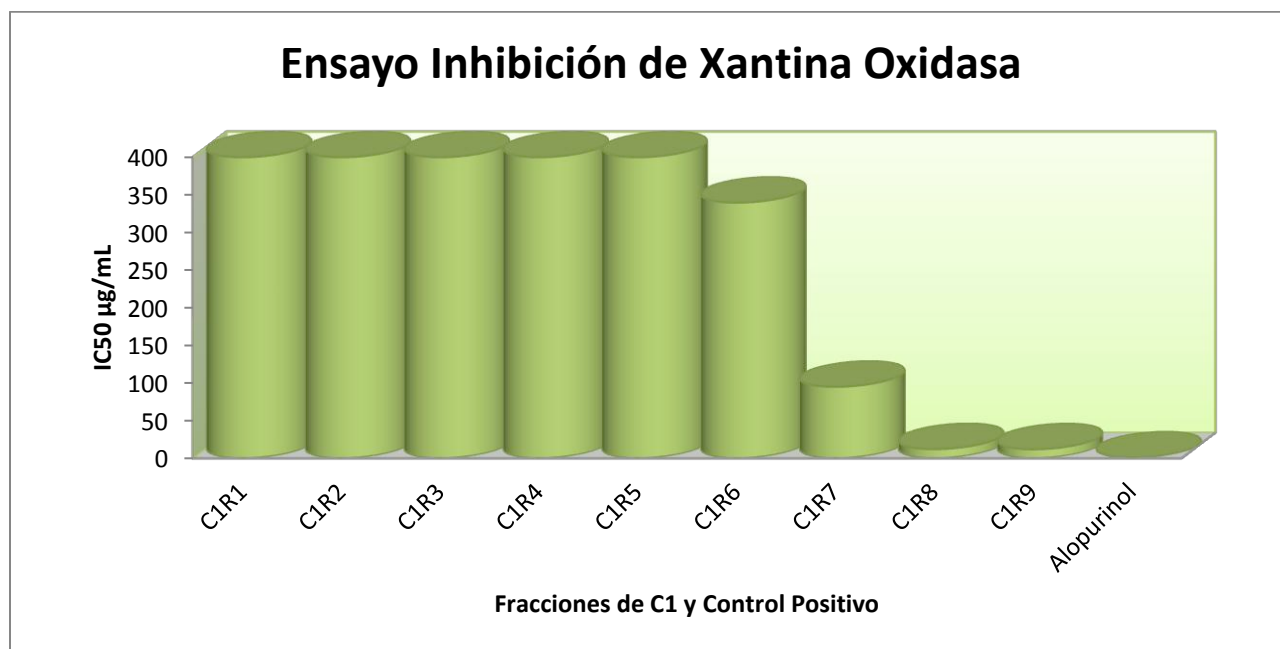


Figura 45.- Gráfica de resultados de inhibición de xantina oxidasa

Los resultados del ensayo de inhibición de la xantina oxidasa, nos muestra una inhibición favorable para las fracciones C1R7, C1R8 y C1R9. Los resultados de las fracciones no son lejanos a los resultados del control positivo en este caso alopurinol, tomando en cuenta que con el aislamientos de los compuestos activos para la inhibición de la xantina oxidasa, esta actividad podría aumentar, una vez restada la influencia que tienen los compuestos no activos en la concentración inhibitoria media.

Resultados de Ensayos Antimicrobianos

Ensayo antibacteriano a las fracciones R1C1, R2C1, R3C1, R4C1, R5C1, R6C1, R7C1, R8C1 y R9C1:

MRSA: *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina

S.a ATCC: *Staphylococcus aureus*

E.f.: *Enterococcus faecalis*

E.c.: *Escherichia coli*

K.p.: *Klebsiella pneumoniae*

A.b.: *Acinetobacter baumannii*.

Tabla 17.- Resultados actividad antibacteriana expresada como la concentración mínima inhibitoria (MIC) en µg/mL

C1						
Fracción	MRSA	S.a ATC	E.f.	E.c.	K.p.	A.b.
C1R1	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
C1R2	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
C1R3	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
C1R4	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
C1R5	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
C1R6	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
C1R7	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
C1R8	>1000	500	500	500	>1000	500
C1R9	1000	500	>1000	1000	>1000	>1000

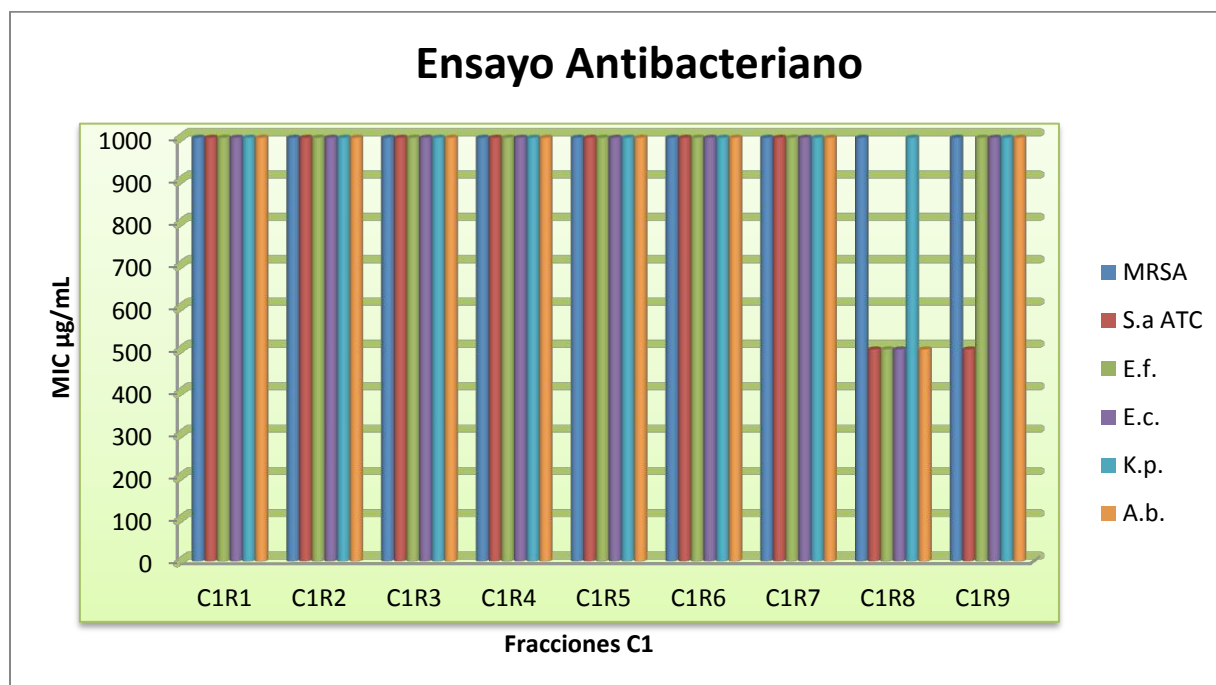


Figura 46.- Gráfica de resultados antibacterianos

Las fracciones C1R8 y C1R9 obtuvieron resultados favorables. Para la fracción C1R8, se obtuvo una concentración mínima inhibitoria de 500 µg/mL para *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli* y *Acinetobacter baumannii*. En el caso de la fracción C1R9 se obtuvo una concentración mínima inhibitoria de 500 µg/mL para *Staphylococcus aureus*.

Ensayo antifúngico a las fracciones R1C1, R2C1, R3C1, R4C1, R5C1, R6C1, R7C1, R8C1 y R9C1:

84: *Candida glabrata*

498: *Candida albicans*

166: *Candida tropicalis*

168: *Candida tropicalis*

53: *Candida albicans*

96: *Candida parapsilosis*

501: *Candida albicans*.

Tabla 18.- Resultados actividad antifúngica expresada como la concentración mínima inhibitoria (MIC) en µg/mL

C1							
Fracción	84	498	166	168	53	96	501
C1R1	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
C1R2	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
C1R3	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
C1R4	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
C1R5	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
C1R6	1000	1000	1000	1000	1000	500	1000
C1R7	500	500	500	1000	500	500	500
C1R8	500	500	500	500	1000	500	500
C1R9	500	500	500	500	500	500	500

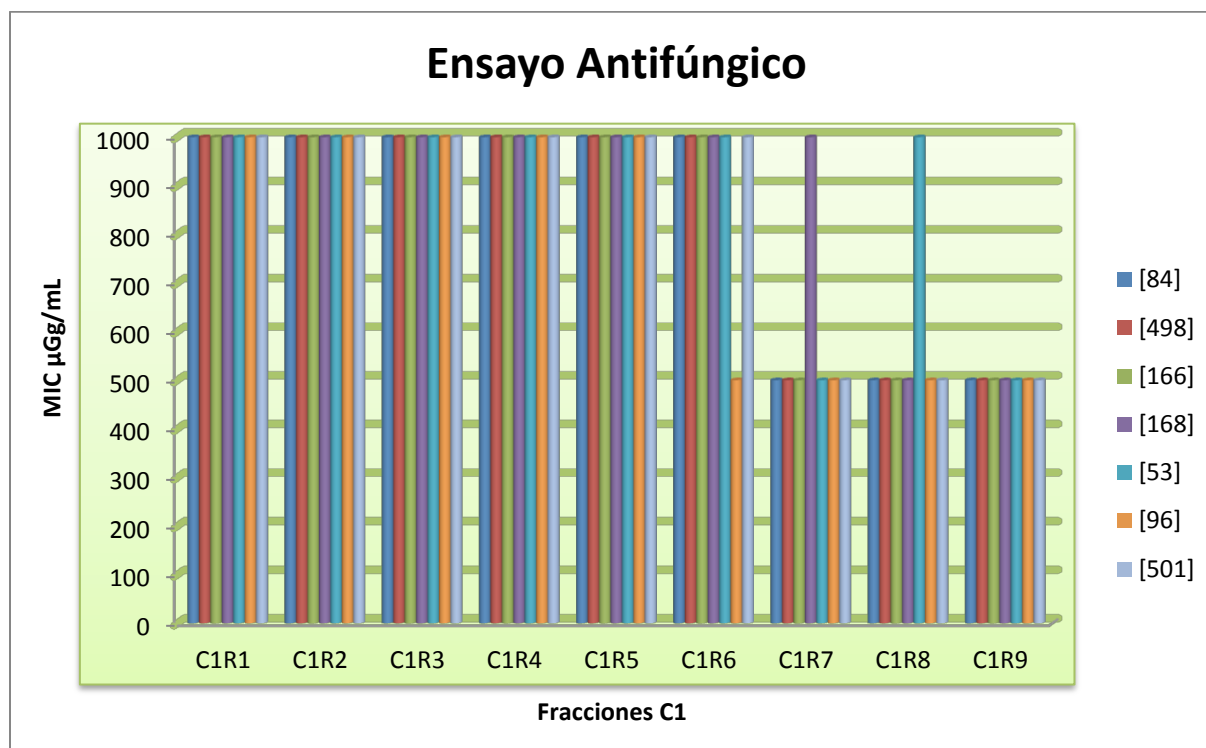


Figura 47.- Grafica resultados antifúngicos

Se obtuvieron resultados favorables en las fracciones C1R6, C1R7, C1R8 y C1R9. En la fracción C1R6 se obtuvo una concentración mínima inhibitoria de 500 µg/mL para *Candida parapsilosis*. En la fracción C1R7 se obtuvo una concentración mínima inhibitoria de 500 µg/mL para *Candida glabrata*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y *Candida albicans*. En la fracción C1R8 se obtuvo una concentración mínima inhibitoria de 500 µg/mL para *Candida glabrata*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* y *Candida albicans*. Por último en la reunión C1R9 se obtuvo una concentración mínima inhibitoria de 500 µg/mL para *Candida glabrata*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida tropicalis*, *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* y *Candida albicans*.

De la parte aérea de *Salvia clevelandii* se realizó un estudio fitoquímico parcial, de donde se aislaron mediante métodos espectroscópicos, dos metabolitos secundarios, un diterpeno de tipo abietano y un triterpeno nuevo.

Los datos espectroscópicos y los experimentos de correlación homonuclear COSY ^1H - ^1H , y heteronuclear a uno y tres enlaces HSQC, HMBC y experimentos ROESY nos permitieron deducir que el nuevo compuesto aislado de *S. Clevelandii*, es un triterpeno que corresponde a la estructura con nombre: 3 β , 6 β , 28-Trihidroxilup-20(29)-eno.

Se determinó la actividad antibacteriana de las 9 fracciones obtenidas del extracto crudo de *S. clevelandii*, frente a los microorganismos: *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina, *Staphylococcus aureu*, *Enterococcus faecales*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*., de los cuales los mas activos fueron la fracción C1R8, con una concentración mínima inhibitoria de 500 $\mu\text{g/mL}$ para *Staphylococcus aureu*, *Enterococcus faecales*, *Escherichia coli* y *Acinetobacter baumannii*. y la fracción C1R9 que presentó una concentración mínima inhibitoria de 500 $\mu\text{g/mL}$ para *Staphylococcus aureu*.

Se realizó un estudio antifúngico con los microorganismos: 84: *C. glabrata*, 498: *C. albicans*, 166: *C. tropicalis*, 168: *C. tropicalis*, 53: *C. albicans*, 96: *C. parapsilosis*, 501: Los resultados mas representativos se observaron en las fracciones C1R6, C1R7, C1R8 y C1R9. En la fracción C1R6 se obtuvo una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 500 $\mu\text{g/mL}$ para *C. parapsilosis*. En la C1R7, C1R8, C1R9 una CMI de 500 $\mu\text{g/mL}$ para *C. glabrata*, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. albicans*, *C. parapsilosis* y *C. albicans*.

Se realizó una evaluación antioxidante mediante la técnica de la decoloración oxidativa del B-caroteno con los 9 extractos. Los resultados muestran que las fracciones con mejor comportamiento antioxidante fueron las fracciones R3C1 y R5C1, con los porcentajes de inhibición del 62 y 96 % respectivamente.

En el análisis de actividad “secuestradora” de radicales libres mediante la técnica del radical libre DPPH, se observó que las fracciones mas activas frente a este radical fueron la C1R7, C1R8 Y C1R9 con porcentajes de reducción de 75, 100 y 77 % respectivamente.

En el experimento de inhibición de la acetilcolinesterasa con las 9 fracciones obtenidas, los resultados muestran que las fracciones C1R4, C1R8 y C1R9 muestran una mejor inhibición, ya que las concentraciones inhibitorias medias son mucho mayores a las del control positivo del ensayo, galantamina.

Finalmente los resultados del ensayo de inhibición de la xantina oxidasa, nos muestra una inhibición favorable para las fracciones C1R7, C1R8 y C1R9.

Estos estudios biodirigidos sugieren que las fracciones C1R7, C1R8 Y C1R9 presentan un mejor perfil bioactivo para el aislamiento y caracterización estructural de metabolitos secundarios.

Bibliografía

Métodos de Investigación Fotoquímica, Xorge A. Dominguez, editorial Limusa, primera edición 1973, Parte I.

Fotoquímica Orgánica, Deanna de Marcano y Masahisa Hasegawa, Universidad Central de Venezuela, Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, primera edición 1991, Capítulo 1.

Estudio Comparativo de los Grupos Indígenas Kamiai y Pa Ipai del Norte de Baja California, Tesis profesional, Edna Alicia Corte Rodríguez, UABC, Escuela Superior de Ciencias, Ensenada Baja California.

Listados Florísticos de México, Reserva de la Biosfera de Vizcaíno Baja California Sur, José Luis León de la Luz, Rocío del Carmen Coria Benet, Jorge Cansino, UNAM, Instituto de Biología, primera edición 1995.

El bosque de coníferas de la Sierra San Pedro Mártir, Baja California, José Delgadillo Rodríguez, SEMARNAT y el Instituto Nacional de Ecología, 2004, Capítulo 5.

The New Book of Salvias: Sages for Every Garden, Betsy Clebsch, TIMBER PR INC, 2008

Antioxidantes Naturales, Jack Challem, Melissa Block, Ediciones Nowtilus, 2008

Plantas con Propiedades Antioxidantes, Lic. Lourdes García Bacallao, Revista Cubana de Investigación Biomédica, 2001

Microbiología clínica práctica, Pedro García Martos, Fernando Paredes Salido, María Teresa Fernández del Barrio, Publicaciones UCA, 1994

Instrumentación

Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)

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

Espectroscopia de infrarrojo IR

Los espectros de espectroscopia de infrarrojo (IR), fueron realizados en espectrofotómetros PERKIN-ELMER modelo SPECTRUM 1, NaCl. Los valores de transmitancia (ν) están expresados en cm^{-1} .

Espectroscopia ultravioleta (UV)

Las mediciones de absorbancia de las técnicas antioxidantes se realizaron en un espectrofotómetro THERMO SCIIENTIFIC, modelo Genesys 20, en celdas de cuarzo de 10 mm. Como disolvente se empleo metanol o agua destilada. Los valores de absorbancia (λ) se expresan en nm.