



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Aislamiento y evaluación como inhibidores de la replicación  
de células tumorales de los componentes diterpénicos de la  
*Salvia candicans*.**

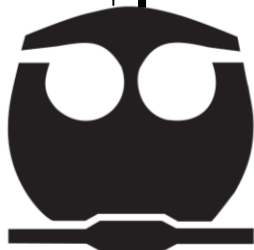
**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICO**

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

**COLIN SEGUNDO ALBERTO**



**MÉXICO, D.F.**

**2013**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **Profesor: Dra. Yolanda Caballero Arroyo**

**VOCAL:**               **Profesor: M. en C. Francisco Rojo Callejas**

**SECRETARIO:**       **Profesor: M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez**

**1er. SUPLENTE:**     **Profesor: Q.F.B. Ana Adela Sánchez Mendoza**

**2° SUPLENTE:**       **Profesor: Dr. José Fausto Rivero Cruz**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**INSTITUTO DE QUÍMICA DEPARTAMENTO DE PRODUCTOS NATURALES  
LABORATORIO 2-9.**

**ASESOR DEL TEMA:**

**M. en C. BALDOMERO ESQUIVEL RODRÍGUEZ**

**SUSTENTANTE:**

**COLIN SEGUNDO ALBERTO**

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de pertenecer a ella, desde la preparatoria, y estudiar una carrera universitaria, así como todos los beneficios otorgados durante mi permanencia.

A la Facultad de Química, por haber sido mi última casa y fuente de conocimiento, aptitudes, habilidades, actitudes y valores que me brindó e impartió a través de su cuerpo de docentes, aulas y servicios. Es un orgullo enorme ser parte de ella.

A mi asesor, el M. en C. Baldomero Esquivel por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y brindarme la confianza para lograr todos los resultados esperados durante el desarrollo del proyecto.

A mi jurado, la Dra. Yolanda Caballero, M. en C. Francisco Rojo, Q.F.B. Ana Adela Sánchez y el Dr. Fausto Rivero, por las aportaciones que hicieron al revisar este trabajo.

Al personal académico y técnico del Instituto de Química, quienes realizaron los análisis de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , así como IR y espectrometría de masas, en especial a la M. en C. María Teresa Ramírez, por realizar las pruebas biológicas de citotoxicidad.

A mis amigos y compañeros de laboratorio por su apoyo y cariño, haciendo mi estancia más agradable y quienes siempre me mostraron su apoyo, en especial a Álvaro Ulloa, Lorena Sánchez, Alex, Tania, Zoraida, pero sobretodo a Celia Bustos por sus importantes aportaciones a este trabajo, su amistad, así como por siempre hacerme ver que cualquier polvo blanco era ácido ursólico.

A los que colaboraron durante la marcha y éxito de éste estudio, y que razonablemente no plasmé, tengo la confianza de encontrarlos en mi archivo sentimental.

## **AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS PERSONALES**

Al final de esta etapa, llega el momento de hacer un balance y reconocer que no tengo más que agradecerle a la vida y a Dios por todo el amor que me rodea y porque tengo todo el potencial para ser y hacer lo que yo quiero.

A mi papá, Porfirio Colin, de quien aprendí mucho sobre cómo conducirme por la vida, por su apoyo moral y monetario, que sin ello, no hubiera sido capaz de realizar este propósito.

A mi mamá, Mónica Segundo, quien fue capaz de sacarme adelante sola toda la vida, porque nunca me dejó en los momentos más difíciles de mi vida. Gracias por siempre estar a mi lado.

A mi abuela casi madre Francisca Soto, a quien le debo la persona que hoy en día soy, si no hubiera sido por su forma tan peculiar de criarme, no se estaría cumpliendo este gran sueño, ya que sin sus regaños y golpes, cuando lo merecía, no sería quien soy. Gracias por tu gran apoyo y por ser una madre para mí.

A mis abuelos, Ángel Segundo y Victoria Pérez, quienes han velado por mi bienestar y han sacrificado mucho por mí.

A mis hermanos David y Vicky, por estar conmigo en cualquier circunstancia, por creer en mí, por ser el mejor regalo que me ha dado la vida.

A mis tíos maternos, que son realmente mis hermanos, por haber sido parte de mi crianza cuando niño, por su ayuda a lo largo de todos estos años y sus palabras de aliento, gracias por todo Manuel, Angélica y Lourdes Segundo.

A mis tíos y primos, porque en ellos siempre encontré un gran ejemplo y apoyo incondicional, en especial a Esteban Hernández, Citlalli Barreto, Rosa Reyes, Carlos Colin, Santos Colin, Álvaro Colin, Guillermina Colin, Clemencia Colin y familia, Bertha Morales, María Morales, Oscar Morales, Roberto Morales, Andrea Morales, Ricardo Morales y Álvaro Colin.

A mis padrinos Cecilia Reyes, Guillermo Morales y Felisa Morales.

A mis primas, que de igual forma considero mis hermanas, Alejandra Morales y Lupe Morales, quienes han sido testigos de los esfuerzos que he hecho para lograr esta meta, por siempre estar a mi lado en los mejores y peores momentos de mi vida, por darme el ánimo y apoyo que siempre necesité.

A mis amigos, casi hermanos, Ángeles Arroyo, Christihan Pineda, Óscar Sandoval, Javier Silva, Samantha Gutiérrez, Elizabeth Yau, Andrea Chávez, Jazmín Ángeles, Paulina Padilla, Rafael Villa, porque con ellos empecé y terminé esta excelente parte de mi vida que fue la carrera. Les agradezco el que hayan estado conmigo cada vez que los necesité, por su gran amistad brindada, sus consejos y por todos aquellos momentos que pasamos juntos durante la carrera, en especial a Pedro Villavicencio por haberme tenido paciencia en primer semestre.

A mis amigos de la carrera de Química: Raymundo Marcial, Daniel Sifuentes, Liliana Capulín, Othoniel Reyes, Andy Tdh, Danea Medina, Oscar Fajardo, Luis David González, por haber compartido la carrera conmigo, por el apoyo brindado, por ser unos grandes colegas y sobre todo por su gran amistad.

A los que algunas vez fueron mis alumnos, los mejores que he tenido en este tiempo que llevo dando clases, Kinder9, en especial a Carmen, Giovanni, Hugo, Jonny, Daniela, Cesar, Jesús, Neri, por haber hecho la última parte de mi carrera muy divertida, por su apoyo incondicional, por su amistad brindada y por siempre estar allí cada vez que los necesité, así como a mis exalumnos Yuritz Valenzuela, Daniel Pedro, Brenda Camarena, Diana Núñez, Ulises Organista.

A mis mejores amigos de toda la vida, que los considero como mis hermanos: Adrian Morales, Antonio Morales, Ángel Roque, Daniel Tinoco, Esdras Daniel, Luis Ruíz, Ady Fonseca, Ivette Barragán, Yossellin Tapia, Silvia Murillo, Azael Ruíz, Daniel Tovar, Selene, Beatriz Portilla por ser los mejores amigos que la vida me ha dado, por estar conmigo en las buenas y en las malas, por ser mis amigos de parranda, por su apoyo moral, sus palabras de aliento cada vez que me he caído y nunca dejarme solo en los peores momentos de mi vida.

A Ballet Folklórico Tlatoani por que por medio del baile encontré la forma de librarme del estrés producido por la carrera, en especial a Dora Javier, Guadalupe Javier, Braulio, Alfredo Esteban y Erika Julián, por su amistad y apoyo.

A mis profesores, por haberme guiado en la búsqueda del conocimiento, por sus grandes enseñanzas y ejemplo, en especial al profesor Gustavo Garduño, quien fue la persona por la cual me quedé en esta carrera, por ser la inspiración que necesité para continuar la misma, por aceptarme como su profesor adjunto, así como por su apoyo económico para los trámites de titulación y en especial, por su gran amistad y apoyo.

A mi profesora de Química del bachillerato María Teresa Herrera, quien fue la persona que me inspiró a elegir la carrera inculcándome un gran gusto por esta ciencia, después de que era la materia que más odiaba, por su apoyo y amistad.

Y por último y no menos importantes, a los profesores Olivia Alvarado, Saúl Santos, Carlos Rea, Raúl Osorio, Silvia Reyes, Octavio Reyes y Olivia Zamora, porque siempre estuvieron al pendiente de mis estudios, por ser los mejores profesores que he tenido en los distintos niveles académicos.

Finalmente a los que me aprecian y cuyos nombres no aparecen aquí, muchas gracias.

## INDICE

1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1. Género <i>Salvia</i>	3
2.2. Actividad biológica del género <i>Salvia</i>	7
2.3. <i>Salvia candicans</i>	9
2.4. Terpenos y su actividad biológica	11
2.5. Triterpenos y su actividad biológica	15
3. Objetivos	16
3.1. Objetivos generales	16
3.2. Objetivos específicos	16
4. Materiales y métodos	17
4.1. Material vegetal	17
4.2. Secado	17
4.3. Extracción	17
4.4. Fraccionamiento	17
4.5. Procedimiento de ensayo de citotoxicidad	18
4.6. Cromatografías	25
4.7. Análisis instrumental	25
5. Resultados y discusión	27
5.1. Purificación de la fracción no polar soluble	28
5.2. Caracterización espectroscópica del compuesto I: Icetexona	30



5.3.	Caracterización espectroscópica del compuesto II: Betulinato de metilo	31
5.4.	Purificación de la fracción no polar insoluble	32
5.5.	Caracterización espectroscópica del compuesto III y IV: Ácido ursólico y Ursolato de metilo	33
5.6.	Caracterización espectroscópica del compuesto V: 7-O-metilconacytona	35
5.7.	Actividad citotóxica de los compuestos I y V.	36
6.	Conclusión	38
7.	Anexos	39
8.	Bibliografía	48

## ABREVIATURAS

RMN <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
IR	Infrarrojo
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer (mejoramiento sin distorsión por medio de la transferencia de polarización)
IE	Impacto Electrónico
m	Metro
cm	Centímetro
cm <sup>-1</sup>	Unidades del número de onda
kg	Kilogramo
mL	Mililitro
mM	Milimolar
nM	Nanomolar
μL	Microlitro
m/z	Relación Masa Carga
ppm	Partes por millón
Hz	Hertz
MHz	Megahertz
μmol/oreja	Micromol por oreja
TPA	13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol
TMS	Tetrametilsilano
DMSO-d <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido deuterado
CDCl <sub>3</sub>	Cloroformo Deuterado
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
Me	Metilo
CH <sub>2</sub>	Metileno
HCC	Carcinoma hepatocelular
K562	Leucemia mielógena crónica.

HCT-15	Adenocarcinoma de colon.
PC-3	Adenocarcinoma de próstata.
U251	Sistema nervioso central.
MCF-7	Adenocarcinoma de glándula mamaria.
SKLU-1	Adenocarcinoma de pulmón.
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Adquirida
NCI	National Cancer Institute (Instituto Nacional de Cáncer de los EUA)
FDA	Food and Drug Administration (Agencia de Alimentos y Medicamentos de los EUA)
IC <sub>50</sub>	Concentración Inhibitoria 50
CCD	Cromatografía en Capa Delgada
R.F	Factor de Retención
CCDP	Cromatografía en Capa Delgada Preparativa
s	Señal Singulete
hept	Señal Heptuplete
dd	Señal Doble de dobles
TBARS	Thiobarbituric acid reactive substances (Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico)
spp	Especies
S.	<i>Salvia</i>

## 1. INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad, se tiene conocimiento empírico por parte de la población en general, así como indígena, de las propiedades curativas de muchas de las plantas existentes en México. Con el paso del tiempo, este conocimiento fue evolucionando, hasta que surgieron investigadores en productos naturales, quienes se encargan de establecer las estructuras de las nuevas sustancias aisladas, ayudando a comprender la fisiología y bioquímica de los organismos que las producen y así lograr su mejor aprovechamiento con fines científicos y económicos, tanto en la medicina como en industria.<sup>1</sup>

En los últimos años, ha surgido un profundo interés por el estudio fitoquímico y ensayos preclínicos de las especies vegetales debido al alto impacto que han tenido los productos naturales en el desarrollo de nuevos fármacos.

Los productos naturales han demostrado ser una fuente potencial de nuevos fármacos con diferentes actividades, incluyendo la actividad anticancerosa. Se ha estimado que aproximadamente el 50% de los fármacos aprobados por la FDA en el periodo comprendido entre el primero de enero de 1981 al 31 de diciembre de 2010, están estrechamente relacionados con Productos Naturales. Específicamente, de los fármacos anticancerosos aprobados en este lapso, se calcula que aproximadamente el 70% provienen de Productos Naturales, siendo el Taxol o Paclitaxel uno de los ejemplos más representativos de los Productos Naturales que presentan dicha actividad.<sup>2</sup>

El cáncer se puede definir como multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales invadiendo partes adyacentes del cuerpo o propagándose a órganos. A esto es a lo que se le conoce como tumores malignos o neoplasias malignas.<sup>3</sup>

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo; en 2008 causó 7.6 millones de defunciones. Los cánceres que tienen mayor impacto en la población son el de pulmón, estómago, mama y colon.<sup>3</sup>

Debido a que los tratamientos actuales, como la quimioterapia y la radiación, carecen de la especificidad necesaria para destruir a las células cancerosas,<sup>4</sup> y la cirugía, la cual también es empleada para el tratamiento de este padecimiento, suele ser muy costosa y dolorosa,<sup>3</sup> el cáncer ha sido blanco de múltiples investigaciones con el fin de desarrollar nuevos fármacos con mayor actividad y especificidad y menores efectos adversos.

Considerando la importancia que tienen los productos naturales en el desarrollo de nuevos medicamentos, en el presente trabajo se realizó la evaluación de los compuestos diterpénicos de *Salvia candicans* en diferentes líneas celulares obtenidas de diferentes tipos de cáncer de origen humano. El aislamiento de estos compuestos se llevó a cabo utilizando técnicas cromatográficas, tales como cromatografía en columna y en capa delgada preparativa. Los productos aislados fueron caracterizados por medio de técnicas espectroscópicas (RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, DEPT, IR) y espectrometría de masas, contribuyendo así con el estudio de los Productos Naturales como posibles agentes anticancerígenos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. Género *Salvia*.

El género *Salvia* L. (Tribu Mentheae) es la más grande de la familia *Lamiaceae* con casi 1000 especies distribuidas en el mundo. Las principales áreas de diversidad se localizan en México, Centroamérica y América del Sur (500 spp), Asia Central Mediterránea (250 spp) y el Este de Asia (90 spp) (Fig. 1)<sup>5</sup>. Estas plantas fueron organizadas en cuatro subgéneros según Bentham (*Salvia*, *Sclarea*, *Leonia* y *Calosphace*), sin embargo, datos taxonómicos sugieren una reconsideración en esta clasificación la cual debe incluir al subgénero *Audibertia*, el cual comprende las *Salvias* de California y Baja California. Los subgéneros *Salvia* y *Sclarea* están presentes en Asia y Europa fundamentalmente. A su vez, el subgénero *Leonia* también se localiza en Europa, Asia, África y en el Norte de América (Tabla 1).<sup>6</sup>

El subgénero *Calosphace* está constituido por 500 especies aproximadamente, de las cuales, en México se registran cerca de 312, con un 88% de endemismo; sin embargo esta cifra va en aumento.<sup>7</sup> Este subgénero es endémico de América y se define por poseer cáliz tubular bilabiado, el labio superior usualmente entero o en ocasiones trífido, el inferior bilobado; corola bilabiada, el labio superior recto o arqueado formando una gálea, mientras que el labio inferior es trilobado; 2 estambres con los conectivos posteriores estériles, unidos longitudinalmente; estilo barbado, con la rama superior más larga que la inferior. Por razones históricas, se ha cambiado el nombre de este subgénero a *Jungia*.<sup>8</sup>

Subgéneros	Distribución
<i>Salvia</i>	Asia y Europa
<i>Esclarea</i>	Asia, Europa y México
<i>Jungia</i> (anteriormente <i>Calosphace</i> )	México, América Central y Sudamérica
<i>Audibertia</i>	California (EU) y Baja California (México)
<i>Leonia</i>	Asia, Europa y Norte América

Tabla 1. Clasificación y distribución del género *Salvia* en subgéneros.

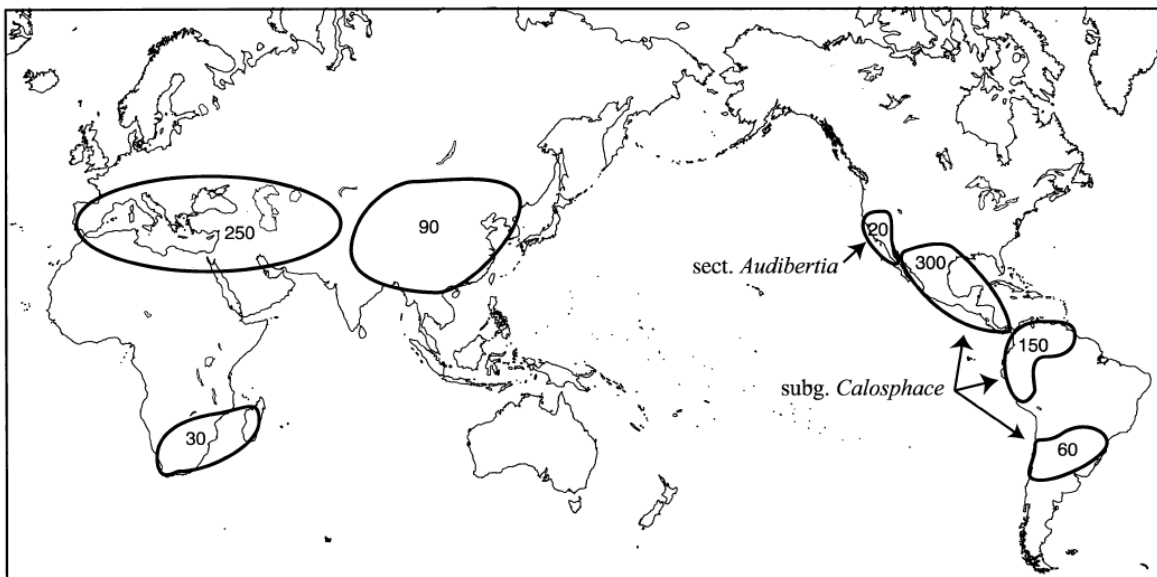


Figura 1. Centros de diversidad del género *Salvia*. Los números indican el número de especies aproximado de cada área.

El género *Salvia*, se caracteriza por ser una importante fuente de metabolitos secundarios, entre los que destacan monoterpenos, diterpenos, triterpenos y flavonas. Actualmente se investiga extensamente, ya que existen especies de interés en la medicina tradicional; de éstas se han aislado compuestos diterpénicos, algunos con esqueleto de abietano y que en general presentan actividad biológica, destacando los bactericidas, antialimentarios y anticancerosos.<sup>1</sup>

El estudio fitoquímico de las partes aéreas de varias especies de *Salvia* ha permitido establecer un interesante perfil químico para el género: esteroides, tales como el  $\beta$ -sitosterol y estigmaesterol así como flavonoides; triterpenos, derivados de esqueletos de lupano, oleanano, dammarano, ursano y algunos compuestos fenólicos; así mismo, para estas plantas se han descrito lactonas sesquiterpénicas y alcaloides diterpénicos, sin embargo los metabolitos secundarios más diversos y característicos del género son los diterpenoides. Entre éstos, más de 200 diterpenoides de tipo abietano y con esqueletos transpuestos de abietano (icetexanos) se han descrito para especies pertenecientes a todos los subgéneros, tanto en la parte aérea como en las raíces. La mayor concentración y diversidad de este tipo de metabolitos están representados en el subgénero *Salvia*, *Sclarea* y *Audibertia*. Hasta el momento más de 100 diterpenoides de tipo clerodano y compuestos relacionados, han sido aislados de especies pertenecientes al subgénero *Jungia* (*Calosphace*). Así mismo, siguiendo la clasificación de Bentham, se ha observado una relación interesante entre el contenido de diterpenos en estas plantas, su distribución geográfica y su clasificación botánica a nivel de subgéneros. Los datos actuales indican que los diterpenoides derivados de clerodanos son característicos de *Salvias* del subgénero *Jungia* (*Calosphace*) y que compuestos derivados de esqueletos de tipo abietano han sido aislados con mayor frecuencia de plantas pertenecientes a otros subgéneros. La distribución y el patrón de oxidación de varios diterpenoides derivados del abietano son de importancia fitográfica y han sugerido conexión evolutiva entre las *Salvias* que crecen en China y las del Nuevo Mundo.<sup>9</sup>

Uno de los rasgos más distintivos del género *Salvia* es la gran diversidad de esqueletos diterpénicos que presentan. Se han aislado aproximadamente más de 30 nuevos esqueletos de este tipo en todo el mundo, tanto de las partes aéreas como de las raíces, muchos de los cuales provienen de precursores tales como clerodano, abietano y primarano, mientras que en especies americanas se han aislado alrededor de 15 nuevos esqueletos, tales como icetexano, salvigenano, entre otros (Fig. 2).<sup>6</sup>



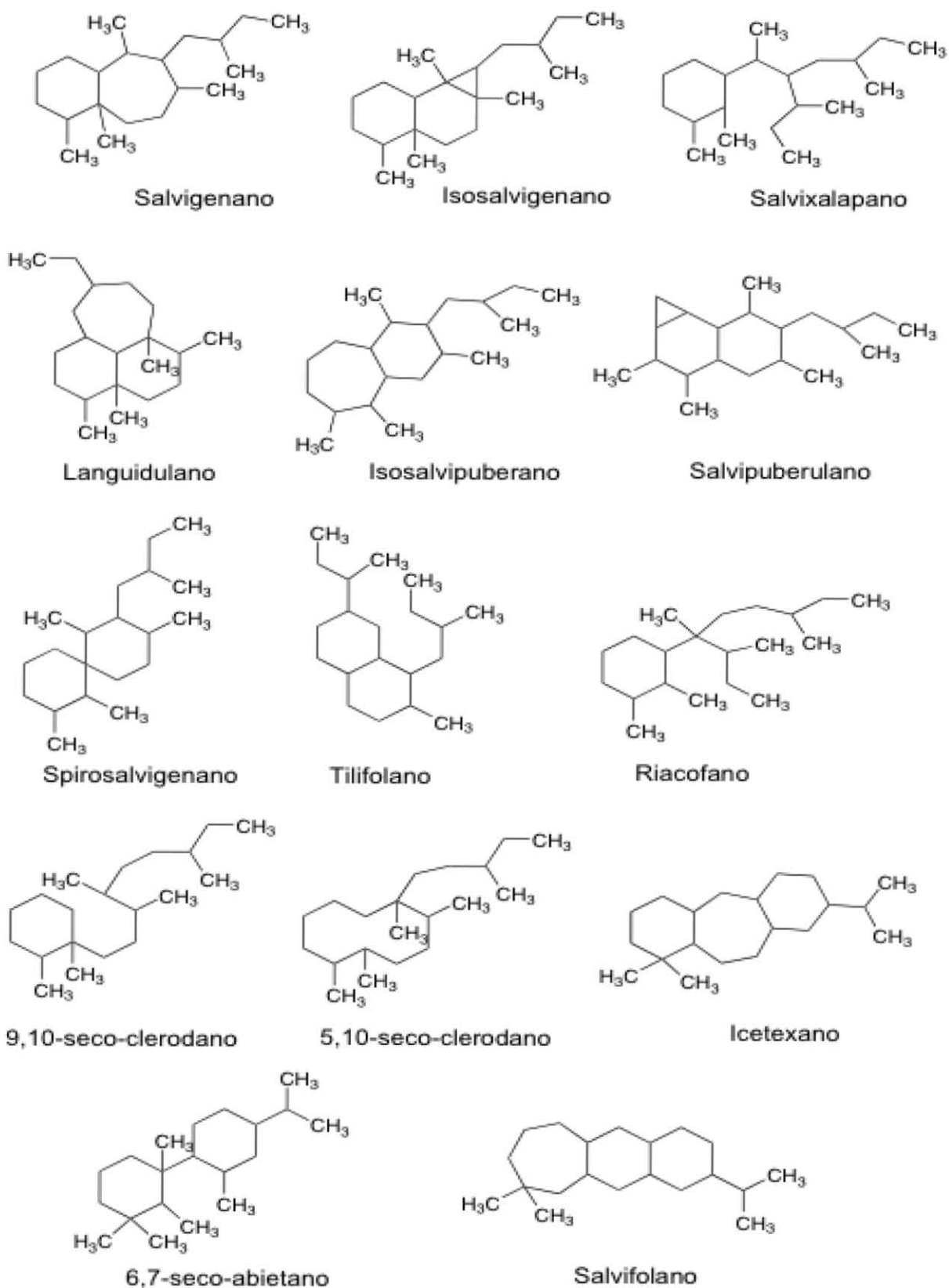


Figura 2. Estructuras de esqueletos diterpénicos de *Salvias* americanas.

Los aceites esenciales de salvias presentan una gran variedad de compuestos monoterpénicos y sesquiterpénicos cuyo perfil puede cambiar de acuerdo a la especie, la temporada del año de cosecha y la distribución geográfica, entre otros factores. Por mencionar un ejemplo, el aceite esencial de *S. officinalis* (L.) contiene principalmente monoterpenos como la  $\alpha$ -tuyona (10-60%; Fig. 3a),  $\beta$ -tuyona (4-36%), Alcanfor (5-20%) y 1.8-cineol (2-15%), junto con sesquiterpenos como el  $\alpha$ -humuleno,  $\beta$ -cariofileno y Viridiflorol. También se han identificado sesquiterpenlactonas, como el caso del guaianólido nubiol (Fig. 3b) aislado de *S. nubicola* (Wall.)<sup>10</sup>.

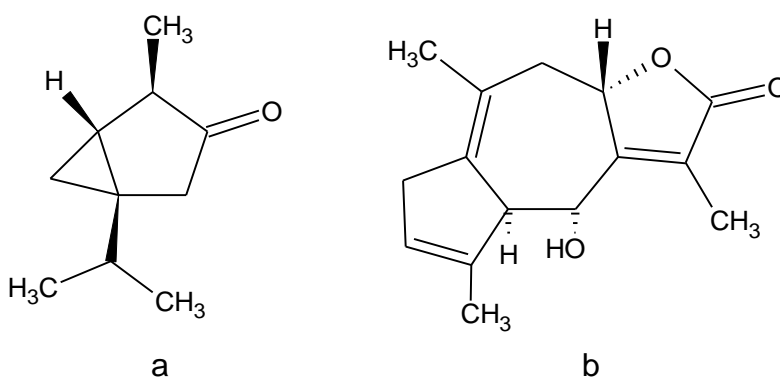


Figura 3. Monoterpeno:  $\alpha$ -tuyona (a). Sesquiterpeno: nubiol (b).

## 2.2. Actividad biológica del género *Salvia*

El nombre del género *Salvia* proviene del latín *salvare* que significa “para curar o para mantener sanos y salvos”. Desde la antigüedad, especies de este género han sido utilizadas en la medicina tradicional<sup>11</sup> para el tratamiento de diversos padecimientos como dolores epilépticos, resfriados, bronquitis, tuberculosis, hemorragias, trastornos menstruales, entre muchas otras.

Una de las especies, quizá la más estudiada es la *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Labiatae), debido a sus múltiples usos en la medicina de China, entre los cuales se pueden mencionar: trastornos cardiacos y vasculares, como arterosclerosis o anomalías de coagulación de la sangre.<sup>12</sup>

Otra especie conocida es *S. fruticosa* Miller, de la cual, se usan sus hojas en decocciones o infusiones para bajar la presión arterial, así como para el tratamiento de hipoglucemia. Debido a sus propiedades antisépticas, antifúngicas, antibacterianas, antioxidantes y antiinflamatorias, es usada a menudo para tratar dolores de garganta y úlceras en la boca.<sup>13</sup>

Por otro lado, se tiene el registro de la *Salvia lavanduloides*, especie mexicana, que se sabe tiene varios atributos farmacológicos, entre los que se incluyen como expectorante, hemostático antipirético, padecimientos estomacales, tos, entre otros.<sup>14</sup>

Otra de las especies más estudiadas es la *Salvia officinalis* L, la cual contiene aceites esenciales, triterpenos 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 anhídrico, así como para el malestar digestivo y transpiración excesiva. También se utiliza para conservar los alimentos debido a sus propiedades antioxidantes, así como saborizante.<sup>13</sup>

Por último, se cita a otra especie mexicana conocida como “hierba de los dioses”, llamada *Salvia divinorum*, usada por los chamanes de Oaxaca, principalmente tribus Mazatecas, con el fin de tratar problemas gastrointestinales, dolores de cabeza, reumatismo, anemia e inflamación del estómago. Su componente más importante es la Salvinorina A que presenta actividad psicotrópica.<sup>15</sup>

### 2.3. *Salvia candicans*

Información taxonómica.<sup>16</sup>

Reino	Plantae
Filo o División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliophyta
Subclase	Asteridae
Orden	Lamiales
Familia	Lamiaceae
Género	<i>Salvia</i>
Subgénero	<i>Jungia</i>
Sección	Tomentellae

Esta especie fue encontrada por primera vez por el botánico Henri Guillaume Galeotti y Martin Martens, en el año de 1840<sup>17</sup>, aceptándose su nombre hasta 1844 (Ref. Org. Bull. Acad. Brux. xi. II. (1844) 61)<sup>18</sup>. La primera referencia de esta especie se encuentra en Hervier Muséum Paris desde 1895.

En la figura 4 se muestra la imagen de *Salvia candicans*, conocida como ocote de burro, la cual, es un arbusto erecto, de alrededor de 1.5 m de altura, con tallos jóvenes blanquecinos y pubescentes; hojas simples, de 1 a 3 cm de largo, opuestas, gruesas, elíptica-deltoides, a veces con lóbulos superficiales en la base, verde-grisáceas, márgenes enteros y recurvados, de pecíolos cortos; flores en espigas terminales, blancas o lilas a rosa-pálidas, con un pétalo inferior de 2 lóbulos y los superiores formando una capucha, pubescente, los sépalos blancos y muy pubescentes. Crece en suelos calizos y superficiales en bosques de encino, chaparral y de matorrales en elevaciones mayores. Es una especie endémica de México, localizada principalmente en los estados de Puebla y Oaxaca.<sup>19</sup>



Figura 4. Flores y hojas de *Salvia candicans*.

Estudios precedentes al presente estudio de las partes aéreas de la misma especie, colectada en el estado de Puebla, muestran que está constituida principalmente de compuestos diterpénicos tipo abietano, entre los que se pueden citar: Icetexona (Fig. 5.7), Conacytona (Fig. 5.1), 7-O-metilconacytona (Fig. 5.1a), Anastomosina (Fig. 5.8), así como los Ácidos ursólico y oleanólico, entre otros.<sup>20</sup>

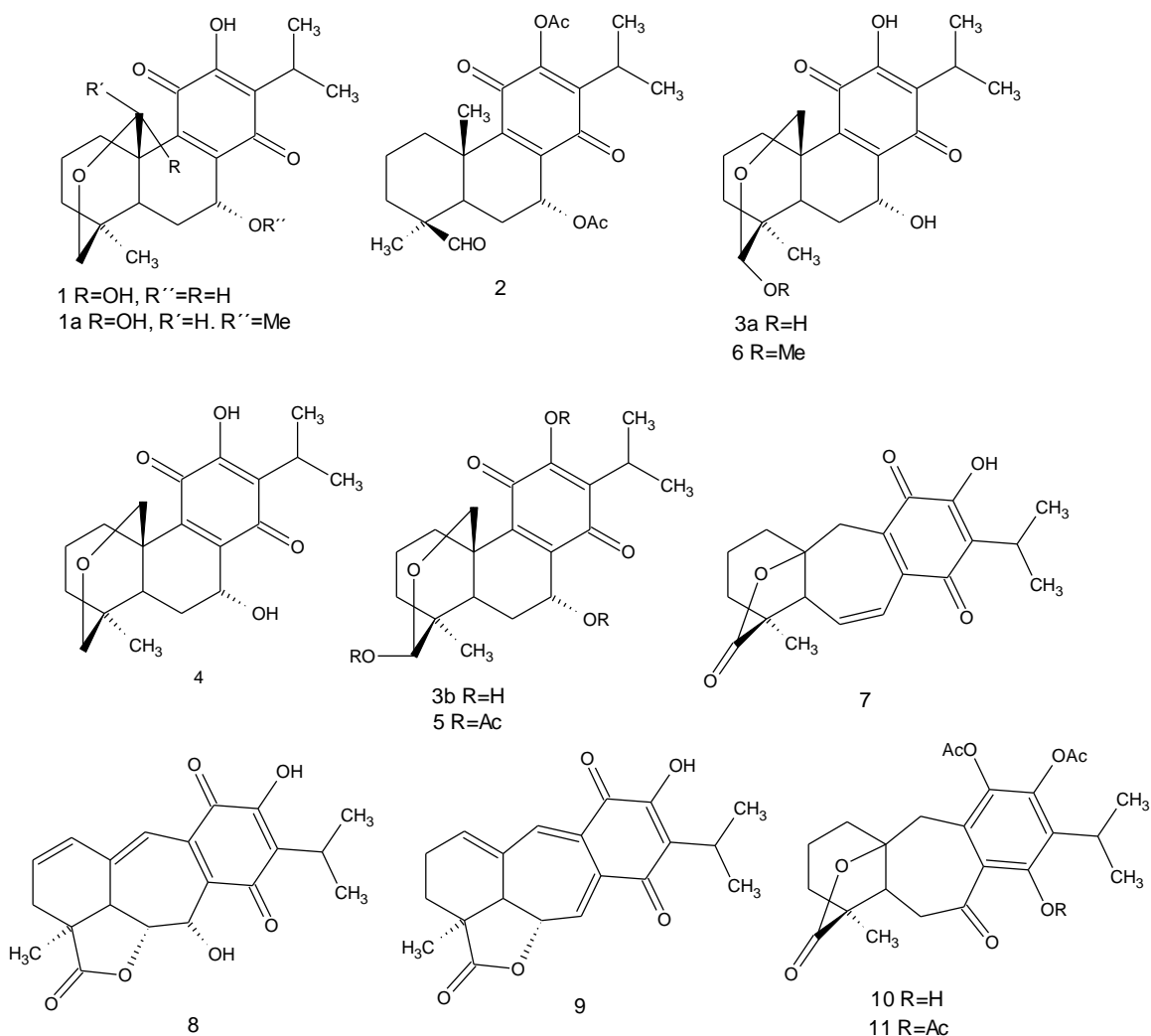


Figura 5. Compuestos aislados anteriormente de *Salvia candicans*.

## 2.4. Terpenoides y su actividad biológica

Los terpenoides son de los Productos Naturales más importantes conocidos por su valor medicinal, 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.

Los diterpenos con esqueleto de abietano o de abietano transpuesto han sido objeto de algunas investigaciones orientadas a establecer su actividad biológica.

De esta manera se ha encontrado para compuestos como la Taxodiona (Fig. 6.4), la Taxodona (Fig. 6.5) y el Cariocal (Fig. 6.6) una actividad inhibidora de la replicación de células tumorales.<sup>21</sup> Los dos primeros compuestos se encuentran en *S. barrelieri*, *S. munzii*, entre otras, los cuales tienen actividad selectiva contra carcinoma intramuscular y carcinoma nasofaríngeo respectivamente; y el Cariocal se encuentra en *Coleus barbatus*, *S. aspera*, *S. anastomosans* y raíces de *S. candicans*, siendo selectivo para células de leucemia.<sup>22</sup>

Algunos abietanos han presentado actividad antialimentaria. Fraga y colaboradores encontraron en raíces de especímenes cultivados de *Salvia broussonetii* que el abietano 14-desoxicoleon U (Fig. 6.2) fue el antialimentario más efectivo contra larvas de *Spodoptera littoralis* y *Leptinotarsa decemlineata*. Un icetaxano llamado Desmetilsalvicanol (Fig. 6.3) también estuvo presente y resultó tóxico para *L. decemlineata*.<sup>23</sup>

Otro caso interesante es el potencial de las *o*-naftoquinonas, como el 4,5-seco-20(10→5)-abeo-abietano denominado Etiopinona (Fig. 6.8), aislada de los extractos de la raíz de *S. aethiopsis* L. Además, la Etiopinona ha presentado actividad citotóxica contra células cultivadas KB y ED50 de carcinoma humano.<sup>24</sup>

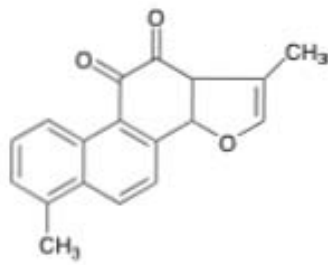
En últimas investigaciones, se ha podido comprobar que la *Salvia miltiorrhiza* presenta componentes que tienen efectos citotóxicos contra ciertas líneas celulares obtenidas de diferentes tipos de cáncer humano. Tal es el caso de la Tanshinona II (Fig. 6.1), que recientemente se ha descrito como inhibidor del crecimiento de carcinoma hepatocelular (HCC) y cáncer de mama in Vivo.<sup>12</sup>

Por otro lado, el estudio de *Salvia leriiaefolia* Benth, una planta Iraní, se ha logrado aislar un compuesto diterpénico tipo labdano (Fig. 6.7) que presenta actividad antibacteriana contra bacterias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus*<sup>25</sup> (responsable de diversas enfermedades tales como conjuntivitis, foliculitis, entre otras) a una concentración 0.4 mM.

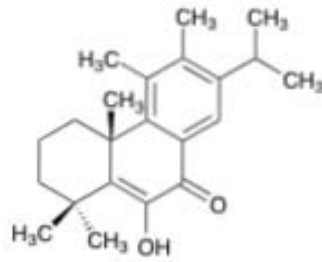
También se reportaron dos diterpenos tipo clerodano (Fig. 6.9 y 6.10) aislados del extracto metanólico de las hojas de *Dodonaea poliantha* (Familia Sapindaceae), los cuales fueron evaluados en el método de inflamación inducida por TPA, exhibiendo actividad de 70 a 76% a una dosis de 0.22 y 0.9  $\mu\text{mol/oreja}$  después de 8 horas, observándose un decremento en la actividad de ambos compuestos al hidrolizarse el éster.<sup>26</sup>

Por último, se menciona a unos de los terpenos alcaloideos más importantes que es el Taxol o Paclitaxel (Fig. 6.11), el cual fue descubierto en 1962 por el botánico Arthur Barkley por medio del extracto de la corteza del tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia Nutt*). En 1971 se confirmó la estructura de dicho compuesto y fue hasta 1992 que este compuesto se aprobó para el tratamiento de cáncer de ovario, mama, pulmón y también ha demostrado eficacia contra el sarcoma de Kaposi.<sup>27,28</sup>

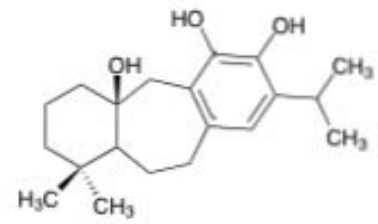




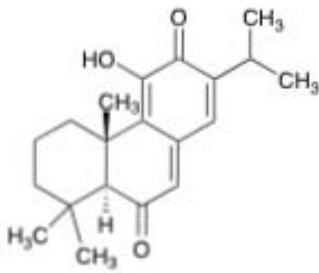
1. Tanshinona II



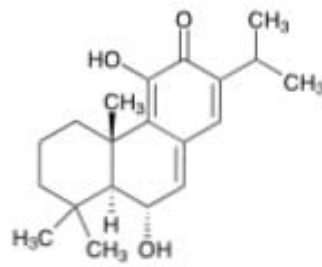
2. 14-desoxicoleon U



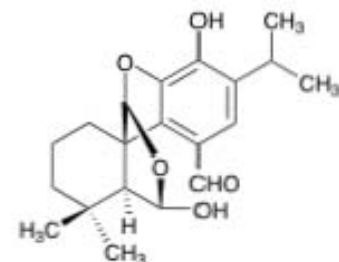
3. Desmetilsalvicanol



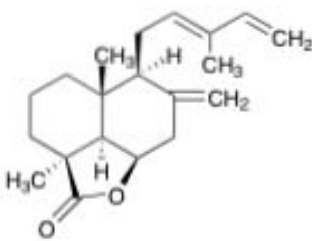
4. Taxodiona



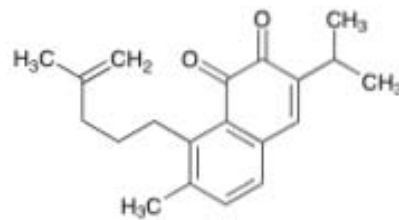
5. Taxodona



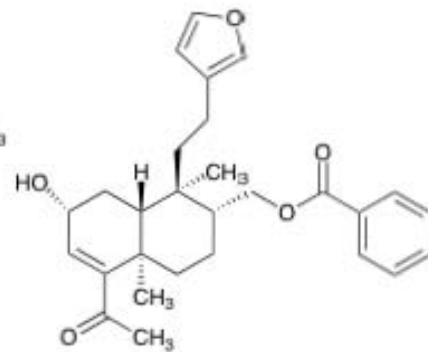
6. Carioal



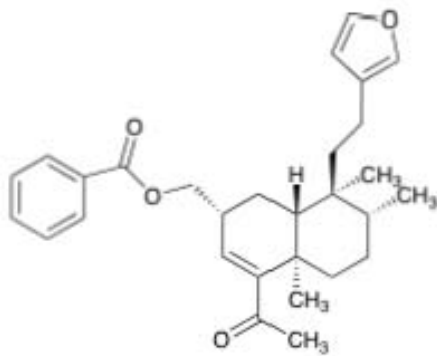
7.



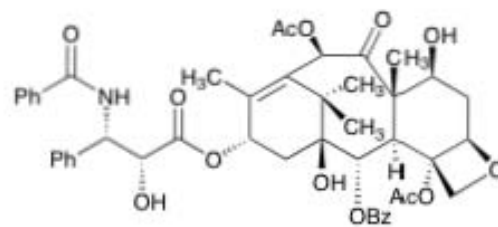
8. Etiopinona



9.



10.



11. Taxol

Figura 6. Compuestos terpénicos que presentan actividad biológica.

## 2.5. Triterpenos y su actividad biológica

Los triterpenos pentacíclicos son un grupo de compuestos de importancia debido a su amplio espectro de propiedades biológicas, entre los cuales se pueden citar los ácidos ursólico, maslínico, oleanólico y betulínico.

Los esqueletos más comunes detectados en la especie *Salvia* son los ursano, oleanano y lupano, los cuales exhiben una gran variedad de actividades biológicas. Los ácidos ursólico y oleanólico se han encontrado en casi todas las *Salvias* estudiadas hasta el momento.

Al ácido betulínico se le ha encontrado propiedades antitumorales contra el melanoma humano, antiinflamatorio, la proliferación del VIH, así como para curar el padecimiento de la malaria; por otro lado, el ácido ursólico tiene la propiedad de ser un antimicrobiano, antiinflamatorio, es un hepatoprotector, presenta actividad anticancerosa (cáncer de la piel fundamentalmente), se emplea como emulsionante en preparados farmacéuticos, cosméticos y alimentos, y en últimos estudios, se ha demostrado que fortalece los músculos y mejora y refuerza el colágeno cutáneo, mejorando así el aspecto de las arrugas, por tanto, se incluye en cosméticos para pieles fotoenvejecidas.<sup>13,28,29</sup>

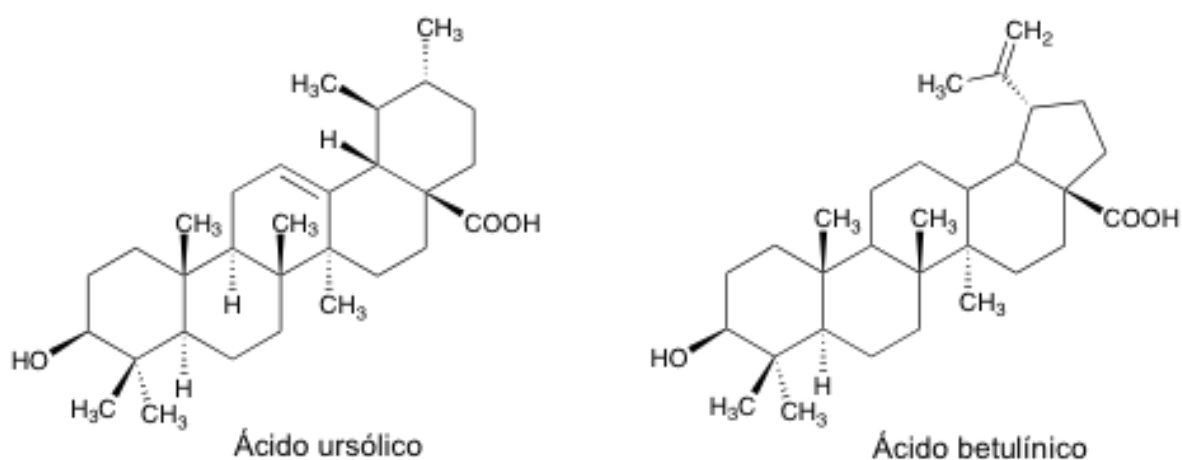


Figura 7. Estructuras del Ácido ursólico y el Ácido betulínico.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo general**

Contribuir al conocimiento químico y biológico del género *Salvia* mediante el aislamiento y evaluación de la actividad citotóxica de los extractos y metabolitos secundarios presentes en *Salvia candicans*.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Realizar la colecta de la planta *Salvia candicans*.
- Obtención del extracto acetónico de las partes aéreas de la planta.
- Evaluar la actividad biológica que presentan los extractos obtenidos de *Salvia candicans*.
- Aislar los metabolitos secundarios de *Salvia candicans* y elucidar su estructura mediante técnicas espectroscópicas y espectrometría de masas.
- Evaluar los componentes aislados en líneas celulares de diferentes tipos de cáncer de origen humano.

## **4. MATERIALES Y MÉTODO**

### **4.1. Material vegetal**

La especie vegetal, *Salvia candicans*, fue colectada por el M. en C. Baldomero Esquivel Rodríguez en Tehuacán, Puebla en septiembre de 2010.

### **4.2. Secado**

El material vegetal se secó a temperatura ambiente durante tres semanas bajo a la sombra obteniéndose 1.90 kg de partes aéreas. Posteriormente, éstas se trituraron manualmente.

### **4.3. Extracción**

La extracción de los componentes de la parte aérea 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 112 g de extracto seco.

### **4.4. Fraccionamiento**

Al extracto acetónico, se le realizó un fraccionamiento por partición empleando una mezcla hexano-benceno 1:1 y otra mezcla de metanol-agua al 20% v/v, obteniéndose una fracción polar y una fracción no polar dándoseles tratamientos distintos.

A la fracción polar se le eliminó el metanol a presión reducida y se realizó otra partición empleando diclorometano. A la fase acuosa se le eliminó el disolvente remanente con bomba de vacío y se sometió a un proceso de liofilización; mientras que a la fase orgánica, se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida.

A la fracción no polar, se le realizó un segundo fraccionamiento obteniéndose una fracción soluble y otra insoluble. El primero se secó con sulfato de sodio anhidro, se concentró a presión reducida y se eliminó el disolvente remanente con bomba

de vacío; mientras que al segundo, se dejó secar a temperatura ambiente en la campana.

A cada una de las fracciones resultantes se les mandó a realizar estudios de citotoxicidad, con el fin de determinar que fracciones presentaban actividad biológica en las diferentes líneas celulares tumorales de origen humano. Según los resultados obtenidos de las pruebas de citotoxicidad, se observó que las fracciones que presentaron una mayor actividad fueron la fracción soluble y la fracción insoluble, provenientes de la fracción no polar, así como la mezcla de compuestos proveniente del diclorometano.

#### **4.5. Procedimiento de ensayo de citotoxicidad**

Las líneas celulares utilizadas en los ensayos de citotoxicidad son las siguientes:

K562: Leucemia mielógena crónica.

HCT-15: Adenocarcinoma de colon.

PC-3: Adenocarcinoma de próstata.

U251: Adenocarcinoma del sistema nervioso central.

MCF-7: Adenocarcinoma de glándula mamaria.

SKLU-1: Adenocarcinoma de pulmón.

Todas las líneas celulares pertenecen al panel del NCI (National Cancer Institute, USA), las cuales se cultivaron en el medio de cultivo RPMI-1640 (Medio Roswell Park Memorial Institute) adicionado con suero fetal bovino al 10%, una mezcla de antibióticos al 10% y 2 mM de glutamina. Con excepción de la línea celular K562, las líneas restantes se adhieren a las botellas de cultivo y para cosecharlas se adiciona 0.8 mL de tripsina-EDTA al 0.05%. Una vez que se desprendieron del sustrato plástico de la botella de cultivo, se les adiciona de 5 mL de medio de cultivo para inactivar la tripsina. Las células en suspensión se depositaron en tubos cónicos y se centrifugan durante 3 minutos; una vez formado el paquete celular se le adicionó medio de cultivo para resuspensión del mismo. Para

determinar la densidad del inóculo, se toman 0.02 mL de la suspensión celular inóculo y se adiciona 0.180 mL de azul de tripano, un colorante orgánico que permite distinguir las células viables y las no viables. El recuento de células viables se llevó a cabo en una cámara de Neubauer, tomando una alícuota de 10  $\mu$ L de la suspensión celular y con ayuda de un microscopio se contaron las células viables. El número de células por mililitro de suspensión se obtuvieron por medio de la siguiente ecuación:

$$C = (RC)(10^{-4})$$

Donde:

C = Número de células por mililitro de suspensión.

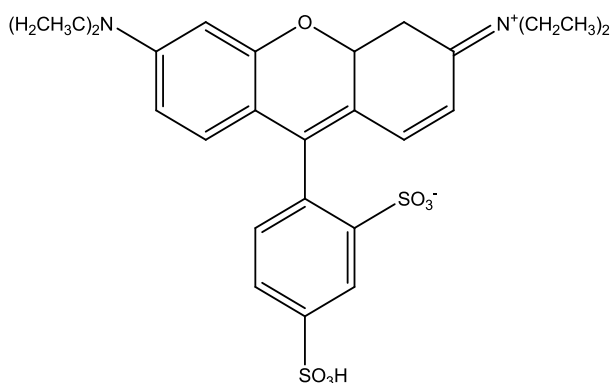
RC = Promedio de células obtenidas de la cuenta de los cuatro cuadrantes de la cámara.

Una vez determinado el número de células por mililitro, se ajustó la densidad del inóculo y se depositaron 100  $\mu$ L/pozo. Para llevar a cabo los ensayos se utilizaron microplacas de plástico de 96 pozos. Cada placa se inoculó con dos líneas celulares por triplicado y se incubó por 24 horas a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad relativa para permitir que las células nuevamente se adhieran al sustrato plástico de los micropozos antes de adicionar los compuestos. Los compuestos se preparan a la concentración de 20 mM disolviéndolos en DMSO. Para realizar un cernimiento primario, los compuestos se probaron a la concentración de 50  $\mu$ M en un volumen de 100  $\mu$ L, y se incubó la microplaca bajo las mismas condiciones descritas anteriormente por 48 horas.

Al finalizar el periodo de incubación, se procedió a la fijación de las células viables *in situ* añadiendo 50  $\mu$ L de ácido tricloroacético (TCA) frío al 50% para las células adheridas o al 80% para células en suspensión y se incubaron a 4 °C durante una hora. Posteriormente se desecó el sobrenadante lavando las placas cinco veces con agua desionizada y dejando secar las mismas a temperatura ambiente. El teñido de las células fijadas al sustrato del pozo, se realiza añadiendo 100  $\mu$ L de

una solución 0.4% de sulforodamina B (SRB) por 30 minutos a temperatura ambiente; la SRB no unida se removió con tres lavados de ácido acético al 1% y la placa se dejó secar al ambiente.

La sulforodamina B es un colorante aniónico que reacciona con los grupos sulfhídrico de las proteínas formando un complejo que se disuelve en soluciones básicas débiles.



Sulforodamina B

Una vez realizada la tinción, las placas se les agrega 100  $\mu$ L de un buffer de tris y se agitaron durante 10 minutos para favorecer la solubilidad del complejo, y a continuación se mide la densidad óptica en un lector de microplacas a una longitud de onda de 515 nm. Los datos se procesan obteniéndose el promedio de la DO de los tres pozos por línea tratados con el compuesto (DOt) y dos pozos control, que corresponden a aquellos que no contienen células, es decir, sólo el compuesto y DMSO (DOb). Adicionalmente se manejan tres pozos que contienen células más la misma proporción de DMSO en la que va el compuesto de prueba (DOc). El porcentaje de inhibición de crecimiento (%IC) se calcula con la siguiente ecuación:

$$\%IC = 100 - \left( \frac{Dot - Dob}{DOc - Dob} \right) * 100$$

En algunos casos se construyó una curva de concentración -respuesta, donde los valores de concentración y % IC son respectivas variables «x» y «y». La concentración que inhibe el crecimiento en un 50% ( $IC_{50}$ ) se determinó a partir de

una regresión lineal por mínimos cuadrados. Se utilizó Doxorrubicina, como fármaco de referencia.

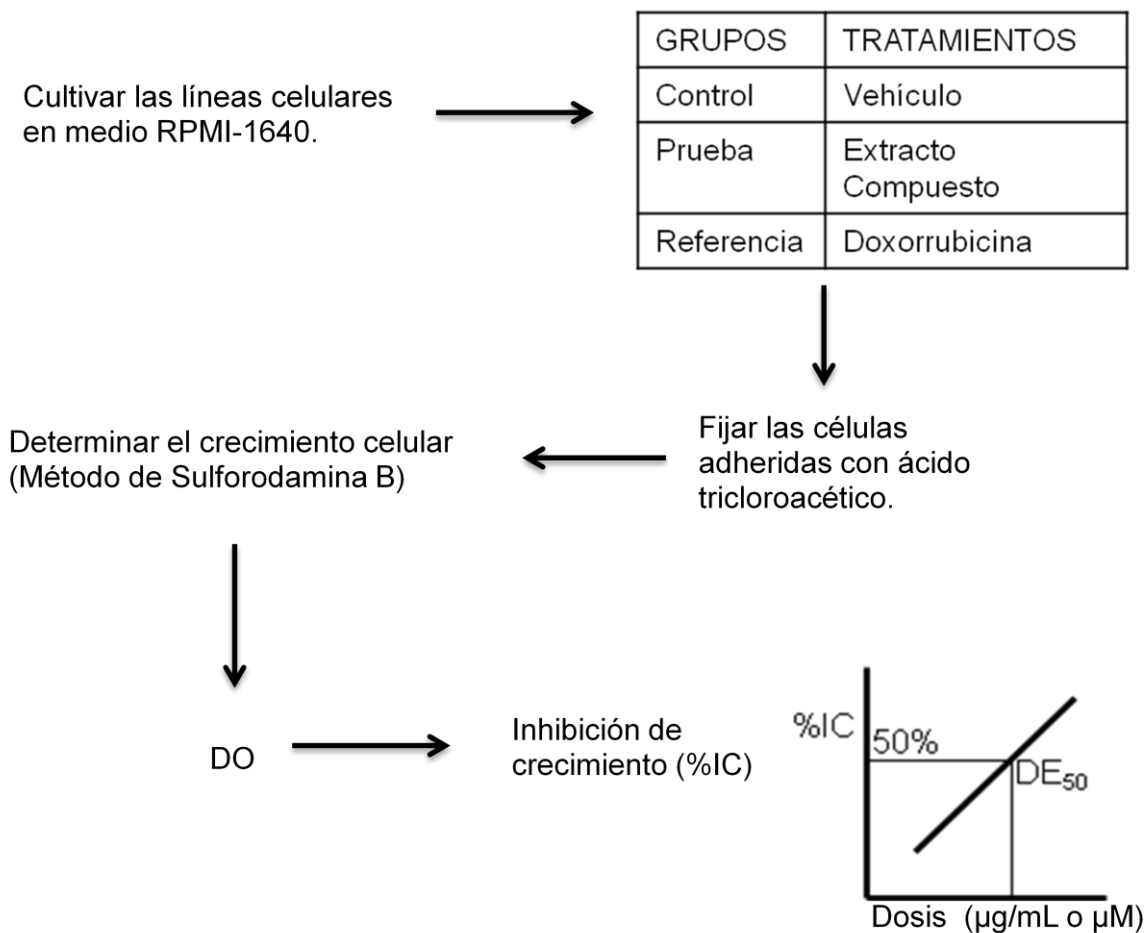


Diagrama 1. Ensayo de citotoxicidad en líneas celulares de cáncer humano.



Diagrama 2. Diagrama experimental para el estudio de la actividad citotóxica de las partes aéreas de *Salvia candicans*.

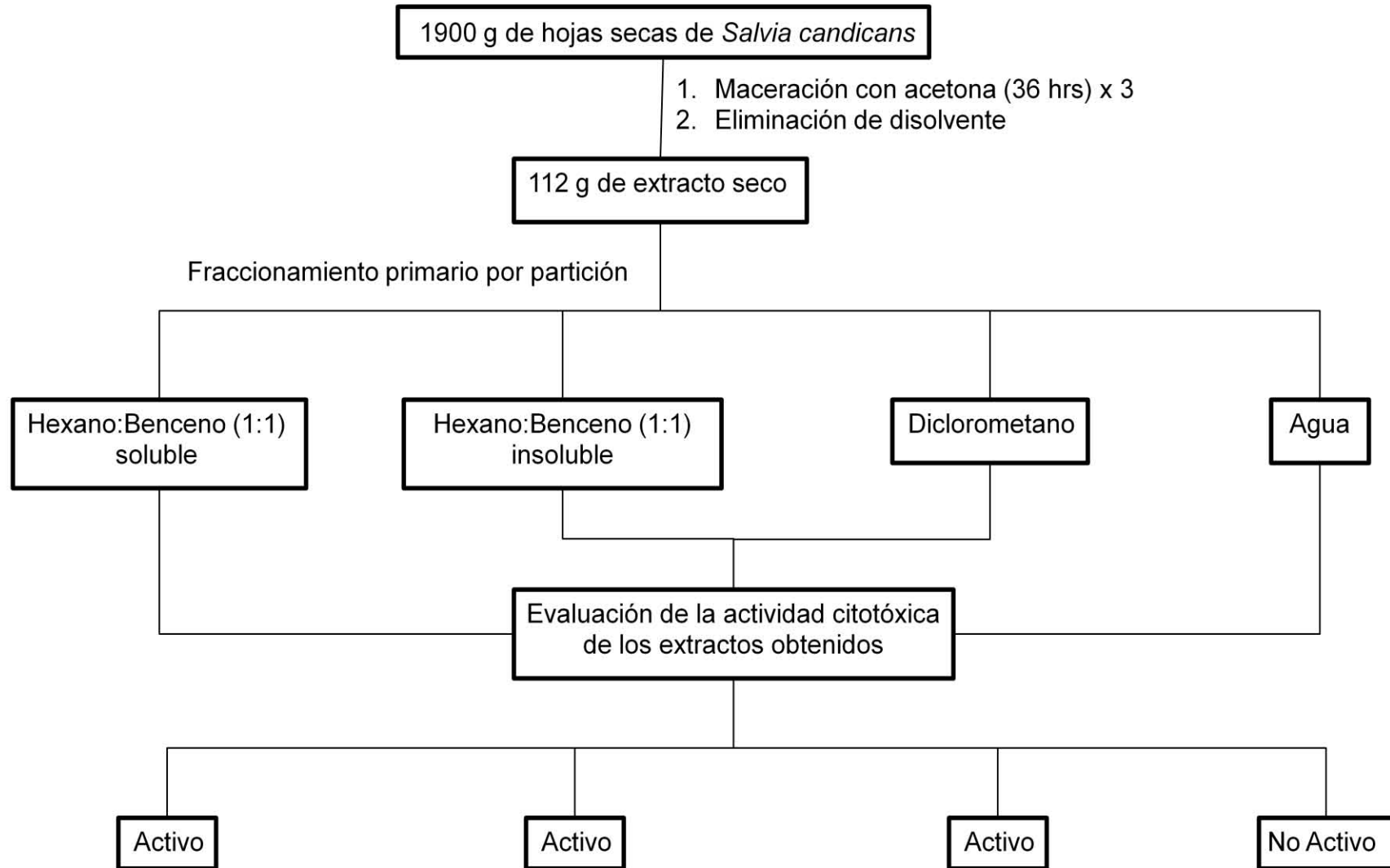


Diagrama 2. Diagrama experimental para el estudio de la actividad citotóxica de las partes aéreas de *Salvia candicans* (Continuación)

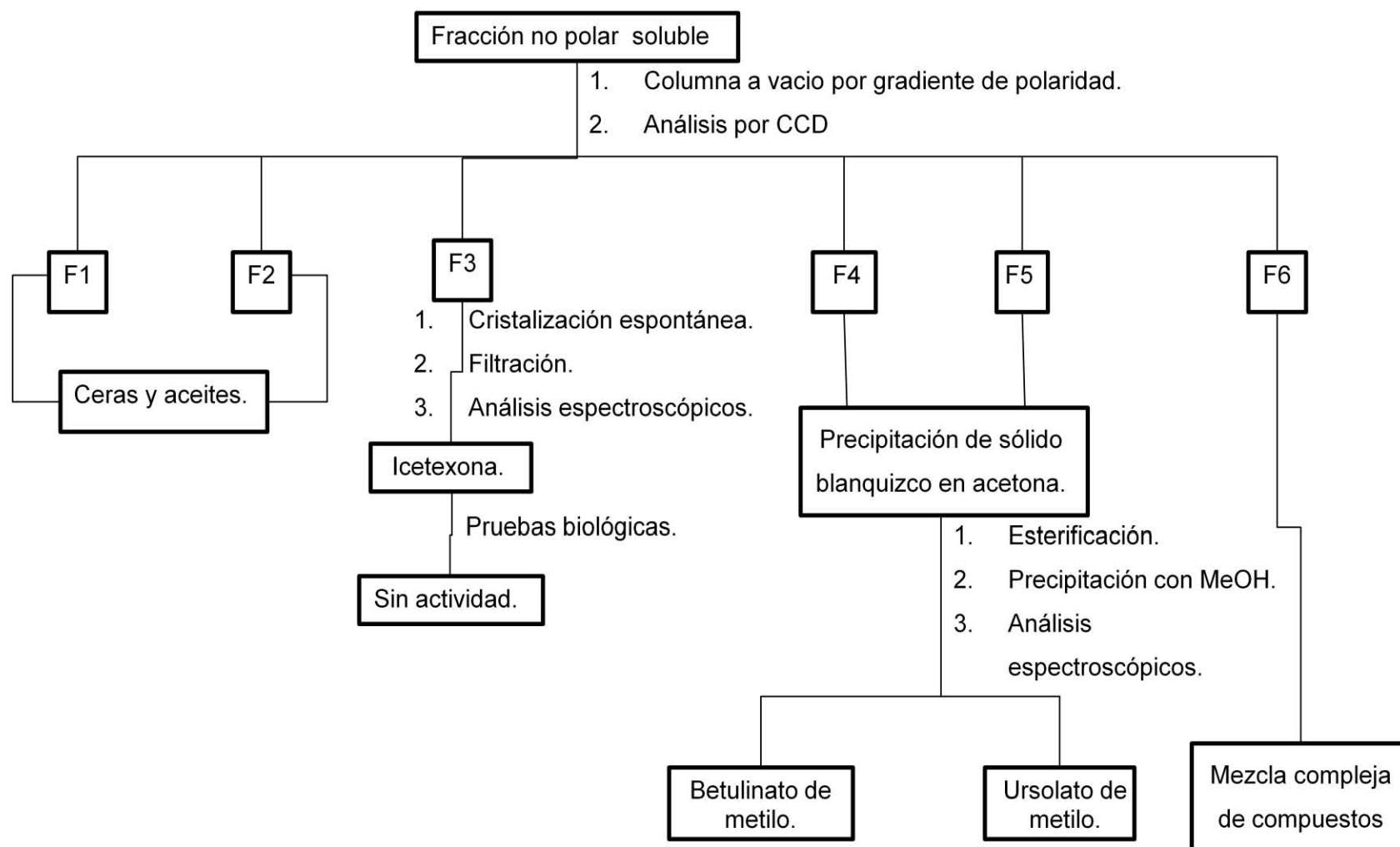
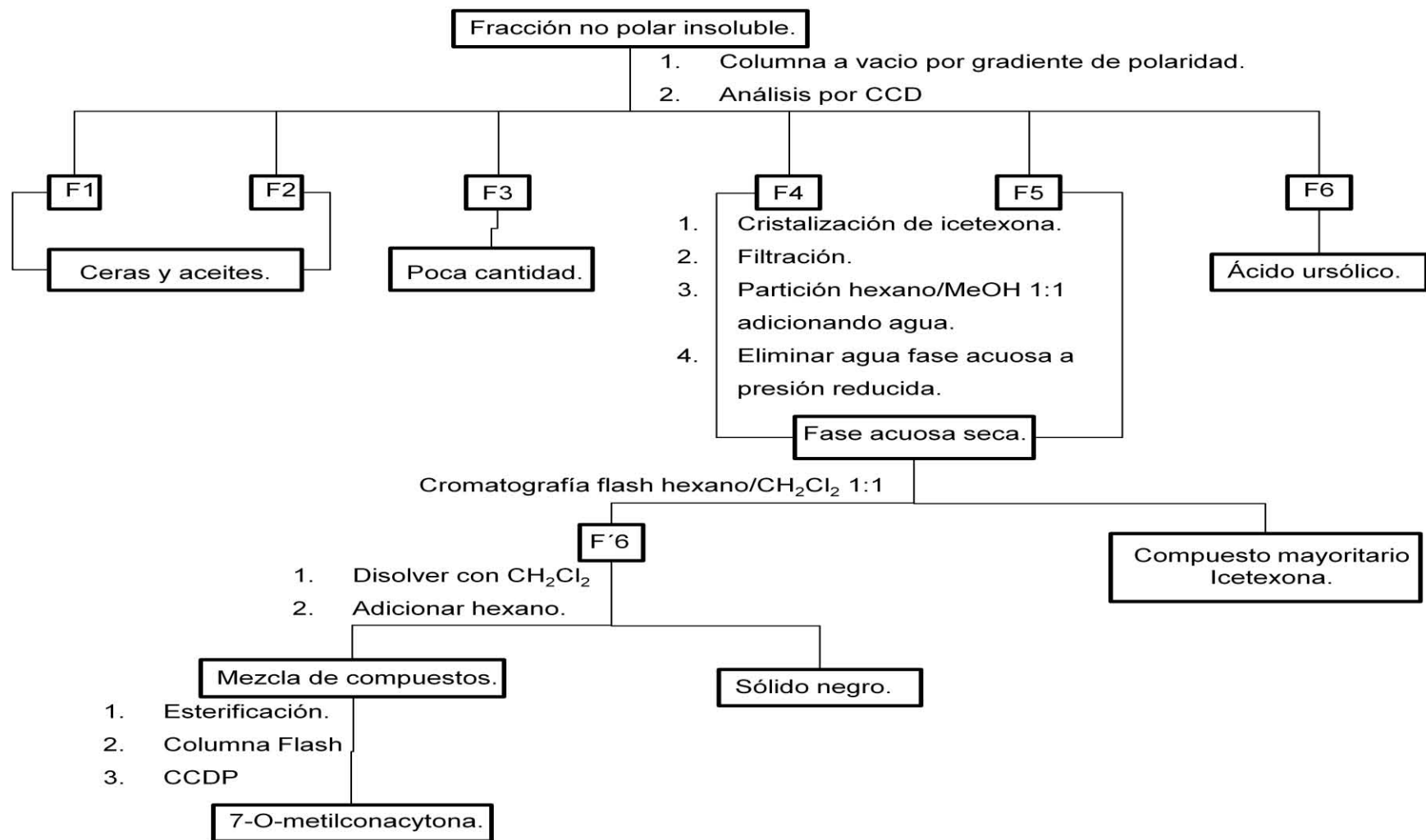


Diagrama 2. Diagrama experimental para el estudio de la actividad citotóxica de las partes aéreas de *Salvia candicans* (Continuación)



#### **4.6. Cromatografía**

Las cromatografías en columna “flash” se realizaron usando la metodología descrita por W. Clark Still. et. al.<sup>30</sup> usando fase estacionaria como 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 GUV<sub>254</sub> 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 mm) 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.

Las cromatografías en columna a vacío se utilizó como fase estacionaria sílica gel 60 Å 70/230 de la marca Aldrich Chemical Company. Esta columna se realizó a gradiente de polaridad, empleando mezclas de elución desde lo no polar hasta lo más polar, usando como eluyentes hexano:acetato de etilo.

Para el caso de las cromatografías en capa delgada preparativa (CCDP, éstas se realizaron en placas de vidrio con sílica G-1000 UV<sub>254</sub> de 1.0 mm de espesor, y un tamaño de 20 x 20 cm de la marca Macherey-Nagel.

#### **4.7. 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  $\text{cm}^{-1}$ .

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y DEPT se obtuvieron en un espectrofotómetro Bruker Avance de 300 MHz utilizando  $\text{CDCl}_3$  y/o  $\text{DMSO-D}_6$  como disolventes y empleando como referencia interna el tetrametilsilano (TMS).

Los espectros de masas fueron determinados en un aparato JEOL-AX505-HA, usando la técnica de impacto electrónico (IE).

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para evaluar si la especie en estudio presenta actividad citotóxica, se obtuvo el extracto de las partes aéreas de la planta por maceración en acetona. Se realizó una partición empleando una mezcla hexano-benceno 1:1 y otra mezcla de metanol-agua al 20% v/v, obteniéndose una fracción polar y una fracción no polar.

A la fracción no polar, se le realizó un segundo fraccionamiento obteniéndose una fracción soluble y otra insoluble, las cuales fueron sometidas a pruebas de citotoxicidad. Los resultados se muestran en la tabla 2.

Como se puede observar, las fracciones resultantes del segundo fraccionamiento presentan un porcentaje de inhibición del 100% en casi todas las líneas celulares, por lo que se decidió continuar con el aislamiento de los metabolitos secundarios que le confieren la actividad biológica.

Porcentajes de Inhibición de Crecimiento a concentración 50 µg/mL				
Fracciones a estudiar.	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Fracción no polar soluble.	Fracción no polar insoluble.	Acuosa.
U251	87.83	100	100	13.19
PC-3	75.78	100	99.2	20.7
K562	88.11	62.2	100	32.04
HCT-15	100	100	100	S.A.
MCF-7	100	100	100	6.5
SKLU-1	85.77	100	100	8.7

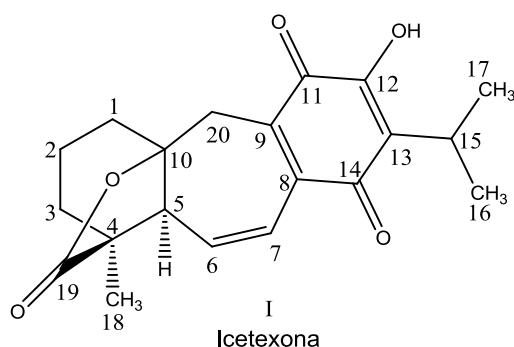
U251: Sistema Nervioso Central; PC-3: Próstata; K562: Leucemia; HCT-15: Colon; MCF-7: Mama; SKLU-1 : Pulmón. S.A. sin actividad.

Tabla 2. Porcentaje de inhibición de crecimiento a concentración 50 µg/mL de los cuatro extractos resultantes.

## 5.1. Purificación de la fracción no polar soluble

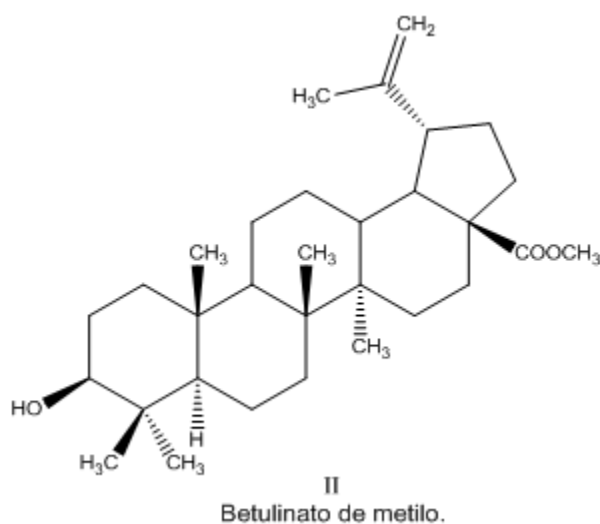
Se realizó una columna a vacío, usando gradientes de polaridad, empleando hexano:acetato de etilo como fase móvil, yendo desde la más baja polaridad hasta la más alta polaridad empleando mezclas de los disolventes antes mencionados. De esta primera columna se obtuvieron 6 fracciones, donde a las dos primeras mostraban apariencia de ser aceites y ceras.

Por otro lado, se observó que al disolver en la fracción 3, resultado de la columna a vacío, cristalizó el compuesto I, siendo posible su obtención por medio de una filtración y lavado del mismo con acetona. Dicho compuesto, es un sólido cristalino naranja con un punto de fusión de 258-260 °C, el cual fue caracterizado por pruebas espectroscópicas IR, RMN ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y DEPT), así como espectrometría de masas correspondiendo a un compuesto previamente aislado, conocido como Icetexona.



De la fracción 4, también se obtuvo Icetexona pero en menor cantidad a comparación de la fracción 3, eliminándola nuevamente por filtración. Una vez eliminada la Icetexona, se observó que al intentar disolver con acetona precipitó un sólido blanco, el cual se filtró y lavó. Posteriormente, se realizó el espectro IR de este sólido y se pudo observar una banda característica de grupos hidroxilo en  $3524\text{ cm}^{-1}$ , así como una banda característica de grupos carbonilo en  $1774\text{ cm}^{-1}$ , concluyéndose que se tenía compuestos con naturaleza ácida, por lo cual, se procedió a realizar una reacción de esterificación con diazometano del grupo ácido, usando como materia prima para su preparación nitrosometilurea de acuerdo a la técnica descrita en la literatura.<sup>31</sup> Posteriormente, se procedió a realizar una columna flash empleando hexano:acetato de etilo 8:2 como eluyente, donde de la subfracción

2, después de haber realizado CCDP utilizando como eluyentes hexano:acetona 9:1 eluida 4 veces, se pudo purificar el compuesto II. El resto de las subfracciones de esta columna, no se tenía la suficiente cantidad de compuesto puro para poder elucidar su estructura.



De la fracción 5, se observó la precipitación en acetona de un compuesto blanco, al cual, se realizó el espectro IR confirmando la presencia de un ácido carboxílico por presencia de la banda característica de un grupo hidroxilo en  $3468\text{ cm}^{-1}$ , así como la de un grupo carbonilo en  $1696\text{ cm}^{-1}$ . Por tanto, se realizó una reacción de esterificación empleando diazometano purificando el compuesto III por medio de la precipitación del mismo en metanol. Este compuesto fue el mayoritario de la fracción.

A la fracción 6, se le realizó una partición con hexano:metanol 1:1, adicionando una pequeña cantidad de agua, con el fin de eliminar la mayor cantidad de triterpenos disponibles, así como clorofilas, posteriormente se le realizó un análisis por espectroscopia IR demostrando la presencia de grupos ácidos carboxílicos, por lo se les hizo una reacción con diazometano. Al realizar un perfil cromatográfico después de la reacción, se observó que la mezcla de componentes era más compleja que antes de hacer dicha reacción.



## 5.2. Caracterización espectroscópica de I: Icetexona

La Icetexona (Fig. 8), es una molécula con esqueleto base de icetexano. Ha sido extraída anteriormente de otras plantas del género *Salvia* como *S. ballotaeflora*, *S. anastomosans* y *S. gilliessi*, por solo mencionar algunas.<sup>32, 33</sup>

Tiene la fórmula molecular  $C_{20}H_{22}O_4$ , determinado por espectrometría de masas, donde el ión molecular se encontró a una relación m/z de 326. El espectro IR se realizó utilizando la técnica de suspensión en nujol. Este espectro muestra una banda ancha de grupos hidroxilo, característica de alcohol en  $3365\text{ cm}^{-1}$ , una señal intensa de lactona de cinco miembros en  $1772\text{ cm}^{-1}$  y dos señales intensas de dos grupos carbonilo provenientes de quinona en  $1630$  y  $1596\text{ cm}^{-1}$ .

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$ , utilizando una mezcla de  $\text{CDCl}_3$  + 2 gotas de  $\text{DMSO-d}_6$  y como referencia TMS; los desplazamientos químicos están en ppm, se observaron las siguientes señales asignadas para algunos de los protones: 2.55 (dd, J= 6, 3 Hz, H-5); 6.40 (dd, J=12, 3 Hz, H-6); 6.85 (dd, J=12, 3 Hz, H-7); 3.18 (hept., J=6 Hz, H-15); 1.23 (d, J=3 Hz, Me-16 y Me-17); 1.25 (s, Me-18); 3.15 y 2.79 (sistema AB, J=12 Hz,  $\text{CH}_2$ -20), 8.90 (s, OH), esta última desaparece con agua deuterada.

Por último, las señales de cada uno de los carbonos presentes en el espectro de  $^{13}\text{C}$  se muestran en la tabla 3.

No. Carbono	Señal RMN $^{13}\text{C}$ (ppm)	No. Carbono	Señal RMN $^{13}\text{C}$ (ppm)	No. Carbono	Señal RMN $^{13}\text{C}$ (ppm)	No. Carbono	Señal RMN $^{13}\text{C}$ (ppm)
1	35.66	6	137.6	11	182.62	16	19.72
2	19.29	7	125.32	12	152.03	17	19.72
3	35.19	8	133.83	13	124.96	18	17.90
4	47.36	9	139.72	14	185.73	19	178.65
5	54.17	10	92.59	15	24.04	20	32.48

Tabla 3. Señales, en ppm, del espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  para el compuesto I.

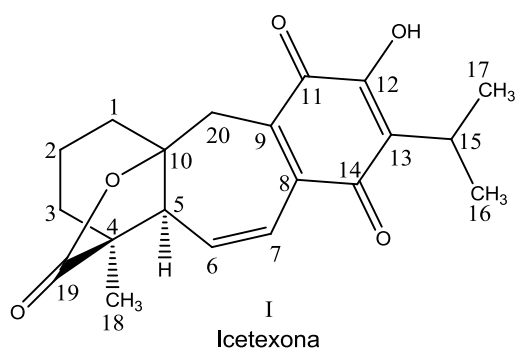


Figura 8. Estructura del compuesto I: Ictetoxona.

### 5.3. Caracterización espectroscópica del compuesto II: Betulinato de metilo

El Betulinato de metilo (Fig. 9) tiene la fórmula molecular  $C_{31}H_{50}O_3$ , determinado por espectrometría de masas, observándose un patrón de fragmentación característico de un esqueleto triterpénico. Presentó un punto de fusión de 178-180 °C. El espectro IR se realizó utilizando la técnica de suspensión en nujol. Este espectro muestra una banda ancha en  $3400\text{ cm}^{-1}$  característica de grupos hidroxilo, una señal intensa en  $1720\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a un grupo carbonilo atribuible a un grupo éster, confirmado por la presencia de una banda intensa en  $1192\text{ cm}^{-1}$ .

Los datos obtenidos del espectro de RMN  $^1\text{H}$  y de RMN  $^{13}\text{C}$ , llevaron a la identificación del compuesto aislado como Betulinato de metilo, lo cual, fue confirmado por comparación con los datos descritos en la literatura.<sup>34</sup> Dado el método de aislamiento, el compuesto identificado corresponde al producto de la esterificación del Ácido betulínico, el cual, es un compuesto de alta incidencia en la naturaleza.

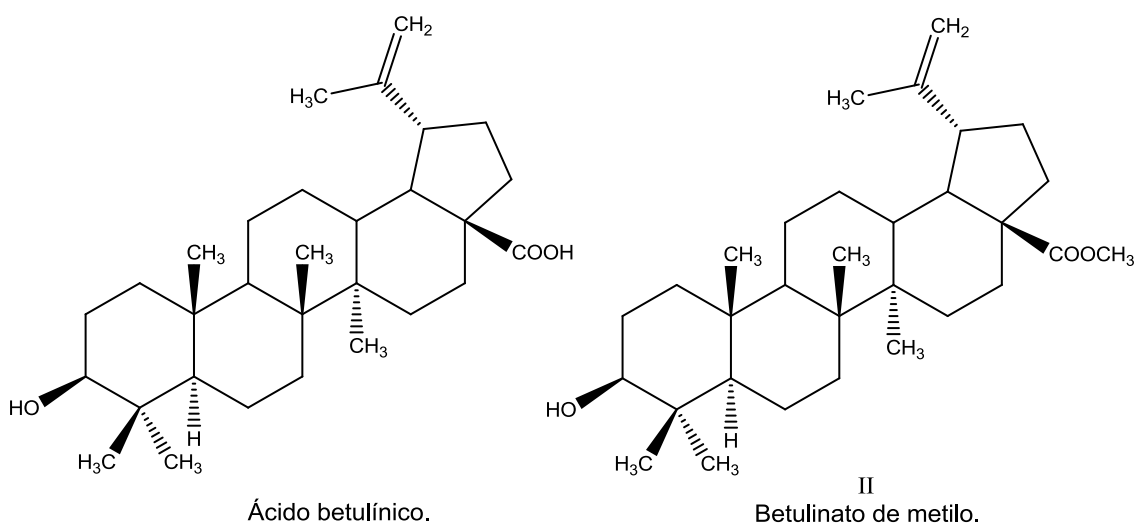


Figura 9. Estructura del compuesto II (Betulinato de metilo) y su precursor (Ácido betulínico).

#### 5.4. Purificación de la fracción no polar insoluble

Al igual que al extracto no polar, se realizó una columna a vacío, usando gradientes de polaridad, empleando una mezcla hexano:acetato de etilo como fase móvil, yendo desde la más baja polaridad hasta la más alta polaridad empleando mezclas de los disolventes antes mencionados. De esta primera columna se obtuvieron 6 fracciones, donde a las dos primeras mostraban la apariencia de ser aceites y ceras.

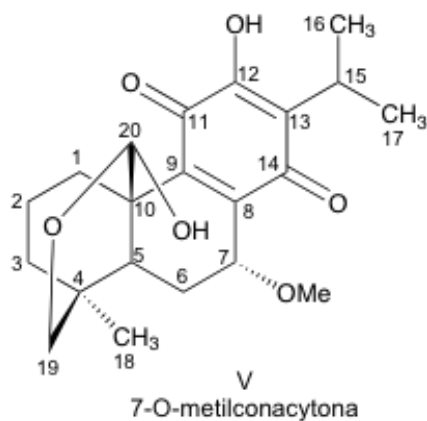
La fracción 3 no fue posible trabajarla debido a la poca cantidad que se tenía de dicha fracción, así como la complejidad de la mezcla.

De la fracción 6, se pudo purificar el compuesto IV gracias a su poca solubilidad en acetona, como en otros disolventes, por medio de precipitación, siendo el mayoritario de la fracción. No fue necesario realizar la reacción de esterificación con diazometano.

De la fracción 4 y 5 nuevamente cristalizó la Icetexona, eliminando la mayoría de la misma por filtración y lavado con acetona. En la fracción 5, la Icetexona fue el compuesto mayoritario. Posteriormente, a la fracción 4, se realizó una partición con hexano:metanol 1:1, adicionando una pequeña cantidad de agua, con el fin de eliminar la mayor cantidad de triterpenos disponibles, así como clorofilas.

Una vez seca la fracción 4, se realizó una columna flash empleando como eluyentes hexano:diclorometano 1:1, obteniéndose 6 subfracciones, donde a la subfracción 6 se disolvió en diclorometano y se adicionó hexano, precipitando una impureza no identificada, la cual fue filtrada. Al filtrado, observándose que presentaba sólidos blancos, señal de posibles triterpenos ácidos, se realizó una esterificación con diazometano; posteriormente una columna flash empleando hexano:acetato de etilo 9:1 como eluyentes. De esta columna resultaron 7 subfracciones.

De la subfracción 2, por medio de CCDP usando hexano:acetona 9:1 como eluyentes, eluida 4 veces, se pudo purificar V.



### 5.5. Caracterización espectroscópica del compuesto III y IV: Ursolato de metilo y Ácido ursólico

El ácido ursólico (Fig. 10) es un sólido blanco opaco con un punto de fusión de 255-257 °C. El ion molecular en el espectro de masas se encontró a una relación m/z de 456, correspondiente a una fórmula molecular de  $C_{30}H_{48}O_3$  y el patrón de fragmentación característico de los triterpenos. El espectro de IR muestra bandas de absorción en  $3468\text{ cm}^{-1}$ , características de un grupo hidroxilo y  $1696\text{ cm}^{-1}$  proveniente de un carbonilo de ácido.

Por otro lado el ursolato de metilo (Fig. 10), producto de reacción entre el ácido ursólico y el diazometano, es un sólido blanco, insoluble en metanol, que tiene un punto de fusión de 156-158 °C. El ion molecular en el espectro de masas se encontró a una relación m/z de 470, correspondiente a una fórmula molecular

de  $C_{31}H_{50}O_3$  y el patrón de fragmentación característico de los triterpenos. El espectro de IR reveló una señal ancha en  $3351\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a grupos hidroxilo de alcohol, una señal en  $1726\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a un carbonilo de éster. Cabe señalar, que la banda secundaria del grupo éster en  $1200\text{ cm}^{-1}$  no se aprecia con mucha claridad, pero se puede concluir que es un éster, debido a que la longitud de onda que presenta este carbonilo con respecto al compuesto ácido se encuentra a valores mayores.

Comparando los espectros de  $^1\text{H}$  del compuesto sin acetilar con el compuesto acetilado, se observa la aparición de un singulete en  $3.62\text{ ppm}$ , no encontrándose en el compuesto ácido, indicando la presencia del grupo metilo del éster. Por último, se corroboró en la literatura el resto de las señales indicando que el producto inicial obtenido fue el ácido ursólico<sup>34,35</sup> y el compuesto obtenido después de la reacción de metilación fue el Ursolato de metilo.

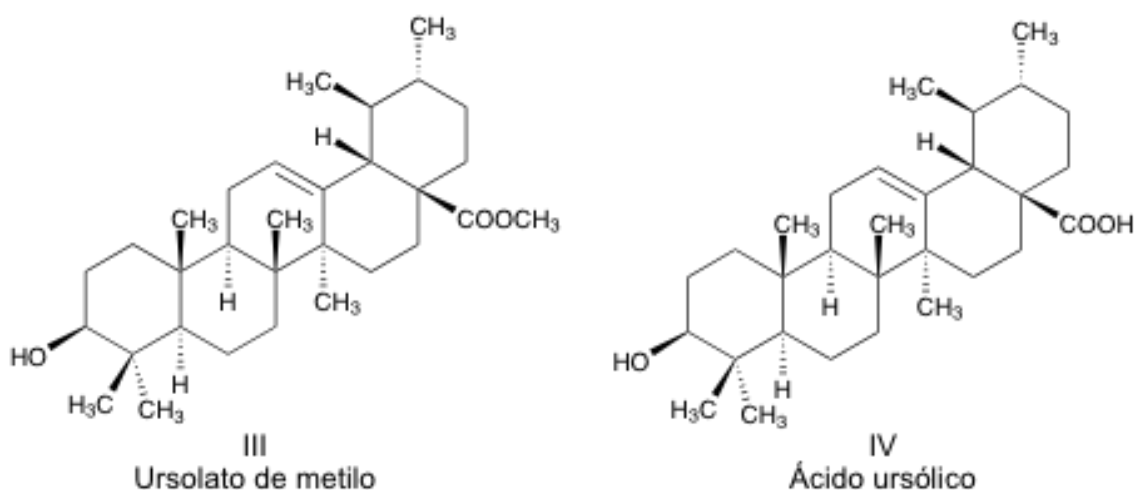


Figura 10. Estructura del compuesto III (Ursolato de metilo) y del compuesto IV (Ácido ursólico).

## 5.6. Caracterización espectroscópica del compuesto V:

### 7-O-metilconacytona

La 7-O-metilconacytona (Fig. 11), es una molécula diterpénica con esqueleto base de abietano. Anteriormente este compuesto ya había sido aislado de *Salvia candicans* y *Salvia anastomosans*. Su identificación fue corroborada por comparación con los datos espectroscópicos descritos en la literatura a partir de la oxidación de este compuesto con el reactivo de Jones.<sup>20, 36, 37</sup>

Presenta una fórmula molecular  $C_{21}H_{28}O_6$ , determinada por espectrometría de masas, donde el ión molecular se encontró a una relación m/z de 376. Este compuesto tiene un punto de fusión entre 210-213 °C.

En el espectro de RMN  $^1H$ , utilizando como disolvente  $CDCl_3$ , y como referencia TMS, en ppm, se observaron las siguientes señales asignadas para algunos de los protones: 4.43 (dd,  $J=3, 2$ , Hz, H-7), 3.21 (hept.,  $J=8$  Hz, H-15); 1.25 (d,  $J=8$  Hz, Me-16), 1.22 (d,  $J=8$  Hz, Me-17), 0.82 (s, Me-18), 3.85 (dd,  $J=8, 2$  Hz, H-19), 3.33 (dd,  $J=12, 4$  Hz, H-19), 5.61 (s, H-20), 3.46 (s, O-Me), 7.07 (s, OH), este último desaparece con agua deuterada.

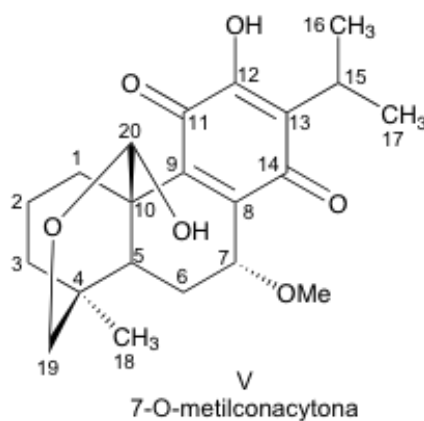


Figura 11. Estructura del compuesto V: 7-O-metilconacytona.

Según los estudios previos que se tienen de este compuesto, se cree que la 7-O-metilconacytona puede ser un derivado del producto natural aislado de *S. ballotaeflora* y *S. pubescens*, que se denominó Conacytona. Este producto puede ser formado por el uso de metanol en el extracto original, más sin embargo, para poder corroborar esta hipótesis se tendría que realizar nuevamente la extracción de esta planta evitando el uso de metanol.<sup>36, 37</sup>

## 5.7. Actividad citotóxica de los compuestos I y V

Para realizar los ensayos de citotoxicidad se tomaron en cuenta los compuestos Icetexona y 7-O-metilconacytona, que presentaron solubilidad en DMSO.

Porcentaje de inhibición de crecimiento a concentración 50 µg/mL.						
Compuesto	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1
Icetexona	2.5	17.6	28.2	18.9	17.2	8.7
7-O-metilconacytona	30.95	50.32	100	100	57.14	62.48

U251 : Sistema Nervioso Central; PC-3 : Próstata; K562 : Leucemia; HCT-15 : Colon; MCF-7 : Mama; SKLU-1 : Pulmón.

Tabla 4. Estudio preliminar de la actividad citotóxica de Icetexona y 7-O-metilconacytona.

El estudio preliminar de la actividad citotóxica mostró que la Icetexona no tiene actividad biológica importante, a comparación de la 7-O-metilconacytona, que mostró actividad importante en las líneas celulares de K562 y HCT-15. Por tal motivo, se realizó una curva de IC<sub>50</sub> para cada línea celular (Tabla 5).

Compuesto	K562	HCT-15
7-O-metilconacytona	18.78 ± 0.6 µM	16.98 ± 0.8 µM
Doxorrubicina	14 ± 0.9 nM	5 ± 0.9 nM

Tabla 5. Actividad anticancerígena de 7-O-metilconacytona.

En la tabla 5 se observa la concentración a la cual se tiene un IC del 50%, comparándose a la 7-O-metilconacytona con la referencia empleada, Doxorrubicina, siendo menos activo el diterpeno con respecto a la referencia, pero se puede considerar que la actividad de dicho compuesto es buena.

Adicionalmente, a la Icetexona se le realizó la prueba de inhibición de peroxidación de lípidos en cerebro de rata por el método de TBARS dando como resultado que a una concentración máxima de 100 µM se obtuvo el 17.03% de actividad, así como la prueba de actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido con TPA empleando una dosis de 0.31 µmol/oreja resultó tener el 14.71% de inhibición, concluyendo que para ambas pruebas,

este compuesto presenta una actividad muy baja. Para la 7-O-metilconacytona no se realizaron estas pruebas por la pequeña cantidad de muestra que se logró aislar.



## 6. CONCLUSIONES

El estudio de los componentes anticancerosas de *Salvia candicans* llevó a la identificación de cuatro compuestos ya descritos previamente en la literatura. Dos compuestos activos de naturaleza triterpenoide: Ácido ursólico y Ácido betulínico. Dos compuestos de naturaleza diterpénica: Icetexona y 7-O-metilconacytona.

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

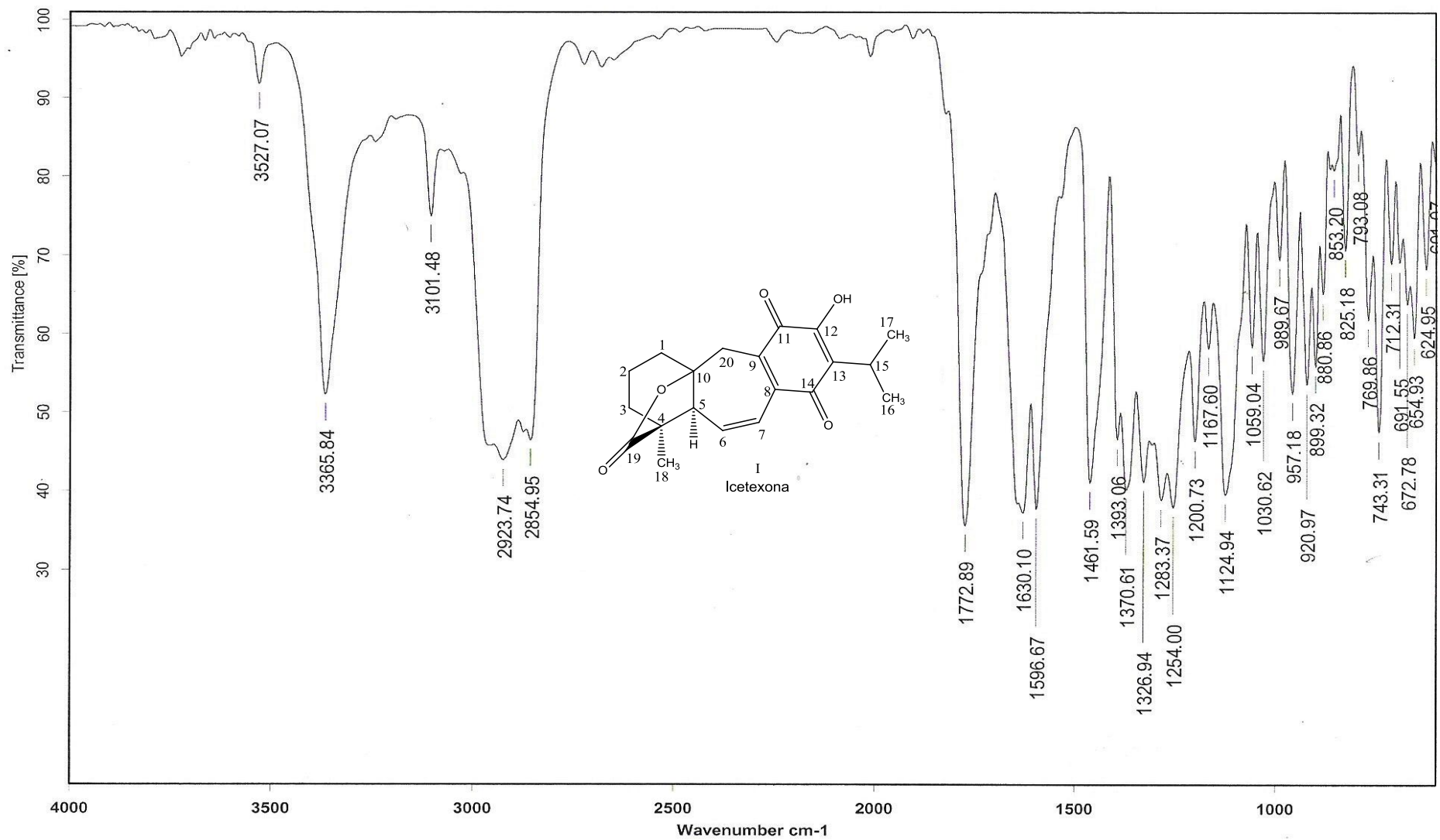
La Icetexona, siendo uno de los componentes mayoritarios del extracto, no mostró actividad en las pruebas biológicas realizadas: citotoxicidad, antiinflamatoria y antioxidante, en los modelos propuestos.

Por otro lado, la 7-O-metilconacytona mostró tener actividad significativa en las líneas celulares K562 y HCT-15, demostrado a través de las  $IC_{50}$  calculadas para cada una de las líneas celulares.

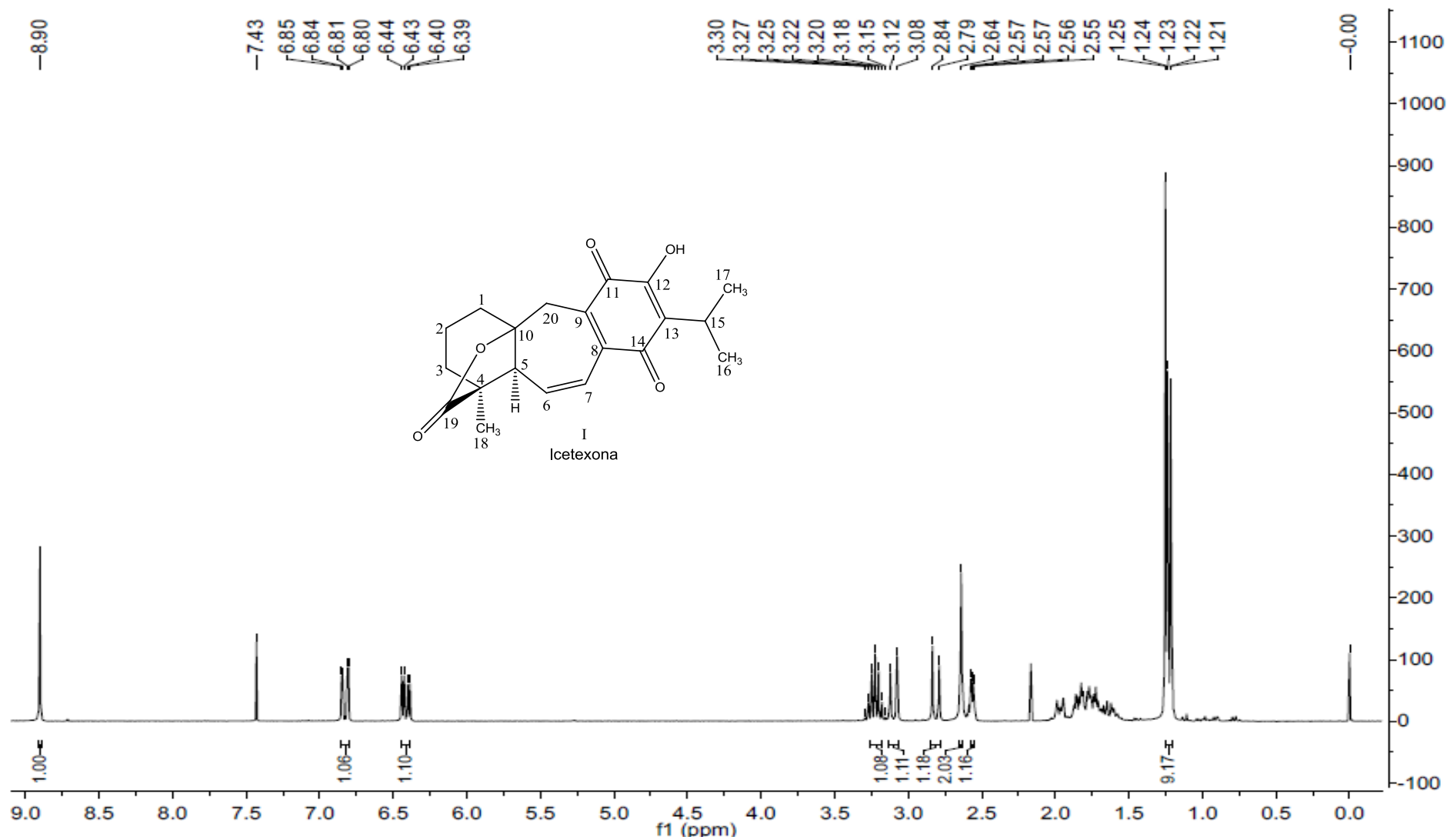
Se propone que la 7-O-metilconacytona no se encontraba inicialmente en el extracto acetónico de la planta, sino que es un producto de reacción entre la Conacytona y el metanol usado como disolvente, por lo que se sugiere realizar nuevamente estudio de esta especie evitando el uso del mismo.

Finalmente, se puede afirmar que los componentes que confieren actividad citotóxica a *Salvia candicans* presentan una estructura triterpenoide, así como el diterpeno antes mencionado, aunque se infiere que la actividad del extracto crudo de la especie en estudio se debe probablemente a la presencia del ácido ursólico, el cual es el compuesto en mayor proporción.

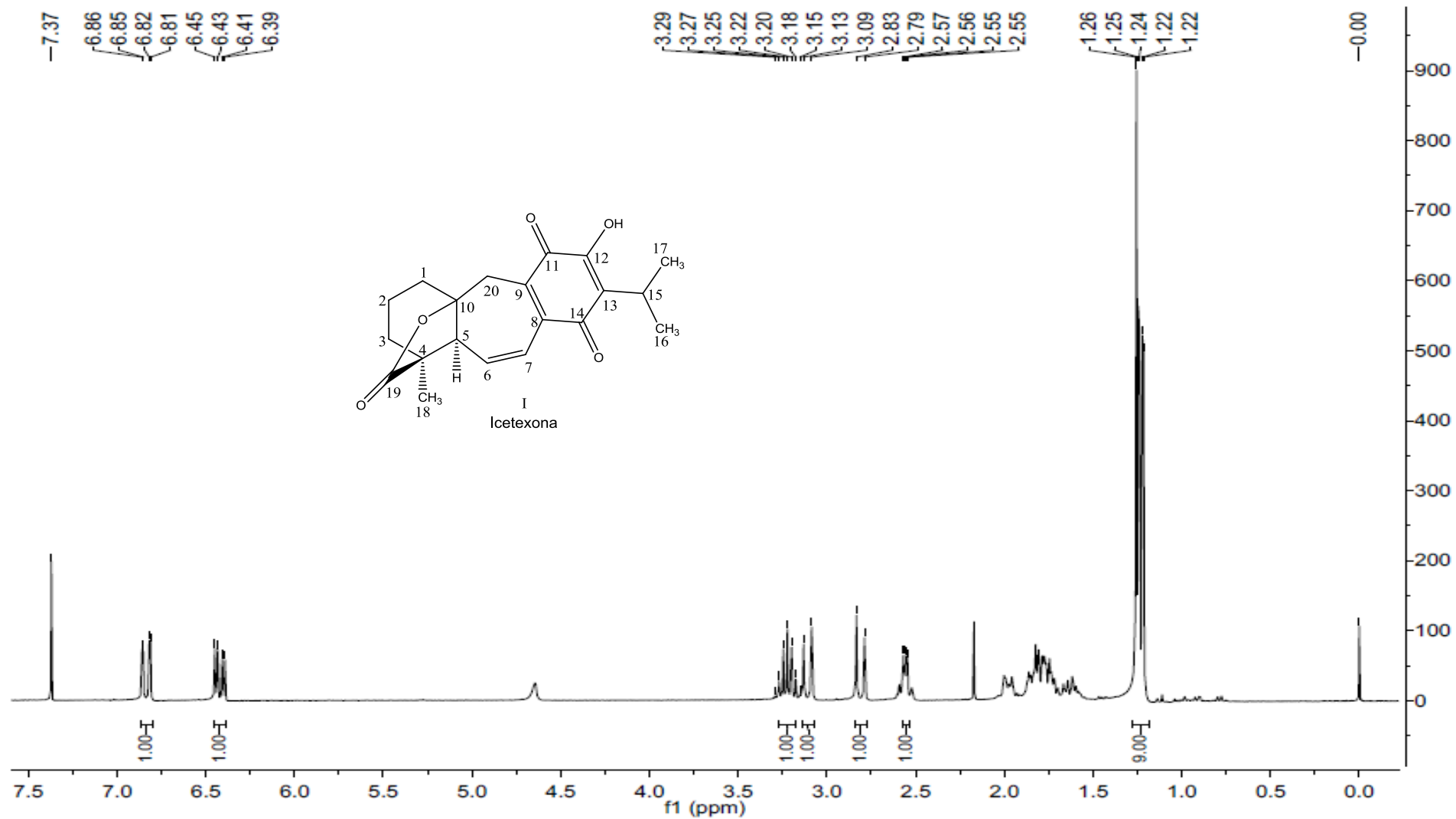
# 7. ANEXOS



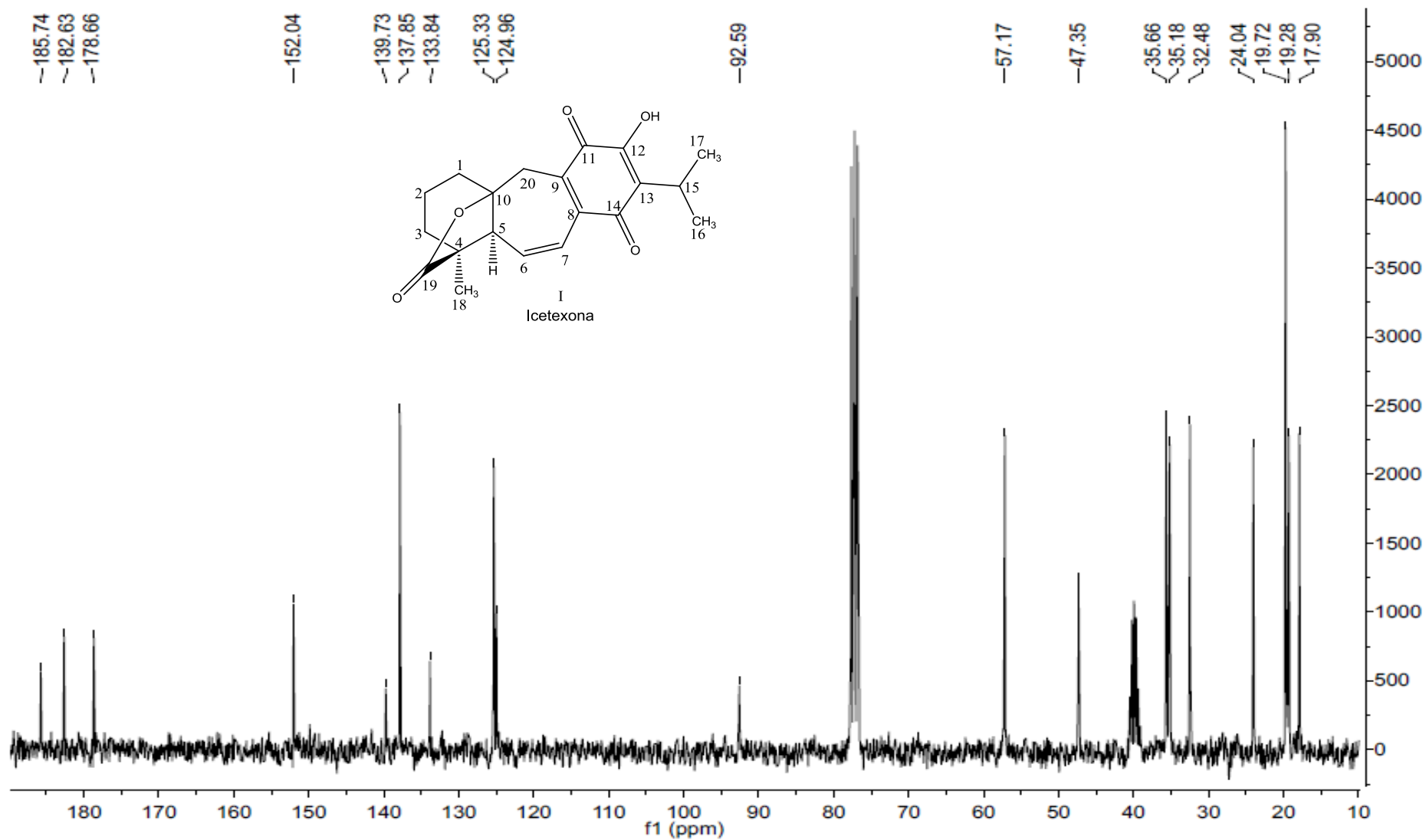
Espectro 1. IR (suspensión en nujol) para el compuesto I.



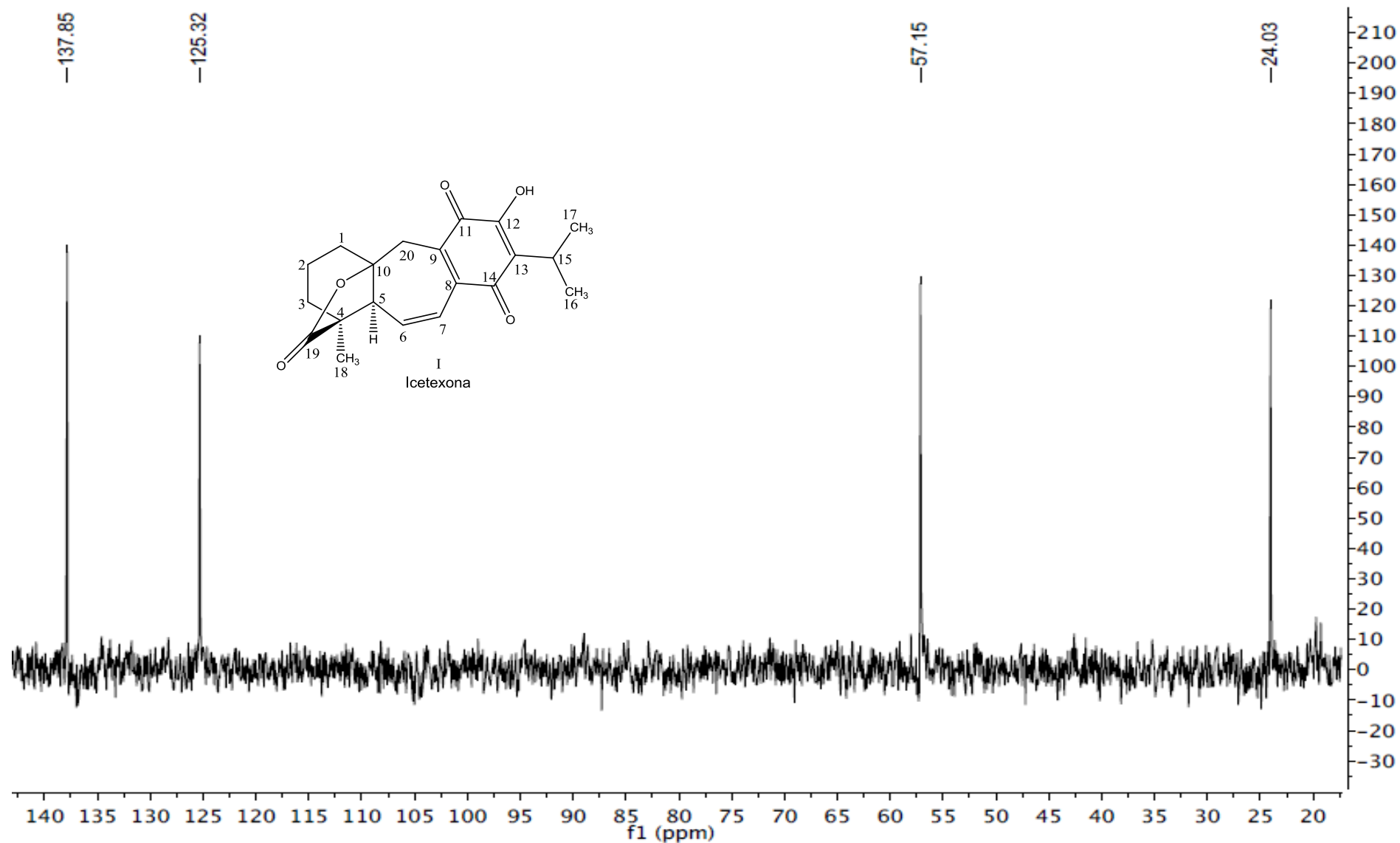
Espectro 2. RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-d}_6$ ) para el compuesto I.



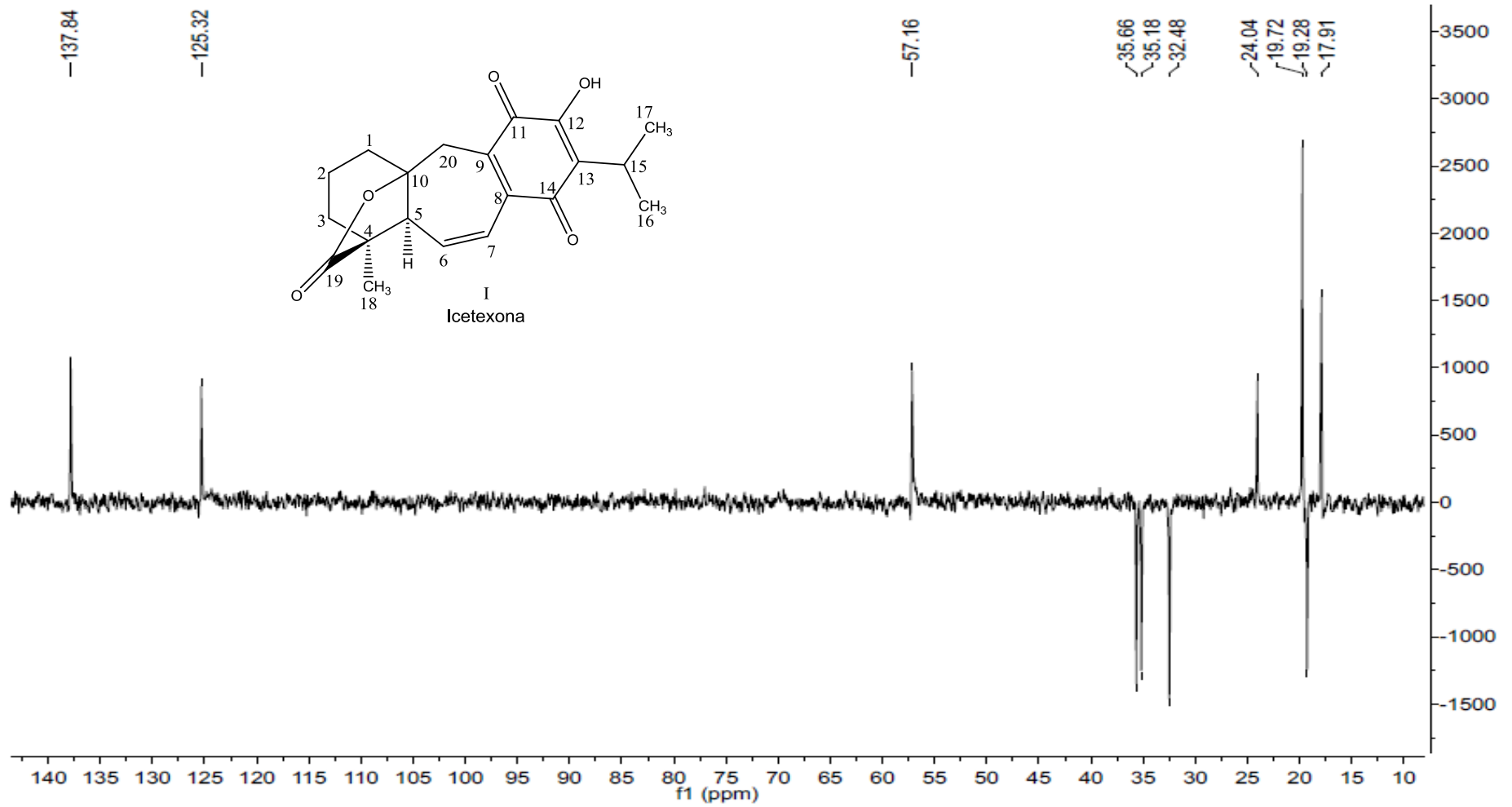
Espectro 3. RMN  $^1\text{H}$  +  $\text{D}_2\text{O}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$  +  $\text{DMSO-d}_6$ ) para el compuesto I.



Espectro 4. RMN <sup>13</sup>C (300 MHz, CDCl<sub>3</sub> + DMSO-d<sub>6</sub>) para el compuesto I.

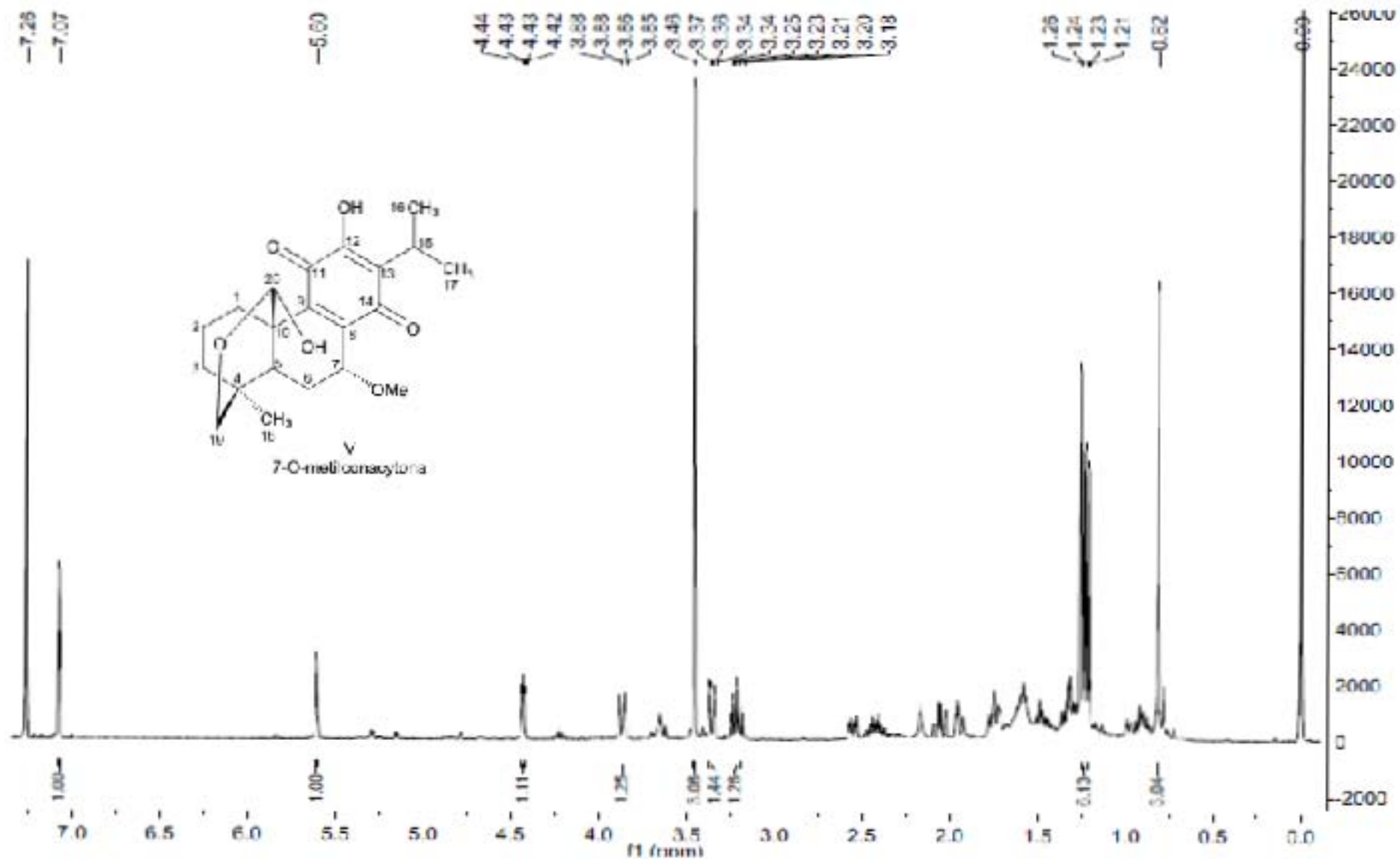


Espectro 5. RMN DEPT 90 (300 MHz,  $\text{CDCl}_3 + \text{DMSO-d}_6$ ) para el compuesto I.

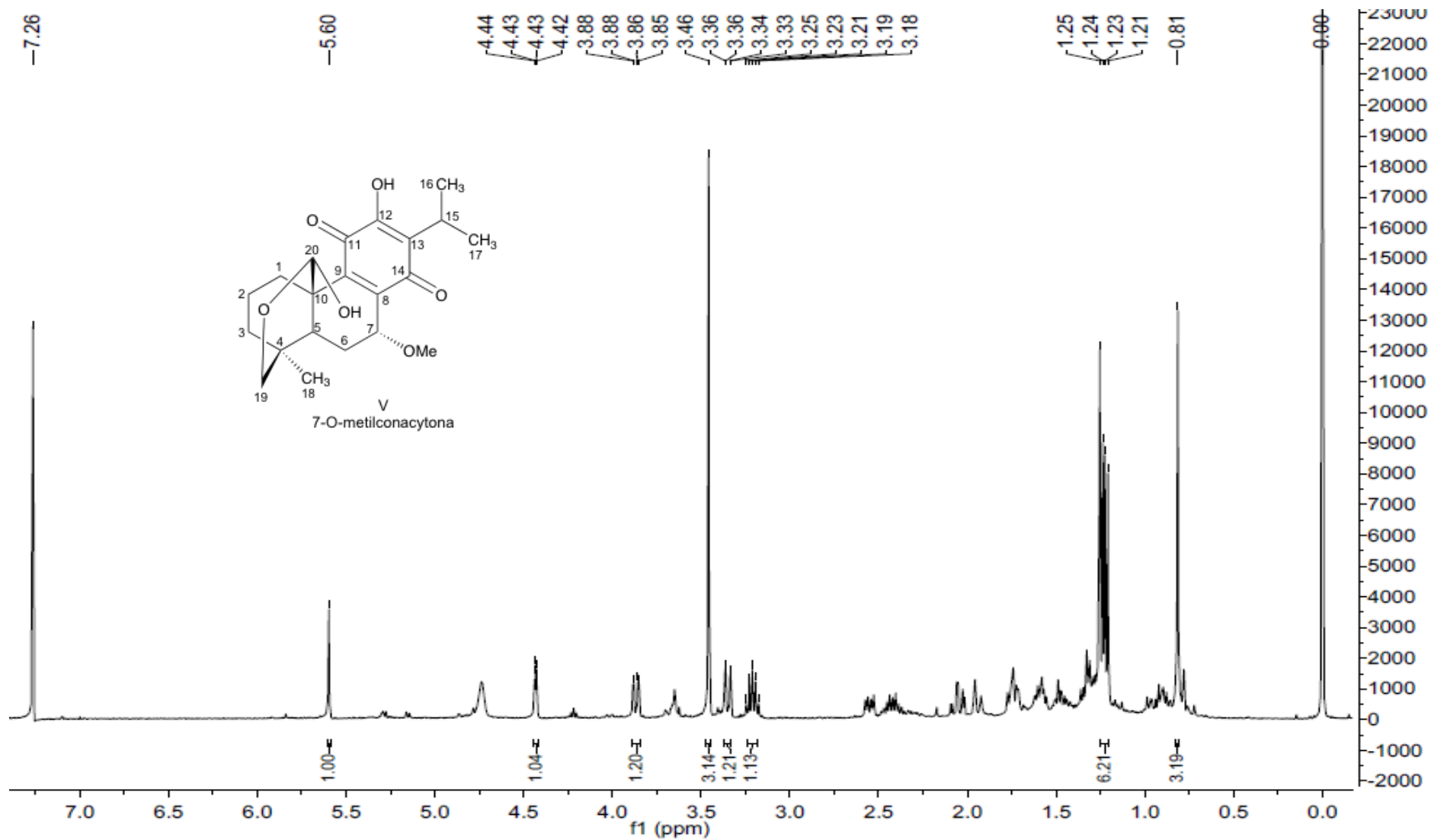


Espectro 6. RMN DEPT 135 (300 MHz, CDCl<sub>3</sub> + DMSO-d<sub>6</sub>) para el compuesto I





Espectro 7. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) para el compuesto V.



Espectro 8. RMN  $^1\text{H}$  +  $\text{D}_2\text{O}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para el compuesto

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Tesis para maestría: Ramírez, A. L. (2001) Estudio fitoquímico del género *Pronosciadium Toconcendii* Rose: estudio hemerográfico de diterpenos con esqueleto de abietano, aislados del género *Salvia*. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, UNAM.
2. Newman, D.; Cragg, G. (2012) Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*. 75, 311-335.
3. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html> (consultada en julio 17 del 2012)
4. Karp, G. (2005) Biología celular y molecular. Editorial McGraw-Hill Interamericana. 4<sup>o</sup> Edición. México, 720-721.
5. Esquivel, B.; Calderón, J.; Arano, M.; Hernández, P.; Sánchez, A. (2005) Diterpenoids from the roots of Mexican *Salvia* Species. Phylogeographical and evolutionary significance. *Revista Latinoamericana de Química*, 33, 82-89.
6. Esquivel, B. (2008) Rearranged clerodane and abietane derived diterpenoids from American *Salvia* species. *Natural Products Communications*, 3, 989-1002.
7. Bedolla-García, B.; Lara-Cabrera, S.; Zamudio, S. (2011) Dos nuevas especies de *Salvia* (Lamiaceae) del centro occidente de México. *Acta Botanica Mexicana* 95: 51-63.
8. Wood, J. R.; Harley, R. M. (1989) The Genus *Salvia* (Labiatae) in Colombia. *Kew Bulletin* 44, 211-278.
9. Esquivel, B.; Calderón, J.; Arano, M.; Hernández, P.; Sánchez, A. (2005) Diterpenoids from the roots of Mexican *Salvia* Species. Phylogeographical and evolutionary significance. *Revista Latinoamericana de Química*, 33, 82-89.
10. Bernotiene, G.; Niviskiene, O.; Butkiene, R.; Mockute, D. (2007) Essential oil composition variability in sage (*Salvia officinalis* L.) *Chemistry and Biodiversity*. Vol. 18, No. 4, 98-104.
11. Kintzios, S. Editor. (2005) SAGE The Genus *Salvia*. Editorial Harwood Academic Publishers. Gran Bretaña. 143-144.

12. Lee, W.; Cheung, C.; Liu, K.; Fung, K.; Wong, J.; Lai, P.; Yeung, J. (2009) Cytotoxic Effects of Tanshinones from *Salvia miltiorrhiza* on Doxorubicin-Resistant Human Liver Cancer Cells. *Journal of Natural Products*, 2010, Vol. 73, No. 5, 854 – 859.
13. Topçu, G. (2006) Bioactive Triterpenoids from *Salvia* Species. *Journal Natural Products*, 69, 482-487.
14. Ortega, A.; Cardenas, J.; Toscano, A.; Maldonado, E.; Aumelas, A.; Van Calsteren, M.; Jankowski, C. (1991) Salviadulines A and B. Two secoclerodane diterpenoids from *Salvia lavanduloides*. *Phytochemistry*, Vol. 30, No. 10, 3357 – 3360.
15. Tesis para Doctorado: Munro T. (2006) The Chemistry of *Salvia divinorum*. Department of Chemistry The University of Melbourne.
16. Instituto de Biología. "*Salvia candicans* - IBUNAM:MEXU:OAX438545". UNIBIO: Colecciones Biológicas. <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:OAX438545> (consultada en julio 17 del 2012)
17. Standley, P. C. Trees and Shrubs of Mexico. Contributions from the United States National Herbarium. Vol. 23. Smithsonian Institution. Washington Government Printing Office. 1920-1926. p, 1281
18. <http://www.theplantlist.org/tpl/record/kew-182257> (consultada en julio 17 del 2012)
19. Weller, S. Plantas de la reserva de la biosfera Tehucán-Cuicuatlán. Vol. I: Especies de Puebla. Peace Corps México.
20. Cárdenas, J.; Rodríguez-Hahn, L. (1995) Abietane and Icetexane Diterpenoids from *Salvia candicans*. *Phytochemistry*, 38, 199-204.
21. Esquivel, B.; Sánchez, A.; Vergara, F.; Matus, W.; Hernandez-Ortega, S.; Ramírez-Apam, M. (2005) Abietane diterpenoids from the roots of some Mexican *Salvia* species (Labiatae): Chemical diversity, phylogeographical significance and cytotoxic activity. *Chemistry and Biodiversity*, 2, 738-747.
22. Tesis para maestría: Hernández, P. (2005) Estudio químico biodirigido de las raíces de *Salvia candicans*. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, UNAM.

23. Fraga, B.; Díaz, C.; Guadaño, A.; Gonzalez-Coloma, A. (2005) Diterpenes from *Salvia broussonetii* Transformed Roots and Their Insecticidal Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53:5200-5206.
24. Hernández-Pérez, M.; Rabanal, R.; Arias, A.; Torre, M.; Rodriguez, B. (1999) Aethiopinone, an Antibacterial and Cytotoxic Agent from *Salvia aethiopis* Roots. *Pharmaceutical Biology*, 37(1): 17–21
25. Habibi, Z.; Eftekhari, F.; Samiee, K.; Rustaiyan, A. (2000) Structures and Antibacterial Activity of a New Labdane Diterpenoid from *Salvia leriaefolia*. *Journal Natural Products*, Vol. 63, No. 2, 270 – 271.
26. Simpson, B.; Claudie, D.; Gerber, J.; Wang, J.; McKinnon, A.; Semple, S. (2011) In Vivo Activity of enzoylester Clerodane Diterpenoids Derivates from *Dodonaea poliantha*. *Journal Natural Products*. 74, 650-657.
27. McChesney, J.; Venkataraman, S.; Henri, J. (2007) Plant natural products: Back to the future or into extinction. *Phytochemistry*, 68, 2015-2022.
28. Ferrer, A., Hernández, M., Serafín, C., Basterrechea, M., Fuentes, V., Torres, F. (2007) Aislamiento de ácido ursólico de las hojas de *Cestrum laurifolium* L'Herit. *CENIC Ciencias Químicas*, Vol. 38, No. 1, 243-247.
29. Alcalde, M., Del Pozo, A. (2004) Ácido ursólico. *Farmacia práctica. Formación Permanente en Dermofarmacia*. Vol. 23, No. 10, 153-155.
30. Still, W. C.; Kahn, M.; Mitra, A. (1978) Rapid Chromatographic Techniques for Preparative Separation with Moderate Resolution. *Journal Organic Chemistry*, 43 (14), p 2923-2925.
31. Roger, Adams. Organic Synthesis Coll, Vol. 2. John Wiley & Sons, ed. 1965, p 165-167.
32. Nieto M, García E, Giordano O, Tonn C. (2000) IceTexane and Abietane Diterpenoids from *Salvia gilliessi*. *Phytochemistry*, 53, 911-915.

33. Esquivel B, Calderón J, Flores E, Sánchez AA, Rosas R (1997) Abietane and Icetexane Diterpenoids from *Salvia ballotaeflora* and *Salvia Axillaris*. *Phytochemistry*, 46, 531-534.
34. Seebacher, W.; Simic, N.; Weis, R.; Saf, R.; Kunert, O. Spectral Assignments and Reference Data, Complete Assignments of  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR Resonance of Oleanolic Acid, 18a-oleanolic acid, Ursolic Acid and their 11-oxo derivatives. *Magn. Reson. Chem.* 2003, 43, 636-638.
35. Charles, J; Behnke, P.J. The Aldrich Library of  $^{13}\text{C}$  &  $^1\text{H}$  FT Spectra. 1st ed, USA, 1993, p. 595.
36. Tesis para maestría: Cárdenas, R. (1992) Estudio fitoquímico de Diterpenos de *Salvia candicans* (secc. *Tomentellae*), RMN  $^{13}\text{C}$  de Diterpenos con esqueleto de Abietano e Icetexano. Facultad de Ciencias Químicas e Industriales División de Estudios de Posgrado, Cuernavaca Morelos.
37. Sánchez, C. (1987) Estudio Quimiotaxonómico de *Salvia goldmanii* y *Salvia anastomosans*. Tesis Maestría UNAM.