



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

---

---

FACULTAD DE QUIMICA

ESTUDIO FITOQUIMICO DE *Salvia longispicata*

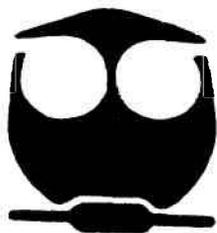
**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**Q U I M I C O**

**P R E S E N T A**

**EHECATL LUIS DAVID PALEO GONZALEZ**



MEXICO, D.F.



2004

**JURADO ASIGNADO:**

**Presidente** **Prof. Gustavo García de la Mora.**

**Vocal** **Profa. Liliana Saldivar Osorio.**

**Secretario** **Prof. Ricardo Jorge Cárdenas Pérez.**

**1er Sup.** **Profa. Ana Adela Sánchez Mendoza.**

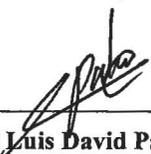
**2do Sup.** **Profa. María del Consuelo S. Sandoval García.**

**Sitio donde se desarrolló el tema:**  
**Laboratorio 2-8, Departamento de Productos Naturales.**  
**Instituto de Química.**  
**UNAM.**

**Asesor:**

  
M. en C. Ricardo Jorge Cárdenas Pérez.

**Sustentante:**

  
Ehecatl Luis David Paleo González.

## INDICE

Introducción	1
Objetivo	3
Antecedentes	4
Parte Experimental	18
Discusión de Resultados	23
Conclusiones	42
Bibliografía	44
Espectros	48

## Agradecimientos

Al pueblo de México por hacer una realidad a la Universidad Nacional Autónoma de México y a ésta por hacer realidad estos estudios.

Al los miembros del H. Jurado por sus comentarios hacia este trabajo.

Al M. en C. Jorge Cárdenas Pérez por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo en el laboratorio 2-8 del Instituto de Química UNAM.

Al M. en C. José Antonio Morales Serna por sus comentarios, ayuda y amistad.

A cada uno de mis compañeros del laboratorio 2-8: Miguel, Eréndira, Ricardo (Don Pira), Ericka, Aline, Armando, Violeta, Jorge, Alejandro, Marx, Rene. Han sido una segunda familia durante todo este tiempo.

A todos mis profesores a lo largo de mis estudios. En particular, a los profesores José Manuel Mendez Stivalet, Fernando León, Juventino García, Angel Guzmán, Ericka Martín, Leticia Flores y Auster Valderrama por hacer a la química más interesante y disfrutable.

A mis compañeros en la facultad de química: Mayra, Lourdes, Idania, Gianni, David (Chino), Memo, Javier, Mariana, Carlos Frontana, Carlos Olvera y todos aquellos que no menciono pero que, de igual manera, hicieron de mi estancia en la facultad algo inolvidable.

Al Lic. Felipe García Estrada por ser un buen amigo.

A Adonis Bello y Alicia Casariego por su amistad durante su estancia en México y por sus comentarios a este trabajo.

A Vanessa, Mónica, Juan, Gerardo e Israel por su amistad de tanto tiempo.

## **Dedicatorias**

### **A Salvador y María Elena**

Gracias por todo durante todo este tiempo. Gracias a ustedes soy lo que soy.

### **A Quetzalli**

Esperando que nunca cambies y trabajes tan duro como hasta ahora para hacer todo lo que quieras.

### **A mi familia**

A mis abuelos José y María Luisa. A mis tías: Guille, Angelina, Delia, Ana y Lourdes; a mis primas Socorro, Lucía, Patricia, Teresa y Verónica. Por contribuir a construir mi vida.

### **A Catalina Valeria**

Gracias por permitir al viento acariciar tu cabello hasta el día de hoy.

### **A Pablo y Jimena**

Como sobrevivir a la facultad de química sin amigos como ustedes.

### **A mis compañeros caninos**

A Wilson, Canica, Macuca, Igor, Lucila, Samuela, Zuga, Pixie y Camilo pues ellos me han dado cariño incondicional y una gran compañía sin importarles como soy.

### **A Ehecatl**

Gracias a ti y todos los antes mencionados has logrado y superado muchas cosas, incluso, sobrevivir a ti mismo.

## INTRODUCCIÓN

Dentro del reino vegetal, la familia Labiatae es una de las más abundantes a lo largo de todo el mundo; ésta se encuentra formada por 180 géneros y alrededor de 3500 especies. Es una familia universal debido a su amplia distribución, pues se pueden encontrar desde una zona cálida, una zona fría o una zona de gran elevación.

En México existen, aproximadamente, 42 géneros (alrededor de 550 especies) representados principalmente por los géneros *Salvia* e *Hyptis*, siendo el género *Salvia* el más abundante, contando con alrededor de 300 especies. El género *Salvia* a su vez está dividido en cuatro subgéneros: *Sclarea*, *Leonia*, *Salvia* y *Calosphace*; especies de los subgéneros *Salvia* y *Sclarea* se encuentran en el continente asiático, las especies del subgénero *Leonia* en América del norte y la gran mayoría de las especies mexicanas pertenecen al subgénero *Calosphace*, que se extiende hasta centro y Sudamérica.

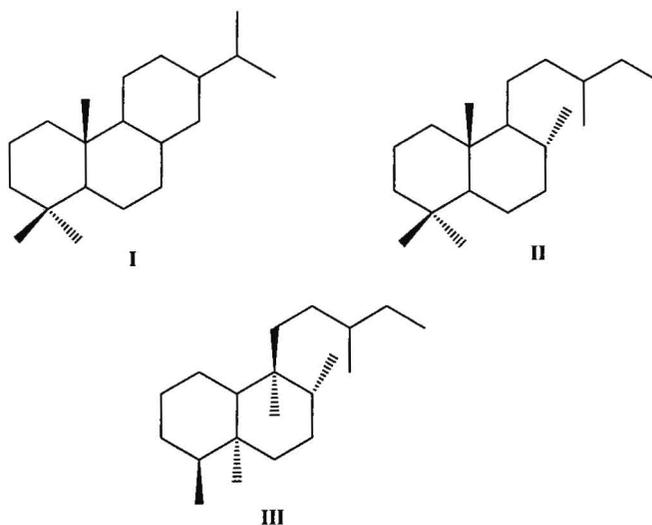
Todos los organismos vegetales poseen caminos metabólicos similares, utilizando especies químicas esenciales para la biosíntesis de azúcares, lípidos, aminoácidos, etc. Este es considerado el metabolismo primario, mediante el cual se determina la supervivencia del organismo en cuestión.

Muchos organismos utilizan otros caminos metabólicos produciendo una gran variedad de compuestos sin aparente utilidad y que poseen una distribución restringida en el organismo, limitándose, en algunos casos, a especies o subespecies únicas; este tipo de compuestos constituyen el metabolismo secundario y es una manifestación de la individualidad del organismo que los contiene.

La biosíntesis de los metabolitos secundarios se ha considerado que parte del ácido mevalónico, formando unidades de isopreno, que al unirse dan compuestos del tipo terpenico como son los monoterpenos, sesquiterpenos y triterpenos.

De estudios realizados en plantas del género *Salvia* se han aislado un gran número de compuestos de tipo terpénico, principalmente diterpenos, compuestos que constan de 20 átomos de carbono que siguen un ordenamiento en la regla biosintética del isopreno. Éstos presentan estructuras cíclicas o alicíclicas que muestran distintos estados de oxidación, observándose la presencia de un número muy diverso de grupos funcionales como son: alcoholes, ácidos, lactonas, etc.

Dentro del grupo de diterpenos se encuentran los de tipo bicíclico como los más abundantes en plantas del género *Salvia*. En los estudios de las especies de los subgéneros *Salvia* y *Sclarea* se han aislado diterpenos del tipo abietano (**I**) y labdano (**II**), mientras que de los géneros *Leonia* y *Calosphace* prevalecen los de tipo abietano y ent – clerodano (**III**).



El interés especial en este tipo de plantas radica en que han sido utilizadas desde tiempos muy antiguos en el tratamiento de diversas enfermedades debido a sus propiedades bactericidas, antitumorales, etcétera. El estudio fitoquímico de la familia Labiatae, y en especial el del género *Salvia* ha permitido aislar metabolitos con actividad biológica; un

ejemplo de ello lo constituyen las diversas sustancias que presentan actividad antiviral y antibacterial atribuida a compuestos de tipo fenólico (acetogeninas) y algunos diterpenos. Para algunos de estos últimos, se han descrito actividades de tipo espasmolítica y sedativa. Muchas de las plantas del género presentan actividad tóxica debida a diversas sustancias con actividades muy distintas contra bacterias, arbustos e insectos. Muchas de estas sustancias se busca emplearlas como insecticidas o herbicidas biodegradables.

En México se ha realizado un estudio muy extenso sobre *Salvias* de varias especies y de distintos lugares de la república, lo cual ha permitido establecer relaciones interesantes basadas en el contenido diterpénico, con el fin de obtener una clasificación quimiotaxonómica adecuada de las especies, de acuerdo a las condiciones de suelo o clima entre otros factores.

Por ello, el presente trabajo tiene como objetivo una caracterización original de *Salvia longispicata* con el fin de contribuir a su clasificación quimiotaxonómica en base a los compuestos que se puedan aislar del ejemplar.

## ANTECEDENTES

En todos los organismos vivos los compuestos químicos se sintetizan y degradan por medio de una cadena de reacciones químicas controladas por enzimas, las cuales constituyen las rutas metabólicas; éstas son muy similares en todos los organismos cuando se trata de la síntesis de compuestos esenciales como son las proteínas, lípidos o los ácidos nucleicos que constituyen lo que se conoce como el metabolismo primario y como metabolitos primarios a los compuestos provenientes de estas rutas metabólicas<sup>1</sup>.

Sin embargo, reflejo de la individualidad, cada organismo utiliza otras vías para sintetizar compuestos sin aparente utilidad y con una distribución restringida dentro de la misma especie, incluso dentro del mismo organismo; estos compuestos son conocidos como metabolitos secundarios y a las rutas por las cuales son sintetizados se conocen de manera global como el metabolismo secundario<sup>1,2</sup>. Debido a estos factores de individualidad, es difícil establecer una función única o específica de dichos compuestos dentro de un grupo o un organismo en particular, ya que cada organismo está expuesto a una serie de factores externos distintos dependiendo del clima, suelo, flora y fauna circundante, que harán que su función cambie de acuerdo al organismo que los sintetiza. A estos compuestos también se les conoce como productos naturales, aunque de una manera un tanto arbitraria para aquellos compuestos de origen natural propios de un organismo u organismos relacionados entre sí<sup>2</sup>.

En particular, las plantas han sido muy estudiadas desde el punto de vista de la química de los productos naturales, debido a que han sido utilizadas desde tiempos ancestrales con fines religiosos y medicinales, existiendo pruebas de su uso en un gran número de culturas como son la cultura China o las culturas de mesoamérica. En la

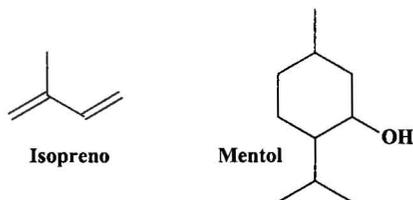
actualidad, debido a estas evidencias, las plantas son sujetos de estudios exhaustivos tratando de encontrar sustancias que puedan ser empleadas en beneficio de las personas como principios activos en medicamentos, herbicidas biodegradables o insecticidas naturales. México es un caso concreto de lo anterior, con una tradición en el uso de plantas con fines terapéuticos y con documentos que guardan esta información desde hace mucho tiempo.

Se han estudiado mucho las rutas metabólicas de las plantas en un esfuerzo para conocer la manera en que son sintetizados los compuestos que se han aislado de ellas y que se agrupan en distintas clases. Estas clases son los alcaloides, las acetogeninas o policétidos, los isoprenoides, análogos del fenilpropano y flavonoides entre otros. En el caso de las plantas del género *Salvia* se ha estudiado ampliamente el contenido terpenico, en especial de los diterpenos ya que muchos de ellos presentan propiedades útiles al hombre y pueden ayudar a la clasificación de los miembros del género<sup>3</sup>.

Los isoprenoides son metabolitos secundarios que han sido aislados como principios activos de un gran número de plantas, entre las que se encuentran especies de la familia Labiatae. Los isoprenoides se pueden dividir en esteroides y terpenos; muchos de estos compuestos cumplen distintas funciones dentro de los organismos, muchos esteroides cumplen funciones de receptores hormonales dentro de la membrana celular, misma a la que hacen más fluida al estar unidos a algunas proteínas y lípidos. Así mismo, muchos terpenos tienen funciones de fotorreceptores dentro de las plantas o como agentes defensivos contra el ataque de insectos o de otras plantas<sup>3</sup>.

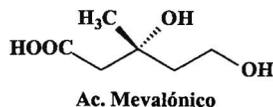
Todos estos compuestos tienen una característica estructural en común, contienen un número entero de unidades de cinco carbonos (C<sub>5</sub>) como en el caso del mentol; De esta manera, se propone que los isoprenoides son generados y deben su nombre a partir de

unidades básicas de isopreno (2-metil-1,3-butadieno), por lo que la condensación sucesiva de unidades de isopreno, mediante un arreglo conocido como de cabeza-cola, produciría compuestos de fórmula  $(C_5)_n$ . A esta regla empírica se le conoce como la regla del isopreno<sup>2</sup>.

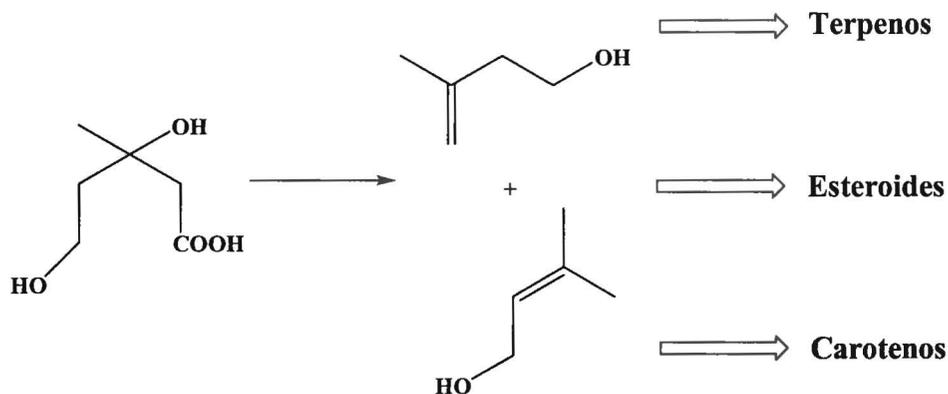


Sin embargo, existen un buen número de excepciones a dicha regla, por lo que para explicar su generación, es necesario pensar en términos de reglas con bases bioquímicas y biosintéticas de la generación del isopreno y su posterior evolución hacia moléculas más complejas. Existen reglas que establecen que los compuestos de tipo terpénico se construyen a partir de unidades de cinco átomos de carbono (como el isopreno), pero la estructura formada inicialmente puede ser modificada por algunas enzimas de distintas maneras generando una gran variedad en los tipos de esqueletos tanto cíclicos o acíclicos.

Teniendo en cuenta que estas reglas son empíricas, las bases bioquímicas para conocer y comprender la síntesis de los terpenos desde un punto de vista más formal tuvo lugar a partir del aislamiento del ácido mevalónico como precursor de unidades de cinco átomos de carbono



La ruta metabólica de obtención de las unidades de cinco átomos de carbono (C<sub>5</sub>) a partir de ácido mevalónico constituye el primer paso en la síntesis de los isoprenoides (figura 1).



**Figura 1**

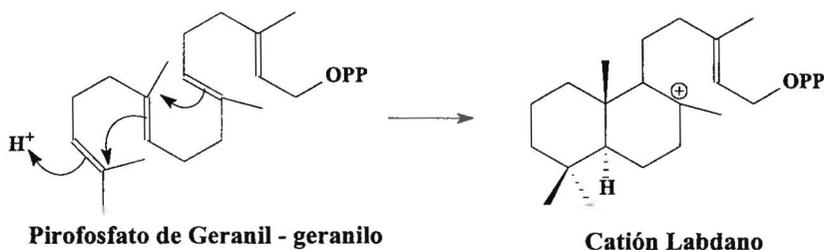
Esta ruta metabólica explica la obtención del alcohol dimetilalílico y su isómero el isopentenol, en forma de sus ésteres de pirofosfato considerados como los precursores fundamentales de todos los isoprenoides. De este modo, estas unidades de cinco átomos de carbono pueden incorporarse casi en cualquier número para producir la gran variedad de esqueletos terpénicos que se han encontrado en muchos de los ejemplares estudiados hasta la actualidad.

Como se muestra en la figura 2, existen distintos tipos de isoprenoides de acuerdo al número de unidades de cinco carbonos y si son cíclicos o no<sup>1</sup>:

Nombre	Numero de átomos de Carbono
Monoterpenos	10 átomos
Sesquiterpenos	15 átomos
Diterpenos	20 átomos
Sesterterpenos	25 átomos
Triterpenos	30 átomos

**Figura 2**

En el caso de la síntesis de los compuestos con 20 átomos de carbono o diterpenos, la regla biogenética del isopreno propone la síntesis de las estructuras teniendo comienzo en la generación del éster de pirofosfato del Geranil - geranilo por la condensación de una molécula pirofosfato de geranilo con una molécula de cada uno de los precursores fundamentales antes mencionados<sup>4</sup>. El proceso de ciclación procede usualmente mediante una adición concertada, teniendo como especie de ataque a una especie electrofílica, como es un protón ( $H^+$ ), sobre el doble enlace entre los carbonos 14 y 15 en el pirofosfato de Geranil - geranilo, dando lugar a un catión bicíclico tipo labdano. Este precursor labdano es muy importante pues el mismo constituye uno de los esqueletos más comunes dentro de los compuestos aislados de plantas del género *Salvia*, así como precursor para explicar la síntesis de otros diterpenos encontrados en plantas del mismo género.

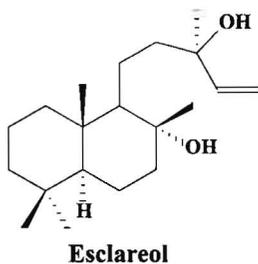


Al ciclarce para formar el catión labdano, existen dos posibles configuraciones debido a dos posibles modos de cierre para formar la fusión de los anillos del sistema bicíclico; esto provoca que los diterpenos puedan presentar dos compuestos con estereoquímica opuesta de manera natural, lo que da lugar al aislamiento de mezclas de compuestos en plantas distintas.

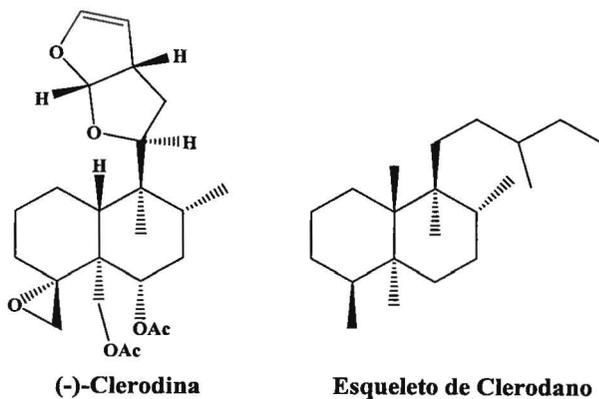
El género *Salvia* comprende alrededor de 900 especies, siendo así uno de los géneros con mayor número de especies dentro de la familia Labiatae. Para su estudio Bentham (1876) lo dividió en cuatro subgéneros: *Salvia*, *Sclarea*, *Leonia* y *Calosphace*. El estudio fitoquímico de muchas de las especies de este género ha mostrado que poseen un importante contenido de diterpenos del tipo abietano y clerodano, esto depende principalmente del subgénero al cual pertenece el espécimen. Así, las especies pertenecientes a los subgéneros *Salvia* y *Sclarea* se caracterizan, generalmente, por tener diterpenos del tipo abietano y labdano, mientras que el subgénero *Leonia* y *Calosphace* se caracteriza primordialmente por la presencia de diterpenos del tipo clerodano y abietano<sup>5</sup>.

En particular, del estudio fitoquímico de *Salvia sclarea*, perteneciente al subgénero *Sclarea*, se aisló un diterpeno con esqueleto de labdano, llamado esclareol. Este tipo de diterpenos constituyen un grupo muy extenso que se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas y que derivan de manera directa del catión labdano, de manera que todos los

labdanos que se conocen poseen la configuración *anti* en la fusión de los anillos A y B, respecto al hidrógeno del carbono 5 y el grupo metilo unido al carbono 10.

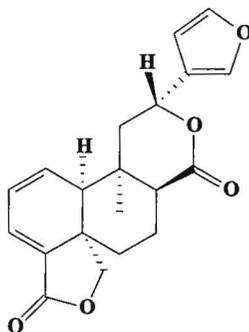


En el subgénero *Calosphace* se clasifican las salvias americanas que se encuentran en México, Centro y Sudamérica. Su estudio ha revelado que más del 80% de los diterpenos de este subgénero tienen estructura de *neo*-clerodano o estructuras biogénicamente relacionadas con un precursor del tipo clerodano<sup>3</sup>.



El término *neo*-clerodano se estableció con la elucidación de la estereoquímica de la (-)clerodina por lo que la serie de compuestos con la estereoquímica opuesta se les conoce como *ent-neo*-clerodanos. En algunas ocasiones el término *neo*-clerodano es remplazado por el término *ent*-clerodano (*ent*, para designar la configuración opuesta), principalmente por razones biogénicas<sup>6</sup>.

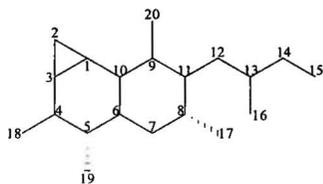
La estructura de los compuestos *neo*-clerodanos se considera derivada del esqueleto de *ent*-labdano a través de migraciones 1-2 de hidruros y grupos metilo. Al igual que los labdanos, la mayoría de los clerodanos conocidos tienen la configuración *anti* en la fusión de los anillos A y B del sistema bicíclico, la configuración indica la posición entre el grupo metilo en el carbono 5 y el hidrógeno en el carbono 10. Sin embargo, también se conocen compuestos clerodánicos con la configuración opuesta *cis*, como la linearolactona<sup>7</sup>; aislada de *Salvia lineata*.



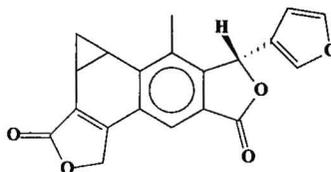
**Linearolactona**

Otra característica estructural presente en un gran número de los clerodanos que se conocen es que presentan heterociclos oxigenados, lo que ha sido relacionado con las propiedades herbicidas y de defensa ante los insectos por parte de la planta.

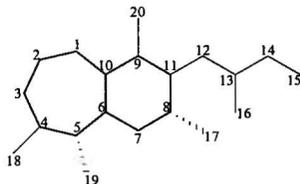
El estudio fitoquímico de varios ejemplares de salvias mexicanas ha permitido conocer la presencia de diterpenos del tipo clerodano con arreglos estructurales muy variados y particulares; los esqueletos de átomos de carbono de estos diterpenos se consideran como reordenamientos a partir de la estructura del *neo*-clerodano. De esta manera, de *Salvia fulgens*, se aisló un diterpeno con anillo de salvigenano, la salvigenólida<sup>8</sup>; así mismo de *Salvia puberula*, se aislaron la salvipuberulina<sup>9</sup>, diterpeno cuyo esqueleto base se conoce como salvipuberulano y la isosalvipuberulina, diterpeno cuyo esqueleto se nombró como isosalvipuberulano<sup>9,10</sup>.



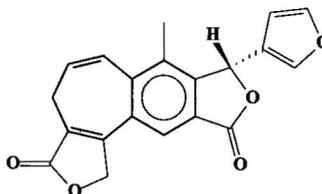
**Salvipuberulano**



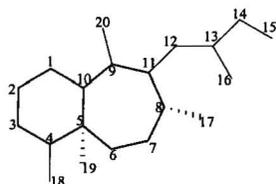
**Salvipuberulina**



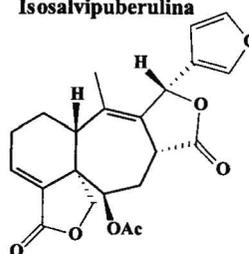
**Isosalvipuberulano**



**Isosalvipuberulina**

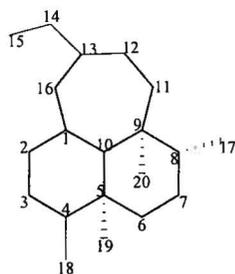


**Salvigenano**

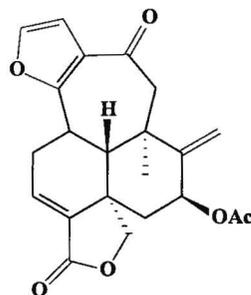


**Salvigenólida**

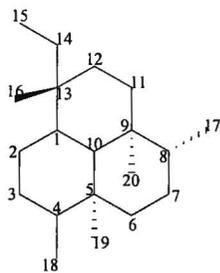
Otro esqueleto de origen clerodánico es el que presenta la languidulina, aislada de *Salvia languidula*, cuyo esqueleto se conoce como languidulano<sup>11</sup>; de esta misma planta se aislaron otros cuatro diterpenos, las salvilanguidulinas A-D que poseían el mismo esqueleto base, nombrado como salvilanguidulano<sup>12</sup>.



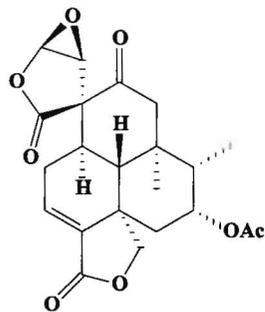
**Languidulano**



**Languidulina**

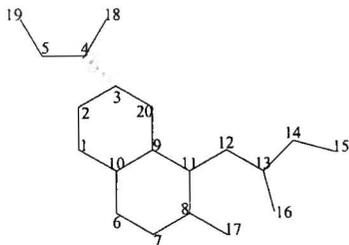


**Salvilanguidulano**

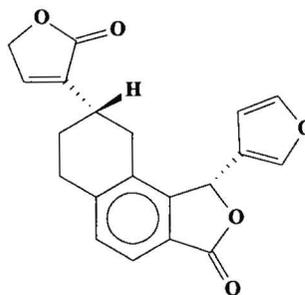


**Salvilanguidulina A**

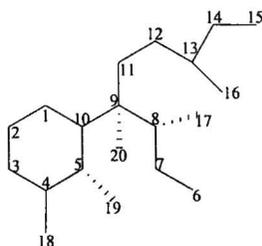
De dos especies; *Salvia tiliaefolia* se aisló la tilifodiólida, un diterpeno tetralínico cuyo esqueleto base se nombró como tilifolano<sup>13</sup>; mientras que de *Salvia rhyacophyla* se aisló la riacofilina, un 5,6 *seco*-clerodano cuyo esqueleto base se nombró como riacofano<sup>14</sup>



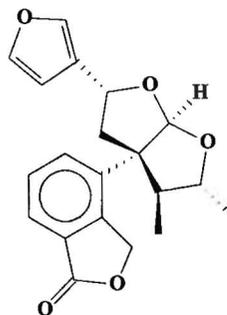
**Tilifolano**



**Tilifodiólida**



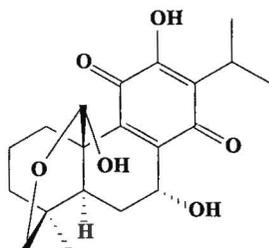
**Riacofoano**



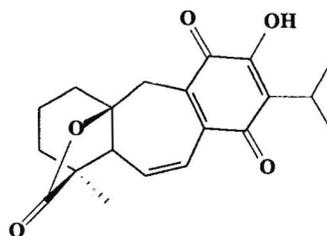
**Riacofilina**

Otros tipos de diterpenos se pueden hallar dentro del género *Salvia* como son los diterpenos del tipo pimarano, abietano e icetexanos entre otros. Muchos compuestos con este tipo de esqueletos han sido aislados en *Salvias* del subgénero *Calosphace*, a pesar de que los dos primeros tipos de esqueleto son mucho más comunes en ejemplares del continente europeo y asiático. Estos esqueletos están relacionados entre sí, pues el esqueleto pimarano proviene del catión labdano por ciclización de un intermediario del mismo, generando el catión pimarano. El esqueleto de abietano deriva directamente del catión pimarano por migraciones de hidruro y metilo para generar el catión abietano. Los esqueletos de pimarano y abietano son tricíclicos con una gran cantidad de grupos funcionales distintos y en variados estados de oxidación. Los diterpenos con esqueleto de icetexano provienen

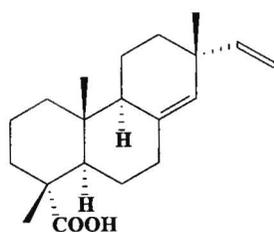
directamente del catión abietano, pues se les considera un anillo de abietano reordenado o transpuesto<sup>15 a 19</sup>.



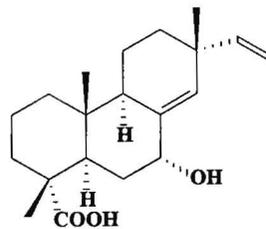
**Conacytona**



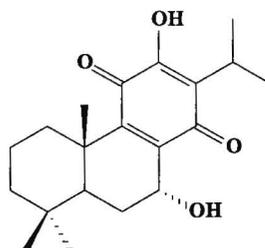
**Ictetexona.**



**Ácido sandaracopimárico**



**Ácido 7α-hidroxisandaracopimárico**



**7α-hidroxiroyleanona**

Por lo que, las especies constituyentes del género *Salvia*, están relacionadas al subgénero y sección a la cual pertenecen. Más del 80% de los diterpenos aislados del subgénero *Calosphace* presentan un esqueleto de clerodano o algún tipo relacionado con éste. En particular, las especies de la sección *Angulatae* (subgénero *Calosphace*), se encuentran constituidas por 44 especies; éstas, están distribuidas en 6 subsecciones:

*Tiliaefoliae*, *Glumaceae*, *Fructicosae*, *Rudes*, *Hiantes* y *Scutellarioideae*. De éstas, 27 especies se encuentran distribuidas a lo largo de México<sup>20</sup>.

Sección <i>Angulatae</i>					
<i>Tiliaefoliae</i>	<i>Glumaceae</i>	<i>Fructicosae</i>	<i>Rudes</i>	<i>Hiantes</i>	<i>Scutellarioideae</i>
<b><i>rhycofila</i></b>	<i>caudata</i>	<i>myriantha</i>	<i>albiflora</i>	<i>drymocharis</i>	<i>flaccida</i>
<b><i>leptostachys</i></b>	<i>roscida</i>	<i>haitensis</i>	<i>mazatlanensis</i>	<i>Alvajaca</i>	
<b><i>urolepis</i></b>	<i>fallas</i>		<i>seemannii</i>		
<b><i>uruapana</i></b>	<i>arthrocoma</i>		<b><i>longispicata</i></b>		
<b><i>tiliaefolia</i></b>	<i>remissa</i>		<b><i>fluviatilis</i></b>		
	<i>fusca</i>		<i>xalapensis</i>		
	<b><i>languidula</i></b>				
	<i>mucidiflora</i>				
	<i>prasiiflora</i>				
	<i>aliena</i>				
	<i>perplicata</i>				

Enmarcadas en negritas se encuentran aquellas que han sido estudiadas

De los estudios fitoquímicos de las especies arriba presentadas se pueden hacer las siguientes comparaciones en base al contenido de diterpenos caracterizados para especímenes de la misma sección<sup>21 22</sup>.

<i>Salvia</i>	Esqueleto diterpénico
<i>rhycofila</i>	Riacofano
<i>leptostachys</i>	Riacofano
<i>urolepis</i>	Languidulano
<i>languidula</i>	Languidulano, salvilanguidulano
<i>fluviatilis</i>	Languidulano, tilifolano
<i>tiliaefolia</i>	Tilifolano, isosalvipuberulano

Con lo anterior se puede observar que existe una relación estrecha entre el contenido diterpénico y la sección a la que pertenece el ejemplar por lo que en la actualidad se puede hablar de un paralelismo entre la diferenciación, clasificación química y seccional. Sin

embargo, el contenido diterpénico no es la única referencia en un estudio de esta naturaleza, pues las plantas también producen compuestos de otras clases que en algunos casos son representativos de casi todos los organismos, como son algunos esteroides de las plantas y que es común aislarlos así como compuestos derivados de las rutas metabólicas del ácido shikímico y del fenilpropano, entre otras que dan origen a compuestos diversos que pueden ser representativos de algunas especies o muy comunes entre otras, como son los flavonoides, alcaloides o macrólidos.

## PARTE EXPERIMENTAL

La purificación de los compuestos se llevó a cabo utilizando técnicas cromatográficas como son la cromatografía en columna al vacío, la cromatografía a presión de aire o “flash” en columna, cromatografía en placa preparativa y la cromatografía en capa fina. Como fases estacionarias fueron utilizadas distintos tipos de sílice ( $\text{SiO}_2$ ), de acuerdo a la técnica empleada. De esta manera se usó sílice G60 F<sub>254</sub> Merck para la cromatografía en columna al vacío, sílice 60 (230:400) Macherey – Nagel para la cromatografía flash en columna y sílice 60 F<sub>254</sub> en las placas preparativas. El monitoreo de estos procesos se realizó mediante placas cromatográficas de  $\text{SiO}_2$  en aluminio Macherey - Nagel con sílice 60 UV<sub>254</sub>. En todos los casos se utilizó una disolución de  $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$  al 1% en  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 2N y una lámpara de luz UV como reveladores. Los puntos de fusión de todos los compuestos obtenidos, fueron determinados en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos.

Los espectros de IR se determinaron en un espectrofotómetro Nicolet FT-IR 750. Los espectros de masas se obtuvieron en un espectrómetro de resolución media JMS-SX505A Jeol por la técnica de impacto electrónico; y en un espectrómetro de alta resolución JMS-102A Jeol, por la técnica FAB+.

Los espectros de RMN de hidrógeno y carbono se obtuvieron en equipos Varian Gemini de 200 Mhz y Varian Unity de 300 Mhz. Los desplazamiento químicos se describen en ppm relativas al TMS y las constantes de acoplamiento se describen en Hz.

Se extrajeron 5.5 Kg de *Salvia longispicata*, incluyendo raíces y partes aéreas, con acetona (23L) a temperatura ambiente durante cuatro días. Una vez que se reunieron los extractos correspondientes a cada día, mediante evaporación al vacío, se llevaron a sequedad obteniendo 234 g. de extracto.

El extracto obtenido fue sometido a una partición con hexano – benceno (1:1)/ metanol – agua (4:1). La parte polar se evaporó a presión reducida hasta eliminación total del metanol, la fase acuosa resultante se extrajo con acetato de etilo para la posterior evaporación del disolvente a presión reducida para obtener 25.2 g de residuo polar. El residuo polar se separó por cromatografía al vacío (columna principal), en una columna de vidrio de 10 cm de diámetro interno, empacada con sílice hasta una altura de 10 cm. La elusión se efectuó iniciando con hexano 100%, mezclas hexano – acetato de etilo de polaridad creciente, acetato de etilo 100%, y acetato de etilo – metanol al 15% siguiendo la separación por cromatografía en capa fina.

A partir de la columna principal, en las fracciones eluidas con un 20% de acetato de etilo en hexano, se observó la precipitación de un sólido. Este sólido fue separado por filtración y purificado por recristalización simple en acetato de etilo caliente dejando enfriar de manera gradual para favorecer la formación de cristales. Se obtuvieron 200 mg. de un sólido amorfo de color blanco con punto de fusión de 250 – 258 °C. Por comparación directa en cromatografía en placa fina y por punto de fusión, se identificó dicho sólido como una mezcla de ácidos oleanólico y ursólico, estos ácidos triterpénicos son muy comunes en las *Salvias* del subgénero *Calosphace* estudiadas hasta ahora.

Las aguas madres obtenidas en la purificación de los ácidos triterpénicos, fueron sometidas a una separación por medio de una cromatografía relámpago, usando como eluyente una mezcla de hexano – acetona en polaridad creciente, siguiendo el proceso de separación por cromatografía en capa fina. De las fracciones colectadas al 15% de acetona en hexano se obtuvo un sólido amarillo claro que fue purificado por recristalización simple

con cloruro de metileno, obteniendo 23 mg de un sólido color amarillo pálido (**I**) cuyo punto de fusión es de 240 – 242 °C. Este compuesto se identificó como la 5,7,4'-trihidroxiflavanona también conocida como **Naringenina**. Sus características espectroscópicas son:

**IR:** ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3400, 2925, 1633, 1602.

**RMN-<sup>1</sup>H:** (300MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  (ppm) (  $\int$ , multiplicidad, J, asignación): 7.31 (2H, H-2', H-6'), 6.89 (2H, H-3', H-5'), 5.97 (2H, s, H-6, H-8), 5.3(1H, dd, 13.2 Hz, 3Hz, H-3), 4.2 (3H, s, 3OH), 3.09 (1H, dd, 17.1 Hz, 13.2 Hz, H-3 ax), 2.75 (1H, dd, 17.1 Hz, 3 Hz, H-3 ec.)

**RMN-<sup>13</sup>C:** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  (ppm): 195.75, 166.92, 164.09, 163.10, 157.81, 129.04, 127.72, 115.68, 102.32, 96.57, 95.55, 78.94, 43.01.

**E. Masas:** (m/z): 272 (M+). 271, 179, 153, 120, 91, 69, 65.

De las fracciones eluidas a un 40% de acetato de etilo en hexano en la columna principal, se observó la precipitación de un polvo blanco muy fino. Se logró aislar un compuesto cristalino (144 mg) de color blanco mediante una recristalización utilizando el sistema de disolventes acetato de etilo/metanol – hexano; dicho compuesto tiene un punto de fusión de 129 – 131°C. A este compuesto se le designó como **II** y por comparación directa con un estándar en cromatografía en placa fina, se le identificó como  $\beta$  - **sitosterol**.

Las aguas madres obtenidas en la purificación de **II** fueron sometidas a una separación mediante una cromatografía relámpago utilizando como eluyente una mezcla acetato de etilo – hexano en polaridad creciente y siguiendo el progreso de la separación

por cromatografía en capa fina. De esta columna cromatográfica, en las fracciones obtenidas a una polaridad de 20% de acetato de etilo – hexano se observa la precipitación de un sólido de color amarillo claro. Por comparación de la cromatografía en placa fina tomada a todas las fracciones obtenidas de esta columna se decidió reunir a todas las fracciones colectadas entre las polaridades de 5 a 20% de acetato de etilo – hexano. Una vez reunidas dichas fracciones, se evaporó un poco de disolvente observando la precipitación de un sólido de color amarillo claro. Éste fue purificado por recristalización por par de disolventes utilizando un sistema hexano – acetato de etilo/metanol. El sólido fue solubilizado en una pequeña cantidad de una mezcla acetato de etilo/metanol para posteriormente agregar poco a poco hexano frío hasta la precipitación del sólido, el cual fue filtrado para obtener 67 mg de un sólido de color amarillo claro con punto de fusión de 45 – 48 °C (III). Sus características espectroscópicas son:

**IR:** ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3200, 1690, 1300, 1200, 850, 760.

**RMN-<sup>1</sup>H:** (300MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm) (  $\int$ , multiplicidad, J, asignación): 7.62 (1H, d, 10.5Hz), 7.09 (1H, dd, 8.2, 2.1Hz), 7.03 (1H, d 2.1Hz), 6.79, (1H, d, 8.5Hz), 6.3 (1H, d, 10.5Hz), 3.98 (6H, s), 3.61 (2H, t, 10.47Hz), 2.9 (1H, s) 2.61 (2H, t, 10.47Hz).

**RMN-<sup>13</sup>C:** (75MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm): 166.73, 155.21, 147.54, 146.8, 143.01, 135 – 115, 129.66, 122, 115.4, 114.8, 55.78, 40.83, 34.53.

**Masas:** (m/z): 222 (M+), 221, 205, 191, 177, 164, 153, 138, 120, 107, 91, 65, 39, 31, 18.

Las fracciones obtenidas a una polaridad de 75% de acetato de etilo en hexano de la columna principal fueron disueltas en acetona observando la precipitación de un sólido. La

purificación fue intentada mediante una recrystalización por par de disolventes en el sistema de disolventes hexano – acetona, la cual no fue posible. Posteriormente se sometió a recrystalización por par de disolventes utilizando acetato de etilo – hexano obteniendo 257 mg de un sólido café claro. Se realizaron varias cromatografías en capa fina en distintos sistemas de elución comprobando que el compuesto estaba puro (**IV**). Su punto de fusión es de 164 – 166 °C y sus características espectroscópicas son las siguientes:

**IR:** ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2972, 2928, 1495, 1093, 1016, 842

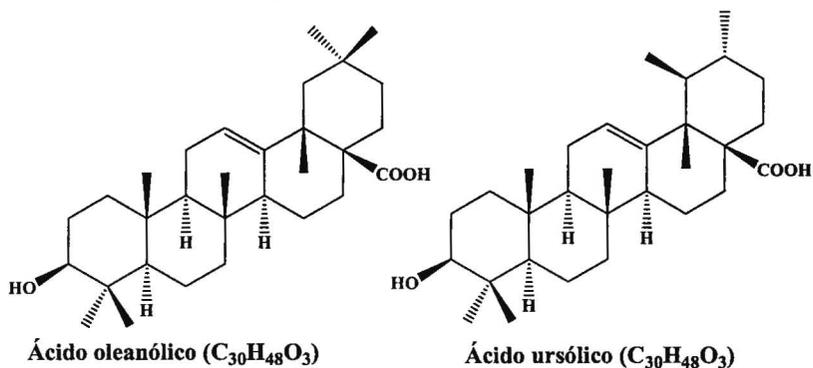
**RMN-<sup>1</sup>H:** (300MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  (ppm) (  $\int$ , multiplicidad, J, asignación): 7.4 (2H, m), 7.0 (2H, m), 5.975 (1H, d, 1Hz), 2.0 (3H, s), 1.596 (3H, s), 1.582 (3H, s).

**RMN-<sup>13</sup>C:** (75MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  (ppm): 138.05, 133.12, 129.807, 129.1, 128.8, 125.8, 124.02, 105.7, 33.6, 31.35, 12.99, 11.64.

**Masas:** (m/z): 450 (M<sup>+</sup>): 415, 339, 274, 246, 206, 170, 151, 128, 112, 91, 83.

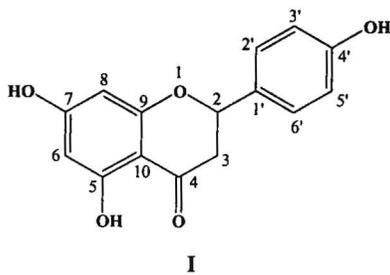
## Discusión de resultados

De las fracciones eluidas con un 20% acetato de etilo en hexano, se observó la precipitación de un sólido en la mezcla de disolventes utilizada como eluyente en la columna. Se obtuvieron 200 mg. de un sólido amorfo de color blanco con punto de fusión de 250 – 258 °C. Por comparación directa en cromatografía en placa fina con una muestra de compuestos y por punto de fusión, se identificó dicho sólido como una mezcla de ácidos triterpénicos conocidos como ácidos oleanólico y ursólico.



Cabe señalar que se obtuvo una mayor cantidad de esta mezcla en el estudio de fracciones posteriores.

De las fracciones obtenidas al 15% de acetona en hexano se obtuvo un sólido amarillo claro que fue cristalizado con cloruro de metileno obteniendo 17 mg de un sólido color amarillo pálido (**I**) cuyo punto de fusión es de 240 – 242 °C



En el espectro de IR (**Espectro 1**) de este compuesto se observan las siguientes señales características: en  $3400\text{ cm}^{-1}$  se asigna para OH, en  $3200\text{ cm}^{-1}$  se asigna para OH de fenol quelatado, en  $1633\text{ cm}^{-1}$  se asigna al C=O de la  $\gamma$ -pirona, a  $1602.5\text{ cm}^{-1}$  se asigna al enlace  $C_{\text{arom.}}-\text{O}$ . En el espectro de masas (**Espectro 5**) obtenido por impacto electrónico se obtiene un ion molecular  $[M]^+$  a  $272\text{ m/z}$ , correspondiente a una fórmula  $C_{15}H_{12}O_5$ .

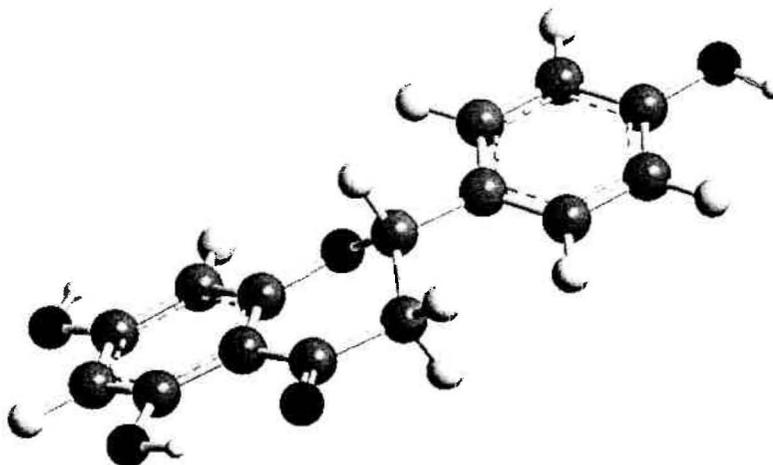
En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  (**Espectro 2**) se identifica un sistema AA'BB' a 7.31 y 6.89 ppm, para los átomos de hidrógeno H-2', H-6' y H-3', H-5' respectivamente, dicho sistema está conformado por un par de señales reflejadas una en la otra en un plano de simetría y con una integral correspondiente a dos protones cada una. Dichos sistemas AA'BB' son característicos de una sustitución aromática 1-4, la cual se puede encontrar en el anillo B del compuesto. La presencia del grupo -OH sobre el C-4' causa un efecto de protección sobre los protones H-3' y H-5', por lo que el desplazamiento químico de éstos se encuentra a campo alto (6.89 ppm).

Además, se puede identificar una señal singulete en 5.97 ppm. con una integral correspondiente a dos protones. Esta señal se asigna a los protones H-6 y H-8 del anillo A obteniendo un singulete debido a que ambos protones están prácticamente protegidos de la misma manera por los efectos *orto* y *para* de los grupos hidroxilo unidos a dicho anillo haciendo que su desplazamiento químico sea muy similar.

En el espectro se observan tres señales doble de doble en 5.3, 3.09 y 2.75 ppm respectivamente y que se encuentran correlacionadas entre sí formando un sistema ABX. La señal en 5.3 ppm es un doble de doble (dd) con una constante de acoplamiento (J) de 13.2 y 3 Hz que integra para un protón. Debido a su desplazamiento químico, la señal corresponde a un protón que se encuentra unido a un átomo de carbono base de oxígeno por lo que la señal se asigna al H-2.

La señal en 3.09 ppm también es un doble de doble, sin embargo, tiene constantes de acoplamiento de 17.1 y 13.2 Hz y dicha señal integra para un protón. Del mismo modo, la señal en 2.75 ppm, otro doble de doble, integra para un protón y posee constantes de acoplamiento de 17.1 y 3 Hz. Ambas señales son asignadas a los hidrógenos unidos al C-3, y, por estar situados sobre el mismo carbono (en este caso particular) forman la parte AB del sistema ABX. El valor de la constante de acoplamiento de 17.1 Hz. entre ambas señales implica el acoplamiento entre dos protones geminales, en especial, que se encuentran en una posición  $\alpha$  a un sistema  $\pi$ , como lo es el sistema carbonílico de la  $\gamma$  - pirona.

El acoplamiento entre la señal a 5.3 ppm, asignada al H-2 y la señal a 3.07 ppm, asignada a uno de los H-3 implica una constante de acoplamiento de 13.2 Hz, estos valores de constante de acoplamiento son característicos de protones vecinos con una conformación anti-periplanar. Así, se puede establecer que ambos protones se encuentran en posiciones axiales en el anillo C de la estructura I. Del mismo modo el acoplamiento entre el H-2 (5.3 ppm) y la señal a 2.72 ppm del otro H-3 con una constante de acoplamiento de 3 Hz, indica que la relación espacial entre ambos es cercana a una conformación del tipo gauche.



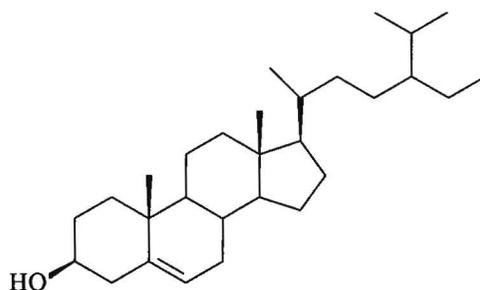
Haciendo este análisis, y partiendo del hecho de que la constante de acoplamiento entre H-2 y uno de los protones H-3 tiene el valor de 13.2 Hz. para dos protones en una conformación anti – periplanar y el protón H-3 restante está gauche a H-2, el anillo B de fenilo debe ocupar una posición ecuatorial en la conformación del anillo de la  $\gamma$  - pirona lo cual es congruente al analizar las constantes de acoplamiento de las señales en el espectro y por motivos de estabilidad debido a las interacciones estéricas menos favorables si el anillo de fenilo estuviese en posición axial.

En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (**Espectro 3**), existen 13 señales. A campo bajo, en 196.5 ppm se tiene una señal pequeña característica de un carbono de carbonilo, en particular, de un carbonilo de cetona conjugada, se asigna al átomo de carbono 4 en la estructura I. Se observan dos señales de carbono  $\text{sp}^3$  una de las cuales se encuentra a 79.4 ppm, dichas señales son características de carbonos base de oxígeno por lo que se asigna al carbono C-2; y la otra señal a 43.01 ppm se asigna al C-3 pues en el espectro del experimento DEPT (**Espectro 4**) se observa que dicha señal corresponde a un carbono  $\text{CH}_2$ .

El resto de las señales corresponde a los carbonos aromáticos de los anillos A y B. Dentro de éstas, se pueden distinguir señales a campo alto correspondientes a los carbonos aromáticos en posición *orto* a la base de oxígeno: C-8 (95.9 ppm), C-6 (96.7 ppm) y C-3', C-5' (115.8 ppm), su desplazamiento químico se debe a los efectos de protección del oxígeno en las posiciones *orto* y *para*. Señales de los carbonos no protonados C-1' y C-10 a 129.7 y 102.7 respectivamente; el caso de C-10 a un campo más alto es debido a la influencia de los tres átomos de oxígeno que se encuentran a dos enlaces de distancia, dichos carbonos se identifican como cuaternarios por no presentar señal en el experimento DEPT. Por último, a campo bajo, se encuentran los cuatro carbonos aromáticos base de

oxígeno que sufren desprotección por efectos inductivos de la unión directa con el oxígeno: 157.85, 163.7, 164.2 y 167.2 ppm. Por las evidencias espectroscópicas descritas, el compuesto I se caracterizó como: 5, 7, 4'-trihidroxi flavanona conocida como Naringenina

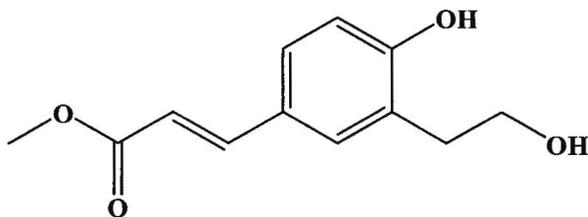
De las fracciones eluidas a un 40% de acetato de etilo en hexano, se observa la precipitación de un polvo blanco muy fino. Se logró aislar un compuesto cristalino de color blanco (II) mediante el sistema de disolventes acetato de etilo – hexano – metanol; dicho compuesto tiene un punto de fusión de 129 – 131 °C y por comparación directa con un estándar en cromatografía en placa fina, se le identificó como  $\beta$  - sitosterol.



**$\beta$  - Sitosterol**

Las aguas madres obtenidas en la purificación de II fueron sometidas a una separación mediante una cromatografía flash utilizando como eluyente una mezcla acetato de etilo – hexano en polaridad creciente. De esta cromatografía, en las fracciones obtenidas a una polaridad de 20% acetato de etilo – hexano se observa la precipitación de un sólido de color amarillo claro. Éste, fue recrystalizado de un sistema hexano – acetato de etilo –

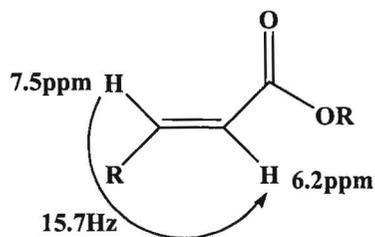
metanol a baja temperatura obteniendo 67 mg del sólido con un punto de fusión de 45 – 48 °C (III). La estructura propuesta para dicho compuesto es la siguiente:



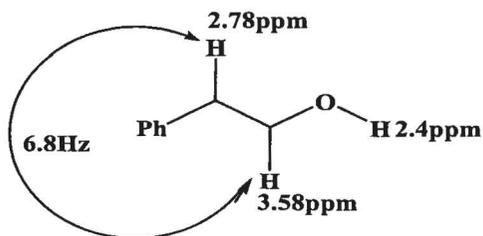
III

En el espectro IR (**Espectro 6**) de este compuesto, se observa una banda ancha de 3300 a 3100  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente a la vibración del enlace O – H de un grupo hidroxilo, de la misma manera se observan los sobretonos característicos de los anillos aromáticos en 830  $\text{cm}^{-1}$  indicando la presencia del mismo pero sin saber acerca de su sustitución. En 1752  $\text{cm}^{-1}$  se observa una señal fuerte correspondiente a un grupo carbonilo en una cadena alifática en este caso de un éster  $\alpha,\beta$  - insaturado, de la misma manera, de 1300 a 1200  $\text{cm}^{-1}$  se observan las señales correspondientes a las vibraciones de los enlaces simples entre carbono y oxígeno. En el espectro de masas (**Espectro 7**) obtenido por impacto electrónico se observa un ion molecular  $[M]^+$  en 222 m/z correspondiente a una fórmula  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{O}_4$ .

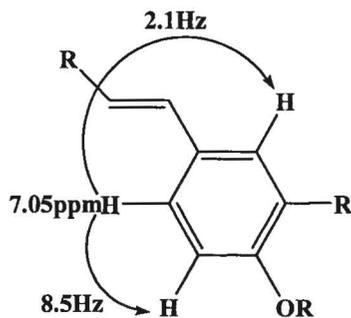
En el espectro de RMN –  $^1\text{H}$  (**Espectro 8**) lo primero que se observan son algunos sistemas sencillos como es el caso de un sistema AB en 7.5 ppm y 6.2 ppm con una constante de acoplamiento de 15.7 Hz ( $J = 15.7$  Hz). Por los valores de desplazamiento químico y de la constante de acoplamiento, se concluye que dicha señal pertenece a dos protones de una doble ligadura en posición relativa *trans*:



Otro sistema que se puede identificar en el espectro de dicho compuesto es uno que consta de dos señales, en forma de triplete, en 3.58 ppm y en 2.78 ppm respectivamente con una constante de acoplamiento entre ellas de 6.8 Hz. Dichas señales integran para dos protones cada una, por lo que corresponderían para dos grupos metilenos unidos entre si. Por los valores de desplazamiento químico, sabemos que uno de esos grupos metileno es base de un átomo de oxígeno mientras que el otro se encuentra unido a un anillo aromático. Así mismo, una señal singulete en 3.98 ppm que integra para tres protones es característica de un grupo metilo unido a oxígeno, por el desplazamiento químico, dicha señal corresponde a un grupo metoxilo de un éster. De la misma manera se observa un singulete ancho en 2.4 ppm que integra para 3 protones, dicha señal corresponde a protones de grupos hidroxilo como el de la cadena de dos metilenos y el grupo hidroxilo unido al anillo aromático.

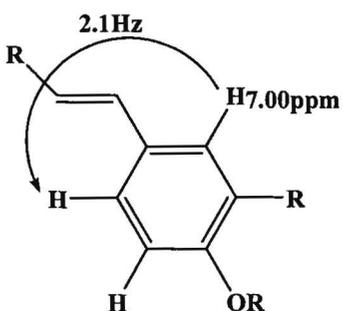


En la zona de 6.75 a 7.1 ppm se observan señales de protones unidos a un anillo aromático. Dentro de dichas señales, se observan algunos sistemas dentro de los cuales se puede concluir la sustitución en el anillo aromático. Se observa una señal doble de doble en 7.05 ppm con constantes de acoplamiento de 8.5 y 2.1 Hz, características de acoplamientos en posición *orto* y *meta*; por su desplazamiento químico, la señal corresponde a un protón que se encuentra a campo alto por lo que un grupo electrodonador ejerce un efecto de protección sobre él, en este caso el único grupo donador puede ser un grupo metoxilo o un grupo hidroxilo; sin embargo, si fuese únicamente la influencia de los grupos mencionados, la protección debería ser mucho mayor y el desplazamiento estaría por debajo de las 6.8 ppm, por lo que se propone que existe la influencia de algún otro grupo funcional, en este caso electroattractor, que disminuye dichos efectos protectores, dicho grupo es la doble ligadura antes mencionada; debido a que sólo presenta una constante de 8.5 Hz, sólo existe acoplamiento con un protón en posición *orto* por lo que la otra posición *orto* se encuentra ocupada

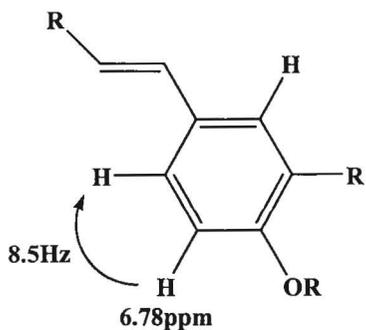


En 7.00 ppm, se encuentra una señal doble con una constante de acoplamiento de 2.1 Hz característica de un acoplamiento aromático del tipo *meta*, al igual que el protón en

7.05 ppm, este protón se encuentra protegido (campo alto) pero sin llegar a un desplazamiento químico característico de un grupo fuertemente protector, por lo que deben existir efectos de desprotección de la doble ligadura o el grupo atractor unido al anillo aromático. Cabe mencionar que dichos efectos de protección o desprotección se hacen evidentes cuando dichos grupos donadores o atractores se encuentran en posiciones relativas *orto* y / o *para* respecto al protón que se analiza ya que es en estas posiciones cuando los efectos resonantes se vuelven muy significativos.



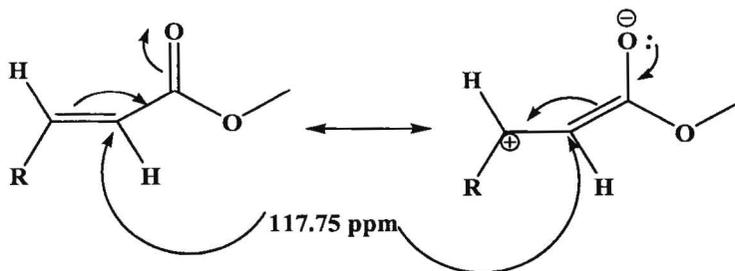
En 6.78 ppm aparece una señal que integra para un protón y que es una señal doble con constante de acoplamiento de 8.5 Hz. Dicha señal se encuentra a campo muy alto respecto al desplazamiento químico común para los protones aromáticos, por lo que un grupo ejerce un efecto de protección sobre él para desplazarlo a campo alto. Dicho protón se encuentra acoplado con otro de manera *orto*, por lo que el sistema aromático es del tipo 1,3,4 – trisustituido.



Cabe señalar que los acoplamientos con los protones en las posiciones relativas *para*, generalmente, no se aprecian pues dichas constantes de acoplamiento se encuentran en el rango de 0 a 1Hz. Cabe señalar que la señal de 2.4 ppm contiene a los protones de los grupos hidroxilo presentes en la molécula y su desplazamiento químico es el característico cuando la muestra contiene agua.

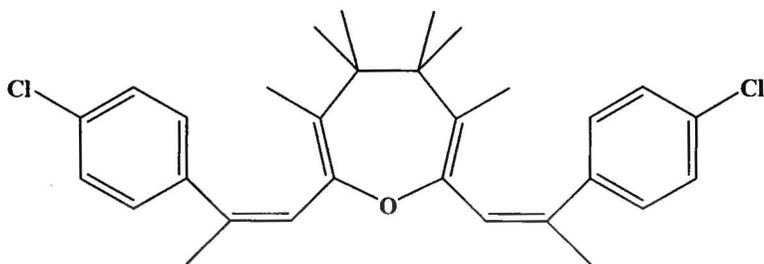
En el caso de RMN –  $^{13}\text{C}$  (**Espectro 9**), se observa una señal en 166.73 ppm correspondiente al carbonilo del éster  $\alpha,\beta$  - insaturado, en la zona para carbono con hibridación  $\text{sp}^2$  se observa una señal en 155.21 ppm, correspondiente al carbono del anillo aromático que se encuentra unido al oxígeno del grupo hidroxilo, por lo que está desprotegido, dicha señal es pequeña porque se trata de un carbono cuaternario. En 141.01 ppm, se encuentra la señal del carbono  $\beta$  de la doble ligadura ya que por efecto resonante con el grupo carbonilo del éster se encuentra desprotegido. En 127.06 y 125.21 ppm se encuentran los carbonos aromáticos totalmente sustituidos. Los carbonos aromáticos unidos a hidrógeno se encuentran en 129.66, 121.98 y 115.34 ppm, este último el que se encuentra en posición *orto* al carbono al cual está unido el átomo de oxígeno por lo que se encuentra protegido. En 117.75 se encuentra el carbono  $\alpha$  de la doble ligadura del sistema conjugado

con el éster, protegido por el efecto resonante de dicho sistema conjugado. Estas señales se observan también en el experimento DEPT (**Espectro 10**):



En 62.82 y 55.78 ppm se encuentran los átomos de carbono base de oxígeno como son el caso del metileno unido al hidroxilo y el grupo metoxilo. La señal en 34.53 ppm corresponde al metileno unido al anillo aromático, estas señales son confirmadas en el experimento DEPT.

Las fracciones obtenidas a una polaridad de 75% Acetato de Etilo en Hexano de la columna original fueron disueltas en acetona, observando la precipitación de un sólido, éste se trató de recrystalizar del mismo sistema de disolventes lo cual no fue posible. Posteriormente se sometió a recrystalización por par de disolventes utilizando Acetato de Etilo – Hexano obteniendo 157 mg de un sólido café claro. Se realizaron varias cromatografías en capa fina en distintos sistemas de elución comprobando que el compuesto estaba puro (**IV**). Para dicho compuesto se propone la siguiente estructura:



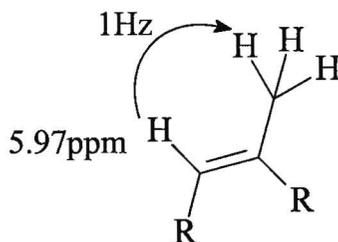
IV

El análisis del espectro de masas (**Espectros 23 a 28**), obtenido por Ionización química, donde se observa el Ion molecular en 480 m/z (481 M+1) y el pico base se encuentra en 450 m/z y presenta el patrón característico para la isotopía de dos átomos de cloro presentes en la molécula en M+2 (64%) y M+4 (30%). En complemento, el peso molecular fue determinado mediante la técnica FAB+ de alta resolución; Dicho experimento arrojó un valor de 450.1517 m/z para el Ion molecular correspondiente a un compuesto con fórmula molecular  $C_{28}H_{28}OCl_2$  basado en la distribución teórica de los iones generados; como se mencionó, dicho pico corresponde para el pico base debido a la pérdida de 30 unidades correspondientes a una molécula de etano, por ello, tomando en cuenta el pico en 480 m/z en el espectro de ionización química, el ion molecular corresponde para una fórmula molecular  $C_{30}H_{34}OCl_2$ . En los espectros de impacto electrónico se observa el pico base en 450 m/z además de un pico intenso en 452 m/z, sólo se observa un pico en 482 m/z en dicho espectros.

Asimismo, el espectro de infrarrojo (**Espectro 11**) muestra las señales correspondientes a las vibraciones de los enlaces C – H de alquenos por arriba de  $3000\text{cm}^{-1}$ , las señales en  $1380$  y  $1093\text{cm}^{-1}$  originadas por la vibración del enlace C – O así como la señal característica para un anillo aromático disustituido en las posiciones 1,4 en  $841\text{cm}^{-1}$ .

Así, las señales que se observan en el espectro de RMN –  $^1\text{H}$  (**Espectro 12**) son tres singuletes en 1.58, 1.59 y 2.0 ppm, la primera y la tercera integran para 3 protones cada

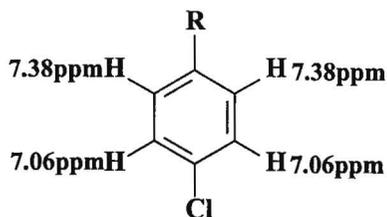
una, lo que indica la existencia de grupos metilo; la segunda señal integra para 4.5 protones por lo que pueden ser dos grupos metilos idénticos o solo uno; debido a su desplazamiento químico, se encuentran unidos a un grupo que ejercen un efecto de desprotección considerable como es una doble ligadura o un halógeno. Se observa un doblete en 5.98 ppm con una  $J = 1\text{Hz}$  y una integral correspondiente a un protón; por el desplazamiento químico se trata de un protón del tipo vinílico que, debido al valor de la constante de acoplamiento, tiene un acoplamiento de tipo alílico. En el espectro de RMN –  $^1\text{H}$  – COSY (**Espectro 15**) se observa la correlación de dicha señal con un singulete en 2.0 ppm correspondiente para un grupo metilo. Dicha correlación confirma que dicha señal en 2.0ppm no es un singulete, sino que debe ser un doblete y que la señal en 5.98 ppm debe ser un cuarteto, ambas con una  $J = 1\text{Hz}$ .



En el espectro de RMN –  $^{13}\text{C}$  (**Espectro 13**) así como en el experimento DEPT (**Espectro 14**), se observan 3 grupos metilo en 12, 14 y 31ppm, ésta última de mayor tamaño que las otras dos, lo que hace suponer que es una señal correspondiente a dos grupos metilo idénticos; estas señales correlacionan en el espectro HETCOR (**Espectro 16**) con las señales de 1.58, 2.0 y 1.59 respectivamente. También, se observa un grupo metino en 105.7 ppm correspondiente a un CH vinílico que correlaciona con la señal de 5.97ppm en el mismo experimento de correlación heteronuclear.

Las señales características de un sistema AA'BB' en 7.38 y 7.06 ppm, con una integral para 4 protones, de una sustitución 1,4 en un anillo aromático. Dichas señales muestran correlación entre sí en el espectro de RMN – <sup>1</sup>H – COSY.

Respecto al espectro de protón, el desplazamiento químico de las señales en la zona de protones aromáticos muestra que existe un grupo unido al anillo aromático que ejerce un ligero efecto de protección haciendo que el desplazamiento químico de dos protones se desplace a campo alto (7.06ppm); sin embargo, debido a que dicho efecto no es tan grande se puede pensar en un grupo como el átomo de cloro que protege las posiciones relativas *orto* y *para* por efecto resonante pero ejerce un efecto de desprotección por efecto inductivo. Asimismo, la señal correspondiente a los otros dos protones está ligeramente desplazada a campo bajo (7.38ppm) lo que hace pensar en un grupo electroattractor como una doble ligadura que ejerce un efecto de desprotección en las posiciones relativas *orto* y *para* del anillo aromático; debido al plano de simetría, se concluye la existencia de dos grupos idénticos.

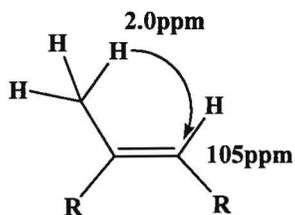


En el espectro de RMN – <sup>13</sup>C, así como en el experimento DEPT se observan señales correspondientes a los carbonos de los grupos metinos aromáticos en 129 y 130 ppm. Estas señales presentan una correlación con las señales de 7.06 y 7.36 ppm en el

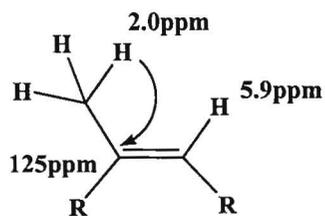
experimento HETCOR. También se observan las señales correspondientes a los átomos de carbono tetrasustituídos en 134 y 140 ppm.

Además se observan señales correspondientes a cuatro átomos de carbono tetrasustituídos en 33, 123, 125 y 127ppm. Las tres señales entre 124 y 128ppm están dentro de la zona de desplazamiento químico de los carbonos  $sp^2$  de una ligadura doble o para carbono de un anillo aromático.

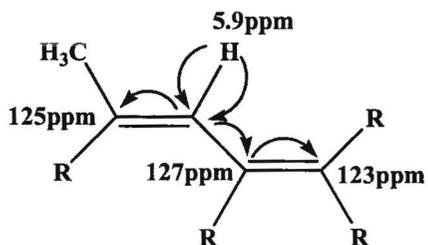
En el experimento de correlación a dos y tres enlaces de distancia (FLOCK) (**Espectros 17 a 22**) se puede observar que las señales correspondientes a los protones aromáticos tienen correlación con los carbonos del sistema bencénico. La señal del carbono en 105 ppm correspondiente a un CH de tipo vinílico muestra correlación con la señal en 2.0 ppm en el espectro de protón correspondiente a un grupo metilo unido a una ligadura doble:



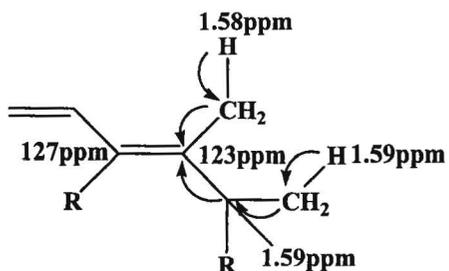
Dicha correlación es a tres enlaces por lo que la señal de 125 ppm muestra correlación con la misma señal de 2.0 ppm en el espectro de protón por lo que debe ser una correlación a dos enlaces de distancia, además de que presenta correlación con la señal de 5.9 ppm en el espectro de protón correspondiente al hidrógeno vinílico:



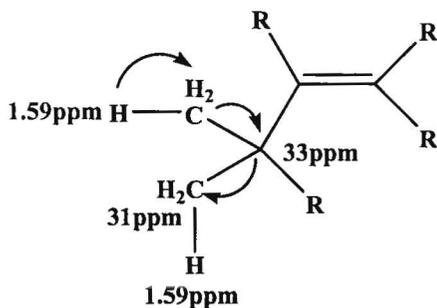
De esta manera, la señal en 5.9 ppm en el espectro de protón muestra correlaciones con las señales de 123, 125 y 127 ppm, todos ellos son carbonos tetrasustituídos y, por el desplazamiento químico, son de tipo vinílico o con una hibridación  $sp^2$



Las señal de 123 ppm en el espectro de carbono muestra correlación con las señales de 1.58 y 1.59 ppm asignadas para los hidrógenos de grupos metilo.



Las señales para dichos hidrógenos correspondientes a grupos metilo, muestran correlación con las señales de 33 y 31 ppm correspondientes para un carbono cuaternario y la señal de los carbonos de los grupos metilo respectivamente.



Uniendo los fragmentos encontrados con todos los experimentos realizados el único átomo por asignar es el átomo de oxígeno que se concluye, por el experimento de espectrometría de masas, que debe estar unido al carbono en 127 ppm lo que es un desplazamiento químico bastante bajo para este tipo de átomos bases de oxígeno. En las Tablas 2 y 3 se resumen las señales en los espectros, cabe señalar que los sistemas aromáticos presentan correlaciones a dos y tres enlaces entre ellos por lo que no se incluyen en la tabla.

**Tabla 2**  
Señales en RMN – <sup>1</sup>H para el compuesto IV

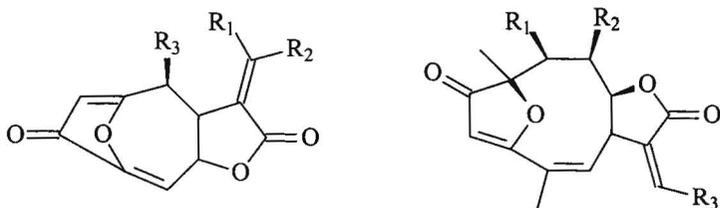
$\delta$ (ppm)	Integración	Multiplicidad	J (Hz)	COSY	HETCOR	FLOCK <sup>2</sup> J	FLOCK <sup>3</sup> J
1.58	3	s			12, 31ppm	123ppm	33, 127ppm
1.59	3	s			12, 31ppm	33ppm	31, 123ppm
2	3	s	5.98ppm		14ppm	125ppm	105ppm

5.98	1	d	1	2ppm	105ppm	125, 127ppm	123ppm
7.04	2	m		7.36ppm	130ppm	129, 130, 133, 138ppm	
7.36	2	m		7.04ppm	129ppm	129, 130, 133, 138ppm	

**Tabla 3**  
Señales en RMN – <sup>13</sup>C para el compuesto IV

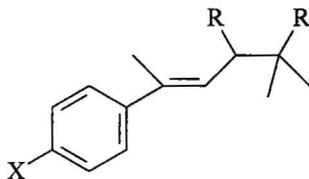
δ (ppm)	DEPT	HETCOR
12	CH3	1.58ppm, 1.59ppm
14	CH3	2ppm
31	CH3	1.58ppm, 1.59ppm
33		
105	CH	5.98ppm
123		
125		
127		
129	CH	7.36ppm
130	CH	7.04ppm
133		
138		

Haciendo una búsqueda en la literatura se pueden encontrar estructuras similares en compuestos de tipo sesquiterpénico principalmente en las especies de *Bajarona* y *Mikania* las cuales contienen ciclos insaturados que contienen un átomo de oxígeno y cuyo tamaño va de siete a trece átomos<sup>24</sup>.



En estos casos, los desplazamientos químicos para los carbonos vinílicos unidos a oxígeno presentan un valor por debajo del esperado (aproximadamente de 140 ppm) pero no se encuentran a un campo tan bajo como lo es 127 ppm en este caso<sup>25</sup>.

También se encontró que el siguiente tipo de fragmento:

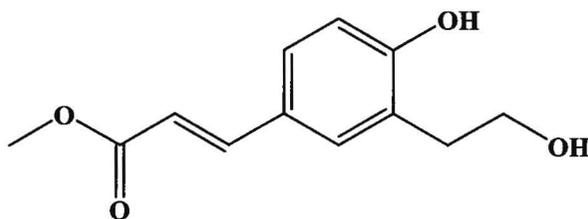


es bastante común en compuestos aislados de plantas del género *Salvia* y que son más comunes cuando X es un grupo -OH y cuando los grupos R se unen a compuestos de tipo flavonoide, derivados de los ácidos fenólicos y, en menor medida, a sesquiterpenos. No se pudo encontrar referencia donde el átomo X fuera un halógeno<sup>26</sup>.

## CONCLUSIONES

Del estudio fitoquímico de *Salvia longispicata* se obtienen las siguientes conclusiones:

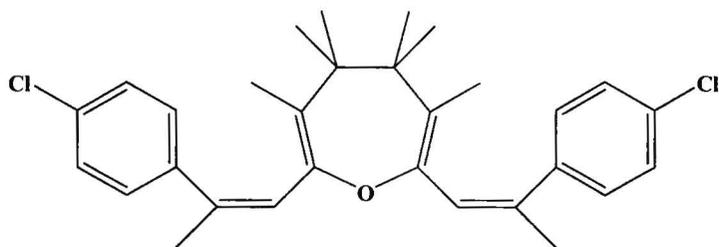
- Se aisló  $\beta$  - sitosterol que es un metabolito ampliamente distribuido en todas las plantas.
- Se aislaron los ácidos triterpénicos Ursólico y Oleanólico que son ampliamente distribuidos dentro de los ejemplares del género *Salvia*.
- Se aisló la Naringenina que es un flavonoide, en específico una flavanona, ampliamente distribuida dentro de los ejemplares del género *Salvia*.
- Se aisló un compuesto (**III**), para el cual se propone la siguiente estructura:



**III**

Dicha estructura se propone en base en a las evidencias experimentales y a que este tipo de estructuras han sido aisladas previamente como intermediarios en la ruta del shikimato. Este tipo de intermediarios se han propuesto para la biogénesis de flavonoides y cumarinas.<sup>2, 27, 28</sup>

➤ Se aisló un compuesto (IV), para el cual se propone la siguiente estructura:



Pero la cual no es concluyente con base en los experimentos realizados. Cabe señalar que dicho compuesto era sensible y que por acción del aire, humedad y otros factores o combinación de los mismos se descompuso, por lo que será necesario trabajar de nuevo la planta para obtener más producto debido a que de los extractos trabajados no se pudo conseguir.

# **BIBLIOGRAFIA**

## BIBLIOGRAFIA

1. Gros, Eduardo G; Pomilio, Alicia B.; et. Al. *Introducción al estudio de los productos naturales* OEA, Serie Química, 1985.
2. Mann, J; *Secondary Metabolism*; second edition; Clarendon Press; Oxford 1987
3. Rodríguez-Hahn, L. ,Cárdenas, J.; *Current topics in Phytochemistry*, v2, 91-102 (1999).
4. *Handbook of terpenoids. Diterpenoids*; Sukh Dev, Renuka Misra, CRC Press Inc., USA 1986.
5. Rodriguez-Hahn, L., Esquivel, B., Cárdenas, J., Ramamoorthy, T.P. 1992. *The distribution of diterpenoids in Salvia. In: Advances in Labiatae Science* (R.M. Harley, T Reynolds, eds.), Royal Botanic Gardens, pp 335-347.
6. Rodriguez-Hahn, L. , Esquivel, B., Cárdenas, J.; *Progress in the chemistry of organic natural products*, **63**, 107-196 (1994)
7. Esquivel, B., Cárdenas, J., Ramamoorthy, T.P., Rodríguez-Hahn, L., *Phytochemistry*, **25**, 2381-2384. (1986).
8. Esquivel B., Cárdenas, J., Toscano, A., Soriano-García, M., Rodríguez-Hahn, L., *Tetrahedron*, **41**, 3213-3217, (1985).
9. Rodríguez-Hahn, L., Esquivel, B., Sánchez, A. A., Cárdenas, J., Tovar, O. G., Soriano-García, M., Toscano, A., *J. Org. Chem.*, **53**, 3933-3936, (1988).
10. Rodríguez-Hahn, L. , Esquivel, B., Cárdenas, J.; *Rev. Latinoamer. Quím.*, **20-3**, 105-110 (1989).
11. Cárdenas, J., Esquivel, B., Toscano, R. A., Rodríguez-Hahn, L., *Heterocycles*, **27**, 1809-1812, (1988).

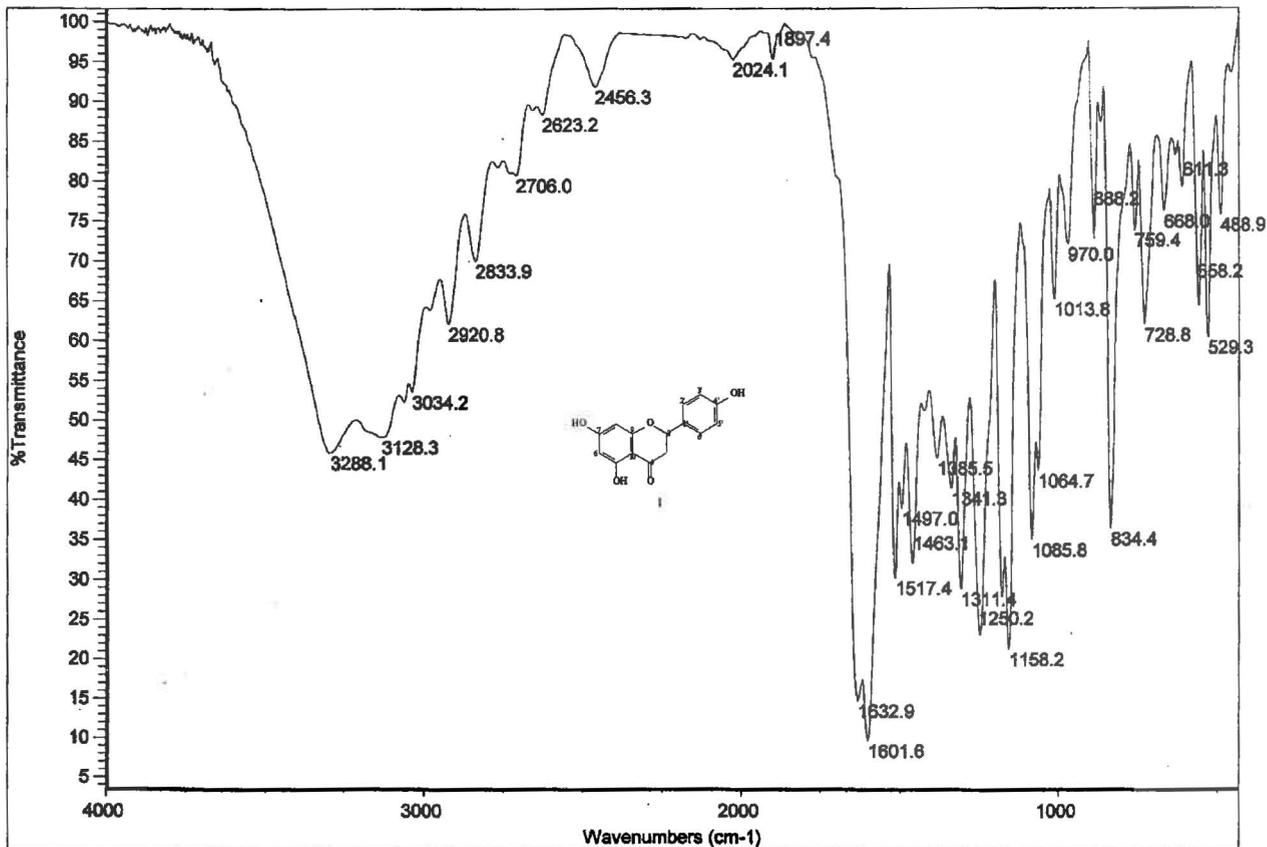
12. Cárdenas, J., Pavón T., Esquivel, B., Toscano, A., Rodríguez-Hahn, L., *Tetrahedron letters*, **33**, 581-584, (1992)
13. Rodríguez-Hahn, L., O'Reilly, R., Esquivel, B., Maldonado, E., Ortega, A., Cárdenas, J., Toscano, R. A., *J. Org. Chem.*, **55**, 3522-3525, (1990).
14. Fernández, M.C., Esquivel, B., Cárdenas, J., Sánchez, A. A., Toscano, R.A., Rodríguez-Hahn, L., *Tetrahedron*, **47**, 7199-7208. (1991).
15. Esquivel, B., Cárdenas, J., Rodríguez-Hahn, L., Ramamoorthy, T.P., *Journal of natural products*, **50**, 738-740, (1987).
16. Esquivel, B., Martínez, N.S., Cárdenas, J., Ramamoorthy, T.P., Rodríguez-Hahn, L., *Planta medica*, **55**, 62-63, (1989).
17. Bruno, M., Savona, G., Fernández-Gadea, F., Rodríguez, B., *Phytochemistry*, **25**, 475-477, (1986).
18. Galicia, M.A., Esquivel, B., Sánchez, A.A., Cárdenas, J., Ramamoorthy, T.A., Rodríguez-Hahn, L., *Phytochemistry* **27**, 217-219, (1988).
19. Domínguez, X. A., González, F., Aragón, R., Gutierrez, M., Marroquin, J.S., Watson, W., *Planta Medica*, **30**, 237-241, (1976).
20. Epling, C. *A Revision of Salvia subgenus Calosphace*. Repert. Spec. Nov. Regni Veg. Beih. pp 15,16. (1939).
21. *Phytochemistry of Medicinal Plants*; Chapter 12, *Neo-clerodane diterpenoids from american salvia species*; edited by John T. Arnason; Plenum Press; New York; 1995.
22. Rodríguez-Hahn, L., Esquivel, B., Cárdenas, J., Ramamoorthy, T.P. 1992. The distribution of diterpenoids in *Salvia*. In: *Advances in Labiatae Science* (R.M. Harley, T Reynolds, eds.), Royal Botanic Gardens, pp 335-347.

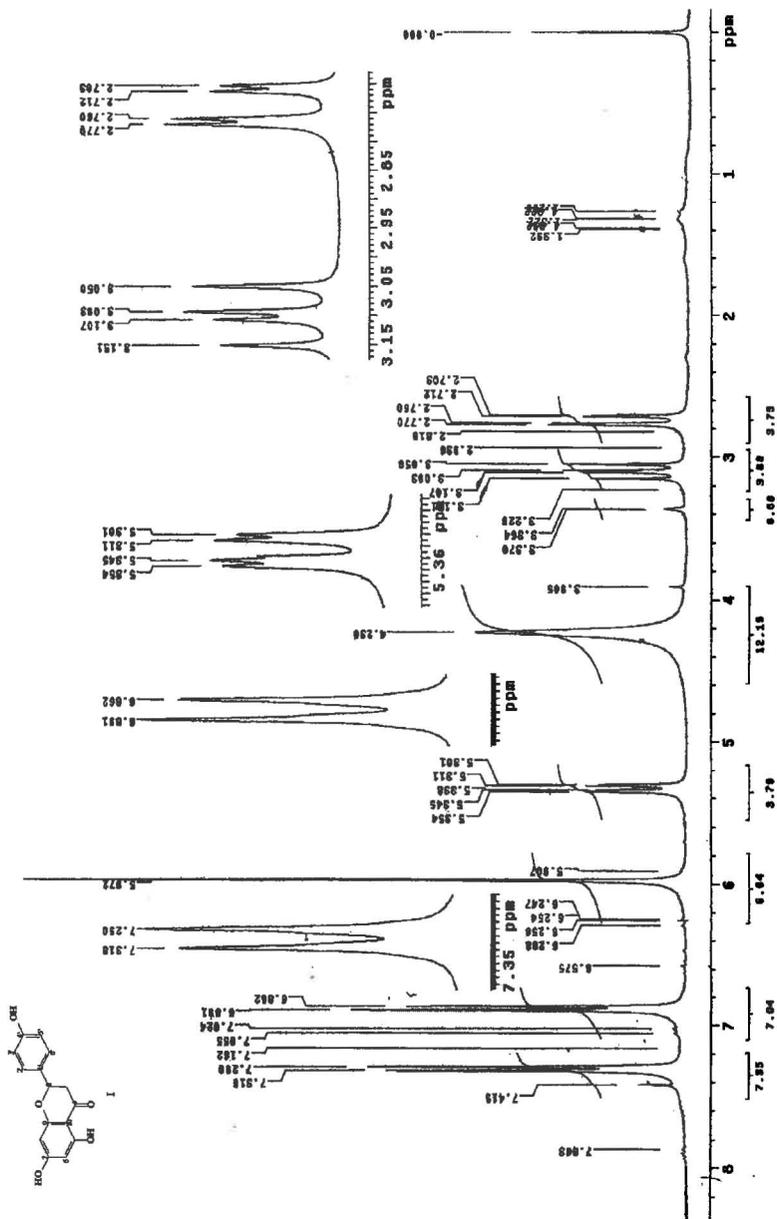
23. Blanca Eda Domínguez Mendoza, *Tesis de Maestría en Ciencias, Química Orgánica*, UAEM 2000.
24. Fraga, B.M. *Natural. Products. Reports.* 73, (1998)
25. Morgenstern, R.M, King, M., Jakupovic, J. *Phytochemistry*, **42**, 1543, (1996)
26. Lu, Y. & Yeap Foo, L. *Phytochemistry*, **59**, 117, (2002).
27. Herrmann, K.M & Weaver, L.M. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**, 473, (1999)
28. Wu, Tian-Shung, Hsu, Meei-Yu, Kuo, Ping-Chung, Sreenivasulu, B, Demu, A, Su, Chung-Ren, Li, Chia-Ying, & Chang, Hsien-Chang C. *J. Nat. Prod.* **66**, 1207, (2003).

# **ESPECTROS**

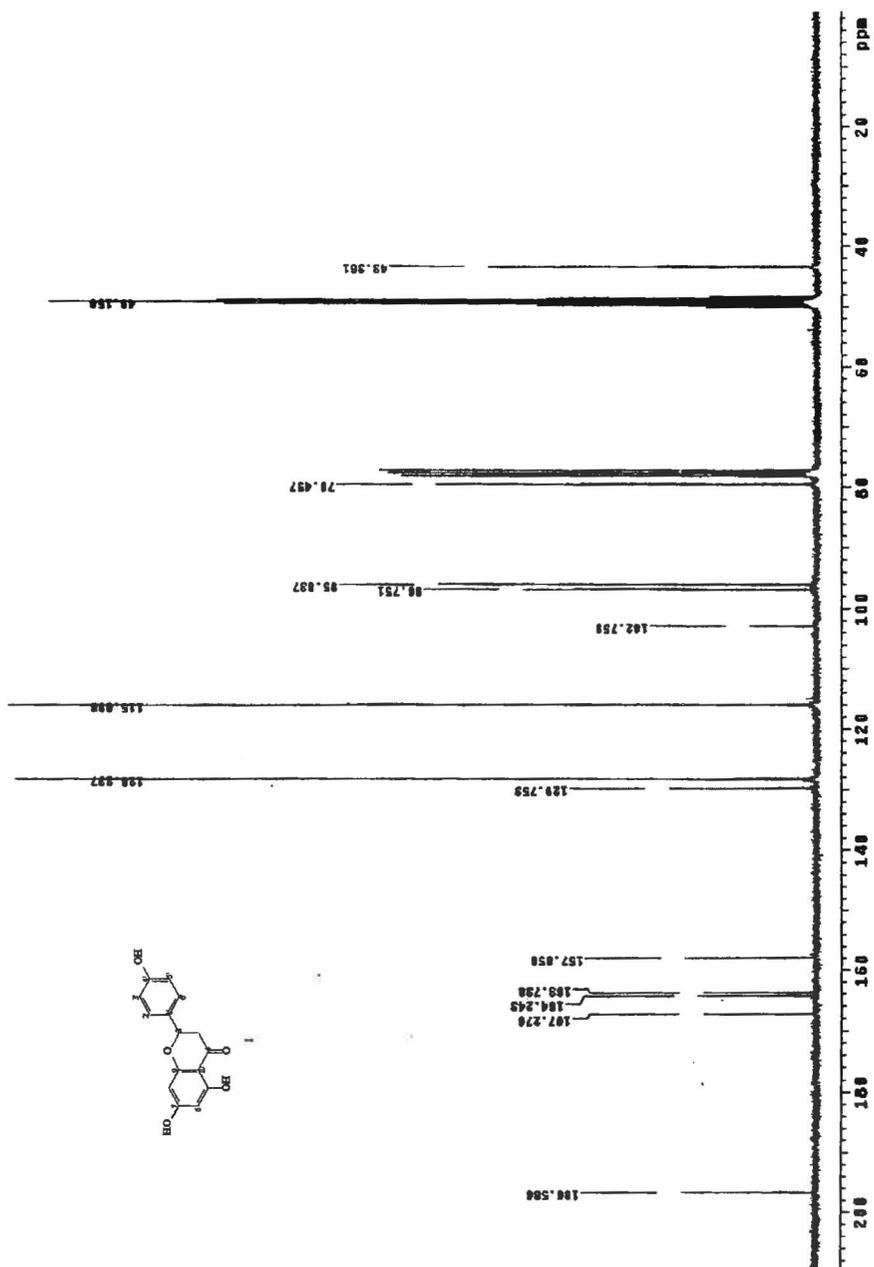


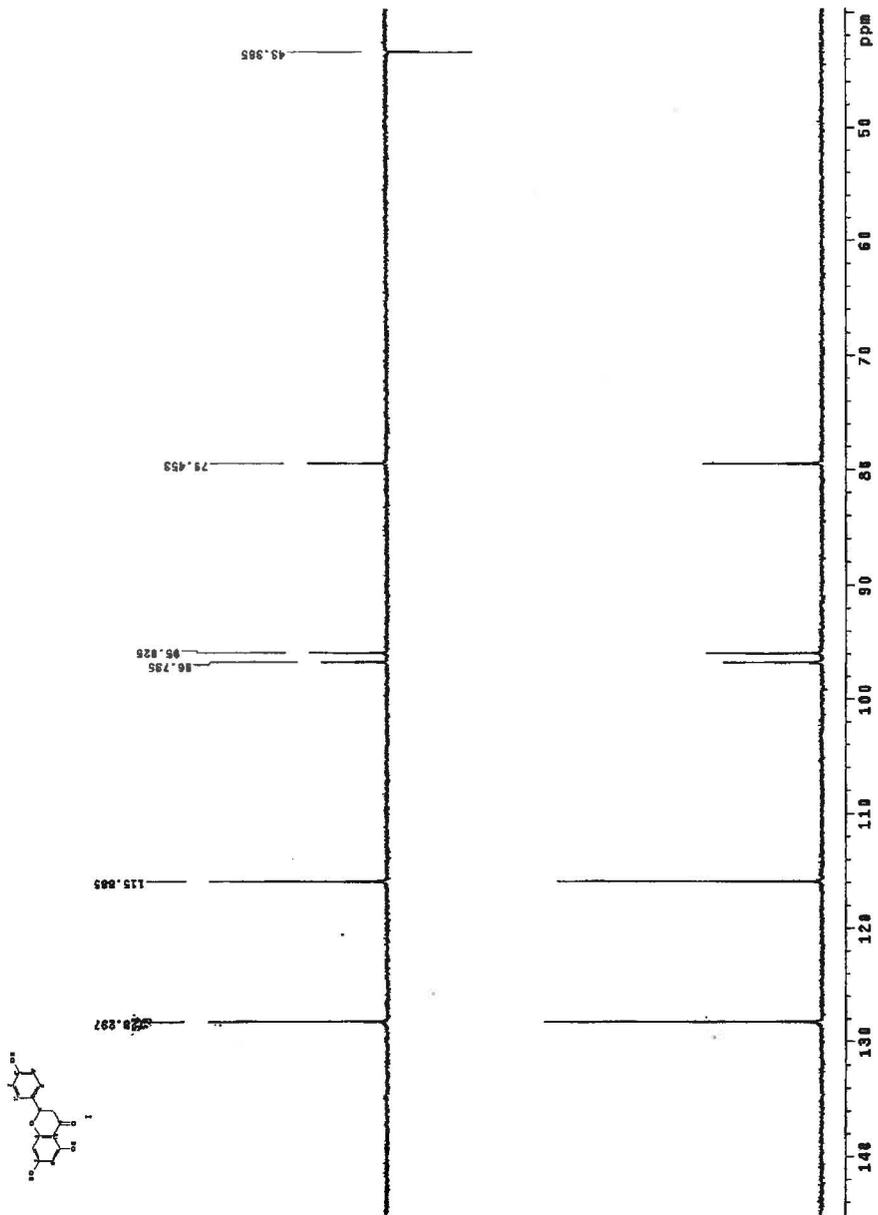
Espectro 1



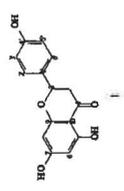
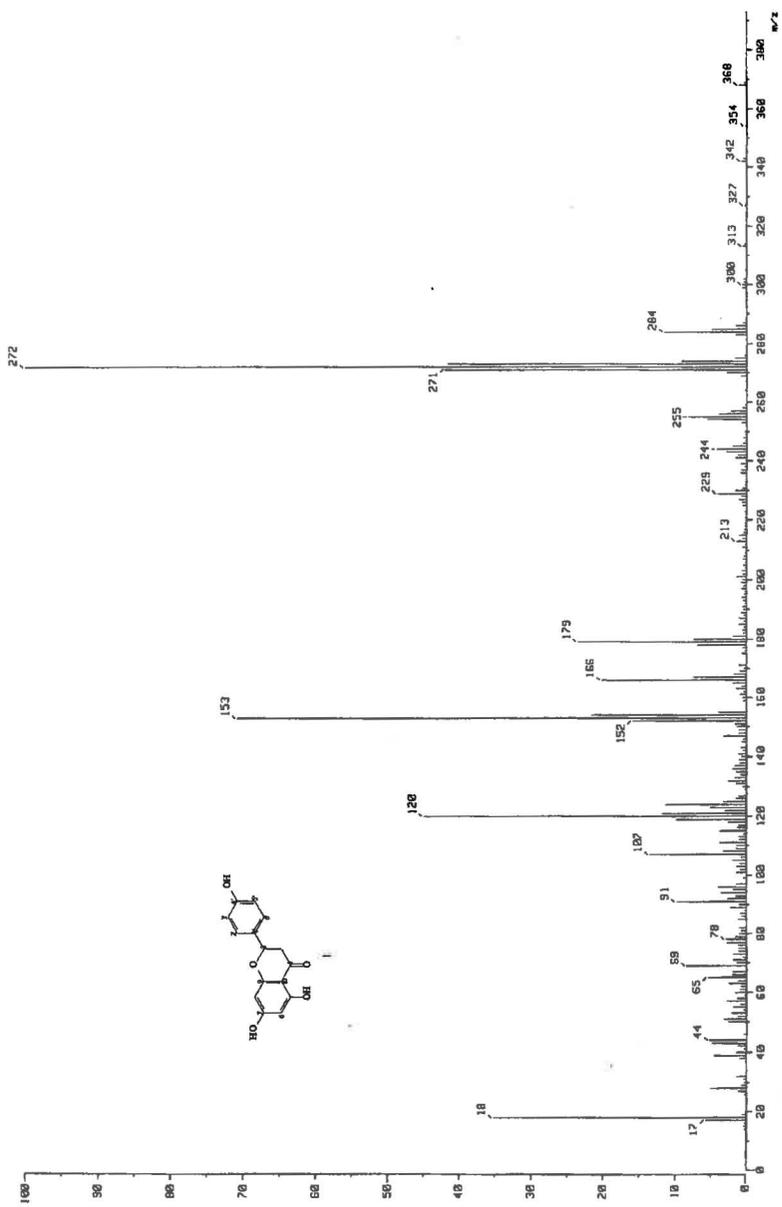


Espectro 2





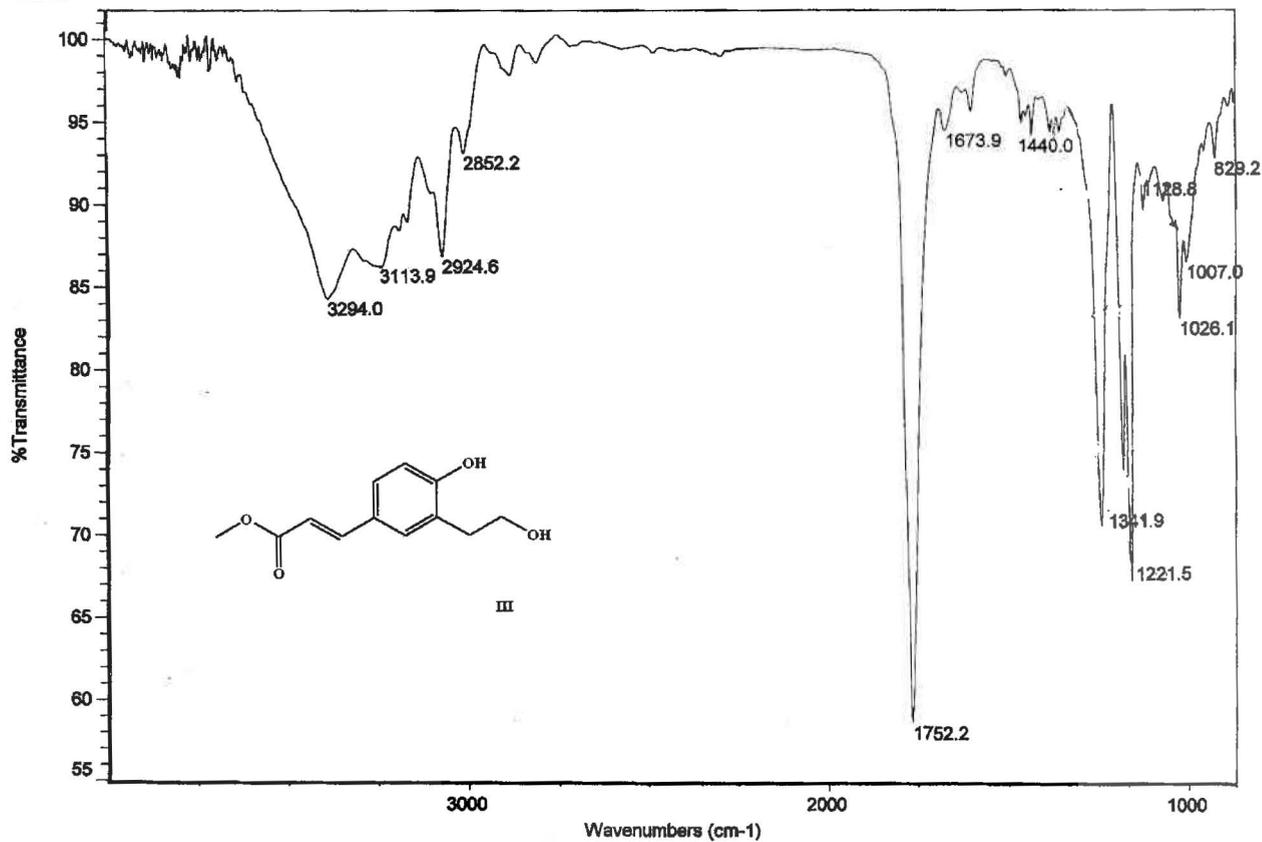
**Espectro 4**

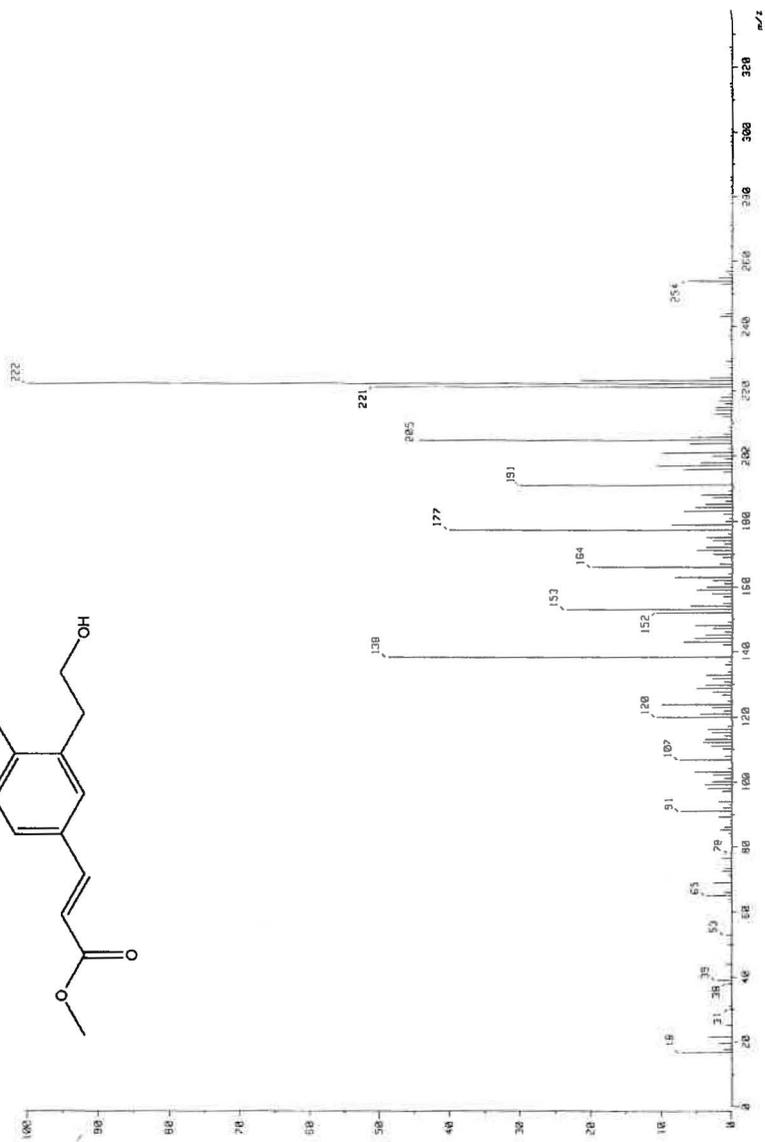
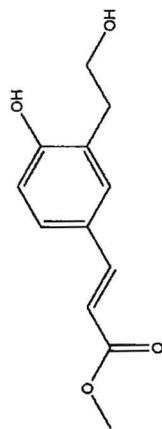


**Espectro 5**

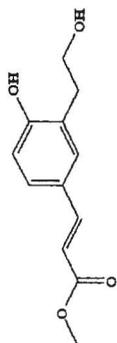


Espectro 6

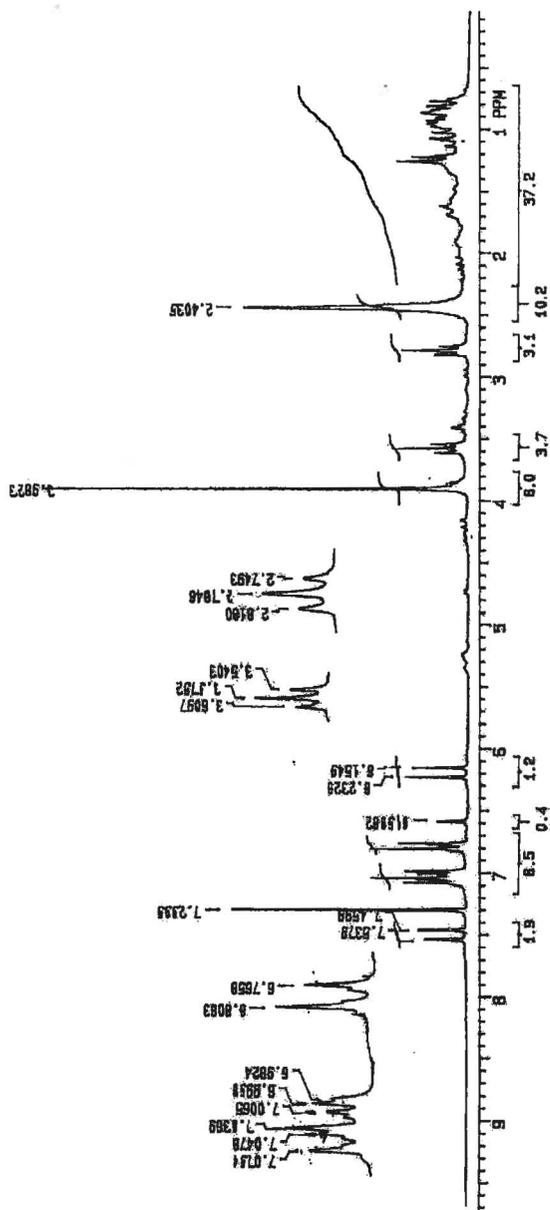




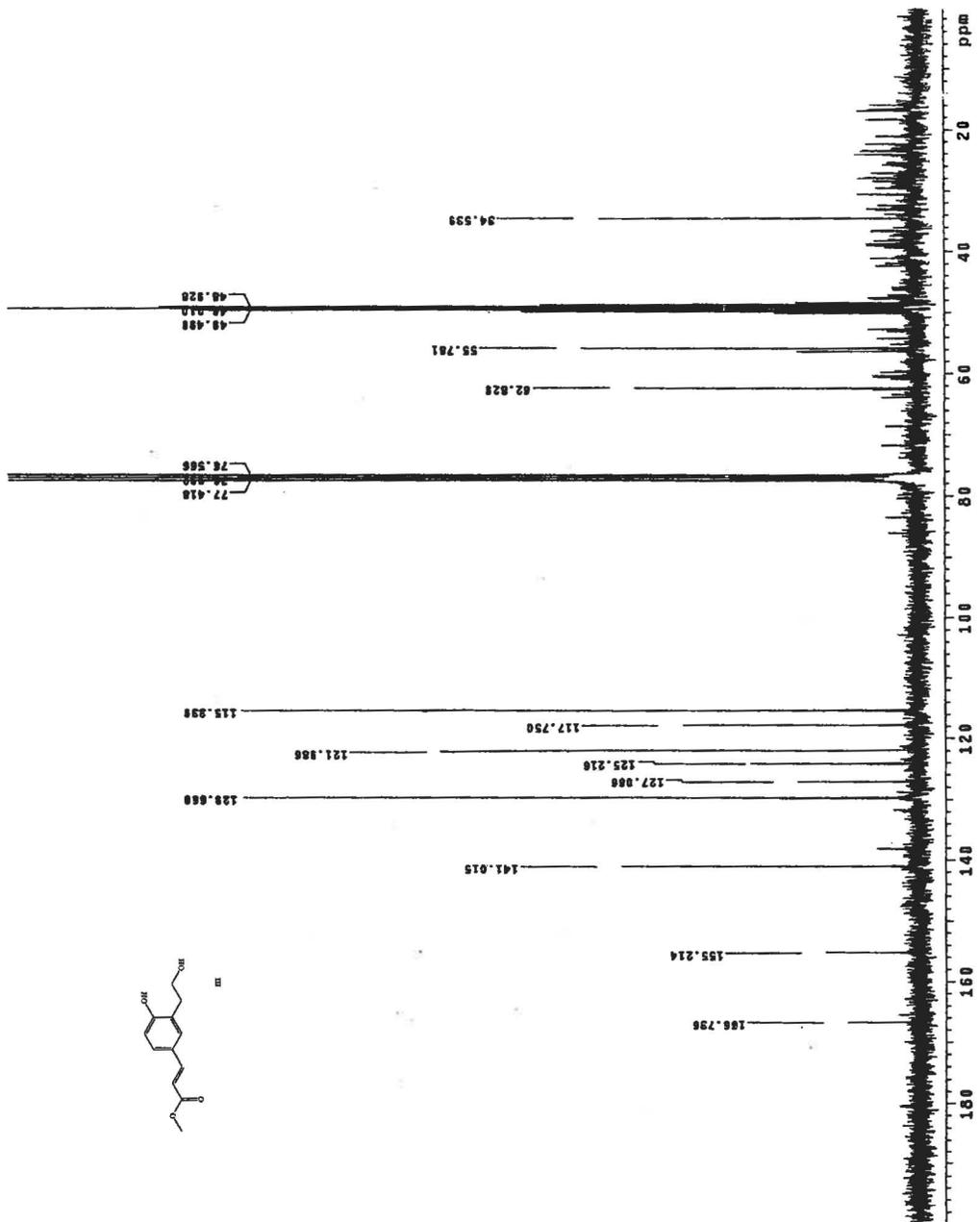
**Espectro 7**



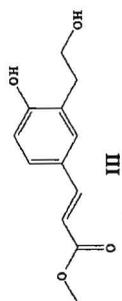
III



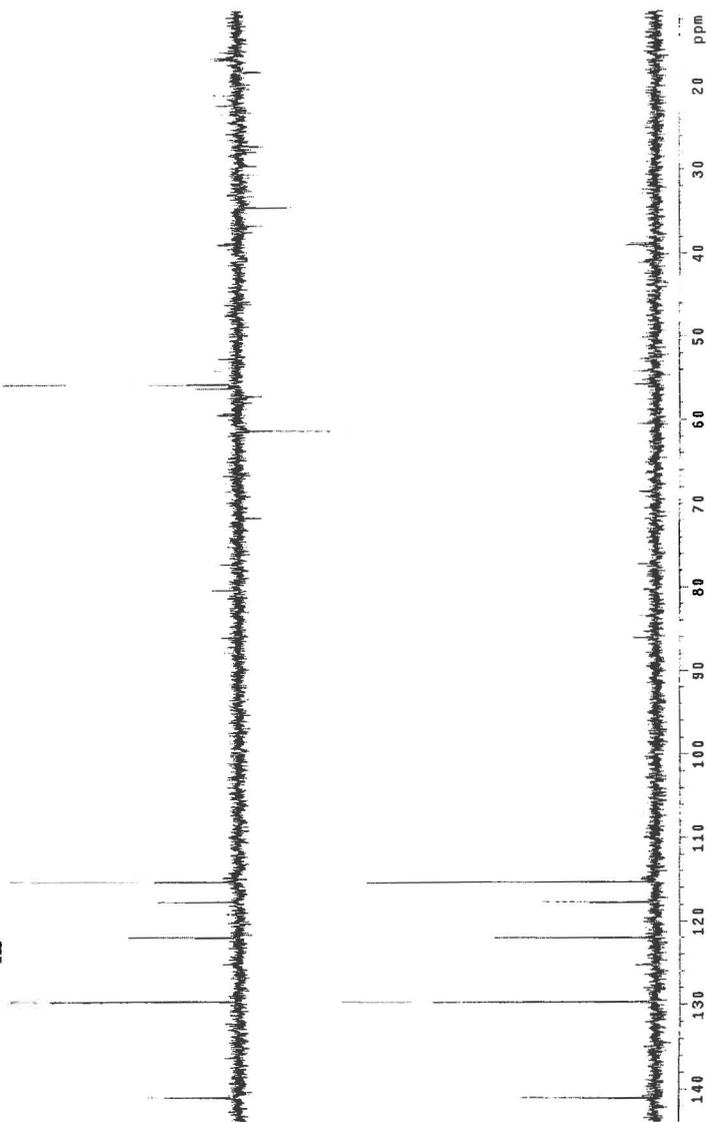
Espectro 8



Espectro 9



55.775



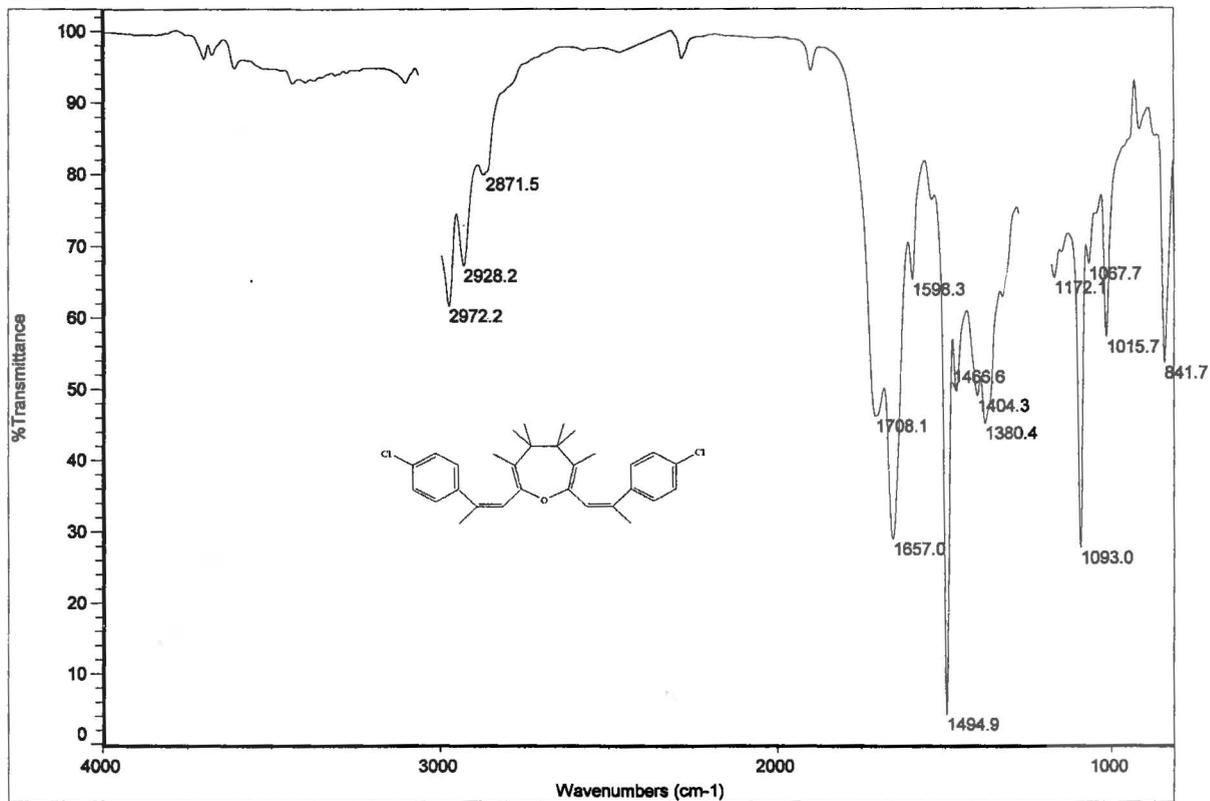
**Espectro 10**

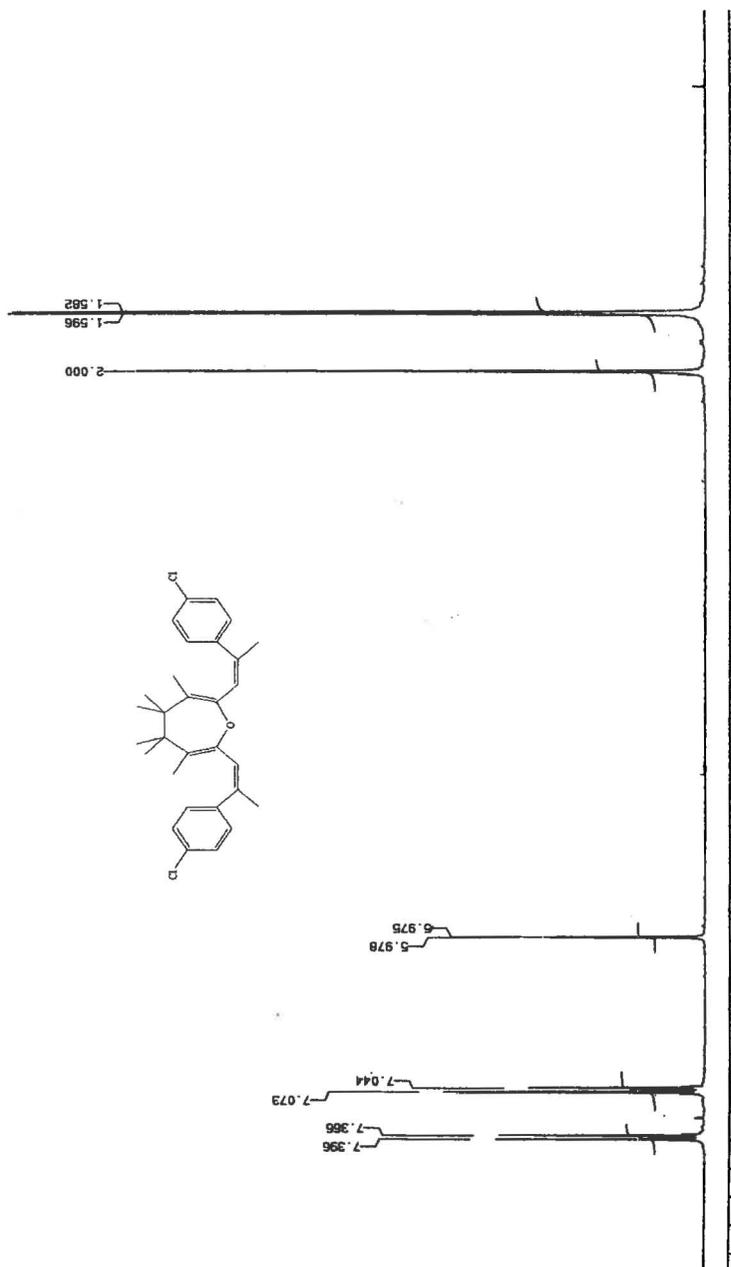
## Espectro 11



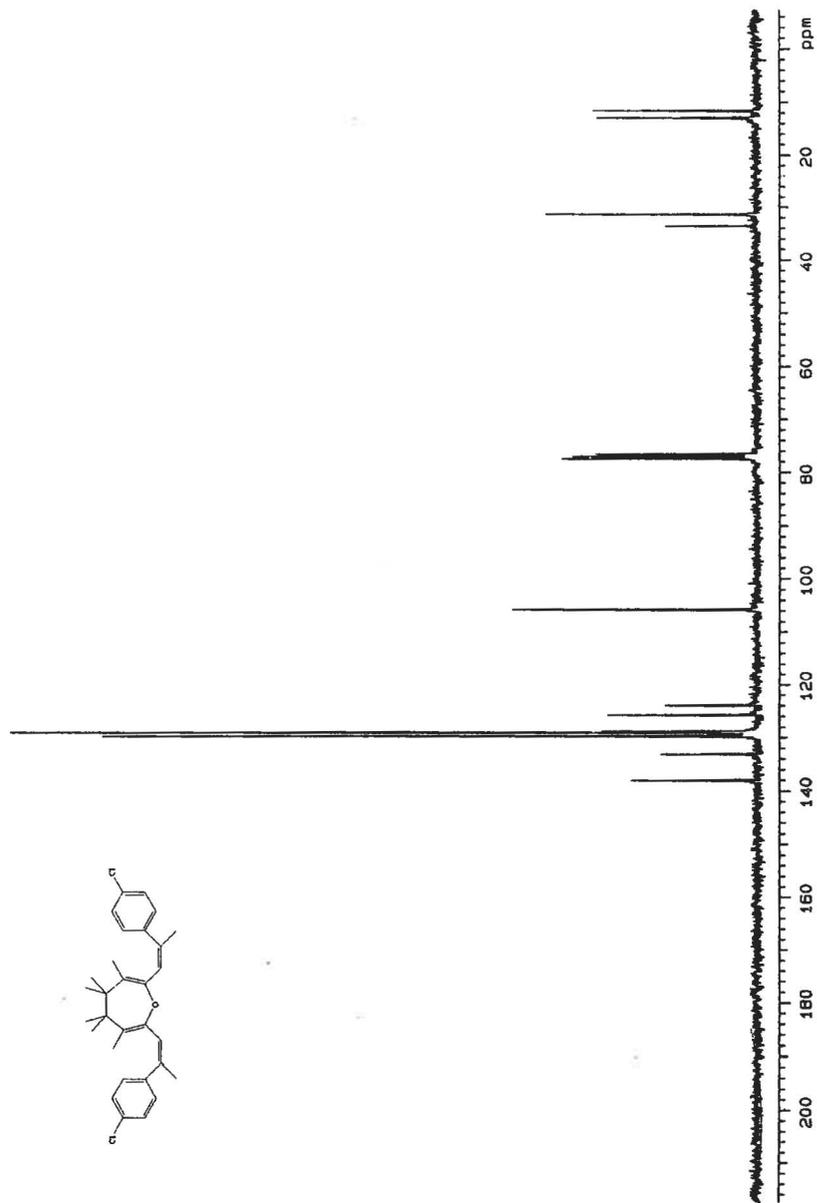
Instituto de Química, UNAM

Laboratorio de Infrarrojo

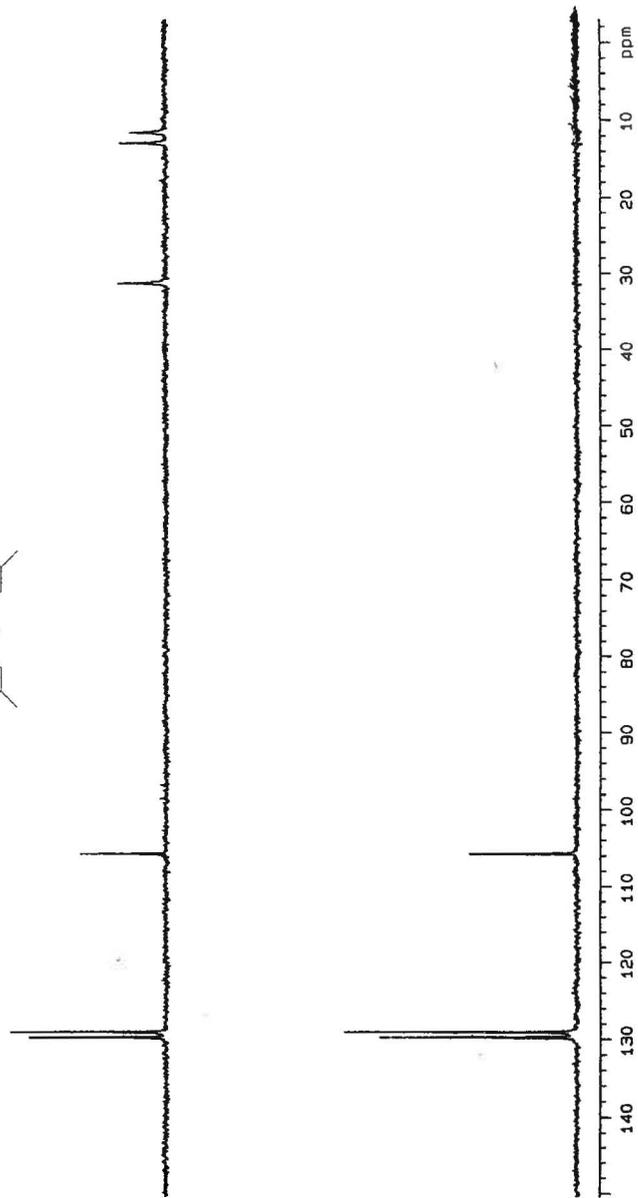
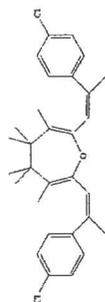




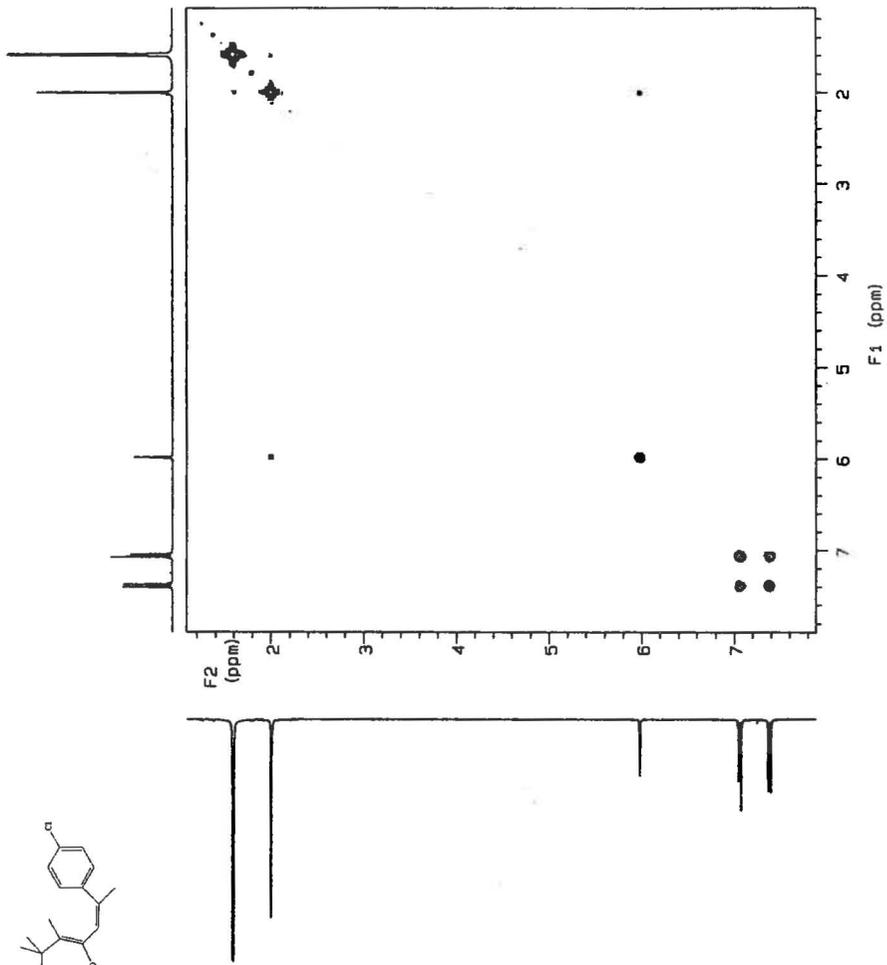
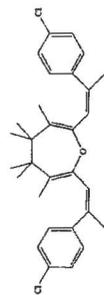
**Espectro 12**



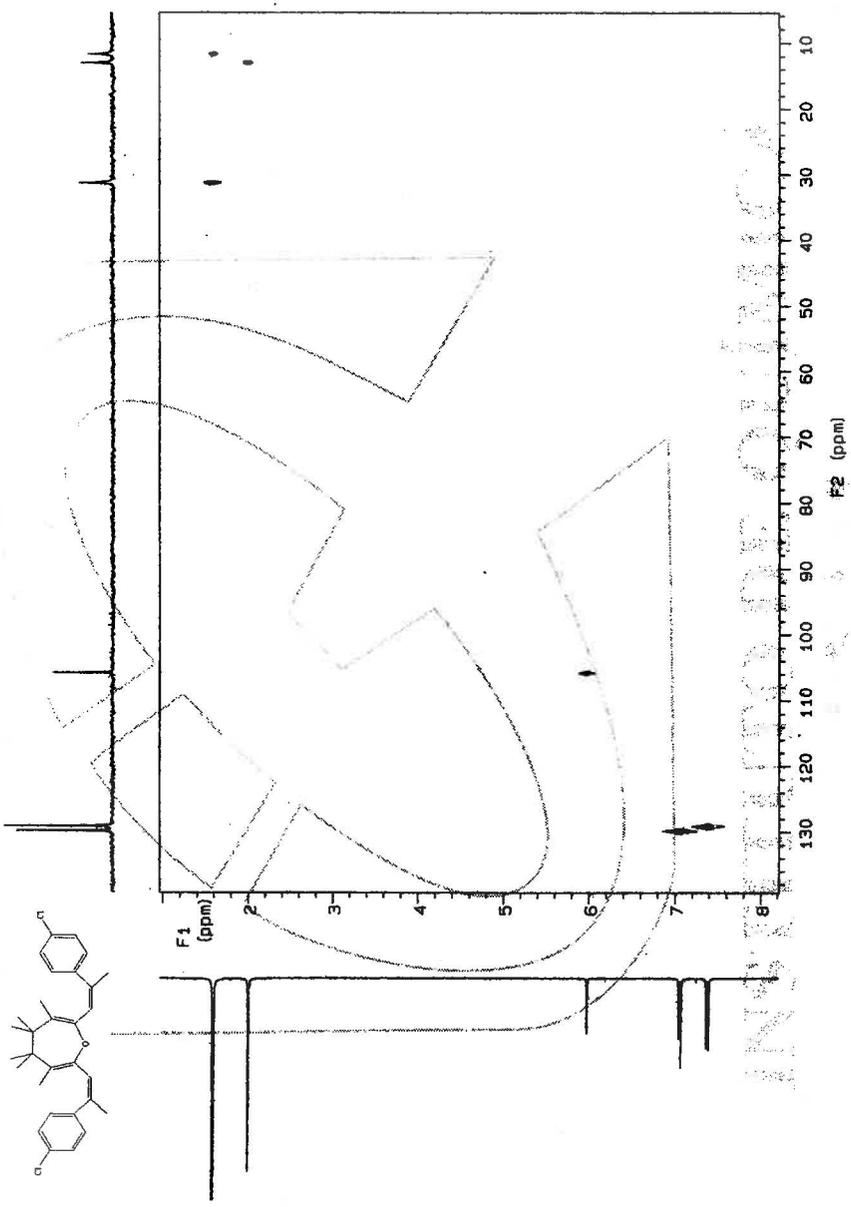
**Espectro 13**



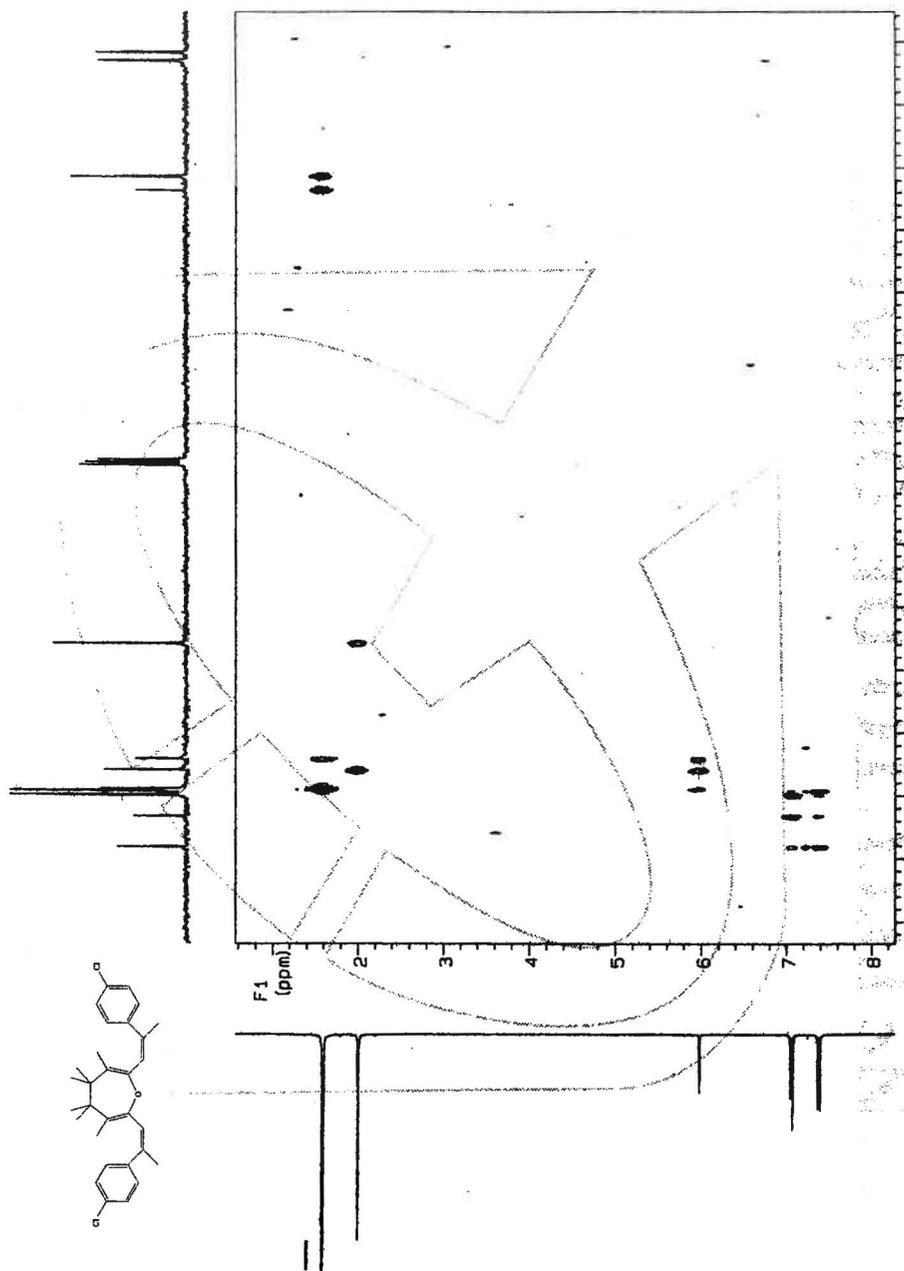
Espectro 14



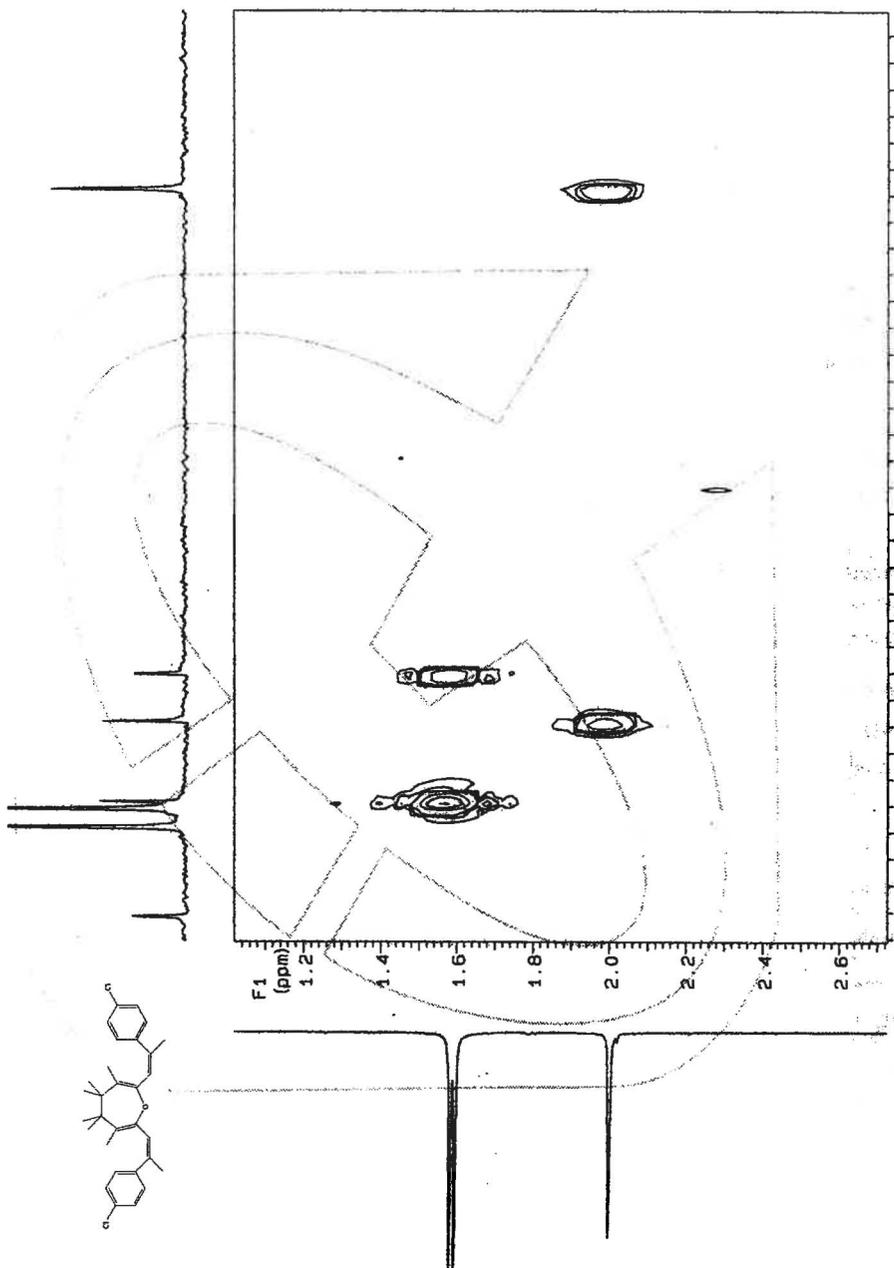
**Espectro 15**



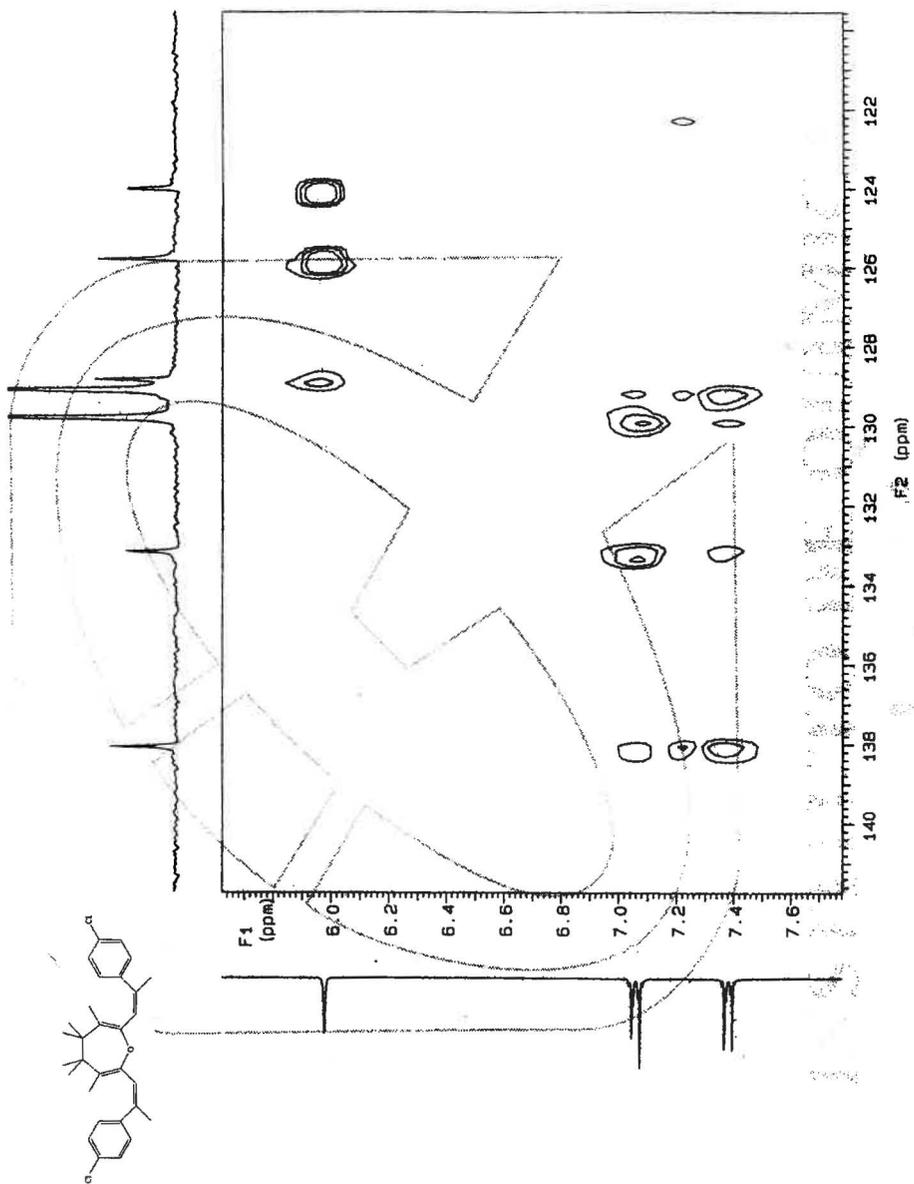
Espectro 16



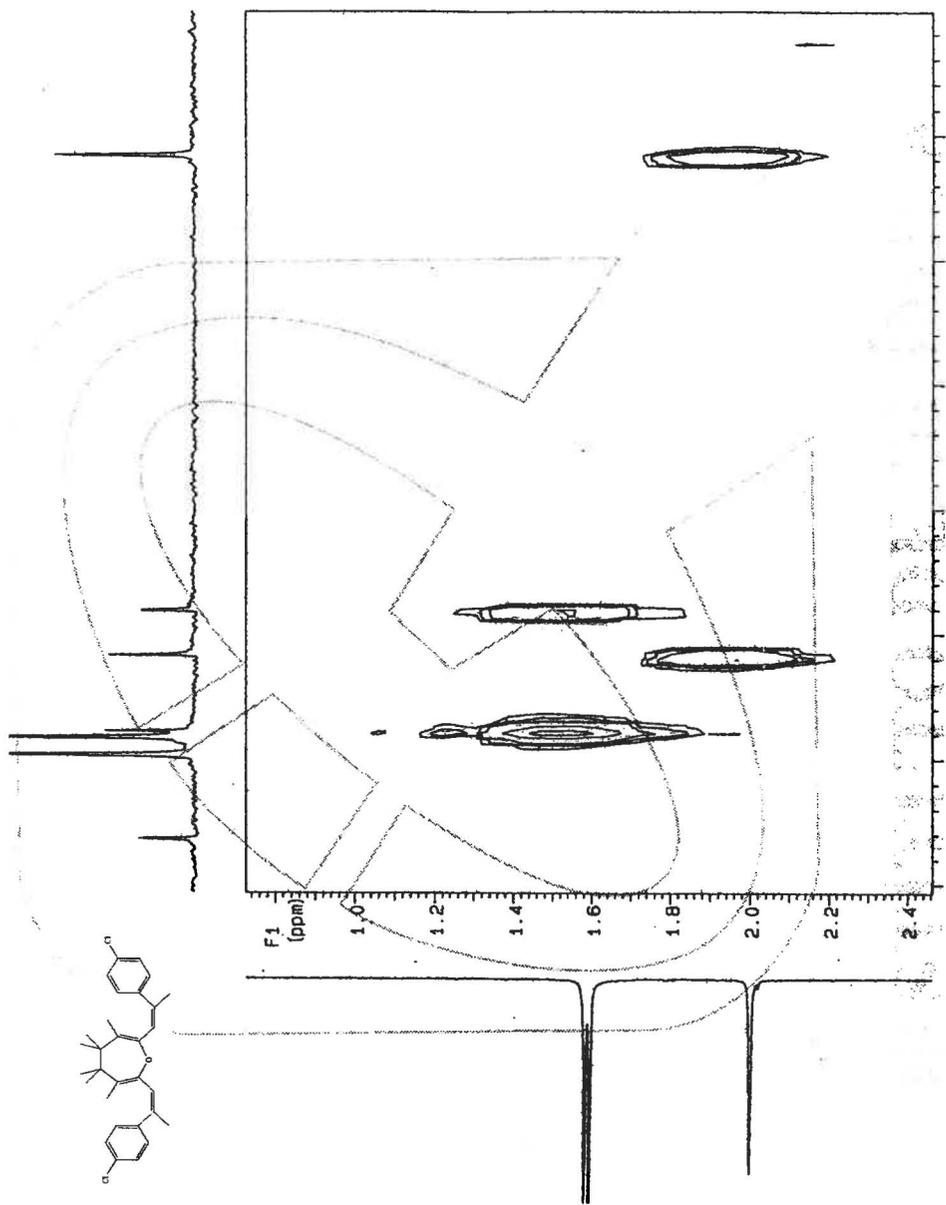
Espectro 17



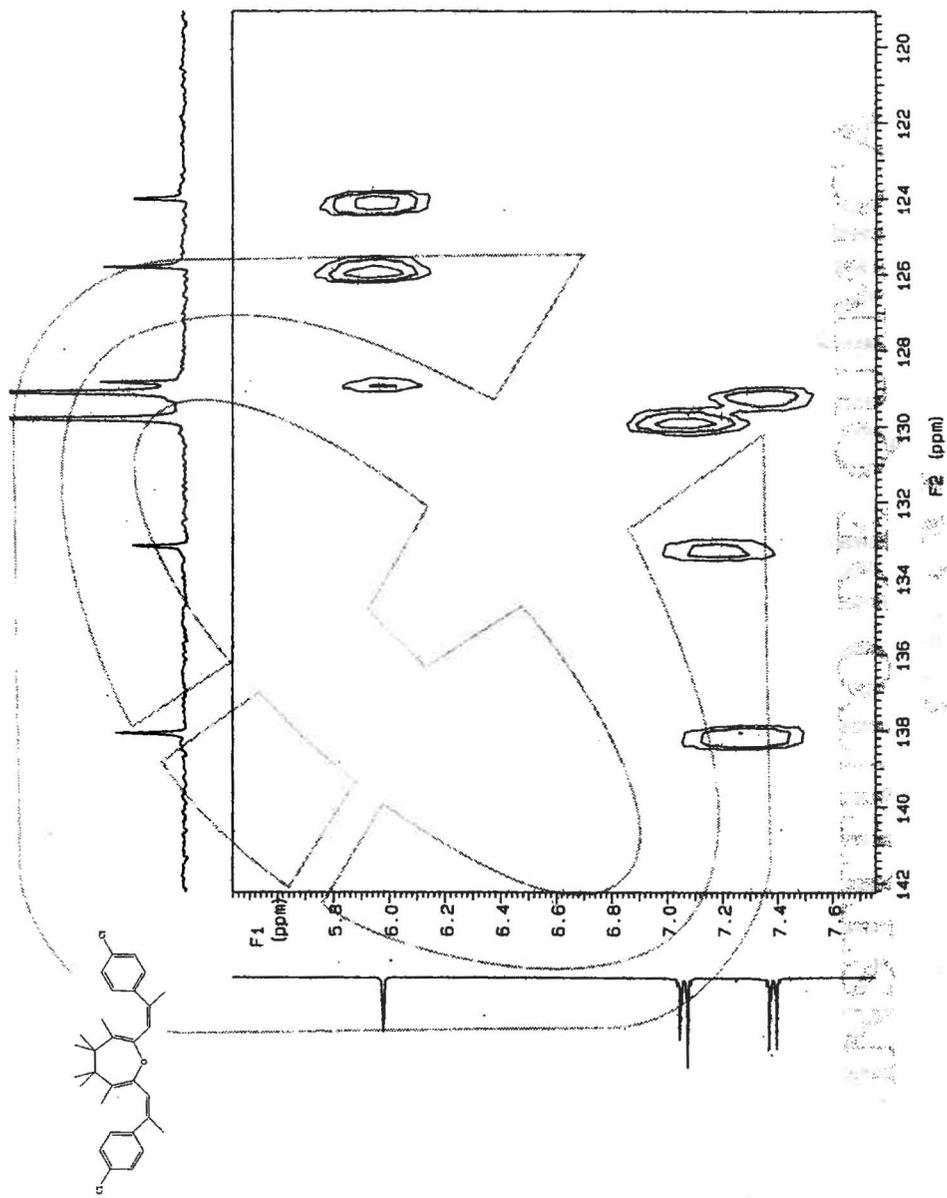
**Espectro 18**



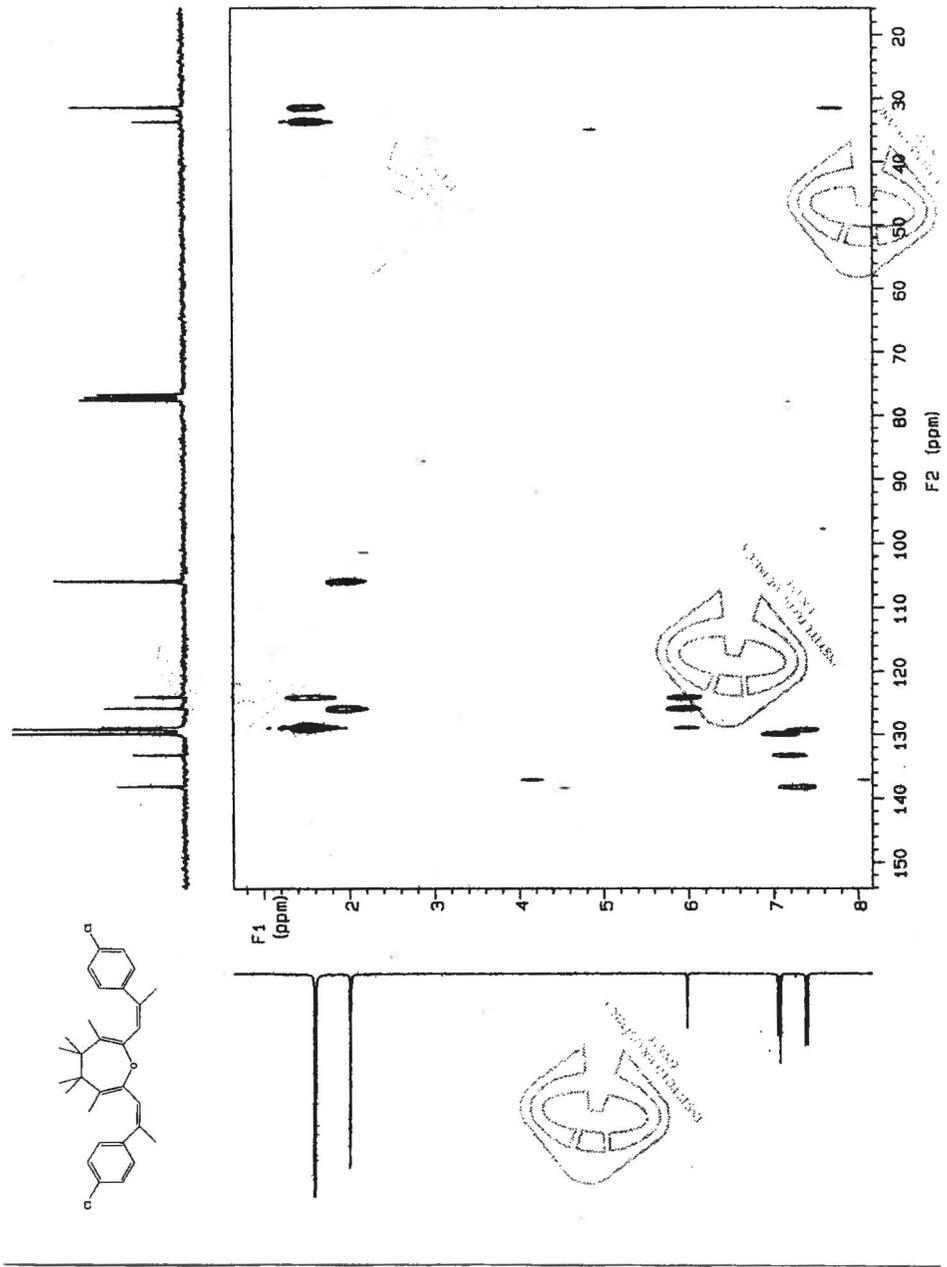
**Espectro 19**



**Espectro 20**

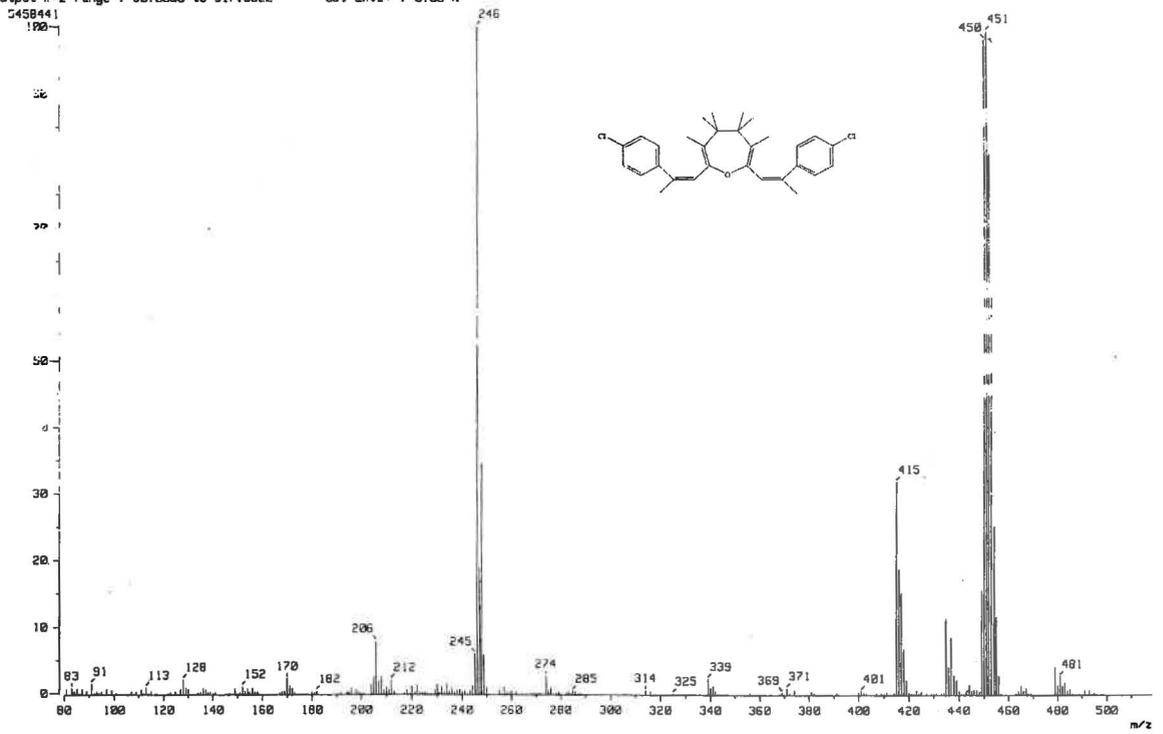


Espectro 21



**Espectro 22**

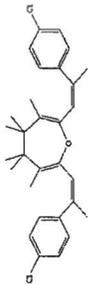
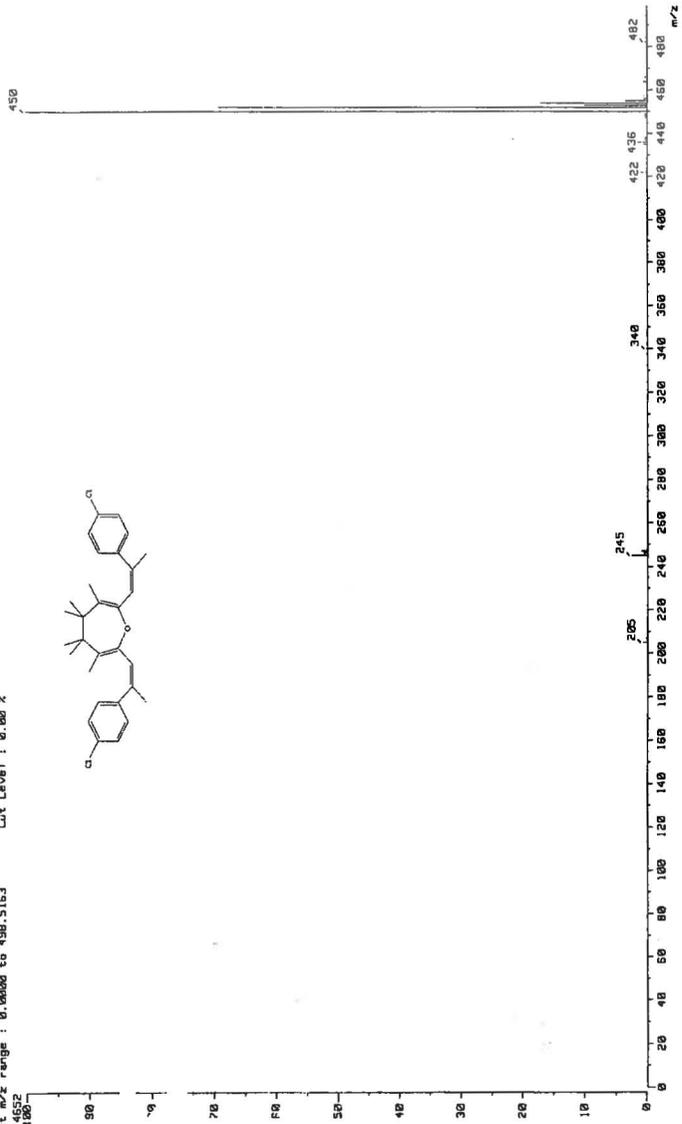
[ Mass Spectrum ]  
Data : Dr-Frontana-Bernardo-078 Date : 21-Jan-10 06:07  
Sample: SLR8  
Note : -  
Inlet : Direct Ion Mode : CI+  
Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]  
RT : 1.36 min Scan# : (50, 83) Temp : 173.9 deg.C  
SP : m/z 246.0000 Int. : 519.06  
Output m/z range : 00.0000 to 517.9822 Cut Level : 0.00 %  
5458441



Espetro 23

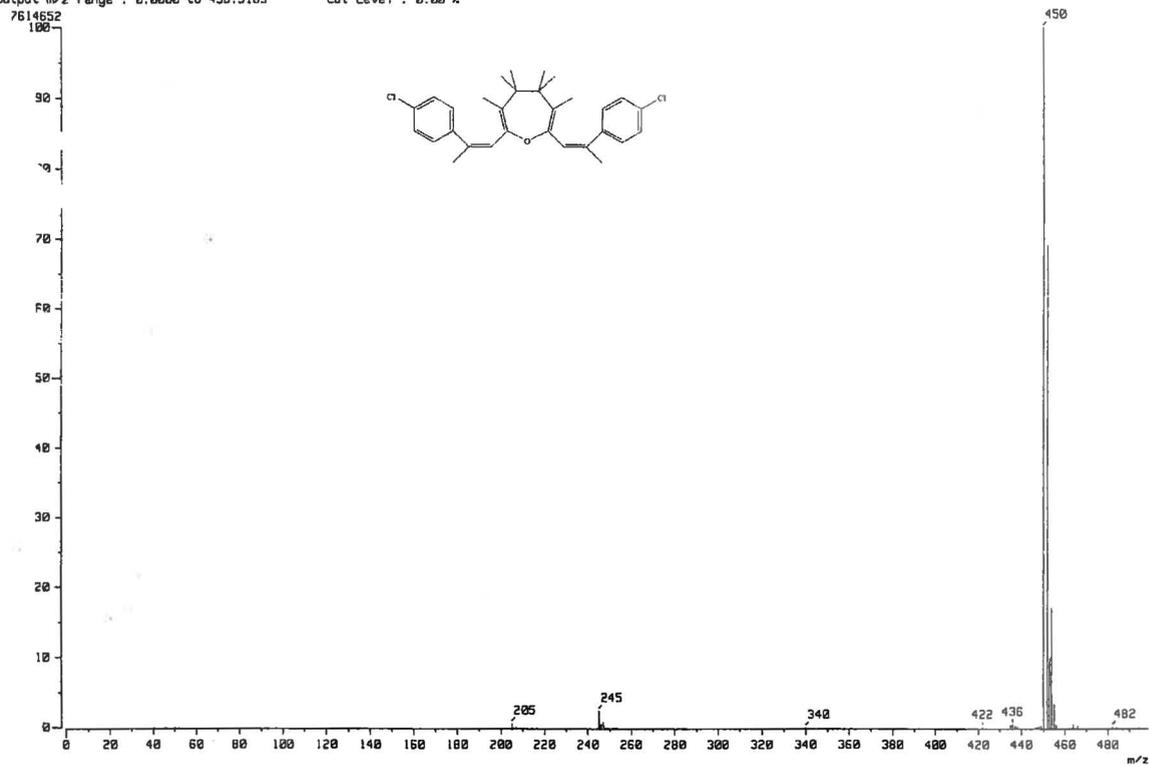
[ Mass Spectrum ]  
Data : D:\fontana-Bernardo-079 Date : 21-Jan-1998 06:15  
Sample : SURB  
Method : SCAN

Inlet : Direct Ion Mode : EI+  
Spectrum Type : Normal Ion CMF-Linear]  
RT : 1.87 min Scan# : (54,72)  
BP : m/z 459.0000 Int. : 726.19  
Temperature : 173.8 deg.C  
Oxidation range : 0.0000 to 459.5163  
Cut Level : 0.00 X



## Espectro 24

[ Mass Spectrum ]  
Date : Dr-Frontana-Bernardo-079 Date : 21-Jan-100 06:15  
Sample: SLR8  
Note : -  
Inlet : Direct Ion Mode : EI+  
Spectrum Type : Normal Ion [HF-Linear]  
RT : 1.87 min Scan# : (54,72) Temp : 173.8 deg.C  
BP : m/z 450.0000 Int. : 726.19  
Output m/z range : 0.0000 to 499.5163 Cut Level : 0.00 %



Espectro 25

[ Theoretical Ion Distribution ]

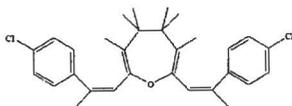
Page: 1

Molecular Formula : C<sub>28</sub> H<sub>28</sub> O Cl<sub>2</sub>

(m/z 450.1517, MW 451.4357, U.S. 14.0)

Base Peak : 450.1517, Averaged MW : 451.4371(a), 451.4411(w)

m/z	INT.	
450.1517	100.0000	*****
451.1551	31.6007	*****
452.1495	68.9770	*****
453.1524	20.7465	*****
454.1482	13.4800	*****
455.1501	3.5770	**
456.1530	0.5411	
457.1560	0.0566	
458.1590	0.0045	
459.1621	0.0003	



**Espectro 26**

[ Elemental Composition ]

Data : Dr-Bernardo-Fontana005

Date : 03-Apr-98 04:44

Page: 1

Sample: -SLR-8

Note : -

Inlet : Direct

Ion Mode : FAB+

RT : 0.96 min

Scan#: (2,8)

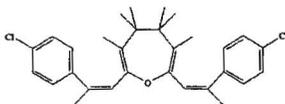
Elements : C 50/0 (12C 50/0, 13C 2/0), H 80/0, O 5/0

Mass Tolerance : 10ppm, 10mmu if m/z < 1000, 20mmu if m/z > 2000

Unsaturation (U.S.) : 0.0 - 25.0

Observed m/z	Int%					
436.1408	17.6					
Estimated m/z	Error [ppm]	U.S.	12C	13C	H	O
436.1374	+7.9	24.0	30	2	18	2
436.1419	-2.3	23.5	31	1	19	2
436.1463	-12.6	23.0	32	-	20	2
436.1311	+22.4	19.0	28	-	20	5

Observed m/z	Int%					
451.1642	48.2					
Estimated m/z	Error [ppm]	U.S.	12C	13C	H	O
451.1609	+7.5	23.5	31	2	21	2
451.1653	-2.4	23.0	32	1	22	2
451.1698	-12.3	22.5	33	-	23	2
451.1545	+21.5	18.5	29	-	23	5



**Espectro 27**

[ Elemental Composition ]

Data : Dr-Bernardo-Fontana067

Date : 03-Apr-98 06:20

Page: 1

Sample: SLR8

Note :

Inlet : Direct

Ion Mode : FAB+

RT : 0.45 min

Scan#: (1,3)

Elements : C 50/0, H 80/0, O 2/0, Cl 2/0(35Cl 2/0, 37Cl 2/0)

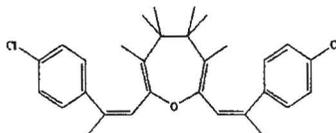
Mass Tolerance : 10ppm, 10mmu if m/z > 1000

Unsaturation (U.S.) : 12.0 - 25.0

Observed m/z	Int%							
450.1636	48.0							
Estimated m/z	Error [ppm]	U.S.	C	H	O	35Cl	37Cl	
450.1620	+3.5	23.0	33	22	2	-	-	

Observed m/z	Int%
435.2198	28.2

Observed m/z	Int%							
435.1401	89.5							
Estimated m/z	Error [ppm]	U.S.	C	H	O	35Cl	37Cl	
435.1385	+3.6	23.5	32	19	2	-	-	



**Espectro 28**