



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

**ESTUDIO BIODIRIGIDO DE LOS COMPONENTES ANTIINFLAMATORIOS DE
Salvia thymoides Benth**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. CELIA BUSTOS BRITO



TUTOR: M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez 2011

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento del presente proyecto a través de la beca número 240055, otorgada para llevar a cabo mis estudios de maestría.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al Instituto de Química y al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas por brindarme los medios necesarios para la realización de este proyecto, así como para mi formación profesional.

A mi tutor el M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez, por su apoyo para la realización de este proyecto, sus enseñanzas y, por supuesto, por su amistad.

Al M. en C. Antonio Nieto Camacho del laboratorio de Pruebas Biológicas del Instituto de Química de la UNAM por la realización de las pruebas biológicas, por todo lo que he aprendido de él, por su apoyo y por la amistad que me ha brindado.

A los integrantes del jurado, los Drs. Manuel Jiménez Estrada, Ricardo Reyes Chilpa, Enrique Ramón Ángeles Anguiano y Alfonso Sebastián Lira Rocha y a la Dra. María Yolanda Ríos Gómez por sus valiosas aportaciones para la culminación de este trabajo.

A los técnicos en RMN, IR y espectrometría de masas que laboran en el Instituto de Química, por su apoyo para la caracterización de los compuestos aislados.

A todas las personas que, de alguna manera, colaboraron para la realización de este trabajo.

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 2-9 del Departamento de Productos Naturales del Instituto de Química de la UNAM, bajo la dirección del M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez.

Fue presentado bajo la modalidad de cartel bajo el título:

“Estudio biodirigido de los componentes antiinflamatorios de *Salvia thymoides* Benth”

En:

Simposio interno 2011 del Instituto de Química de la UNAM del 5 al 8 de diciembre.

Y

Programa de maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, “QuimiUNAM 2011” del 16 al 18 de noviembre.

INDICE

1.- Introducción	1
2.- Antecedentes.	3
2.1. Familia Lamiaceae (Labiatae).	3
2.2. Género <i>Salvia</i> .	4
2.2.1. Actividades biológicas del género <i>Salvia</i> .	8
2.3. <i>Salvia thymoides</i> .	10
2.4. Terpenoides y sus actividades biológicas.	13
2.4.1 Triterpenos.	17
2.5. Flavonoides.	19
2.6. Generalidades del proceso inflamatorio.	21
2.6.1. Dermatitis.	22
3.- Justificación.	24
4.- Objetivos.	25
4.1. Objetivo general.	25
4.2. Objetivos específicos.	25
5.- Materiales y métodos	26
5.1. Material vegetal.	26
5.2. Secado y fragmentación.	26
5.3. Extracción.	26
5.4. Estudio biodirigido de la actividad antiinflamatoria del extracto de <i>Salvia thymoides</i>	26
5.4.1. Modelo de edema inducido por TPA.	27
5.5. Cromatografías.	32
5.6 Análisis instrumental.	32
6.-Resultados y discusión.	34
6.1. Estudio biodirigido de la actividad antiinflamatoria de <i>Salvia thymoides</i> Benth.	35
6.1.1. Purificación de la fracción de diclorometano.	36

6.1.1.1. Caracterización espectroscópica de I : 3',5-dihidroxi-4',6,7-trimetoxiflavona (eupatorina).	38
6.1.1.2. Estudio de actividad biológica para el compuesto I en el modelo de inflamación inducida por TPA.	40
6.1.2. Purificación de la fracción no polar.	41
6.1.2.1. Purificación del precipitado en hexano: acetona.	41
6.1.2.1.1. Compuesto II . Acido 3-β-hidroxilupen-20(29)-en-28-oico (acido betulínico).	42
6.1.2.1.2. Compuestos III y IV . Mezcla de ácido 3-β-hidroxiolean-12-en-28-oico y 3-β-hidroxiurs-12-en-28-oico (ácidos olenólico y ursólico)	44
6.1.2.1.3. Compuesto V .	45
6.1.2.1.4. Compuesto VI .	48
6.1.2.2. Purificación del sobrenadante en hexano: acetona.	50
6.1.2.2.1. Esterificación de la fracción 13.	51
6.1.2.2.2. Compuesto VIII . 3β-lup-20(29)-en-3-ol (lupeol).	52
6.1.2.2.3. Compuesto IX . β-sitosterol.	53
6.1.2.3. Purificación de la fracción polar.	54
6.1.2.3.1. Compuesto X : 3`4`5,7-tetrahidroxifavanonol (dihidroquercetina).	55
7.- Conclusiones.	59
8. Anexos.	60
8.1. Caracterización de los compuestos aislados.	61
8.2. Espectros.	65

ABREVIATURAS

RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
IR	Infrarrojo
TPA	13-acetato de 12- O-tetradecanoil forbol
J	Constante de acoplamiento
s	Señal simple
d	Señal doble
t	Señal triple
c	Señal cuádruple
dd	Señal doble de dobles
ddd	Señal doble de doble de doble
dddd	Señal doble de doble de doble de doble
td	Triple de dobles
p.f	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
cm ⁻¹	Número de onda
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (Mejoramiento sin distorsión por medio de transferencia de polarización)
m/z	Relación masa-carga
IE	Impacto electrónico
Cl ₅₀	Concentración inhibitoria 50
µmol/oreja	Micromol por oreja
TMS	Tetrametilsilano
CCD	Cromatografía en Capa Delgada
R.f.	Factor de retención
CF	Cromatografía "flash"
CCDP	Cromatografía en Capa Delgada Preparativa
fMLP/CB	Formil-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina/citocalasina B
EPP	Etil-fenil-propionato
EEM	Error estándar de la media
δ	Desplazamiento químico

NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement and Exchange Spectroscopy (Espectroscopía de intercambio y mejoramiento nuclear Overhauser).
MHz	Megahertz
Hz	Hertz
DMSO-D ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
D ₂ O	Óxido de deuterio
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
ν_{\max}	Frecuencia máxima
cm	Centímetros
mm	Milímetros
IL-1	Interleucina 1
15-(R)- HETE	15-R-hidroxieicosatetraenoico
MPO	Mieloperoxidasa
LPS	Lipopolisacáridos
iNOS	Enzima óxido nítrico sintása inducible
RO	Rotación óptica

RESUMEN

En el presente trabajo se llevó a cabo el estudio biodirigido de los componentes antiinflamatorios del extracto acetónico de las hojas de *Salvia thymoides* Benth colectada en el estado de Puebla usando como modelo de actividad antiinflamatoria el edema inducido por TPA, con el objetivo de determinar cuáles son los componentes que le confieren la actividad antiinflamatoria. La purificación de los metabolitos secundarios presentes en el extracto se realizó utilizando técnicas cromatográficas, tales como columnas "flash" CCD y CCDP. Los compuestos aislados fueron caracterizados por las técnicas espectroscópicas pertinentes, tales como IR, RO, RMN y espectrometría de masas.

Se identificaron los siguientes compuestos tipo terpenoide con actividad antiinflamatoria: una mezcla de los ácidos ursólico y oleanólico, ácido betulínico, lupeol y β -sitosterol. También se identificó eupatorina y dihidroquercetina, para la primera se calculó una CI_{50} de 0.134 $\mu\text{g}/\text{oreja}$, para la segunda no se realizó la realización de la prueba de actividad antiinflamatoria.

También se identificaron dos estructuras con esqueleto diterpénico tipo clerodano para las cuales no se encontraron datos previos descritos en la literatura y las cuales no presentaron actividad en el modelo propuesto.

Los resultados de las pruebas de actividad antiinflamatoria realizadas para los compuestos aislados, indicó que la mezcla de los ácidos ursólico y oleanólico son los responsables de la actividad del extracto acetónico de *Salvia thymoides*.

1. INTRODUCCIÓN

La biodiversidad del mundo posee una fuente ilimitada de diversidad estructural química, por lo que los productos naturales han sido una significativa fuente de fármacos con diversas actividades.

El descubrimiento accidental de la penicilina en 1928 por Alexander Fleming y su introducción en el mercado en 1941 como un eficiente antibiótico sin sustanciales efectos adversos, revolucionó la química farmacéutica, estimulando el desarrollo de nuevas estrategias para el desarrollo y descubrimiento de fármacos con diversas actividades, es decir, se incrementó el interés por los productos naturales. Así, a mitad del siglo XX, los microorganismos comienzan a ser fuente de numerosos fármacos y los organismos marinos también empiezan a marcar significativas contribuciones a la medicina en años recientes.¹

Entre algunos ejemplos de productos naturales prototipo puros que fueron identificados a través de la investigación de plantas vasculares, se encuentran: la atropina, la digitoxina, la efedrina, la morfina, la quinina y el ácido salicílico, tan solo por mencionar algunos. Otros, como las hormonas, provienen de animales terrestres.

Así, hasta el 2006 se estimaba que casi el 50% de los fármacos aprobados con múltiples actividades biológicas, tales como anticancerígenos, antibacterianos, antiparasitarios, antivirales, entre otros, eran productos naturales o estaban íntimamente relacionados con ellos, ya sea por modificación química, semisíntesis o inspirados en algún metabolito secundario de una fuente natural.²

Por otro lado, se ha estimado que hay aproximadamente 300,000 especies de plantas vasculares, de las cuales 10,000 se han reportado con usos medicinales.³ Se calcula que alrededor del 10 por ciento de la diversidad global

¹Jones, WP.; Chin, Y-W.; Kinghorn, A. D. The Role of Pharmacognosy in Modern Medicine and Pharmacy. *Curr. Drug. Targ.* **2006**, 7, 247-264

²Newman, J. D.; Cragg, G. Natural Products as Sources of New Drugs Over the Last 25 Years. *J. Nat. Prod.* **2007**, 70, 461-477.

³McChesney, J. D.; Venkataraman S. K.; Henri, J.T. Plant Natural Products: Back to the Future or Into Extinction?. *Phytochemistry.* **2007**, 68, 2015–2022.

de especies se concentra en el territorio mexicano, lo que lo convierte junto con Colombia, Brasil, Indonesia, Perú, China, Congo e India en uno de los llamados países “megadiversos”. En cuanto al número de especies, México es el cuarto lugar en plantas, cuarto en anfibios, segundo en mamíferos y primero en reptiles.⁴ Por lo que, nuestro país es una fuente rica en productos naturales de origen vegetal, de los cuales, aún falta mucho por estudiar.

Considerando la importancia que tienen los productos naturales en el desarrollo de nuevos medicamentos, en el presente trabajo se realizó el estudio biodirigido de los componentes antiinflamatorios de *Salvia thymoides* Benth a través de técnicas cromatográficas como cromatografía en columna y capa delgada. Los compuestos aislados fueron caracterizados por técnicas espectroscópicas (RMN de ¹H, ¹³C, DEPT, IR) y espectrometría de masas y se realizó el estudio preliminar de su actividad antiinflamatoria a través del método de edema inducido por TPA en oreja de ratón.

⁴ <http://www.semarnat.gob.mx> (consultado en agosto 23 de 2011)

2. ANTECEDENTES

2.1. Familia Lamiaceae (Labiatae)

La familia Lamiaceae consta de 224 géneros y 4000 especies aproximadamente. Los miembros de esta familia se encuentran en los trópicos y subtropicos, además de partes templadas del mundo. Las áreas de mayor diversidad se encuentran en el Mediterráneo, Asia central, América, las islas del Pacífico, África tropical y China.⁵ Sus miembros son principalmente herbáceas y arbustos, en la familia no se conocen epífitas, saprófitas o parásitas.⁶ Los tallos son tetragonales, hojas simples, opuestas y decusadas. Con frecuencia las plantas están cubiertas de pelos y de glándulas que emiten fragancia, debido a que almacenan en sus hojas aceites esenciales que les confieren la característica de aromaticidad. El cáliz está fusionado en forma de campana o cono, algunas veces bilabiadas; pétalos fusionados pentámeros; 4 ó 2 estambres epipétalos, ya sea iguales o de dos longitudes, ovario súpero de dos carpelos fusionados, los cuales forman cuatro lóculos distintos, cada uno con un óvulo basal. Usualmente el estilo es ginobásico. El fruto consiste de cuatro nueces parecidas a aquenios indehiscentes con una semilla. Existe una amplia variedad de formas de corola y posición estaminal dentro de la familia, usualmente con una clara división entre el labio superior e inferior.⁷

La familia Lamiaceae tiene importancia económica mundial ya que se le han dado múltiples usos. Debido a su aromaticidad son usadas en perfumería y como ornamentales, por ejemplo *Salvia sclarea* (usada en aromaterapia), *Salvia dorisiana* (aroma frutal), *Salvia greggii* (perfume de melocotón), y *Salvia rutilans* (perfume de piña) y en la preparación de alimentos, por ejemplo *Thymus vulgaris* (tomillo) *Origanum vulgare* (orégano) y *Ocimum basilicum* (albahaca). Adicionalmente a estos usos, es importante mencionar el uso de estas plantas en la medicina tradicional, ya que han sido empleadas para el

⁵Esquivel, B.; Sanchez, A. A.; Aranda, E. Natural Products of Agrochemical Interest from Mexican Labiatae, *Phytochemicals and phytopharmaceuticals*, editores, Fereidoon shahidi, Chi-Tang Ho. USA, 2000; p 371-385.

⁶Ramamoorthy, T.P.; Eliot, M. Mexican Lamiaceae: Evolución and Endemism. In Biological Diversity of Mexico: Origins and Distribution; Ramamoorthy T.P, Bye R., Lot A. J. Eds.; Oxford University press; New York. 1993; p 513-539.

⁷Standley, P.; Williams, L. Labiatae. *Flora of Guatemala. Fieldiana Botany.* 197; 324(9):237-317.

tratamiento de diversos trastornos, tales como epilepsia, bronquitis, tuberculosis, hemorragias, inflamación de la cavidad oral y desordenes menstruales.⁸

Algunos de los metabolitos secundarios aislados de esta familia han mostrado interesantes actividades biológicas, tales como, antivirales, antiinflamatorias, antibacterianas y antialimentarias contra insectos.^{9,10}

Los constituyentes químicos de la familia Lamiaceae han sido estudiados principalmente por su valor económico, el cual está estrechamente relacionado con su alto contenido en aceites esenciales, los cuales consisten principalmente de mono y sesquiterpenos volátiles. Además, estos estudios han llevado a aislar un gran número de metabolitos secundarios, tales como esteroides, flavonoides, iridoides, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos y sesterterpenos.

2.2. Genero *Salvia*

El género *Salvia* L. (tribu Mentheae, Lamiaceae) representa un conjunto enorme y cosmopolita de cerca de 1000 especies distribuidas alrededor del mundo, aunque las áreas de mayor diversidad son México, América Central y América del Sur (500 spp), Asia Central Mediterránea (250 spp.), y el este de Asia (90 spp.) (Fig. 1).¹¹ Éstas fueron organizadas por Bentham (1876) en cuatro subgéneros, (*Salvia*, *Sclarea*, *Leonia* y *Calosphace*); sin embargo, datos recientes, tanto químicos como taxonómicos sugieren una reconsideración de esta clasificación (Tabla 1). Esta nueva reclasificación incluye al subgénero *Audibertia* abarcando las *Salvias* de California y Baja California.¹² Por razones

⁸Topçu, G. Bioactive Triterpenoids from *Salvia* Species. *J. Nat. Prod.* **2006**; 69:482-487.

⁹Simmonds, M.S.J.; Blaney, W.M.; Ley, S.V.; Savona, G.; Bruno, M.; Rodriguez, B. The Antifeedant Activity of Clerodane Diterpenoids from *Teucrium*. *Phytochemistry*. **1989**, 28(4), 1069-1071.

¹⁰Maurizio, B.; Vassallo, N.; Monique, S.J.; Simmonds, A. Diterpenoid with Antifeedant Activity from *Scutellaria rubicunda*. *Phytochemistry*. **1999**, 50(6), 973-976

¹¹Jay, B.; Walker, J.; Kenneth, J.; Sytsma, J. T.; Wink, M. *Salvia* (Lamiaceae) is not Monophyletic: Implications for the Systematics, Radiation, and Ecological Specializations of *Salvia* and Tribe Mentheae. *Am. J. Bot.* **2004**, 91(7), 1115-1125.

¹²Harley, R.M.; Heywood, C.A. Chromosome Numbers in Tropical American Labiatae, *In Advances in Labiatae*. *Science*, ed. R.M. Harley y T. Reymolds, Royal Botanic Gardens, Kew, UK, **1992**; 221-246

históricas, el nombre del subgénero *Calosphace* ha sido cambiado por *Jungia*.¹³

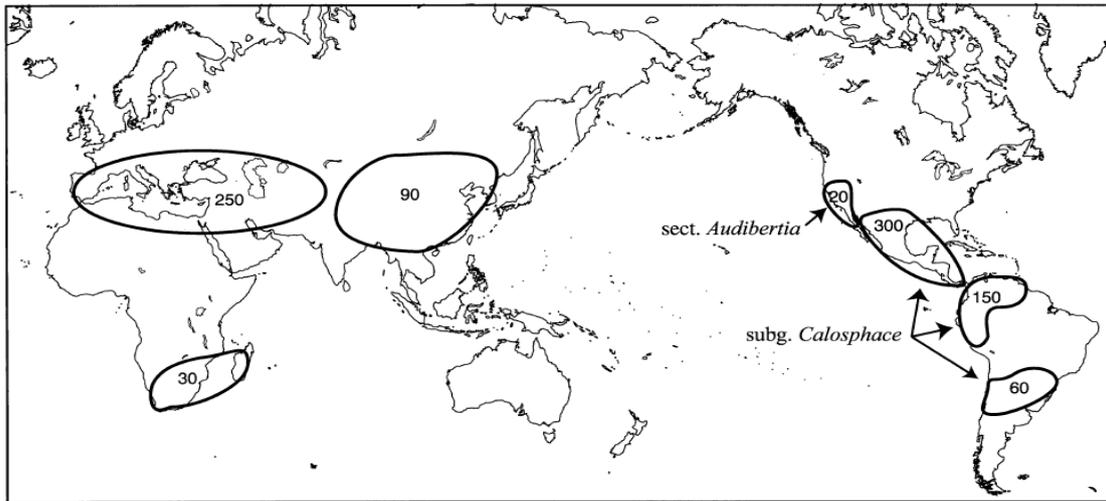


Figura 1. Centros de diversidad del género *Salvia*. Los números indican el número aproximado de especies en cada área.

Tabla 1. Clasificación y distribución del género *Salvia* a nivel subgénero.¹⁴

Subgénero	Distribución
<i>Audibertia</i>	California (USA) y Baja California (México) ¹⁵
<i>Jungia</i> (antiguamente <i>Calosphace</i>)	México, América Central y Sudamérica ^{16 17}
<i>Leonia</i>	Asia, Europa, Asia y Norte América. ¹⁸
<i>Salvia</i>	Asia y Europa ¹⁹
<i>Sclarea</i>	Asia, Europa y México ²⁰

¹³Wood, J.R.; Harley, R.M. The Genus *Salvia* (Labiatae) in Colombia. *Kew Bull.* **1989**, 44, 211-278.

¹⁴Esquivel, B.; Sanchez, A.A.; Aranda, A. Loc.cit.

¹⁵Epling, C. The Californian *Salvias*: A Review of *Salvia* Section *Audibertia*, *Ann. Mo. Bot. Gard.* **1938**, 25, 95-152.

¹⁶Epling, C. The Californian *Salvias*: A revision of *Salvia* Subgenus *Calosphace*, *Feddes Repert. Specierum. Nov. Regni. Beih.* **1939**, 110, 1-383.

¹⁷Wood, J. R.; Harley, R.M. Loc.cit.

¹⁸Benthán, G. *Labiatae*, in *Genera Plantarum*. Bentham, G.; Hooker, J.D., London, 1876, vol. 2, p 1160-1223.

¹⁹*Idem*

²⁰*Idem*

Uno de los rasgos más distintivos del género *Salvia* es la gran diversidad de esqueletos diterpénicos que presentan. Se han aislado más de 30 nuevos esqueletos de este tipo tanto de las partes aéreas como de las raíces, muchos de ellos indicando que provienen de precursores clerodánicos, abietánicos y pimaránicos. En la Figura 2 se muestran los esqueletos diterpénicos encontrados en especies de *Salvia* Americanas. La numeración mostrada está derivada del precursor más probable tomando en cuenta los cambios de conectividad ocurridos.²¹

A medida que avanza la investigación fitoquímica de esta familia, se elucidan nuevas estructuras con los esqueletos base ya mencionados. Uno de los nuevos compuestos tipo diterpeno recientemente descrito en la literatura data de 2011, aportado por Yutaka Aoyagi y su equipo de trabajo, donde se logró identificar un compuesto tipo clerodano con un esqueleto carbonado sin precedente de las partes aéreas de *Salvia leucantha*. El nuevo clerodano **1** (Salvileucalina C) fue caracterizado estructuralmente por técnicas espectroscópicas, estableciendo que mantiene una estrecha relación con salvileucalina D, **2**. Aunque se conocen diterpenos conteniendo una subunidad biciclo [3.2.0]hept-6-eno, este es el primer diterpeno tipo clerodano que presenta una estructura de este tipo.²²

²¹Esquivel, B. Rearranged Clerodane and Abietane Derived Diterpenoids from American *Salvia* Species. *Nat. Prod. Commun.* **2008**, 3(6), 989-1002.

²²Yutaka, A.; Akira, Y.; Reiko K.; Fukuya, T.; Haruhiko, F.; Tadateru, N.; Atsufumi, N.; Nobuaki, M.; Kenji, M.; Koichi, T. Salvileucalin C, a Novel Rearranged Neoclerodane Diterpene from *Salvia leucantha*. *Tetrahedron Lett.* **2011**, 52, 1851–1853

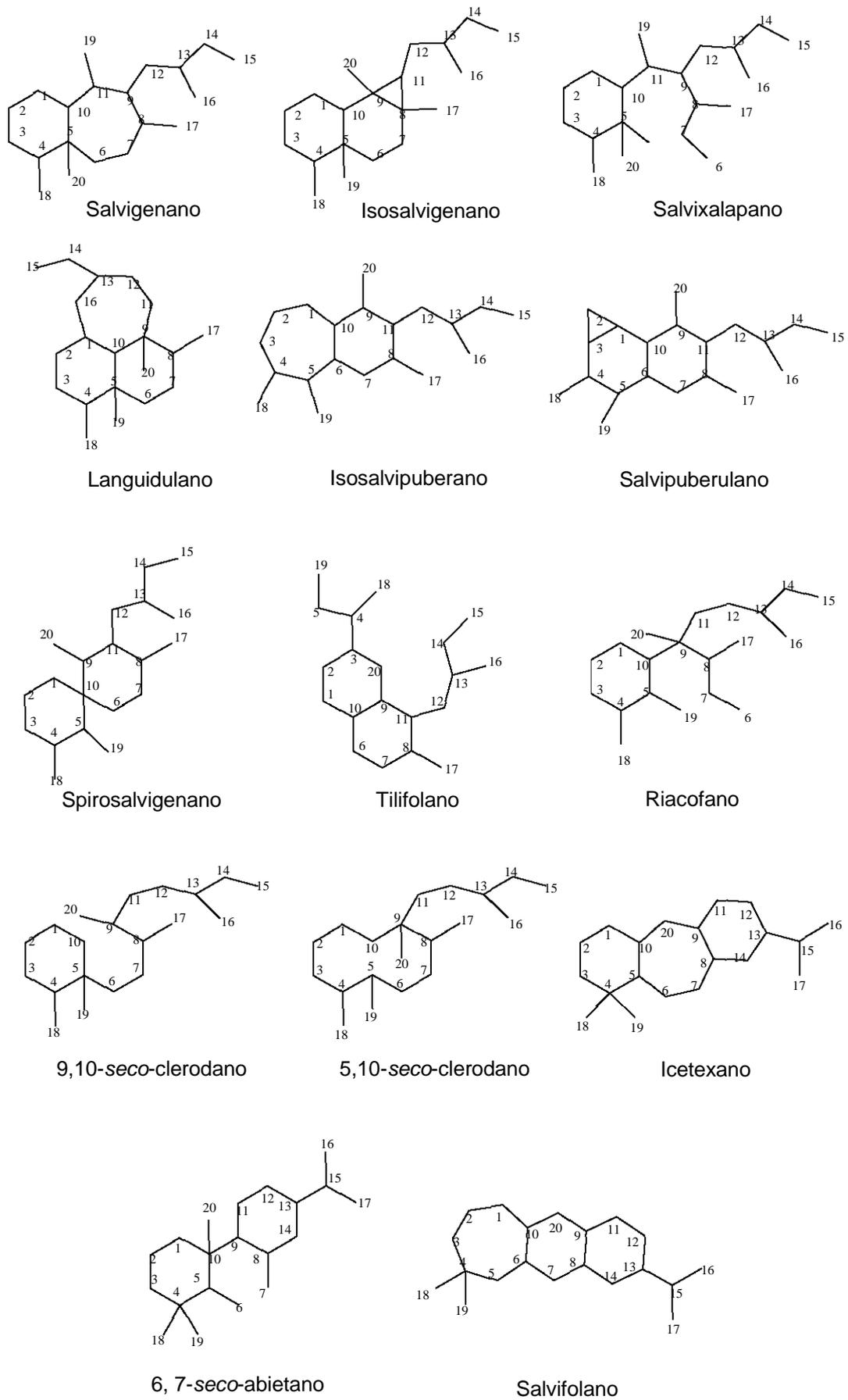
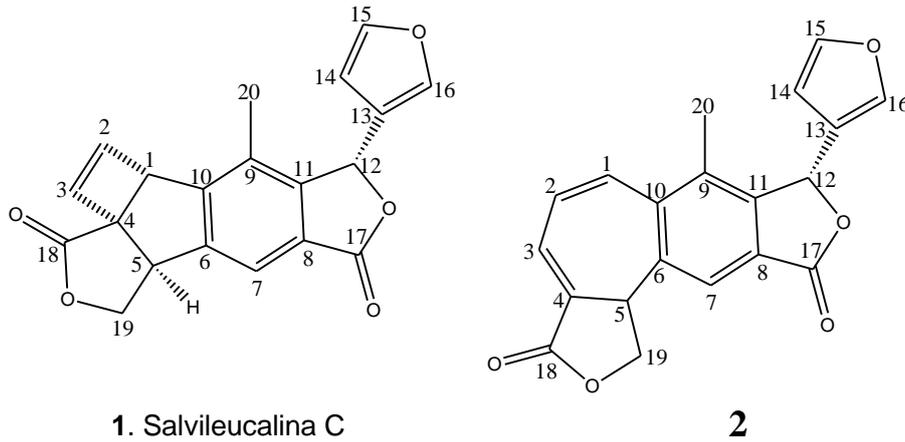


Figura 2. Estructura de esqueletos diterpénicos de *Salvias* americanas.



2.2.1. Actividades biológicas del género *Salvia*

El nombre del género *Salvia* L. proviene del latín *salvare* que significa “para curar o para mantener sanos y salvos” refiriéndose a las propiedades medicinales de algunas de las especies.²³

Este género de la familia Lamiaceae es uno de los más importantes desde el punto de vista medicinal. Algunas especies de este género son cultivadas para ser usadas como especias en comida, perfumería y cosméticos, además de ser usadas en medicina tradicional como espasmolíticas, depresoras del sistema nervioso central, antibacteriales, antidiabéticas y antioxidantes. La Tabla 2 muestra algunos usos tradicionales de algunas salvias del sur de África.²⁴

Una de las especies, quizá la más estudiada por sus múltiples aplicaciones medicinales es la *Salvia officinalis* L, la cual contiene aceites esenciales, diterpenoides, triterpenoides y taninos, a los cuales se les ha atribuido sus múltiples actividades biológicas. El extracto de esta planta ha sido utilizado como antiséptico, antiinflamatorio de la cavidad oral y antihidrótico. Su contribución en la industria cosmética y de alimentos también es importante, ya que el extracto, el aceite esencial o sus constituyentes han mostrado ser excelentes conservadores y aromatizantes. Por otro lado, *Salvia miltiorrhiza* es

²³Blumenthal, M.; Goldberg, A.; Brinkmann, J.; Herbal Medicine: Expanded Commission E Monographs. *Integrative medicine communications*, USA, 2000.

²⁴Kamatoua G.P.P. *Salvia* species: A review of biological activities and phytochemistry. *J Ethnopharmacol.* **2008**, 119, 664–672.

una planta bien conocida en la medicina tradicional china por sus propiedades antiinflamatorias y antitumorales.²⁵

Tabla 2. Usos tradicionales de algunas salvias del sur de África.

<i>Especies</i>	Parte de la planta usada	Modo de uso	Tratamiento
<i>Salvia africana-caerulea</i>	ramas	Infusión con sal y limón	Cólico, diarrea, indigestión dolor abdominal
<i>Salvia africana-lutea</i>	Planta completa	Infusión, decocción	Resfriado, tos y gripe
<i>Salvia chamalaeagnea</i>	hojas	Decocción, infusión	Resfriado, tos y gripe
<i>Salvia triangulris</i>	Planta completa	Decocción con <i>Helichrisum latifolium</i> y <i>Commelina africana</i>	Enfermedades del hígado y esterilidad
<i>Salvia repens</i>	Raíces, hojas planta completa	Decocción	Llagas en el cuerpo y problemas estomacales, diarrea
<i>Salvia runcinata</i>	Planta completa, hojas y semillas	Decocción, asadas	Desinfectante y urticaria
<i>Salvia scabra</i>	hoja	Decocción	Purgante
<i>Salvia spp</i>	Raíces y planta completa	Decocción	Bilis, resfriado y fiebre
<i>Salvia spp</i>	Planta completa	Infusión en combinación con <i>leonorus</i>	Tuberculosis, tos gripe, infecciones bacterianas y resfriados
<i>Salvia stenophylla</i>	Planta completa	Infusión, decocción	Desinfectante

²⁵ Wang, B.Q. *Salvia miltiorrhiza* Chemical and Pharmacological Review of a Medicinal Plant. *J. Med. Plant. Res.* **2010**, 4(25), 2813-2820.

Estudios fitoquímicos de algunos miembros del género *Salvia* y otros géneros de la familia Lamiaceae han proporcionado numerosos metabolitos secundarios con interesantes actividades biológicas, entre ellas se encuentran: antitumorales²⁶, antimicrobianos²⁷, antiinflamatorios²⁸ y agentes antialimentarios contra insectos.^{29, 30}

2.3. *Salvia thymoides*

Información taxonómica.³¹

Reino	Plantae
Phylum	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Género	Thymoides
Especie	<i>Salvia thymoides</i>

Dicha especie fue denominada así por el botánico George Bentham en 1833 con el epíteto *thymoides* como referencia a las pequeñas hojas que semejan el timo.

La primera referencia localizada de esta especie se encuentra en el registro realizado por Carl Epling en 1936 en el herbario de la Real Expedición Botánica de la Nueva España del Real Jardín Botánico de Madrid.³²

²⁶ Costas, D.; Kostas, D.; Hatziantoniou, S.; Anastasaki, T.; Angelopoulou, D. Cytotoxic and Anti-Inflammatory Activity of Labdane and cis-Clerodane Type Diterpenes. *Plant. Med.* **2001**, 614-618.

²⁷ Haznedaroglu, Z. M.; Karabay, U.N.; Zeybek, U. Antibacterial Activity of *Salvia tomentosa* Essential oil. *Phytoteraphy.* **2001**, 72(7), 829-831.

²⁸ De Felice, A.; Bader, A.; Leone, A.; Sosa, S.; Loggia, R. D.; Tubaro, A.; De Tommasi, N.; New Polyhydroxylated Triterpenes and Anti-inflammatory Activity of *Salvia hierosolymitana*. *Plant. Med.* **2006**, 72, 643-649

²⁹ Simmonds, M. S. J.; Blaney, W M.; Lev, S V.; Savona, G.; Bruno. M.; Rodriguez, B. The Antifeedant Activity of Clerodane Diterpenoids from *Teucrium*. *Phytochemistry.* **1989**, 18(4), 1060-1071.

³⁰ Rosselli, S.; Maggio, A.; Piozzi, F.; Simmonds, M. S.; Bruno M. Extremely Potent Antifeedant neo-Clerodane Derivatives of Scutecyprol A. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52, 7867-7871.

³¹ Instituto de Biología. "*Salvia thymoides* Benth. - IBUNAM:MEXU:OAX763851" UNIBIO: Colecciones Biológicas. <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:OAX763851> (consultado en noviembre 28 de 2011).

³² Catálogo del herbario de la real expedición botánica de Nueva España, 1787-1803. Escrito por Paloma Blanco Fernández de Caleya, Adolfo Espejo Serna, Mario Adolfo Espejo, Ana Rosa López-Ferrari, Real Jardín botánico CSIC.

La figura 3 muestra la imagen de *Salvia thymoides*, la cual, es un arbusto delgado, por lo general de aproximadamente 30 cm de altura; hojas largas y obtusas de 4 a 7 mm, raramente de hasta 12 mm, frecuentemente cubiertas de pelillos blancos y enredados. Los pecíolos de hasta 3 mm de largo, las flores dispuestas sobre cortos racimos, de hasta 6 cm de largo, el cáliz de color verde y púrpura oscuro y generalmente con la superficie cubierta de pelos glandulares, es un tubo, que hacia el ápice se divide en dos diminutos labios; la corola de color azul-púrpura, es un tubo de la misma longitud que el cáliz y que en el ápice se divide en dos labios, el superior en forma de capuchón y el inferior mucho más grande, dividido en lóbulos desiguales y con 2 líneas blancas en su parte media; consta de dos estambres.³³ Endémica de México, se localiza en el valle de Tehuacán Puebla³⁴ y algunas partes de Oaxaca³⁵ y Chiapas. Está clasificada en la sección *Floculosae* (subgénero *Jungia*, anteriormente, *Calosphace*, familia Labiatae).



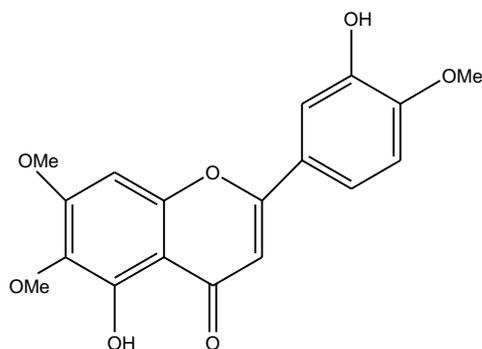
Figura 3. *Salvia thymoides* Benth, colectada en el Valle de Tehuacán Puebla. Fotografía tomada en noviembre de 2011.

³³ *Salvia thymoides* Benth. www.conabio.gob.mx. (consultado en octubre 27 de 2011)

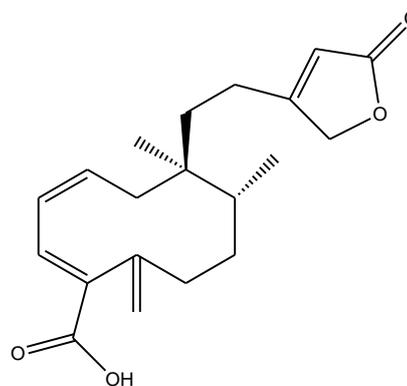
³⁴ Valiente-Banuet, A.; Flores-Hernández, N.; Verdú, M.; Dávila, P. The Chaparral Vegetation in Mexico Under non Mediterranean Climate: the Convergence and Madrean-Tethyan Hypotheses Reconsidered. *Am. J. Bot.* **1998**, 85(10), 1398-1408.

³⁵ Epling, C. Loc.cit

Como antecedentes de este trabajo, en 1989 se realizó un estudio de esta planta colectada en el estado de Oaxaca, donde se describió que entre sus constituyentes, se encuentran los siguientes componentes: ácidos betulínico y oleanólico, eupatorina (**3**) y un ácido 5,10-secoclerodano (**4**).³⁶

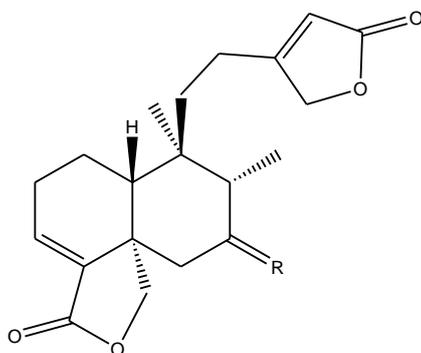


3. Eupatorina

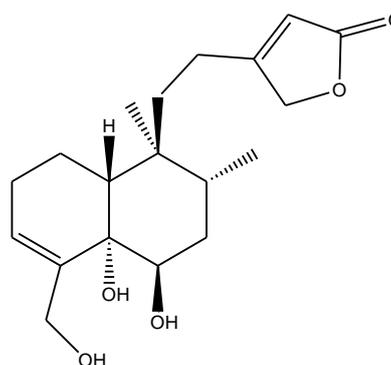


4

Por otro lado, en 1997 los investigadores, Emma Maldonado y Alfredo Ortega, del Instituto de Química de la UNAM, ampliaron el estudio fitoquímico de esta especie, colectada en el mismo lugar, reportando la presencia de sitosterol, betulina, 5,6-dihidroxi-7,3',4'-trimetoxiflavona, 5,6,4'-trihidroxi-7,3'-dimetoxiflavona, los diterpenoides **5** y **6** y el compuesto mayoritario en esta especie, thymonina (**7**) en las partes aéreas de dicha especie.³⁷



5. R=α-OH, β-H
6. R=O



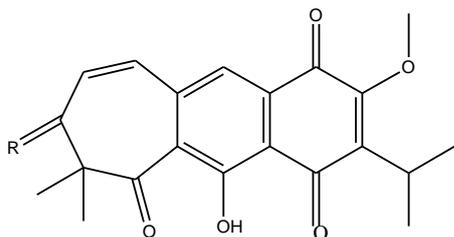
7. Thymonina

Adicionalmente, en 2005, los investigadores Baldomero Esquivel y Ana Adela Sánchez, analizaron la composición de las raíces de *Salvia thymoides*, lo que llevó al aislamiento de tres nuevos diterpenos con esqueletos transpuestos tipo

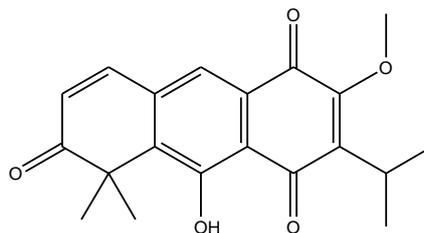
³⁶Flores, E. A. Estudio fitoquímico de *Salvia thymoides* Benth. Tesis, Facultad de Química UNAM. 1989.

³⁷Maldonado, E.; Ortega, A. Neo-clerodane diterpenes from *Salvia thymoides*. *Phytochemistry*. **1997**, 46(7), 1249-1254.

icetexano (**9,10** y **11**), además de una quinona ya reportada en la literatura (**8**).³⁸



- 8.** R=H,H. Tilifolidiona
9. R=O. 3-oxo-tilifolidiona
10. R=H,OH. 3-hidroxitilifolidiona



- 11.** 5-*nor*-3-oxo-tilifolidione

2.4. Terpenoides y sus actividades biológicas

Unos de los compuestos más importantes conocidos por su valor medicinal son los terpenoides, algunos de ellos han sido usados por siglos con fines terapéuticos, como antimicrobianos, antitumorales, citotóxicos y antiinflamatorios, de ahí que en las últimas décadas se ha incrementado la investigación sobre este tipo de compuestos. Muchos de los terpenoides encontrados en años recientes han sido aislados de familias de plantas, como Asteraceae y Lamiaceae.

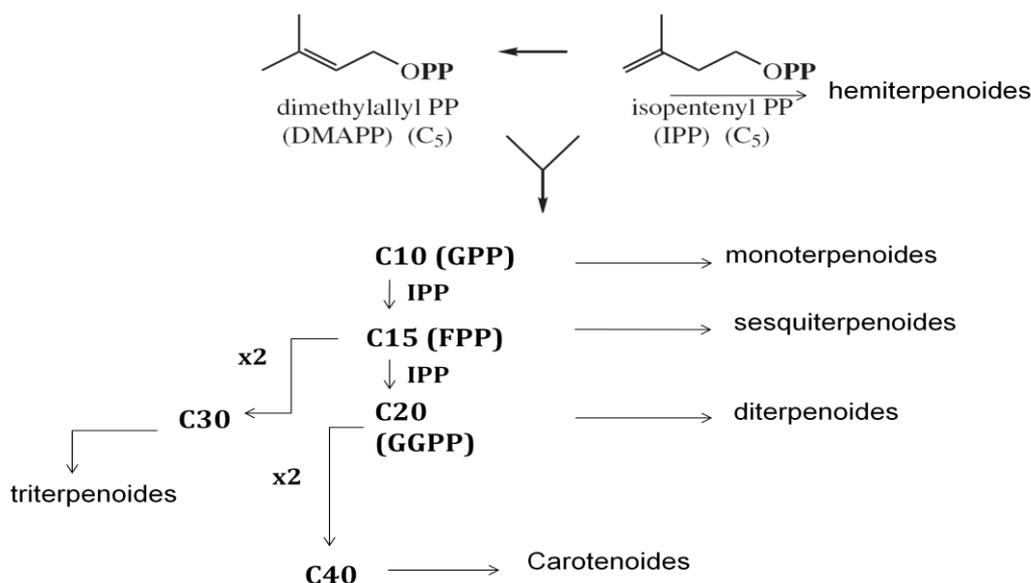
Se ha postulado que el mecanismo de acción a través del cual los terpenoides ejercen su efecto antiinflamatorio es inhibiendo la factor de transcripción nuclear KB (NF- κ B), que regula la transcripción de varias citocinas inflamatorias como son IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 y TNF- α .³⁹

Los terpenos son un amplio grupo de compuestos caracterizados por la unión consecutiva de unidades isoprenicas. El difosfato de isopentenilo (IPP) es el intermediario central de la biosíntesis de isoprenoides, el cual es sintetizado por dos posibles vías: mevalonato y desoxixilulosa-5-fosfato (DXP), la primera

³⁸Esquivel, B.; Sánchez, A.A. Rearranged Icetexane Diterpenoids from the Roots of *Salvia thymoides* (Labiatae). *Nat. Prod. Res*, **2005**, 19(4), 413–417.

³⁹De las Heras, B.; Hortelano, S. Drug Targets. *Inflammation & Allergy*. **2009**, 8, 28-39.

operando en el citosol y la segunda en los plástidos.^{40,41} El esquema 1 muestra la formación de los precursores de diterpenos a partir del IPP y DMAPP.



Esquema 1. Formación de precursores de terpenoides.

Los diterpenos son compuestos caracterizados por poseer una estructura básica de 20 carbonos y proceder del precursor 2*E*,6*E*,10*E*-geranilgeranilpirofosfato (GGPP), presentando una gran variabilidad estructural. Tanto los clerodanos como los abietanos derivan de estructuras labdánicas formadas a través de una ciclación ácido-catalizada del GGPP.

Los diterpenos clerodánicos constituyen un grupo de sustancias que ha atraído el interés en los últimos años por sus novedosas estructuras químicas y su actividad insecticida y antialimentaria contra algunos insectos tales como *Spodoptera exempta* y *S. littoralis* que causan importantes pérdidas económicas.^{42,43} Sin embargo también se les han atribuido interesantes actividades farmacológicas.

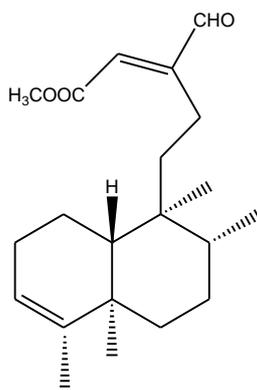
⁴⁰Lange, M.; Rujan, T.; Martin, W.; Croteau, R. Isoprenoid Biosynthesis: The Evolution of Two Ancient and Distinct Pathways Across Genomes. *PNAS*. **2000**, 97(24), 13172–13177.

⁴¹Croteau, R.; Kutchan, T. M.; Lewis, N. G. "Natural Products (Secondary Metabolites)". In: Buchanan, Gruissem, Jones, eds.. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland, Estados Unidos. 2000. Cap. 24.

⁴²Rodríguez, B.; de la Torre, M.C.; Perales, A.; Malakov, P.Y.; Papanov, G.Y.; Simmonds, M.S.J., Blaney, W.M. Oxirane-opening Reactions of Some 6,19-oxygenated 4 α -18-epoxy-neo-clerodanes Isolated from *Teucrium*. Biogenesis and Antifeedant Activity of their Derivatives. *Tetrahedron*. **1994**, 50(18), 5451-5468.

⁴³Domínguez, M.J.; Mossner, E.; de la Torre, M.C.; Rodríguez, B. Hemisynthesis of Some Biogenetically Anomalous 17 β -neoclerodane Diterpenoids. *Tetrahedron*. **1998**; 54 (47), 14377-14400

Aunque se han reportado pocos casos de compuestos antiinflamatorios con esqueletos tipo clerodano, se ha descubierto que este tipo de estructuras también pueden presentar dicha actividad. Un ejemplo de ello es el compuesto **12**, el cual fue aislado en 2006 de la corteza de *Polyanthia longifolia* var. *pendula* y presenta actividad antiinflamatoria en el modelo de fMLP/CB con una CI_{50} de $0.60 \pm 0.09 \mu\text{g/mL}$.⁴⁴

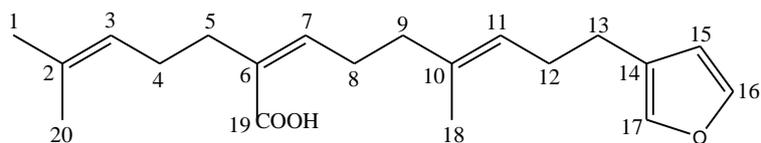
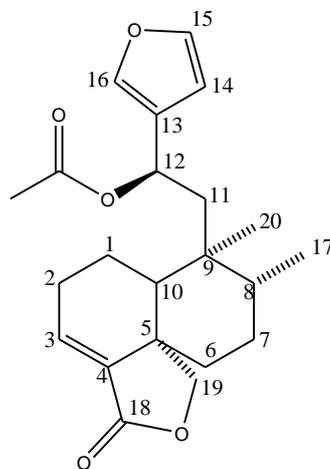


12

Adicionalmente, en 2008 Iana Bantim Felício Calou y colaboradores, reportan dos diterpenos (**13** y **14**) aislados de las flores de *Egletes viscosa* (Asteraceae) que manifiestan actividad antiinflamatoria en el modelo de TPA (inflamación aguda) y en la dermatitis crónica inducida por oxazolona (inflamación crónica), uno de ellos corresponde a un clerodano (**14**), ambos compuestos presentan una inhibición del edema dependiente de la dosis de manera similar a la dexametasona, fármaco usado como referencia.⁴⁵

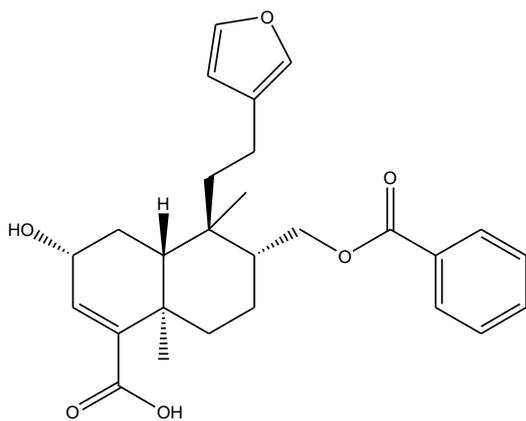
⁴⁴Fang-Rong, C.; Tsong-Long, H.; Yu-Liang Y.; Chia-En, Li.; Chin-Chung. W.; Hamad, H. I.; Wen-Bin, H.; Yang-Chang, W. Anti-inflammatory and Cytotoxic Diterpenes from Formosan *Polyalthia longifolia* var. *pendula*. *Plant. Med.* **2006**, 72(14), 1344-1347.

⁴⁵Calou, I.B.; Sousa, D. I.; Cunha, G.M.; Brito, G.A.; Silveira, E.R.; Rao, V.S.; Santos, F.A. Topically Applied Diterpenoids from *Egletes viscosa* (Asteraceae) Attenuate the Dermal Inflammation in Mouse Ear Induced by Tetradecanoylphorbol 13-acetate-and Oxazolone. *Biol. Pharm. Bull.* **2008**, 31(8), 1511–1516.

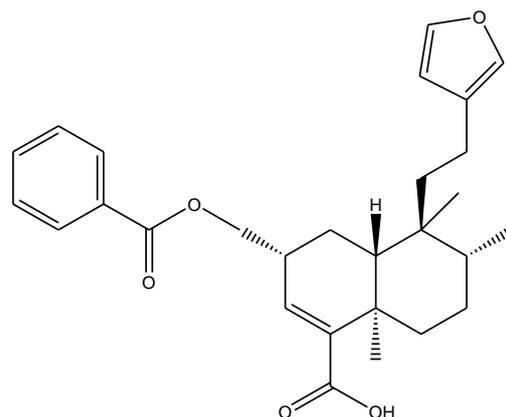
**13****14**

En 2011 se reportaron dos diterpenos (**15** y **16**) tipo clerodano aislados del extracto metanólico de las hojas de *Dodonaea polyandra* (género *Sapindaceae*), producto de un estudio biodirigido y cuya elucidación estructural se llevó a cabo por diferentes técnicas espectroscópicas (IR, RMN y UV) y espectrometría de masas. Dichos compuestos fueron evaluados en el modelo de inflamación inducida por TPA, exhibiendo una actividad de (70-76%) a una dosis de 0.22 y 0.9 $\mu\text{mol/oreja}$ después de 8 horas, observándose un decremento en la actividad de ambos compuestos al hidrolizar el éster.⁴⁶

⁴⁶Simpson, B.S.; Claudie D.J.; Gerber, J.P.; Pyke, S.M.; Wang, J.; McKinnon, R.A.; Semple, S.J.; In Vivo Activity of Benzoyl Ester Clerodane Diterpenoid Derivatives from *Dodonaea polyandra*. *J. Nat. Prod.* **2011**, *74*, 650–657.



15



16

Por otro lado, los terpenoides tipo abietano también han puesto de manifiesto su actividad como antiinflamatorios, por ejemplo: la planta *Isodon rubescens* (Hemsl.) H. Hara, especie endémica de China perteneciente a la familia Labiatae, ha atraído la atención debido a sus propiedades antibacterianas, antivirales y antiinflamatorias. Dicha planta contiene principalmente *ent*-kauranos y *ent*-abietanos, a los cuales se han atribuido dichas actividades.⁴⁷

2.4.1. Triterpenos

Los triterpenos pentacíclicos son un grupo de compuestos de importancia debido a su amplio espectro de propiedades biológicas, los ácidos ursólico, maslínico, oleanólico y betulínico presentan potencial terapéutico en cáncer, inflamación o SIDA, por sólo mencionar algunos.

Los esqueletos más comunes detectados en las especies de *Salvia* son los ursano, oleanano y lupano, los cuales exhiben una gran variedad de actividades biológicas; de hecho, los ácidos ursólico y oleanólico se han encontrado en casi todas las *Salvias* estudiadas hasta el momento. Dichos ácidos exhiben actividades antimicrobianas, antiinflamatorias, antihiperlipidémica, antiulcerosas, hepatoprotectivas, hipoglicémicas, anticarcinogénicas y antiangiogénicas, entre otras.⁴⁸

En el mismo contexto, el género *Salvia* también ha tenido una aportación importante ya que se ha logrado aislar y caracterizar diferentes metabolitos

⁴⁷Han, Q.; Lu, Y.; Zhang, L. I.; Zheng, Q.I.; Sun, H.H. Novel *ent*-kaurane Dimers from *Isodon rubescens* var. *rubescens*. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 2833-2837.

⁴⁸Topçu, G. Loc.cit.

secundarios que han resultado activos como antiinflamatorios. En la Figura 4 se muestran algunos triterpenos aislados del extracto clorofórmico de las hojas de *Salvia hierosolymitana* con actividad antiinflamatoria.⁴⁹ Por otro lado, se ha reportado la actividad antiinflamatoria de *Salvia mexicana* L. var. *Minor* Benth, la cual fue atribuida al ácido ursólico y β -sitosterol, constituyentes aislados de la planta junto con betulinol, ácido betulínico y arbutina.⁵⁰

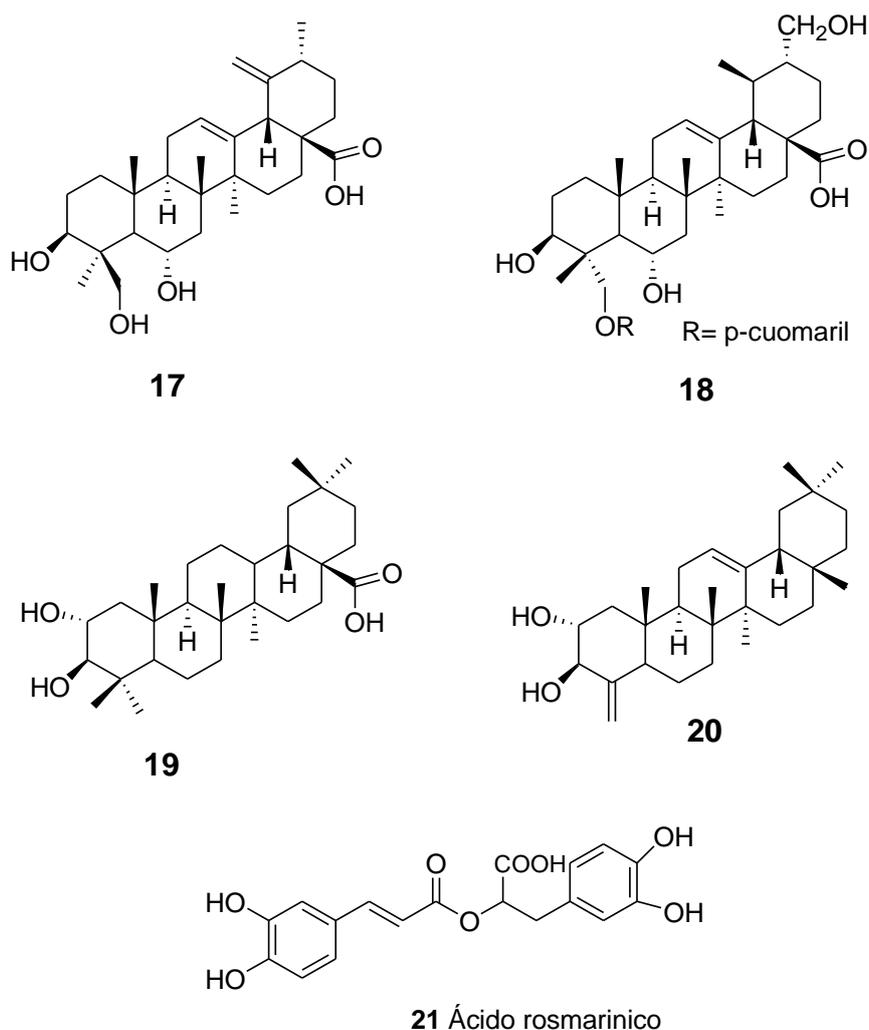


Figura 4. Triterpenos aislados de *Salvia hierosolymitana* con actividad antiinflamatoria.

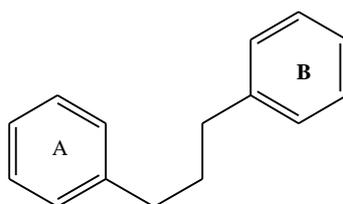
⁴⁹De Felice, A.; Bade, A.; Leone, A.; Sosa, S.; Loggia, R.D.; Tubaro, A.; De Tommasi, N. New Polyhydroxylated Triterpenes and Anti-inflammatory Activity of *Salvia hierosolymitana*. *Plant. Med.* **2006**, *72*, 643-649.

⁵⁰Argumedo; D.R.; Parra-Delgado, H.; Ramirez, A. M. T.; Nieto, C.A.; Martínez-Vázquez, M. Isolation and Chemical Transformations of Some Anti-inflammatory Triterpenes from *Salvia mexicana* L. var. *Minor* Benth. *Rev. Soc. Quím. Méx.* **2003**, *47*(2), 167-172.

2.5. Flavonoides.

Los flavonoides son un grupo de metabolitos secundarios que se distribuye en las plantas vasculares de manera ubicua, siendo las Rutáceas, Poligonáceas, Asteráceas y Apiáceas las principales familias que los contienen. Abundan sobre todo, en las partes aéreas jóvenes y más expuestas al sol, ya que la luz solar favorece su síntesis.⁵¹ En los órganos en los que están presentes (frutos, hojas, flores y cortezas), actúan como copigmentos o como responsables directos de la coloración de los mismos.⁵²

Los flavonoides tienen una estructura química definida (**22**), C6-C3-C6, que procede de dos rutas biosintéticas: el anillo A se biosintetiza a través de la ruta de los policétidos, mientras que el B y la unidad C3 proceden de la ruta del ácido shikímico.



22

Desde el punto de vista de sus propiedades biológicas, numerosos estudios *in vitro* ponen de manifiesto que estos compuestos tienen efectos antioxidantes, reducen la formación de radicales libres, pueden inhibir la peroxidación lipídica, poseen efectos antimutagénicos y tienen la capacidad de inhibir diversas enzimas.⁵³ Asimismo, estudios *in vivo* demuestran que potencialmente los flavonoides presentan numerosas actividades farmacológicas, destacando las acciones: Protectora vascular, antitumoral, analgésica, antiinflamatoria, antialérgica, antiulcerosa y hepatoprotectora.^{54, 55}

⁵¹López-Luengo, M. T. Flavonoides. *Offarm.* **2002**, 21 (4), 108-113.

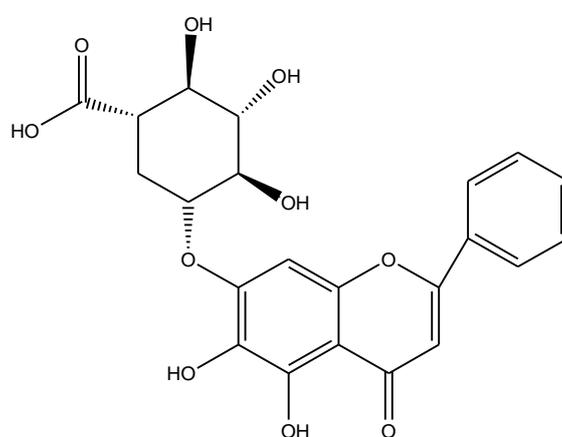
⁵²Bruneton, J. Terpenos y Esteroides. In: *Farmacognosia: Fitoquímica. Plantas Medicinales*, 2nd ed.; Acribia, S.A. España, 2001, pp 457-651.

⁵³Lopez-Luengo, M.T. Loc.cit.

⁵⁴Zaragozá-García, F.; Tofiño-González, M.I.; Oliveira-Santamaría, L. Flavonoides y fitoterapia. *Revista de Fitoterapia.* **2002**, 2(1), 21-32.

⁵⁵Álvarez-Castro, E.; Orallo-Cambeiro, F. Actividad Biológica de los Flavonoides (I). *Acción Frente al Cáncer. Offarm.* **2003**, 22(10), 130-140.

La familia Lamiaceae es una fuente rica en flavonoides bioactivos,⁵⁶ un ejemplo notable de ello se encuentra en *Scutellaria baicalensis* Georgi (Lamiaceae), una planta usada en el tratamiento de una variedad de desórdenes inflamatorios, tales como: bronquitis, nefritis, hepatitis, asma y dermatitis atópica. Se han aislado flavonoides antioxidantes, los cuales han mostrado tener propiedades de inhibir la producción de NO, la expresión de iNOS y los niveles de TNF- α en macrófagos estimulados con LPS. El compuesto **23** corresponde a la baicalina, uno de los flavonoides aislados de *Scutellaria baicalensis* con actividad antiinflamatoria.^{57, 58}



23. Baicalina

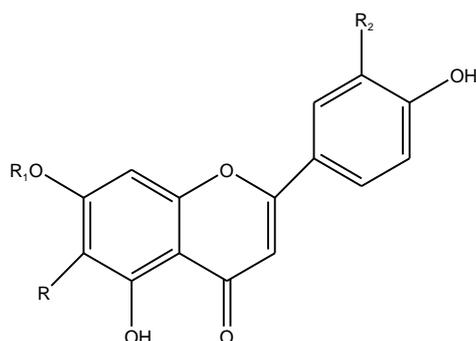
Los compuestos **24**, **25**, **26** y **27** muestran otros ejemplos de flavonoides aislados de *Leonotis leonurus*, a los cuales se han atribuido propiedades antiinflamatorias.⁵⁹

⁵⁶Ulubelen, A.; Topcu, G.; Kolak, U. Labiatea Flavonoids and their Bioactivity in: Studies in Natural Products Chemistry. In Bioactive Natural products (part K) Atta-ur-Rahman Ed. Elsevier UK. **2005**; 30, 233-302.

⁵⁷Kubo, M.; Matsuda, H.; Tanaka, M.; Kimura, Y.; Okuda, H.; Higashino, M.; Tani, T.; Namba, K.; Arichi, S.; Studies on *Scutellaria* radix: VII. Antiarthritic and Anti-inflammatory Actions of Methanolic Extract and Flavonoids Components from *Scutellariae* radix. Chem. Pharm. Boull. **1984**, 32, 2724-2729.

⁵⁸Chen, Y. C.; Shen, S.C.; Chen, L.G; Lee, T. I.; Yang, L. L. Wogonin, Baicalin and Baicalein. Inhibition of Inducible Nitric Oxide Synthase Inhibitors and Lipopolysaccharide. Biochem. Pharmacol. **2001**, 61, 1417-1427.

⁵⁹El-Ansari, M.A.; Aboutabl, E.A.; Razik, H.A.; Sharaf, M.; Hawas, U.W.; Soliman, G.M.; El-Seed, S.G.; Phytochemical and Pharmacological Studies on *Leonotis leonorus*. Pharm. Biol. **2009**, 47(9), 894-902.



24	R	R1	R2
25	OH	CH3	H
26	H	H	H
27	OH	GLUA ⁶ -Me	H

De esta manera se puede decir que la familia Lamiaceae y por ende, el género *Salvia*, poseen una amplia variedad de componentes con múltiples actividades biológicas y por lo tanto son excelentes candidatos para la búsqueda de nuevas sustancias con diversas actividades biológicas.

2.6. Generalidades del proceso inflamatorio

El proceso inflamatorio incluye una serie de reacciones desencadenadas por diversos estímulos exógenos o endógenos, tales como: infecciones bacterianas, isquemia, interacciones antígeno-anticuerpo, así como lesiones térmicas o físicas, donde cada tipo de estímulo provoca un patrón característico de reacción o respuesta. A nivel macroscópico, el cuadro clínico muestra eritema, edema y dolor. Las respuestas inflamatorias surgen en tres fases, donde, al parecer, cada una es regulada por mecanismos distintos: una fase transitoria aguda caracterizada por vasodilatación local y mayor permeabilidad capilar; una fase subaguda tardía que se identifica por la infiltración de polimorfonucleares y una fase proliferativa crónica en la que se manifiesta degeneración y fibrosis tisular.

El estudio de los mecanismos a través de los cuales se lleva a cabo el proceso inflamatorio, ha llevado a determinar las enzimas y mediadores involucrados en éste. En el proceso global intervienen muchos mecanismos, algunos mediados por una variedad de moléculas de señalización, además de la activación de los factores de complemento. Los mediadores pertenecen a diferentes clases químicas, tales como aminas (histamina, serotonina), proteínas y péptidos (enzimas hidrolíticas, citocinas, factores del complemento, anticuerpos y

quininas), especies reactivas de oxígeno (ROS, anión superóxido, hidroperóxido y radicales hidroxilos), y lípidos (factores activadores de plaquetas, prostanoïdes y leucotrienos). Estos mediadores inician, mantienen, agravan y modulan el curso del proceso inflamatorio. Por otro lado, existen mediadores que pueden actuar como antiinflamatorios, por ejemplo: el ácido 15-(R)-hidroxieicosatetraenóico (15-(R)-HETE) y lipoxinas de los productos de la cascada del ácido araquidónico o la interleucina-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-10, IL-12 e IL-13 de la familia de citocinas, las cuales ejercen acciones pro y antiinflamatorias dependiendo de su participación en la respuesta inmuno-específica.⁶⁰

Existen dos tipos de células implicadas en la inflamación, unas que se encuentran en forma permanente en los tejidos, como son los mastocitos o las células endoteliales, y otras que pueden migrar y acceden al sitio afectado desde la sangre, como son los neutrófilos polimorfonucleares, monocitos, macrófagos y linfocitos. Estas células producen una gran cantidad de moléculas activas que, de manera directa o indirecta, son mediadores del proceso inflamatorio.

2.6.1. Dermatitis

La dermatitis es una inflamación de la piel, la cual se hace evidente por edema y eritema, infiltración de neutrófilos, aumento en la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MOP); e hiperplasia de la epidermis asociada con el incremento de poliaminas, prostaglandinas y leucotrienos.

Existen varios modelos de inflamación de diferente naturaleza en el tejido cutáneo empleando animales de experimentación. Cada uno se basa en el uso de un agente irritante aplicado directamente sobre la piel (*in situ*) o bien inyectando aquel en una parte específica del organismo. El 13-acetato de 12-O-tetradecanoil-forbol (TPA) es un agente irritante el cual produce una inflamación aguda y se utiliza para evaluar anti-inflamatorios de tipo esteroïdal y no esteroïdal, mientras que el etil-fenil-propiolato (EPP) al igual que el TPA

⁶⁰Nathan, C. Points of Control in Inflammation. *Nature*. **2002**, 420, 846-852.

produce inflamación aguda pero sólo se utiliza para evaluar anti-inflamatorios de tipo esteroideal.⁶¹

⁶¹Roitt, I. M.; Brostoff, J.; Male, D. K. Inmunología: 3rd Ed.; Fontan, F. F. trad. Ediciones Científicas y Técnicas S. A. 1989; p 15.

3. JUSTIFICACIÓN

El motivo que impulsa a la elección de los productos naturales derivados de plantas con aplicaciones medicinales como área de estudio, se basa en la necesidad de encontrar compuestos líderes en el desarrollo de medicamentos que presenten mayor eficacia y disminuyan o anulen los efectos adversos de los que se encuentran actualmente en el mercado.

La habilidad para desencadenar una reacción inflamatoria es esencial para la supervivencia de los organismos, dado los innumerables agentes patógenos y nocivos ambientales existentes, sin embargo una excesiva respuesta inflamatoria causa morbilidad y mortalidad en enfermedades tales como, arteriosclerosis, tromboembolismo, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, peritonitis, y artritis reumatoide, entre otras, por lo que la búsqueda de compuestos que frenen esta respuesta es de vital importancia para preservar las condiciones fisiológicas del organismo.

Estudios previos han mostrado que diversas especies del género *Salvia* son usadas en la medicina tradicional como antiinflamatorios, por lo que se requieren estudios científicos que avalen dicho uso.

Aunque se ha demostrado que el género *Salvia* es una fuente rica en ácidos ursólico y oleanólico y que estos ácidos poseen actividad antiinflamatoria, también se han encontrado estructuras del tipo clerodano y flavonoide con dicha actividad, por lo que la determinación de los componentes antiinflamatorios de la planta es importante tanto de un punto de vista biológico como estructural.

Si bien es cierto que la especie ha sido estudiada, las investigaciones llevadas a cabo se realizaron utilizando muestras colectadas en distintas condiciones, tanto geográficas como temporales, y dado que se ha demostrado que el metabolismo secundario de las plantas es dependiente de estos factores, se infiere que la composición química puede ser diferente.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Realizar el estudio biodirigido de extracto acetónico de las hojas de *Salvia thymoides* colectada en el estado de Puebla con la finalidad de determinar la estructura química de los metabolitos secundarios que le confieren la actividad antiinflamatoria.

4.2. Objetivos específicos

Realizar la colecta de la planta *Salvia thymoides* Benth en el Valle de Tehuacán, Puebla.

Obtener el extracto acetónico de las hojas de *Salvia thymoides* Benth.

Realizar el fraccionamiento cromatográfico biodirigido del extracto acetónico, usando como prueba de actividad antiinflamatoria el modelo de edema inducido por TPA.

Elucidar la estructura de los componentes antiinflamatorios aislados por medio de los métodos espectroscópicos y espectrométricos pertinentes.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Material vegetal

La especie vegetal, *Salvia thymoides*, fue colectada por el M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez en Tehuacán, Puebla en septiembre de 2010 e identificada por la M. en C. María del Rosario García Peña. Un ejemplar de referencia fue depositado en el herbario del Instituto de Ecología de la UNAM.

5.2. Secado y fragmentación

El material vegetal, se secó a temperatura ambiente y bajo la sombra obteniéndose 1800 g de hojas secas. Posteriormente, éstas se fragmentaron manualmente.

5.3. Extracción

La extracción de los componentes de las hojas se efectuó mediante maceración en acetona, tres veces consecutivas por 36 horas cada una.

El extracto acetónico se concentró por destilación a presión reducida hasta sequedad, obteniéndose 110 g de extracto seco.

5.4. Estudio biodirigido de la actividad antiinflamatoria del extracto de *Salvia thymoides*

El extracto obtenido fue sometido a evaluación de su actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido por TPA. Dada la actividad mostrada por el mismo, se efectuó un ensayo biodirigido de la actividad antiinflamatoria en el modelo ya establecido para determinar los metabolitos secundarios responsables de la actividad biológica.

El estudio de actividad antiinflamatoria se llevó a cabo en el laboratorio de pruebas biológicas del Instituto de Química de la UNAM por el M. en C. Antonio Nieto Camacho.

La descripción del modelo de edema inducido por TPA se detalla a continuación y el diagrama 1 muestra el proceso del estudio biodirigido.

5.4.1. Modelo de edema inducido por TPA

Para la realización de esta prueba se emplearon ratones macho de la cepa CD1 de entre 25-30 g de peso. Se pesaron los ratones y posteriormente fueron separados en grupos de tres a ocho ratones cada uno, donde uno de los grupos se tomó como control negativo al ser tratado solo con TPA en el vehículo usado y los restantes como grupos tratados con TPA más el compuesto o extracto. Una vez marcados y separados, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico con una dosis de 30 mg/Kg, la cual fue administrada por vía intraperitoneal.

En la oreja derecha se aplicaron 10 μ L de una solución etanólica de TPA a una concentración de 0.25 mg/mL con una jeringa Hamilton, la oreja izquierda fue usada como control, aplicándose en ella, solo el vehículo. Transcurridos 10 minutos se aplicaron 20 μ L de solución del compuesto o extracto a las concentraciones adecuadas para cada uno, en la oreja derecha. Se desarrolló la inflamación durante un periodo de 4 horas, después de lo cual, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se extrajo una porción de 7 mm de diámetro de la porción central de cada oreja con la ayuda de un sacabocados.

Cada una de las porciones de orejas tratadas y controles fue pesada en una balanza analítica. La medida de la respuesta antiinflamatoria se obtuvo por diferencia de pesos entre ambas orejas.

El porcentaje de inhibición del edema se obtuvo de la siguiente manera:

$$\% \text{ de Inhibición} = [(C-E) / C] \cdot 100$$

Donde;

C= edema del grupo tratado con TPA

E= edema del grupo tratado con TPA más extracto o compuesto puro.

Para la determinación de la CI_{50} se graficó el log de la concentración vs el % de inhibición del edema y se aplicó una regresión lineal para obtener la concentración a la cual se obtenía el 50% de respuesta, el resultado se reporta en μ mol/oreja o mg/ oreja.

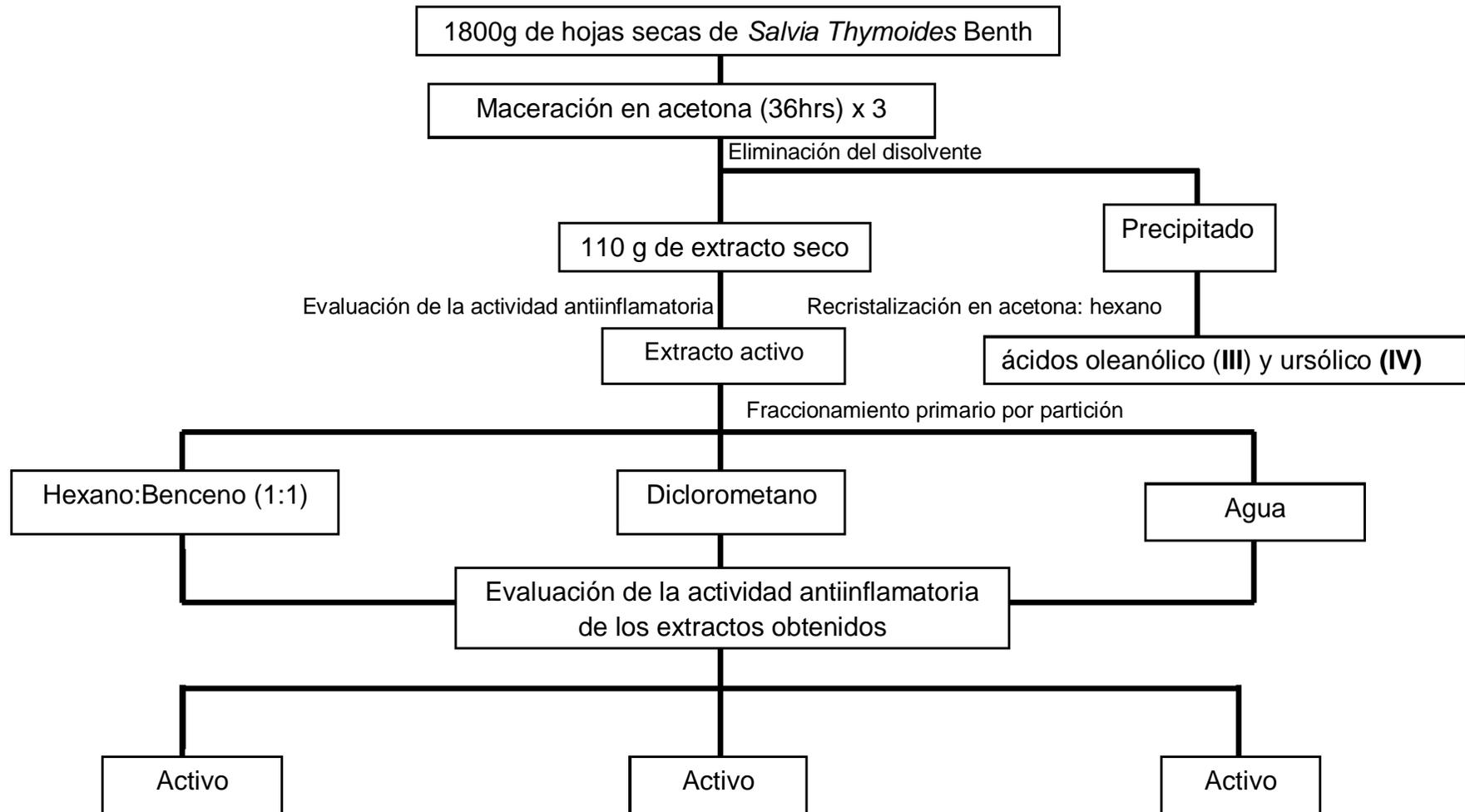
Diagrama 1. Diagrama experimental para el estudio biodirigido de la actividad antiinflamatoria de las hojas de *Salvia thymoides*.

Diagrama 1. Diagrama experimental para el estudio biodirigido de la actividad antiinflamatoria de las hojas de *Salvia thymoides* (Continuación)

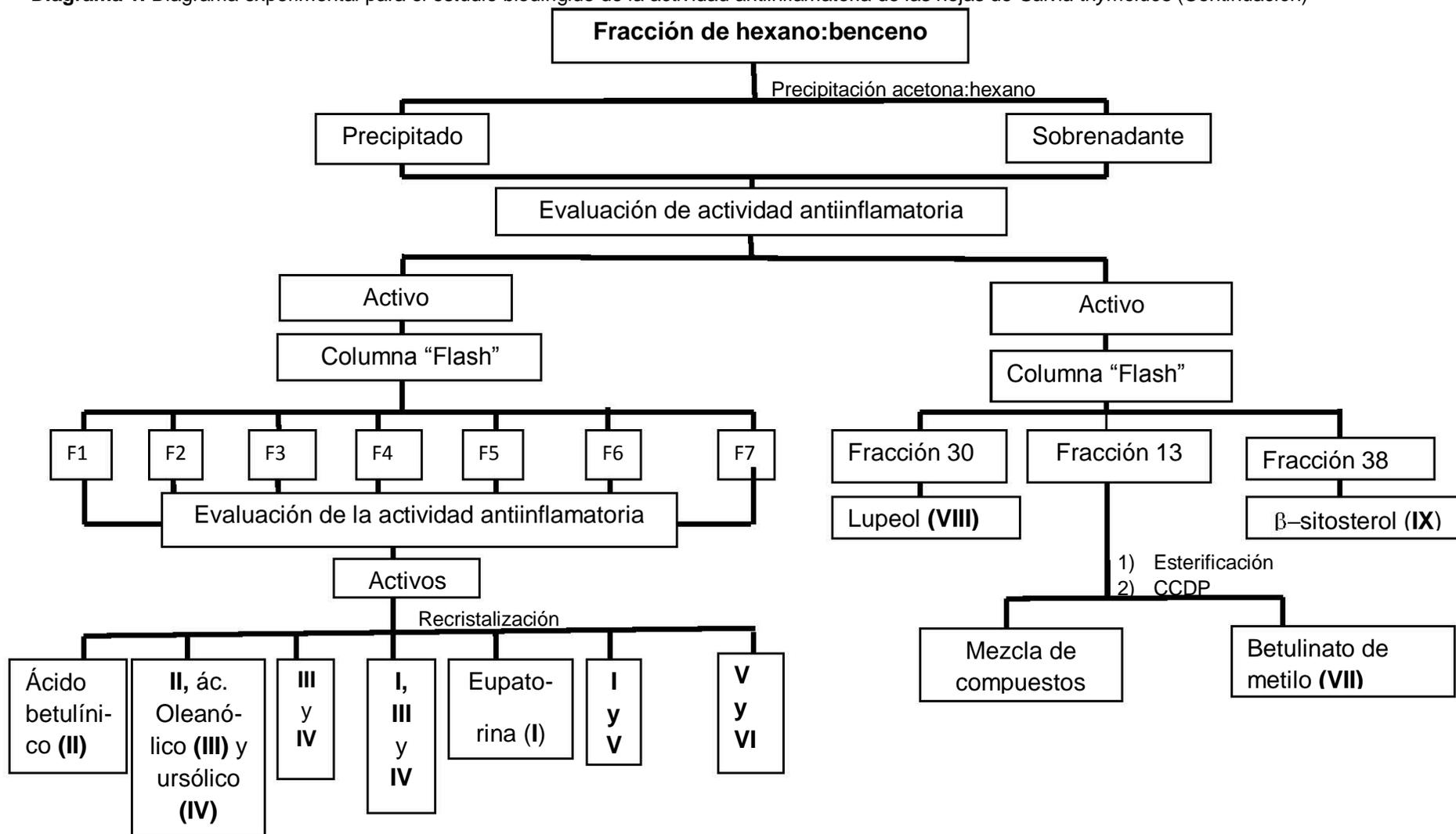


Diagrama 1: Diagrama experimental para el estudio biodirigido de la actividad antiinflamatoria de las hojas de *Salvia thymoides* (Continuación).

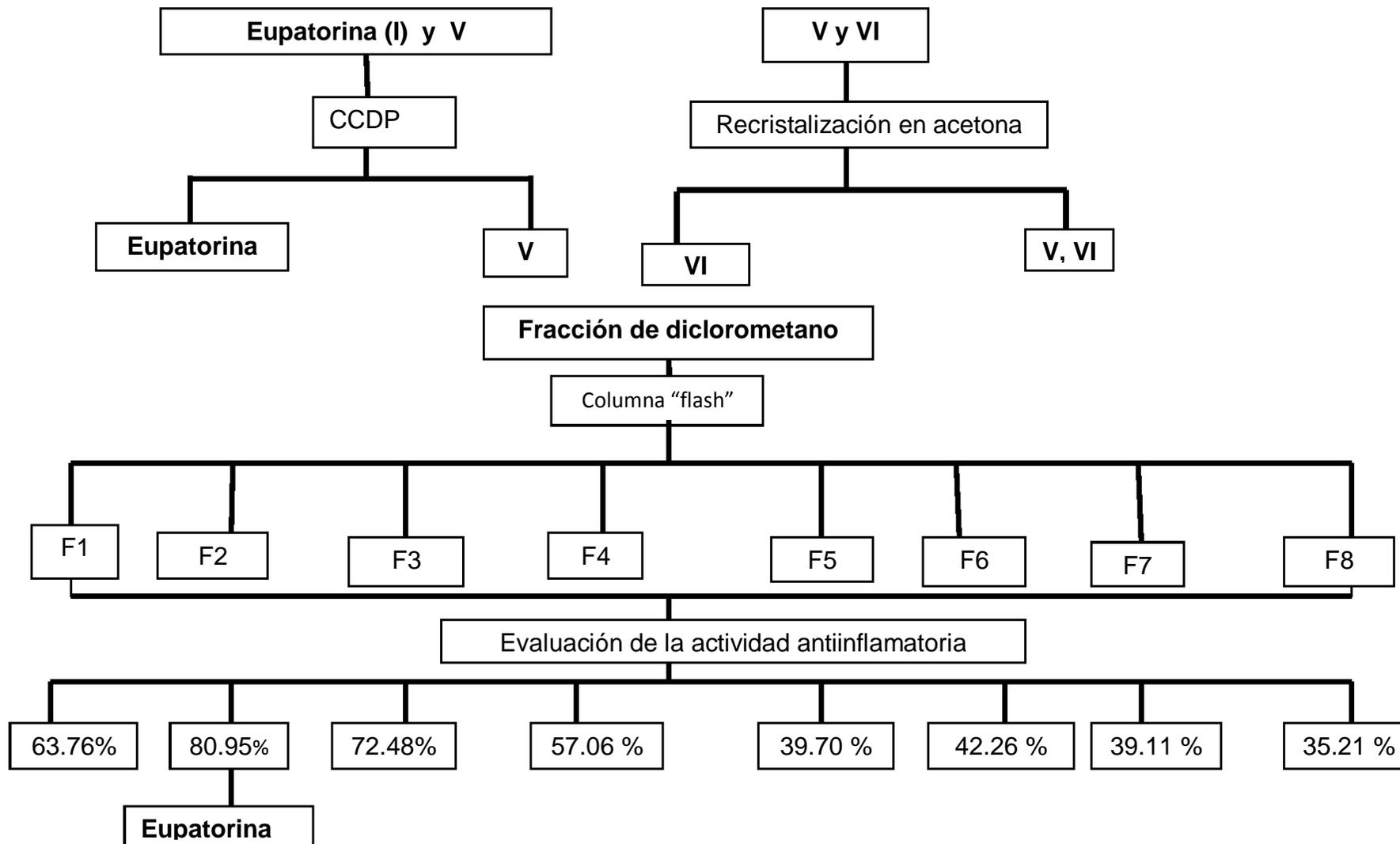
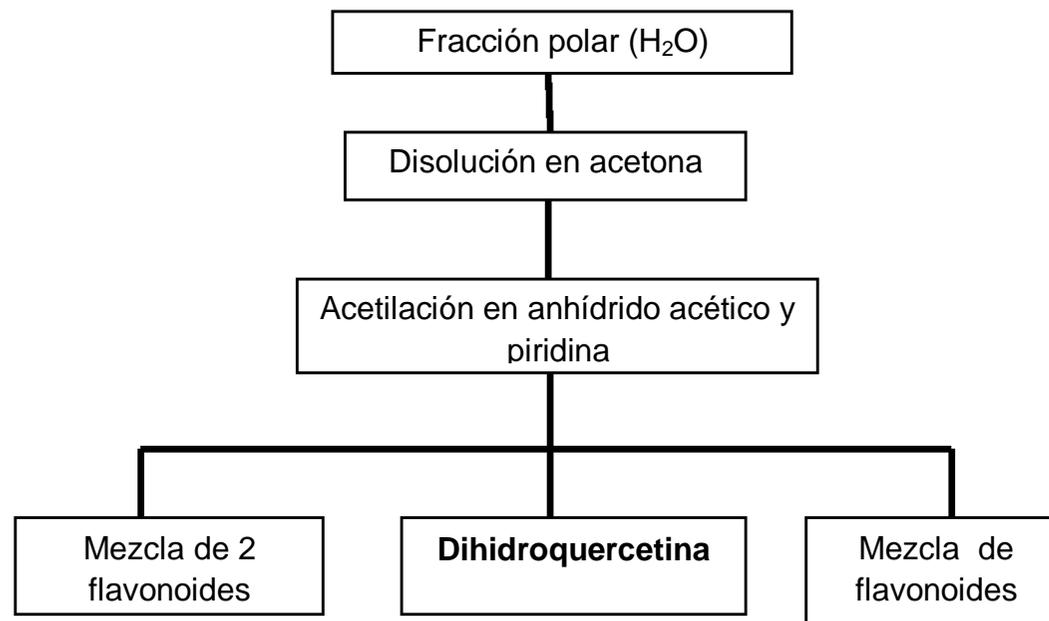


Diagrama 1: Diagrama experimental para el estudio biodirigido de la actividad antiinflamatoria de las hojas de *Salvia thymoides* (Continuación).



5.5. Cromatografía

Las cromatografías en columna “flash” se realizaron usando la metodología descrita por W. Clark Still. *et. al*⁶² usando como fase estacionaria sílica gel 60 Å 230/400 de la marca Macherey-Nagel. La elección de la fase móvil adecuada se llevó a cabo por ensayos previos en cromatografía en capa delgada (CCD) y la proporción de la mezcla se eligió ajustando el R.f. en un intervalo entre 0.2 y 0.25. Dichas cromatografías se realizaron usando cromatofolios de sílica gel G UV₂₅₄ de 0.25 mm de espesor, de la misma marca. El revelado se llevó a cabo utilizando luz ultravioleta proveniente de una lámpara portátil modelo ENF-260C (254-235 nm) y/o utilizando como reactivo cromogénico una solución de sulfato cérico amoniacal en ácido sulfúrico concentrado. La aplicación de la muestra se realizó adsorbiendo previamente el extracto vegetal en sílica gel del mismo tipo en una proporción 1:20.

Para el caso de las cromatografías en capa delgada preparativa (CCDP), éstas se realizaron en placas de vidrio con sílica G-100 UV₂₅₄, de 1.0 mm de espesor, y un tamaño de 20 x 20 cm de la marca Macherey-Nagel.

5.6. Análisis instrumental

Todos los reactivos utilizados son comerciales de Aldrich Chemical Company y los disolventes empleados fueron destilados previamente.

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato MEL-TEM II, Laboratory Devices, USA y no están corregidos.

Los espectros de IR fueron determinados en un espectrofotómetro FT-IR Bruker Tensor 27, empleando técnicas de solución o suspensión, dependiendo de la solubilidad del compuesto en cloroformo y las absorciones están expresadas en cm^{-1} .

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de ^1H , ^{13}C y DEPT se obtuvieron en un espectrómetro Bruker Advance de 300 MHz utilizando CDCl_3 y/o DMSO-D_6 como disolventes y empleando como referencia interna el

⁶²Still, W.C.; Kahn, M.; Mitra, A.; Rapid Chromatographic Technique for Preparative Separations with Moderate Resolution. *J. Org. Chem.* **1978**, 43, (14), 2923-2925.

tetrametilsilano (TMS), los desplazamientos químicos(δ) están expresados en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en Hertz (Hz). Para los datos de RMN de ^1H , las señales se indican como simple (s), doble (d), triple (t), cuádruple (c), doble de doble (dd), doble de doble de doble (ddd), triple de dobles (td) y múltiple (m).

Los espectros de masas fueron determinados en un aparato JEOL-AX505-HA, usando la técnica de impacto electrónico (IE). Los números entre paréntesis indican la intensidad relativa al 100% del pico base donde los datos están expresados en unidades de masa-carga (m/z).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se llevó a cabo el estudio biodirigido de los componentes antiinflamatorios del extracto acetónico de *Salvia thymoides* Benth, recolectada en el estado de Puebla. En dicho estudio se evaluó la actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido por TPA, siguiendo el protocolo descrito anteriormente,^{63,64} el cual es utilizado para evaluar la actividad de antiinflamatorios tanto esteroidales como no esteroidales, es un modelo de inflamación aguda donde se usa el TPA (13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol) como agente inductor de inflamación en oreja de ratón, la cual es contrarrestada por el compuesto de prueba, en caso de resultar activo.

Los ésteres del forbol inducen el edema a través de la síntesis de prostaglandinas (PGE₂), cuya formación está catalizada por las enzimas ciclooxigenasas. El TPA estimula la producción de grandes cantidades de PGE₂ y pequeñas cantidades de leucotrienos, formados por catálisis de lipooxigenasas, de ahí que el edema inducido por éste sea especialmente sensible a fármacos antiinflamatorios inhibidores principalmente de la enzima ciclooxigenasa o inhibidores de ambas, ciclooxigenasa/lipoxigenasa.^{65,66}

Es importante mencionar que solo se calculó la CI₅₀ a los metabolitos secundarios puros que presentaron actividad en los estudios preliminares y cuya CI₅₀, en el mismo modelo, no se encontró reportada en la literatura. En el caso de compuestos puros el estudio preliminar se llevó a cabo a una concentración de 0.31 µg/oreja y en el caso de fracciones o extractos a 1.0 mg/oreja.

En el caso de las pruebas preliminares, los resultados se analizaron mediante una prueba de t de Student. En el caso del cálculo de las CI₅₀ de los

⁶³Rao, T. S.; Currie, J. L.; Shaffer, A. F.; Isakson, P. Comparative Evaluation of Arachidonic Acid (AA)- and Tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-Induced Dermal Inflammation. *Inflammation*. 1993, 10, 723-741.

⁶⁴Payá, M.; Ferrándiz, M. L.; Erradi, F.; Terencio, M. C.; Kijjoa, A.; Pinto, M.; Alcaraz, M. J. Inhibition of Inflammatory Responses by a Series of Novel Dolabrane Derivatives. *Eur. J. Pharm.* 1996, 312, 97-105.

⁶⁵Carlson, R.P.; O'Neill-Davis, L.; Chang, J.; Lewis, A.J. Modulation of Mouse Ear Edema by Cyclooxygenase and Lipoxigenase Inhibitors and Other Pharmacologic Agents. *Inflammation Research*. 1985, 17 (2), 197-204.

⁶⁶De Young, L.M.; Kheifets, J.B.; Ballaron, S.J.; Young, J.M.; Edema and Cell Infiltration in the Phorbol Ester-Treated Mouse Ear are Temporally Separate and can be Differentially Modulated by Pharmacologic Agents. *Inflamm. Res.* 1989, 26 (3), 335-341.

compuestos puros, los resultados se analizaron estadísticamente por una prueba de ANOVA, seguida de una prueba de Dunnet.

En todos los casos, es decir, para estudios preliminares y para la determinación de IC_{50} , los valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control negativo.

6.1. Estudio biodirigido de la actividad antiinflamatoria de *Salvia thymoides* Benth.

Para evaluar si la planta en estudio presenta actividad antiinflamatoria, se obtuvo el extracto de las hojas de la planta por maceración en acetona, éste fue sometido a la prueba de actividad antiinflamatoria. Luego de realizar esta prueba, se observó que el edema inducido en la oreja por el TPA disminuyó en un 79.76%.

Dados los resultados obtenidos en la prueba de TPA, la cual confirmó la actividad antiinflamatoria del material vegetal en estudio, se procedió a realizar un primer fraccionamiento, el cual se llevó a cabo disolviendo el extracto en una mezcla $CH_3OH:H_2O$ en una proporción 4:1, para posteriormente realizar una partición con $C_6H_{14}-C_6H_6$ (1:1), una vez particionado, se eliminó el metanol a presión reducida para posteriormente realizar una segunda partición con CH_2Cl_2 , con la finalidad de separar los componentes no polares, polares y medianamente polares, respectivamente. Las fracciones obtenidas de esta partición también fueron sometidas al estudio preliminar de actividad antiinflamatoria. Como se muestra en la figura 5, las tres fracciones presentan actividad en el modelo propuesto, siendo la fracción hexano:benceno, la más activa (58.01% de inhibición del edema). Las fracciones de diclorometano y agua presentan una actividad similar (44.01 y 46.08 de inhibición, respectivamente).

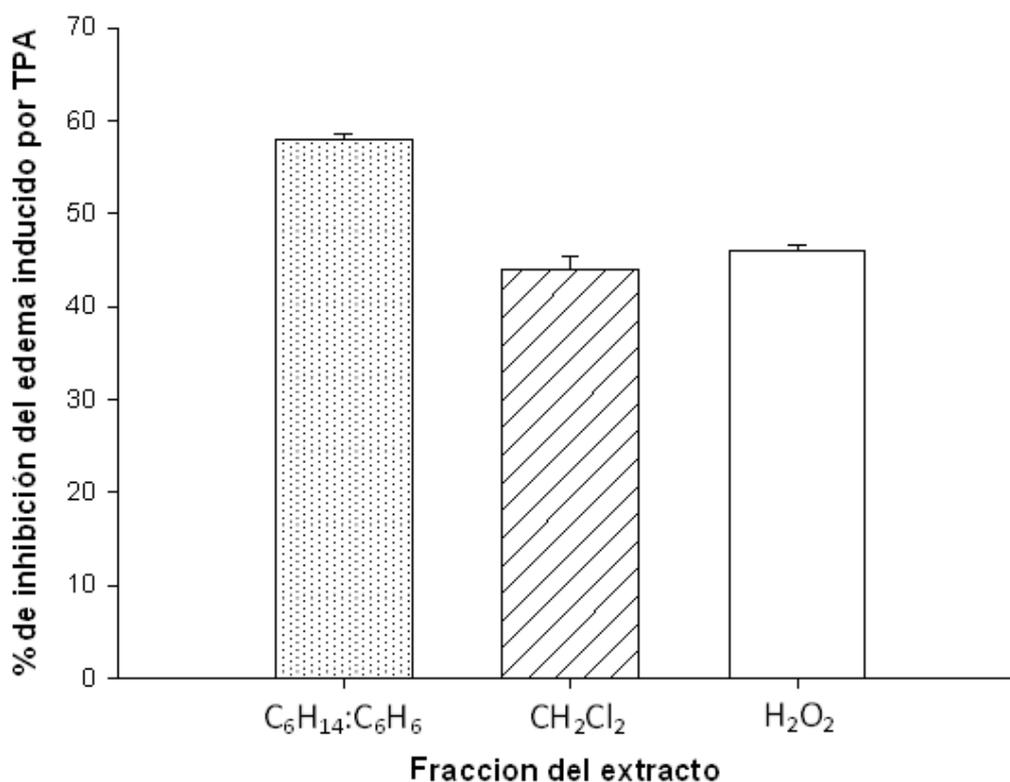


Figura 5. Actividad antiinflamatoria de las fracciones obtenidas en el fraccionamiento primario, realizadas a una concentración de 1 mg/oreja, usando acetona como vehículo. Los datos representan el promedio de 3 animales \pm el error estándar de la media.

Debido a que las tres fracciones presentaron actividad, se continuó con su tratamiento.

6.1.1 Purificación de la fracción de diclorometano

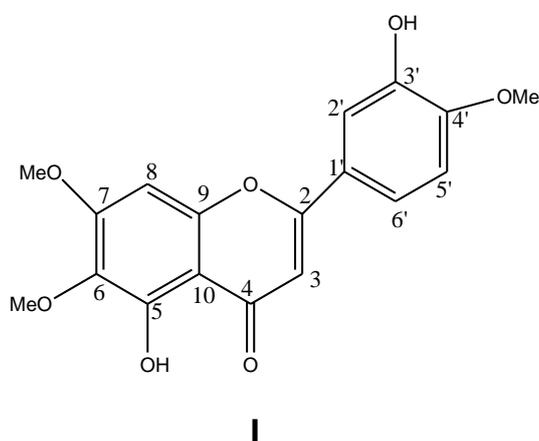
Se realizó una columna “flash” usando hexano:acetona (7:3) como fase móvil, de la cual se obtuvieron 8 fracciones realizándose la prueba de actividad antiinflamatoria en cada una de ellas, los resultados se muestran en la Tabla 3. Como se puede observar, la actividad se concentró en las primeras fracciones.

Tabla 3. Actividad antiinflamatoria de las fracciones obtenidas en la columna "flash" para el extracto de CH₂Cl₂.

Numero de fracción	% de inhibición de edema inducido por TPA
I	63.76±5.4**
II	80.95± 7.3**
III	72.48±3.2**
IV	57.06±8.4**
V	39.70±3.2**
VI	42.26±4.5**
VII	39.11±2.1**
VIII	35.21±4.1**

Los datos representan el promedio de tres animales ± el error estándar de la media. Los valores marcados con ** se consideraron con diferencia significativa con respecto al control con una $p \leq 0.01$.

El análisis por cromatografía en capa delgada, permitió determinar que en las fracciones con mayor actividad se encuentra presente un componente que se observa en el UV y que al ser revelada con sulfato sérico resulta visible una mancha amarilla en la placa, junto con otros componentes. Dicho compuesto se separó del resto de los componentes por cristalización en el mismo disolvente de elución, obteniendo un sólido cristalino amarillo con un punto de fusión de 191-195°C (I), el cual fue caracterizado por espectroscopia de IR, RMN (¹H, ¹³C y DEPT), así como espectrometría de masas, estableciendo la siguiente estructura como la correspondiente al compuesto I.



6.1.1.1. Caracterización espectroscópica de I: 3',5-dihidroxi-4',6,7-trimetoxiflavona (eupatorina)

El espectro IR (Espectro1) se realizó utilizando la técnica de suspensión en nujol y muestra bandas características para una estructura tipo flavonoide. Este espectro muestra una banda en 1656 cm^{-1} , la cual es característica de un carbonilo de cetona conjugada, y señales intensas entre 1100 y 1300, debidas a la torsión del hidroxilo, una banda en 3545 cm^{-1} característica de las vibraciones de grupos hidroxilo, bandas atribuidas a anillos aromáticos: Una en 3034 debida al estiramiento C-H, una en 1749 cm^{-1} dada por las flexiones fuera del plano de los enlaces C-H, 1496 cm^{-1} debida al núcleo bencénico, y bandas en 2846 y 1025 cm^{-1} correspondientes a metoxilos.

Por otro lado, por RMN de ^1H (espectro 2), usando CDCl_3 como disolvente se observan 3 señales simples, una en 3.93, otra en 3.98 y finalmente una en 3.99 ppm que integran para 3 protones cada una, las cuales fueron asignadas a los tres grupos metoxilo en posición 4', 6 y 7, respectivamente. Adicionalmente, en 5.79 y 12.76 ppm se observan 2 señales simples intercambiables por D_2O , que integran para un protón (espectro 3) lo que indica que se tienen 2 grupos hidroxilo en la molécula. La señal más desplazada a campo bajo fue asignada al protón fenólico en posición 5 del anillo A, este desplazamiento es característico de este tipo de estructuras donde el protón 5 presenta enlaces de hidrógeno con el grupo carbonilo en posición 4, la señal simple en 6.59 ppm fue asignada al protón en la posición 8.

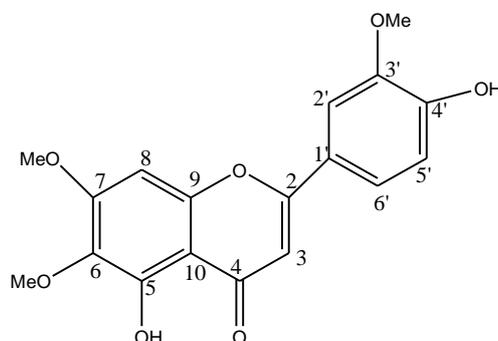
La señal simple que se observa en 6.56 ppm es distintiva de un flavonoide tipo flavona y corresponde al protón H-3.

El protón en posición 5' se observa como una señal doble en 6.97 ppm con una $J = 8.7\text{ Hz}$, la cual se debe al acoplamiento *orto* con el protón en posición 6', la señal doble en 7.43 ppm ($J = 2.3\text{ Hz}$) se asignó al protón H-2', el cual tiene una constante de acoplamiento *meta* con el protón 6'.

Finalmente, la señal doble de doble en 7.47 ppm ($J = 8.4, 2.1$) se asignó al protón 6', en el cual se observa el acoplamiento con el protón *orto* en 5' y el acoplamiento *meta* con H-2'.

El espectro de ^{13}C (espectro 4) muestra las 3 señales correspondientes para los grupos metoxilo y la señal correspondiente al carbono 4, muy desplazada a campo bajo, ubicada en 182.66 ppm. La asignación inequívoca de estos desplazamientos se llevó a cabo a través de un experimento DEPT (espectros 5 y 6).

Ante la insuficiencia de los datos experimentales para discernir entre la estructura propuesta y su isómero (**28**), se realizó un experimento NOESY (espectro 7) con la finalidad de determinar la correlación de los protones del metilo, ya sea con el protón en posición 2' o con el protón en posición 5'. El experimento mencionado confirmó la estructura propuesta al evidenciar la correlación entre los protones del metilo y el protón en posición 5'.



28

La espectrometría de masas indica que el compuesto tiene una fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_7$ con 11 grados de insaturación y corresponde con la estructura propuesta y muestra un patrón de fragmentación característico de un compuesto tipo flavonoide.

La molécula fue identificada como eupatorina, la cual ya había sido aislada de *Salvia thymoides* así como de otras plantas, entre ellas de *Tanacetum vulgare*, donde fue estudiada su actividad antiinflamatoria en el modelo de TPA obteniendo un 47% de inhibición a una concentración de 0.5 mg/oreja.⁶⁷ Sin embargo no se pudo encontrar algún trabajo donde se reportara la CI_{50} .

⁶⁷Schinella, G. R.; Giner, R. M.; Recio, M. C.; Mordujovich, D. B.; Rios, J. L.; Manez, S. Anti-inflammatory Effects of South American *Tanacetum vulgare*. *J. Pharm. Pharmacol.* **1998**, 50, 1069-1074

6.1.1.2. Estudio de actividad biológica para el compuesto I en el modelo de inflamación inducida por TPA

En la prueba preliminar de actividad antiinflamatoria, el compuesto I presentó un 58% de inhibición del edema, por lo que se procedió a calcular la CI_{50} . Debido a la baja solubilidad del compuesto, el estudio se llevó a cabo usando como vehículo una solución de piridina 10% en clorofomo, empleando indometacina como fármaco de referencia. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4. En el caso de la indometacina, la curva se llevó a cabo utilizando como vehículo EtOH:Acetona 1:1 a concentraciones de 0.031, 0.1, 0.31 y $1\mu\text{mol/oreja}$ y los resultados representan el promedio de 5 animales, en el caso del compuesto de prueba (compuesto I) se requirió incrementar el número de ratones de 5 a 8 dada la dispersión existente en los resultados debido a los problemas de solubilidad en el vehículo utilizado. Los datos reportados representan un promedio de los ratones empleados \pm el error estándar de la media (EEM).

Como lo muestra la tabla 5, la CI_{50} del compuesto I es aproximadamente la mitad de la mostrada por el fármaco de referencia lo que parece indicar que el compuesto de prueba sea casi dos veces más potente que la indometacina en el modelo de edema inducido por TPA. Sin embargo esto es algo que no se puede afirmar debido al uso de un diferente vehículo en cada caso.

Por otro lado, se observa que el compuesto presenta un efecto máximo a una dosis de $0.56\mu\text{mol/oreja}$, después de lo cual comienza a disminuir a pesar del incremento de la dosis, tal efecto es llamado taquifilaxia, un fenómeno caracterizado por la disminución o anulación de la respuesta tras la administración de dosis repetidas de un mismo fármaco, y aunque se incremente la dosis no se logra obtener la respuesta.⁶⁸ Dicho efecto no se presenta en el fármaco de referencia, donde se muestra un efecto dependiente de la dosis, por lo que se puede inferir que el mecanismo de acción de la

⁶⁸Velasco, M. A. Compendio de Farmacología General. Díaz de Santos S:A, ed. Madrid. 2001. p 97.

eupatorina (I) quizá sea diferente al de la indometacina, la cual actúa a través de la inhibición no selectiva de la COX-1 y COX-2.⁶⁹

Tabla 4. Determinación de la IC_{50} para la actividad antiinflamatoria para la eupatorina (I).

Muestra	Dosis (μ mol/oreja)	Edema (mg)	Inhibición (%)	IC_{50} (μ mol/oreja)
Control (Piridina 10% en clorofomo)	-	11.31 \pm 0.76	-	-
C-8	0.01	10.86 \pm 0.72	4.00	0.134 r=0.91
	0.031	8.93 \pm 0.95	21.05	
	0.1	6.04 \pm 1.60**	46.59**	
	0.32	4.60 \pm 1.31**	59.32**	
	0.56	1.26 \pm 0.26**	88.86**	
	1	2.08 \pm 0.56**	81.61**	
	1.78	2.86 \pm 1.03**	74.71**	
Control (EtOH:Acetona 1:1)		14.75 \pm 1.13		
Indometacina	0.031	12.78 \pm 1.21	13.36	0.236 r= 0.983
	0.1	10.74 \pm 1.13 *	27.19 *	
	0.31	5.62 \pm 0.89 **	61.90 **	
	1	2.88 \pm 0.73 **	78.76 **	

Los datos representan el promedio de cinco a ocho ratones \pm el error estándar de la media. Los resultados se analizaron mediante una prueba de ANOVA seguida de una prueba de Dunnett. Los valores de $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**) se consideraron con diferencia significativa con respecto al control con una $p \leq 0.01$.

6.1.2 Purificación de la fracción no polar

A la fracción hexano: benceno se le realizó un segundo fraccionamiento por precipitación en hexano:acetona. Los componentes precipitados presentaron 67% de inhibición del edema en la oreja de ratón y el sobrenadante 29.29% por lo que se prosiguió con el estudio biodirigido.

6.1.2.1 Purificación del precipitado en hexano : acetona

En el caso del precipitado en hexano acetona, se realizó una columna “flash”, usando una mezcla de hexano:acetato de etilo en una proporción de 4:1. Los resultados mostrados en la Tabla 5 indican que todas las fracciones son

⁶⁹Mendoza Patiño Nicandro. Farmacología Médica. Editorial Médica Panamericana. México. 2008. 294.

activas, de las cuales todos los componentes mayoritarios se purificaron por recristalización y resultaron ser los responsables de la actividad.

Tabla 5. Actividad antiinflamatoria de las fracciones obtenidas en la columna “flash” para la fracción precipitada en hexano: acetona.

Fracción	% de inhibición del edema en TPA
I	67.94±4.3**
II	80.41±5.2**
III	74.55±3.1**
IV	69.47 ±5.2**
V	62.60±8.3**
VI	78.12±2.7**
VII	76.08±3.4**

Los datos representan el promedio de cinco animales ± el error estándar de la media. Los resultados se analizaron mediante una prueba de t de Student y los valores de $p \leq 0.01$ (**) se consideraron con diferencia significativa con respecto al control.

6.1.2.1.1. Compuesto II. Ácido 3-β-hidroxilupen-20(29)-en-28-oico (ácido betulínico)

De la fracción II se obtuvo el compuesto II, como un sólido blanco cristalino con un punto de fusión de 295-299°C, para el cual el espectro IR (espectro 8) muestra bandas de absorción, indicando la presencia de grupos carbonílicos, 3408 cm^{-1} correspondiente al estiramiento del OH, 1688 cm^{-1} , debido al estiramiento del carbonilo y 1376 cm^{-1} dado por la torsión/estiramiento del carboxilo y una banda en 1459 cm^{-1} la correspondiente a la torsión de tijera del metileno terminal.

El espectro de ^{13}C mostró 30 señales evidenciando una estructura tipo triterpenoide. La resonancia de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) (espectro 9) revela una señal doble en 4.72 (J=2.1) y un doble de doble en 4.58 (J=2.1y 1.2) atribuidas a los protones olefínicos terminales, cuyos carbonos fueron ubicados en el ^{13}C (espectro 10) y DEPT (espectro 11 y 12) como un metileno con un desplazamiento de 109.89 ppm y un carbono cuaternario en 150.89 ppm, lo que corrobora la presencia de un grupo olefínico en la molécula, además de un

metino en 178.55 ppm que indica un grupo ácido en la estructura. Por otro lado, en la resonancia magnética protónica se observan dos señales dobles de dobles en 3.16 ppm ($J= 6, 5.4$) y 3.02 ppm ($J=11.1, 4.8$) atribuidas al protón en la posición 3, geminal a un grupo hidroxilo y al protón alílico en la posición 19 respectivamente. El espectro de ^{13}C confirmó la presencia de un grupo alcohol en la posición 3 como un metino en 78.66 ppm.

Por otro lado, la espectrometría de masas muestra un ion molecular de 456 m/z, que corresponde a una fórmula condensada de $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$, y un patrón de fragmentación característico de un esqueleto triterpénico que apoya la estructura propuesta para este compuesto.

Todas las evidencias espectroscópicas así como su comparación con las reportadas en la literatura⁷⁰ llevaron a la identificación de la estructura como el ácido betulínico, el cual es un compuesto de alta incidencia en la naturaleza y que ya había sido reportado como parte de los componentes de *Salvia thymoides*.⁷¹

El ácido betulínico es un triterpenoide pentacíclico que exhibe varias actividades biológicas, incluyendo inhibición del virus de inmunodeficiencia humana (HIV), antibacterial, antimalarial, antihelmítica, antiproliferativa, antioxidante, analgésica y antiinflamatoria.⁷² Regio, *et.al* realizaron por primera vez estudios de actividad antiinflamatoria para este compuesto en 1995 en el modelo de Carragenina, EPP y TPA.⁷³ Por otro lado, en el mismo año, su CI_{50} fue determinada por Yasukawa K., *et.al*, en el modelo de TPA reportada como 0.3 mg/oreja la cual resultó ser la misma que la indometacina, fármaco usado como referencia.⁷⁴

⁷⁰Charles, J.; Behnke, P.J. The Aldrich library of ^{13}C & ^1H FT Spectra. 1st ed, USA, 1993, p 594.

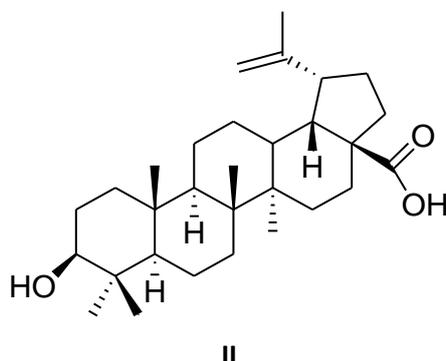
⁷¹Maldonado, E.; Ortega, A. Loc.cit.

⁷²Yogeeswari, P; Sriram, D. Betulinic Acid and Its Derivatives: A Review on their Biological Properties. *Curr. Med. Chem.* **2005**; 12:657-666.

⁷³Recio, M.C.; Giner, R.M.; Manez, S.; Gueho, J.; Julien, H.R.; Hostettmann, K.; Rios, J.L. Investigations on the Steroidal Anti-inflammatory Activity of Triterpenoids from *Diospyros leucomelas*. *Planta Med.* 1995, 61(1), 9-12.

⁷⁴Yasukawa K., Yu S. Y., Yamanouchi S., Takido M., Akihisa T., Tamura T., Some Lupane-type Triterpenes Inhibit Tumor Promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in Two-stage Carcinogenesis in Mouse Skin. *Phytomedicine.* **1995**; 1(4), 309-13.

Aunque en este estudio no se determinó la CI_{50} de el ácido betulínico aislado de *Salvia thymoides*, el estudio preliminar de mostró un 58.60% de inhibición del edema inducido por TPA en el modelo de inflamación empleado.



6.1.2.1.2 Compuestos III y IV. Mezcla de ácido 3-β-hidroxiolean-12-en-28-oico y 3-β-hidroxiurs-12-en-28-oico (ácidos olenólico y ursólico).

De la fracción II se obtuvo por recristalización un sólido blanco opaco con un punto de fusión de 255-258 °C, el espectro IR(espectro 13) muestra bandas de absorción en 3423 cm^{-1} , característica de un grupo OH y 1689 cm^{-1} para COOH, el ion molecular en el espectro de masas indica una masa molecular de 546 m/e, correspondiente a una fórmula molecular de $C_{30}H_{48}O_3$ y el patrón de fragmentación característico de los triterpenos, con 7 grados de insaturación, de los cuales uno corresponde a la insaturación en C12-C13, uno al carbonilo del ácido y los 5 restantes a los 5 anillos. Adicionalmente, los espectros de RMN de 1H y ^{13}C (espectros 14 y 15) sugieren la presencia de una mezcla de los ácidos ursólico y olenólico, lo cual se corroboró con los datos reportados en la literatura.^{75,76} Estos ácidos son compuestos usuales en plantas del género *Salvia*, están ampliamente reportados en la literatura como antiinflamatorios y su CI_{50} corresponde a 0.3 mg/oreja⁷⁷ y 0.1mg/oreja⁷⁸ para el ácido olenólico y ursólico respectivamente. El estudio preliminar de actividad antiinflamatoria muestra una actividad de 80.4% de inhibición.

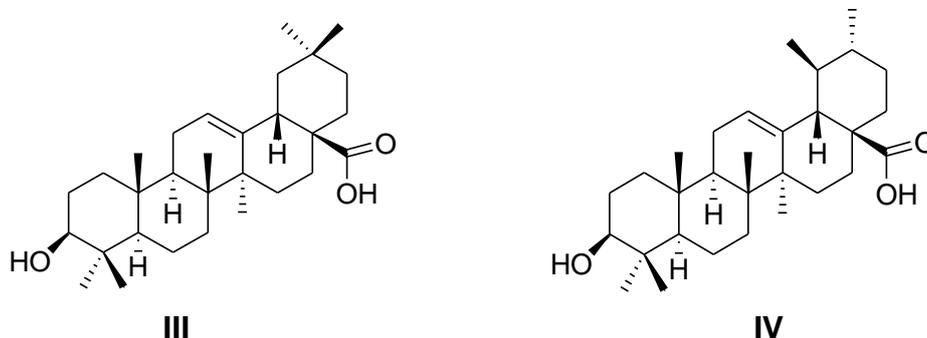
⁷⁵Charles, J; Behnke, P.J. Op.Cit. p 595.

⁷⁶Seebacher, W.; Simic, N.; Weis, R.; Saf, R.; Kunert, O. Spectral Assignments and Reference Data, Complete Assignments of 1H and ^{13}C NMR Resonances of Oleanolic Acid, 18a-oleanolic acid, Ursolic Acid and their 11-oxo derivatives. *Magn. Reson. Chem.* **2003**, 41, 636–638.

⁷⁷Yasukawa, K.; Yu, S. Y.; Yamanouchi, S.; Takido, M.; Akihisa, T.; Tamura, T. Loc.cit.

⁷⁸Banno, N.; Akihisa, T.; Tokuda, H.; Yasukawa, K.; Higashihara, H.; Ukiya, M.; Watanabe, K.; Kimura, Y.; Hasegawa, J.; Nishino, H.; *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2004**, 68, 85-90.

Cabe resaltar que esta mezcla fue el componente mayoritario del extracto, a diferencia de lo reportado por E. Maldonado y A. Ortega, donde se describe la thymonina como el principal metabolito secundario de la especie.



6.1.2.1.3. Compuesto V

La fracción VI presentó un 78% de inhibición de edema por lo que se siguió en el estudio biodirigido encontrándose que esta fracción estaba constituida por solo dos componentes, uno de ellos correspondiente al compuesto I ya reportado como antiinflamatorio y un compuesto tipo clerodano, compuesto V, el cual no presentó actividad antiinflamatoria, con diferencia significativa respecto al control (19.83 % de inhibición en el modelo propuesto). Como se puede notar, ambos compuestos probados individualmente presentan una actividad menor que cuando se administran en juntos, lo que lleva a suponer que existe un efecto sinérgico entre ambos.

El compuesto V fue aislado por recristalización en metanol como un sólido blanco opaco con un punto de fusión de 180-182°C y $[\alpha]_D = 169$ (acetona, c 1).

En el espectro de RMN ^1H (espectro 19) se muestra una señal doble en δ 0.78 ppm ($J=6.9$) y una señal simple en δ 0.73 ppm, las cuales son características de los grupos metilo 17 y 20, respectivamente, de un compuesto diterpénico tipo clerodano. Esto se confirma por la presencia de dos carbonos con multiplicidad de cuartetos en 13.80 y 18.55 ppm en RMN de ^{13}C .

El espectro IR (espectro 18) muestra bandas en 1610 cm^{-1} y 1639 cm^{-1} correspondientes a dobles ligaduras, en 1726 cm^{-1} una banda atribuida a un carbonilo de ester. Finalmente, dos bandas, una en 1781 cm^{-1} y otra en 1749 cm^{-1} , las cuales se observan como una señal doble, una más intensa que la

otra, correspondiente al fenómeno conocido como resonancia de Fermi⁷⁹ la cual es característica de lactonas conjugadas de cinco miembros, por lo que se planteó la estructura de una γ -lactona- α,β -insaturada.

El metileno de la lactona descrita se observa en RMN de ^1H como una señal doble en 4.76 ppm con una constante de acoplamiento de 1.8 Hz y el metino como una señal triple en 5.85 ppm, los carbonos correspondientes se observan en 73.05 y 115.26 ppm, respectivamente (espectro 21), además, de 2 carbonos tetrasustituídos, uno en 170.85 ppm correspondiente al carbono del carbonilo y el segundo en 170.54 asignado al carbono vinílico completamente sustituido.

El espectro de masas muestra un pico base de 111 correspondiente al fragmento de una γ -lactona- α,β -insaturada sustituida en posición α , lo que apoya la estructura propuesta.

En 7.37 ppm se observa una señal doble de dobles ($J= 7.5, 2.4$) cuya integral corresponde a un protón, señal característica para un protón en posición β a un grupo carbonilo. Por otro lado, se observa un ddd en 5.97 ($J= 10.5, 2.7, 1.2$ Hz) además de un tdd en 5.23 ($J= 12.6, 4.2, 1.8$ Hz), que integra para un protón, cuyos datos indican que se trata de un protón vinílico vecino a un metileno, los carbonos correspondientes a dichos protones, se observan como metinos en 126.73, 128.18 y 143.03 ppm, respectivamente.

El espectro de resonancia magnética protónica exhibe señales atribuibles a un metileno exocíclico conjugado, la primera como un triplete en 5.11 ($J=1.8\text{Hz}$) y la segunda como una señal simple y ancha en 4.88 ppm. Dicho metileno exocíclico se observa en la RMN de ^{13}C en un desplazamiento de 118.46ppm.

Complementariamente, se observa un grupo metino en δ 35.5 ppm, tal desplazamiento es característico de un carbono sp^3 , lo que indica que tiene tres sustituyentes, el cual corresponde al carbono 8.

A diferencia del 5,10-seco-clerodan-1,3,5(19),13-tetraen-15,16-ólida-18-oico, previamente aislado de *Salvia thymoides*,⁸⁰ el espectro de RMN ^1H muestra

⁷⁹Jones, R.N.; Angell, C.L; Smith, R. J. D. The Carbonyl Stretching Bands in the Infrared Spectra of Unsaturated Lactones. *Can. J. Chem.* **1959**, 37, 2007-2022.

⁸⁰ Flores, E. A. Loc cit.

una señal ancha y deformada en 3.68 ppm como una señal que integra para un protón, y que por su desplazamiento químico puede ser asignada a un hidrógeno geminal a un grupo hidroxilo secundario, lo que se corrobora al afinarse por el intercambio con oxido de deuterio (espectro 20). Tal señal fue asignada al protón ubicado en la posición 7. Aunque no se pudieron medir las constantes de acoplamiento de manera inequívoca debido a la deformación de la señal, la dimensión de la anchura de la misma permite inferir que H-7 presenta una orientación β , ya que la amplitud de la señal es de aproximadamente 10 Hz, lo que concuerda con una constante de acoplamiento trans diaxial entre H-7 y el protón α posicionado en el C-6 que debería presentar una constante de acoplamiento de aproximadamente 10 Hz, y los dos acoplamientos de aproximadamente 3 Hz que se esperan para su acoplamiento con los protones 6 y 8 que presentan la misma orientación, con lo que debería observarse una señal ddd de constantes de acoplamiento de 10, 3, y 3 Hz, respectivamente.

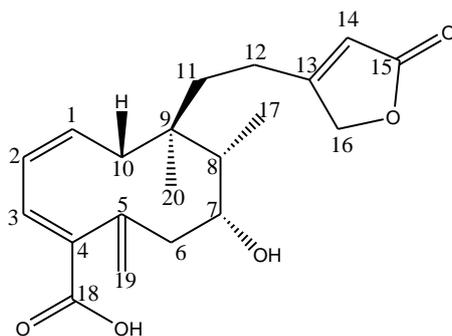
Sin embargo si se supone que H-7 se encuentra en posición α , la señal se ensancharía casi al doble debido a las constantes de acoplamiento de aproximadamente 10 Hz con los protones β de las posiciones 6 y 8. En tal caso, la señal esperada sería un ddd con constantes de acoplamiento de aproximadamente 10, 10 y 3 Hz.

Todo lo anterior lleva a inferir que el grupo hidroxilo localizado en la posición 7 se encuentra en una posición α , lo cual no se pudo verificar con experimentos adicionales debido a la falta de muestra. El carbono correspondiente se observa como un metino en 77.2 ppm.

La asignación y grado de sustitución de los carbonos fue corroborada por experimentos DEPT (espectros 22 y 23).

El espectro de masas indica un ion molecular de 346 m/z concordante con la fórmula $C_{20}H_{26}O_5$ con 8 grados de insaturación.

Todas las características ya mencionadas, llevan a la conclusión de que se trata del siguiente compuesto (**V**), el cual no se encontró descrito en la literatura.

**V**

6.1.2.1.4. Compuesto VI

La fracción VII presentó un 76.08% de inhibición del edema en el modelo de inflamación, el análisis por CCD mostró una mezcla de al menos dos componentes.

La purificación de los componentes de la fracción VII, llevó al compuesto **VI** por recristalización en acetona, como un sólido blanco cristalino con un punto de fusión de 283-285 °C, y un $[\alpha]_D = -1.052$ (DMSO, c 2.85), el cual resultó ser el mayoritario en dicha fracción.

El compuesto **VI** presenta algunas características similares al compuesto **V**, el espectro de infrarrojo (espectro 24) muestra la resonancia de fermi con una banda intensa en 1735 y una de menor intensidad en 1795, lo que indica que la lactona γ -lactona- α,β -insaturada se encuentra formando parte de esta estructura.

El espectro de infrarrojo muestra una banda ancha en 3404 cm^{-1} y dos grupos carbonilos conjugados como bandas intensas en 1676 cm^{-1} .

La resonancia magnética protónica (espectro 25) muestra los protones correspondientes al metileno de la lactona en un desplazamiento de 4.58 ppm con una constante de acoplamiento de 1.8 Hz que integra para dos protones. El protón en la posición 14 se encuentra como una señal triple centrada en 5.69 ppm ($J=1.5$) que integra para un protón. Los carbonos correspondientes se muestran en el espectro 27 y el grado de sustitución fue determinado por un experimento DEPT (espectros 28 y 29), el carbono metilénico se encuentra en 72.34 ppm y el metino en 114.59 ppm.

La RMN de protón muestra señales atribuibles a tres grupos metilos, uno como un señal simple en 1.18 ppm y los dos restantes en 0.74 ppm, a pesar de que las señales se encuentran traslapadas, se puede notar la señal doble correspondiente al metilo en posición 17, con una constante de acoplamiento de 6 Hz y la señal simple correspondiente al metilo en posición 20, las cuales son características de estructuras tipo clerodano.

En 9.99 ppm se observa una señal simple que integra para un protón y que se asignó por desplazamiento químico a un grupo aldehído en posición alílica, el carbono correspondiente se observa en 195.33 ppm.

En 6.02 ppm se observa otra señal simple que integra para un protón, dicho desplazamiento indica que es vinílico, en posición α a un grupo carbonilo, lo cual se confirma en espectro RMN de ^{13}C como un carbono sp^2 en 130.63 ppm.

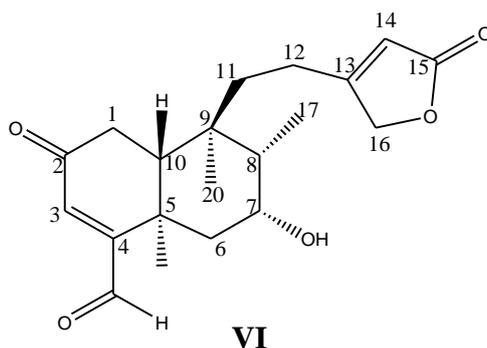
Por otro lado, en RMN de ^{13}C , se observa una señal en 198.9 ppm, la cual corresponde a un carbono completamente sustituido, esta señal es atribuible al carbono β de una cetona α,β -insaturada.

Adicionalmente, se observa una señal doble en 4.88 ppm ($J=4.2$ Hz), la cual, es intercambiable con óxido de deuterio (espectro 26), lo que indica que se tiene un grupo hidroxilo en la molécula, la multiplicidad de dicha señal indica que existe acoplamiento entre el grupo hidroxilo y su correspondiente protón geminal, el cual, se observa como una señal múltiple en 3.53 ppm, la cual también se simplifica cuando se adiciona óxido de deuterio.

A pesar de la complejidad de la señal correspondiente al protón en posición geminal al hidroxilo, en el espectro determinado con adición de óxido de deuterio, fue posible medir tres constantes de acoplamiento 4.5, 5.4 y 9.6 Hz, lo que indica que el protón en cuestión se acopla a un protón con una orientación contraria y con otros dos protones con la misma orientación. Lo que lleva a deducir que tal protón se encuentra ubicado en el carbono 7 con una orientación β , acoplándose con los protones β de los carbonos 6 y 8 y con el protón α ubicado en la posición 6. Por ende, el hidroxilo debe encontrarse en posición α .

La espectrometría de masas muestra un ion molecular de 346 m/z, correspondiente con la fórmula $C_{20}H_{26}O_5$ y 8 grados de insaturación.

Todo lo anterior lleva a proponer la siguiente estructura como la correspondiente al clerodano **VI**, la cual, al igual que el compuesto V, no se encontró descrita en la literatura.



La prueba de actividad antiinflamatoria indica que compuesto **VI** induce la inflamación en el modelo de TPA con una actividad de -22.45% de inhibición del edema

El resto de los componentes de la fracción no se pudieron purificar debido a la poca cantidad de muestra, sin embargo, los datos espectroscópicos muestran que se encuentra presente el compuesto **V** junto con otro componente, la prueba de TPA realizada para esta fracción indica que la actividad se sigue conservando.

6.1.2.2. Tratamiento del sobrenadante en hexano:acetona

Se realizó una columna “flash” usando una mezcla hexano: acetato de etilo (80:20). Se obtuvieron 38 fracciones, de las cuales solo tres resultaron activas, la 13, 30 y 38. La fracción 13 presentó un 66.76% de inhibición del edema en el modelo de evaluación antiinflamatoria.

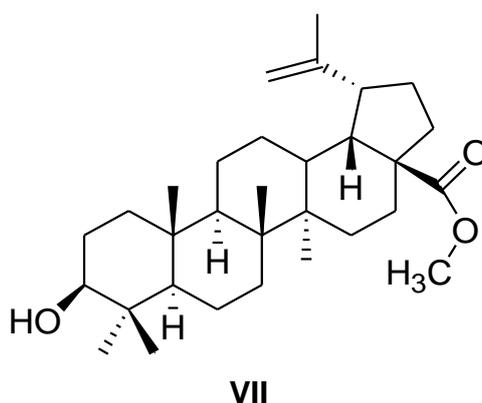
De la fracción 13 se aisló, por recristalización en acetona, una mezcla de compuestos con un R_f muy semejante en las cromatoplas, lo que significó que la estructura de los componentes debería ser muy similar. La prueba de actividad antiinflamatoria mostró una actividad de 66.76%** de inhibición del

edema por lo que se decidió separar la mezcla en sus componentes individuales. Dada la dificultad para separar los componentes por métodos cromatográficos, se recurrió a métodos químicos.

6.1.2.2.1 Esterificación de la fracción 13.

El espectro de IR de la fracción 13 mostró bandas indicativas de la presencia de ácidos carboxílicos, por lo que se pensó que la esterificación de tal ácido sería un método factible para poder separar la mezcla. El método de esterificación elegido para tal efecto fue con diazometano, usando como materia prima para su preparación la nitrosometilurea de acuerdo con la técnica descrita previamente.⁸¹ El progreso de la reacción se monitoreo por CCD y los productos se separaron por CCDP evidenciando la presencia de dos componentes.

El análisis de la espectroscopia del componente esterificado (**VII**) indica que se trata del derivado esterificado de **II**, ya que la resonancia magnética protónica se observan señales semejantes, además de una señal simple adicional en 3.66 ppm (espectro 30), y en RMN de ¹³C (espectro 31) muestra una señal extra en 51.24ppm correspondiente al metilo del ester, además, el ion molecular en la espectrometría de masas corrobora la adición del mismo a la molécula con un incremento de 14 unidades al ion molecular.



⁸¹Roger, Adams. Organic Syntheses Coll, Vol 2. John Wiley & Sons, INC, ed. 1965, p 165-167.

El análisis espectroscópico del segundo componente indicó que aún se tiene una mezcla de varios componentes de naturaleza triterpénica, los cuales no pudieron ser aislados debido a su baja proporción en la muestra.

6.1.2.2.2. Compuesto VIII. 3β -lup-20(29)-en-3-ol (lupeol)

De la fracción 30 se aisló como componente mayoritario un compuesto blanco con punto de fusión de 195-197 °C. En el espectro IR (espectro 32) se observan bandas en 3690 cm^{-1} (grupos hidroxilo), 3070 cm^{-1} (vibración asimétrica del metileno terminal).

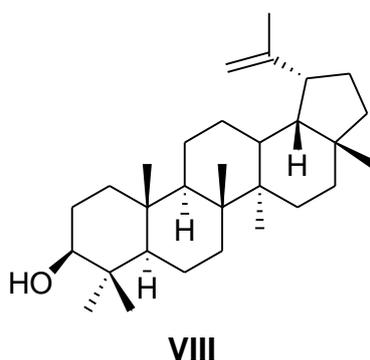
En el espectro de ^{13}C (espectro 34) se observan 30 carbonos, de los cuales, de acuerdo al experimento DEPT (espectro 35 y 36), 7 corresponden a grupos metilo, 11 a metilenos, 6 a metinos y los 6 restantes a carbonos cuaternarios. También se observa una señal base de oxígeno a 78.94 ppm, correspondiente a la señal en el espectro de RMN ^1H (espectro 33) de un hidrógeno base de alcohol desplazada en 3.18 ppm como una señal doble de doble ($J=10.8, 5.7\text{ Hz}$). En este mismo espectro se observa la presencia de protones vinílicos de tipo terminal en 4.68 y 4.56 ppm con constantes de acoplamiento de 1.2 Hz. Los carbonos correspondientes a estas señales se encuentran en 109.23 y 150.88 ppm, respectivamente. Además, se observan las 7 señales simples de los grupos metilo características de un esqueleto triterpenoide en 1.68, 1.032, 0.96, 0.94, 0.83, 0.79 y 0.76 correspondientes a los metilos 30, 27, 26, 25, 24, 23 y 28, respectivamente.

Por otro lado, la espectrometría de masas muestra un ion molecular de 426 m/z estableciendo la fórmula molecular de $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ con 6 insaturaciones. Al presentar solo un doble enlace, el resto de las insaturaciones deben corresponder a anillos presentes en la estructura, por lo tanto se trata de un compuesto pentacíclico tipo lupano. Todas las observaciones anteriores, así como la comparación con datos físicos y espectroscópicos reportados en la literatura,⁸² llevó a identificar a este compuesto como 3β -lup-20(29)-en-3-ol (lupeol), para el cual, sus propiedades antiinflamatorias, se encuentran

⁸² Fotie, J.; Scott-Bohle, D.S.; Leimanis, L.M.; Georges, E.; Rukunga, G.; Nkengfack, E.A.; Fotie, Lupeol Long-Chain Fatty Acid Esters with Antimalarial Activity from *Holarrhena floribunda*. J. Nat. Prod. **2006**, 69, 62-67.

ampliamente descritas en la literatura^{83,84} además de otras actividades biológicas entre las que destacan la antimalárica, antiprotozoaria, antibacteriana y anticancerígena.⁸⁵

Aunque en este caso tampoco se calculó la CI_{50} para este compuesto, el estudio preliminar de actividad antiinflamatoria mostró un 65.6% de inhibición del edema en el modelo de TPA. Estudios previos indican una CI_{50} de 0.48 mg/oreja para este compuesto.⁸⁶



6.1.2.2.3. Compuesto IX. β -sitosterol

De la fracción 38 se obtuvo un compuesto blanco con un punto de fusión de 125-130°C. Todos los datos espectroscópicos y físicos indican que se trata de β -sitosterol. El espectro IR (espectro 37) muestra una banda en 3461 cm^{-1} atribuida a la vibración del grupo hidroxilo así como bandas atribuidas a dobles ligaduras. El espectro de RMN 1H (espectro 38) presenta: 1) Una señal doble con un desplazamiento químico de 5.35 ppm ($J=3.9$) que integra para un protón, asignado a aquel ubicado en la posición 6; 2) Una señal múltiple en 3.51 debida al protón en posición 3; 3) El metilo 29 se observa como una señal triple en 0.84 ($J=6.6$ Hz) y 4) El metilo 27 como una señal doble en 0.81 con una $J=7.6$ Hz. Los espectros de ^{13}C (espectro 39) y DEPT (espectro 40) ratifican la estructura propuesta, observándose el carbono en posición 5 en

⁸³Saleem, M. Lupeol, a Novel Anti-inflammatory and Anti-cancer Dietary Triterpene. *Cancer Lett.* **2009**;285:109–115

⁸⁴Saleem, M.; Afaq, F.; Adhami, V.M.; Mukhtar, H.; Lupeol Modulates NF-kappaB and PI3K/Akt Pathways and Inhibits Skin Cancer in CD-1 Mice. *Oncogene.* **2004**, 23, 5203-5214.

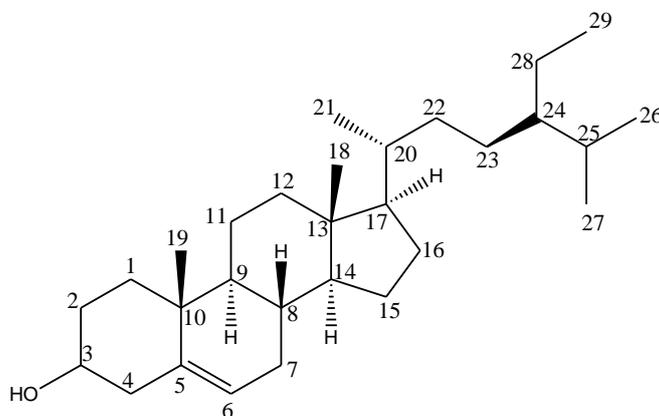
⁸⁵Yamaguchi, C.; In, Y.; Wada, S.; Yamada, T.; Tokuda, H.; Tanaka, R. Cancer Chemopreventive Activity of Oleanane-Type Triterpenoids from the Stem Bark of *Betula ermanii*. *Chem. Biodiversity.* **2009**, 6(7), 1093-1100.

⁸⁶Arciniegas, A.; Ramíre-Apan, M.T.; Pérez-Castoren, A.L.; Romo del Vivar, A. Anti-inflammatory Constituents of *Mortonia greggii* Gray. *Z Naturforsch.* **2004**, 59(3-4), 237-243.

149.79 ppm y el carbono 6 en 121.74 ppm, corroborando el doble enlace entre estos carbonos.

Por otro lado, el espectro de masas confirma la estructura propuesta con un ion molecular de 414 m/z. todos los datos concuerdan con los reportados para β -sitosterol.^{87, 88}

La actividad antiinflamatoria de este compuesto también ha sido documentada exhaustivamente.^{89, 90, 91} Se ha reportado una IC_{50} de 1.8 mg/oreja en el modelo de actividad antiinflamatoria inducida por TPA.⁹² Aunque en este caso tampoco se determinó la IC_{50} , se observó un 56.27% de inhibición del edema en el estudio preliminar.



IX

6.1.2.3. Purificación de la fracción polar

Debido a que se tenía poca cantidad de esta fracción y la falta de solubilidad de la misma, sólo se trabajó con la porción soluble en acetona, que fue el disolvente en que se realizó la prueba de actividad antiinflamatoria.

⁸⁷Della, G. M.; Molinaro, A.; Monaco, P.; Previtera, L.; Acylglycosyl Sterols from *Pistia stratiotes*. *Phytochemistry*. **1991**, 30(7), 2422-2424.

⁸⁸Charles, J.; Behnke, P.J. *Op.Cit.* 569.

⁸⁹Yasukawa, K.; Takidoa, M.; Matsumoto, T.; Takeuchi, M.; Sterol and Triterpene Derivatives from Plants Inhibit the Effects of a Tumor Promoter, and Sitosterol and Betulinic Acid Inhibit tumor Formation in Mouse Skin Two Stage Carcinogenesis. *Oncology*, **1991**, 48, 72-76.

⁹⁰Gómez, M.A.; Sánchez, M.T.; García, M.D.; Fernández, M.A. Study of the Topical Anti-Inflammatory Activity of *Achillea ageratum* on Chronic and Acute Inflammation Models. *Z. Naturforsch.* **1999**, 54, 937-941.

⁹¹Villaseñor, I.M.; Angelada, J.; Canlas, A.P.; Echegoyen, D. Bioactivity Studies on Beta-sitosterol and its Glucoside. *Phytotherapy Res.* **2002**, 16, 417-421.

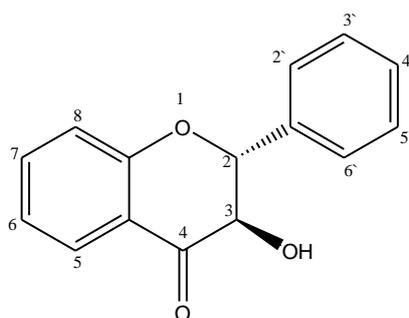
⁹²Akihisa, T.; Yasukawa, K.; Yamaura, M.; Ukiya, M.; Kimura, Y.; Shimizu, N.; Arai, K. Triterpene Alcohol and Sterol Ferulates from Rice Bran and Their Anti-inflammatory Effects. *J. Agricult. food Chem.* **2000**, 48, 2313-2319.

El peso de la fracción soluble en acetona fue de 80 mg de una mezcla, la cual fue analizada por CCD, permitió observar una mancha amarilla desde el punto de aplicación hasta un R_f de 0.5. En su espectro de IR, realizado en suspensión en nujol, se observaron bandas características para grupos hidroxilo por lo que se procedió a realizar una reacción de acetilación con anhídrido acético en piridina con el fin de mejorar la resolución y por ende separar los componentes.

El producto de la reacción de acetilación fue analizada por CCD, observándose la presencia de tres manchas en la placa y por lo tanto, se tenía al menos tres componentes principales en la muestra, los cuales se separaron por CCDP. La RMP de cada uno de los tres componentes mostró que aún se tienen mezclas de compuestos, aunque ya no se pudo continuar con la purificación debido a la poca cantidad de muestra, las señal observadas en todos ellos indican que se tienen estructuras tipo flavonoide.

6.1.2.3.1. Compuesto X: 3`4`5,7-tetrahidroxifavanonol (dihidroquercetina)

A pesar de que aún se tenían algunas impurezas en la muestra, se pudo elucidar la estructura del compuesto **X** como un flavonoide tipo flavanonol, cuya estructura base es la siguiente:



El espectro IR (espectro 41) para el compuesto **X** muestra bandas características para anillos aromáticos, en 3040 cm^{-1} una banda de correspondiente al estiramiento C-H, varias bandas entre 1000 y 1170 cm^{-1} y una banda en 1769 correspondiente a un grupo carbonilo.

En el espectro de RMN ^1H (espectro 42), se observan dos señales dobles, una en δ 5.31 ($J=12.3\text{ Hz}$) y otra en δ 5.59 ($J= 12\text{ Hz}$) correspondientes a los protones de las posiciones 3 y 2, respectivamente, esto, aunado a los carbonos

desplazados a 73.32 ppm y 80.34 ppm, en el espectro de RMN ^{13}C (espectro 44), correspondientes a los carbonos 3 y 2, respectivamente. Estas evidencias apoyan la estructura tipo favanonol propuesta y están corroborados por los espectros DEPT mostrados en los espectros 45 y 46. Analizando, el tamaño de las constantes de acoplamiento indicadas para estos dos protones, se concluye que ambos carbonos presentan una configuración R.

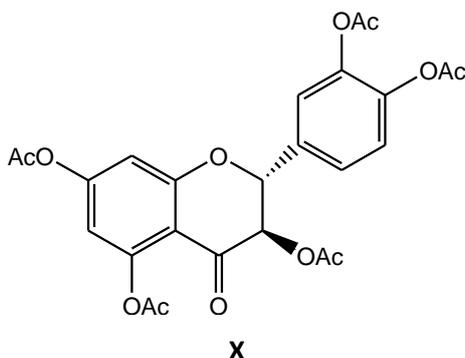
El sistema de señales observado a campo más bajo indica que se tiene un anillo B sustituido en las posiciones 3' y 4'. De esta manera, se observa el protón ubicado en la posición 6' como una señal doble de doble en δ 7.33 con una $J_{orto}=8.4$ Hz y $J_{meta}=2.1$ Hz) con los protones en 5' y 2', respectivamente. El protón 5' se observa en δ 7.25 con una $J_{orto}=8.4$ Hz con el protón 6' y finalmente el protón en 2' se observa como una señal doble en δ 7.27 con una $J_{meta}=2.1$ Hz con el protón en 6'.

Por otro lado, se observan dos señales dobles con constantes de acoplamiento características de un acoplamiento *meta* entre los protones lo que indica que se tienen 2 sustituyentes en el anillo A, la señal doble en δ 6.24 ($J_{meta}=2.2$ Hz) es característica para el protón 8 de este tipo de compuestos, por lo que se infiere que los sustituyentes deben estar en la posición 5 y 7, asignando la señal doble en δ 6.27 ($J_{meta}=2.1$ Hz) al protón en la posición 6.

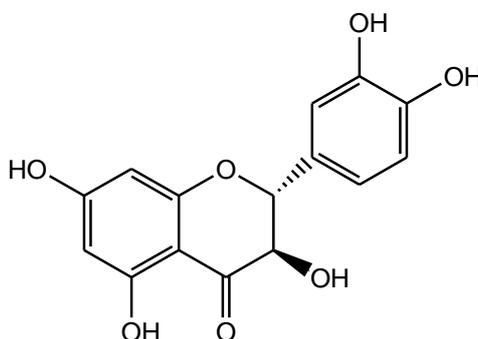
En el espectro de RMN ^{13}C , se observan 3 señales con desplazamientos químicos muy similares correspondientes a grupos metilos en δ 20.58 (C3), 20.86 (C3', C4'), 21.32 (C7) ppm, de las cuales, la señal en 20.86 ppm presenta mayor intensidad que las otras dos, lo que se atribuye a la presencia de dos grupos metilo con desplazamientos iguales. Además, se observa una cuarta señal con un desplazamiento químico de 29.92 ppm, el cual se asignó al grupo metilo en posición 5, dicho grupo se desplaza a campo bajo respecto a los otros metilos debido al efecto anisotrópico del grupo carbonilo ubicado en posición 4. Los 5 grupos metilo corresponden a los metilos de los acetatos en las posiciones ya indicadas, por lo que se deduce que se tiene la molécula

completamente acetilada. La asignación completa se corroboró con datos de referencia.⁹³

La espectrometría de masas muestra los fragmentos característicos para un dihidroflavonol.⁹⁴ y muestra el ion molecular en 515 m/z, correspondiente a 15 grados de insaturación, lo que apoya la siguiente estructura.



Dada la técnica empleada para aislar este compuesto, se tiene que la estructura original del compuesto en la planta es la dihidroquercetina, cuya estructura es la siguiente.



Es importante mencionar que este componente no había sido reportado en los estudios previos de la especie.

El estudio de actividad antiinflamatoria para este compuesto no se realizó debido a la poca cantidad disponible del mismo. Aunque la principal actividad estudiada ha sido la antioxidante, su actividad como antiinflamatorio ya ha sido descrita previamente, se sabe que actúa como inhibidor de la PGE2 y la COX-

⁹³Kiehlmann, E.; Slade, P.W.; Methylation of Dihydroquercetin Acetates: Synthesis of 5-O-Methyl-dihydroquercetin. *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 1562-1566.

⁹⁴Harborne, J.B. *The flavonoids*, Chapman and Hall, London 1995, pp 103-105.

2.⁹⁵ Respecto a su actividad en el modelo de TPA en oreja de ratón se ha reportado nula al ser administrado oralmente 18 horas antes de la administración del inductor de la inflamación.⁹⁶ No se pudo encontrar ningún informe acerca de su aplicación tópica.

Finalmente, la figura 6 muestra una comparación entre la actividad del extracto y los compuestos aislados a una concentración de 0.31 $\mu\text{g}/\text{oreja}$. Como se puede observar, la mezcla de los ácidos oleanólico y ursólico parece explicar las propiedades antiinflamatorias de la planta en estudio, con un porcentaje de inhibición similar al que presentó el extracto.

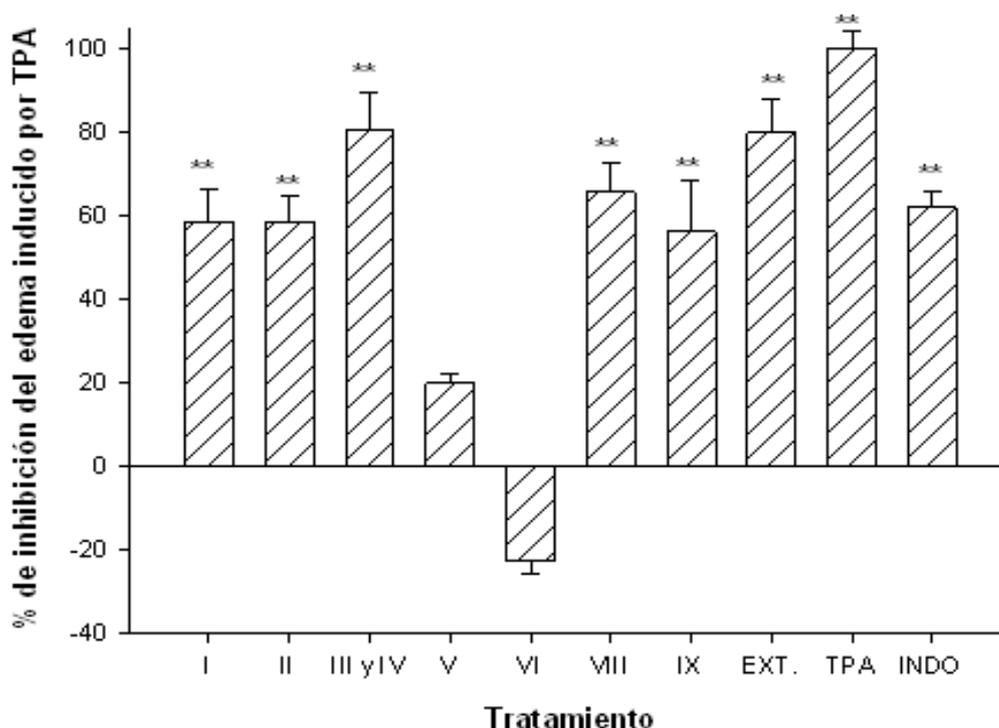


Figura 6. Actividad antiinflamatoria de los metabolitos secundarios aislados de *Salvia thymoides* determinados a una concentración de 0.31 $\mu\text{mol}/\text{oreja}$ usando como vehículo una mezcla de cloroformo:acetona (1:1). Los datos representan el promedio de tres a cinco ratones \pm el error estándar de la media. Los resultados se analizaron mediante una prueba de *t* de Student y los valores de $p \leq 0.01$ (**) se consideraron como diferencia significativa con respecto al control. Donde I =eupatorina**, II =ác. betulínico**, III y IV =mezcla de los ácidos oleanólico y ursólico**, V y VI =clerodanos no reportados, VIII =lupeol**, IX = β -sitosterol**, ext =extracto acetónico**e INDO= Fármaco de referencia (idometacina).**

⁹⁵Hämäläinen, M.; Nieminen, R.; Zaini, A.M.; Vuorela, P.; Vapatalo, H.; Moilanen, E. Effects of Flavonoids on Prostaglandin E2 Production, and on COX-2 and mPGES-1 Expressions in Activated Macrophages. *Planta Med.* **2011**, 77 (13), 1504-1511.

⁹⁶Ueda, H.; Yamazaki, C.; Yamazaki, M. A Hydroxyl Group of Flavonoids Affects Oral Anti-inflammatory Activity and Inhibition of Systemic Tumor Necrosis Factor-alpha Production. *Bios. Biotechnol. Biochem.* **2004**, 68(1), 119-125.

7. CONCLUSIONES

El estudio biodirigido de los componentes antiinflamatorios de *Salvia thymoides* llevó a la identificación de nueve compuestos. Cinco compuestos activos de naturaleza triterpenoide: Ácido betulínico, ácido oleanólico, ácido ursólico, lupeol y β -sitosterol; Una estructura activa tipo flavonoide: eupatorina; un compuesto tipo flavonoide para la cual no fue posible realizar el estudio de actividad y dos clerodanos que no presentaron actividad en el modelo de actividad antiinflamatoria empleado.

La estructura química de los metabolitos aislados se dedujo mediante sus datos físicos, espectroscópicos y espectrométricos.

Varios compuestos aislados ya han sido reportados para la especie en estudio, como lo son: Los Ácidos betulínico, oleanólico, ursólico y β -sitosterol y eupatorina.

Adicionalmente, se determinó la estructura química de cuatro compuestos no reportados anteriormente para la especie en estudio: La dihidroquercetina, lupeol y los compuestos **V** y **V**.

Aunque los compuestos **V** y **VI** no presentaron actividad antiinflamatoria en el modelo propuesto, representan un valioso aporte a la fitoquímica de la especie ya que son estructuras que no se encontraron reportadas anteriormente en la literatura.

Finalmente, se puede afirmar que los componentes que confieren actividad antiinflamatoria a *Salvia thymoides* presentan una estructura triterpénoide y flavonoide principalmente, aunque se infiere que la actividad del extracto crudo de la especie en estudio se debe principalmente a la presencia de los ácidos ursólico y oleanólico.

8. ANEXOS

8.1. Caracterización de los compuestos aislados

Compuesto I. 3',5-dihidroxi-4',6,7-trimetoxiflavona (eupatorina): p.f. 191-195°C; IR(espectro 1, Nujol) $\nu_{\text{máx.}} \text{ cm}^{-1}$: 3545, 1611, 1592, 1496, 1458, 1125, 1271; RMN ^1H (espectro 2, 300 MHz, CDCl_3) δ :12.76 (1H, s, C5-OH), 5.79 (1H, s, C4'-OH), 6.56 (1H,s, H3), 6.59 (1H,s,H8), 6.97 (1H,d, J=8.7Hz, H3'), 7.34 (1H, d, J=2.3Hz, H6'), 7.47 (1H,dd,J=7.8,2.1, H2'), 3.93 (3H,s,C4'-CH₃), 3.98 (3H,s,C6-CH₃), 3.99 (3H, s, C6-CH₃); RMN ^{13}C (espectro 4, 75 MHz, CDCl_3) δ : 182.66 (d, C5), 163.83 (d, C2), 158.79 (d,C7), 153.23 (s,C5), 153.04 (s,C9), 149.62 (s,C4'), 146.07 (s, C3'), 132.69 (d,C6), 124.51 (s, C1'), 119 (d,C6'), 112.36 (d,C5'), 110.73 (d,C2'), 106.18 (s,C10), 104.49 (d,C3), 90.61 (d,C8), 60.83 (c, C6-OCH₃), 56.31 (c, C3'-OCH₃), 56.16 (c, C7-OCH₃); EM-IE 70 eV, m/z(%): 344[M⁺] (100), 329 (89), 315 (19), 181 (13), 153 (26), 69 (8).

Compuesto II. ácido 3-β-hidroxilupen-20(29)-en-28-oico: p.f. 295-299°C; IR (espectro 8, Nujol) $\nu_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$: 3408, 2922, 2853, 1709, 1688, 1376; RMN ^1H (espectro 10, 300MHz, CDCl_3) δ :4.72 (1H,d,J=2.1,H29), 4.58 (1H,dd,J=2.1,1.2, H29), 3.16 (1H,dd,J=6,5.4,H3), 3.02 (1H,dd,J=11.4,4.8,H19), 1.68 (3H,s,CH₃), 0.97 (3H,s CH₃),0.96 (3H,s,CH₃), 0.94 (3H,s,CH₃), 0.82 (3H,s,CH₃), 0.75 (3H,s CH₃); RMN ^{13}C (espectro 10, 75 MHz, CDCl_3) δ 178.55 (t,C28), 150.89 (s,20), 109.89 (t,C29), 78.65 (d,C3), 56.10, 55.35, 50.53, 49.20, 46.89, 42.42, 40.73, 38.85, 38.73, 38.22, 37.17, 37.08, 34.34, 32.33, 30.67, 29.72, 28.03, 27.39, 25.54, 20.87, 19.37, 18.29, 16.126, 16.04, 15.47, 14.67; EM-IE 70eV, m/z (%): 456 [M⁺] (29), 438 [M+-H₂O] (9), 411 [M⁺-COOH] (6), 248 (32), 207 (67), 203 (77),189 (100),175 (68).

Mezcla de compuestos III y IV. Ácido 3-β-hidroxiolean-12-en-28-oico y 3-β-hidroxiurs-12-en-28-oico; p.f. 255-258°C; IR (espectro 13, Nujol) $\nu_{\text{máx.}} \text{ cm}^{-1}$: 3423,1689, 1459,1377; RMN ^1H (espectro 16, 300 MHz, $\text{CDCl}_3+\text{DMSO-D}_6$, todas las señales duplicadas): δ 0.78, 0.80, 0.83, 0.92, 0.93,0.94,1.08 (21H, 7s, CH₃), 1.37 (m, 2H, H-21), 1.38 (m, 2H, H-16), 1.45 (m, 2H, H-20), 1.51 (m, 4H, H-18, H-19), 3.2 (1H, m, H3), 5.25 (1H,t,J=3.3), RMN ^{13}C (espectro 15, 75 MHz, $\text{CDCl}_3+\text{DMSO-D}_6$ región aromática):180.09, 144.04, 138.26, 125.29, 122.06, 78.69; EM-IE 70 eV, m/z (%): 456 [M⁺] (3), 438 (2), 248 (100), 219 (6), 203 (45), 189 (10), 133 (20), 119 (7).

Compuesto **V**. p.f.180-182°C;p.f. $[\alpha]_D=169$ (acetona, c 1); IR (espectro 18, solución en CDCl_3) $\nu_{\text{máx. cm}^{-1}}$:3685,3498, 2959, 2929, 2859, 1781, 1749, 1688. RMN ^1H (espectro 19, 300 MHz, CDCl_3), δ 0.73 (1H, s, H17), 0.89(1H, d, $J=6.9$), H20), 4.76 (1H, d, $J=1.8$, H16), 4.88 (1H,s, H18 α), 5.11 (1H,t, $J=1.8$, H18 β), 5.3(1H,dddd, $J=12.6$, 4.2, 1.8, H1), 5.86 (1H,t, $J=1.8$,H14), 5.97 (1H,ddd, $J=10.5,2.7.1.2$,H2), 7.38 (1H,dd $J=7.5,2.4$, H3); RMN ^{13}C (espectro 21, 75 MHz, CDCl_3): 174 (s, C19), 170.85 (s,C15), 170.54 (s,C13), 144.46 (s,C4), 143.02 (d,C1), 128.19 (d, C2), 126.74 (d,C3), 118.46 (s, C18), 115.26 (t,C14), 73.05 (t, C16), 37.89 (s, C9), 35.75 (t,C11), 35.56 (d, C8), 34.73 (t,C10), 33.70 (t,C6), 29.15 (t,C7), 23.59 (t,C12), 18.55 (c, C2), 13.81 (c,C17); EM-IE 70 eV, m/z (%): 330 (11), 313 (44), 297 (17), 254 (18), 201 (22), 173 (35), 159 (47), 131 (65), 111 (100), 107 (78), 98 (82), 91 (92), 79 (46), 55 (35).

Compuesto **VI**. p.f. 184-185°C; $[\alpha]_D=-1.052$ (DMSO, c 2.85); IR (espectro 24, Nujol) $\nu_{\text{máx. cm}^{-1}}$: 3404, 3115, 3019, 2925, 2854, 1795, 1736, 1677, 1631, 1455.; RMN ^1H (espectro 25, 300 MHz, $\text{CDCl}_3+\text{DMSO-D}_6$) δ : 9.99 (1H,s, H18), 6.02 (1H,s,H3), 5.69 (1H,t, $J=1.5$, H14), 4.89 (1H,d, $J=4.2$, C12-OH), 4.59 (2H,d, $J=1.8$, H16 α y H16 β), 3.52 (1H, q, $J=5.2$, H7 β), 1.18 (3H,s,C19- CH_3), 0.74 (6H,d, $J=6$,C17- CH_3 y C20- CH_3); RMN ^{13}C (espectro 27, 75 MHz, $\text{CDCl}_3+\text{DMSO-D}_6$) δ :198.91 (s,C2), 195.33 (d,C18), 173.02 (s,C15), 169.27 (s,C13), 164.40 (s,C4), 130.63 (d,C3), 114.59 (d,C14), 72.34 (t,C16), 71.77 (d,C7), 44.60 (s,C5), 44.03 (d,C10), 37.56 (s,C9), 35.18 (t,C6), 34.18 (t,C11), 33.81 (t,C12), 33.69 (d,C8), 21.05 (t,C1), 16.72 (c,19), 14.80 (c,C20) 14.06 (c,C17), EM-IE 70 eV m/z (%): 346 (43), 328 (58), 215 (46), 189 (45), 187 (38), 161 (73), 148 (45), 135 (34), 121 (40), 111 (43), 98 (100), 91 (39), 81 (40), 69 (37), 55 (34).

Compuesto **VII**. Betulinato de metilo. p.f. 178-180°C; RMN ^1H (espectro 30, 300 MHz, CDCl_3) δ : 4.72 (1H,d, $J=2.1$,H29), 4.58 (1H,dd, $J=2.1,1.2$, H29), 3.66 (H3, s CH_3) 3.16 (1H,dd, $J=6,5.4$,H3), 3.02 (1H,dd, $J=11.4,4.8$,H19), 1.68 (3H,s, CH_3), 0.97 (3H,s CH_3),0.96 (3H,s, CH_3), 0.94 (3H,s, CH_3), 0.82 (3H,s, CH_3), 0.75 (3H,s CH_3); RMN ^{13}C (espectro 31, 75 MHz, CDCl_3) δ 176.66 (t,C28), 150.59 (s,20), 109.56 (t,C29), 79.00 (d,C3), 56.57, 55.37, 51.24, 50.56, 49.49, 46.98, 42.40, 40.69, 38.86, 38.73, 38.28, 37.21, 36.97, 34.34, 32.19, 30.62, 29.68, 27.98,

27.42, 25.53, 20.89, 19.37, 18.30, 16.10, 15.95, 15.34, 14.7. EM-IE 70 eV, m/z (%): 411[M⁺-COOMe] (6), 207 (47), 203 (100), 189 (58), 175 (27), 135 (41), 133 (36), 95 (36), 81 (28), 69 (25).

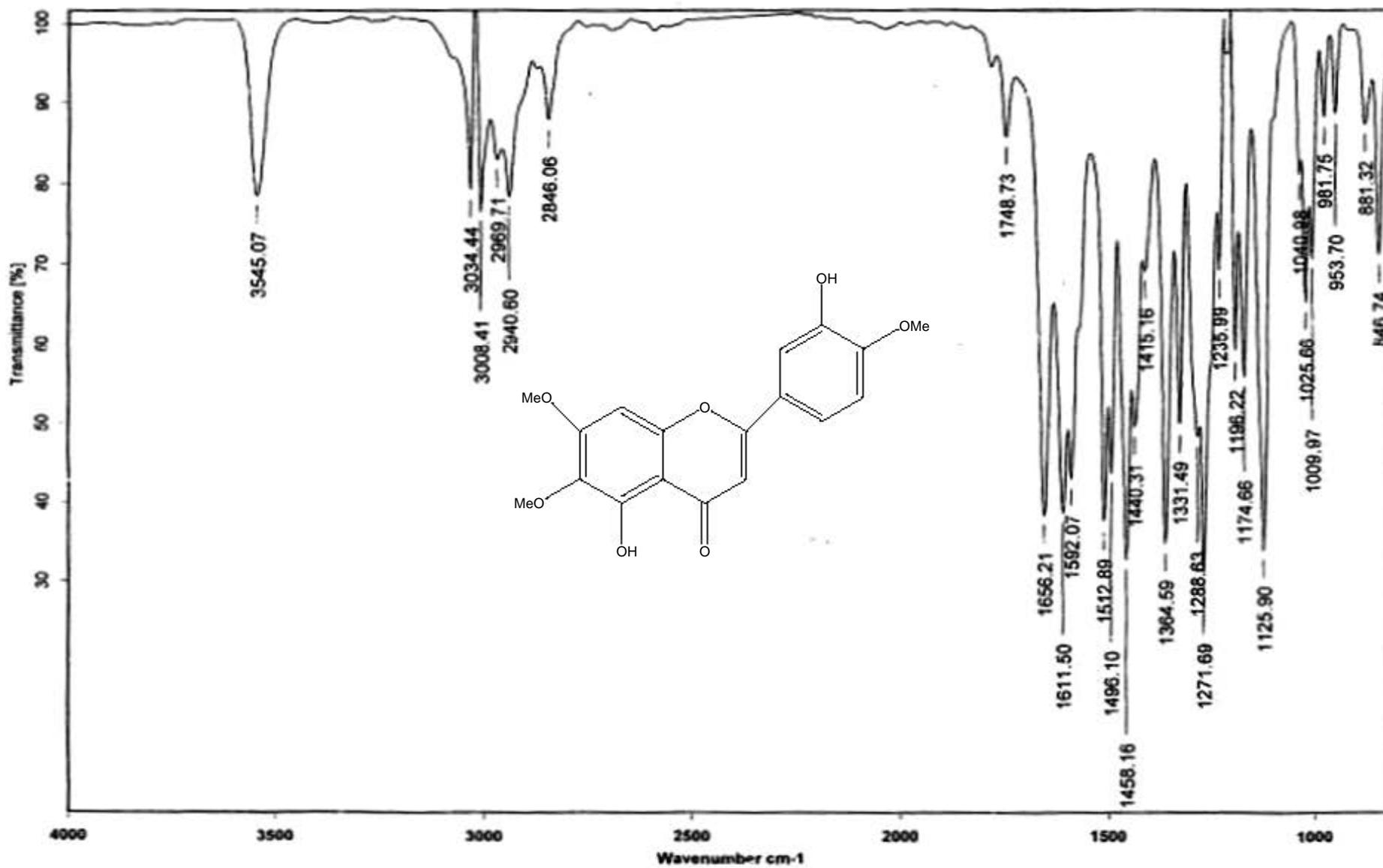
Compuesto **VIII**. 3 β -lup20(29)-en-3-ol; p.f. 195-199°C; IR (espectro 32, solución en CHCl₃) $\nu_{\text{máx.}}$ cm⁻¹: 3692, 2946, 2860, 1638, 162, 1455, 1381; RMN ¹H (espectro 33, 300MHz, CDCl₃): δ 4.68 (1H,d,J=1.2, H29 α), 4.56 (1H,d,J=1.2, H29 β), 3.18 (1H,dd,J=10.8,5.7,H3), 1.68, 1.032, 0.96, 0.94, 0.83, 0.79, 0.76 (3H,s,CH₃): ¹³C(espectro 34, 75 MHz, CDCl₃) δ 150.88 (s,C20), 109.22 (d,C20), 78.94 (d,C3), 48.26 (d,C19), 55.24, 50.39, 48.76, 47.92, 42.94, 42.76, 40.78, 39.93, 38.78, 38.66, 38.01, 37.11, 35.52, 34.24, 29.80, 29.61, 27.91, 27.35, 25.10, 20.88, 19.23, 18.25, 17.92, 16.03, 15.91, 15.28, 14.48; EM-IE 70 eV, m/z (%): 426 [M⁺], 411 (21), 315 (22), 257 (21), 218 (92), 207 (99), 189 (100), 163 (32), 149 (47), 135 (99), 121 (81), 118 (81), 95 (85), 81 (67), 69 (55).

Compuesto **IX**. β -sitosterol: p.f. 125-130°C; IR (espectro 37, solución en CHCl₃) $\nu_{\text{máx.}}$ cm⁻¹: 3690, 3461, 2959, 2938, 2870, 1731, 1602, 1464, 1380; RMN ¹H (espectro 38, 300MHz, CDCl₃): δ 5.35 (1H,d,J=3.9, H6), 3.51 (1H,m,H3), 1.00 (3H,s,CH3-19), 0.92 (3H, d, J=5.1,CH3-21), 0.84 (3H,t,J=5.7,CH3-29), 8.82 (3H,d,J=6.6, CH3-27), 0.68 (3H,s,CH3-18). (Espectro 39, 75 MHz, CDCl₃) δ 140 (d, C5), 121 (d,C6), 71.83 (C3), 56.80, 56.09, 50.17, 45.88, 42.34, 39.81, 37.28, 36.53, 36.17, 33.98, 31.94, 31.70, 29.20, 28.26, 26.13, 24.32, 23.09, 21.11, 19.83, 19.41, 19.6, 18.80, 11.99, 11.88. EM-IE 70 eV, m/z (%): 414 [M⁺] (100), 396 (64), 381 (52), 381 (52), 329 (57), 303 (70), 273 (40), 255 (54), 231 (45), 213 (72), 199 (28), 173 (31), 161 (91), 145 (69), 133 (54), 107 (73), 95 (64), 81 (60), 69 (45), 55 (45), 43 (33).

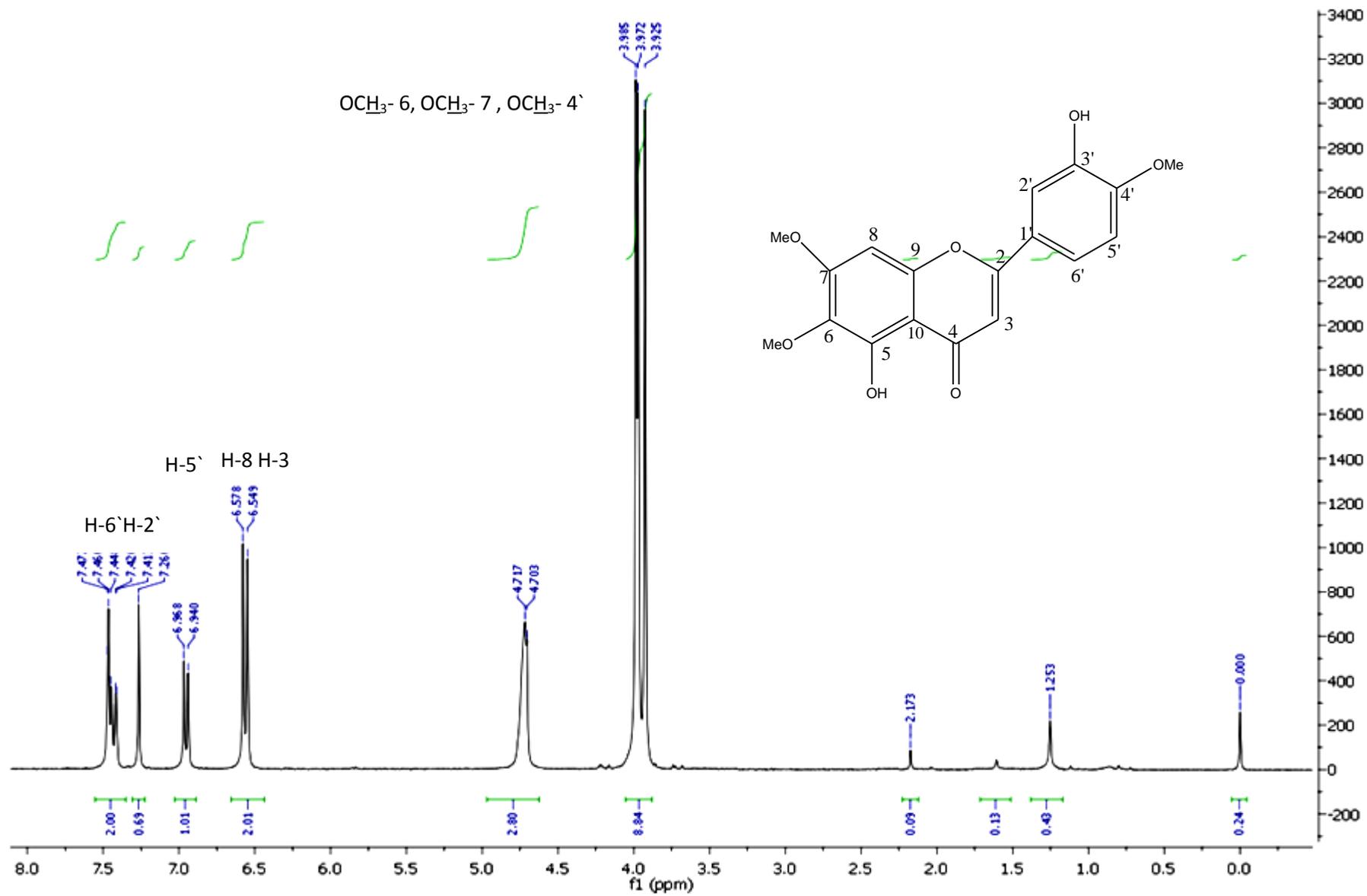
Compuesto **X**. 3`4`5,7-tetrahidroxifavanonol (dihidroquercetina). p.f. 90-100 °C; IR (espectro 41, solución en CHCl₃) $\nu_{\text{máx.}}$ cm⁻¹: 3569, 3020, 1769, 1694, 1622, 1371; RMN ¹H (espectro 42, 300 MHz, CDCl₃): δ 8.4 (1H,dd,J=8.4,2.1,H6`), 7.27 (1H,d,J=2.1, H2`), 7.25 (1H,d,J=8.4,H5`), 6.27 (1H,d,J=2.1,H6), 6.24 (1H,d,J=2.1,H8), 5.59 (1H,d,J=12,H2), 5.31 (1H,d,J=12.3,H3), 3.49 (1H,s,C2-OH); RMN ¹³C (Espectro 44, 75 MHz, CDCl₃) δ : 184.6 (s,C4), 169.99 (3-OAc`), 169.55 (7-OAc), 168.32 (3`, 4`-OAc), 164.32 (7-OAc), 163.37 (9), 152.37 (C5), 142.96 (C3`), 142.25 (C4`), 134.35 (1`), 125.71 (C6`), 123.96 (C2`), 123.03

(C5`), 106.68 (C10), 106.34 (C6), 102.08 (C8), 80.34 (C2), 73.33 (C3), 29.92 (5-OAc), 21.317 (7-OAc), 20.86 (3`,4`-OAc), 20.58 (3-OAc). EM-IE 70 eV, m/z (%):515 [M⁺] (5), 472 (19), 455 (33), 442 (67), 412 (28), 388 (33), 370 (49), 346 (33), 328 (87), 286 (100), 208 (21), 195 (45), 153 (98), 152 (71), 150 (64), 123 (34), 99 (29), 57 (21).

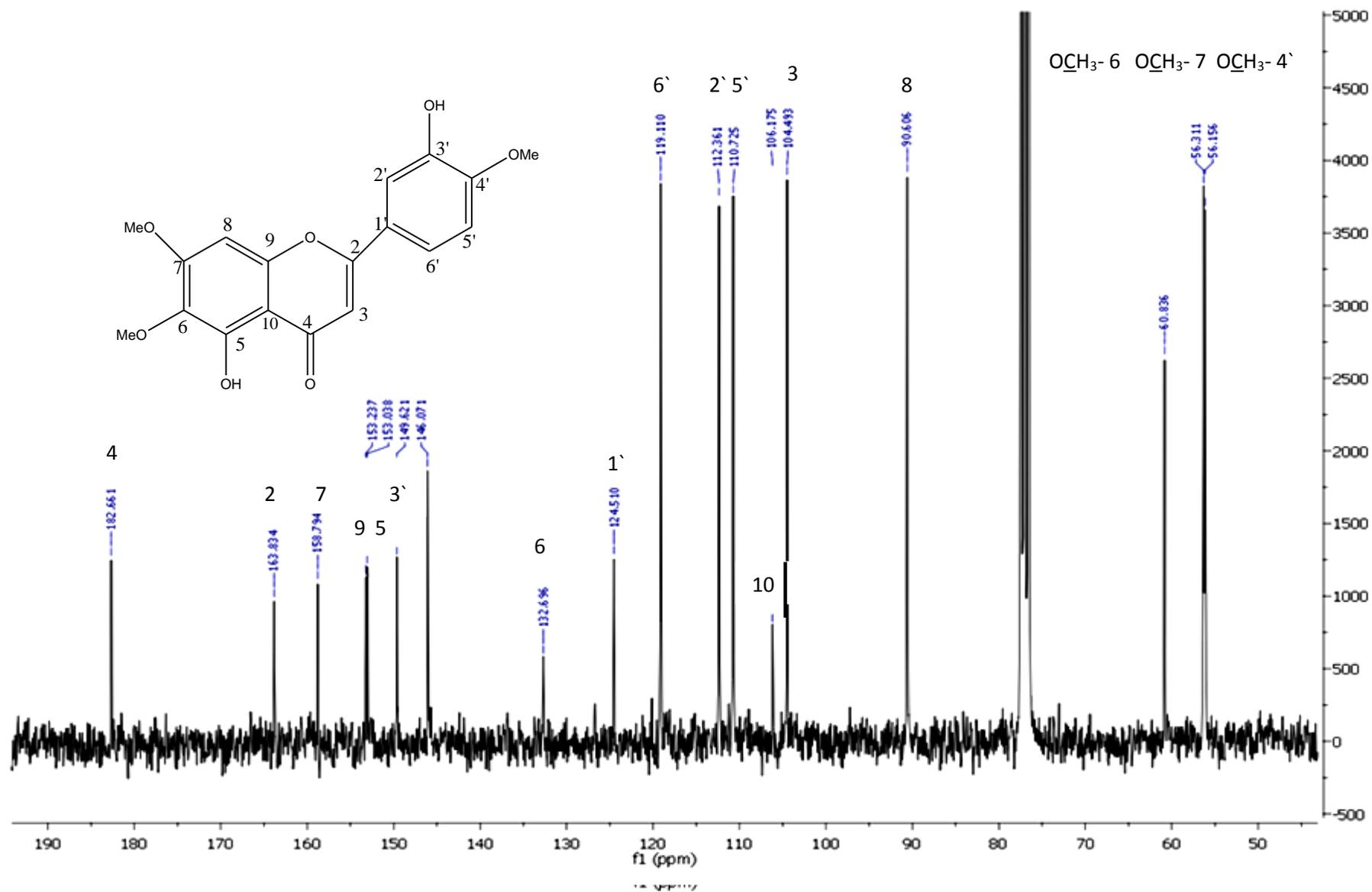
8.2. ESPECTROS



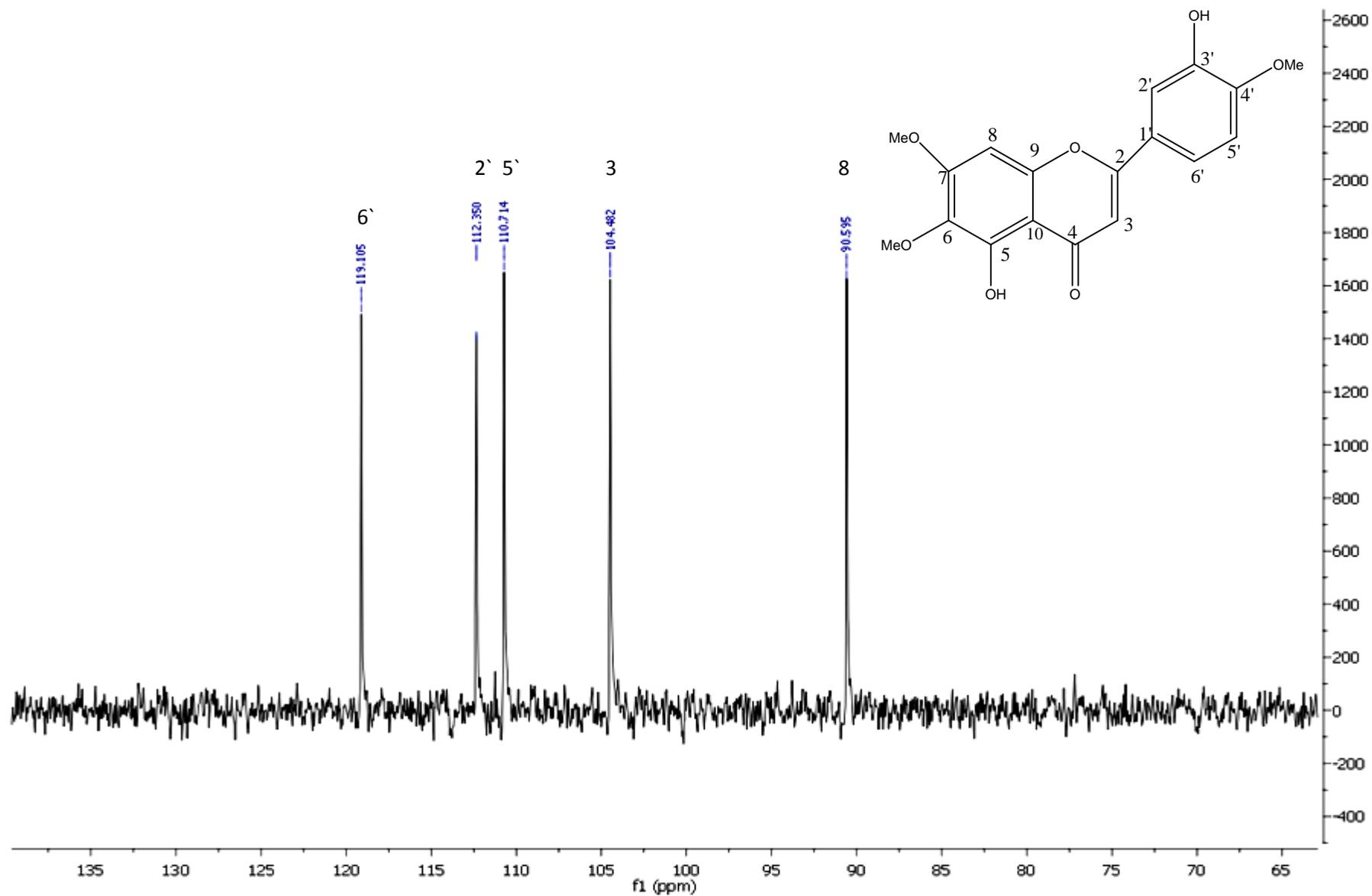
Espectro 1. Espectro IR realizado por la técnica de suspensión en Nujol para el compuesto I.



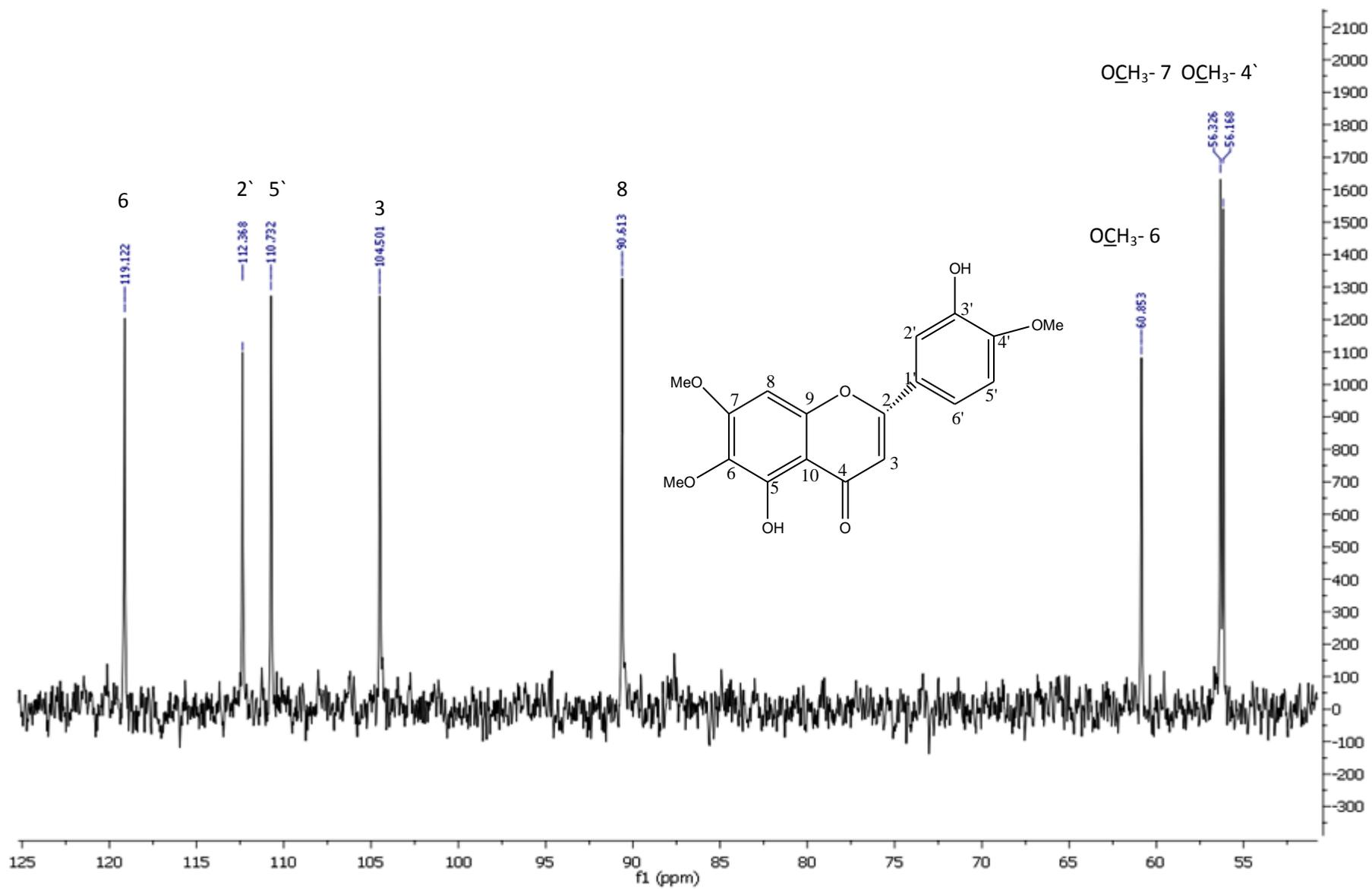
Espectro 3. ^1H + D_2O RMN (300 MHz, CDCl_3) para el compuesto I.



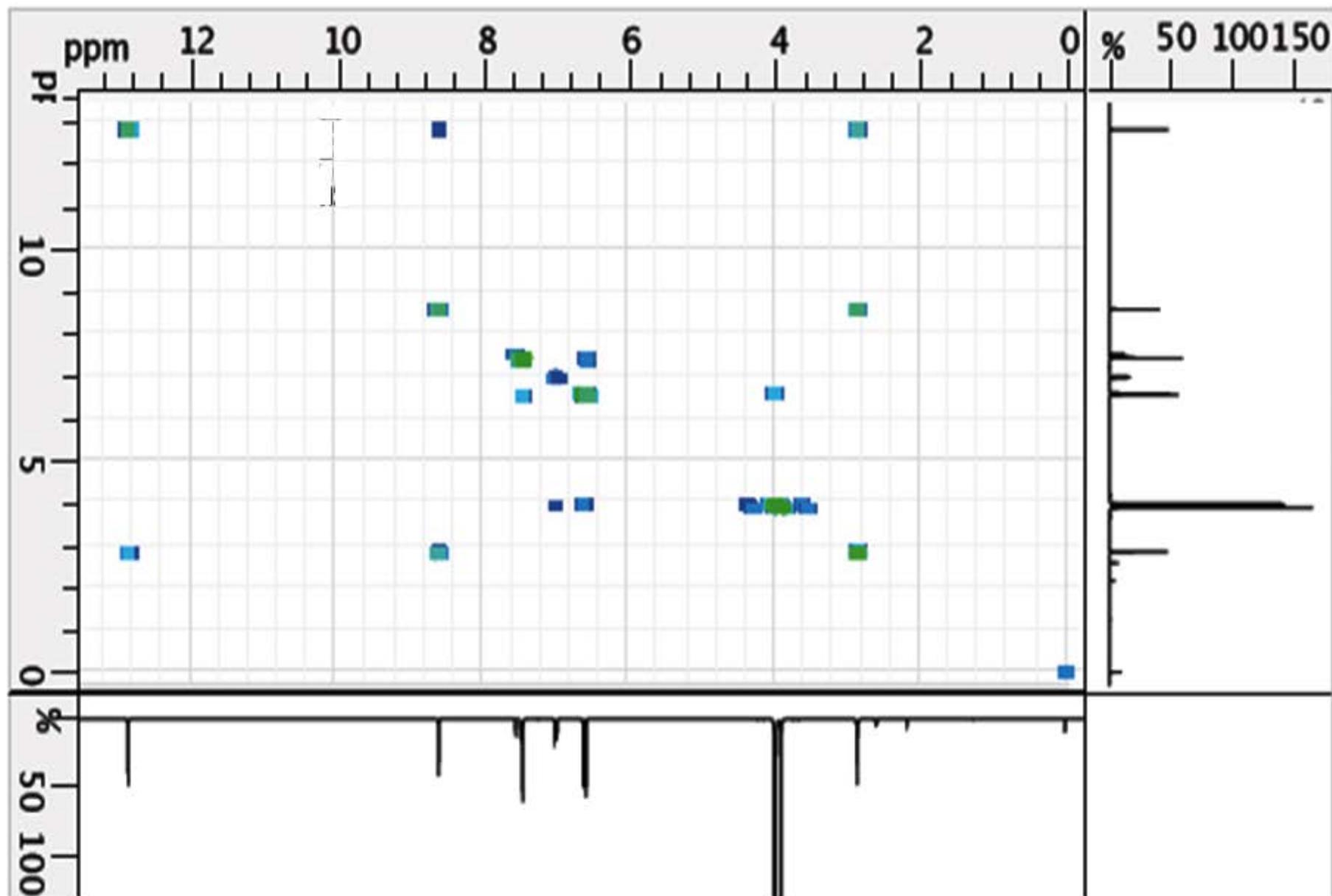
Espectro 4. RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) para el compuesto I.



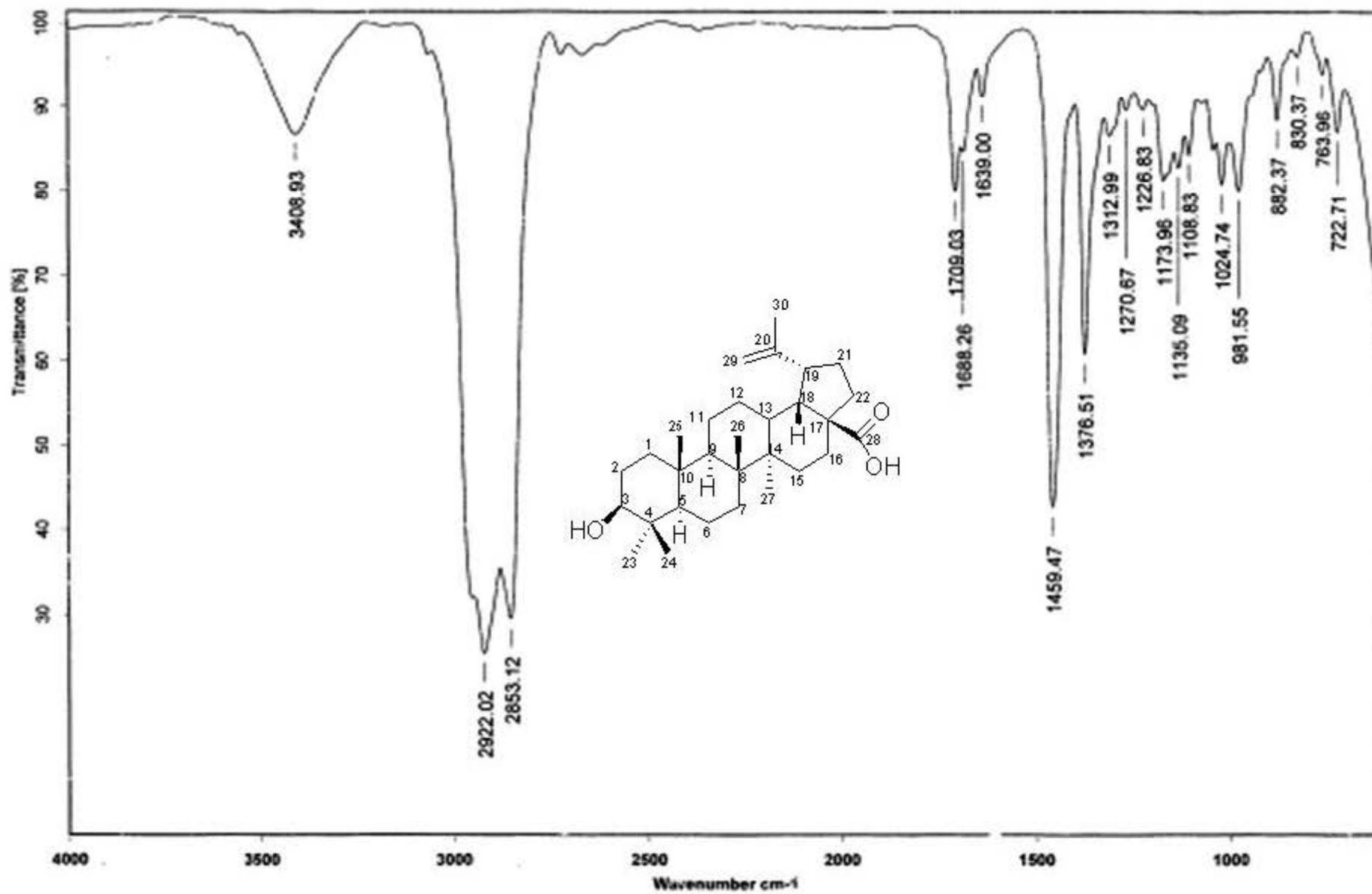
Espectro 5. DEPT 90 (75 MHz, CDCl₃) compuesto I.



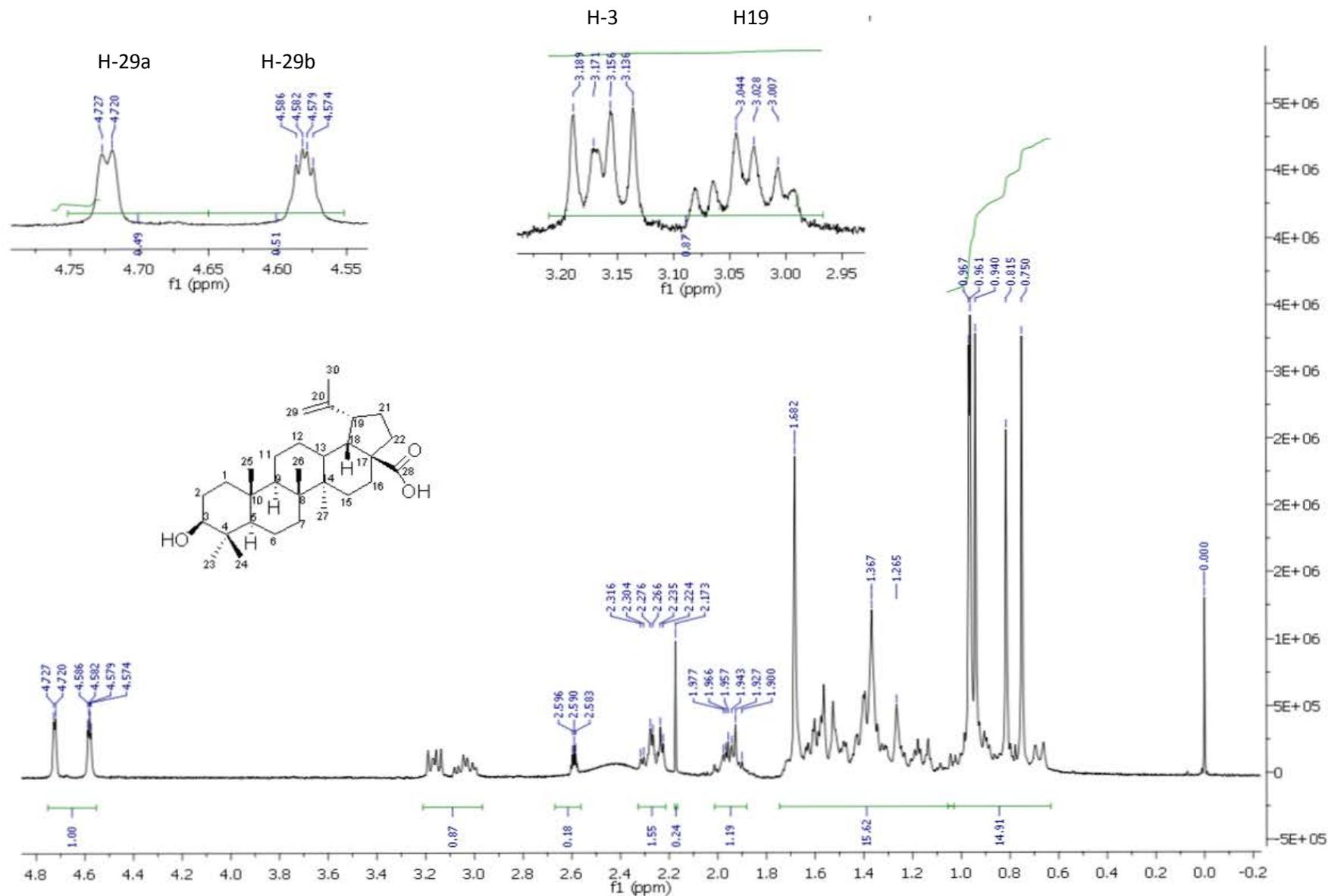
Espectro 6. DEPT 135 (75 MHz CDCl₃) para el compuesto I.



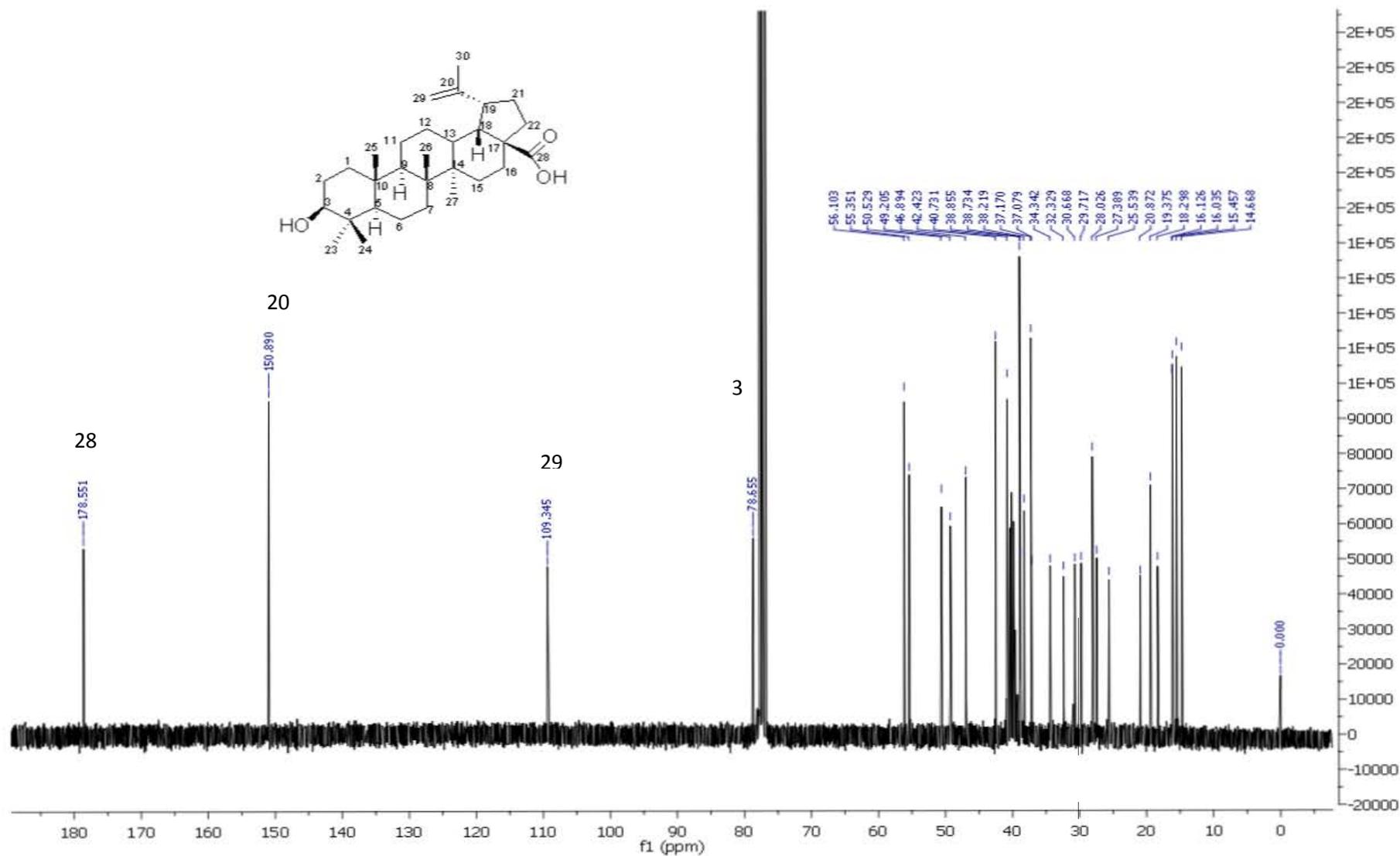
Espectro 7. COSY (300 MHz, CDCl₃+DMSO-D₆) para el compuesto I.



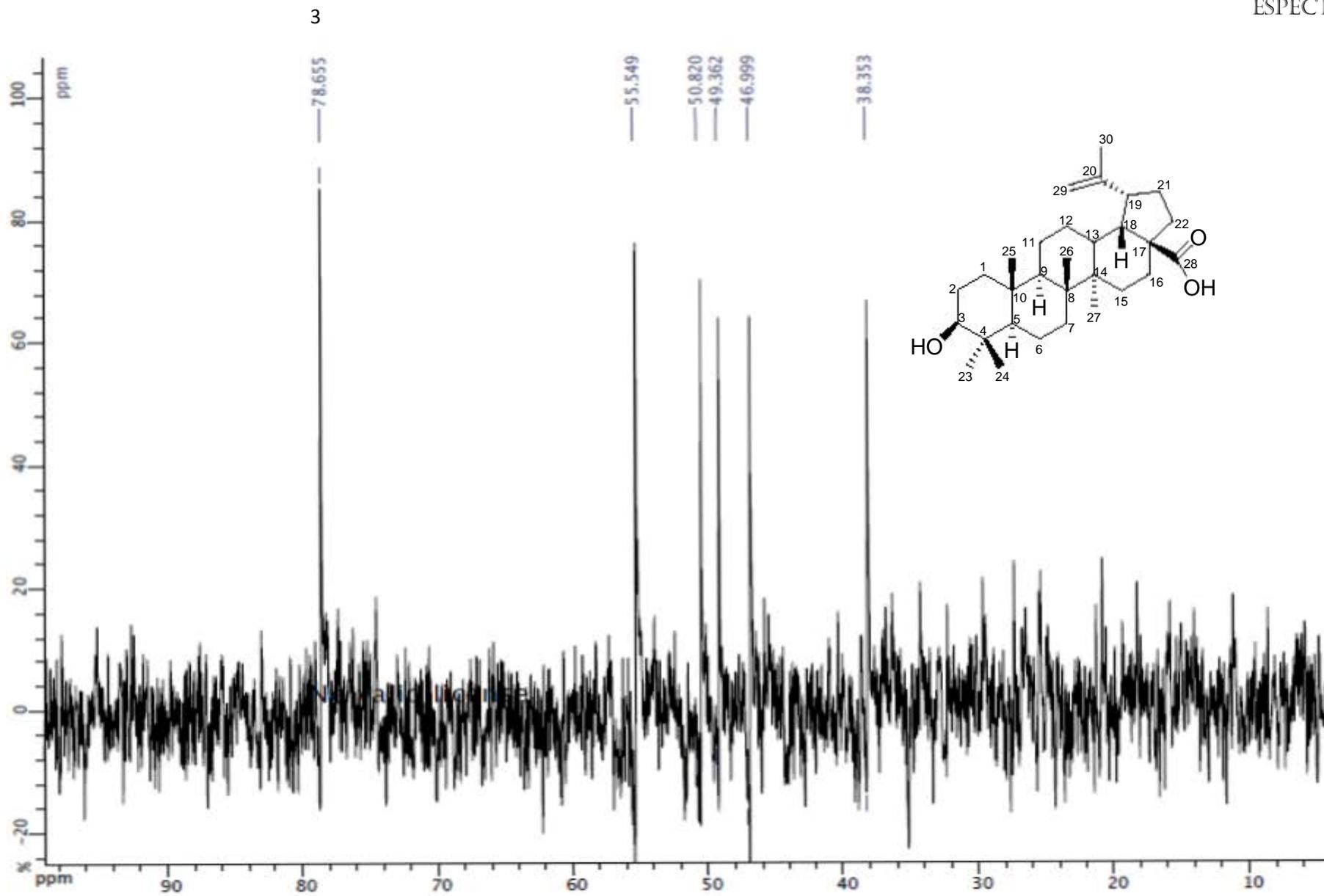
Espectro 8. Espectro IR realizado por la técnica de suspensión en Nujol para el compuesto II.



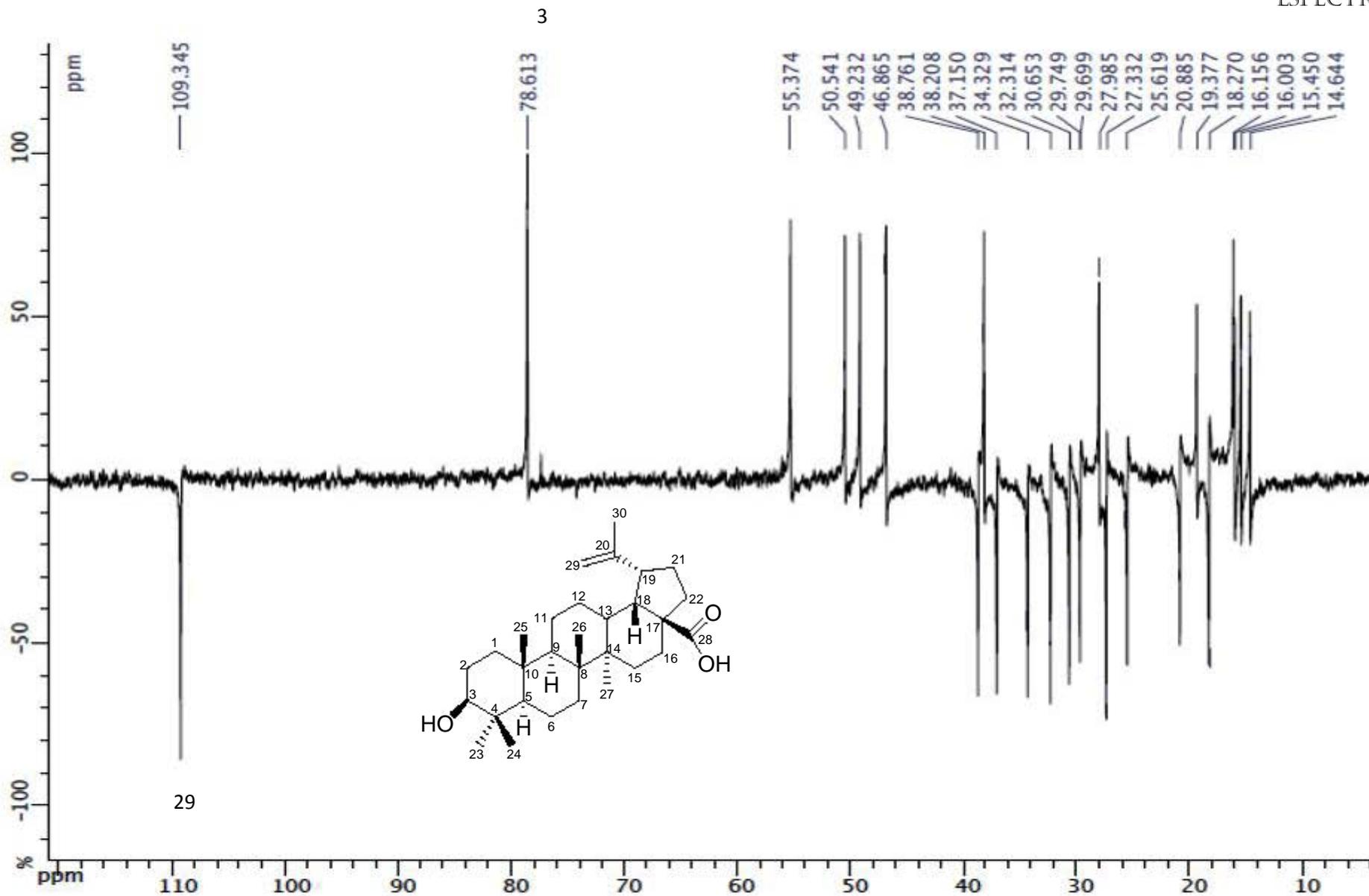
Espectro 9. RMN de ^1H (300 MHz, $\text{CDCl}_3+\text{DMSO-D}_6$) para el compuesto II.



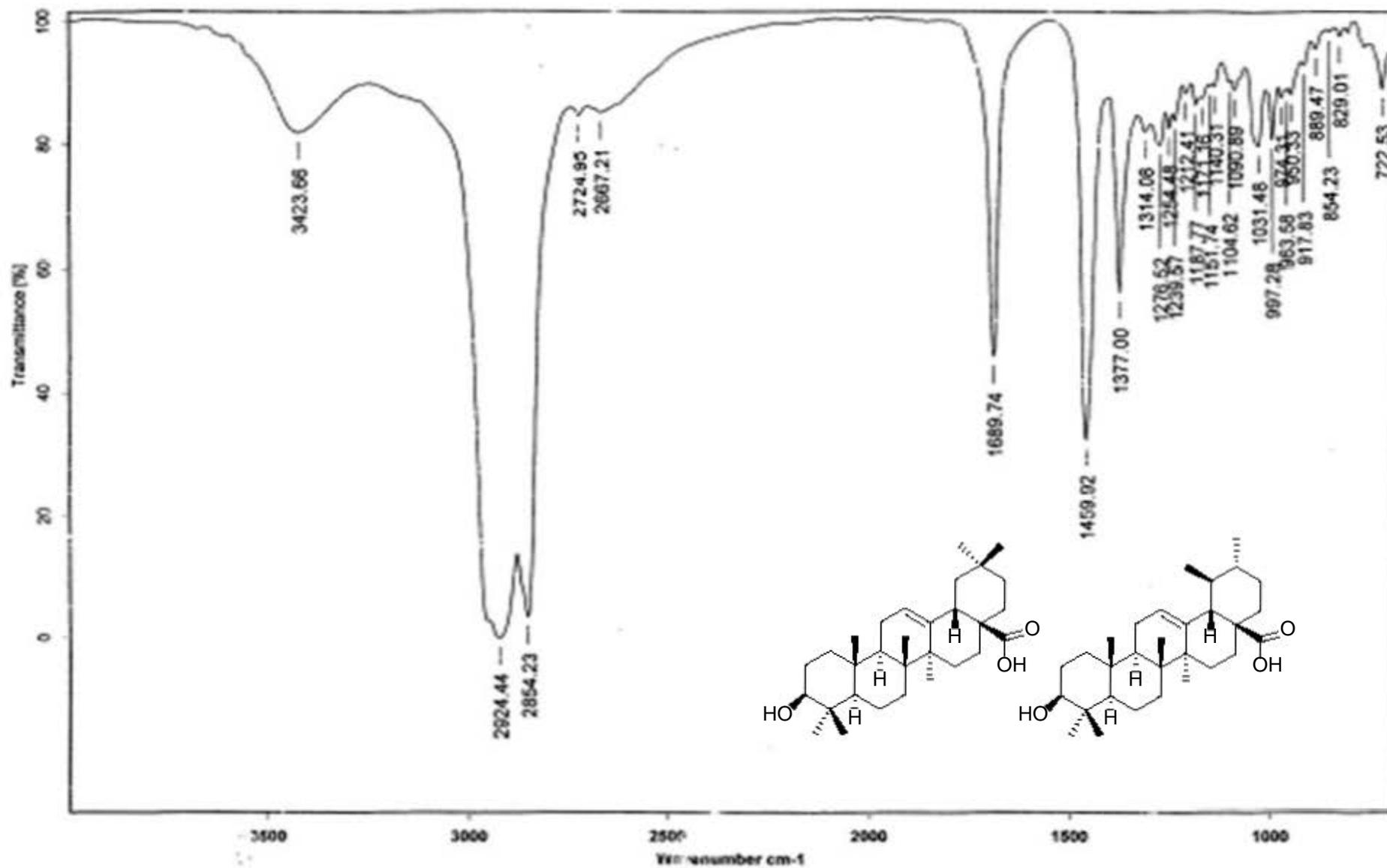
Espectro 10. RMN de ^{13}C (75.4 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-D}_6$) para el compuesto II.



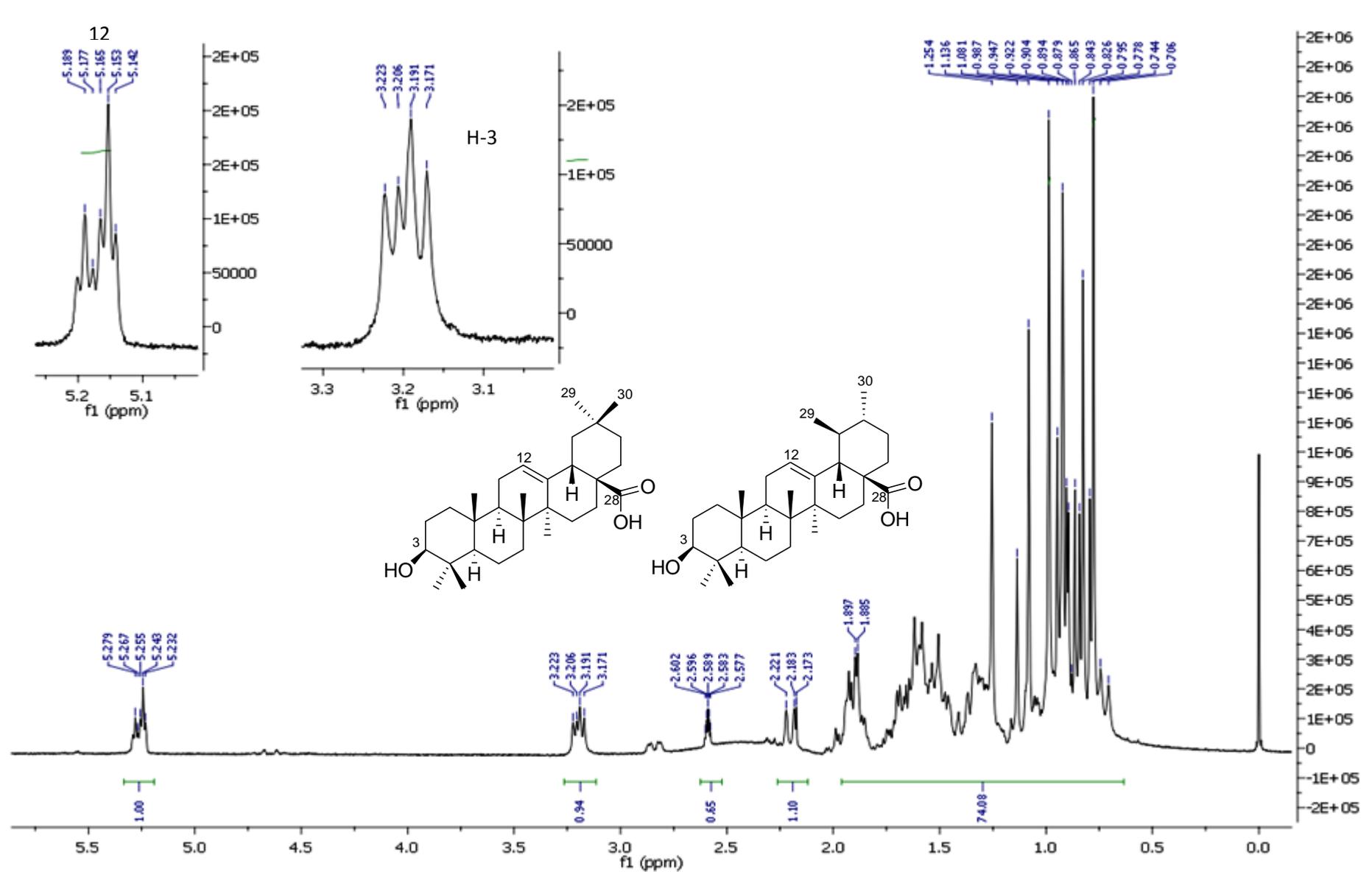
Espectro 11. Espectro DEPT 90(75 MHz, $\text{CDCl}_3+\text{DMSO-D}_6$), compuesto II.



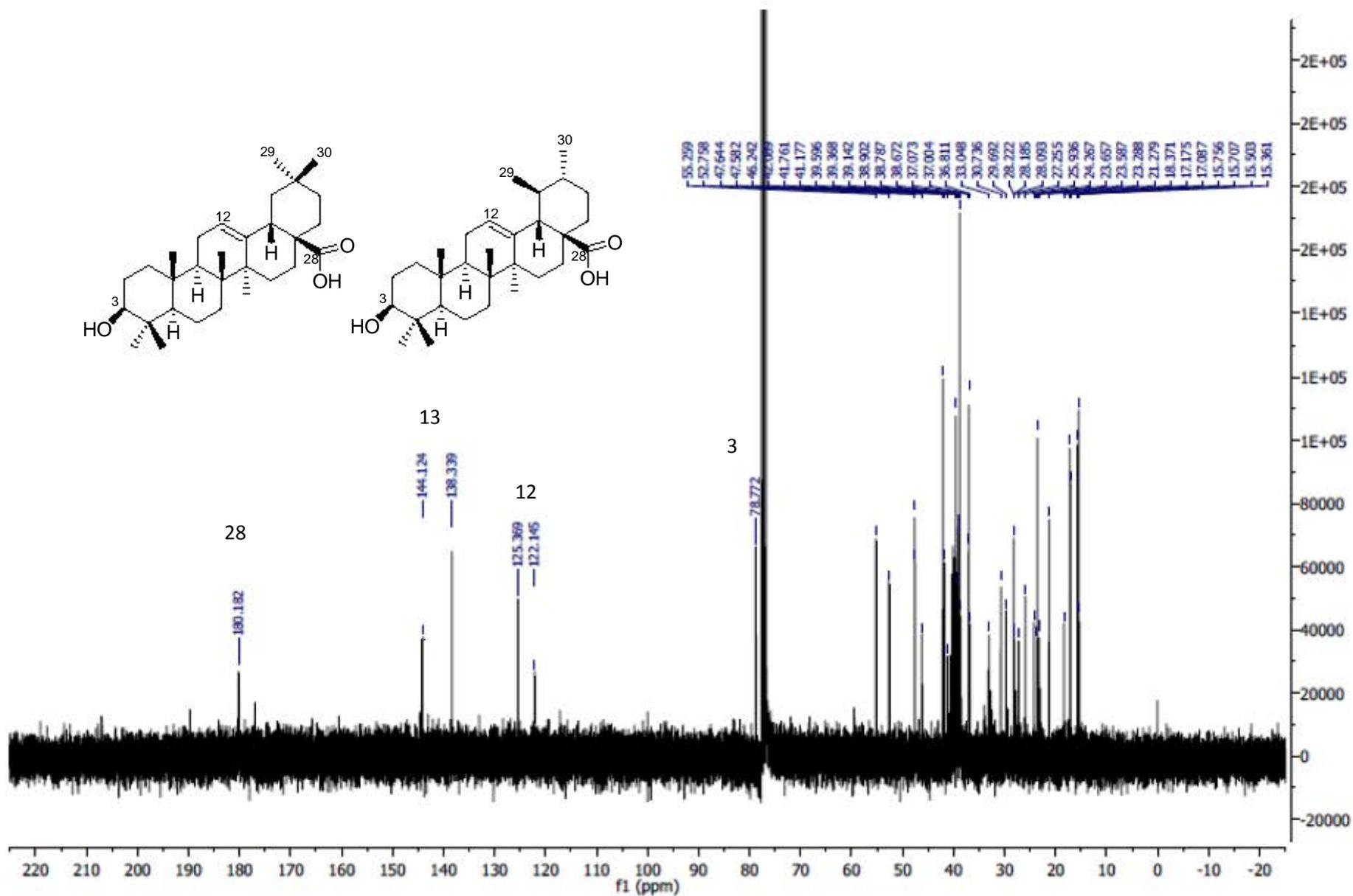
Espectro 12. DEPT 135 (75 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-D}_6$) Compuesto II.



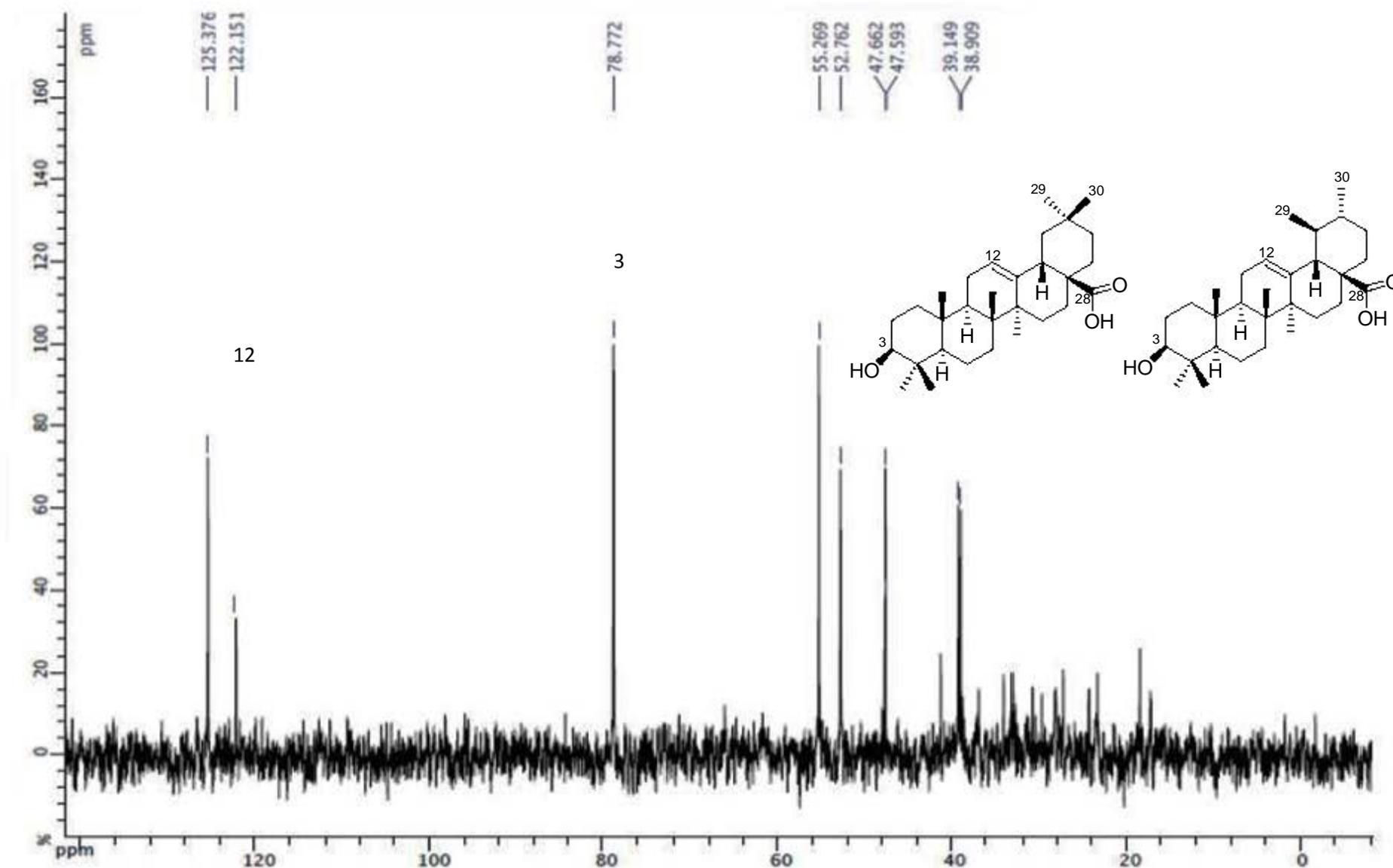
Espectro 13. IR (suspensión en Nujol) para la mezcla de compuestos III y IV.



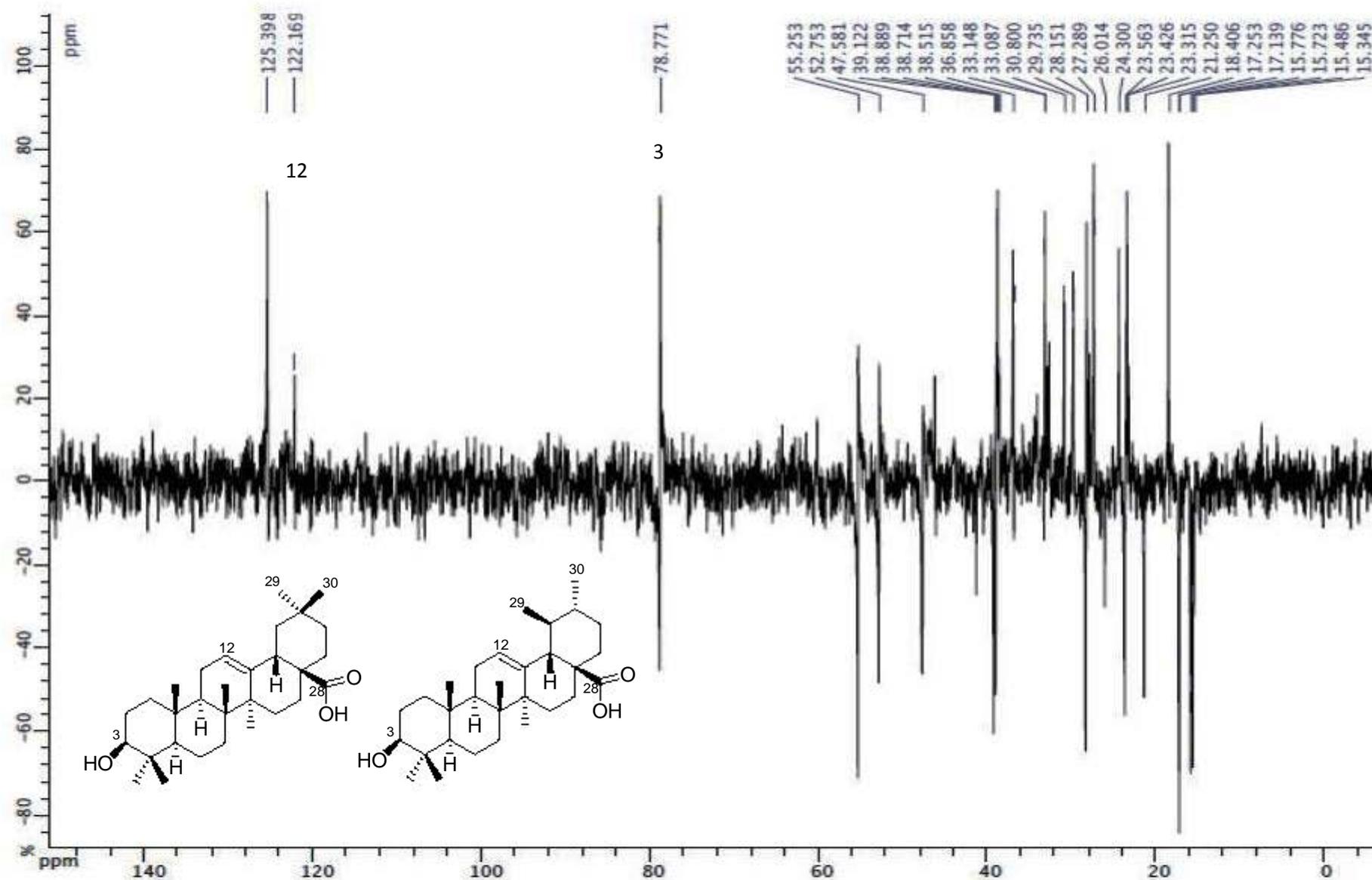
Espectro 14. RMN ^1H (300 MHz, $\text{CDCl}_3+\text{DMSO-D}_6$) para mezcla compuestos III y IV.



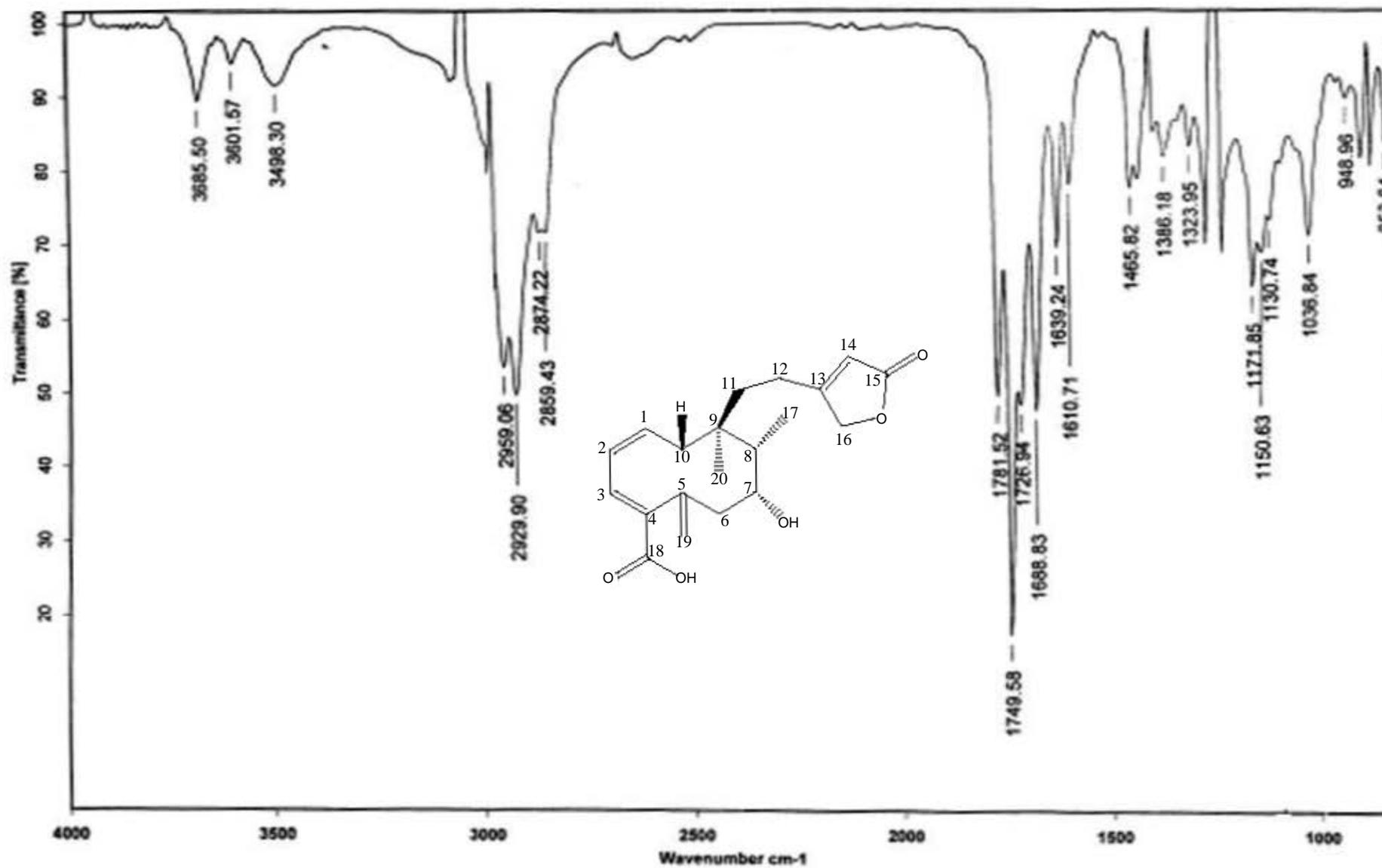
Espectro 15. RMN ^{13}C (75 MHz, $\text{CDCl}_3+\text{DMSO-D}_6$) para la mezcla compuestos III y IV



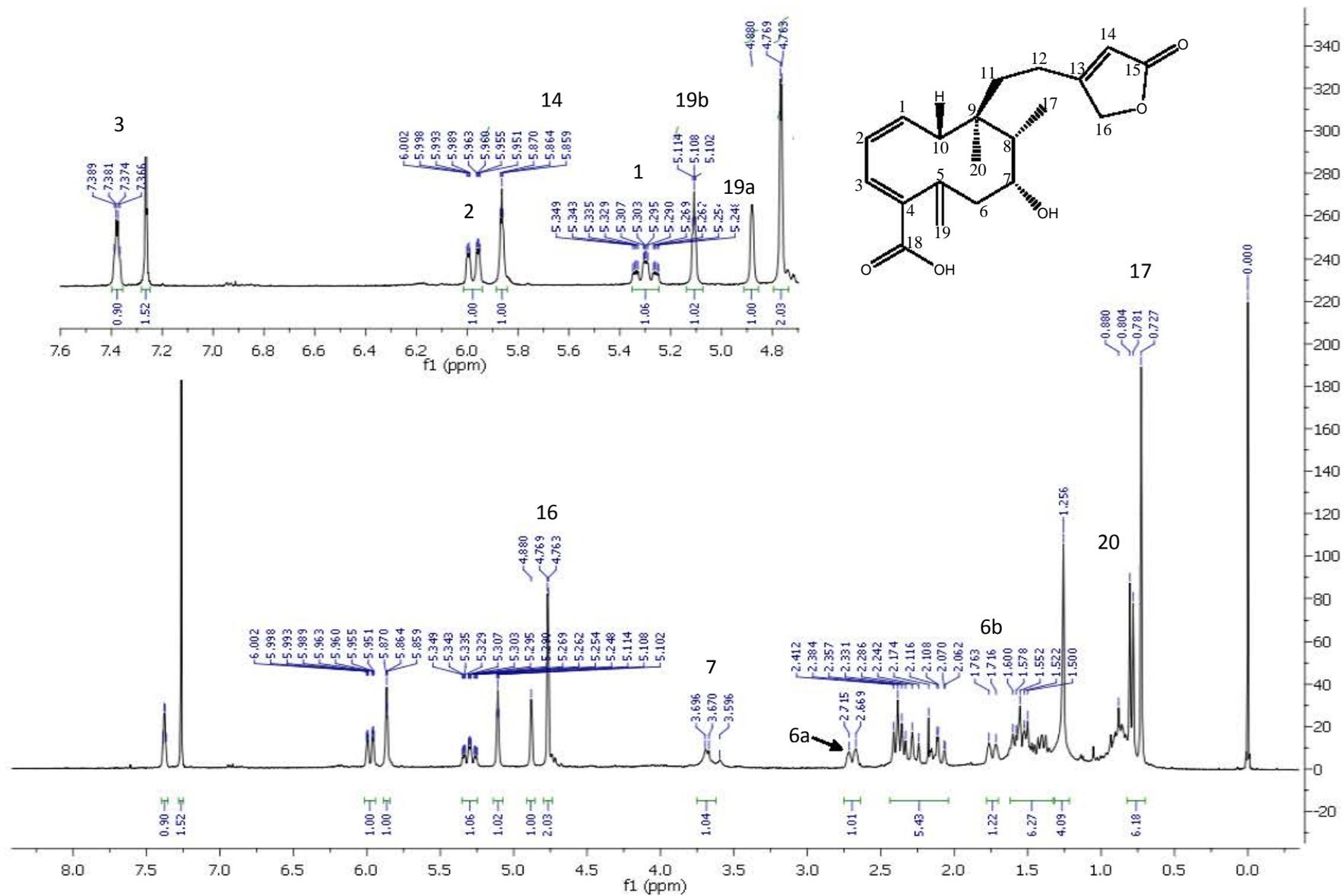
Espectro 16. DEPT 90 (75 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-D}_6$) para la mezcla compuestos III y IV



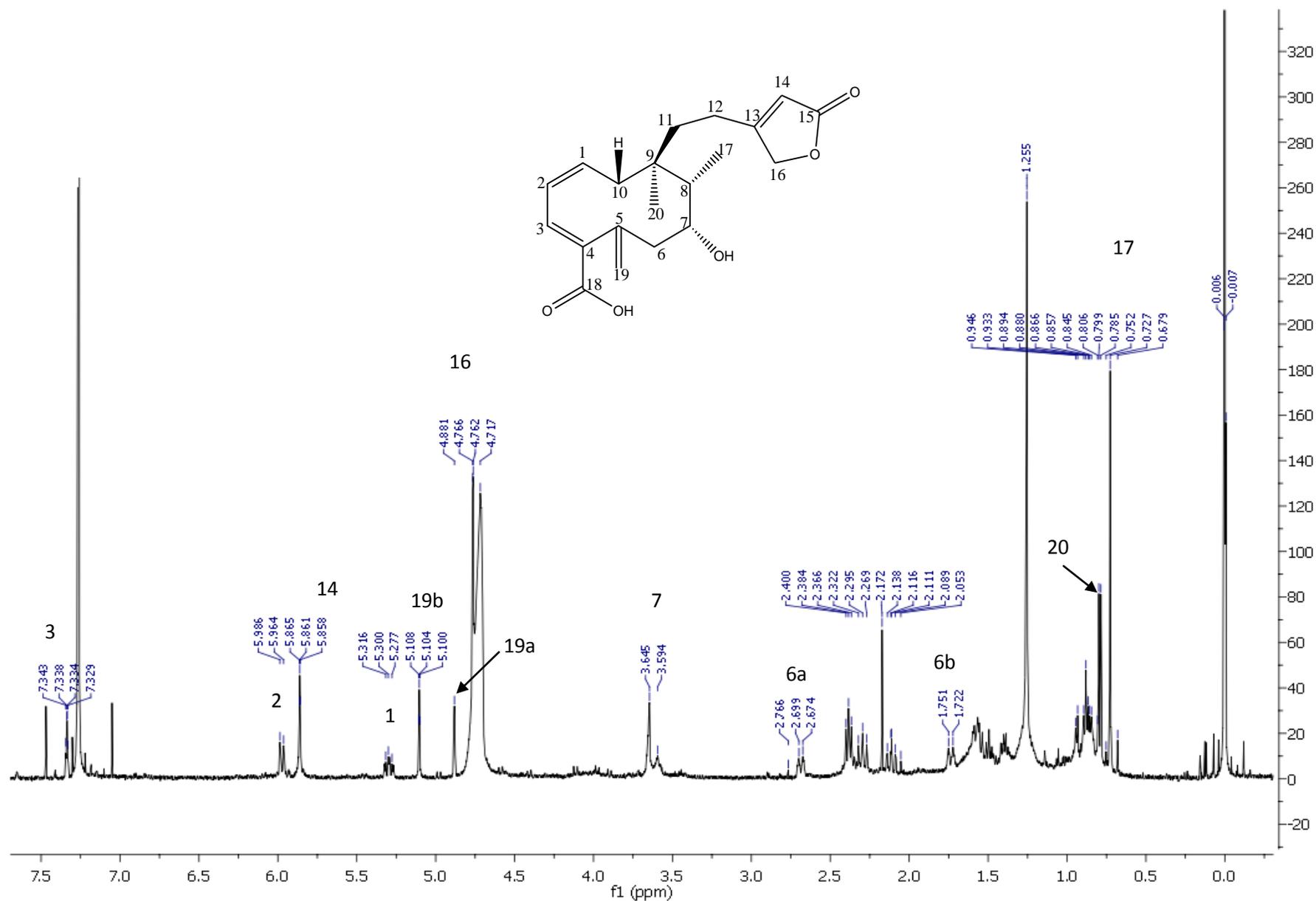
Espectro 17. DEPT 135 (75 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-D}_6$) para la mezcla de compuestos III y IV.



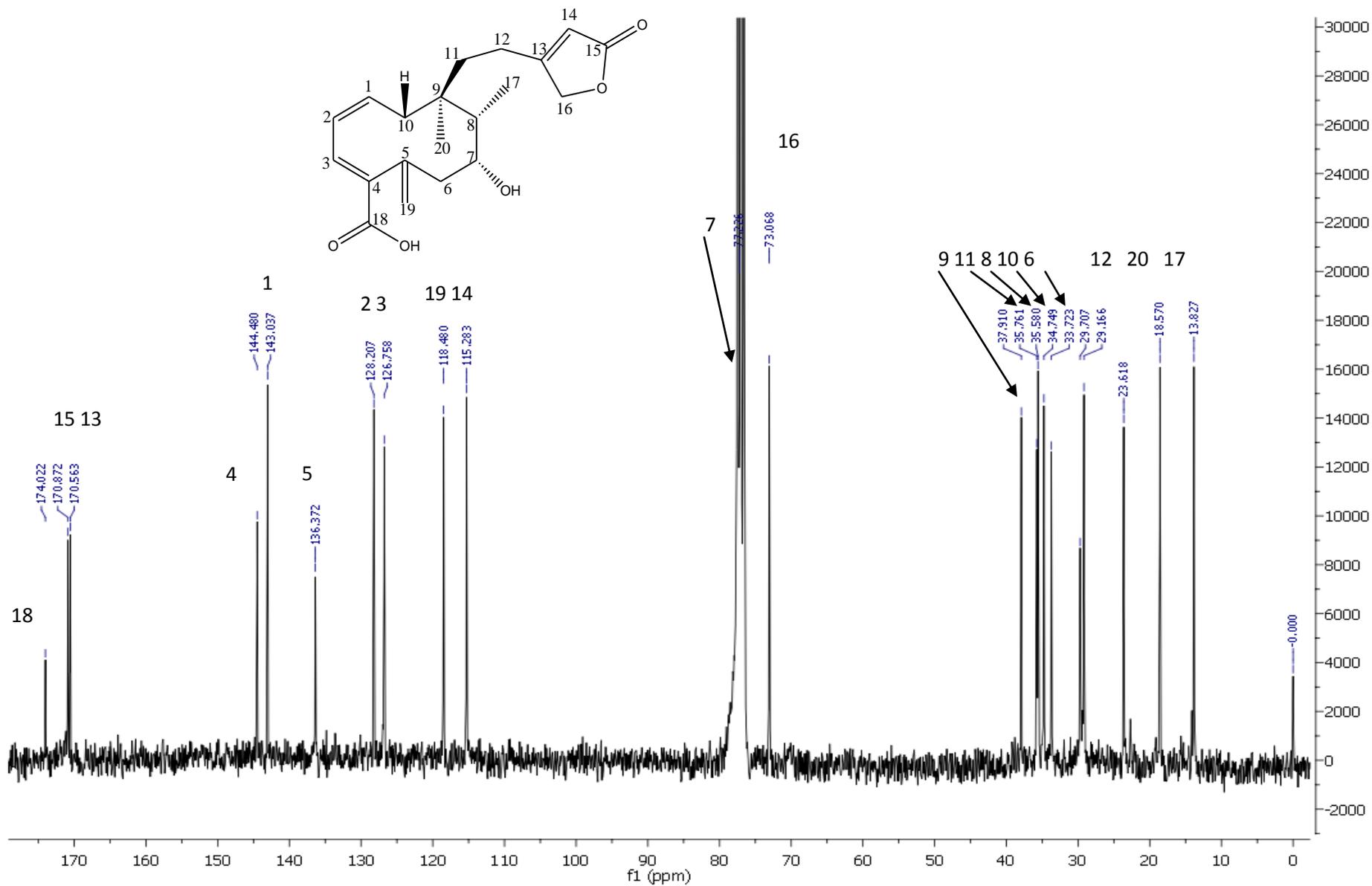
Espectro 18. IR (disolución en CHCl_3) para el compuesto V.



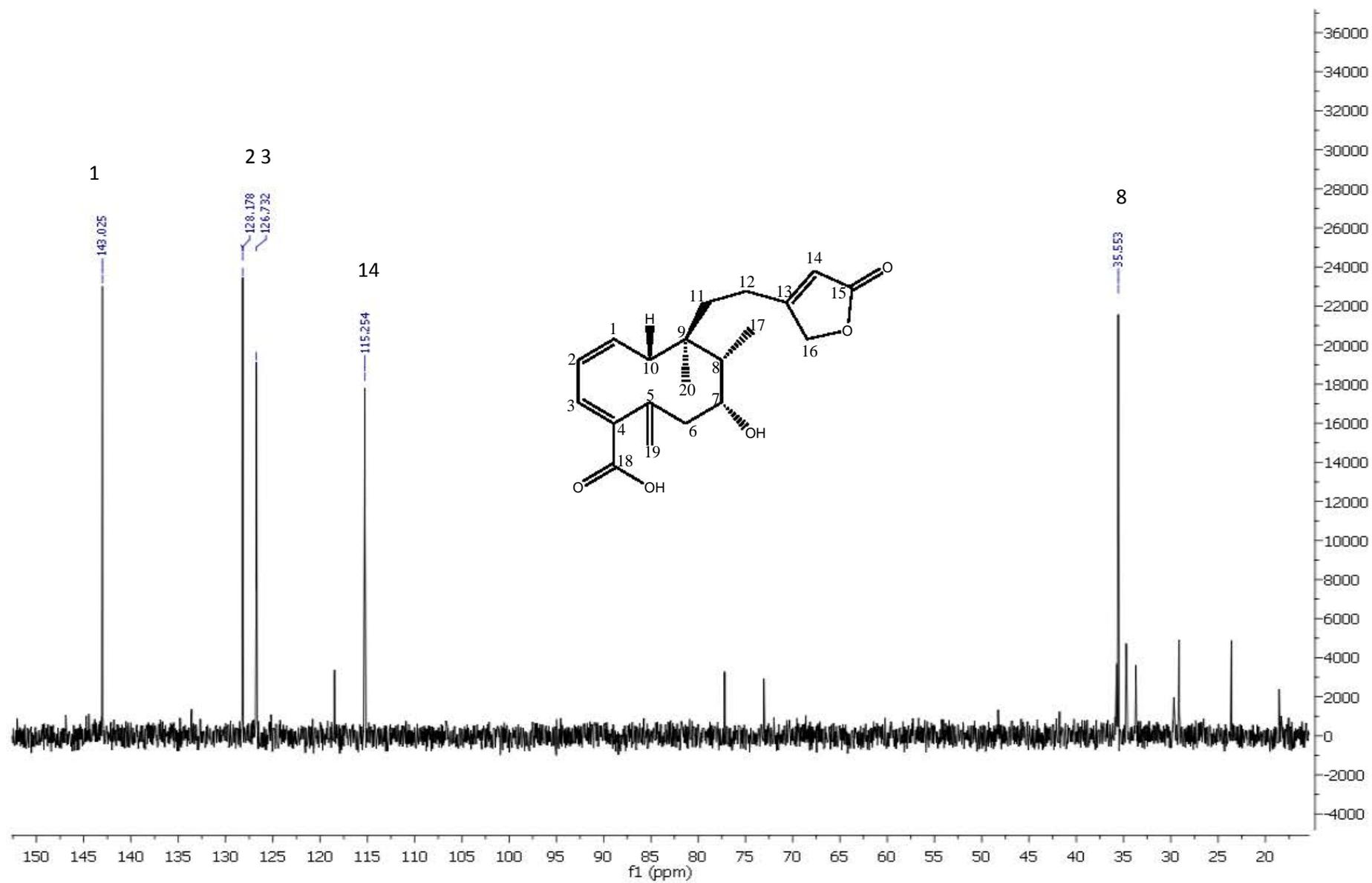
Espectro 19. RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃) compuesto V.



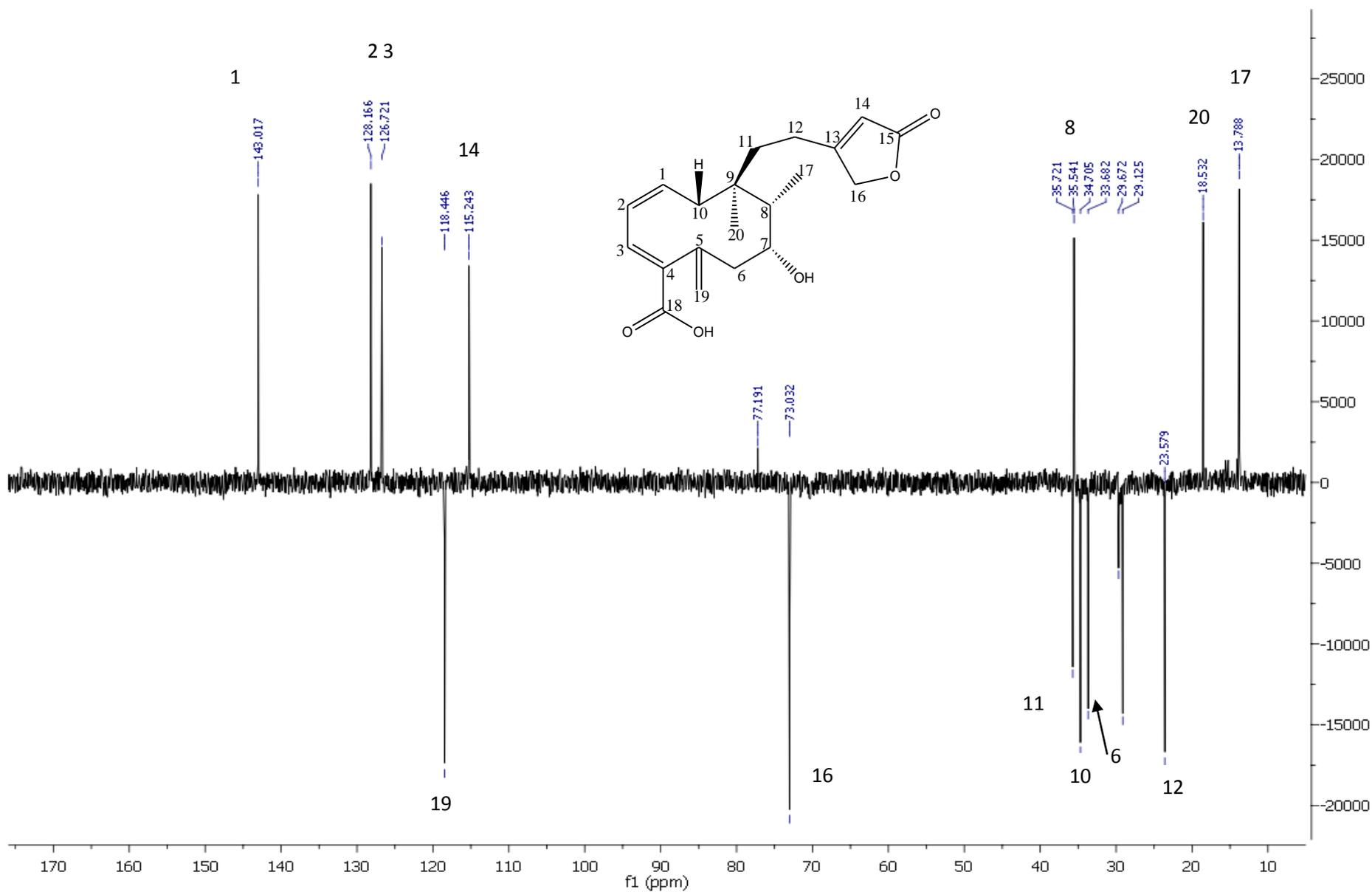
Espectro 20. RMN ^1H + D_2O (500 MHz, CDCl_3) compuesto **V**



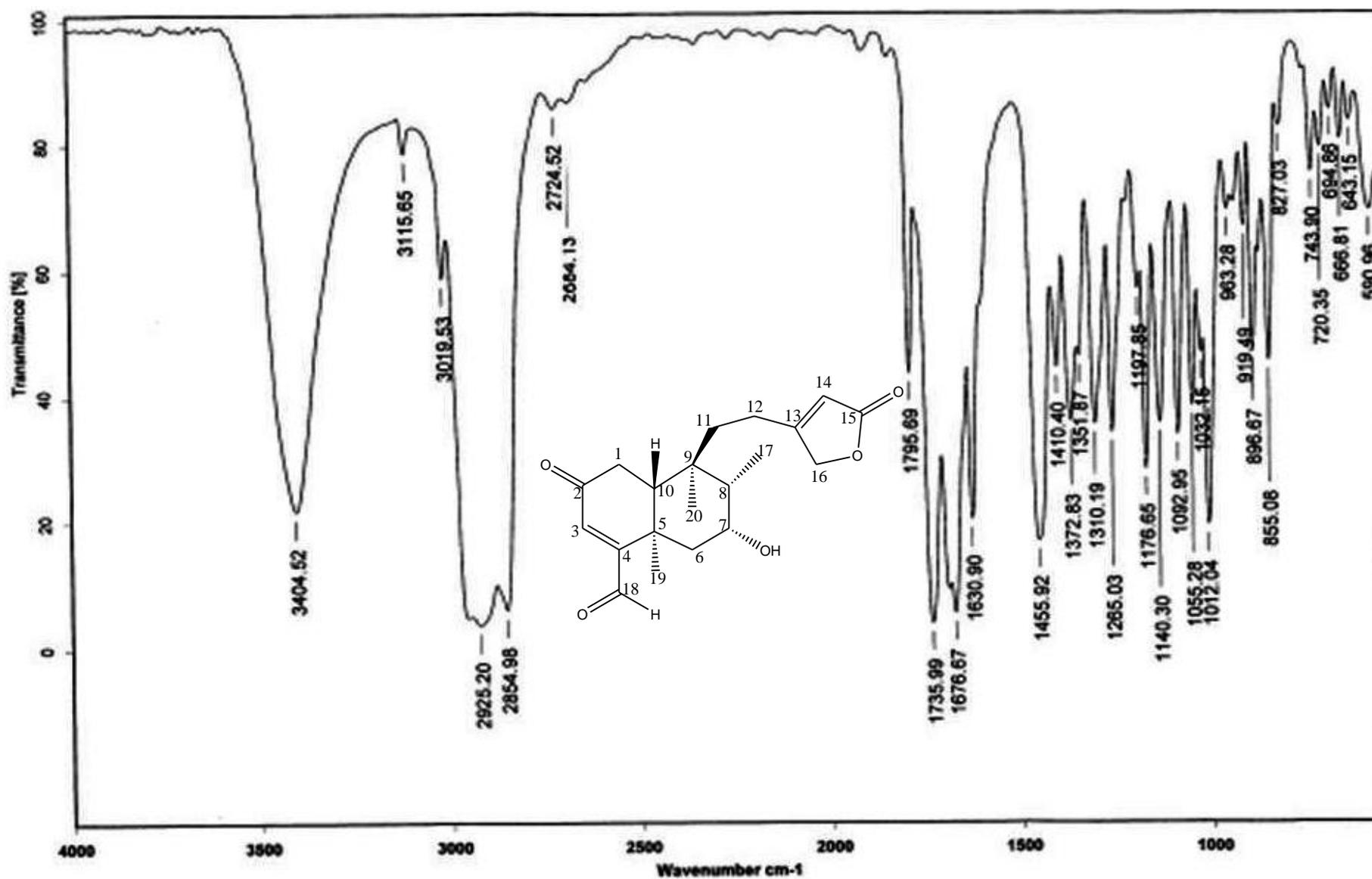
Espectro 21. RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) para el compuesto V.



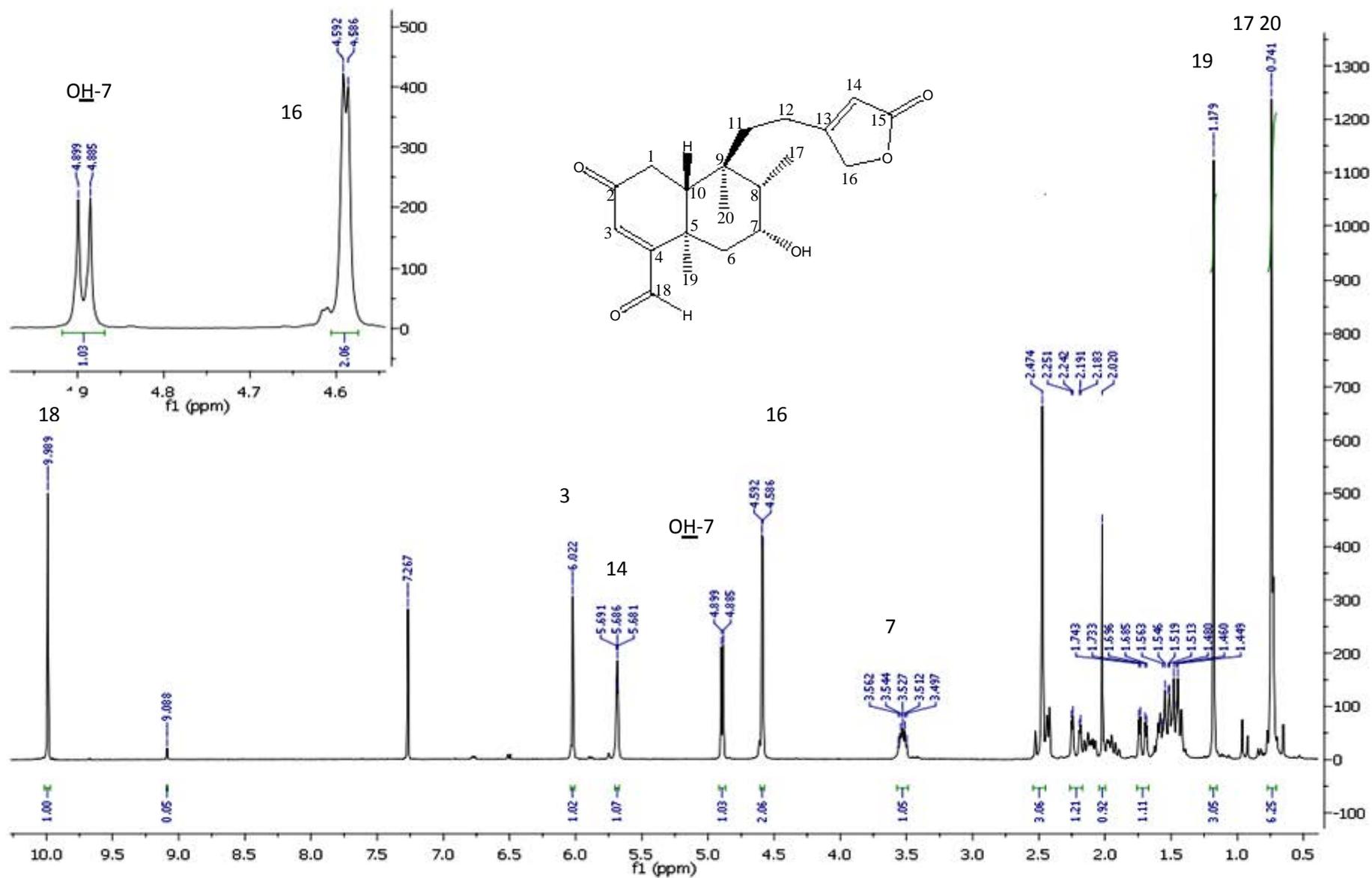
Espectro 22. RMN DEPT 90 (75 MHz, CDCl_3) para el compuesto V.



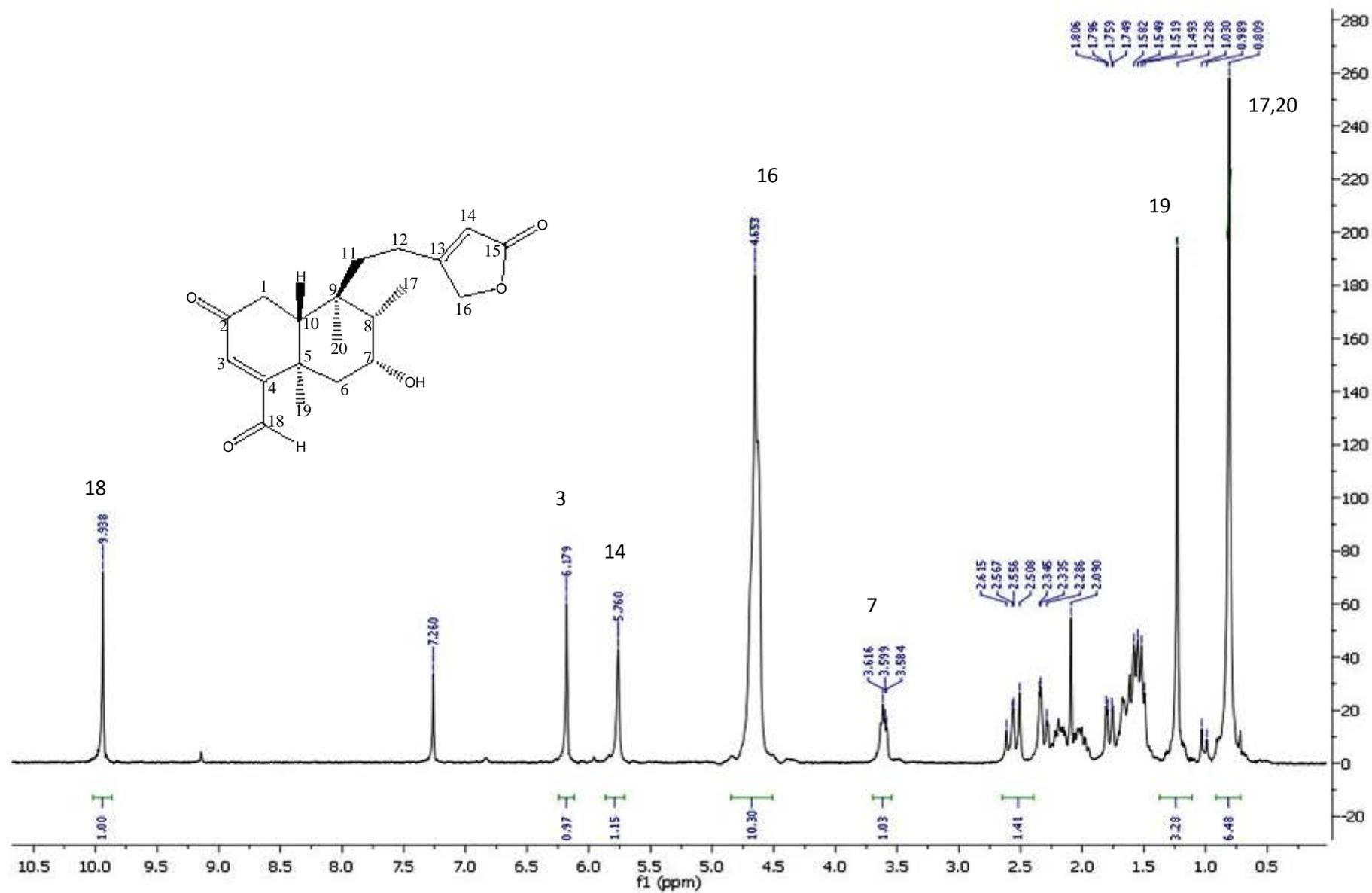
Espectro 23. DEPT 135 (75 MHz, CDCl_3) para el compuesto V.



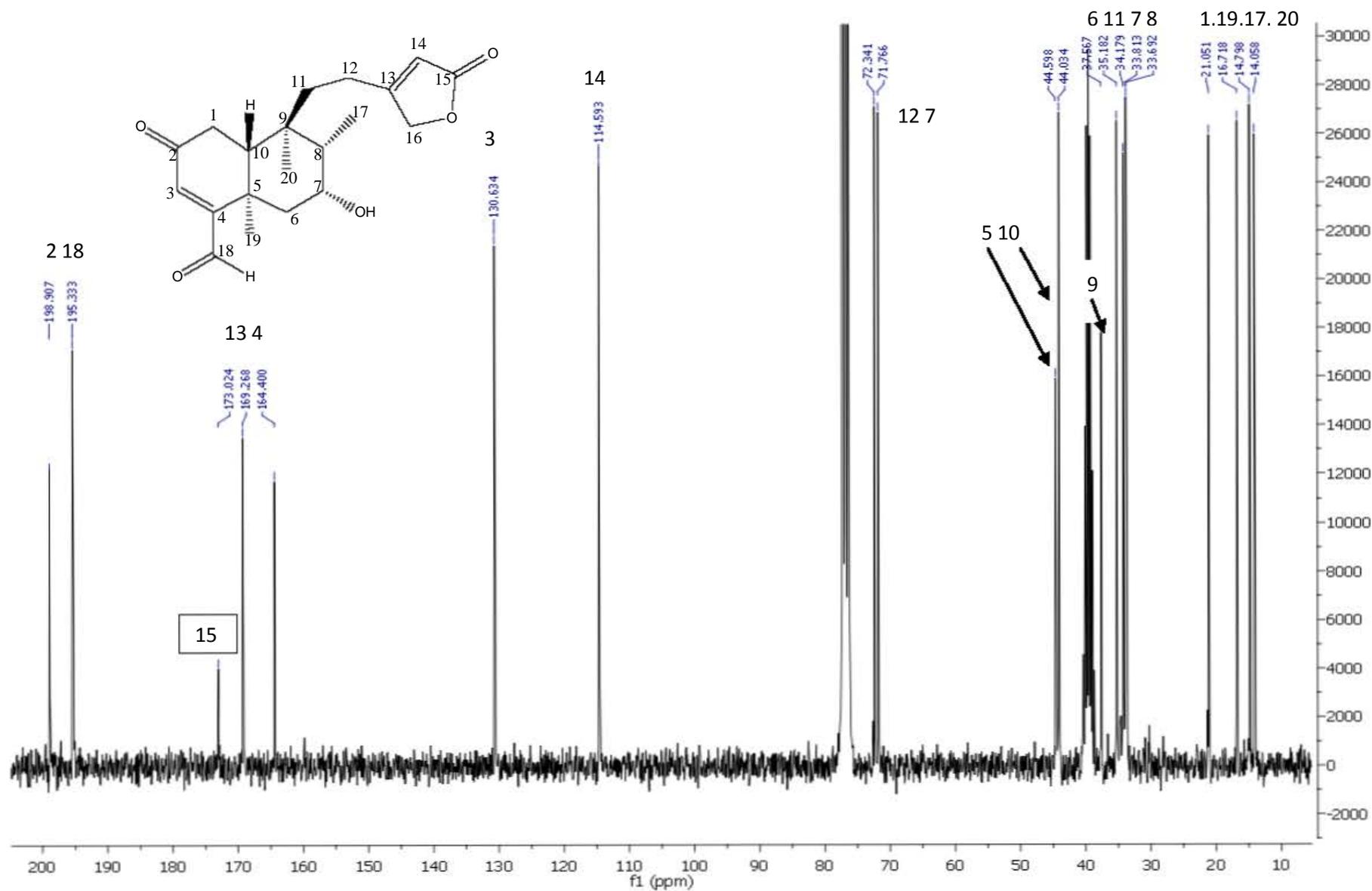
Espectro 24. Espectro IR (suspensión en Nujol) para el compuesto VI.



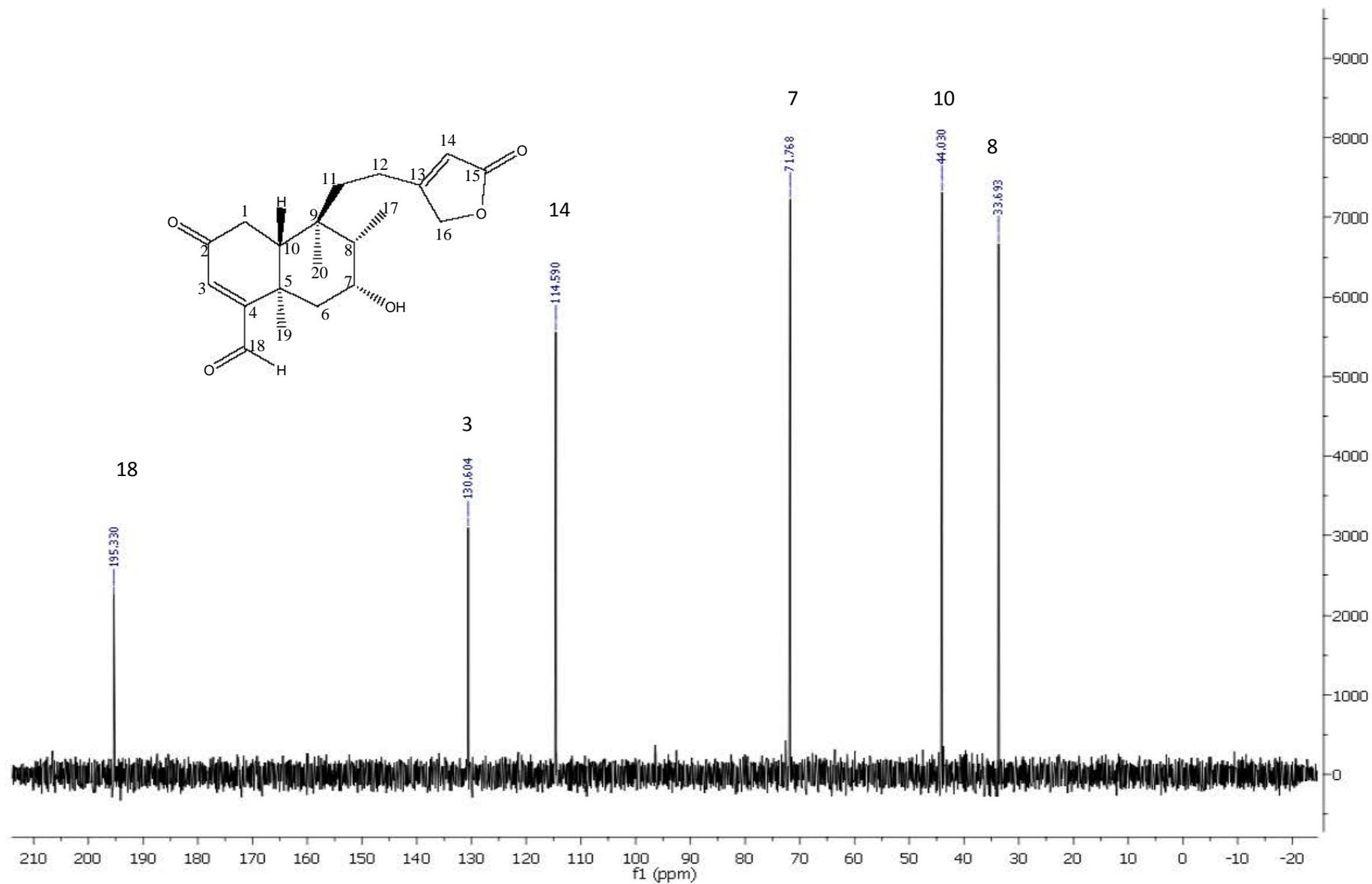
Espectro 25. RMN ^1H (300 MHz, $\text{CDCl}_3+\text{DMSO-D}_6$) para el compuesto VI.



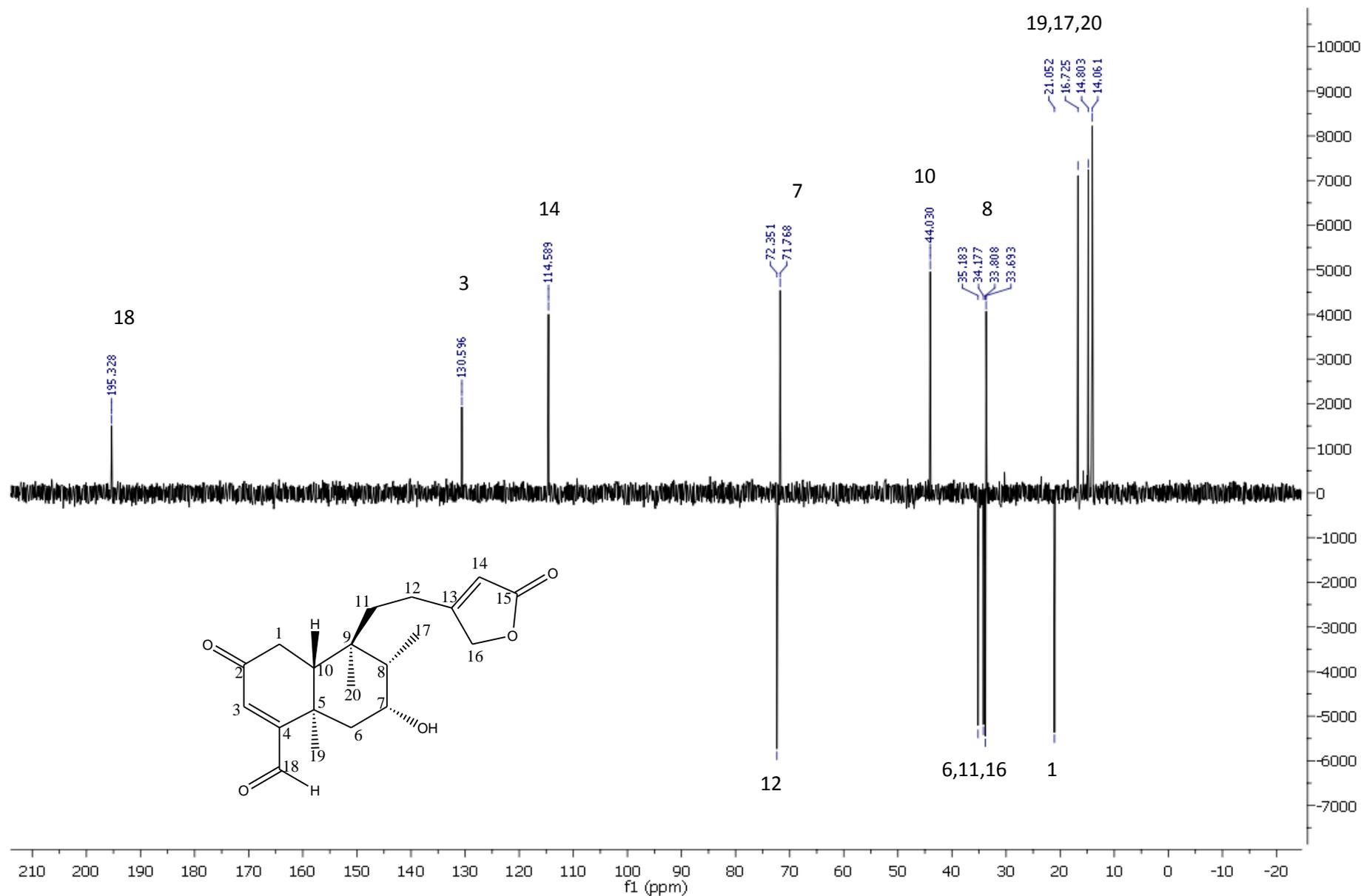
Espectro 26. RMN ^1H + D_2O (75 MHz, $\text{CDCl}_3+\text{DMSO-D}_6$) para el compuesto VI.



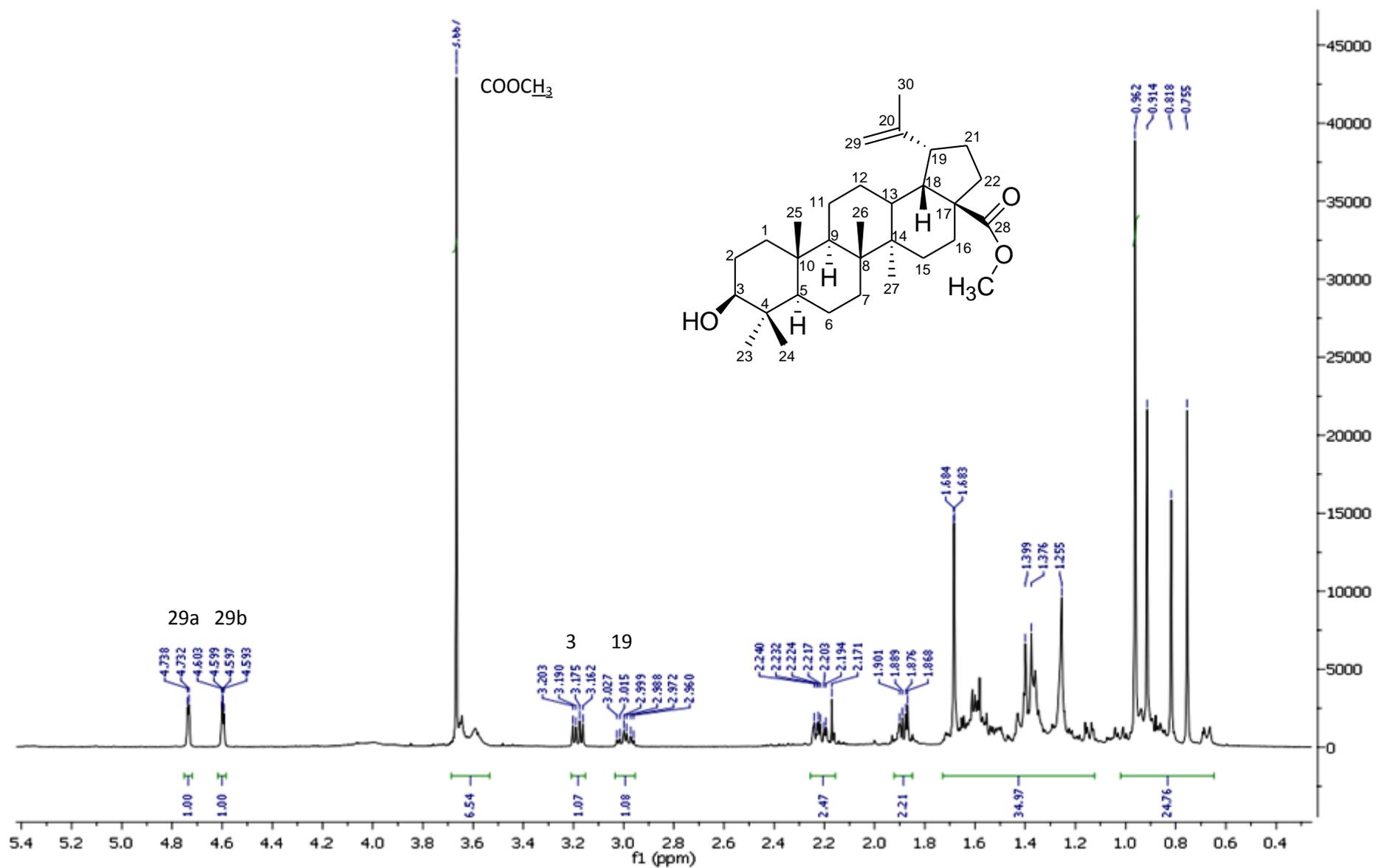
Espectro 27. RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃+DMSO-D₆) para el compuesto VI.



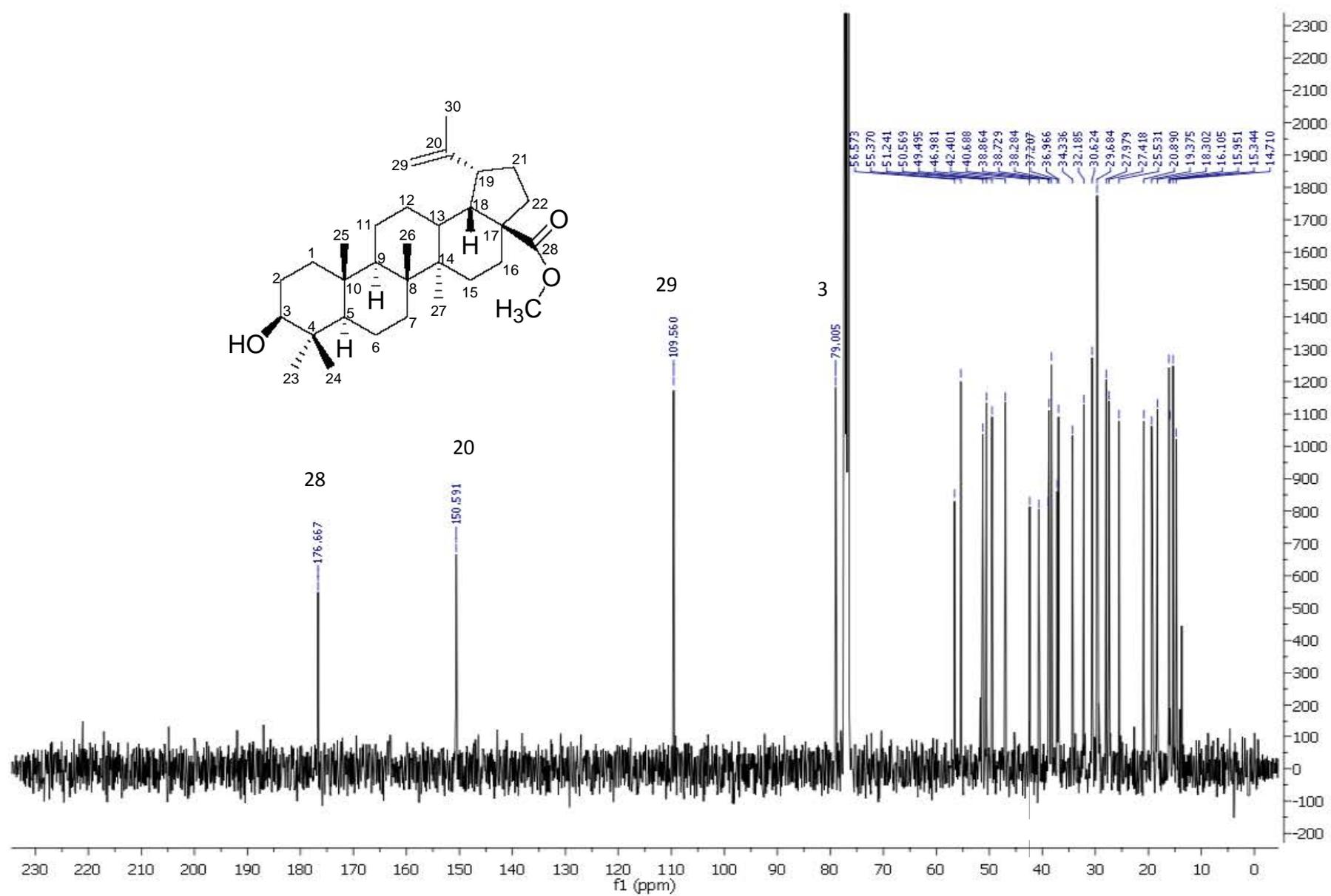
Espectro 28. RMN DEPT 90 (75 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-D}_6$) para el compuesto VI.



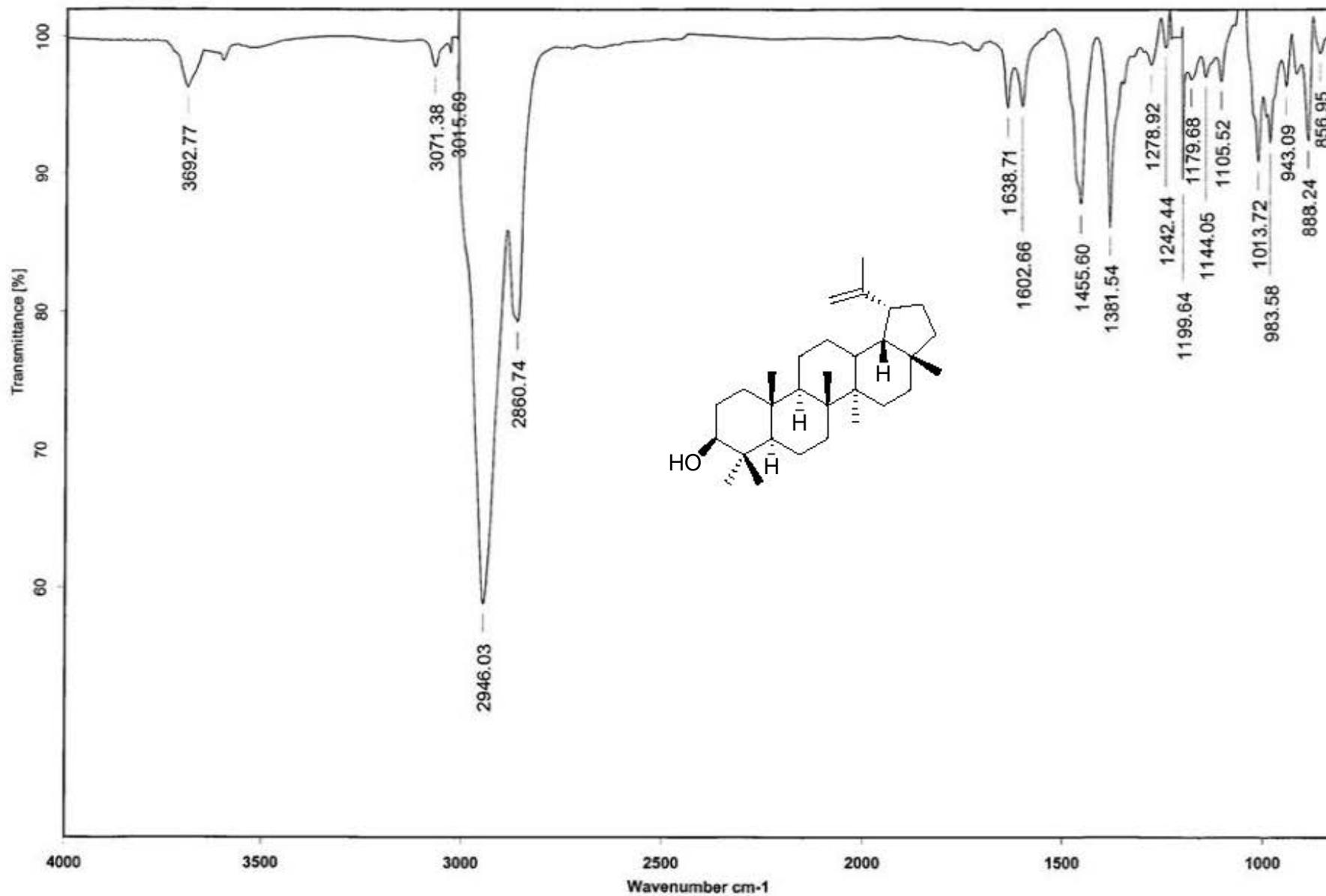
Espectro 29. DEPT 135 (75 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-D}_6$) para el compuesto VI.



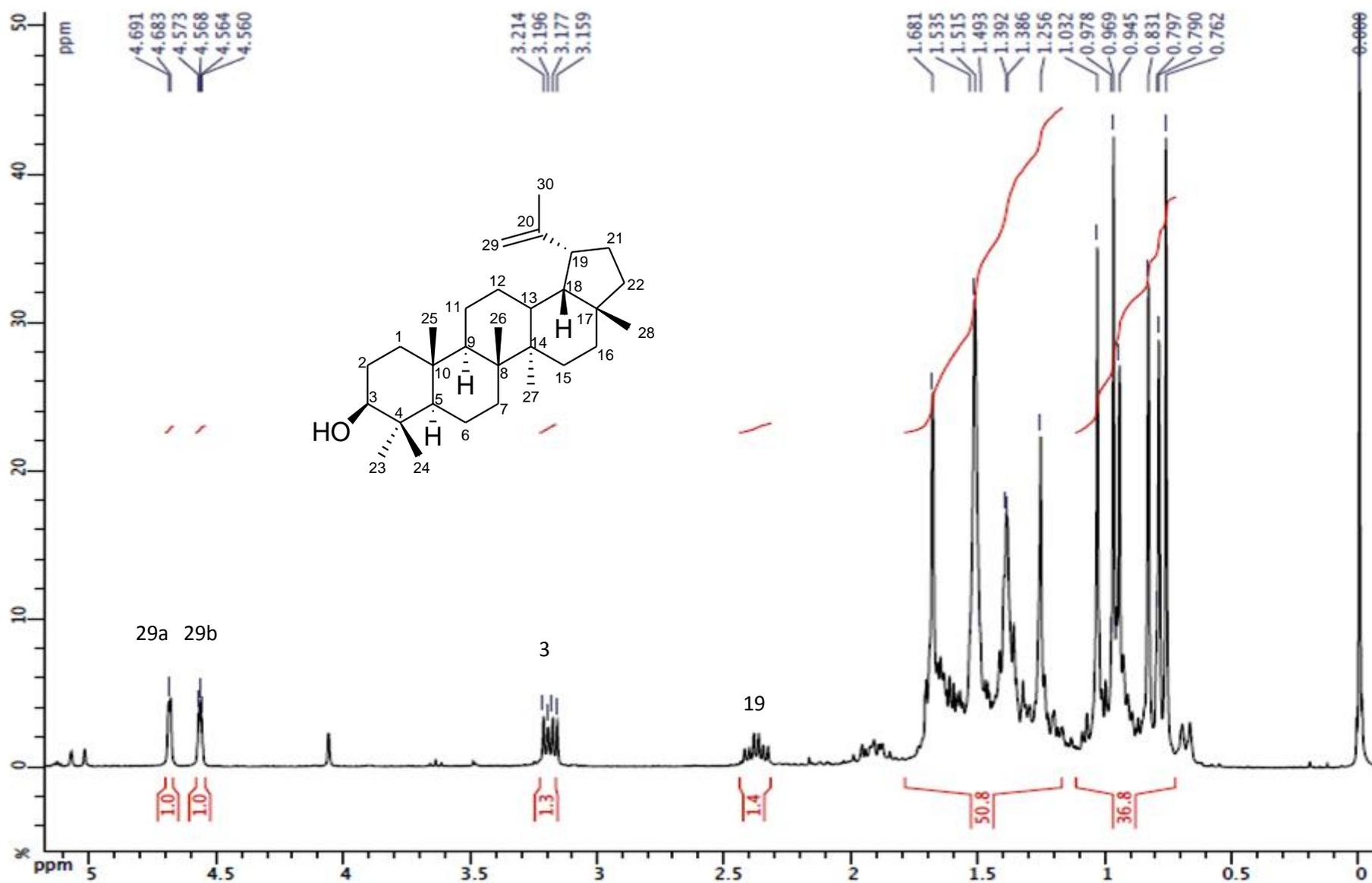
Espectro 30. RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) para el compuesto VII.



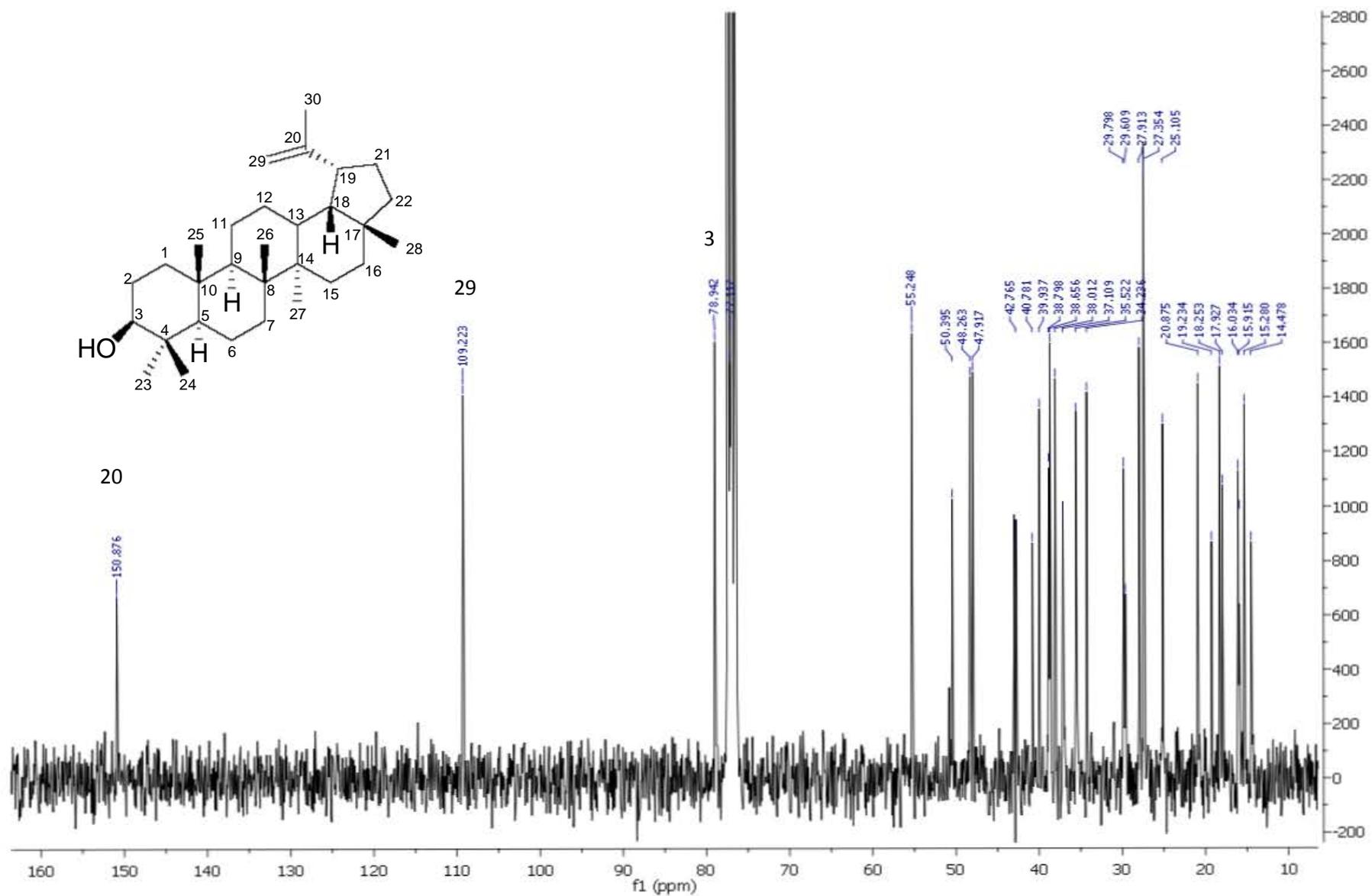
Espectro 31. RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) para el compuesto VII.



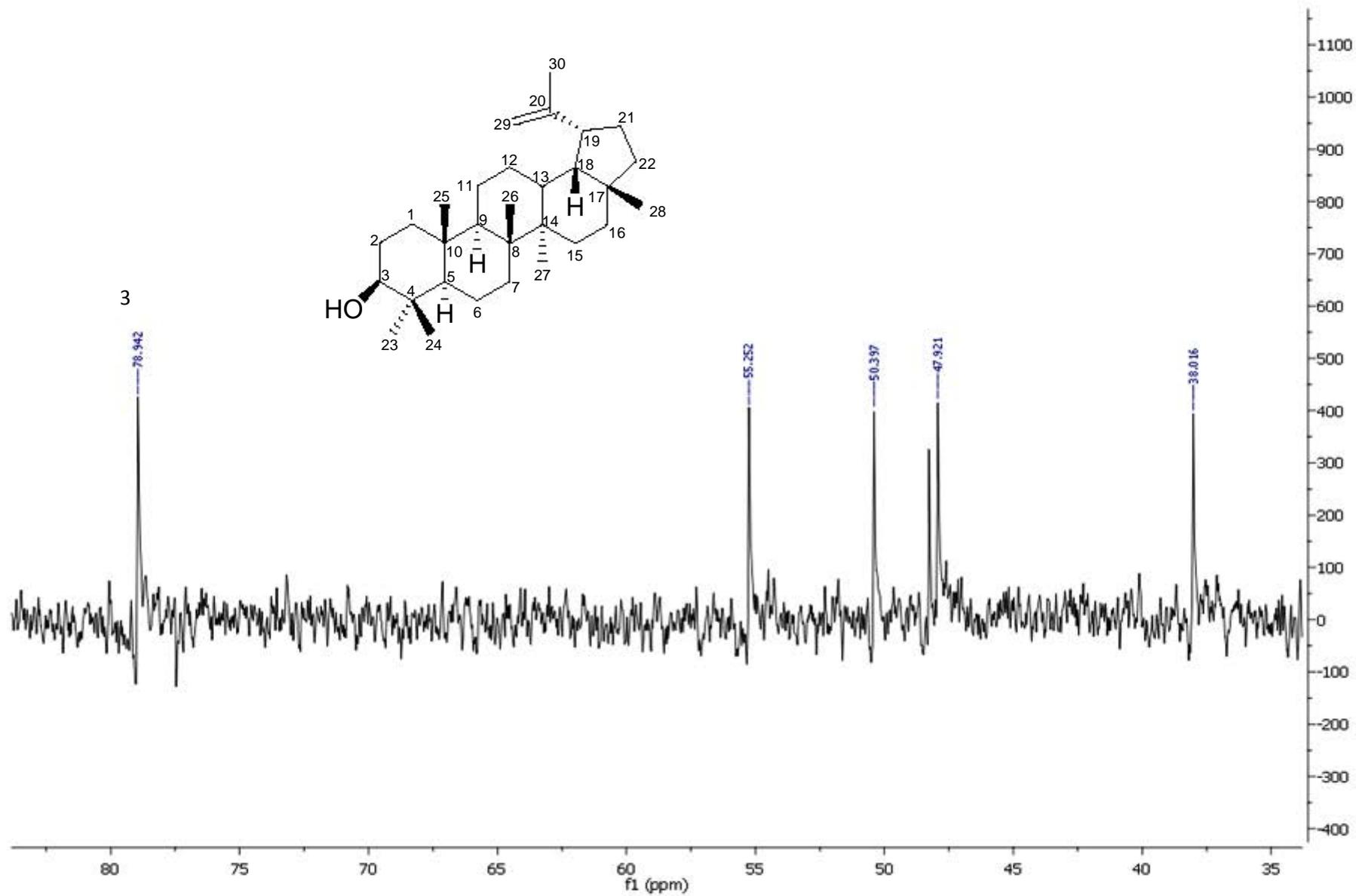
Espectro 32. IR (solución CHCl_3) para el compuesto VIII.



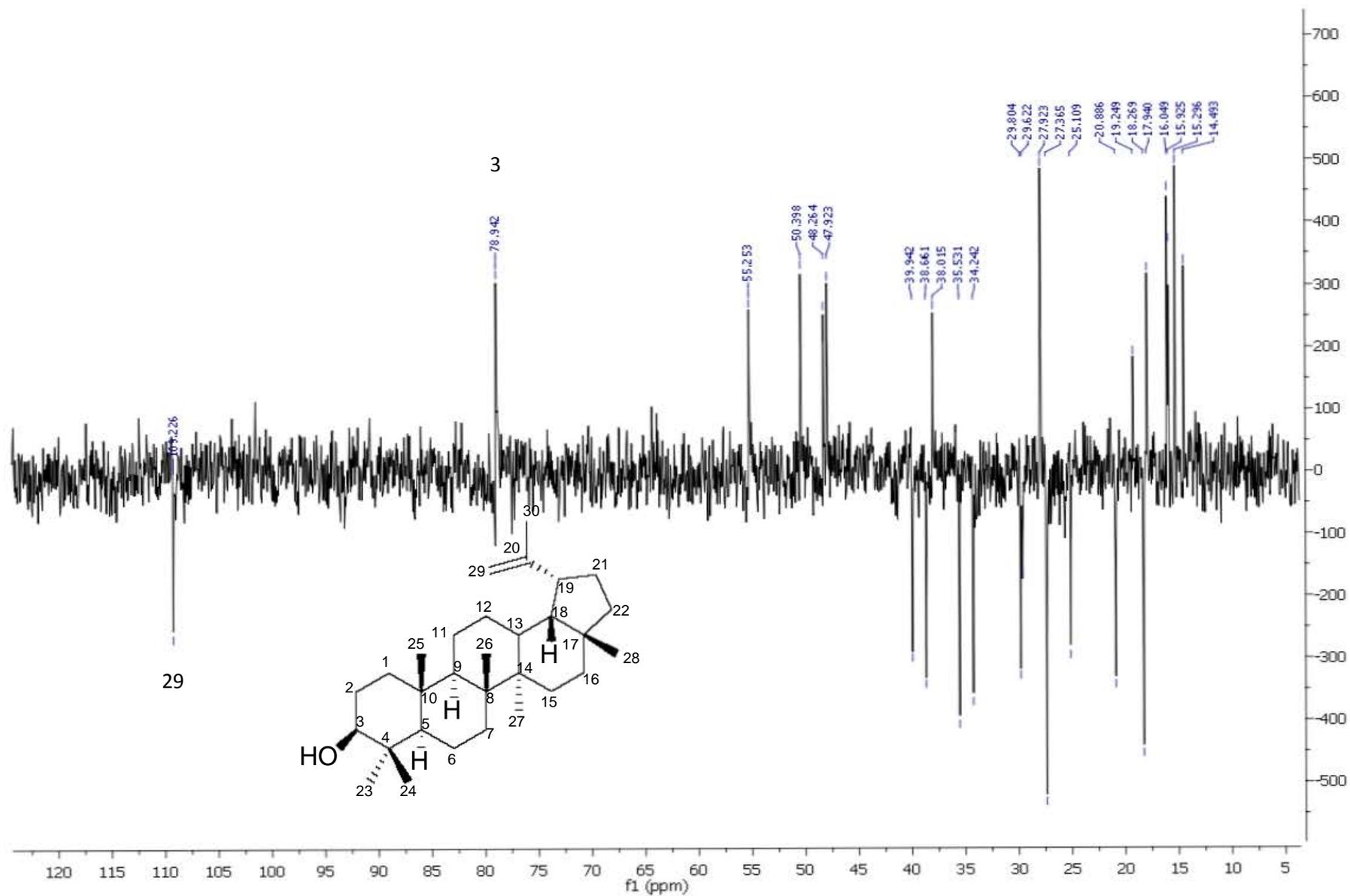
Espectro 33. RNM ^1H (300 MHz, CDCl_3) para el compuesto VIII.



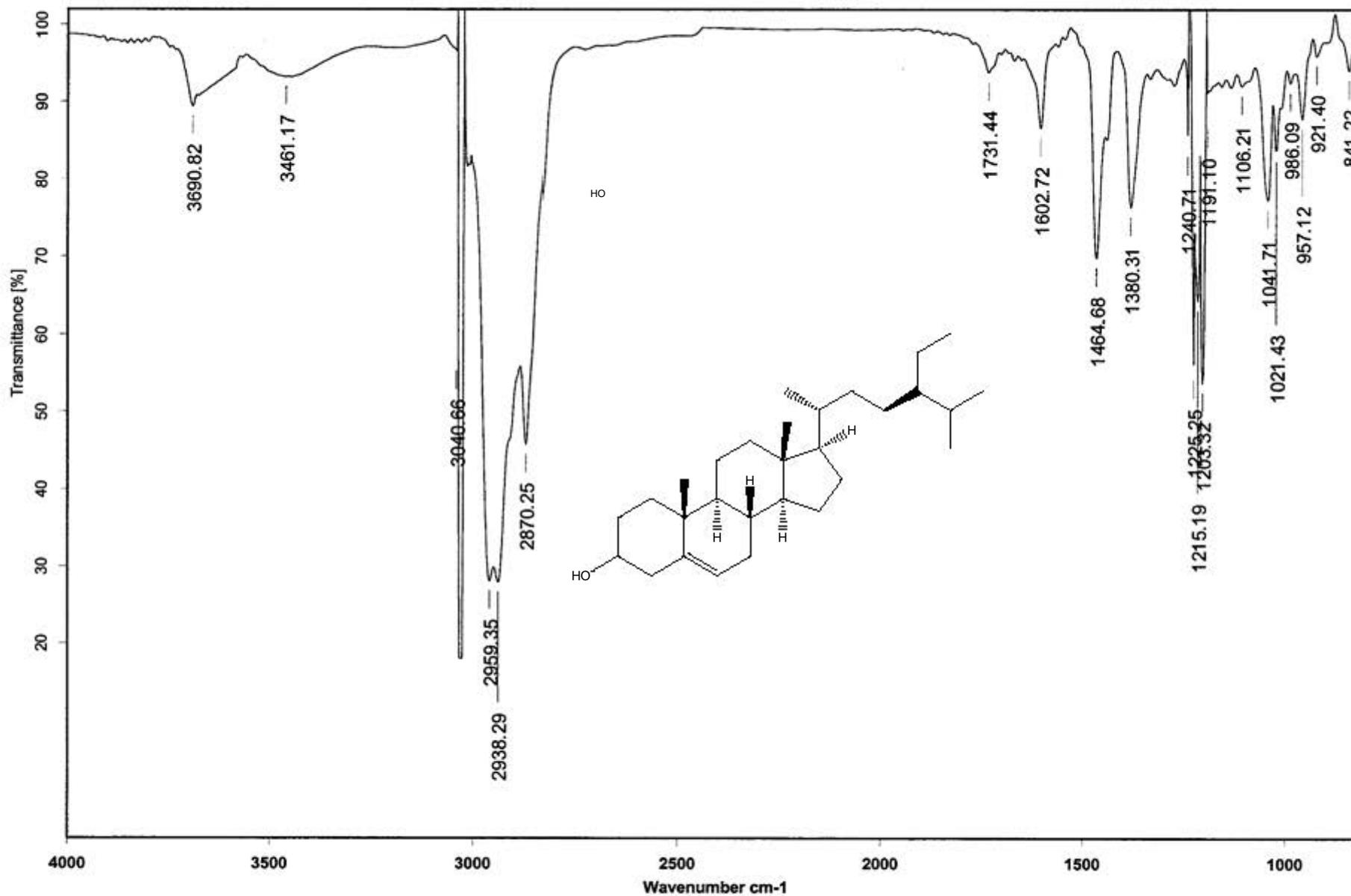
Espectro 34. RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃) para el compuesto VIII.



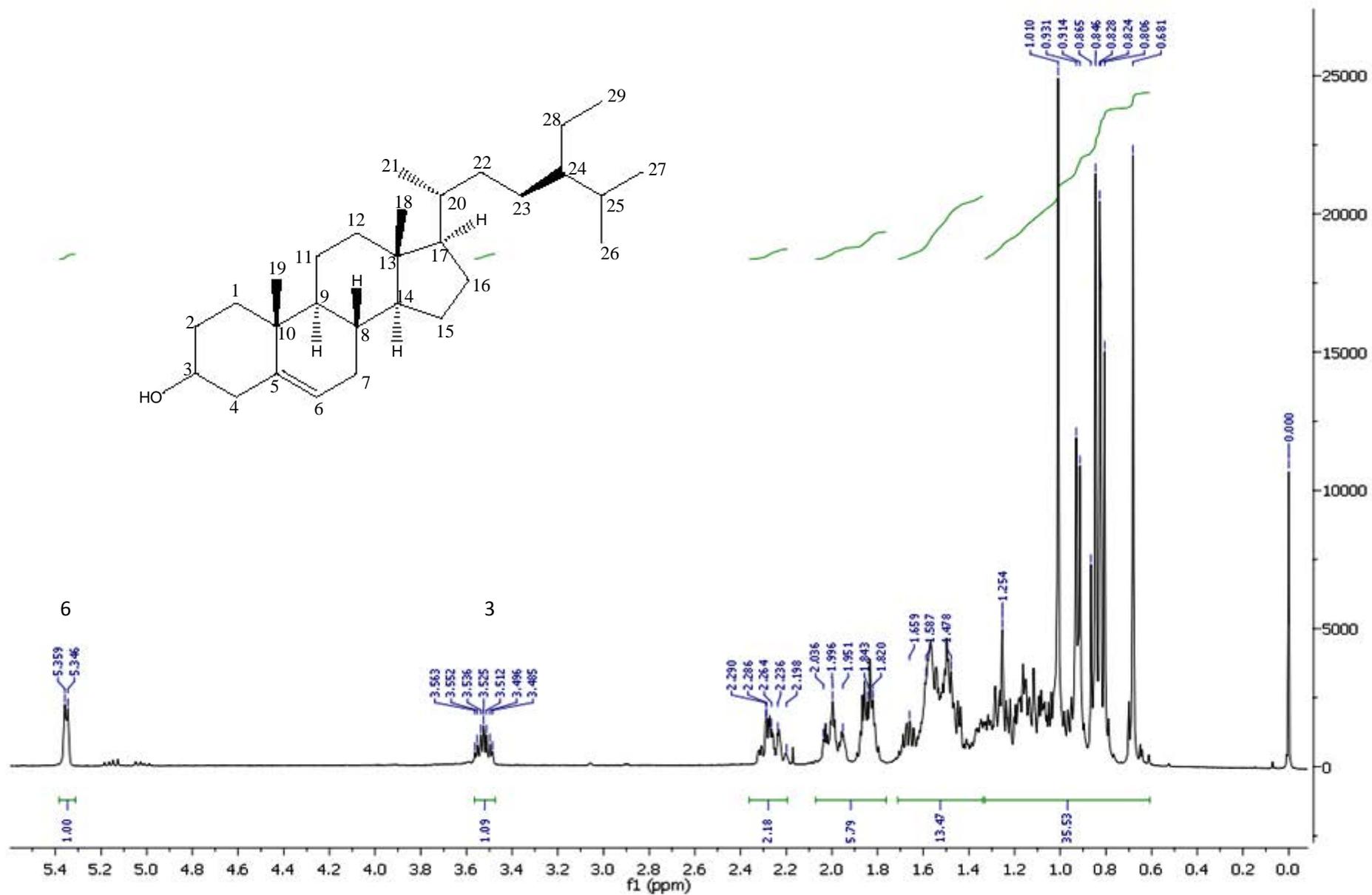
Espectro 35. RMN DEPT 90 (75 MHz, CDCl_3) para el compuesto VIII.



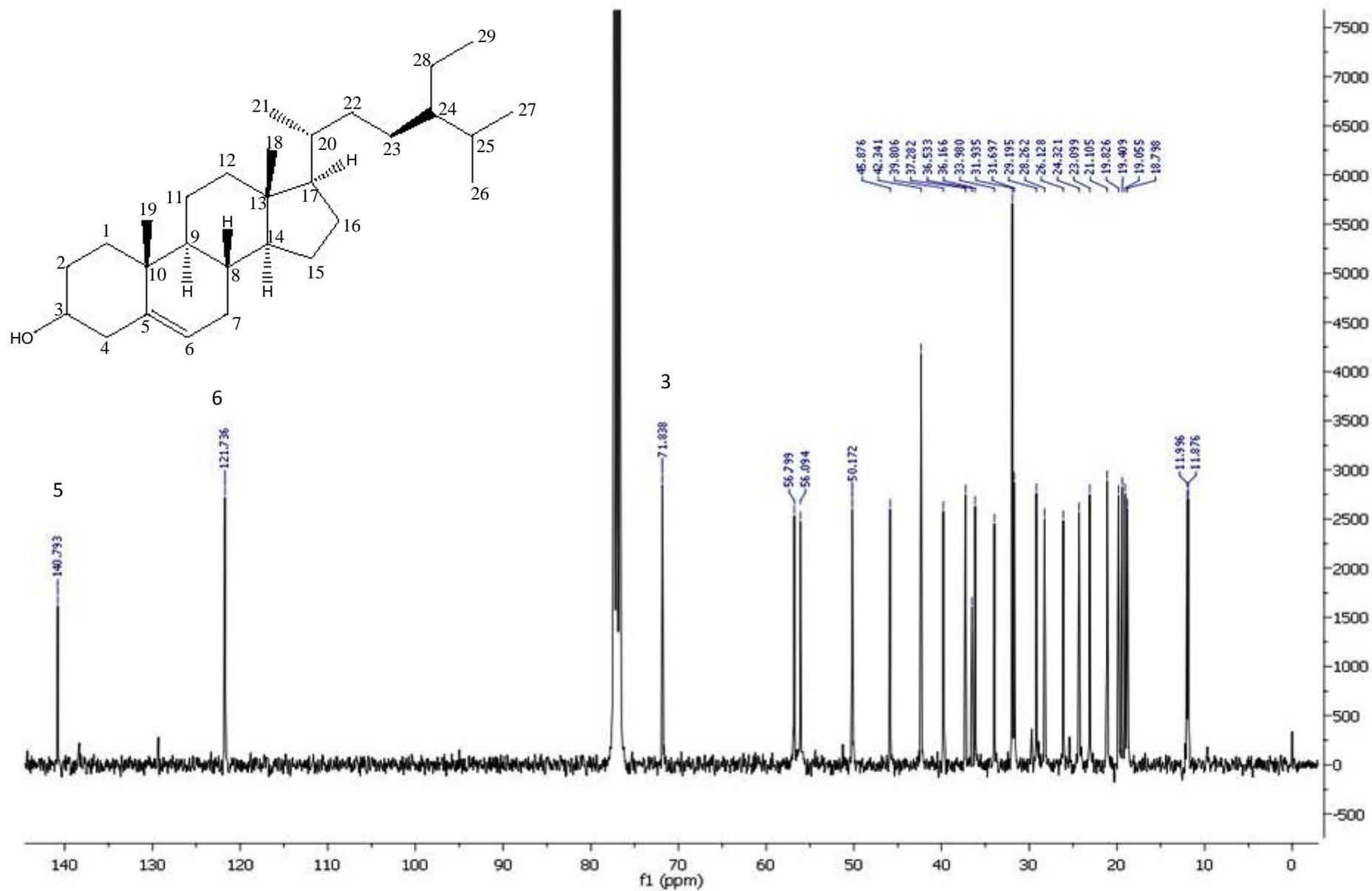
Espectro 36. DEPT 135 (75 MHz, CDCl₃) para el compuesto VIII.



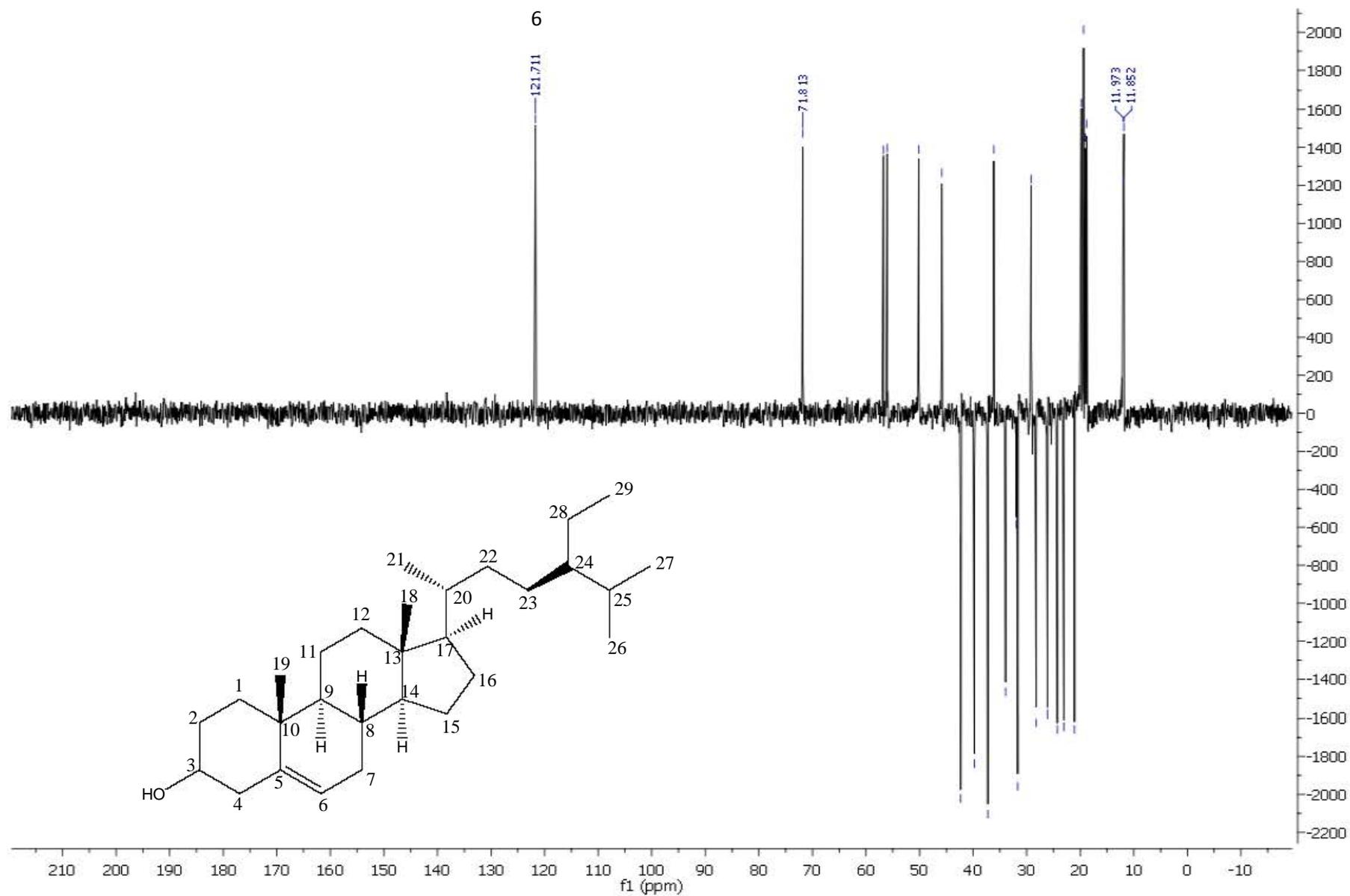
Espectro 37. IR (solución CDCl_3) para el compuesto IX.



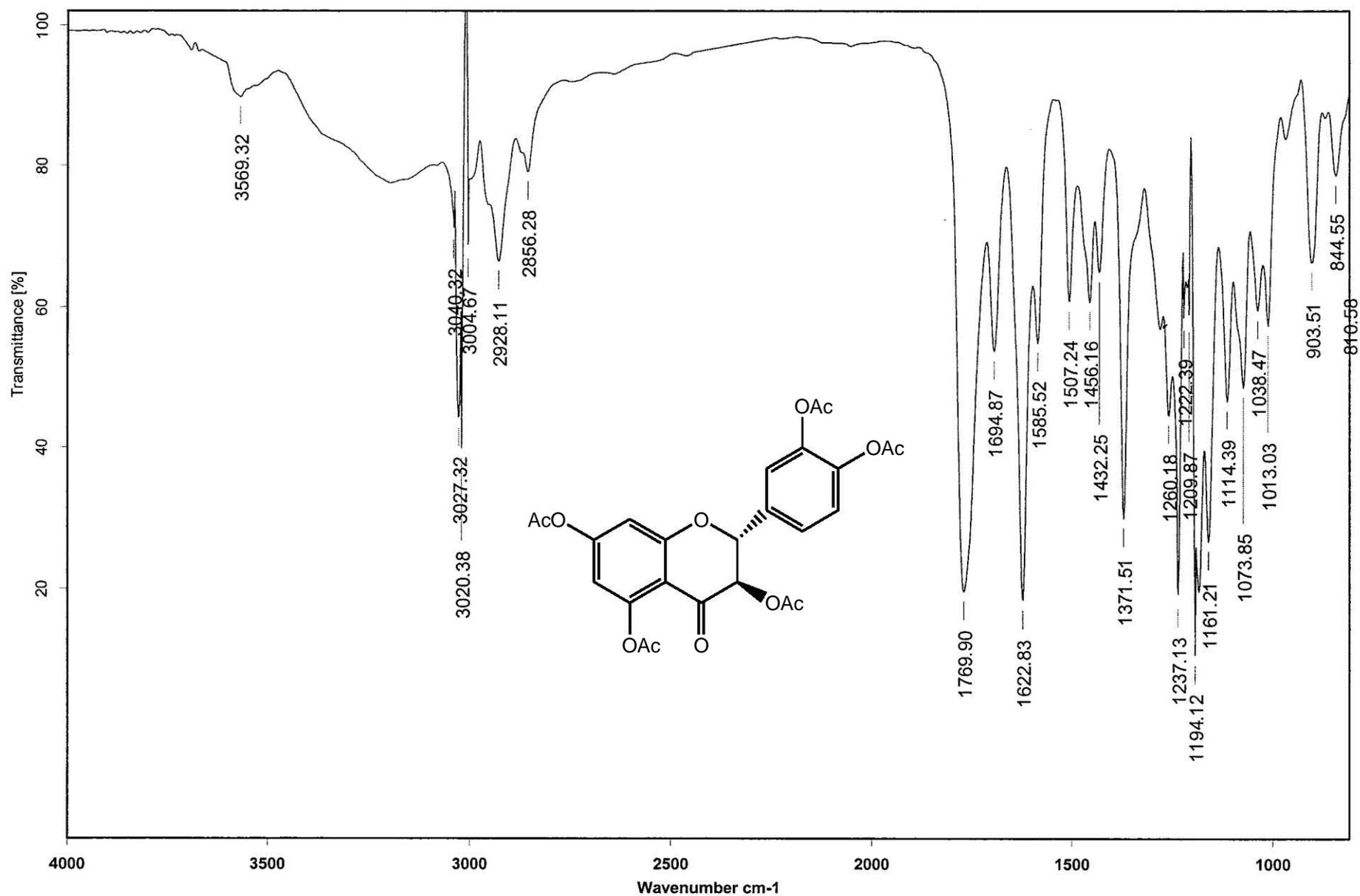
Espectro 38. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) para el compuesto IX.



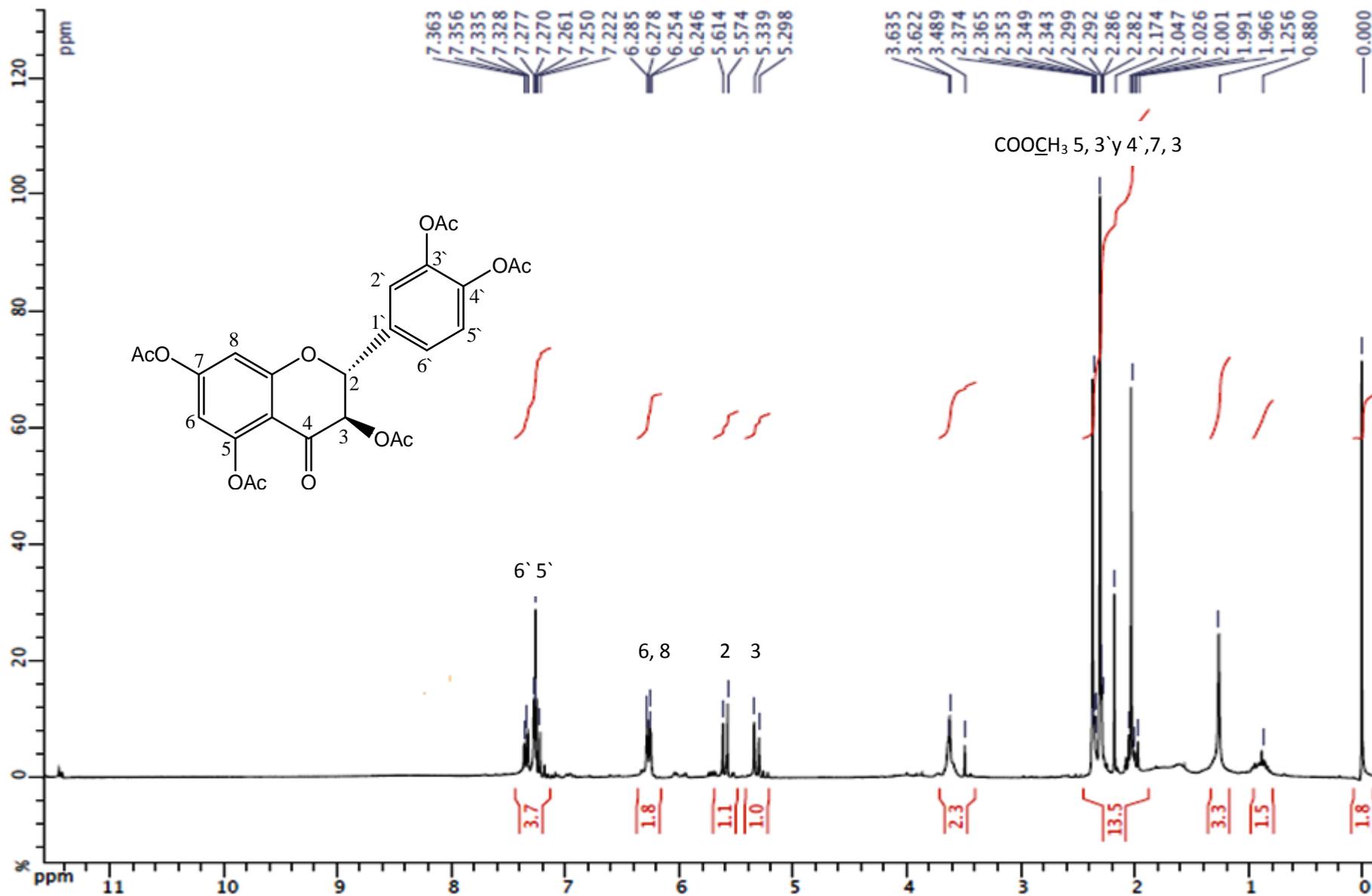
Espectro 39. RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) para el compuesto IX.



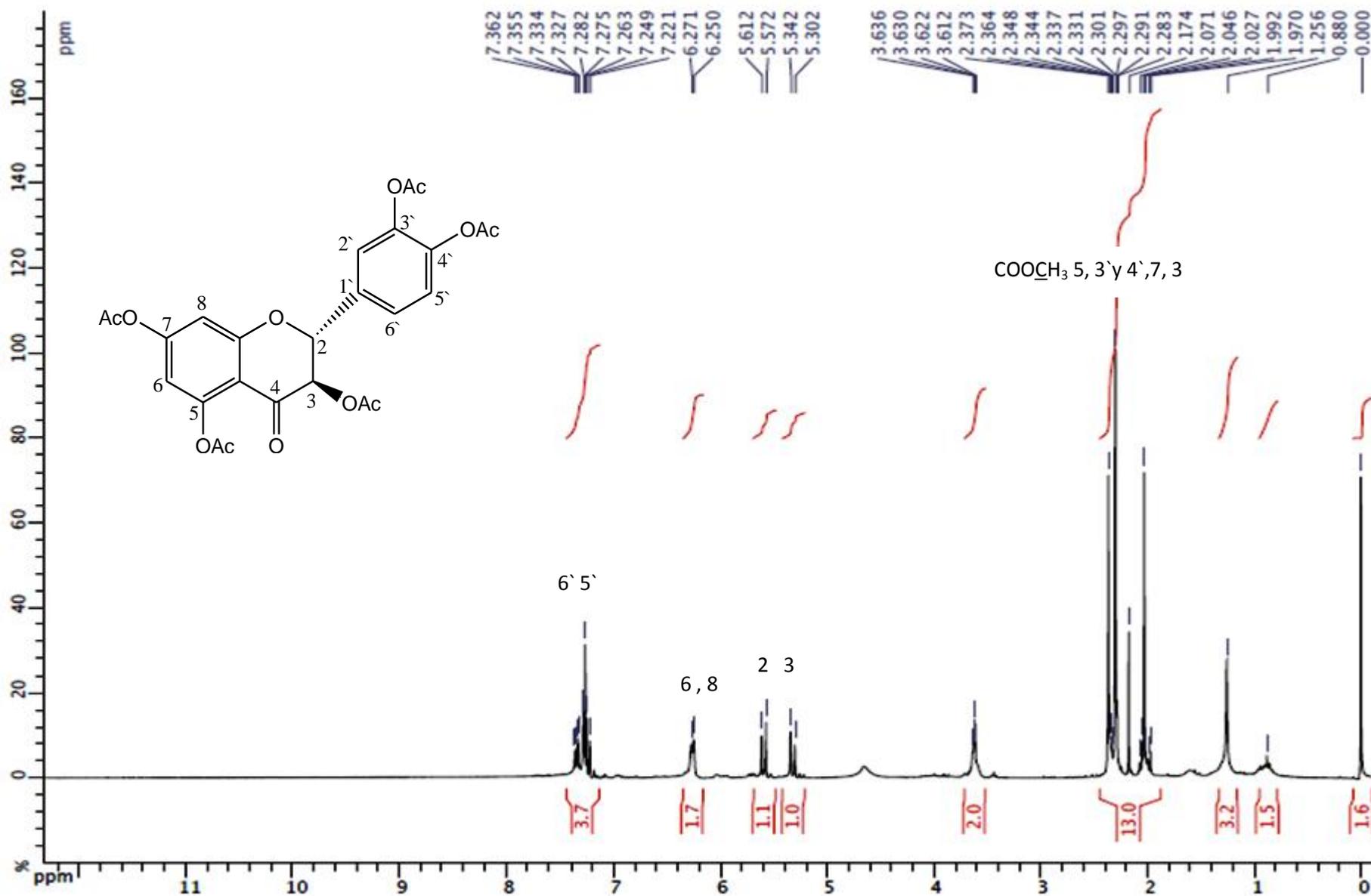
Espectro 40. RMN DEPT 135 (75 MHz, CDCl_3) para el compuesto IX.



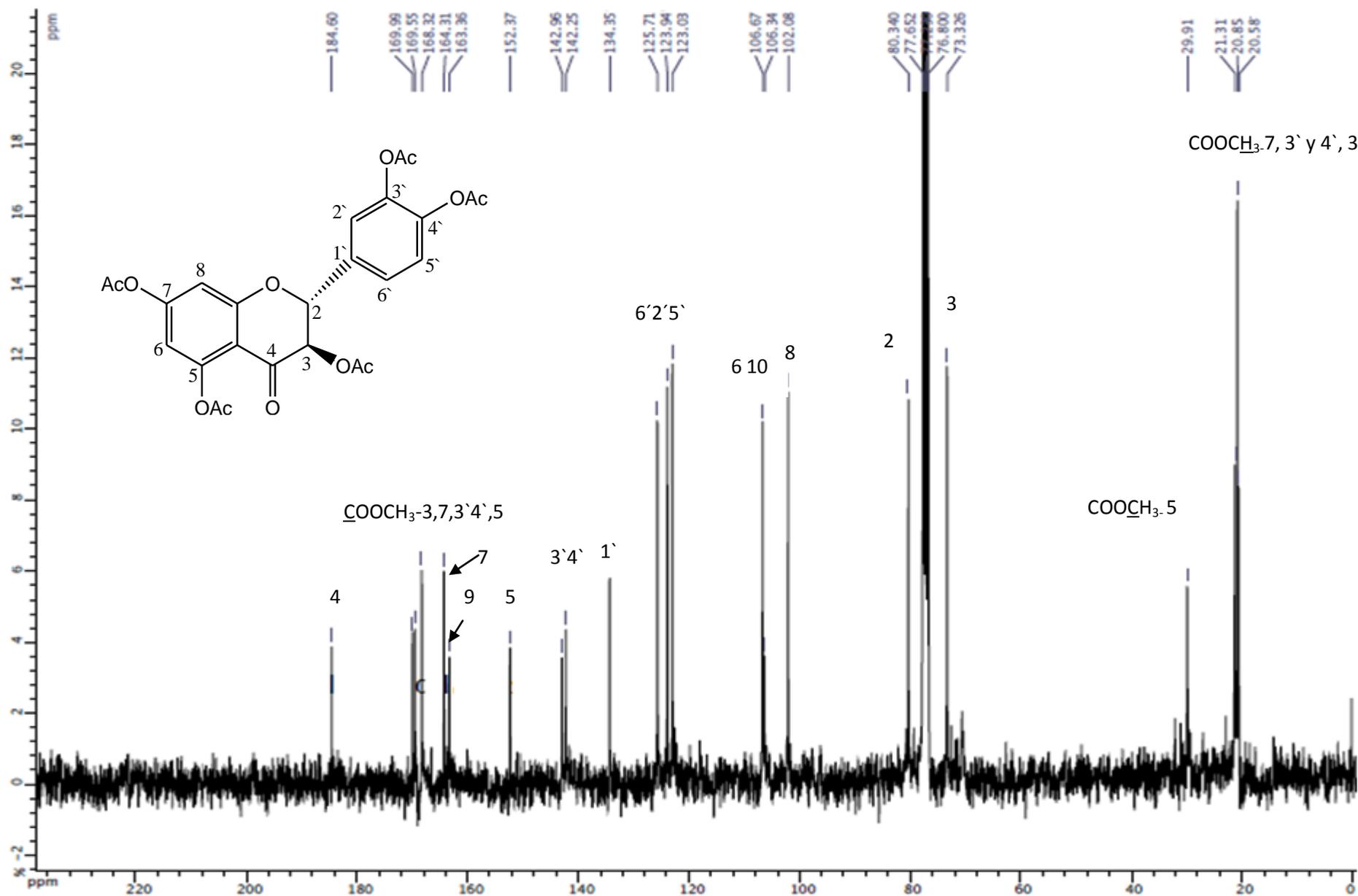
Espectro 41. IR (disolución CDCl₃) para el compuesto X.



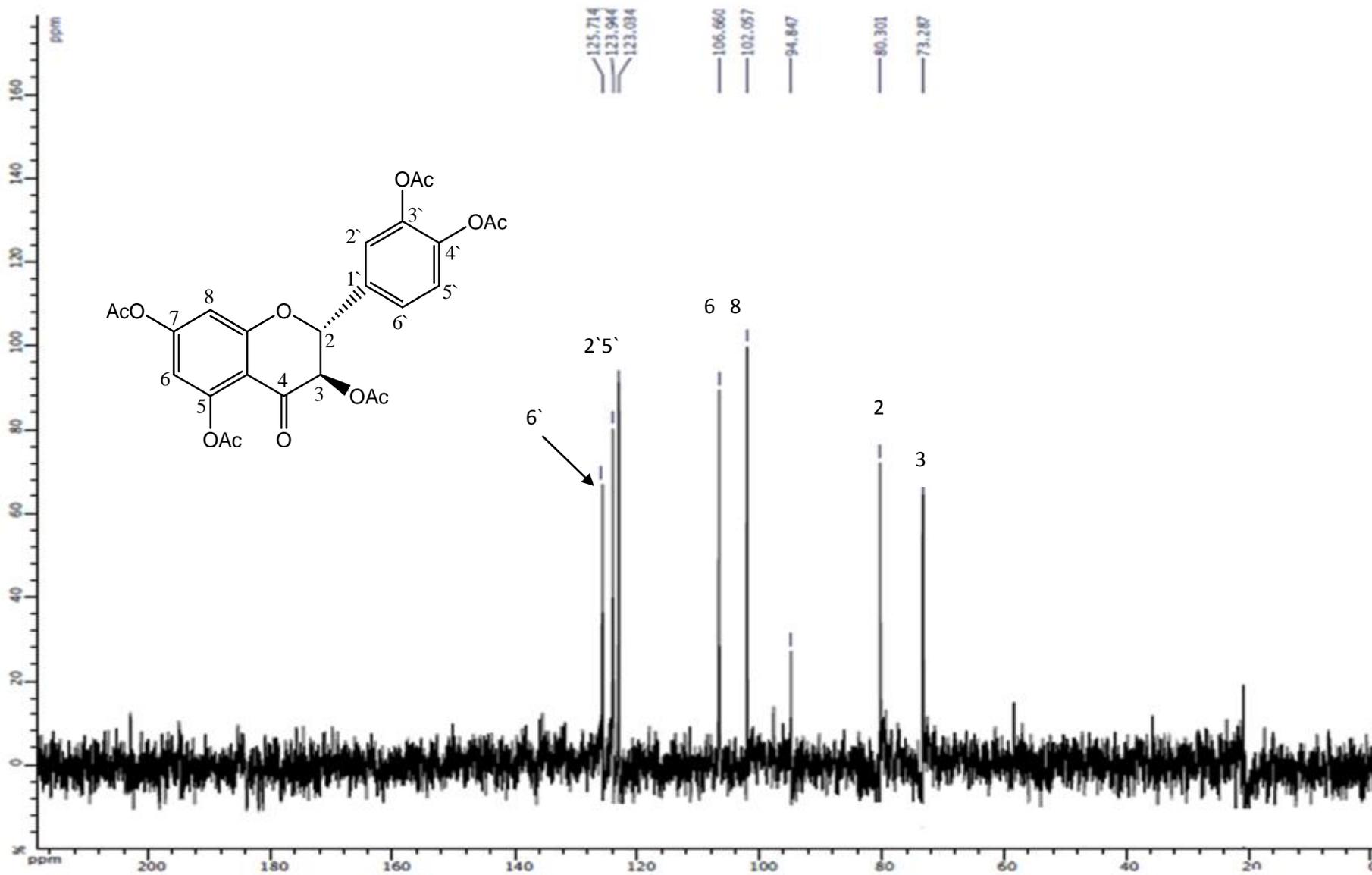
Espectro 42. RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) para el compuesto X.



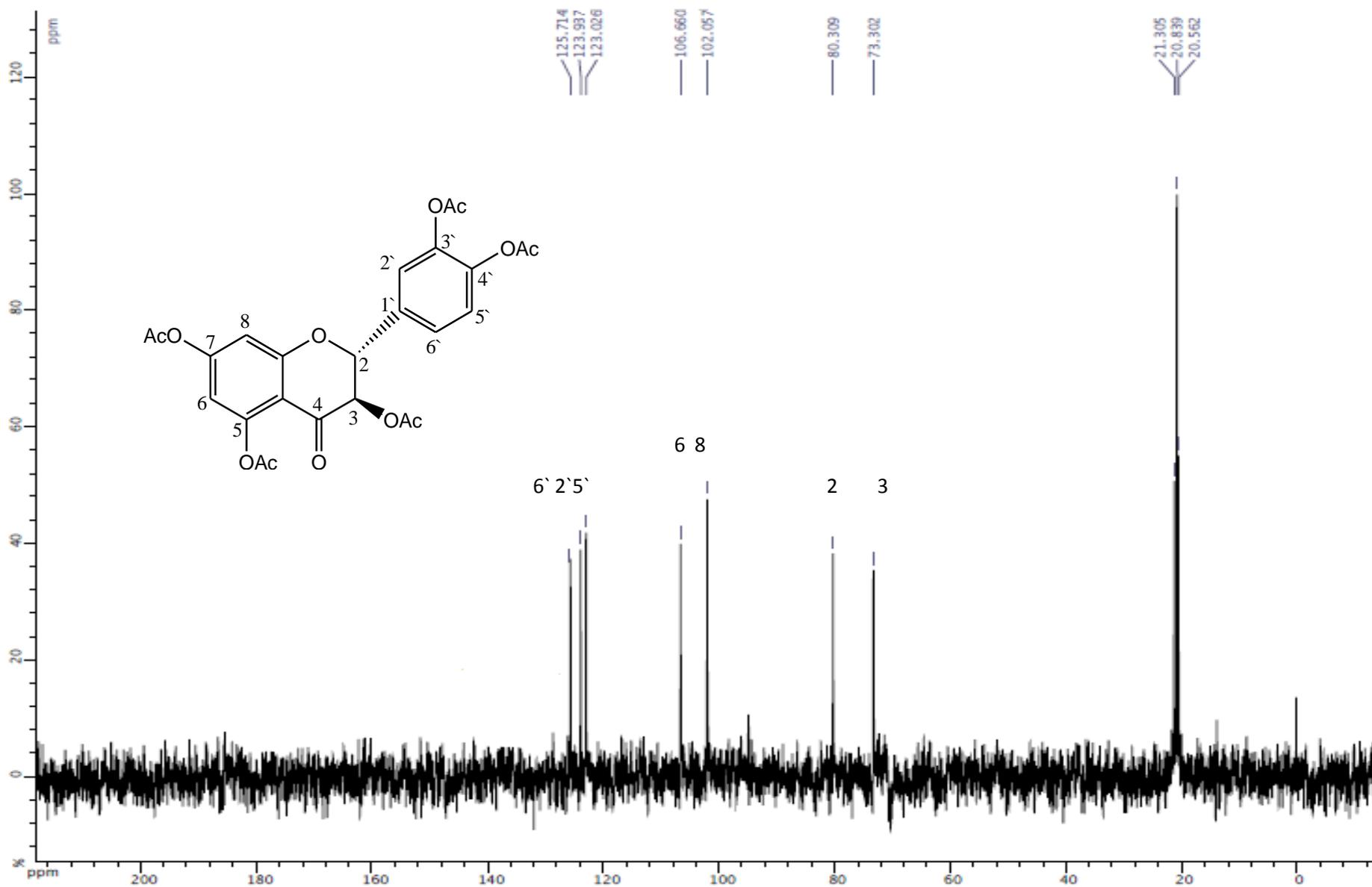
Espectro 43. RMN ¹H +D₂O (300Mz, CDCl₃) para el compuesto X.



Espectro 44. RMN ^{13}C (300Mz, CDCl_3) para el compuesto X.



Espectro 45. DEPT 90 (75 MHz, CDCl₃) para el compuesto X.



Espectro 46. DEPT 135 (75 MHz, CDCl₃) para el compuesto X.