



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS
DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**Estudio químico y antifúngico *in vitro* de tres especies
del género *Salvia* (Familia: Lamiaceae) del Estado de
Michoacán**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS QUÍMICAS
PRESENTA

M. en C. Mónica Alicia Calderón Oropeza

DIRECTORA
D.C. ROSA ELVA NORMA DEL RÍO TORRES

CODIRECTOR
D.Q. MARIO ARMANDO GÓMEZ HURTADO

MORELIA, MICHOACÁN

FEBRERO DE 2021

DEDICATORIA

A mi familia, por su comprensión y apoyo

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo y al Programa de Doctorado por permitirme continuar con mi formación académica.

Al Programa para el Desarrollo Profesional Docente, Dirección de Superación Académica por la beca otorgada, Apoyo para Estudios de Posgrado de Alta Calidad 2017 y a la Universidad del Mar por darme la oportunidad de desarrollarme profesionalmente y permitirme conocer con mayor profundidad el mundo académico.

Mi más amplio agradecimiento a los integrantes de mi comité tutorial, los doctores Hugo Alejandro García Gutiérrez, Gabriela Rodríguez García y Mauro Manuel Martínez Pacheco por sus valiosas aportaciones para mejorar este trabajo.

Al Q.F.B. José Manuel Zaragoza Ríos y DC. Concepción Armenta Salinas por la adquisición de los espectros de RMN y al M.C. José Luis Salvador Hernández por la adquisición de los cromatogramas y espectros de masas en el IIQB-UMSNH.

A mis compañeros y amigos de laboratorio Gabi, Sinuhé, Odessa, Viri, Eva, Goretti, Monse, Irving, Héctor, Toño, Dalia, Ernesto y Armando por los momentos compartidos y su disposición para ayudar en todo momento. De igual forma agradezco a todos los compañeros que forman parte del Laboratorio de Fisiología Celular, en especial al M.C. Alberto Flores y la D.C. Rosy Espinoza por su apoyo y amistad.

A mis directores de tesis, el D.Q. Mario Armando Gómez Hurtado por su valiosa asesoría, pero sobre todo por contagiar su entusiasmo y emoción hacia la investigación. A la Dra. Rosa Elva Norma del Río Torres, por su apoyo, confianza, paciencia y disposición para compartir sus conocimientos, por esa huella que deja en cada uno de nosotros sus estudiantes, es un honor formar parte de su equipo.

A mis padres, por su comprensión y apoyo incondicional, por darme un lugar privilegiado en su corazón. A José, por su amor, compañía y paciencia, por ser mi apoyo constante, un gran esposo y un mejor padre. A Sofía y Diego, los dos maravillosos regalos que la vida me ha dado, gracias por iluminar mi vida con su alegría y amor incondicional.

El presente trabajo se desarrolló en los laboratorios de Química de Productos Naturales y Fisiología Celular del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, así como en las instalaciones de la Universidad del Mar, campus Puerto Escondido, con la beca 511-6/17-6288, Apoyo para Estudios de Posgrado de Alta Calidad 2017 PRODEP-DSA-DGESU.

Parte de los resultados de este trabajo de investigación se publicaron como:

Artículo

Calderón-Oropeza, M.A., Ramírez-Briones, E., Rodríguez-García, G., Salvador-Hernández, J.L., Bedolla-García, B.Y., Zamudio, S., Maldonado-Bonilla, L.D., del Río R.E. and Gómez-Hurtado, M.A. (2021). Metabolic correlations of *Salvia dugesii* Fernald and *Salvia gesneriiflora* Lindl. & Paxton with native *Salvia* plants from four continents using essential oils compositions. Records of Natural Products. <http://doi.org/10.25135/rnp.223-19.121912>

Foros y congresos

Triterpenos hidroxilados tipo lupano de *Salvia dugesii*. Calderón-Oropeza, M.A., Galván-Gómez, S., Gómez-Hurtado, M.A., Rodríguez-García, G., Zamudio, S., Bedolla-García, B.Y. y del Río, R.E. 14 Congreso Estatal de Ciencia Tecnología e Innovación. 8º Encuentro de Jóvenes Investigadores del Estado de Michoacán. Ponencia. 30 de octubre de 2019. Morelia Michoacán.

Evaluación antifúngica de extractos de *Salvia* en *Fusarium* spp. de plátano. Calderón-Oropeza, M.A., Maldonado-Bonilla, L.D., Sánchez-Espinosa, A.C., Villarruel-Ordaz, J.L., Hernández-Carlos, B., Gómez-Hurtado, M.A., Bedolla-García, B.Y., Zamudio, S. y del Río-Torres, R.E. XII Congreso Nacional de Micología. Sociedad Mexicana de Micología. Cartel. Del 15 al 19 de octubre de 2018. Xalapa, Veracruz.

Extractos de *Salvia* spp. y su potencial actividad antifúngica. Calderón-Oropeza, M.A., Maldonado-Bonilla, L.D., Hernández-Carlos, B., Talavera-Alemán, A., Gómez-Hurtado, M.A., Rodríguez-García, G., Bedolla-García, B.Y., Zamudio, S. y del Río Torres, R.E. 2do Foro del Posgrado en Ciencias Químicas. 42º Aniversario del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Del 2 al 6 de julio de 2018. Morelia Michoacán.

Aceites esenciales de dos especies de *Salvia* de Michoacán. Calderón-Oropeza, M.A. Espinoza-Madrigal, R.M., Gómez-Hurtado, M.A., Hernández-Carlos, B.,

Bedolla-García, B.Y., Zamudio, S. y del Río R.E. 52º Congreso Mexicano de Química. 36º Congreso Nacional de Educación Química. Del 26 al 29 de septiembre de 2017. Puerto Vallarta, Jalisco.

Aceites esenciales de *Salvia dugesii* y *Salvia gesneriflora* de Michoacán. Calderón-Oropeza, M.A., Rodríguez-García, G., Gómez-Hurtado, M.A., Salvador-Hernández, J.L., Hernández-Carlos, B., Bedolla-García, B.Y., Zamudio, S. y del Río-Torres, R.E. 1er Foro del Posgrado en Ciencias Químicas. Morelia, Michoacán. 31 julio- 04 agosto de 2017.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	XI
ÍNDICE DE TABLAS	XIV
SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS.....	XV
RESUMEN	XVII
ABSTRACT	XVIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Diversidad vegetal de México	3
2.2 Familia Lamiaceae	3
2.3 Género <i>Salvia</i>	4
2.4 Constituyentes químicos del género <i>Salvia</i>	5
2.4.1 Aceites esenciales de <i>Salvia</i>	5
2.4.2 Diterpenos de <i>Salvia</i>	7
2.4.2.1 Diterpenos encontrados en salvias mexicanas	8
2.4.3 Triterpenos de <i>Salvia</i>	12
2.4.4 Flavonoides y compuestos fenólicos de <i>Salvia</i>	13
2.5 Especies de <i>Salvia</i> consideradas para la investigación	16
3. JUSTIFICACIÓN.....	19
4. OBJETIVO GENERAL	20
4.1 Objetivos Específicos	20
5. PARTE EXPERIMENTAL	21
5.1 Generalidades	21
5.2 Material botánico	21
5.2.1 Selección de especies	21
5.2.2 Recolección de plantas	21
5.3 Extracción de aceites esenciales de <i>S. dugesii</i> y <i>S. gesneriiflora</i>	22
5.4 Preparación de los extractos vegetales	23
5.5 Extracción de productos naturales y preparación de derivados	23
5.5.1 Extracción del ácido oleanólico (60).....	23

5.5.2	Extracción del ácido kerlinico (76).....	25
5.5.3	Extracción del 3 β ,20,25-trihidroxilupano (77).....	25
5.5.4	Extracción del 3 β ,20-dihidroxilupano (78).....	26
5.5.5	Extracción de lupeol (79)	27
5.5.6	Preparación de 3 β ,25-diacetil-20-hidroxilupano (80).....	28
5.5.7	Preparación de la lactona 81	29
5.5.8	Preparación de derivados formilados 82, 83 y 84	30
5.6	Ensayo con hongos fitopatógenos.....	32
5.6.1	Recolección de tejidos de plátano.....	32
5.6.2	Aislamiento de hongos fitopatógenos	32
5.6.3	Método de difusión en agar.....	32
5.6.4	Concentración mínima fungicida (CMF) de los compuestos puros	33
5.6.5	Método de difusión en agar para compuestos (método modificado)	33
5.7	Análisis estadístico	33
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
6.1	Aceites esenciales de <i>Salvia dugesii</i> y <i>Salvia gesneriiflora</i>	34
6.2	Selección de extractos.....	35
6.3	Efecto antifúngico de los extractos de las tres especies de <i>Salvia</i>	37
6.3.1	Inhibición del crecimiento micelial	37
6.4	Purificación de compuestos mayoritarios de los extractos bioactivos	46
6.4.1	Extracto de diclorometano de flores de <i>Salvia dugesii</i>	46
6.4.1.1	Extracción del ácido oleanólico (60)	46
6.4.2	Extracto de diclorometano de hojas de <i>Salvia dugesii</i>	49
6.4.2.1	Extracción del ácido kerlinico (76)	49
6.4.3	Extracto hexánico de hojas de <i>Salvia dugesii</i>	52
6.4.3.1	Extracción del 3 β ,20,25-trihidroxilupano (77).....	52
6.4.3.2	Extracción del 3 β ,20-dihidroxilupano (78)	56
6.4.3.3	Extracción de lupeol (79)	60
6.5	Preparación de derivados.....	64
6.5.1	Preparación del 3 β ,25-diacetil-20-hidroxilupano (80).....	65
6.5.2	Preparación de la lactona 81	68

6.5.3 Preparación de derivados formilados 82, 83 y 84	71
6.6 Actividad antifúngica de productos naturales de <i>Salvia</i> y derivados	75
7. CONCLUSIONES	81
8. BIBLIOGRAFÍA.....	83
9. ANEXO 1	93
10. ANEXO 2	111

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Centros de diversidad del género <i>Salvia</i>	2
Figura 2. Estructura química del estigmasterol (1) y β -sitosterol (2).	5
Figura 3. Terpenos de <i>Salvia officinalis</i>	6
Figura 4. Sesquiterpenos de <i>Salvia hispanica</i>	7
Figura 5. Esqueleto de diterpenos del género <i>Salvia</i>	8
Figura 6. Diterpenos de <i>Salvia divinorum</i>	8
Figura 7. Diterpenos de <i>Salvia melissodora</i>	9
Figura 8. Estructuras de las dugesinas A-G (40-46) reportadas para <i>Salvia dugesii</i>	10
Figura 9. Estructuras de clinopodiólidos 47-50 de <i>Salvia clinopodioides</i>	11
Figura 10. Estructuras de diterpenos 51-54 obtenidos de <i>Salvia cinnabarina</i>	11
Figura 11. Estructura química de esqueletos de triterpenos.	12
Figura 12. Estructura química de triterpenos 59-63 aislados de <i>Salvia melissodora</i> , <i>S. mexicana</i> y <i>S. buchananii</i>	13
Figura 13. Estructuras de los flavonoides 64-68 encontrados en <i>Salvia</i>	14
Figura 14. Ácidos fenólicos 69-72 encontrados en <i>Salvia</i>	15
Figura 15. Inflorescencias de <i>Salvia dugesii</i> Fernald, <i>Salvia gesneriiflora</i> Lindl. & Paxton, <i>Salvia mocioni</i> Benth. y <i>Salvia plurispicata</i> Epling.	16
Figura 16. Compuestos aislados de <i>Salvia gesneriiflora</i>	17
Figura 17. Estructuras de los compuestos 85-90 encontrados en los aceites esenciales de <i>Salvia dugesii</i> y <i>S. gesneriiflora</i>	34
Figura 18. Extractos seleccionados por especie, disolvente y parte de la planta..	37
Figura 19. Crecimiento micelial de las tres especies de <i>Fusarium</i> frente a los extractos hexánicos de <i>Salvia</i> spp	38

Figura 20. Crecimiento micelial de las tres especies de <i>Fusarium</i> frente a los extractos obtenidos con diclorometano de <i>Salvia</i> spp.....	39
Figura 21. Crecimiento micelial de las tres especies de <i>Fusarium</i> frente a los extractos obtenidos con metanol de <i>Salvia</i> spp	39
Figura 22. Espectros de RMN ¹ H los extractos S1CF (azul) y S1CH (negro).....	41
Figura 23. Espectros de RMN ¹ H los extractos S4CF (negro) y S4CH (azul).....	42
Figura 24. Fotografías del crecimiento micelial de a) <i>Oligoporus</i> sp., b) <i>Colletotrichum acutatum</i> , c) <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i> (M5), d) <i>Fusarium oxysporum</i> (M104) y <i>Fusarium verticillioides</i> (M108), frente a (-) DMSO, (+) Azoxystrobin, (1) S4CH, (2) S1MH, (3) S4MH, (4) S4HF, (5) S4HH, (6) S1HF, (7) S1CH y (8) S1MF	44
Figura 25. Espectro de RMN de ¹ H del ácido oleanólico (60) en CDCl ₃ a 400 MHz.	46
Figura 26. Espectro de RMN de ¹³ C del ácido oleanólico (60) en CDCl ₃ a 100 MHz.	47
Figura 27. Espectro de RMN de ¹ H del ácido kerlinico (76) en CDCl ₃ a 400 MHz.	50
Figura 28. Espectro de RMN de ¹³ C del ácido kerlinico (76) en CDCl ₃ a 100 MHz...	50
Figura 29. Espectro de RMN ¹ H del 3 β ,20,25-trihidroxilupano (77) en CDCl ₃ a 300 MHz.....	52
Figura 30. Espectro de RMN ¹³ C del 3 β ,20,25-trihidroxilupano (77) en CDCl ₃ a 75 MHz.....	53
Figura 31. Espectro COSY del 3 β ,20,25-trihidroxilupano (77).	54
Figura 32. Espectro de RMN ¹ H del 3 β ,20-dihidroxilupano (78) en CDCl ₃ a 400 MHz.	56

Figura 33. Espectro de RMN ¹³ C del 3β,20-dihidroxilupano (78) en CDCl ₃ a 100 MHz.....	57
Figura 34. Espectro COSY del 3β,20-dihidroxilupano (78).....	58
Figura 35. Espectro de RMN ¹ H de lupeol (79) en CDCl ₃ a 400 MHz.	61
Figura 36. Espectro de RMN ¹³ C del lupeol (79) en CDCl ₃ a 100 MHz.	62
Figura 37. Espectro de RMN ¹ H del 3β,25-diacetil-20-dihidroxilupano (80) en CDCl ₃ a 400 MHz.	65
Figura 38. Espectro de RMN ¹³ C del 3β,25-diacetil-20-hidroxilupano (80) en CDCl ₃ a 100 MHz.	66
Figura 39. Espectro de RMN ¹ H de la lactona 81 derivado de 77 , en CDCl ₃ a 300 MHz.	68
Figura 40. Espectro de RMN ¹³ C de la lactona 81 derivado de 77 , en CDCl ₃ a 75 MHz.	69
Figura 41. Espectro de RMN ¹ H del derivado 82 , en CDCl ₃ a 400 MHz.....	71
Figura 42. Espectro de RMN ¹ H del derivado 83 , en CDCl ₃ a 400 MHz.....	72
Figura 43. Espectro de RMN ¹ H del derivado 84 , en CDCl ₃ a 400 MHz.....	73
Figura 44. Fotografías de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>ubense</i> frente a diferentes tratamientos.....	78
Figura 45. Fotografías de <i>Fusarium verticillioides</i> frente a diferentes tratamientos... ..	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes de los aceites esenciales de dos especies de <i>Salvia</i>	35
Tabla 2. Rendimiento de extracción de <i>Salvia dugesii</i> , <i>S. mocinoi</i> y <i>S. plurispicata</i> con hexano, diclorometano y metanol.....	36
Tabla 3. Índice de crecimiento de hongos fitopatógenos	43
Tabla 4. Datos espectroscópicos de RMN ¹³ C del ácido oleanólico (60) experimental y literatura.....	48
Tabla 5. Datos espectroscópicos de RMN ¹³ C del ácido kerlinico (76), experimental y literatura.....	51
Tabla 6. Datos espectroscópicos de RMN ¹³ C del 3 β ,20,25-trihidroxilupano (77).....	55
Tabla 7. Datos espectroscópicos de RMN ¹³ C del 3 β ,20-dihidroxilupano (78).....	59
Tabla 8. Datos espectroscópicos de RMN ¹³ C de lupeol (79).	63
Tabla 9. Datos espectroscópicos de RMN ¹³ C de 3 β ,25-diacetil-20-hidroxilupano (80).....	67
Tabla 10. Datos espectroscópicos de RMN ¹ H a 300 MHz y ¹³ C a 75 MHz de la lactona 81 en CDCl ₃	70
Tabla 11. Datos espectroscópicos de RMN ¹³ C (δ ppm) de los carbonos funcionalizados del triterpeno 77 y los derivados 82 , 83 y 84 , a 100 MHz, CDCl ₃	74
Tabla 12. Índice de crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i> f.p. <i> cubense</i> y <i>F. verticillioides</i>	77

SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

°C	Grados Celsius
δ	Desplazamiento químico
μg	Microgramos
μL	Microlitros
μM	Micromolar
CCF	Cromatografía en capa fina
CG-EM	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50
cm	Centímetros
CMF	Concentración mínima fungicida
COSY	Correlated spectroscopy
d	Señal doble
dd	Señal doble de dobles
DE	Desviación estándar
DMSO	Dimetil sulfóxido
dt	Señal doble de triples
g	Gramos
HETCOR	Heteronuclear correlation
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence
Hz	Hertz
IC	Índice de crecimiento
IR	Espectroscopía de infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
m	señal múltiple
mg	Miligramos
MHz	MegaHertz

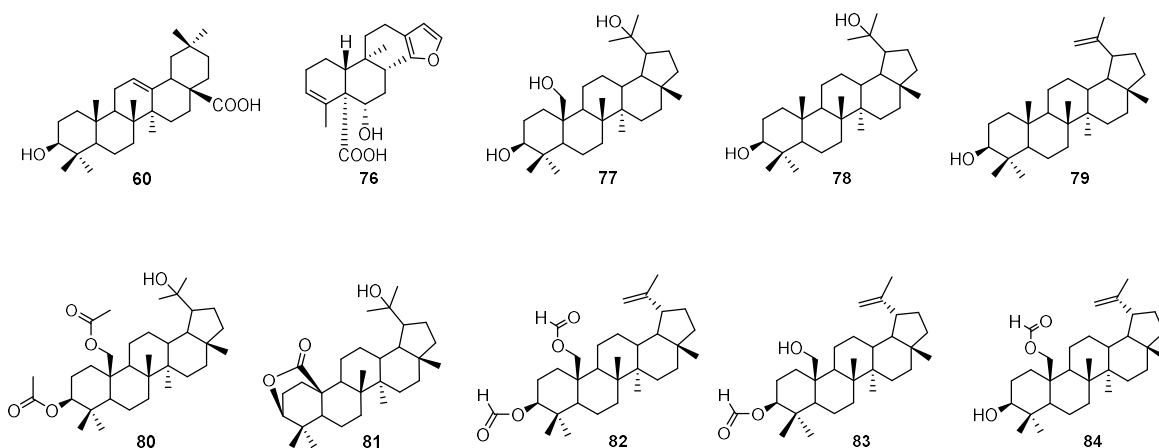
Símbolos, abreviaturas y acrónimos

mL	Mililitros
mm	Milímetros
PCC	Clorocromato de piridino
PDA	Agar papa dextrosa
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia magnética nuclear
s	Señal simple
sa	Señal simple ancha
t	Señal triple
THF	Tetrahidrofurano
TLC	Thin layer chromatography
TMS	Tetrametilsilano

RESUMEN

El análisis fitoquímico de las especies de *Salvia* incluidas en este trabajo permitió identificar a cinco terpenos, de los cuales, el ácido oleanólico (**60**), el ácido kerlinico (**76**) y el 3 β ,20,25-trihidroxilupano (**77**) se encontraron como compuestos mayoritarios, mientras que los compuestos 3 β ,20-dihidroxilupano (**78**) y lupeol (**79**) fueron minoritarios. Además de los metabolitos naturales, el estudio químico de **77** generó cinco compuestos que fueron producto de reacciones de acetilación, oxidación e hidrólisis ácida, con ello se obtuvieron los derivados **80-84**.

El ensayo antifúngico *in vitro* evidenció inhibición del crecimiento micelial de los fitopatógenos de prueba, los extractos de diclorometano de hojas y flores de *S. dugesii* y *S. plurispicata* fueron los que proporcionaron mayor inhibición. Adicionalmente, se realizó el ensayo antifúngico de los compuestos naturales y derivados, de los cuales, el ácido kerlinico (**76**) mostró la mayor inhibición del crecimiento micelial, al mismo tiempo se determinó que dicha inhibición es dependiente de la concentración.

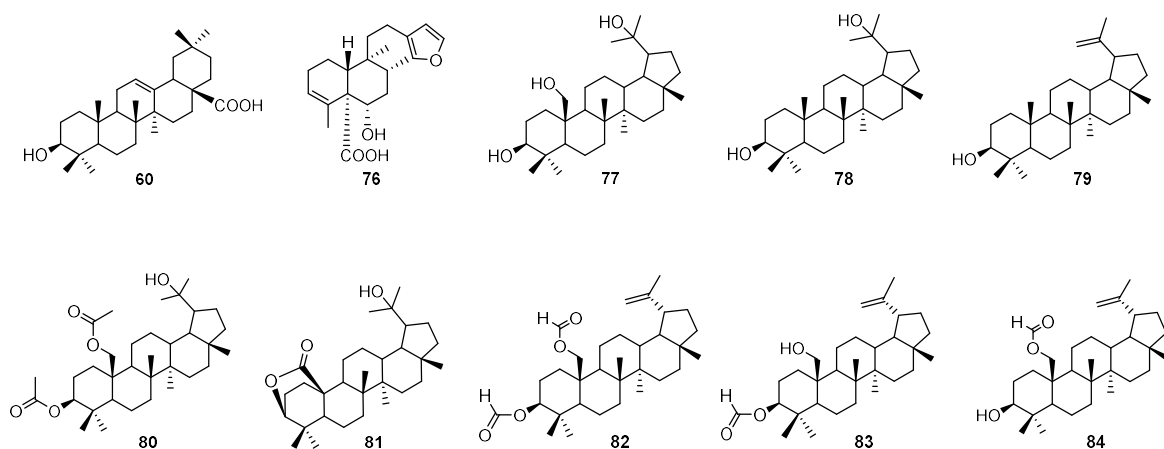


Palabras clave: *Salvia*, extractos, actividad antifúngica, terpenos, derivados.

ABSTRACT

The phytochemical analysis of *Salvia* species included in this work allowed the identification of five terpenes, the majority compounds of them were oleanolic acid (**60**), kerlinic acid (**76**) and 3 β ,20,25-trihydroxylupane (**77**) and the minority compounds were 3 β ,20-dihydroxylupane (**78**) and lupeol (**79**). Also, the chemical study of **77** generated five compounds by acetylation, oxidation and acid hydrolysis reactions, thereby obtaining the derivatives **80-84**.

The *in vitro* antifungal assay showed inhibition of mycelial growth of the test phytopathogens, dichloromethane extracts of leaves and flowers of *S. dugesii* and *S. plurispicata* were those that provided the greatest inhibition. Additionally, the antifungal assay of natural compounds and their derivatives was performed and the greatest inhibition of mycelial growth was showed by the kerlinic acid (**76**) at the same time it was determined that such inhibition is concentration-dependent.



Key words: *Salvia*, extracts, antifungal activity, terpenes, derivatives.

1. INTRODUCCIÓN

El sector agroalimentario en México es uno de los pilares económicos más importantes debido a que proporciona empleos, ingreso de divisas y seguridad alimentaria al país. En los últimos años el sector agrícola se ha enfrentado a varios desafíos relacionados con la disminución del rendimiento de los cultivos debido a plagas, enfermedades y tensiones abióticas. Diversos plaguicidas se han utilizado ampliamente para controlar las enfermedades fúngicas que afectan a varios cultivos. Durante las últimas décadas, la producción agrícola se ha intensificado gracias al uso de dichos plaguicidas, lo que ha llevado a una estabilidad económica. Por otra parte, la búsqueda de alternativas para el control de enfermedades en la agricultura ha ganado importancia debido a que algunos patógenos fúngicos han ganado resistencia hacia los antifúngicos comerciales, además de que algunos productos químicos sintéticos han sido prohibidos debido a su toxicidad (Brauer et al., 2019).

Entre los cultivos de interés agrícola de la región costa de Oaxaca se encuentra el cultivo de plátano (*Musa* sp.). Oaxaca ocupa el octavo lugar en la producción de este fruto (SADER-SIAP, 2019). El cultivo de plátano es susceptible a enfermedades fúngicas entre las que destaca el llamado mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) (Ploetz et al., 2003). Durante la primera mitad del siglo XX, *Fusarium* causó una gran destrucción de cultivos en América Central, Panamá fue uno de los países más severamente afectados, de ahí deriva el nombre de mal de Panamá (Jeger et al., 1996).

Se han realizado trabajos de investigación enfocados al descubrimiento de agentes naturales, en donde el reino vegetal sobresale por ser el productor más eficiente de metabolitos secundarios con actividad bioplaguicida (Dubey et al., 2011), algunas sustancias de origen natural han demostrado una actividad antifúngica prometedora por lo que podrían convertirse en una alternativa para combatir hongos fitopatógenos para la agricultura (Brauer et al., 2019).

La familia Lamiaceae ha sido objeto de estudios intensivos orientados al aislamiento de diferentes tipos de metabolitos secundarios. El género *Salvia* es el más abundante dentro de la familia, con aproximadamente 1000 especies

distribuidas por todo el mundo (Figura 1) (Walker et al., 2004). Las especies de *Salvia* se caracterizan por ser aromáticas, se utilizan como especias y hierbas culinarias, en la industria cosmética y medicina tradicional dada sus propiedades bioactivas (Ghorbani & Esmailizadeh, 2017). El estudio químico de diversas especies de *Salvia* ha permitido establecer un perfil fitoquímico caracterizado por flavonoides, terpenos y compuestos fenólicos (Lu & Foo Yeap, 2002; Wu et al., 2012), por lo que sus especies representan un material excelente para el aislamiento de compuestos con propiedades biológicas distintas.

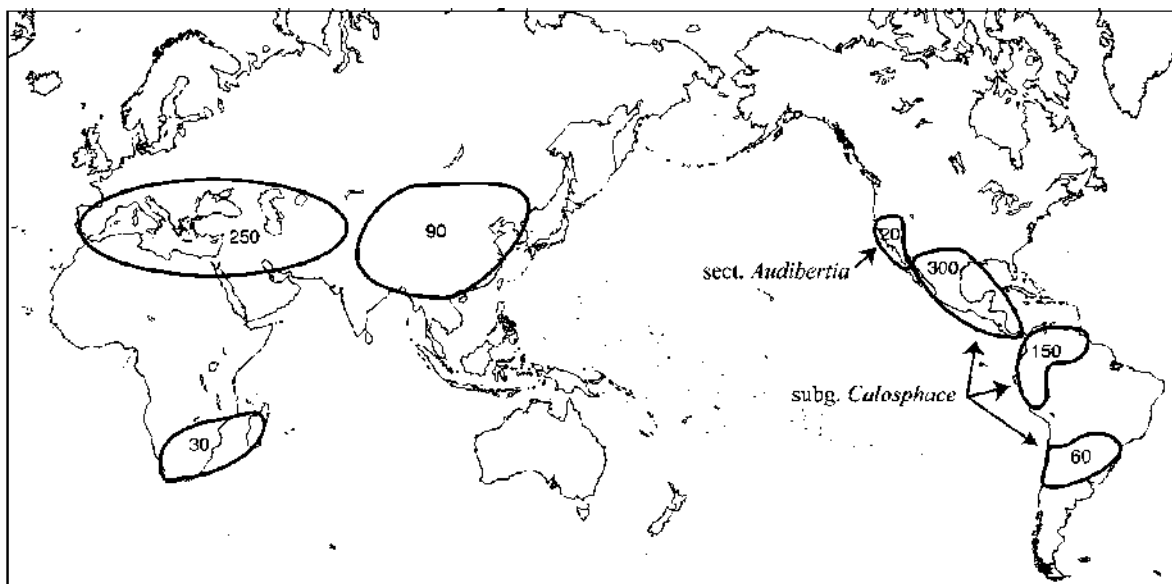


Figura 1. Centros de diversidad del género *Salvia*. Número aproximado de especies en cada región. Tomado de Walker et al., 2004.

2. ANTECEDENTES

2.1 Diversidad vegetal de México

México ocupa el quinto lugar en riqueza de plantas vasculares, después de Brasil, Colombia, China e Indonesia (CONABIO, 2020), con 23 424 especies de las cuales se estima que el 50 % son endémicas. Las angiospermas son las representantes con mayor diversidad vegetal en el territorio nacional con 22 126 especies, en este grupo las familias que destacan principalmente por su número de géneros y especies son: Asteraceae, Fabaceae, Orchidaceae, Poaceae, Euphorbiaceae, Rubiaceae, Cactaceae y Lamiaceae (Villaseñor, 2016).

En la República Mexicana, la mayor concentración de la diversidad se encuentra a lo largo de un área que va de Chiapas, Oaxaca y se prolonga por un lado hacia el centro de Veracruz y por el otro a Guerrero, Sinaloa y Durango (Rzedowski, 1991). El Estado de Michoacán ocupa el sexto lugar en riqueza florística en México (Villaseñor, 2016).

2.2 Familia Lamiaceae

La familia Lamiaceae es una de las más diversas a nivel mundial con cerca de 236 géneros y 7 173 especies (Harley et al., 2004; Martínez-Gordillo et al., 2013). Presenta distribución subcosmopolita y es muy diversa en zonas templadas. Sus especies se caracterizan por ser aromáticas, por lo que han sido utilizadas ya sea como condimentos (*Origanum*, *Thymus*, *Mentha*), como especies ornamentales (*Coleus*, *Salvia*, *Scutellaria*), además de su uso en la cosmética (*Lavandula*, *Calamintha*) y la medicina (*Salvia*, *Mentha*, *Lavandula*) (Karpiński, 2020; Martínez-Gordillo et al., 2013).

Lamiaceae se ubica entre las diez familias con mayor diversidad en México (Villaseñor, 2016). Distribuidas en 32 géneros que, a su vez, incluyen 591 especies. Esto significa que el 8.23 % de las especies y el 13.55 % de los géneros de Lamiaceae del planeta, existen en México. Con respecto al endemismo de las especies de nuestro país, este corresponde al 65.82 % (Martínez-Gordillo et al., 2013). Por otro lado, Michoacán cuenta con 105 especies nativas y/o naturalizadas,

registrando así el 1.4 % de las conocidas en el mundo y 17.7 % de las que se reportan para México (Lara-Cabrera et al., 2016).

2.3 Género *Salvia*

El género *Salvia* es el más diverso de la familia Lamiaceae, es nativo del Mediterráneo y se distribuye ampliamente en el sudeste de Asia, en América Central y del Sur y la región Euro Mediterráneo (Georgiev & Pavlov, 2017). Debido a su variación morfológica, *Salvia* se clasifica en cinco subgéneros: *Salvia*, *Audibertia*, *Calosphace*, *Leonia* y *Sclarea*. En México se encuentran especies principalmente de los subgéneros *Calosphace* y *Audibertia* (Walker et al., 2004). Se han registrado 328 especies de las cuales del 85-88 % son endémicas (Cornejo-Tenorio & Ibarra-Manríquez, 2011). Para Michoacán el registro es de 62 especies, de las cuales *S. cyanantha*, *S. indigocephala*, *S. gravida*, *S. synodonta* y *S. vasquezii* subsp. *tancitaroensis* son endémicas del Estado (Lara-Cabrera et al., 2016).

El nombre de *Salvia* proviene del latín *salvare*, que significa curar, varias especies son empleadas en la medicina tradicional por sus diversas actividades biológicas (Kamatou et al., 2008; Khedher et al., 2017). Existen muchas diferencias en los efectos farmacológicos de sus especies. Los estudios sobre la relación estructura-actividad dentro del género son necesarios para explicar los mecanismos de actividad biológica (Jäger & van Staden, 2000). En décadas recientes, con el aumento en el conocimiento farmacológico sobre el efecto benéfico de *Salvia*, especialmente *S. officinalis*, se ha logrado determinar su actividad como antibacteriano, antioxidante, antiinflamatorio y antitumoral. Sus componentes han sido muy eficaces en el desarrollo de nuevos fármacos naturales para prevenir, controlar o tratar muchos problemas de salud, como la diabetes, el Alzheimer y el cáncer (Hamidpour et al., 2014). Además de *S. officinalis*; *S. miltiorrhiza* y *S. lavandulifolia* son algunos ejemplos de especies ampliamente utilizadas en las industrias farmacológica, cosmética y de alimentos (Georgiev & Pavlov, 2017).

2.4 Constituyentes químicos del género *Salvia*

El género *Salvia* ha sido de gran interés debido a la variedad de metabolitos secundarios que produce; hasta el 2011, se reportaron cerca de 730 compuestos aislados de 134 especies de *Salvia*, los cuales se agrupan en siete tipos: sesquiterpenos, diterpenos, sesterpenos, triterpenos, esteroides, polifenoles y otros. Los principales constituyentes de *Salvia* son terpenos y flavonoides, de los cuales, más del 80 % son diterpenos (Wu et al., 2012). Los compuestos esteroidales que frecuentemente se han encontrado en *Salvia* son el estigmasterol (1) y β -sitosterol (2) (Figura 2). A medida que avanza la investigación fitoquímica del género, se elucidan nuevas estructuras principalmente de esqueletos terpénicos. Por lo que es de suponer que el número de metabolitos de *Salvia* es muy superior a los reportados hace nueve años.

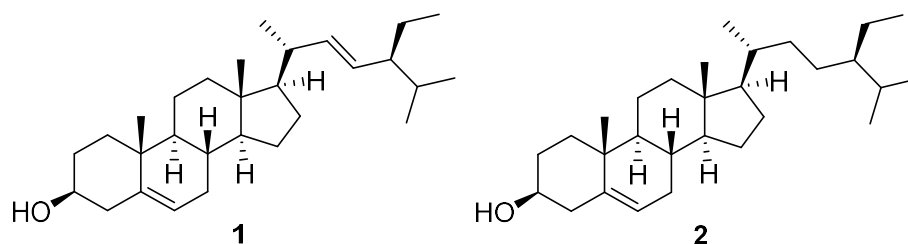


Figura 2. Estructura química del estigmasterol (1) y β -sitosterol (2).

2.4.1 Aceites esenciales de *Salvia*

Las especies de *Salvia* se caracterizan por ser aromáticas, sus aceites esenciales son económicamente importantes en el mundo debido a su uso en los alimentos, como agente saborizante, en perfumería y cosméticos; así como su uso medicinal (Georgiev & Pavlov, 2017; Ulubelen, 2000). Los aceites esenciales provenientes de varias especies de *Salvia* son fuentes valiosas para la búsqueda de compuestos de interés farmacológico, incluyendo la actividad antimicrobiana, antioxidante y anticancerosa (Poulios et al., 2020; Privitera et al., 2019). Entre los compuestos comúnmente encontrados en los aceites esenciales de *Salvia* están monoterpenos y sesquiterpenos hidrocarbonados u oxigenados. Como por ejemplo en *Salvia officinalis* y *S. hispanica*, dos especies representativas para Europa y América. S.

officinalis es nativa del Mediterráneo, es la especie más estudiada del género; su aceite esencial se comercializa y está formado principalmente por α -tujona (**3**) (18-43 %), β -tujona (**4**) (3-8.5 %), alcanfor (**5**) (4.5-24.5 %), 1,8-cineol (**6**) (5.5-13 %), α -humuleno (**7**) (0-12 %), α -pineno (**8**) (1-6.5 %), canfeno (**9**) (1.5-7 %) y acetato de bornilo (**10**) (2.5 %). Con la determinación de los componentes principales se logró definir la quimiotaxonomía de la especie, se identificaron cinco quimiotipos, en donde el más común fue el representado por α -tujona>alcanfor>1,8-cineol; seguido de α -humuleno; un tercer quimiotipo representado por β -tujona; el cuarto grupo formado por 1,8-cineol/alcanfor y finalmente el quimiotipo de esclareol/ α -tujona (Figura 3) (Craft et al., 2017).

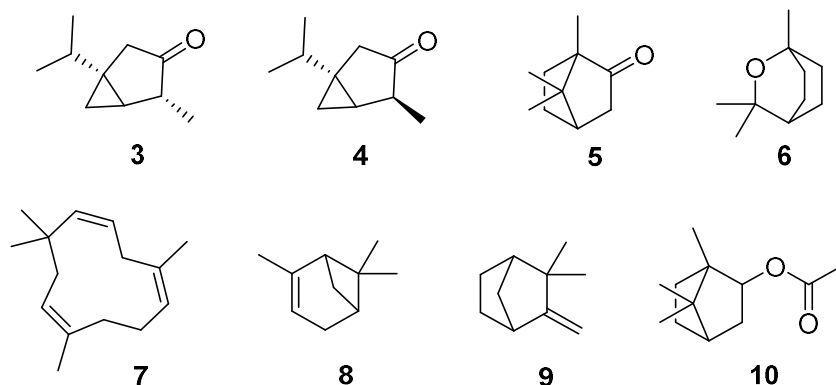


Figura 3. Terpenos de *Salvia officinalis*.

S. hispanica es conocida comúnmente como Chia, es una especie de consumo tradicional en América Central y es originaria de México-Guatemala. En su aceite esencial se encontraron a los terpenos (*Z*)-cariofileno (**11**) (11.5 %), (*E*)-cariofileno (**12**) (10.6 %), α -humuleno (**7**) (4.8 %), δ -amorfenol (**13**) (3.1 %), y γ -gurjuneno (**14**) (3.1 %); así como a los sesquiterpenos oxigenados como el α -eudesmol (**15**) (3.8 %), óxido de cariofileno (**16**) (2.7 %), y espatulenol (**17**) (2.2 %) (Figuras 3 y 4) (Elshafie et al., 2018).

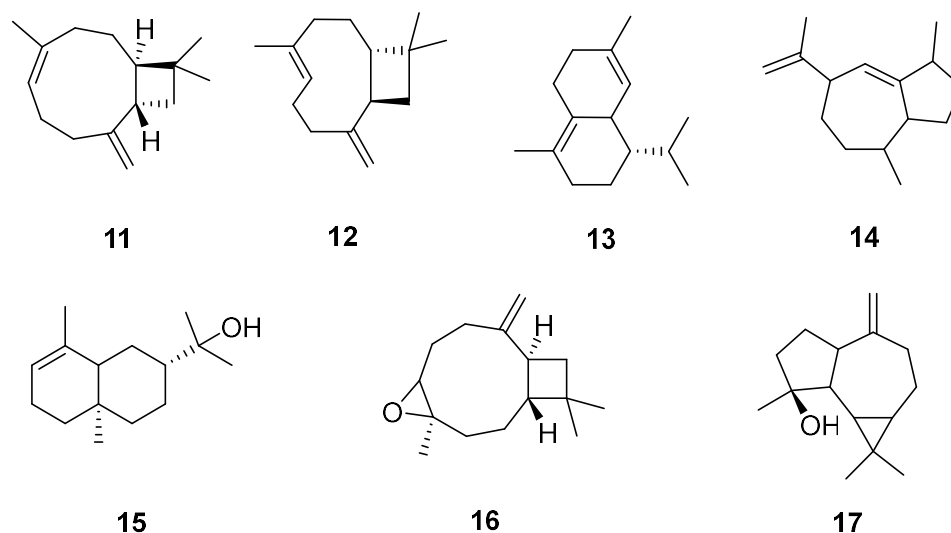


Figura 4. Sesquiterpenos de *Salvia hispanica*.

El perfil químico de los aceites esenciales depende de los rasgos genéticos, el ciclo de vida de la planta, la temporada de cosecha, así como del clima predominante, las precipitaciones y los nutrientes disponibles (Lim Ah Tock et al., 2020).

Las características cualitativas de los aceites esenciales provenientes de diferentes países son similares; sin embargo, han mostrado importantes variaciones cuantitativas en el contenido de los compuestos principales, razón por la cual estos aceites probablemente muestran diferentes actividades biológicas (Georgiev & Pavlov, 2017).

2.4.2 Diterpenos de *Salvia*

Se ha establecido que los metabolitos secundarios más característicos y diversificados para el género son los diterpenos (Baldomero Esquivel, 2008); principalmente del tipo abietano **18** y neo-clerodano **19** (Figura 5). Los diterpenos con esqueleto de abietano se han encontrado principalmente en especies de Asia y Europa, mientras que los del tipo neo-clerodano en especies de América Central y América del Sur (Ulubelen, 2000). Entre los diterpenos, además de abietanos y clerodanos, también se han descrito labdanos **20**, pimaranos **21**, kauranos **22**, totaranos **23** e icetexanos **24** (Figura 5) (Wu et al., 2012).

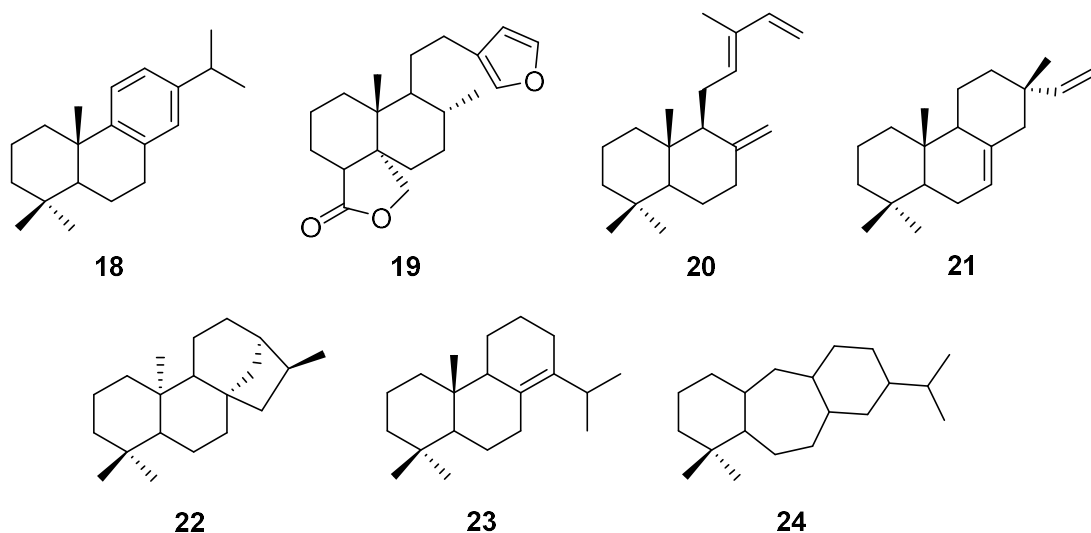


Figura 5. Esqueleto de diterpenos del género *Salvia*.

2.4.2.1 Diterpenos encontrados en salvias mexicanas

En comparación con las salvias de Europa, Asia y África, que se caracterizan por sintetizar diterpenos principalmente de tipo abietano, las salvias mexicanas sintetizan diterpenos mayoritariamente derivados de neo-clerodano. Entre los diterpenos más conocidos de salvias mexicanas encontramos a la salvinorina A (**25**) y salvinorina B (**26**) (Figura 6) obtenidas de *Salvia divinorum* a las cuales se les atribuye actividad psicotrópica (Ortega et al., 1982; Valdés III et al., 1983) y recientemente se le reportó efecto antinociceptivo a **25** (Tlacomulco-Flores et al., 2020).

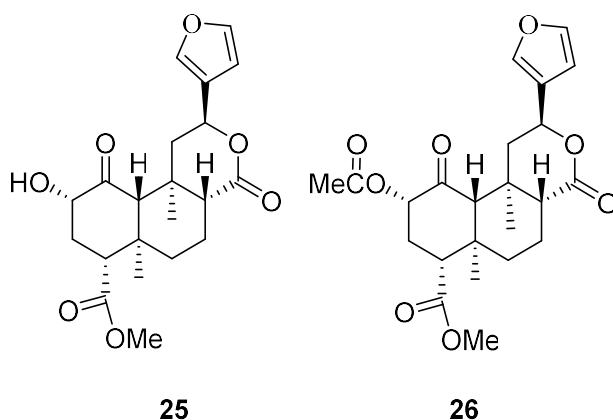


Figura 6. Diterpenos de *Salvia divinorum*.

En las especies mexicanas se han encontrado diversos compuestos diterpénicos; *S. melissodora* es un ejemplo de una especie cuyo contenido de diterpenos puede variar en función del sitio y la época de recolección. Rodríguez-Hahn et al., (1995) exponen la diversidad de neo-clerodanos encontrados en ejemplares de *S. melissodora*, recolectados en la ciudad de México, los Estados de México, Hidalgo y San Luis Potosí. En la figura 7 se muestra la estructura de los compuestos **27-39** de *S. melissodora* provenientes de los sitios antes mencionados. Así como *S. melissodora*, existen otras especies de *Salvia* que comparten esta característica como *S. keerlii* (B. Esquivel et al., 1985; Rodríguez-Hahn et al., 1987) o *S. fulgens* (Baldomero Esquivel et al., 1987; Narukawa et al., 2006).

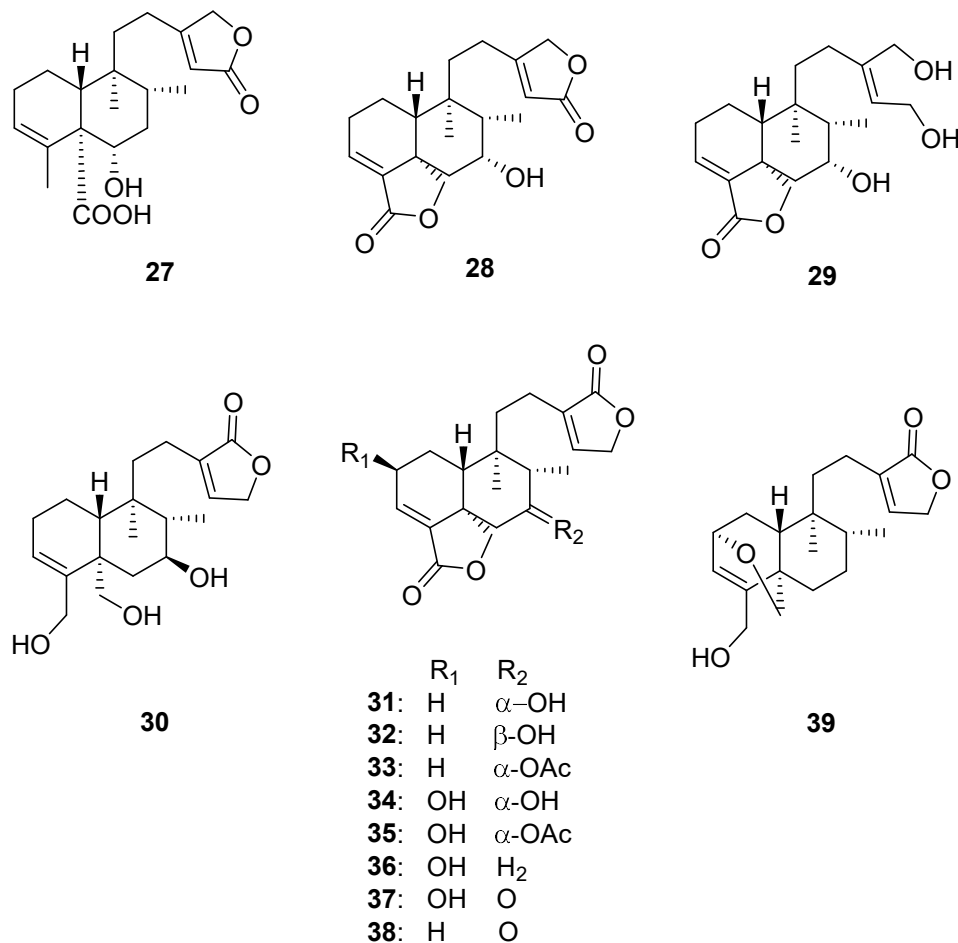


Figura 7. Diterpenos de *Salvia melissodora*.

La mayoría de los estudios fitoquímicos se han generado a partir de ejemplares recolectados en México o de especies originarias de México que en algún momento fueron introducidas en otros países, un ejemplo de ello es *Salvia dugesii* Fernald, que en 2004 y 2011 obtuvieron diterpenos derivados de clerodano denominados dugesina A-G (estructuras **40-46**, Figura 8); sin embargo, en 2013 se publicó que la especie de la que obtuvieron dichos diterpenos correspondía a *S. tiliifolia*, una especie nativa de México (Gang et al., 2011; Hu et al., 2013; G. Xu et al., 2004).

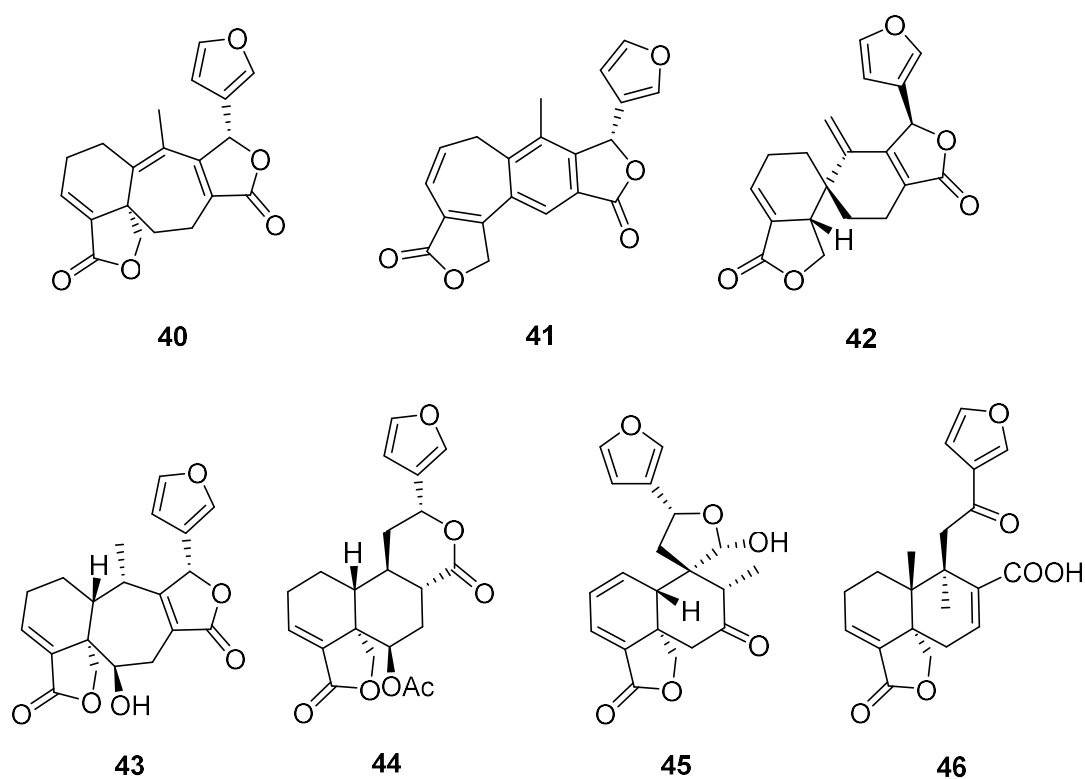


Figura 8. Estructuras de las dugesinas A-G (**40-46**) reportadas para *Salvia dugesii*.

Otros ejemplos de diterpenos de salvias mexicanas, pero con esqueletos diferentes de clerodano son los reportados por Bustos-Brito et al., 2019; quienes encontraron tres derivados de abietano denominados clinopodiólido A (**47**), clinopodiólido B (**48**) y clinopodiólido C (**49**), así como uno de icetexano llamado

clinopodiólido D (**50**) de *S. clinopodioides* con actividad antioxidante, antiprotozoaria y antipropulsiva (Figura 9).

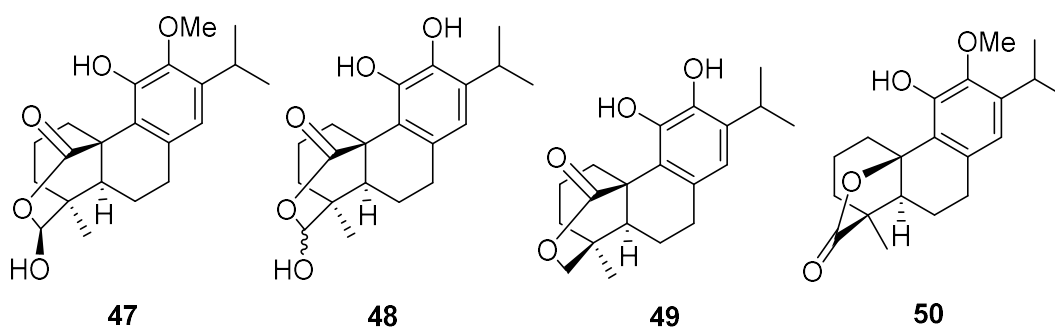


Figura 9. Estructuras de clinopodiólidos **47-50** de *Salvia clinopodioides*.

De las partes aéreas de *S. cinnabarina* obtuvieron dos nuevos derivados de labdano denominados malonilcommunol (**51**) y ácido 6 β -hidroxi-*trans*-communico (**52**) con capacidad para inhibir la actividad de la α -glucosidasa de levadura, adicionalmente, **52** presentó actividad antiinflamatoria. En el mismo trabajo reportaron el aislamiento de dos derivados de pimarano denominados como isopimara-7,15-dien-3-ona (**53**) e isopimara-7,15-dien-3-ol (**54**) (Figura 10) (Bustos-Brito et al., 2020).

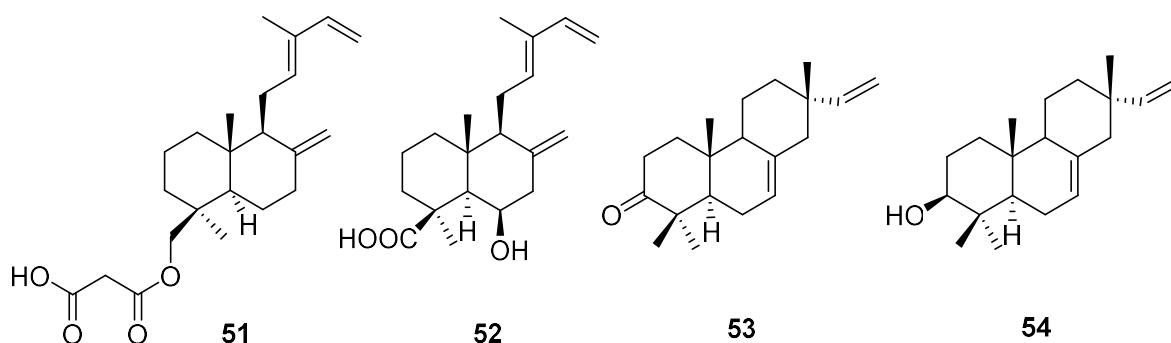


Figura 10. Estructuras de diterpenos **51-54** obtenidos de *Salvia cinnabarina*.

2.4.3 Triterpenos de *Salvia*

Los triterpenos pentacíclicos con esqueleto de ursano **55**, oleanano **56** y lupano **57** (Figura 11) son constituyentes comunes de casi todas las especies de *Salvia*. La mayoría de los triterpenos encontrados en *Salvia* están funcionalizados en C-3 con un grupo hidroxilo o cetona. Otra posición en la que es común encontrar hidroxilos es en C-1, C-2 o C-11. En los derivados de ursano y oleanano generalmente se encuentra un doble enlace entre C-12 y C-13 y algunas veces entre C-18 y C-19 (Topcu, 2006). La posición C-28 suele encontrarse oxidada como grupo carboxilo; en menor medida como CH₂OH y en pocos casos como aldehído. La abundancia y distribución de triterpenos pentacíclicos en diferentes salvias es altamente variable (Lakhal et al., 2014). También se han aislado triterpenos di o trihidroxilados de diversas especies, mientras que aquellos altamente hidroxilados son conocidos solo para un número limitado de especies como *S. argentea* y *S. kronenburgii* (Jash et al., 2016).

Una revisión publicada en 2016 contabilizó 214 triterpenos a partir de 113 especies del género *Salvia*. Registraron 88 derivados de ursano, 70 de oleanano, 32 con esqueleto de lupano, ocho derivados de dammarano **58** (Figura 11) y 16 triterpenos clasificados como misceláneos (Jash et al., 2016).

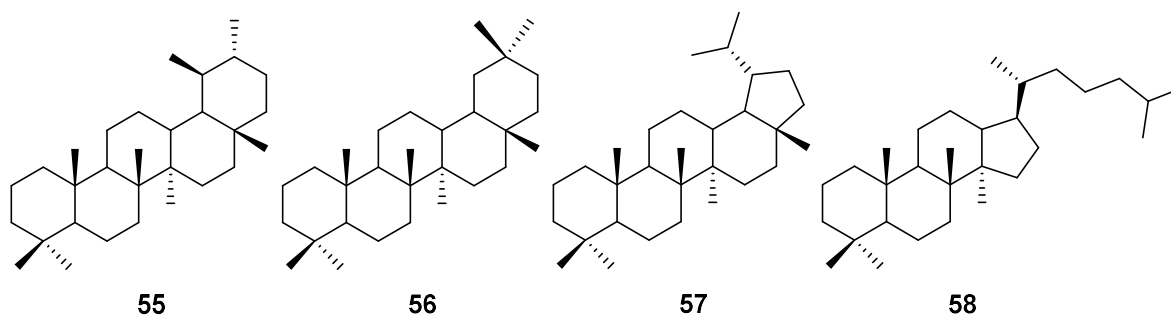


Figura 11. Estructura química de esqueletos de triterpenos.

Los ácidos ursólico (**59**) y oleanólico (**60**) fueron aislados a partir de *S. officinalis* en 1951 (Topcu, 2006); ambos triterpenos se han encontrado en ejemplares de *S. melissodora* recolectados en el Estado de México y a **60**, de

ejemplares de San Luis Potosí (Baldomero Esquivel et al., 1988, 1989). De extractos de flores de *S. mexicana* L. var. *minor* Benth. obtuvieron a los triterpenos ácido betulínico (**61**), betulinol (**62**) y ácido ursólico (**59**), en este mismo trabajo reportaron el efecto antiinflamatorio de *S. mexicana* el cual es atribuido a **59** y a **2** (Argumedo Delira et al., 2003). El ácido salvibuchanico (**63**) (Figura 12) aislado del extracto de raíz de *S. buchananii*, un triterpeno de lupano que tiene un anillo de lactol de siete miembros en el anillo A mostró actividad citotóxica (Beladjila et al., 2018).

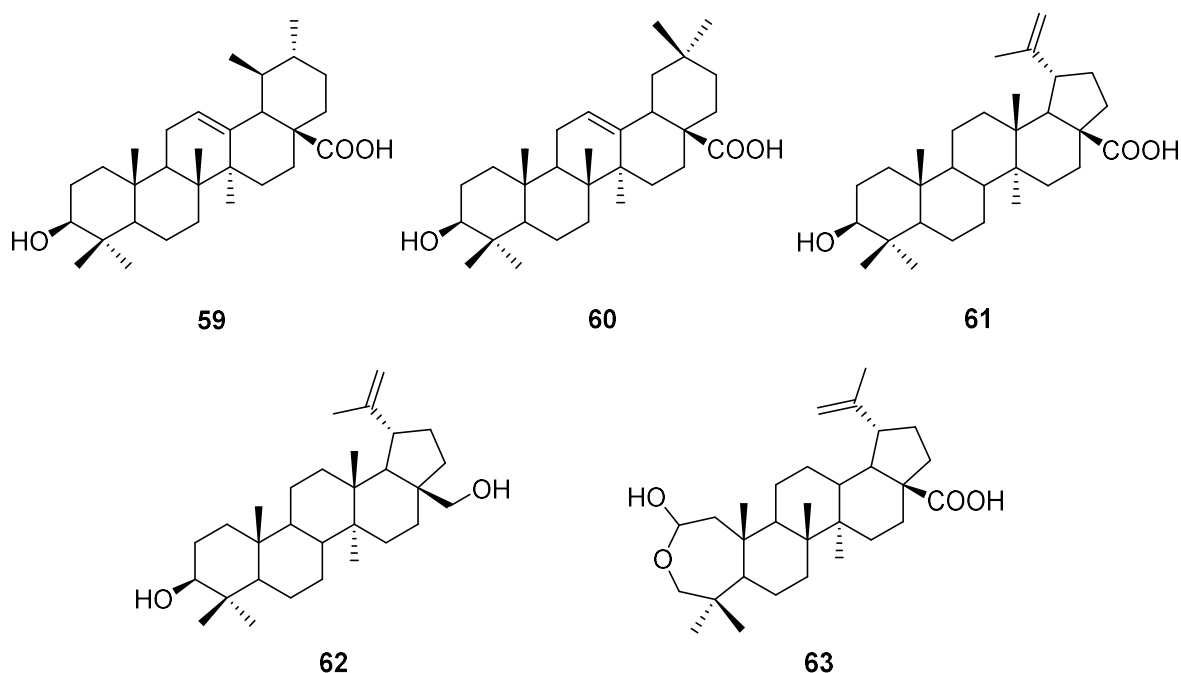


Figura 12. Estructura química de triterpenos **59-63** aislados de *Salvia melissodora*, *S. mexicana* y *S. buchananii*.

Además de triterpenos también se ha reportado el aislamiento de esteroides, antocianinas, cumarinas, flavonoides, polisacáridos, ácidos fenólicos y sus derivados (Lu & Foo Yeap, 2002).

2.4.4 Flavonoides y compuestos fenólicos de *Salvia*

Aunque la investigación del género se ha enfocado principalmente en los compuestos terpénicos y sus efectos bioactivos, se ha prestado particular atención a los componentes de los extractos polares, principalmente de especies de Asia,

por ejemplo, *Salvia miltiorrhiza*, *S. yunnanensis* y *S. chinensis*, así como también de *S. officinalis*. Los flavonoides y los ácidos fenólicos son los principales metabolitos encontrados en extractos acuosos de varias especies de *Salvia*. Los flavonoides se han aislados principalmente de las hojas y flores de *Salvia*; mientras que los compuestos fenólicos se han obtenido principalmente de raíces. (Georgiev & Pavlov, 2017).

Los derivados 6-hidroxilados de apigenina (**64**) y luteolina (**65**) son muy comunes en el género. De los extractos acuoso y alcohólico de *Salvia officinalis* aislaron como componente mayoritario a luteolina-7-glucósido (**66**) (Lima et al., 2007) y en menor concentración, los flavonoides rutina (**67**) y quercetina (**68**) (Figura 13) (Hernández-Saavedra et al., 2016).

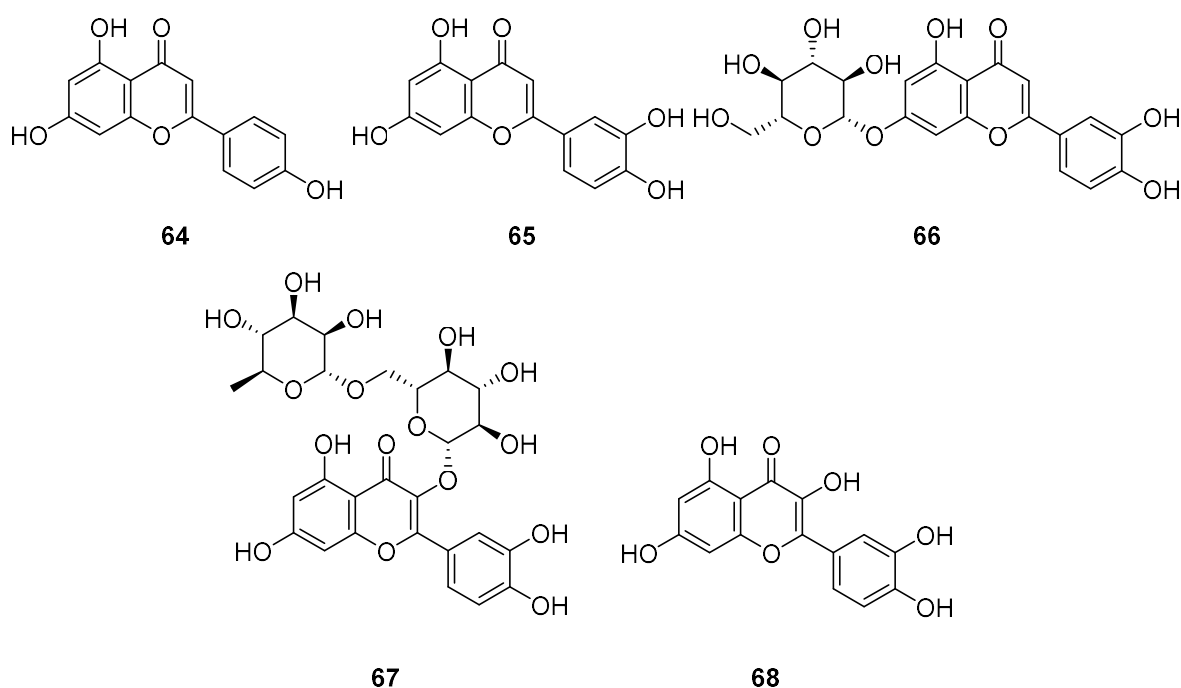


Figura 13. Estructuras de los flavonoides **64-68** encontrados en *Salvia*.

Los ácidos fenólicos como los derivados del ácido cafeico (**69**) forman parte de una amplia variedad de compuestos denominados ácidos salvianólicos, así como del ácido rosmarínico (**70**) que suele encontrarse como compuesto principal de extractos polares. El ácido cafeico es el componente básico de una variedad de

metabolitos que pueden formarse por la condensación de forma monomérica. Los trómeros y tetrómeros han demostrado tener actividades terapéuticas. Por ejemplo, los ácidos salvianólico A (**71**) y salvianólico B (**72**) (Figura 14), que han demostrado una fuerte actividad antioxidante frente a radicales libres de oxígeno (Lu & Foo Yeap, 2002).

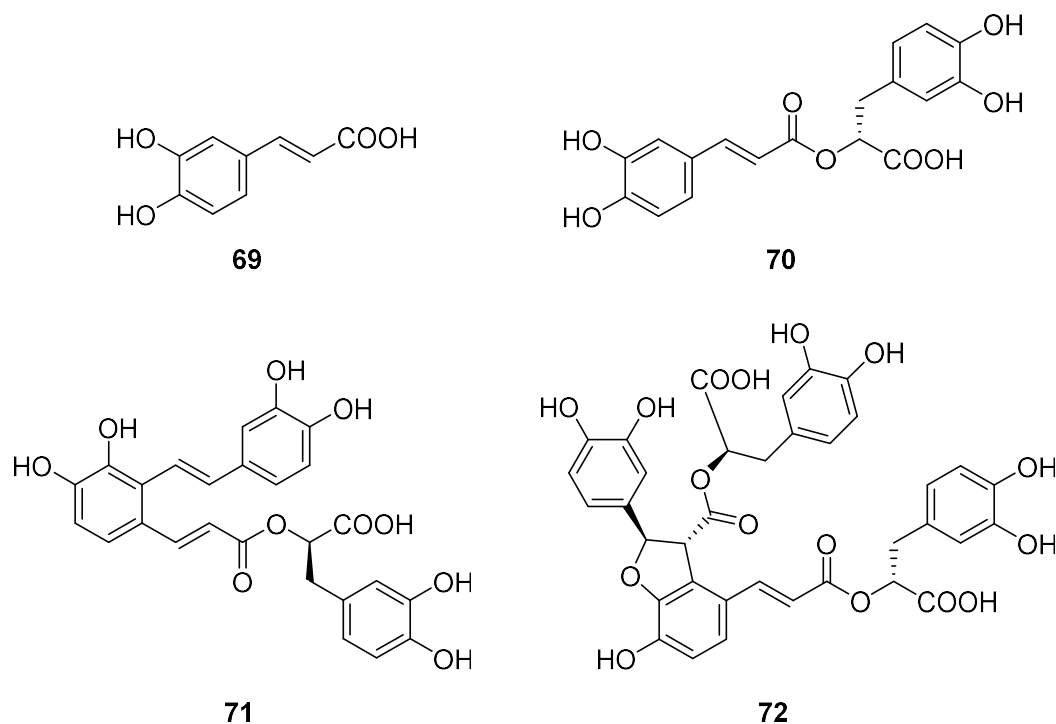


Figura 14. Ácidos fenólicos **69-72** encontrados en *Salvia*.

Los compuestos aislados de extractos de *Salvia* están asociados con actividades antiséptica, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiinflamatoria, antioxidante, hipoglucémica, citotóxica y antitumoral (Topcu, 2006). La investigación fitoquímica de especies de *Salvia* es justificable debido a los diferentes efectos biológicos reconocidos para el género.

2.5 Especies de *Salvia* consideradas para la investigación

Michoacán es uno de los Estados con un mayor número de especies del género *Salvia*. Entre ellas se encuentran *S. dugesii*, *S. gesneriiflora*, *S. mocinoi* y *S. plurispicata* (Figura 15) con una distribución reconocida en el Estado.



Figura 15. Inflorescencias de *Salvia dugesii* Fernald, *Salvia gesneriiflora* Lindl. & Paxton, *Salvia mocinoi* Benth. y *Salvia plurispicata* Epling.

Salvia dugesii Fernald es endémica de México, recientemente reconocida como especie, ya que desde casi 80 años se sinonimizó con *Salvia melissodora* Lag. Es una planta arbustiva de 0.5 a 2 m de alto, tallos ramificados, entrenudos de 4.5 a 6 cm, peciolo de 5 a 36 mm de largo; lámina foliar discolora, ovada, de 1.5 a 5.5 cm de largo, con 6-12 flores. Se distribuye en Aguascalientes, Durango, Guanajuato, Jalisco, Michoacán, Oaxaca, Puebla y Querétaro; periodo de floración: marzo a diciembre (Olvera-Mendoza et al., 2017).

Salvia gesneriiflora Lindl. & Paxton es una hierba perenne, arbusto o raramente arbusto trepador de 0.7 a 10 m, flores rojas o raramente blancas, tallos glanduloso-pegajosos, hojas opuestas, ovadas de hasta 11 cm de largo y 8 cm de ancho. Periodo de floración de octubre a marzo. Se ha registrado de Jalisco al Estado de México y Puebla (Cornejo-Tenorio & Ibarra-Manríquez, 2001; Rzedowski & Rzedowski, 2001).

Salvia mocinoi Benth., es una hierba perenne de 1 a 2.5 m, con flores azules o moradas. Su periodo de floración va de octubre a abril. Se distribuye desde el

oeste de México hasta el norte de Nicaragua, entre los 30 a 2850 m de elevación, habita en zonas templadas y bosques tropicales (Cornejo-Tenorio & Ibarra-Manríquez, 2011; González-Gallegos et al., 2020).

Salvia plurispicata Epling es endémica de México, es una hierba perenne de 0.5 a 1.8 m, presenta inflorescencias de 15 flores en promedio en color azul-morado. Se distribuye principalmente en Michoacán y ocasionalmente, en el Estado de México; su periodo de floración va de julio a abril (Cornejo-Tenorio & Ibarra-Manríquez, 2011; Espino-Espino et al., 2014; Lara-Cabrera et al., 2016).

Entre los trabajos de investigación de las especies anteriores, encontramos para *Salvia gesneriiflora* Lindley el aislamiento de salvifulgenolido (**73**) e isosalvixalapadieno (**74**), así como el glucósido de quercetina (**68**) y los ácidos ursólico (**59**), cafeico (**69**), rosmarínico (**70**) y clorogénico (**75**) (Figura 16) (Calzada et al., 2015; Gómez-Rivera et al., 2018). Las dugesinas A-G con esqueleto de clerodano originalmente fueron reportadas de *S. dugesii* (Xu et al., 2004); sin embargo, posteriormente se publicó una corrección en la que se aclara que la especie de la que obtuvieron dichos diterpenos corresponden a *S. tiliifolia* y no a *S. dugesii* (Gang et al., 2011; Hu et al., 2013). Para *S. mocinoi* y *S. plurispicata* no existen estudios químicos.

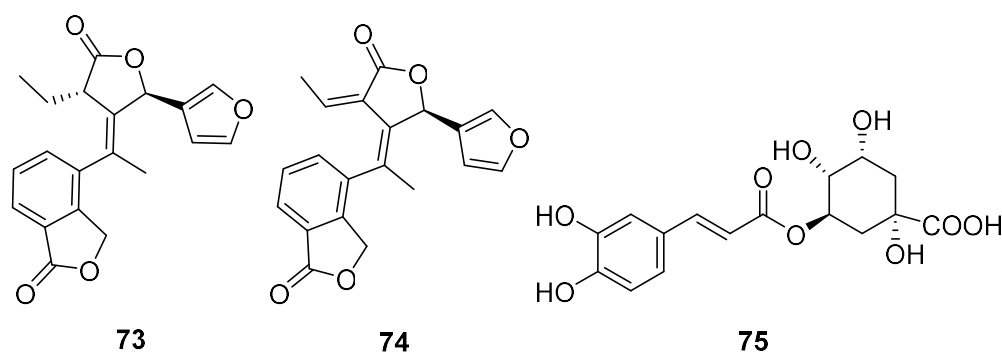


Figura 16. Compuestos aislados de *Salvia gesneriiflora*.

Por lo anterior se propuso trabajar con especies de *Salvia* con la finalidad de aportar información sobre la fitoquímica del género, así como conocer su potencial antifúngico entre hongos fitopatógenos del género *Fusarium*.

3. JUSTIFICACIÓN

Entre las técnicas que se emplean para el control de plagas y enfermedades encontramos el uso de plaguicidas sintéticos que son utilizados de forma indiscriminada, éstos contienen compuestos tóxicos que causan daño tanto a los consumidores como al ambiente, además de promover la aparición de organismos resistentes. Debido a los efectos negativos que generan los productos químicos sintéticos y a la demanda de alimentos libres de ellos, es que se ha promovido la búsqueda de plaguicidas naturales para la protección de los cultivos. La amplia variedad de sustancias químicas que producen las salvas como respuesta a los diferentes tipos de estrés, abre la pauta para buscar alternativas para biocontrol en beneficio del sector agrícola y de los consumidores, por lo que se propone trabajar con tres especies vegetales a fin de encontrar sustancias con actividad antifúngica.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antifúngica de *Salvia dugesii*, *Salvia plurispicata* y *Salvia mocinoi* sobre aislados de *Fusarium* spp. de plátano de la región costa de Oaxaca, así como dilucidar la estructura química tanto de los compuestos mayoritarios como de aquellos que resulten bioactivos.

4.1 Objetivos Específicos

- Obtener los extractos de la parte aérea y de raíz de las tres especies de *Salvia*.
- Obtener los aislados de *Fusarium* spp. de plátano.
- Realizar el ensayo antifúngico entre los hongos fitopatógenos y los extractos.
- Aislar los compuestos mayoritarios de los extractos vegetales bioactivos.
- Determinar la estructura de los metabolitos por métodos físicos, químicos, espectrométricos y espectroscópicos.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Generalidades

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de 1D y 2D se determinaron en espectrómetros Varian Mercury Plus 400; Varian Mercury 300, BRUKER 300 y BRUKER 200; los disolventes utilizados fueron cloroformo deuterado $CDCl_3$ y metanol deuterado CD_3OD y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna fueron. Los espectros fueron procesados en el programa MestReNova v12.0.0-20080.

La purificación de los compuestos se realizó por cromatografía en columna abierta en fase normal (gel de sílice 60 (230-400 mesh ASTM)), los sistemas de elución fueron mezclas de hexanos-acetato de etilo con incrementos en la polaridad. El proceso de separación se monitoreó mediante cromatografía en capa fina (CCF), utilizando como fase estacionaria cromatofolios de aluminio (AL TLC, gel de sílice 60 F254) y como fase móvil diferentes sistemas de elución hexanos-acetato de etilo.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Scientific y no están corregidos.

5.2 Material botánico

5.2.1 Selección de especies

La Dra. Brenda Y. Bedolla García, realizó la identificación botánica de especies del género *Salvia*, ubicadas en Michoacán. De una lista de 13 especies, se seleccionaron a *S. dugesii* Fernald, *S. plurispicata* Epling y *S. mocinoi* Benth. para realizar el estudio fitoquímico, que de acuerdo con la búsqueda de información en la base de datos SciFinder® dichas especies no cuentan reportes sobre su fitoquímica. Adicionalmente se incluyó a *S. gesneriiflora* Lindl. & Paxton debido a la característica aromática de sus hojas y solo como parte de un estudio comparativo de aceites esenciales con *S. dugesii*.

5.2.2 Recolección de plantas

Las salidas de campo se realizaron en diferentes sitios del Estado de Michoacán para recolectar el material vegetal. Se depositaron dos ejemplares de cada especie

en el Herbario del Centro Regional del Bajío, Instituto de Ecología A. C. y fueron determinados por la Dra. Brenda Y. Bedolla García. A continuación, se indican los datos de recolección por cada especie.

Salvia dugesii Fernald

Voucher: 257299. Michoacán de Ocampo, municipio de Jiménez: alberca de Los Espinos, 19°54'24"N, 101°46'17"W, altitud 2049, 8/abril/2017, colectores: *B. Bedolla-García, R. E. N. del Río T. y M. Calderón* 126. Hábitat: matorral subtropical, arbusto de 2.5 m de alto, flores azules y aromática.

Salvia gesneriiflora Lindl. & Paxton

Voucher: 257298. Michoacán de Ocampo, municipio de Charapan: a las afueras del poblado Charapan, al W, ca. de la carr. Los Reyes-Charapan, 19°38'60"N, 102°15'21"W, altitud 2370 m, 13/abril/2017, *B. Bedolla-García y G. Álvarez B.* 127. Hábitat: barranca, relictos de bosque de *Pinus*, arbusto, trepador, corola roja, abundantes de tricomas glandulares

Salvia mocinoi Benth

Voucher 257773. Las Cruces, sobre el camino de Las Peras a Indaparapeo, municipio de Indaparapeo, 19°12'4"N, 100°54'50"W, 2300 m, 21/abril/2017, *S. Zamudio* 17200.

Salvia plurispicata Epling

Voucher 257774. Ca. de la Laguna Larga, Los Azufres, municipio de Zinapécuaro, 19°48'13"N, 100°41'06"W, 2661 m, 5/mayo/2017, *S. Zamudio, B. Bedolla et al.* 17205.

5.3 Extracción de aceites esenciales de *S. dugesii* y *S. gesneriiflora*

Los aceites esenciales se obtuvieron mediante el método por arrastre de vapor a partir de 135 g de hojas frescas de *S. dugesii* y 200 g de hojas frescas de *S.*

gesneriiflora. La mezcla del arrastre de vapor de agua y aceites esenciales se condensaron en un refrigerante y se recuperaron en un matraz, se realizaron tres extracciones con diclorometano en una proporción 1:2. Se recuperó la fase orgánica y se adicionó sulfato de sodio anhidro, se filtró y el disolvente se dejó evaporar hasta peso constante. Los aceites esenciales obtenidos se analizaron por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas en un equipo marca Thermo Scientific GC TRACE 1310 EM ISQ LT a 70 eV. Los espectros obtenidos se analizaron con la base de datos NIST MS Search 2.0 (National Institute of Standards and Technology Mass Spectral Database). El porcentaje mínimo de comparación para un componente fue del 70 %.

5.4 Preparación de los extractos vegetales

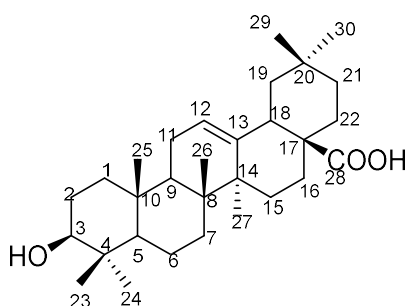
El material vegetal de cada especie se secó a temperatura ambiente y a la sombra, posteriormente se separaron en flores, hojas, tallos y raíces. La maceración se inició con hexano durante tres días, a temperatura ambiente y en ausencia de luz para evitar la descomposición de algún producto natural. Una vez transcurrido el tiempo, el disolvente se filtró y se eliminó a presión reducida, este procedimiento se realizó tres veces. El material vegetal residual se secó y maceró con diclorometano (CH_2Cl_2) y finalmente con metanol (MeOH) para recuperar el mayor número de componentes. A cada extracto se le determinó el rendimiento de extracción y se analizó por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) para determinar la naturaleza y abundancia de los metabolitos presentes. Los criterios de selección de extractos se basaron en el rendimiento de extracción y en las señales de los espectros de RMN de hidrógeno.

5.5 Extracción de productos naturales y preparación de derivados

5.5.1 Extracción del ácido oleanólico (60)

De un lote de 115 g de flor de *Salvia dugesii* se obtuvieron 4.81 g de extracto de diclorometano. Se tomaron 4 g del extracto para desengrasarlo dos veces con metanol y se recuperaron 3.3 g de extracto desengrasado para la separación cromatográfica, la cual se realizó en una columna de vidrio de 2 cm de diámetro, gel

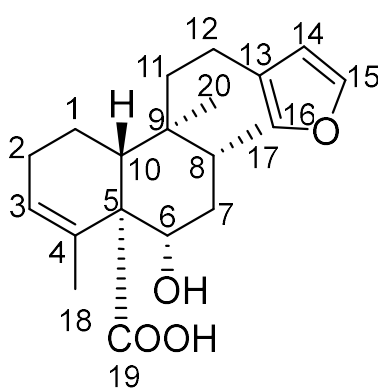
de sílice 230-400 mallas como fase estacionaria y hexano para el empacamiento; la fase móvil constó de mezclas de hexano-acetato de etilo en polaridad ascendente. Se recolectaron 65 fracciones de 30 mL. De las fracciones 17-42 se recuperaron 2 g de un compuesto mayoritario impuro, el cual se llevó a una recromatografía para obtener 562 mg de un sólido blanco amorfo con punto de fusión de 282-288 °C, el compuesto se disolvió con etanol al 99.7 % para favorecer la formación de cristales; estos presentaron forma de agujas incoloras.



Ácido oleanólico (**60**). Sólido cristalino incoloro; $[\alpha]_{589} + 67$, $[\alpha]_{578} + 68$, $[\alpha]_{546} + 77$, $[\alpha]_{436} + 132$, $[\alpha]_{365} + 210$ (*c* 2.8, CHCl₃). IR $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹ = 2931, 2857, 1692, 1471, 1434, 977. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ 5.28 (1H, t, *J* = 3.6 Hz, H-12), 3.22 (1H, dd, *J* = 11.0, 5.0 Hz, H-3), 2.80 (1H, dd, *J* = 13.6, 3.6 Hz, H-18), 1.94 (1H, H-16), 1.87 (1H, H-11), 1.76 (1H, H-22'), 1.71 (1H, H-15'), 1.63 (1H, H-19'), 1.61 (1H, H-16'), 1.61 (1H, H-1'), 1.59 (2H, m, H-2, H-2'), 1.57 (1H, H-22), 1.53 (1H, H-9), 1.52 (1H, H-6), 1.40 (1H, H-7), 1.36 (1H, H-6'), 1.33 (1H, H-21'), 1.30 (1H, H-7'), 1.15 (1H, H-19), 1.13 (3H, s, H-27), 1.09 (1H, H-15), 0.98 (3H, s, H-23), 0.95 (1H, H-1), 0.92 (3H, s, H-29), 0.92 (1H, H-11'), 0.91 (3H, s, H-25), 0.90 (3H, s, H-30), 0.77 (3H, s, H-26), 0.74 (3H, s, H-24) y 0.72 (1H, H-5).
 RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ 183.3 (C, C-28), 143.5 (C, C-13), 122.6 (CH, C-12), 79.0 (CH, C-3), 55.1 (CH, C-5), 47.6 (CH, C-9), 46.5 (C, C-17), 45.8 (CH₂, C-19), 41.5 (C, C-14), 40.9 (CH, C-18), 39.2 (C, C-8), 38.7 (C, C-4), 38.3 (CH₂, C-1), 37.0 (CH₂, C-10), 33.7 (CH₂, C-21), 33.0 (CH₃, C-29), 32.5 (CH₂, C-7), 32.4 (CH₂, C-22), 30.6 (C, C-20), 28.0 (CH₃, C-23), 27.6 (CH₂, C-15), 27.1 (CH₂, C-2), 25.9 (CH₃, C-27), 23.5 (CH₃, C-30), 23.3 (CH₂, C-11), 22.8 (CH₂, C-16), 18.2 (CH₂, C-6), 17.1 (CH₃, C-26), 15.5 (CH₃, C-24) y 15.3 (CH₃, C-25).

5.5.2 Extracción del ácido kerlinico (76)

A partir de 280 g de hoja de *Salvia dugesii* se obtuvieron 30 g de extracto de diclorometano. Se tomaron 6 g de extracto, se desengrasó dos veces con metanol y se obtuvieron 4 g de extracto desengrasado, se sometió a cromatografía en columna abierta con gel de sílice 230-400 mallas y mezclas de hexano-acetato de etilo en polaridad creciente. De las fracciones 2-25 se obtuvieron 1.4 g de un compuesto impuro, que por recromatografía se obtuvieron 300 mg de un sólido blanco amorfo.



Ácido kerlinico (**76**). Sólido blanco amorfo. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 7.35 (1H, s, H-15), 7.21 (1H, s, H-16), 6.26 (1H, s, H-14), 5.64 (1H, s, H-3), 3.48 (1H, dd, $J = 11.5, 4.5$ Hz, H-6), 2.30 (1H, H-12'), 2.23 (1H, H11'), 2.22 (1H, H-2'), 2.19 (1H, H-2), 2.08 (1H, H-11), 1.98 (1H, H-1'), 1.97 (1H, H-7'), 1.92 (3H, s, H-18), 1.84 (1H, H-7), 1.80 (1H, H-1), 1.77 (1H, H-8), 1.67 (1H, H-12), 1.50 (1H, H-10), 0.86 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-

17) y 0.73 (3H, s, H-20).

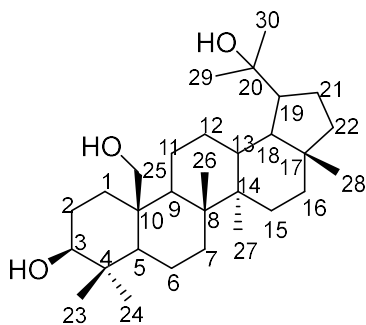
RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 181.6 (C, C-19), 142.9 (CH, C-15), 138.5 (CH, C-16), 136.2 (C, C-4), 127.6 (CH, C-3), 125.2 (C, C-13), 110.8 (CH, C-14), 76.0 (CH, C-6), 53.7 (C, C-5), 48.3 (CH, C-10), 39.0 (CH_2 , C-7), 38.8 (CH_2 , C-1), 38.2 (C, C-9), 35.4 (CH, C-8), 26.3 (CH_2 , C-11), 23.3 (CH_3 , C-18), 17.5 (CH_2 , C-2), 17.5 (CH_2 , C-12), 16.1 (CH_3 , C-17) y 15.6 (CH_3 , C-20).

5.5.3 Extracción del 3 β ,20,25-trihidroxilupano (77)

De un lote de 295 g de hoja seca de *Salvia dugesii* se obtuvieron 11.78 g de extracto hexánico. Se tomaron 3 g del extracto para desengrasarlo dos veces con metanol y una vez con acetona. Se recuperaron 2 g de extracto hexánico desengrasado, el cual se llevó a cromatografía en columna con mezclas de hexano-acetato de etilo en polaridad ascendente en una columna de vidrio de 2 cm de diámetro, gel de sílice

230-400 mallas como fase estacionaria y hexano para el empacamiento. Se recuperaron 132 fracciones de 7 mL.

De las fracciones 112-119 se obtuvieron 683.1 mg de un compuesto mayoritario, sólido blanco amorfo con punto de fusión de 140-144 °C.

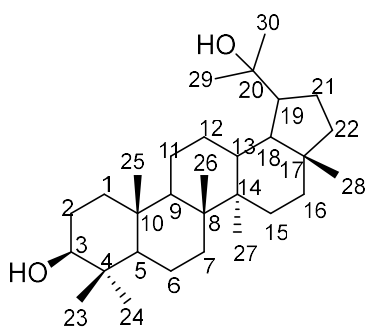


3β,20,25-trihidroxilupano (77). Rotación específica de $[\alpha]_{589} + 37$ $[\alpha]_{578} + 39$, $[\alpha]_{546} + 44$, $[\alpha]_{436} + 78$, $[\alpha]_{365} + 131$ (*c* 9.7, CHCl₃). IR $\nu_{\text{máx}}$ cm⁻¹= 3598, 2963, 1738, 1466, 1384, 1370, 1160, 1111, 1062. RMN de ¹H (300 MHz, CDCl₃): δ 4.01 (1H, d, *J* = 12.1 Hz, H-25), 3.92 (1H, d, *J* = 12.1 Hz, H-25'), 3.24 (1H, dd, *J* = 10.6, 5.7 Hz, H-3), 2.25 (1H, dt, *J* = 13.6, 3.6 Hz, H-1), 1.87 (1H, H-12), 1.84 (1H, H-21), 1.78 (1H, H-19), 1.78 (1H, H-15), 1.70 (1H, H-13), 1.70 (1H, H-11), 1.64 (2H, H-2), 1.58 (1H, H-11'), 1.48 (1H, H-16), 1.46 (1H, H-6), 1.45 (2H, d, *J* = 2.7 Hz, H-7), 1.40 (1H, H-6'), 1.35 (1H, H-16'), 1.35 (1H, H-9), 1.32 (1H, H-18), 1.31 (1H, H-12'), 1.29, (1H, H-22), 1.22 (3H, s, H-30), 1.19 (3H, s, H-26), 1.15 (1H, H-21'), 1.11 (3H, s, H-29), 1.10 (1H, 22'), 1.04 (1H, H-15'), 1.00 (3H, s, H-23), 0.97 (3H, s, H-27), 0.82 (1H, H-5), 0.82 (1H, m, H-1'), 0.81 (3H, s, H-28), 0.78 (3H, s, H-24).

RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃): δ 79.0 (CH, C-3), 73.6 (C, C-20), 62.6 (CH₂, C-25), 55.6 (CH, C-5), 51.8 (CH, C-9), 50.1 (CH, C-19), 48.5 (CH, C-18), 44.7 (C, C-17), 44.0 (C, C-14), 41.8 (C, C-10), 41.6 (C, C-8), 40.3 (CH₂, C-22), 38.8 (C, C-4), 37.8 (CH, C-13), 35.7 (CH₂, C-16), 34.9 (CH₂, C-7), 33.5 (CH₂, C-1), 31.7 (CH₃, C-30), 29.8 (CH₂, C-21), 28.8 (CH₃, C-23), 28.8 (CH₂, C-12), 27.9 (CH₂, C-15), 27.9 (CH₂, C-2), 24.8 (CH₃, C-29), 24.4 (CH₂, C-11), 19.34 (CH₃, C-28), 18.1 (CH₂, C-6), 16.8 (CH₃, C-26), 15.9 (CH₃, C-24) y 15.5 (CH₃, C-27).

5.5.4 Extracción del 3β,20-dihidroxilupano (78)

De las 132 fracciones del extracto hexánico desengrasado se obtuvieron dos compuestos más; de las fracciones 20-32 se obtuvieron 94.4 mg de un sólido blanco amorfo con punto de fusión de 128-131 °C.

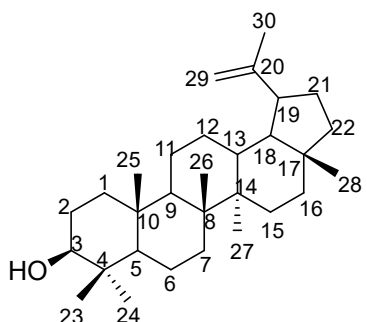


3β,20-dihidroxilupano (78). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 3.20 (1H, dd, $J = 11.2, 5.1$ Hz, H-3), 1.90 (1H, H-21), 1.84 (1H, H-12), 1.79 (1H, H-19), 1.75 (1H, H-15), 1.71 (1H, H-13), 1.62 (1H, H-1), 1.60 (2H, H-2, H-2'), 1.50 (1H, H-6), 1.49 (1H, H-16), 1.48 (1H, H-11), 1.40 (1H, H-6'), 1.39 (2H, d, $J = 3.0$ Hz, H-7), 1.34 (1H, H-16'), 1.32 (1H, H-18), 1.30 (1H, H-21'), 1.27 (1H, H-22), 1.27 (1H, H-12'), 1.25 (1H, H-9), 1.24 (1H, H-11'), 1.22 (3H, s, H-30), 1.10 (1H, H-22'), 1.12 (3H, s, H-29), 1.05 (3H, s, H-26), 1.01 (1H, H-15'), 0.97 (3H, s, H-23), 0.95 (3H, s, H-27), 0.90 (1H, H-1'), 0.83 (3H, s, H-25), 0.80 (3H, s, H-28), 0.76 (3H, s, H-24) y 0.68 (1H, H-5).

RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 79.0 (CH, C-3), 73.5 (C, C-20), 55.1 (CH, C-5), 50.2 (CH, C-9), 49.9 (CH, C-19), 48.3 (CH, C-18), 44.6 (C, C-17), 43.5 (C, C-14), 41.3 (C, C-8), 40.2 (CH_2 , C-22), 38.8 (C, C-4), 38.7 (CH_2 , C-1), 37.4 (CH, C-13), 37.0 (C, C-10), 35.5 (CH_2 , C-16), 34.5 (CH_2 , C-7), 31.5 (CH_3 , C-30), 29.0 (CH_2 , C-12), 28.7 (CH_2 , C-21), 28.0 (CH_3 , C-23), 27.5 (CH_2 , C-15), 27.4 (CH_2 , C-2), 24.7 (CH_3 , C-29), 21.4 (CH_2 , C-11), 19.2 (CH_3 , C-28), 18.3 (CH_2 , C-6), 16.1 (CH_3 , C-26), 16.1 (CH_3 , C-25), 15.4 (CH_3 , C-24) y 14.8 (CH_3 , C-27).

5.5.5 Extracción de lupeol (79)

De las fracciones 61-66 del extracto hexánico de hojas, se recuperaron 91.3 mg de una mezcla que se sometió a una recromatografía para obtener 12.7 mg de un sólido en forma de cristales finos incoloros con punto de fusión de 212-218 °C.

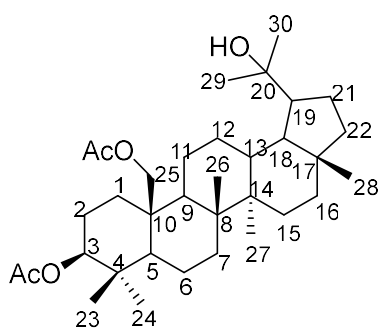


Lupeol (79). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 4.68 (1H, s, H-29), 4.56 (1H, s, H-29'), 3.18 (1H, dd, $J = 11.2, 5.0$ Hz, H-3), 2.38 (1H, m, H-19), 1.91 (1H, H-21), 1.68 (3H, s, H-30), 1.66 (1H, H-1), 1.66 (1H, H-12), 1.63 (1H, H-13), 1.60 (2H, H-2, H-2'), 1.59 (1H, H-15), 1.52 (1H, H-6), 1.48 (1H, H-16), 1.39 (1H, H-11), 1.38 (1H, H-6'),

1.38 (2H, d, $J = 2.0$ Hz, H-7), 1.38 (1H, H-22), 1.36 (1H, H-18), 1.32 (1H, H-16'), 1.26 (1H, H-9), 1.25 (1H, H-21'), 1.18 (1H, H-11'), 1.17 (1H, H-22'), 1.05 (1H, H-12'), 1.02 (3H, s, H-26), 0.99 (1H, H-15'), 0.96 (3H, s, H-23), 0.94 (3H, s, H-27), 0.92 (1H, H-1'), 0.82 (3H, s, H-25), 0.78 (3H, s, H-28), 0.75 (3H, s, H-24) y 0.68 (1H, H-5). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 151.1 (C, C-20), 109.4 (CH_2 , C-29), 79.1 (CH, C-3), 55.4 (CH, C-5), 50.5 (CH, C-9), 48.4 (CH, C-18), 48.1 (CH, C-19), 43.1 (C, C-17), 42.9 (C, C-14), 40.9 (C, C-8), 40.1 (CH_2 , C-22), 39.0 (C, C-4), 38.8 (CH_2 , C-1), 38.1 (CH, C-13), 37.3 (C, C-10), 35.7 (CH_2 , C-16), 34.4 (CH_2 , C-7), 29.8 (CH_2 , C-21), 28.1 (CH_3 , C-23), 27.5 (CH_2 , C-2), 27.5 (CH_2 , C-15), 25.2 (CH_2 , C-12), 21.0 (CH_2 , C-11), 19.4 (CH_3 , C-30), 18.4 (CH_2 , C-6), 18.1 (CH_3 , C-28), 16.2 (CH_3 , C-26), 16.1 (CH_3 , C-25), 15.5 (CH_3 , C-24) y 14.8 (CH_3 , C-27).

5.5.6 Preparación de 3 β ,25-diacetil-20-hidroxilupano (80)

A 50 mg de **78** se le adicionaron (0.5:0.5 mL) piridina y anhídrido acético, la mezcla de reacción se mantuvo en baño María durante dos horas. Posteriormente, el producto de reacción se extrajo con acetato de etilo, se realizaron lavados con tres volúmenes de agua, se adicionó un volumen de ácido clorhídrico al 10 %, se realizaron lavados con tres volúmenes de agua, con disolución saturada de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) tres veces, nuevamente con agua tres veces y finalmente se filtró con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4), el filtrado se dejó evaporar hasta sequedad. Se obtuvo un sólido blanco amorfo con punto de fusión de 67-69 °C con un rendimiento del 78 %.



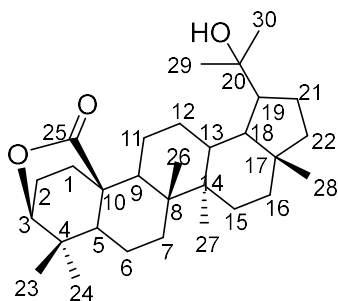
3 β ,25-diacetil-20-hidroxilupano (**80**). Rotación específica de $[\alpha]_{589} + 3$ $[\alpha]_{578} + 3$, $[\alpha]_{546} + 4$, $[\alpha]_{436} + 7$, $[\alpha]_{365} + 13$ (c 17.1, CHCl_3). IR $\nu_{\text{máx}}$ cm^{-1} = 2954, 2855, 1723, 1457, 1369, 1251, 1029, 973, 936, 915, 900. RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 4.51 (1H, t, $J = 10.4$ Hz, H-3), 4.48 (1H, d, $J = 12.4$ Hz, H-25), 4.33 (1H, d, $J = 12.4$ Hz, H-25'), 2.1 (1H, H-1), 2.05 (6H, s, OAc-3/25), 1.88 (1H, H-21), 1.87 (1H, H-12), 1.80 (1H, H-19), 1.76 (1H, H-15), 1.66

(1H, H-13), 1.64 (1H, H-11), 1.54 (1H, H-2'), 1.54 (1H, H-6'), 1.50 (1H, H-2), 1.49 (1H, H-16), 1.46 (2H, d, $J = 2.8$ Hz, H-7), 1.42 (1H, H-9), 1.39 (1H, H-11'), 1.37 (1H, H-16'), 1.36 (1H, H-6), 1.30 (1H, H-18), 1.30 (1H, H-22), 1.30 (1H, H-21'), 1.30 (1H, H-12'), 1.23 (3H, s, H-30), 1.13 (3H, s, H-29), 1.13 (3H, s, H-26), 1.10 (1H, H-22'), 1.03 (1H, H-15'), 0.96 (1H, H-5), 0.96 (3H, s, H-27), 0.95 (1H, H-1'), 0.89 (3H, s, H-23), 0.88 (3H, s, H-24), 0.82 (3H, s, H-28).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ 171.2 (C, OAc-3), 171.0 (C, OAc-25), 80.5 (CH, C-3), 73.5 (C, C-20), 64.0 (CH_2 , C-25), 55.5 (CH, C-5), 51.4 (CH, C-9), 50.0 (CH, C-19), 48.4 (CH, C-18), 44.5 (C, C-17), 43.9 (C, C-14), 41.4 (C, C-10), 40.1 (C, C-8), 40.1 (CH_2 , C-22), 37.7 (CH, C-13), 37.5 (C, C-4), 35.6 (CH_2 , C-16), 34.5 (CH_2 , C-7), 33.4 (CH_2 , C-1), 31.7 (CH_3 , C-30), 29.4 (CH_2 , C-21), 28.7 (CH_2 , C-12), 28.6 (CH_3 , C-23), 27.8 (CH_2 , C-15), 24.7 (CH_3 , C-29), 23.9 (CH_2 , C-11), 23.6 (CH_2 , C-2), 21.3 (CH_3 , OAc-25), 21.3 (CH_3 , OAc-3), 19.2 (CH_3 , C-28), 18.0 (CH_2 , C-6), 16.9 (CH_3 , C-24), 16.5 (CH_3 , C-26) y 15.2 (CH_3 , C-27).

5.5.7 Preparación de la lactona **81**

A 50 mg de **77** se le adicionaron (1.0:1.0 mL) CH_2Cl_2 y tetrahidrofurano (THF) hasta disolver, se agregaron 1.5 equivalentes de clorocromato de piridino (PCC) disuelto en 0.5 mL de CH_2Cl_2 . La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 2 h. El producto de reacción se impregnó en gel de sílice y se fraccionó mediante cromatografía en columna usando mezclas de hexano:acetato de etilo en polaridad ascendente. Se recuperó un sólido incoloro con punto de fusión de 255-260 °C con un rendimiento del 55 %.



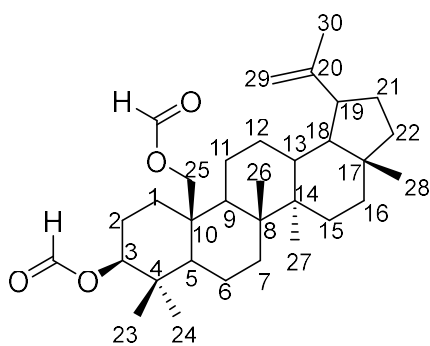
Lactona **81**. RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3): δ 4.04 (1H, dd, $J = 3.4, 1.1$ Hz, H-3), 2.14 (1H, H-11), 2.11 (1H, H-1), 2.00 (1H, H-2), 1.92 (1H, H-13), 1.88 (1H, H-12), 1.88 (1H, H-2'), 1.85 (1H, H-21), 1.82 (1H, H-19), 1.78 (1H, H-15), 1.56 (1H, H-11'), 1.48 (1H, H-16), 1.48 (1H, H-6), 1.46 (2H, H-7, H-7'), 1.42 (1H, H-9), 1.41 (1H, H-18), 1.36 (1H, H-16'), 1.33 (1H, H-1'), 1.32 (1H, H-12'), 1.30 (1H, H-22), 1.30 (1H,

H-6'), 1.29 (1H, H-5), 1.24 (3H, s, H-26), 1.23 (3H, s, H-30), 1.23 (1H, H-21'), 1.12 (3H, s, H-29), 1.11 (1H, H-22'), 1.10 (1H, H-15'), 1.06 (3H, s, H-24), 0.99 (3H, s, H-23), 0.95 (3H, s, H-27), 0.83 (3H, s, H-28).

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) δ 176.1 (C, C-25), 83.9 (CH, C-3), 73.5 (C, C-20), 52.2 (CH, C-5), 49.6 (CH, C-19), 48.1 (CH, C-18), 45.2 (CH, C-9), 44.7 (C, C-10), 44.7 (C, C-17), 43.1 (C, C-14), 40.6 (C, C-8), 40.3 (CH_2 , C-22), 37.8 (CH, C-13), 37.3 (C, C-4), 35.4 (CH_2 , C-16), 32.8 (CH, C-7), 32.7 (CH_2 , C-1), 31.5 (CH_3 , C-30), 29.7 (CH_2 , C-21), 28.7 (CH_2 , C-12), 27.6 (CH_3 , C-24), 27.6 (CH_2 , C-15), 24.7 (CH_3 , C-29), 23.1 (CH_2 , C-11), 22.3 (CH_3 , C-23), 22.2 (CH_2 , C-6), 21.5 (CH_2 , C-2), 19.2 (CH_3 , C-28), 16.1 (CH_3 , C-26), 14.6 (CH_3 , C-27).

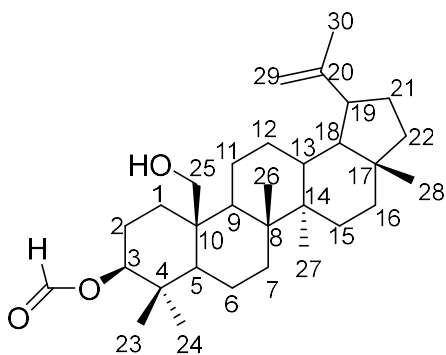
5.5.8 Preparación de derivados formilados **82**, **83** y **84**

A 200 mg de **78** se le agregaron 5.0 mL de tolueno y 1.0 mL de ácido fórmico, la mezcla se mantuvo en reflujo hasta agotar la materia prima (2 h y 20 min), el producto de reacción se concentró en rotavapor a presión reducida y el crudo de reacción se impregnó en 220 mg de gel de sílice 230-400 mallas como fase estacionaria y hexano: acetato de etilo para el empacamiento y fase móvil. Se recuperaron 20 fracciones de 10 mL. En las fracciones F04, F10 y F12 se obtuvieron los derivados **82**, **83** y **84**, con rendimientos del 41, 2 y 30 % respectivamente.

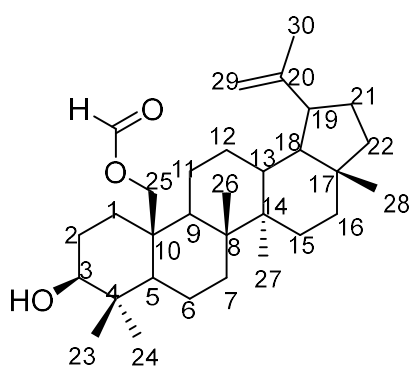


3 β ,25-diformilolup-20(29)-eno (**82**). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 8.10 (1H, s, HCOO-C3), 8.08 (1H, s, HCOO-C25), 4.67 (1H, sa, H-29), 4.58 (1H, d, $J = 12.3$, H-25), 4.57 (1H, s, H-29'), 4.64 (1H, dd, $J = 11.0, 5.5$ Hz H-3), 4.45 (1H, d, $J = 12.3$ Hz, H-25'), 1.67 (3H, s, H-30), 1.10 (3H, s, H-26), 0.95 (3H, s, H-25), 0.91 (3H, s, H-23), 0.90 (3H, s, H-24) y 0.78 (3H, s, H-28).

24) y 0.78 (3H, s, H-28).



3β-formilolup-20(29)-eno (83). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 8.11 (1H, s, HCOO-C3), 4.68 (1H, s, H-29), 4.57 (1H, s, H-29'), 4.64 (1H, dd, $J = 11.1$, 5.5 Hz, H-3), 4.03 (1H, d, $J = 11.8$ Hz, H-25), 3.94 (1H, d, $J = 11.8$ Hz, H-25'), 1.68 (3H, s, H-30), 1.16 (3H, s, H-26), 0.95 (3H, s, H-27), 0.90 (3H, s, H-23), 0.88 (3H, s, H-24) y 0.79 (3H, s, H-28).



25-formilolup-20(29)-eno (84). RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ 8.07 (1H, s, HCOO-C25), 4.68 (1H, s, H-29), 4.56 (1H, s, H-29'), 4.54 (1H, d, $J = 12.2$ Hz, H-25), 4.43 (1H, d, $J = 12.2$ Hz, H-25'), 3.23 (1H, dd, $J = 11.7$, 4.7 Hz, H-3), 1.67 (3H, s, H-30), 1.10 (3H, s, H-26), 1.01 (3H, s, H-23), 0.95 (3H, s, H-27), 0.81 (3H, s, H-24) y 0.78 (3H, s, H-28).

5.6 Ensayo con hongos fitopatógenos

5.6.1 Recolección de tejidos de plátano

Los tejidos de plátano se recolectaron en los municipios aledaños a Puerto Escondido, San Pedro Mixtepec Distrito 22, Oaxaca. El muestreo que se empleó de tipo no probabilístico (Marques Dos Santos, 2004). Se realizó un recorrido al área agrícola y se eligieron aquellos individuos con síntomas de enfermedad. Las muestras se colocaron en bolsas de plástico, se etiquetaron y transportaron al Laboratorio de Genética de la Universidad del Mar campus Puerto Escondido.

5.6.2 Aislamiento de hongos fitopatógenos

Las muestras se lavaron con agua destilada estéril, se realizaron cortes cuadrados tanto de tejido sano (80 %) como enfermo (20 %) de aproximadamente 0.5 mm²; a estos cortes se les realizó una asepsia superficial con hipoclorito de sodio (NaClO) al 3 % durante 1 minuto y se enjuagaron dos veces con agua destilada estéril; se colocaron en cajas de Petri con medio de cultivo agar dextrosa y papa (PDA) y se incubaron a 27 °C durante una semana. Una vez que los hongos crecieron, se realizaron resiembras consecutivas hasta la obtención de cultivos axénicos (Cavallini Arauz, 1998).

5.6.3 Método de difusión en agar

En cajas de Petri (90 mm) con PDA estéril se colocaron seis discos de papel filtro distribuidos en la superficie. A cada disco se le adicionaron 6 µL de cada tratamiento (DMSO, azoxystrobin o extracto). Cuando los tratamientos fueron absorbidos por el papel, se inoculó un propágulo de 5 mm de diámetro de cultivos jóvenes (7 días de crecimiento). Las cajas se incubaron a 25 °C en ausencia de luz. Se midió el crecimiento micelial al tercer día de incubación para las cepas de *Fusarium*, al cuarto día para *Colletotrichum acutatum* 10 y al octavo día para *Oligoporus* sp. Estos dos últimos son controles (sensible y resistente a antifúngicos comerciales) internos y son cepas que forman parte de la colección fúngica del Laboratorio de Fisiología Celular del IIQB-UMSNH. Se calculó el índice de crecimiento para cada hongo de prueba.

5.6.4 Concentración mínima fungicida (CMF) de los compuestos puros

El método utilizado fue el de microdilución en caldo. Los compuestos puros (1.0 mg/mL) se disolvieron en etanol, se prepararon diluciones seriadas al 50 % con medio de cultivo RPMI estéril en una placa de 96 pocillos y se adicionarán 100 μ L del cultivo (5.0×10^4 células/mL) a cada pocillo. Se utilizó azoxystrobin como control positivo. Se dejó incubar a 27 °C durante 48 h y posteriormente se tomaron 20 μ L de cada dilución para subcultivar en cajas de Petri de 60 mm con agar dextrosa Sabouraud, se dejaron incubar a 27 °C durante 48 h y finalmente se hizo el conteo de colonias. El punto de corte para definir a la concentración mínima fungicida es aquella concentración de compuesto más baja que no muestre crecimiento o muestre menos de tres colonias (Espinell-Ingroff et al., 2002).

5.6.5 Método de difusión en agar para compuestos (método modificado)

Para determinar la actividad antifúngica de los compuestos insolubles en el medio RPMI o medio acuso, se consideró el método de difusión en agar con las siguientes modificaciones: en cajas de Petri (90 mm) con PDA estéril, se colocaron seis discos de papel filtro distribuidos en la superficie. A cada disco se le adicionaron 6 μ L de cada tratamiento hasta alcanzar la concentración de prueba (etanol, azoxystrobin o compuesto). Una vez que fueron absorbidos por el papel, se inocularon 1×10^5 esporas en cada disco. Las cajas se incubaron a 25 °C en ausencia de luz. Se midió el crecimiento micelial al tercer día de incubación para las cepas de *Fusarium*. Se calculó el índice de crecimiento.

5.7 Análisis estadístico

De cada tratamiento se realizaron tres repeticiones independientes cada uno por triplicado. Los datos se analizaron mediante un ANOVA de una vía seguido por la prueba de Dunnet o Tukey ($p < 0.05$). Para el análisis de los datos se utilizó el paquete Statistica versión 10.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Aceites esenciales de *Salvia dugesii* y *Salvia gesneriiflora*

Los aceites esenciales de *S. dugesii* y *S. gesneriiflora* presentaron un rendimiento de 0.0786 y 0.0711 % respectivamente. Del análisis de CG-EM se detectaron 27 componentes para *S. dugesii* con abundancia relativa de 0.60 – 10.04 %, los componentes principales fueron el cariofileno (**12**) (10.04 %), γ -muuroleno (**85**) (7.97), espatulenol (**17**) (7.63 %), óxido de cariofileno (**16**) (5.85 %), germacreno D (**86**) (4.97 %) y otros componentes con una abundancia menor al 4.5 %. Para *S. gesneriiflora* se detectaron 25 componentes con abundancia relativa de 0.73 – 15.68 %, los componentes principales fueron cariofileno (**12**) (15.68 %), hediciariol (**87**) (7.57 %), γ -elemeno (**88**) (7.54 %), valeranona (**89**) (6.26 %), acetato de bornilo (**10**) (5.80 %), geranil- α -terpineno (**90**) (5.49 %) y espatulenol (**17**) (4.74 %) así como otros componentes con una abundancia menor al 4.5 %. Las dos especies de *Salvia* comparten seis compuestos con abundancia relativa distinta. (Figura 17; Tabla 1).

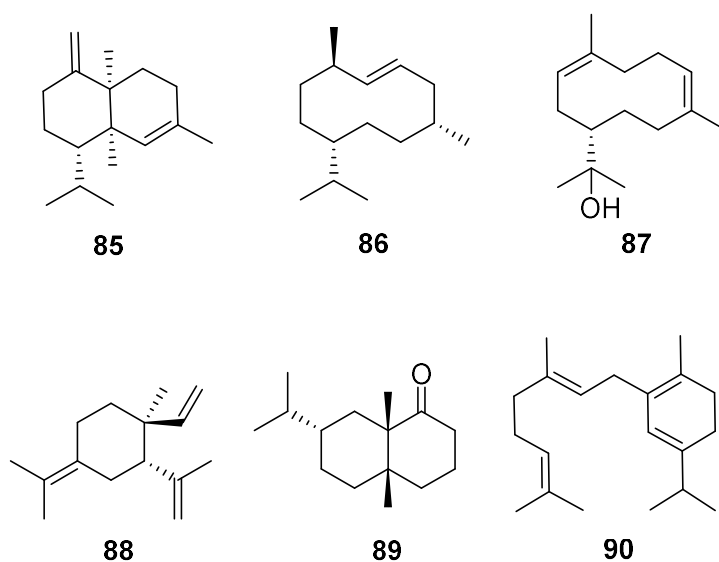


Figura 17. Estructuras de los compuestos **85-90** encontrados en los aceites esenciales de *Salvia dugesii* y *S. gesneriiflora*.

Tabla 1. Componentes de los aceites esenciales de dos especies de *Salvia*.

Tiempo de retención (min)	Componente	<i>S. dugesii</i> %	<i>S. gesneriiflora</i> %
10.30	Cariofileno (12)	10.04	15.68
9.27	Acetato de bornilo (10)	3.35	5.80
11.45	Espatulenol (17)	7.63	4.74
11.15	Óxido de cariofileno (16)	5.84	2.54
10.52	Aromadendreno (82)	2.95	1.09
9.99	β -Bourboneno (83)	1.60	1.01

El perfil químico de ambas especies es diferente con respecto a los componentes minoritarios. La composición química de los aceites esenciales está constituida principalmente por terpenos (mono y sesquiterpenos), ésteres, alcoholes y cetonas; nuestros resultados son semejantes a los reportados para la mayoría de las especies de *Salvia*, en donde la composición química de los aceites esenciales de salvias muestra principalmente monoterpenos y sesquiterpenos que contienen oxígeno (Formisano et al., 2007; Kamatou et al., 2008; Rustaiyan et al., 2007; Schmiderer et al., 2008).

Entre los componentes principales que se han reportado para este género están los compuestos **12**, **16** y **17**. Para dichos compuestos se ha reportado su actividad anticancerosa, antioxidante y antimicrobiana; su efecto analgésico y antiinflamatorio; así como su efecto inmunomodulador de linfocitos.

6.2 Selección de extractos

Se plantearon dos criterios de selección de extractos, el primero con base en el rendimiento el cual debe ser igual o superior al 1.5 %, para realizar tanto los ensayos biológicos como la purificación de compuestos mayoritarios; el segundo, de acuerdo con las señales de los espectros de resonancia magnética nuclear, sobre todo aquellas que aparecen en la región de aromáticos, heteroátomos y alifáticos dada la abundancia de flavonoides y terpenos en el género *Salvia*. Se obtuvieron 12 extractos por cada especie vegetal. En la tabla 2 se muestra el rendimiento en gramos y porcentaje y se indica en negritas los 22 extractos seleccionados de acuerdo con este criterio. Los extractos con mayor rendimiento fueron los obtenidos con metanol, seguidos de diclorometano y finalmente los de hexano.

Tabla 2. Rendimiento de extracción de *Salvia dugesii*, *S. mocinoi* y *S. plurispicata* con hexano, diclorometano y metanol. Los extractos con rendimiento superior a 1.5 % se muestran en negritas.

	Parte de la planta	Hexano		Diclorometano		Metanol	
		g	%	g	%	g	%
<i>S. dugesii</i>	Flor	2.12	1.85	4.81	4.37	4.35	4.31
	Hoja	11.78	3.99	30.04	10.73	29.73	12.08
	Tallo	1.07	0.36	1.56	0.52	7.78	2.63
	Raíz	0.39	0.29	0.53	0.40	2.56	1.97
<i>S. mocinoi</i>	Flor	2.41	5.36	0.69	1.68	2.91	7.45
	Hoja	1.09	0.56	2.59	1.35	3.10	1.64
	Tallo	0.91	0.28	1.84	0.58	11.75	3.73
	Raíz	0.29	0.21	0.38	0.28	5.72	4.24
<i>S. plurispicata</i>	Flor	0.94	2.36	1.97	5.31	10.53	10.5
	Hoja	2.54	1.69	5.01	3.41	9.42	6.68
	Tallo	2.06	0.34	5.61	0.94	25.46	4.32
	Raíz	0.66	0.24	0.76	0.28	11.23	4.24

Los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno de los 32 extractos permitieron seleccionar aquellos que mostraron señales en la región de aromáticos, heteroátomos, así como de alifáticos. Los espectros de los extractos de las partes aéreas muestran el mismo patrón de señales para flores, hojas y tallos, con un mismo disolvente; lo que justifica que la gran mayoría de los estudios fitoquímicos de *Salvia* se realicen de la parte aérea y raíces. De acuerdo con los criterios de selección mencionados anteriormente, los extractos que se consideraron fueron los que se muestran en la figura 18; sus espectros de RMN ^1H se muestran en el Anexo 1.

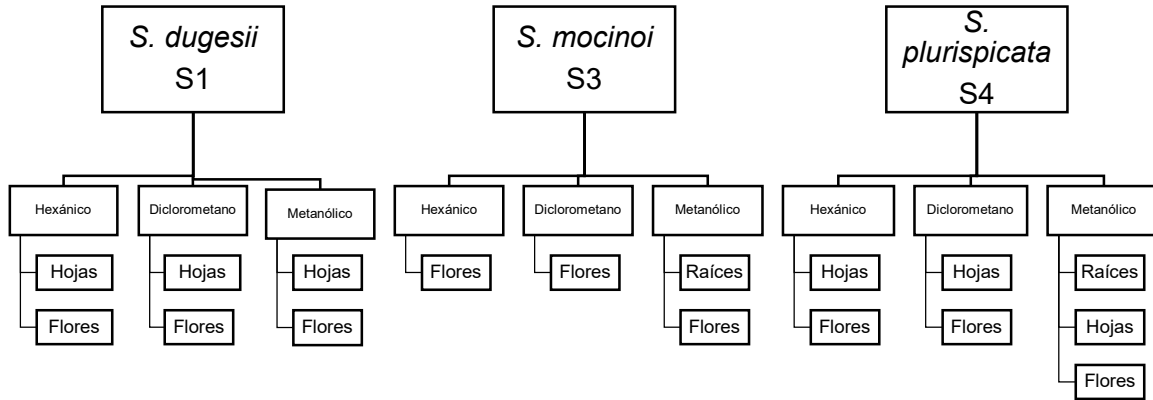


Figura 18. Extractos seleccionados por especie, disolvente y parte de la planta. A cada extracto se le asignó una abreviatura que incluye la especie: S1 corresponde a *S. dugesii*, S3 a *S. mocinoi* y S4 a *S. plurispicata*; seguido del disolvente: H para hexánico, C para diclorometilénico y M para metanólico; finalmente parte de la planta: H hojas, F flores y R raíces.

6.3 Efecto antifúngico de los extractos de las tres especies de *Salvia*

6.3.1 Inhibición del crecimiento micelial

Existen algunos trabajos referentes al efecto antifúngico de extractos de *Salvia*; por ejemplo, en el 2002 reportaron que el extracto de *S. moorcraftiana* obtenido con acetona, inhibió el crecimiento de *Macrophomina phaseolina* y *Fusarium oxysporum* var. *lycopersici* en un 50.0 y 60.0 % respectivamente (Khan et al., 2002). Recientemente se publicó el efecto de 1000 ppm del extracto hexánico de *S. virgata* frente a *Verticillium dahliae*, *Fusarium oxysporum* f sp *radicis lycopersici*, *Alternaria solani* y *Rhizoctonia solani*, quienes presentaron una inhibición del crecimiento micelial del 27.8, 62.9, 63.9 y 97.6 %, respectivamente (Bayar & Yilar, 2019).

En este trabajo se utilizaron los 17 extractos seleccionados para realizar el ensayo antifúngico, (cinco hexánicos, cinco diclorometilénicos y siete metanólicos). En la figura 19 se muestran los valores del crecimiento micelial de las tres especies de *Fusarium* frente a los tratamientos; S1 corresponde a *Salvia dugesii*, S3 a *S. mocinoi* y S4 a *S. plurispicata*. Al comparar el efecto de los extractos con el control, se encontraron diferencias significativas entre las medias del crecimiento micelial

($p < 0.05$) de las tres especies de *Fusarium*, los extractos hexánicos que tienen mayor efecto antifúngico son: S4HH, S4HF y S1HF.

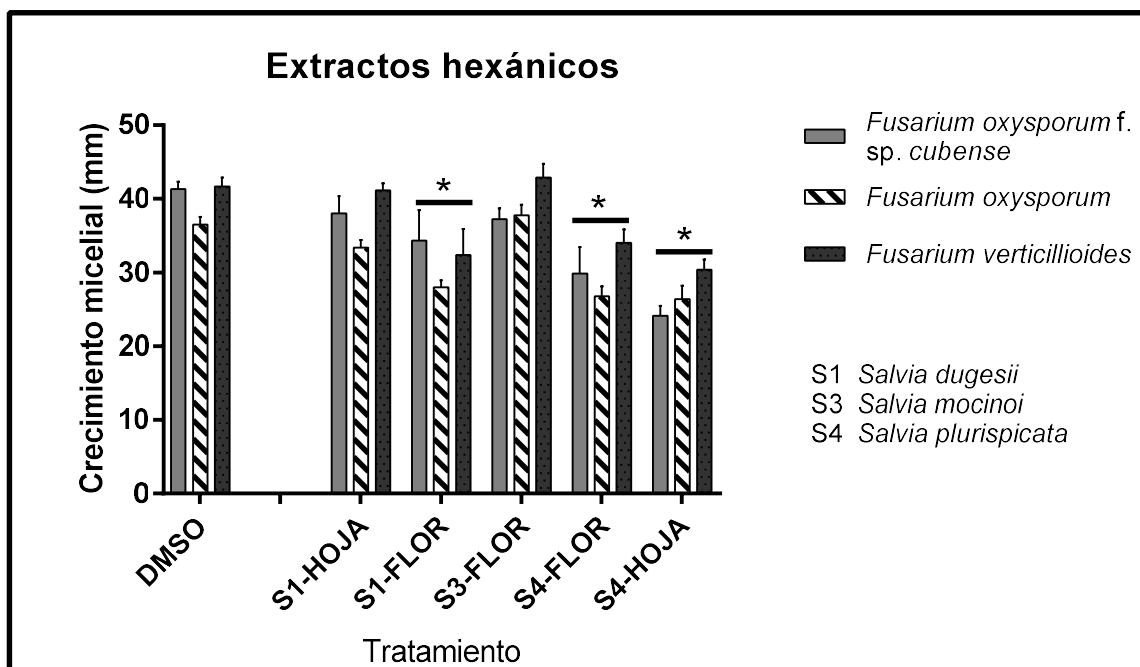


Figura 19. Crecimiento micelial de las tres especies de *Fusarium* frente a los extractos hexánicos de *Salvia* spp. Los datos fueron analizados por un ANOVA de una vía seguido por la prueba de Dunnet.

Los extractos de diclorometano también inhibieron el crecimiento micelial de las tres especies de *Fusarium*. En la figura 20 se muestran los resultados, al comparar el efecto de los extractos con el control y de acuerdo con el análisis estadístico, existe una diferencia significativa entre las medias del control y los tratamientos identificados como S1CF, S1CH, S4CF y S4CH.

De los extractos metanólicos, S1MF y S4MR mostraron inhibición en el crecimiento micelial tanto de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* como de *F. verticillioides* (Figura 21).

Así, los extractos que presentaron mayor efecto antifúngico fueron los obtenidos con diclorometano a partir de las flores tanto de *S. dugesii* como de *S. plurispicata*.

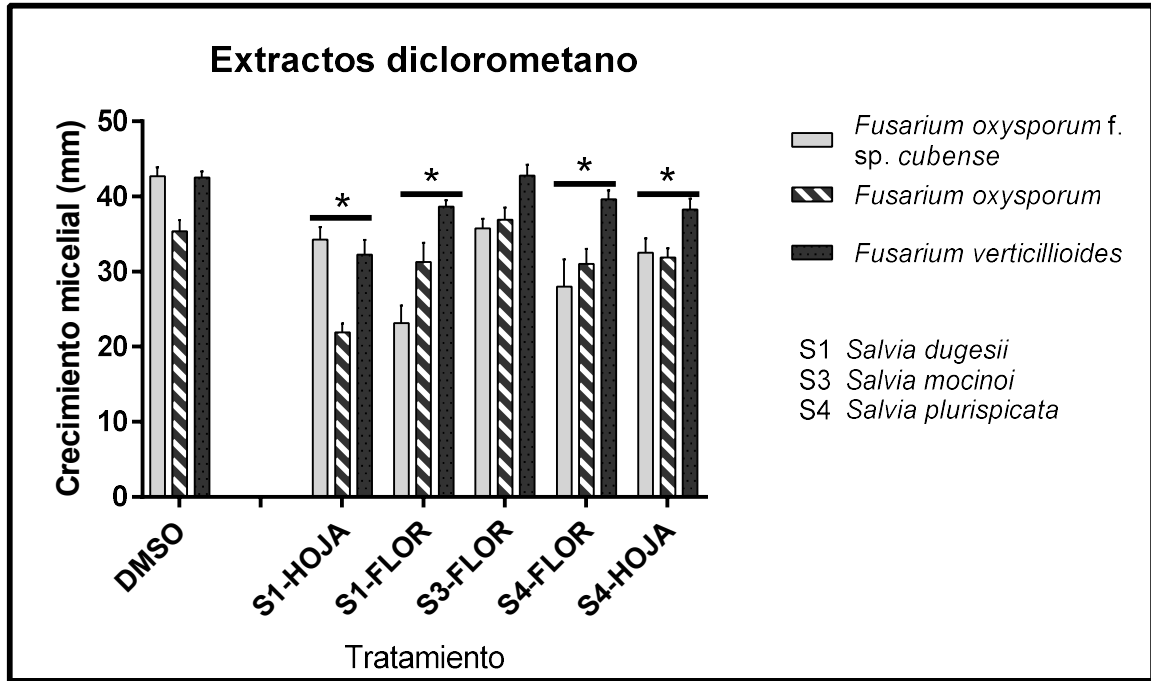


Figura 20. Crecimiento micelial de las tres especies de *Fusarium* frente a los extractos obtenidos con diclorometano de *Salvia* spp. Los datos fueron analizados por un ANOVA de una vía seguido por la prueba de Dunnet.

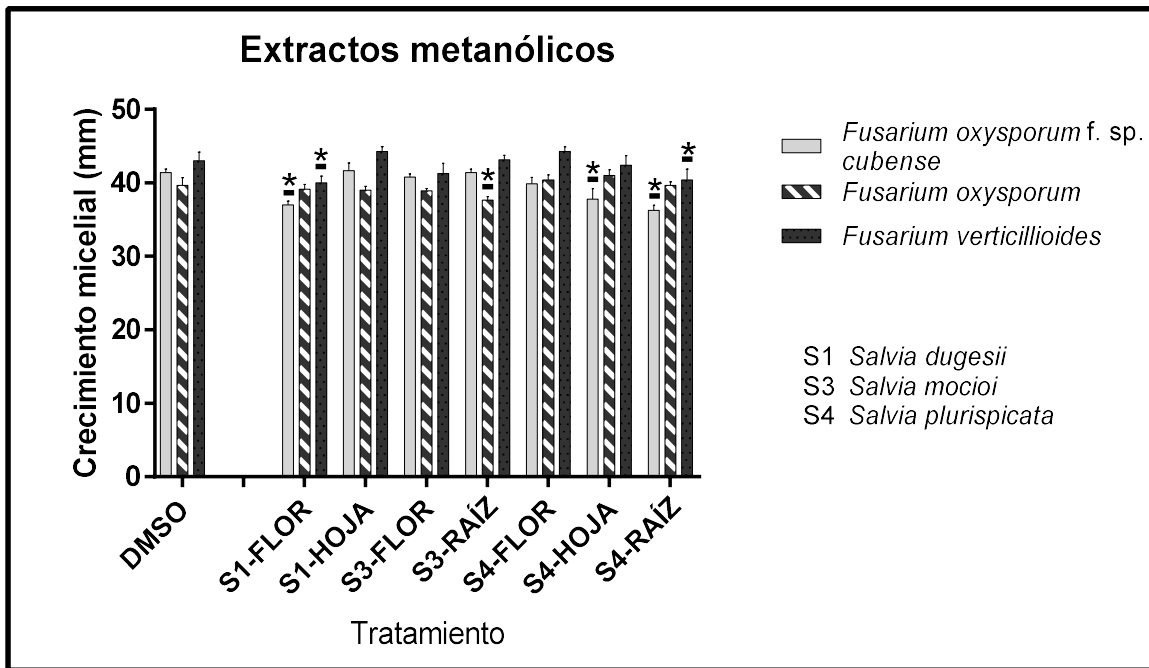


Figura 21. Crecimiento micelial de las tres especies de *Fusarium* frente a los extractos obtenidos con metanol de *Salvia* spp. Los datos fueron analizados por un ANOVA de una vía seguido por la prueba de Dunnet.

En esta investigación, además de conocer la fitoquímica de estas especies de *Salvia*, es biológicamente atractivo que las flores de dos especies distintas, recolectadas en diferentes lugares hayan presentado esta novedosa actividad antifúngica, por lo que resulta interesante saber si un mismo compuesto es el responsable de la inhibición del crecimiento *in vitro* o si se trata de compuestos distintos. En caso de que el responsable de dicha inhibición sea un mismo compuesto presente en ambas especies de *Salvia*, podríamos sugerir que existe una ruta metabólica en común que le puede conferir alguna ventaja adaptativa debido a que se trata de dos especies independientes.

Este ensayo preliminar evidenció actividad antifúngica para *Fusarium* y, con la finalidad de ampliar el espectro de microorganismos de prueba, se incluyeron dos cepas control: *Oligoporus* sp. y *Colletotrichum acutatum* 10.

Al mismo tiempo, se compararon los espectros de los extractos bioactivos y en ellos observamos que S1CF y S1CH coinciden en los desplazamientos de tres señales simples entre 7.5 y 6.0 ppm, así como señales características de terpenos (Figura 22), de manera similar, para los extractos S4CF y S4CH encontramos coincidencia de señales aproximadamente en 5.3 y 2.8 ppm, así como señales características de terpenos (Figura 23).

Por lo anterior y debido a que los extractos S1CF y S4CF tuvieron un mayor efecto en la inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* f sp. *cubense*, se inició su fraccionamiento para aislar sus componentes mayoritarios. Aunque el extracto S1HH no mostró efecto bioactivo, su espectro evidenció un compuesto mayoritario por lo que también se inició su fraccionamiento.

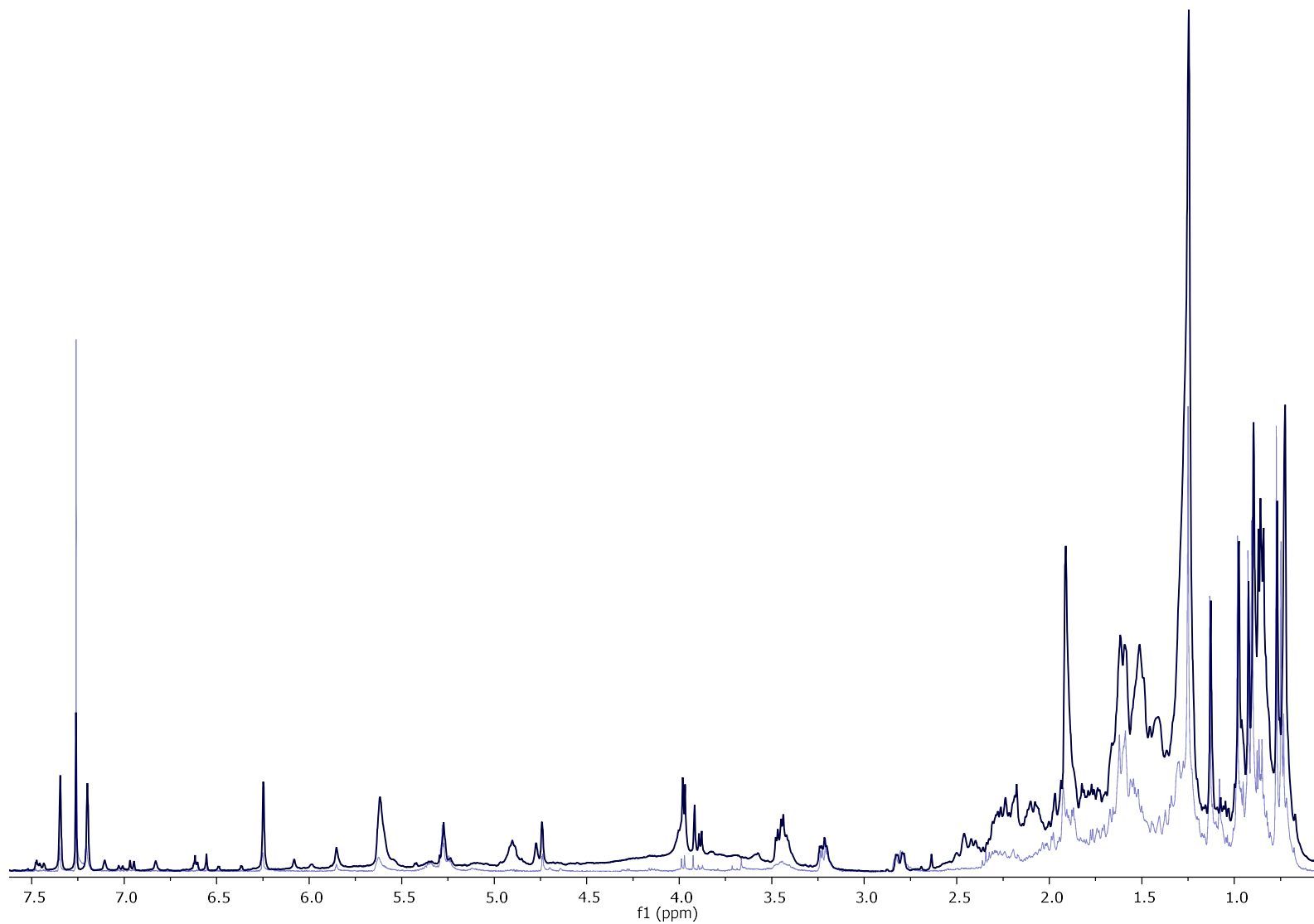


Figura 22. Espectros de RMN 1H los extractos S1CF (azul) y S1CH (negro).

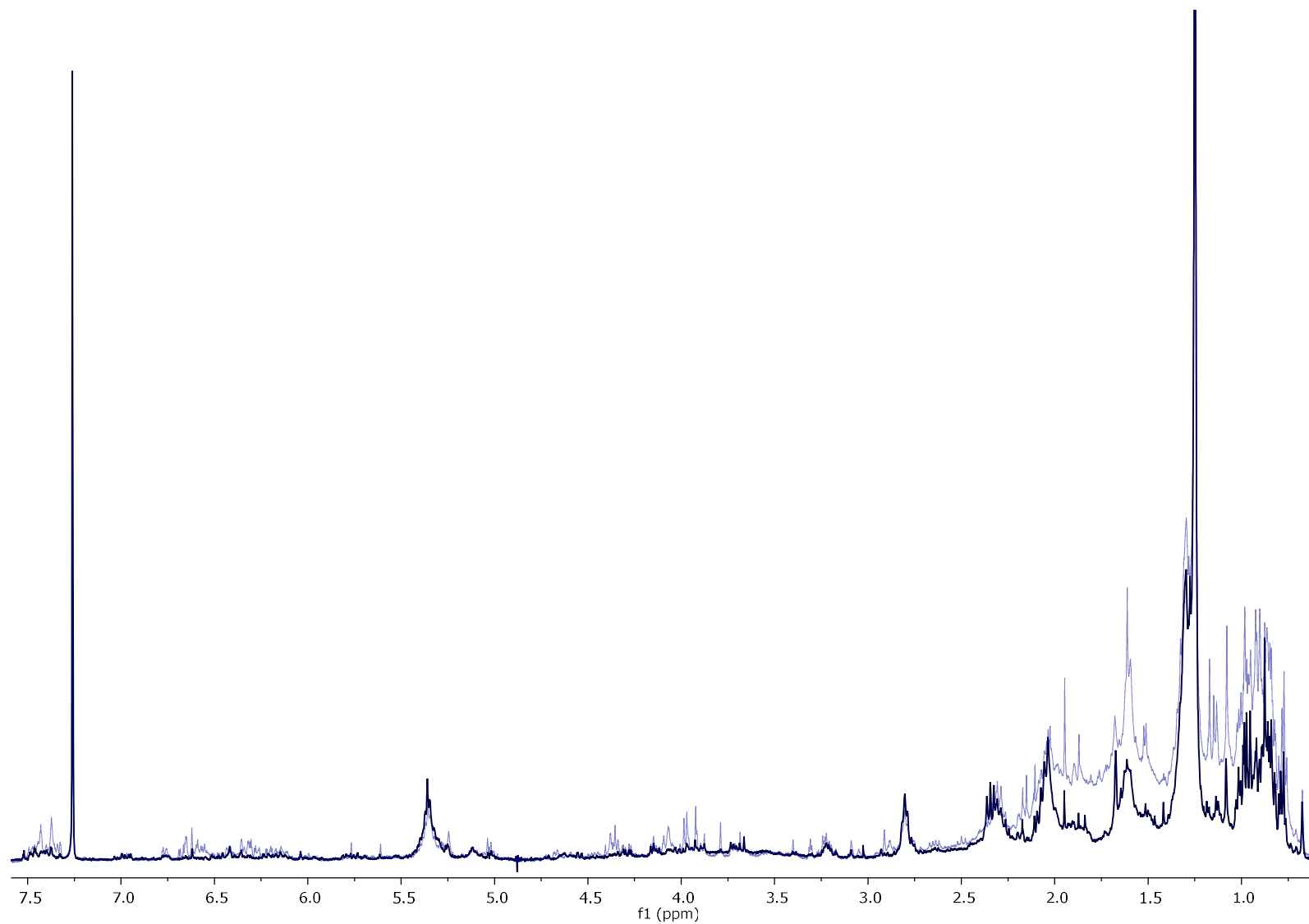


Figura 23. Espectros de RMN 1H los extractos S4CF (negro) y S4CH (azul).

El ensayo para determinar el efecto antifúngico para las cepas control incluyó a los 14 extractos restantes (cuatro hexánicos, tres diclorometilénicos y siete metanólicos). Se calculó el índice de crecimiento (IC) de las tres cepas de *Fusarium*, así como de las cepas control. En la tabla 3 se muestran los valores del índice de crecimiento de los extractos evaluados. Dichos valores se interpretan como sigue: entre más cercano sea el valor de IC a cero, mayor efecto antifúngico tendrá el extracto, por otro lado, si el IC es más cercano a la unidad, el extracto presenta un menor efecto antifúngico.

Tabla 3. Índice de crecimiento de hongos fitopatógenos. Control = Azoxystrobin. DE. Desviación estándar. Los datos son promedio de tres experimentos independientes con tres repeticiones. Valores con la misma letra en cada columna, no presentan diferencia estadística significativa (n=3). Tukey $\alpha=0.05$.

	<i>Oligoporus</i> sp.	<i>C. acutatum</i> 10	<i>F.</i> <i>oxysporum</i> f.sp. <i> cubense</i>	<i>F.</i> <i>oxysporum</i>	<i>F.</i> <i>verticillioides</i>
Control	0.605±0.06^a b	0.676±0.06^a	0.674±0.05 a	0.551±0.04 a	0.717±0.03^a
S1HF	0.596±0.09^a b	0.727±0.06^a b	0.892±0.05	0.876±0.07	0.946±0.05
S1CH	0.530±0.05^a	0.711±0.07^a	0.704±0.05 a	0.801±0.06	0.766±0.11^{a-} c
S1MH	1.075±0.12	0.968±0.10	1.055±0.04	1.025±0.05	1.035±0.06
S1MF	0.987±0.27	0.961±0.09	1.039±0.06	0.955±0.08	0.853±0.14
S3HF	1.030±0.22	0.949±0.16	0.949±0.05	1.02±0.11	0.922±0.04
S3CF	0.833±0.10	0.772±0.07^a bc	0.847±0.03	0.915±0.07	0.885±0.08
S3MR	0.815±0.07	0.902±0.09	0.934±0.04	1.075±0.06	1.012±0.04
S3MF	0.962±0.09	0.956±0.11	0.912±0.03	0.990±0.06	0.901±0.04
S4HH	0.483±0.05^a	0.766±0.06^{a-} c	0.669±0.04 a	0.721±0.06	0.739±0.08^a b
S4HF	0.633±0.11^{a-} c	0.802±0.06^{a-} d	0.672±0.04 a	0.732±0.04	0.718±0.08^a
S4CH	0.905±0.18	0.873±0.12	0.920±0.06	0.904±0.05	0.931±0.06
S4MR	0.949±0.10	0.888±0.06	0.929±0.03	1.021±0.06	0.977±0.07
S4MH	0.905±0.18	0.944±0.09	1.015±0.06	0.975±0.07	1.000±0.06
S4MF	0.834±0.14	0.903±0.12	0.991±0.05	1.000±0.06	1.035±0.09

ÍNDICE DE CRECIMIENTO ± DE

Resultados y Discusión

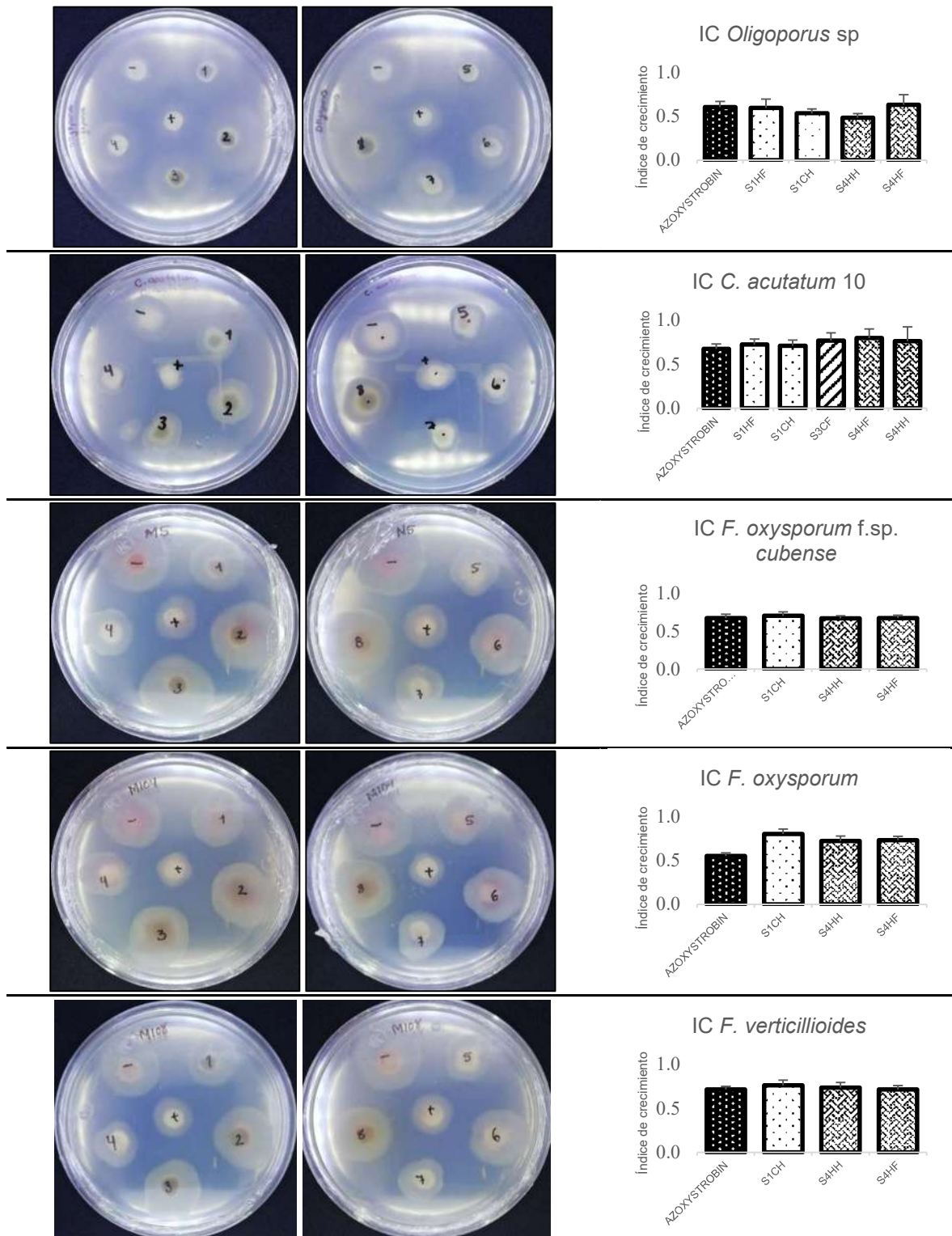


Figura 24. Fotografías del crecimiento micelial de a) *Oligopus* sp., b) *Colletotrichum acutatum*, c) *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (M5), d) *Fusarium oxysporum* (M104) y *Fusarium verticillioides* (M108), frente a (-) DMSO, (+) Azoxystrobin, (1) S4CH, (2) S1MH, (3) S4MH, (4) S4HF, (5) S4HH, (6) S1HF, (7) S1CH y (8) S1MF. Fotos representativas de un experimento con tres repeticiones.

Los extractos designados como S4HH, S4HF, S1HF, S1CH y S3CF inhibieron el crecimiento de *C. acutatum* 10 al igual que el azoxystrobin, los valores obtenidos no mostraron diferencias significativas. Los extractos S4HH, S4HF, S1HF y S1CH también inhibieron el crecimiento de *Oligoporus* sp. al igual que azoxystrobin. En lo que corresponde a las cepas de *Fusarium*, se puede apreciar que los extractos S4HH, S4HF y S1CH inhiben el crecimiento de *F. oxysporum* f. sp. *ubense* y *F. verticillioides*, con valores estadísticamente iguales al antifúngico comercial (Figura 24). La mayoría de las publicaciones que reportan efecto antifúngico de *Salvia* proviene de ensayos realizados con aceites esenciales, entre las especies cuyo aceite esencial ha mostrado efecto antifúngico frente a cepas de *Fusarium* están *S. fruticosa* Miller y *S. sclarea* L (Karpíński, 2020). El extracto acuoso de *S. guaranitica* también inhibió el crecimiento de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* con un valor de IC calculado de 0.606, muy semejante a los valores obtenidos en este trabajo (Rongai et al., 2015).

Los resultados anteriores nos indican que en las partes aéreas tanto en *Salvia dugesii* como en *S. plurispicata* existen compuestos con actividad antifúngica para más de un género de hongos fitopatógenos; esto abre la posibilidad de continuar explorando dicha actividad en una amplia variedad de hongos de interés agrícola.

6.4 Purificación de compuestos mayoritarios de los extractos bioactivos

6.4.1 Extracto de diclorometano de flores de *Salvia dugesii*

6.4.1.1 Extracción del ácido oleanólico (60)

A partir de 115 g de flores de *Salvia dugesii* se obtuvo el extracto de diclorometano, el cual se fraccionó mediante cromatografía en columna para extraer al ácido oleanólico (60), éste compuesto fue identificado mediante sus datos de RMN de ^1H y ^{13}C , los cuales coinciden con los datos reportados por Ragasa y Lim (2005) (Tabla 4). En su espectro de RMN de ^1H (Figura 25) se encuentra una señal triple de hidrógeno vinílico con δ 5.28 (1H, t, $J = 3.6$ Hz, H-12), una señal doble de doble de un hidrógeno base de alcohol con δ 3.22 (1H, dd, $J = 11.0, 5.0$ Hz, H-3), una señal doble de doble en δ 2.80 (1H, dd, $J = 13.6, 3.6$ Hz, H-18), así como siete señales simples que corresponden a los hidrógenos de metilos terciarios con δ 1.13 (3H, s, H-27), 0.98 (3H, s, H-23), 0.92 (3H, s, H-29), 0.91 (3H, s, H-25), 0.90 (3H, s, H-30), 0.77 (3H, s, H-26) y 0.74 (3H, s, H-24).

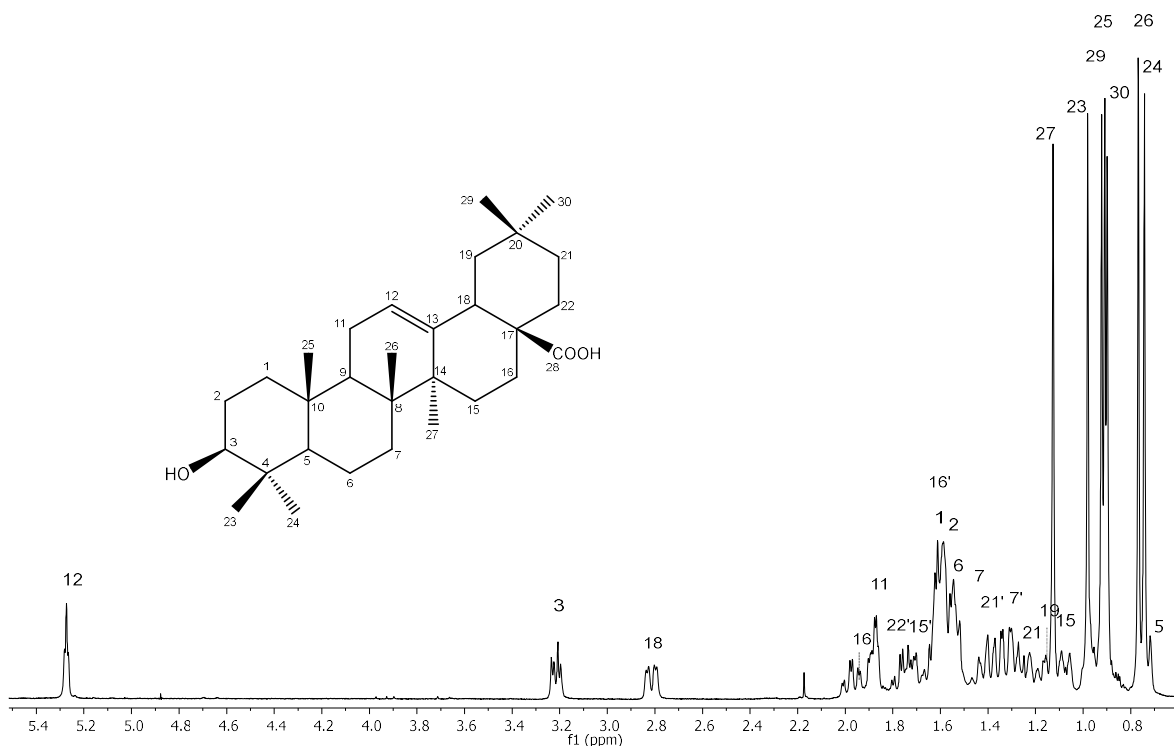


Figura 25. Espectro de RMN de ^1H del ácido oleanólico (60) en CDCl_3 a 400 MHz.

En su espectro de RMN ^{13}C (Figura 26) se apreciaron 30 señales características de un triterpeno. Entre 15.3 ppm y 55.2 ppm se encuentran 26 señales de carbonos alifáticos; en 79.0 ppm, una señal de un carbono base de alcohol, mientras que en 122.6 ppm y 143.5 ppm se detectaron dos señales típicas de carbonos vinílicos. Adicionalmente, se encontró una señal en 183.7 ppm que corresponde a un carbono de ácido carboxílico. Estos datos (Tabla 4) se compararon con los de la literatura y coinciden con el compuesto **60**. La asignación total de las señales de RMN ^1H y ^{13}C se realizó con base en los espectros en 1D y 2D.

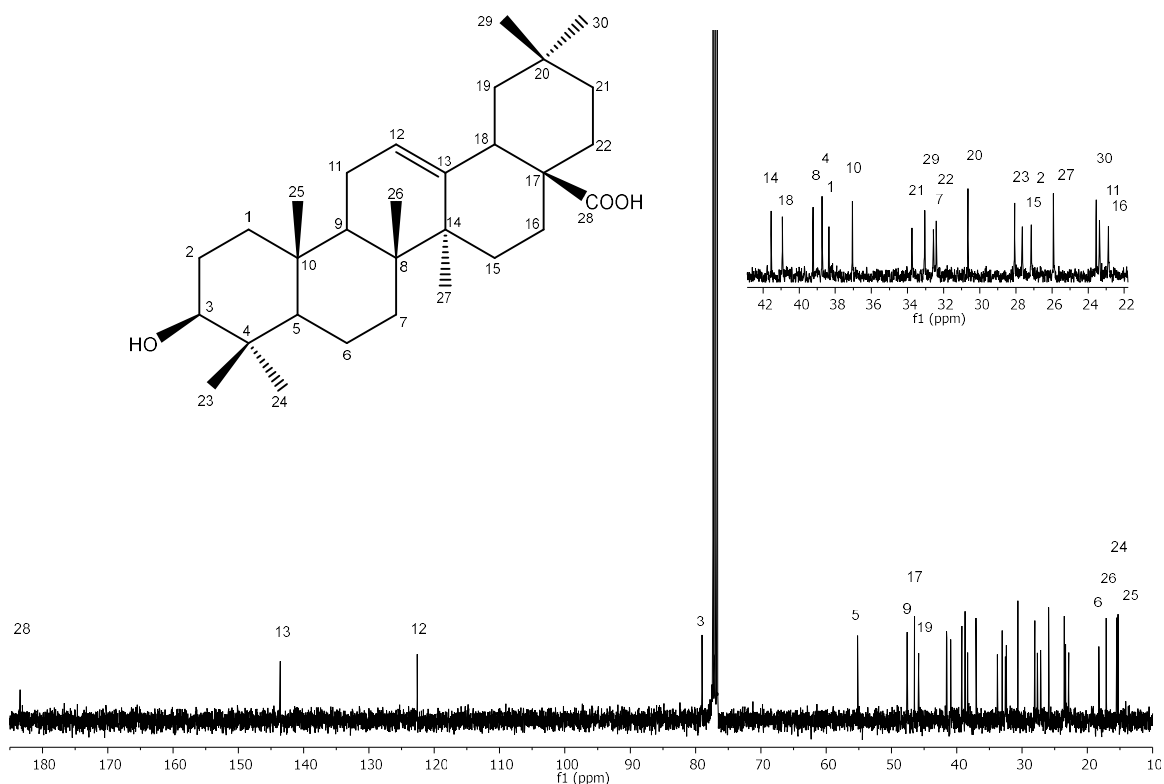


Figura 26. Espectro de RMN de ^{13}C del ácido oleanólico (**60**) en CDCl_3 a 100 MHz.

Tabla 4. Datos espectroscópicos de RMN ^{13}C del ácido oleanólico (60) experimental y literatura.

Carbono	δ (ppm) Experimental	δ (ppm) Ragasa y Lim 2005
1	38.3	38.7
2	27.1	27.1
3	79.0	79.0
4	38.7	38.7
5	55.1	55.1
6	18.2	18.2
7	32.5	32.5
8	39.2	39.2
9	47.6	47.6
10	37.0	37.0
11	23.3	23.3
12	122.6	122.6
13	143.5	143.2
14	41.5	41.5
15	27.6	27.6
16	22.8	22.9
17	46.5	46.4
18	40.9	40.9
19	45.8	45.8
20	30.6	30.6
21	33.7	33.7
22	32.4	32.4
23	28.0	28.0
24	15.5	15.5
25	15.3	15.3
26	17.1	17.0
27	25.9	25.9
28	183.3	182.6
29	33.0	33.0
30	23.5	23.6

A partir del 115 g de flores se obtuvieron 4.81 g de extracto de diclorometano del cual se logró la extracción de 0.69 g de ácido oleanólico, lo que representa el 0.6 % del peso seco de las flores de *Salvia dugesii*.

El ácido oleanólico (**60**) es uno de los triterpenos más comúnmente encontrados en el género *Salvia*, ha sido aislado de extractos obtenidos con diclorometano o metanol ya sea de las partes aéreas o raíces. También se ha encontrado con diferentes grupos funcionales en la posición 3, por ejemplo, cetona o metil éster (Georgiev & Pavlov, 2017).

6.4.2 Extracto de diclorometano de hojas de *Salvia dugesii*

6.4.2.1 Extracción del ácido kerlinico (**76**)

De 280 g de hojas de *Salvia dugesii* se obtuvo el extracto de diclorometano, el cual se fraccionó por cromatografía en columna abierta para extraer al diterpeno **76**. En su espectro de RMN de ^1H (Figura 27) se encuentran tres señales simples con δ 7.35, 7.21 y 6.26 que corresponden a los hidrógenos de un anillo de furano, una señal simple δ 5.64 de un hidrógeno vinílico (1H, s, H-3), una señal doble de dobles con δ 3.48 (1H, dd, $J = 11.5, 4.5$ Hz, H-6), dos señales simples δ 1.92 (3H, s, H-18), 0.73 (3H, s, H-20), así como una señal doble con δ 0.86 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, H-17). Entre 0.70 y 1.20 ppm del espectro de hidrógeno se aprecian las señales de los metilos terciarios del ácido oleanólico (Figura 27, región 1.20 a 0.70 ppm) que, para esta muestra es un contaminante, ya que se encuentran en proporción 1:14 para **60:76**, sin embargo, en el extracto es un compuesto mayoritario.

En su espectro de RMN ^{13}C (Figura 28) se aprecian 20 señales características de un diterpeno. Entre 15.6 y 53.7 ppm se encuentran 12 señales de carbonos alifáticos, en 75.9 ppm, una señal de un carbono base de alcohol, así como cuatro señales en 110.8, 125.2, 138.6 y 142.8 ppm que son características de carbonos de un anillo de furano. En 127.6 y 136.2 ppm se aprecian dos señales típicas de carbonos vinílicos y finalmente una señal en 181.3 ppm correspondiente a un carbono de ácido carboxílico. Los datos (Tabla 5) se compararon con los reportados en la literatura y coincidieron con los reportados para el clerodano conocido como ácido kerlinico (**76**) (Rodríguez-Hahn et al., 1987). La asignación

total de las señales de RMN ^1H y ^{13}C se realizó por comparación con los datos de la literatura.

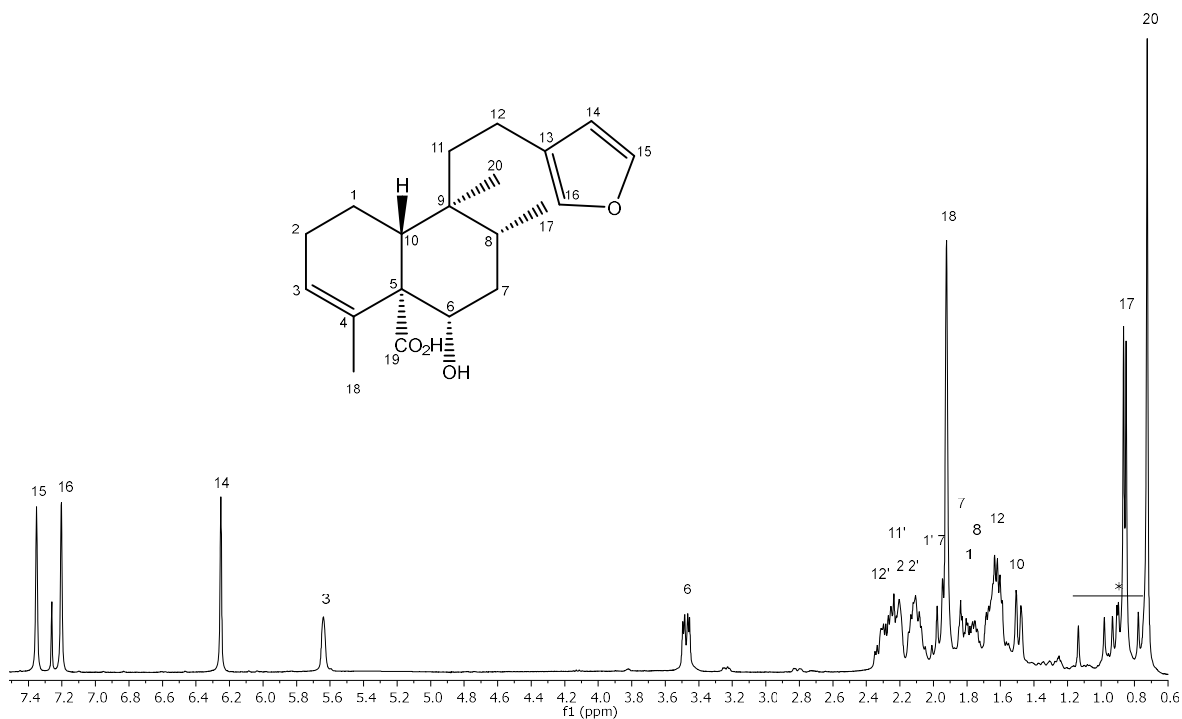


Figura 27. Espectro de RMN de ^1H del ácido kerlinico (**76**) en CDCl_3 a 400 MHz.

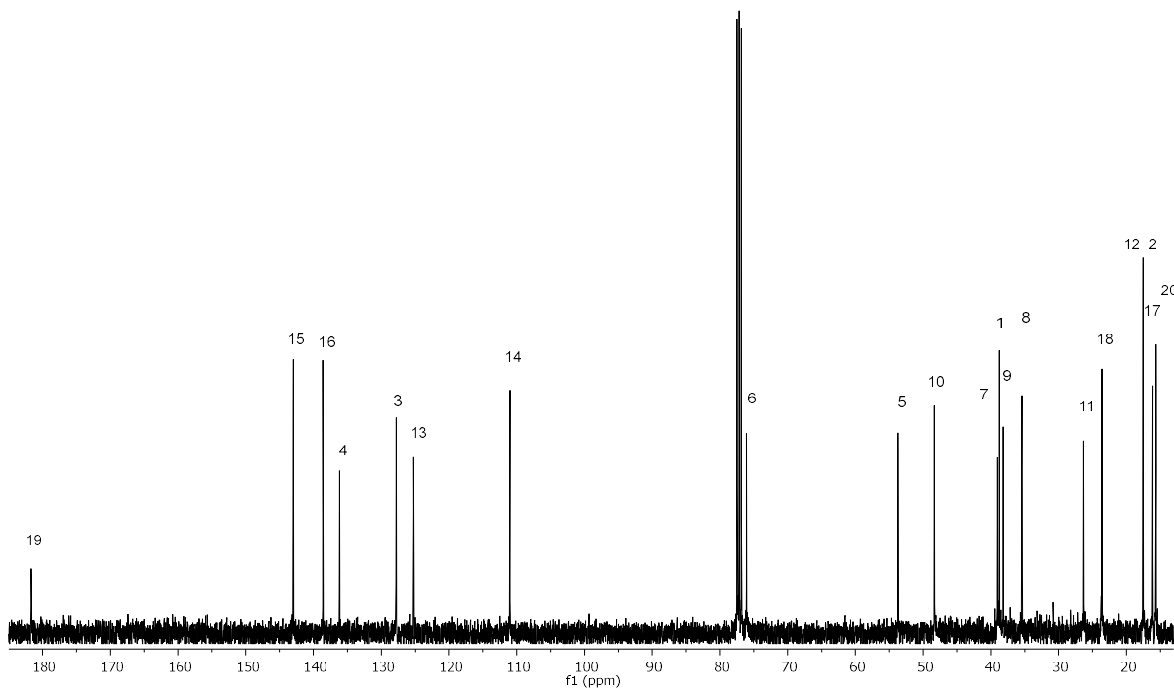


Figura 28. Espectro de RMN de ^{13}C del ácido kerlinico (**76**) en CDCl_3 a 100 MHz.

Tabla 5. Datos espectroscópicos de RMN ^{13}C del ácido kerlinico (**76**), experimental y literatura.

Carbono	δ (ppm) Experimental	δ (ppm) Rodríguez-Han et al., (1987)
1	38.8	38.9
2	17.5	17.5
3	127.6	127.6
4	136.2	136.2
5	53.7	53.7
6	76.0	76.0
7	39.0	38.8
8	35.4	35.5
9	38.2	38.9
10	48.3	48.4
11	26.3	26.3
12	17.5	17.5
13	125.2	125.2
14	110.8	110.9
15	142.9	142.8
16	138.5	138.5
17	16.1	16.1
18	23.3	23.3
19	181.6	181.0
20	15.6	15.15

El ácido kerlinico (**76**) es un diterpeno que se obtuvo por primera vez a partir de ejemplares de *Salvia keerlii* recolectados en Querétaro. Rodríguez-Han et al., (1987) lograron elucidar la estructura de **76** por comparación con el ácido melisodórico, diterpeno obtenido de *S. melissodora*, una especie botánicamente relacionada con *S. keerlii*. El ácido kerlinico (**76**) está presente en *S. keerlii* en un 0.68 % del peso seco de las partes aéreas. En este trabajo se obtuvo con un rendimiento del 0.50 %.

6.4.3 Extracto hexánico de hojas de *Salvia dugesii*

6.4.3.1 Extracción del 3 β ,20,25-trihidroxilupano (**77**)

2 g del extracto hexánico desengrasado de hojas de *Salvia dugesii* se sometieron a separación en columna cromatográfica para obtener 683 mg de un sólido blanco amorfo con punto de fusión de 140-144 °C. En su espectro de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) (Figura 29) se aprecian dos señales dobles en 4.01 ppm (1H, d, $J = 12.1$ Hz, H-25) y 3.92 ppm (1H, d, $J = 12.1$ Hz, H-25') correspondientes a hidrógenos base de alcohol, así mismo en 3.24 ppm una señal doble de dobles para otro hidrógeno base de alcohol (1H, dd, $J = 10.6, 5.7$ Hz, H-3), en 2.25 se encuentran dos señales triples correspondientes al metileno en posición 1 (1H, dt, $J = 13.6, 3.6$ Hz, H-1). En la región de carbonos alifáticos se aprecian siete señales simples correspondientes a los metilos 30, 26, 29, 23, 27, 28 y 24 con 1.22, 1.19, 1.11, 1.00, 0.97, 0.81 y 0.78 ppm, respectivamente.

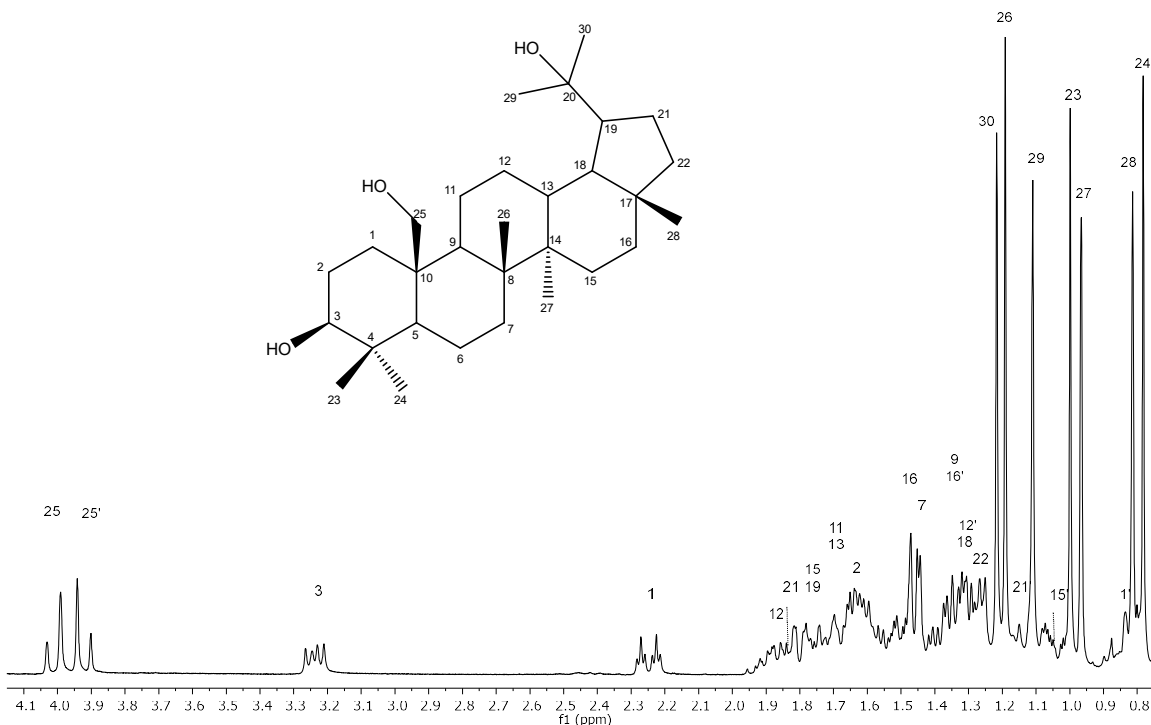


Figura 29. Espectro de RMN ^1H del 3 β ,20,25-trihidroxilupano (**77**) en CDCl_3 a 300 MHz.

En su espectro RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) (Figura 30) se encontraron 30 señales características de un triterpeno. Entre 15.5 y 55.6 ppm se observan 27 señales de carbonos alifáticos, en 62.6, 73.6 y 79.0 ppm tres señales correspondientes a los carbonos base de alcohol C-25, C-20 y C-3 respectivamente.

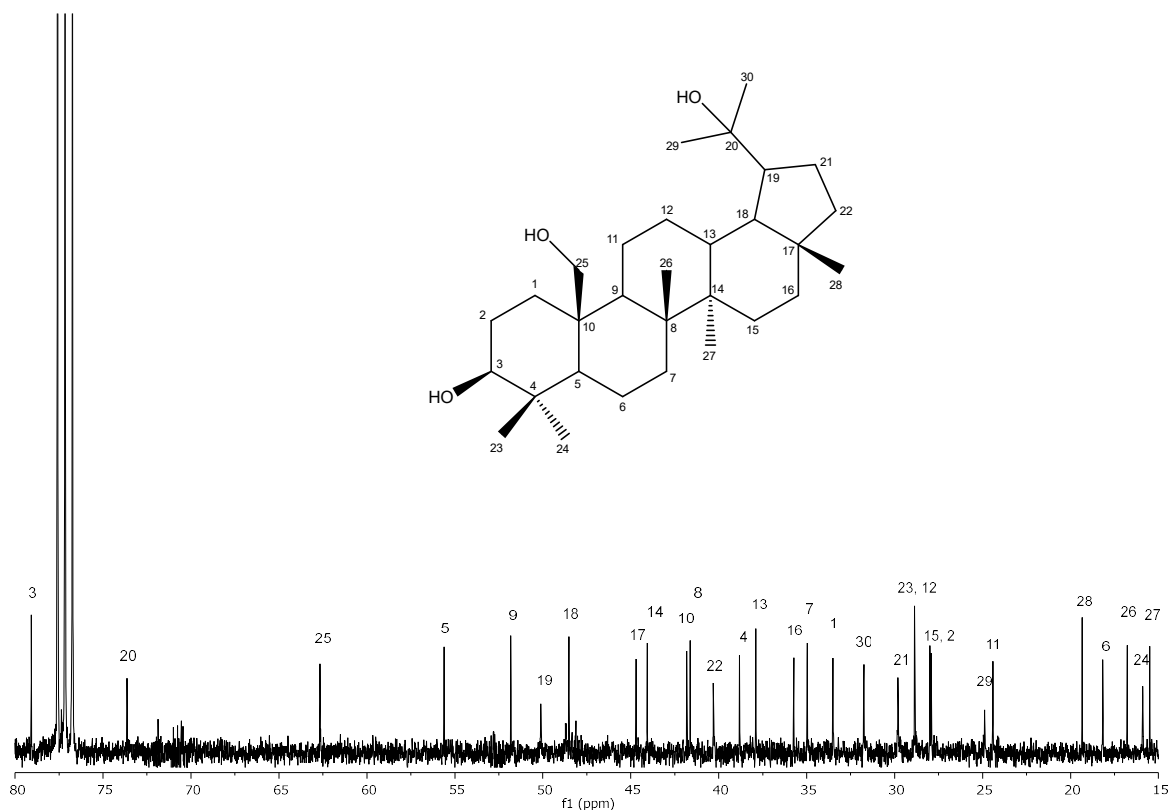


Figura 30. Espectro de RMN ^{13}C del $3\beta,20,25$ -trihidroxilupano (**77**) en CDCl_3 a 75 MHz.

El experimento COSY (Figura 31) evidencia la correlación del H-25' con 3.92 ppm y el H-9 con 1.35 ppm. También se observa la correlación del hidrógeno base de alcohol H-3 con 3.24 ppm y los hidrógenos del metileno en posición 2 con 1.64 ppm. En 2.25 y 0.82 ppm se aprecia la correlación de los hidrógenos del metileno en posición 1, así, los desplazamientos fueron asignados a H-1 y H-1' respectivamente. En 2.25 y 1.64 ppm se observa la correlación de los hidrógenos adyacentes H-1 y H-2. Además de la correlación entre H-21 y H-22 con 1.84 y 1.29 ppm y finalmente la correlación entre los hidrógenos H-15 y H-16' con 1.78 y 1.35

ppm. Además del experimento COSY, la asignación total de las señales de RMN ^1H y ^{13}C se realizó con base en los espectros HSQC y HMBC.

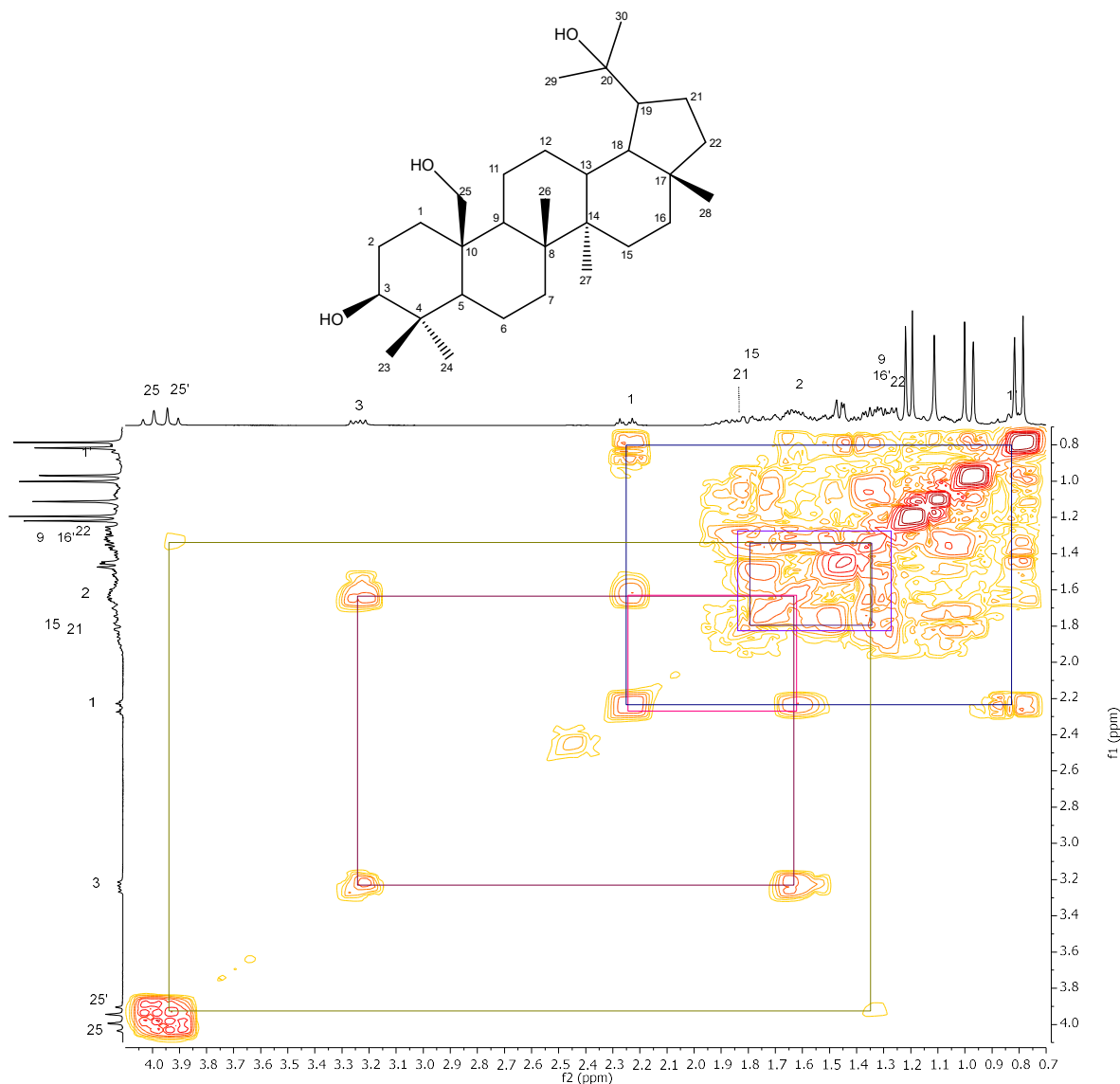


Figura 31. Espectro COSY del 3 β ,20,25-trihidroxilupano (**77**).

Yürüker et al., (1998) reportaron los datos de RMN ^{13}C para el triterpeno **77** en metanol deuterado (CD_3OD). En este trabajo también se obtuvieron los espectros de RMN ^1H y ^{13}C en el mismo disolvente (Anexo 2). En la tabla 7 se muestran los datos de RMN ^{13}C en CD_3OD del 3 β ,20,25-trihidroxilupano (**77**) en donde se aprecia que coinciden con los reportados en la literatura.

Tabla 6. Datos espectroscópicos de RMN ^{13}C del $3\beta,20,25$ -trihidroxilupano (**77**).

Carbono	δ (ppm) Experimental (77) CD ₃ OD	δ (ppm) Yürüker et al., (1998) CD ₃ OD
1	34.7	34.8
2	28.5	29.0
3	79.9	79.9
4	39.8	39.8
5	57.1	57.2
6	19.2	19.2
7	36.1	36.1
8	42.7	42.7
9	53.4	53.4
10	42.9	42.9
11	25.2	25.2
12	29.2	29.2
13	39.3	39.3
14	45.0	45.0
15	29.0	28.5
16	36.9	36.9
17	45.5	45.5
18	49.8	49.8
19	51.4	51.4
20	74.0	74.0
21	30.5	30.5
22	41.1	41.1
23	29.4	29.4
24	16.5	16.5
25	62.8	62.7
26	17.3	17.3
27	15.9	15.9
28	19.8	19.8
29	25.3	25.3
30	31.5	31.5

El $3\beta,20,25$ -trihidroxilupano (**77**) es un triterpeno que se extrajo por primera vez de las hojas de *Rhus taitensis* recolectadas en Papua Nueva Guinea, con un rendimiento del 0.14 % del peso seco. Aunque en el género *Salvia* existe una amplia variedad de triterpenos hidroxilados, el compuesto **77** no se ha reportado para ninguna especie de *Salvia*, éste compuesto se encuentra como mayoritario en el extracto hexánico de hojas de *S. dugesii*, ya que se obtuvo con un rendimiento del 0.91 % del peso seco, es decir, poco más de seis veces que en *R. taitensis*.

6.4.3.2 Extracción del $3\beta,20$ -dihidroxilupano (**78**)

De las fracciones hexano:acetato de etilo (9:1) se obtuvieron 94.4 mg de un sólido blanco amorfo con punto de fusión de 128-131 °C. En su espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Figura 32) se observa en 3.20 ppm (1H, dd, $J = 11.2, 5.1$ Hz, H-3) una señal doble de dobles correspondiente a un hidrógeno base de alcohol, así como ocho señales características de metilos terciarios en 1.22 ppm para CH_3 -30, 1.12 ppm para CH_3 -29, 1.05 ppm para CH_3 -26, 0.97 ppm para CH_3 -23, 0.95 ppm del CH_3 -27, 0.83 ppm para CH_3 -25, 0.80 ppm para CH_3 -28 y finalmente en 0.76 ppm la señal del CH_3 -24.

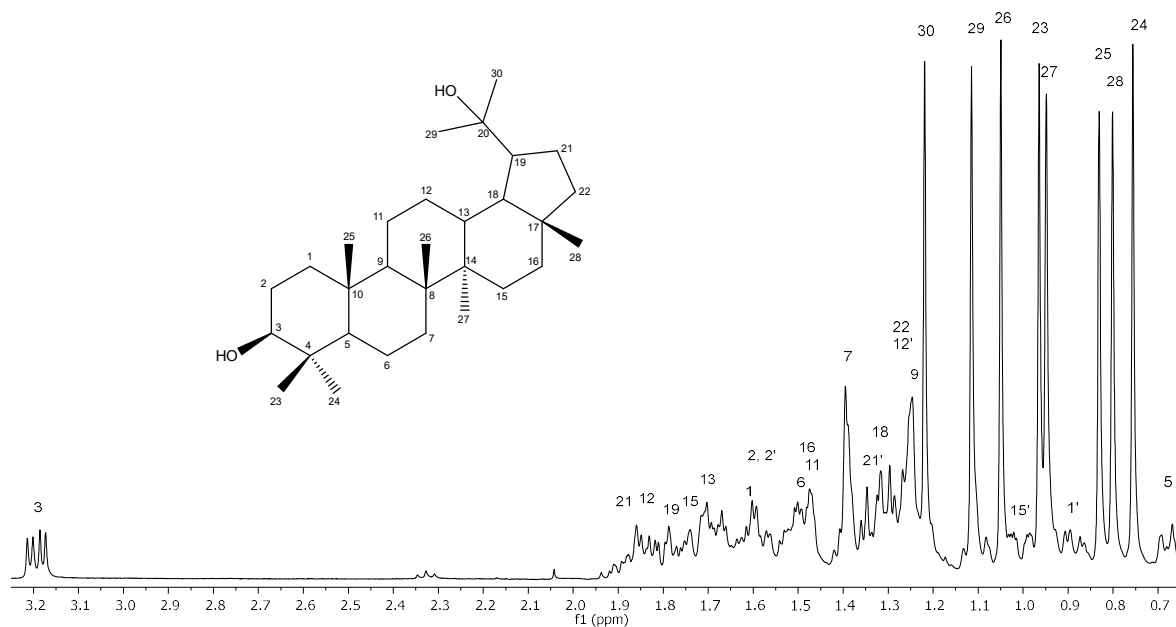


Figura 32. Espectro de RMN ^1H del $3\beta,20$ -dihidroxilupano (**78**) en CDCl_3 a 400 MHz.

En su espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Figura 33) se aprecian las 30 señales esperadas para un triterpeno. Entre 14.8 y 55.1 ppm se observan 28 señales de carbonos alifáticos; mientras que en 73.5 y 79.0 ppm se encuentran dos señales características de carbonos base de alcohol asignados a C-20 y C-3 respectivamente. Los datos espectroscópicos obtenidos fueron iguales a los descritos para el 3 β ,20-dihidroxilupano (**78**) (Segura et al., 2000) (Tabla 7). En los datos de la literatura, los desplazamientos encontrados en 24.76 y 31.54 ppm están asignados indistintamente para C-29 y C-30. En este trabajo se comprobó la asignación de ambos desplazamientos con el espectro HETCOR y por comparación con las asignaciones del 3 β ,20,25-trihidroxilupano (**77**), en donde 24.7 ppm corresponde a C-29 y 31.5 ppm a C-30.

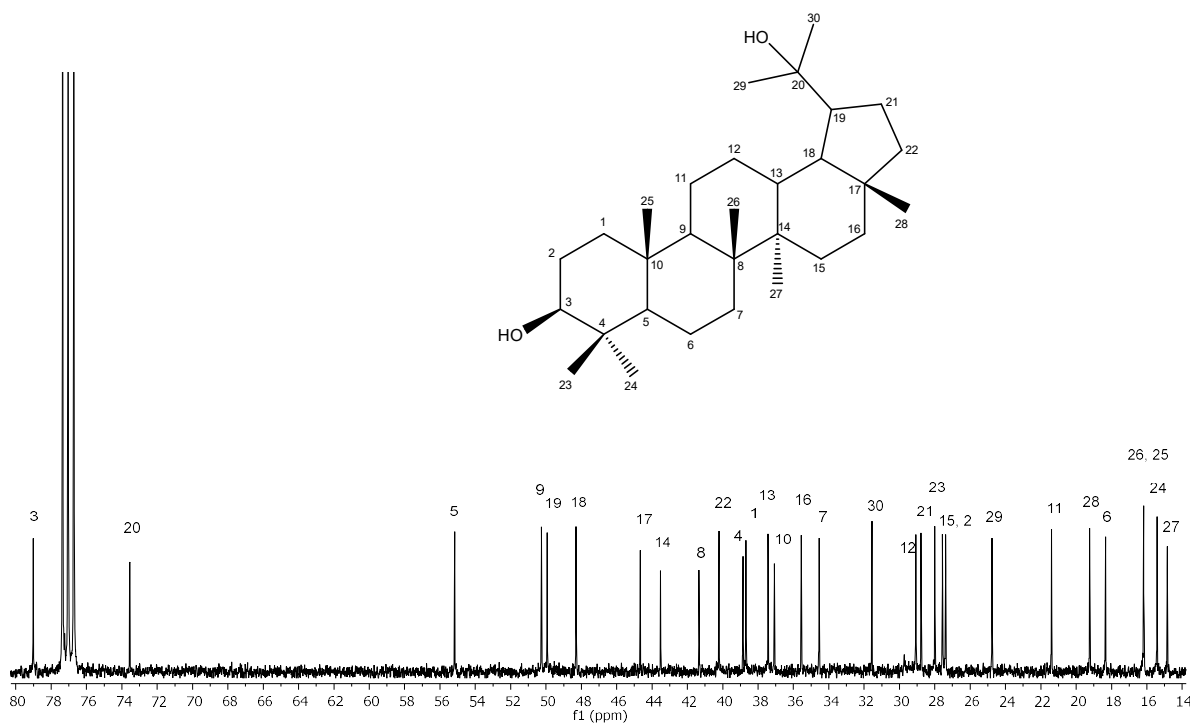


Figura 33. Espectro de RMN ^{13}C del 3 β ,20-dihidroxilupano (**78**) en CDCl_3 a 100 MHz.

Mediante el experimento COSY (Figura 34) se lograron observar al menos ocho correlaciones de hidrógenos adyacentes: en 3.20 y 1.60 ppm se observa la correlación entre el hidrógeno base de alcohol H-3 y H-2 metilénico; en 1.79 y 1.32

ppm se encuentra la correlación entre H-19 y H-18; en 1.71 y 1.27 se puede observar la correlación de los hidrógenos H-13 y H-12'; en 1.75 y 1.49 ppm la correlación de los hidrógenos metilénicos H-15 y H-16; en 1.60 y 0.90 ppm se encuentra la correlación de H-2 y H-1, ambos hidrógenos de grupo metileno; de la misma forma encontramos en 1.48 y 1.25 ppm la correlación de H-11 y H-9; también se aprecia en 1.4 ppm y 0.68 ppm la correlación de H-6 y H-5; finalmente se aprecia una correlación en 1.90 y 1.32 ppm de H-18 y H-21.

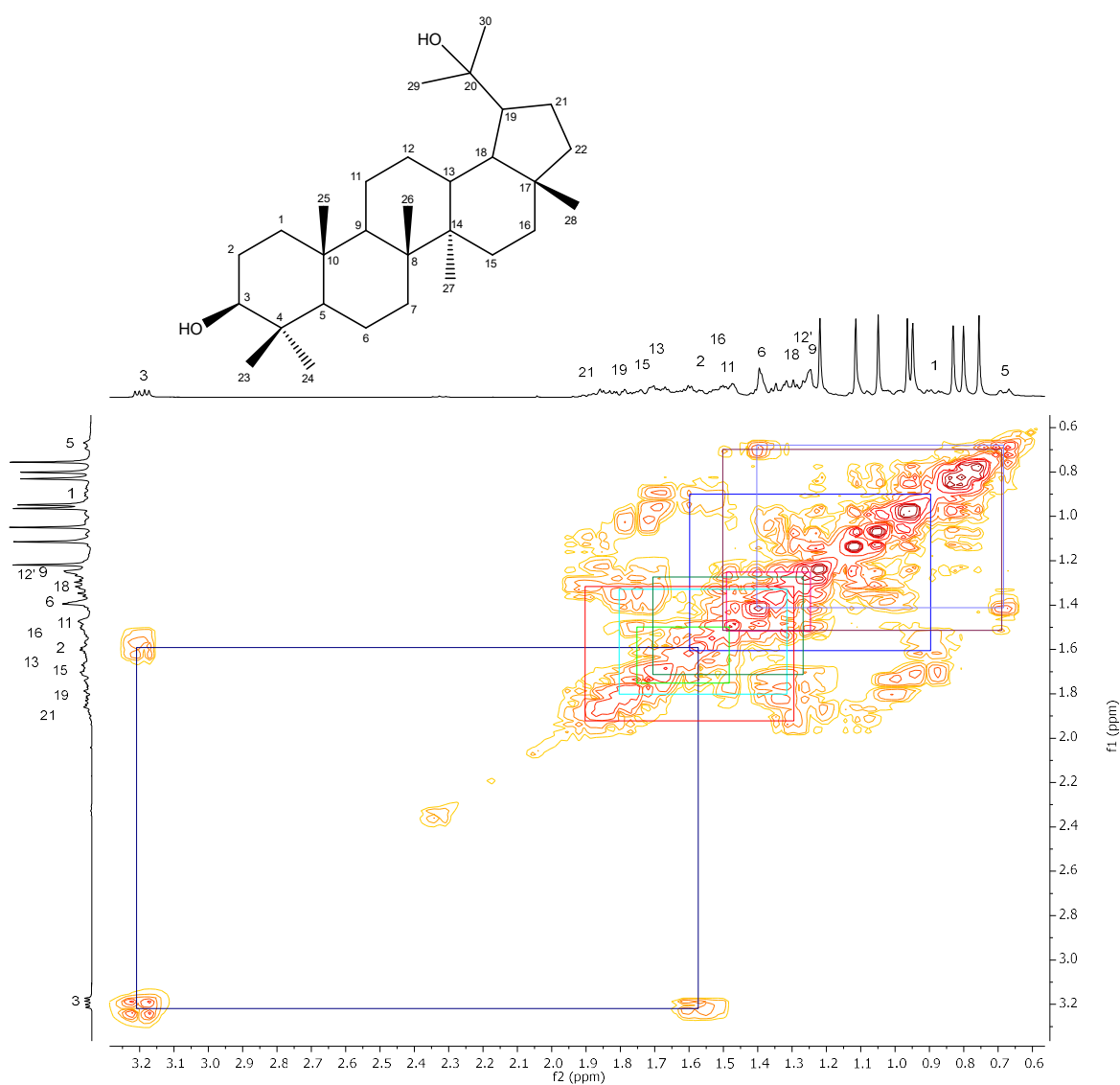


Figura 34. Espectro COSY del 3 β ,20-dihidroxilupano (**78**).

Tabla 7. Datos espectroscópicos de RMN ^{13}C del $3\beta,20$ -dihidroxilupano (**78**).

Carbono	δ (ppm) Experimental (78) CDCl ₃	δ (ppm) Segura et al., (2000) CDCl ₃
1	38.7	38.7
2	27.4	27.4
3	79.0	79.0
4	38.8	38.8
5	55.1	55.2
6	18.3	18.3
7	34.5	34.5
8	41.3	41.3
9	50.2	50.3
10	37.0	37.1
11	21.4	21.4
12	29.0	29.0
13	37.43	37.4
14	43.5	43.5
15	27.5	27.6
16	35.5	35.5
17	44.6	44.6
18	48.3	48.3
19	49.9	49.9
20	73.5	73.5
21	28.7	28.7
22	40.2	40.2
23	28.0	28.0
24	15.4	15.4
25	16.1	16.1
26	16.1	16.1
27	14.8	14.8
28	19.2	19.2
29	24.7	24.8/31.5
30	31.5	31.5/24.8

Al igual que el **77**, el 3 β ,20-dihidroxilupano (**78**) no se ha reportado para el género *Salvia*, y a diferencia de **77**, el compuesto **78** es un componente minoritario en *S. dugesii* ya que su rendimiento fue de 0.13 % del peso seco.

Los triterpenos 3 β ,20,25-trihidroxilupano (**77**) y 3 β ,20-dihidroxilupano (**78**) han mostrado actividad antimicobacteriana frente a *Mycobacterium tuberculosis*, en donde, el compuesto **77** mostró una CMI de 45 $\mu\text{g/mL}$, mientras que **78** mostró una CMI >100 $\mu\text{g/mL}$; así, los autores reportan un débil efecto antimicobacteriano para **77** (Jadulco et al., 2011).

6.4.3.3 Extracción de lupeol (**79**)

De las fracciones hexano:acetato de etilo (8:2) se recuperaron 91.3 mg de una mezcla que se sometió a una recromatografía para obtener 12.7 mg de un sólido en forma de cristales finos incoloros con punto de fusión de 212-218 °C. En su espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Figura 35) se observa una señal simple en 4.68 ppm correspondiente al hidrógeno vinílico H-29; en 4.56 ppm otra señal simple asignada al otro hidrógeno vinílico H-29', en 3.18 ppm (1H, dd, $J = 11.2, 5.0$ Hz, H-3) se encuentra una señal doble de dobles de un hidrógeno base de alcohol; también se aprecia una señal múltiple en 2.38 ppm asignada al hidrógeno alílico H-19; así como siete señales simples en 1.68, 10.2, 0.96, 0.94, 0.82, 0.78 y 0.75 ppm asignados a los metilos terciarios CH₃-30, CH₃-26, CH₃-23, CH₃-27, CH₃-25, CH₃-28 y CH₃-24, respectivamente. Los datos anteriores se compararon con los reportados en la literatura y coinciden con los datos asignados al compuesto triterpénico **79** (Suryati et al., 2011).

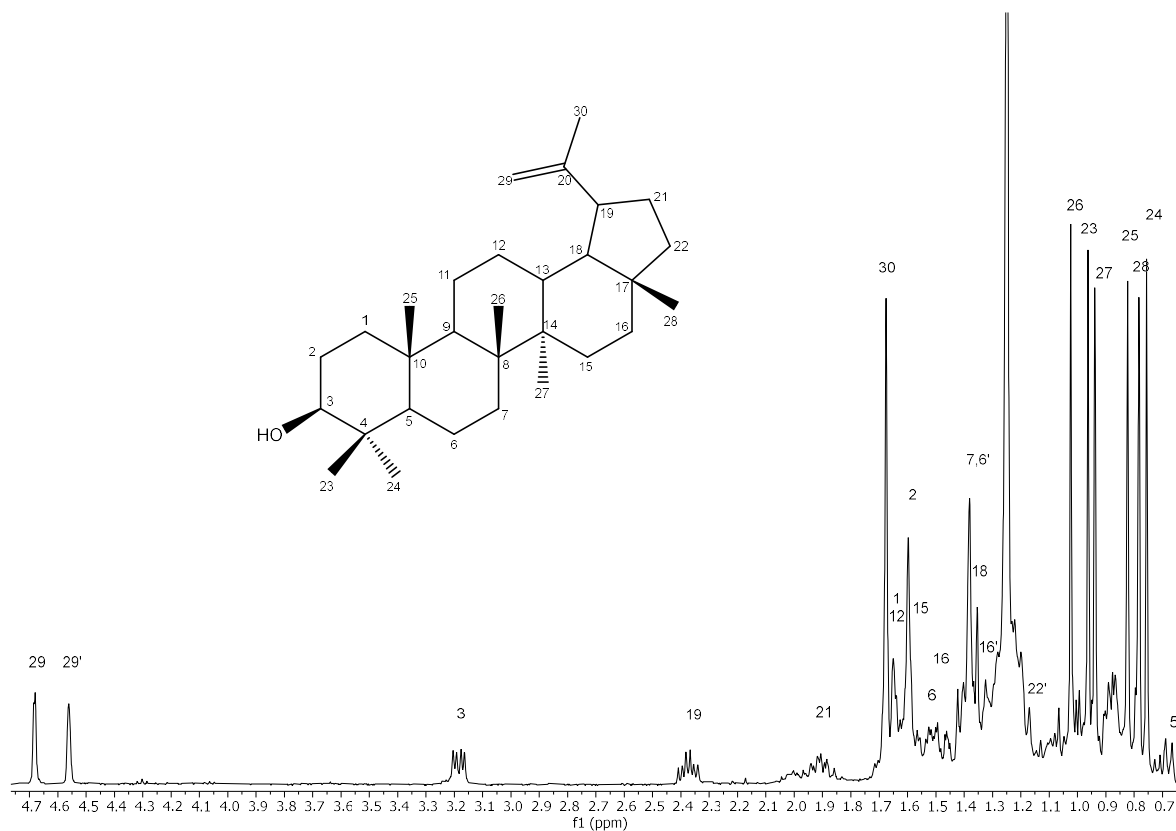


Figura 35. Espectro de RMN ^1H de lupeol (**79**) en CDCl_3 a 400 MHz.

En su espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) entre 14.8 y 55.4 ppm se observan 27 señales de carbonos alifáticos; en 151.1 ppm se aprecia una señal del carbono vinílico C-20, así como otra señal de carbono vinílico en 109.4 ppm asignada a C-29; finalmente en 79.1 ppm se encuentra una señal de carbono base de alcohol asignada a C-3 (Figura 36). La asignación total de las señales de RMN ^1H y ^{13}C se realizó con base en los espectros COSY y HETCOR. La tabla 8 muestra los desplazamientos de las señales de carbono y se comparan con los reportados por Suryati et al., (2011).

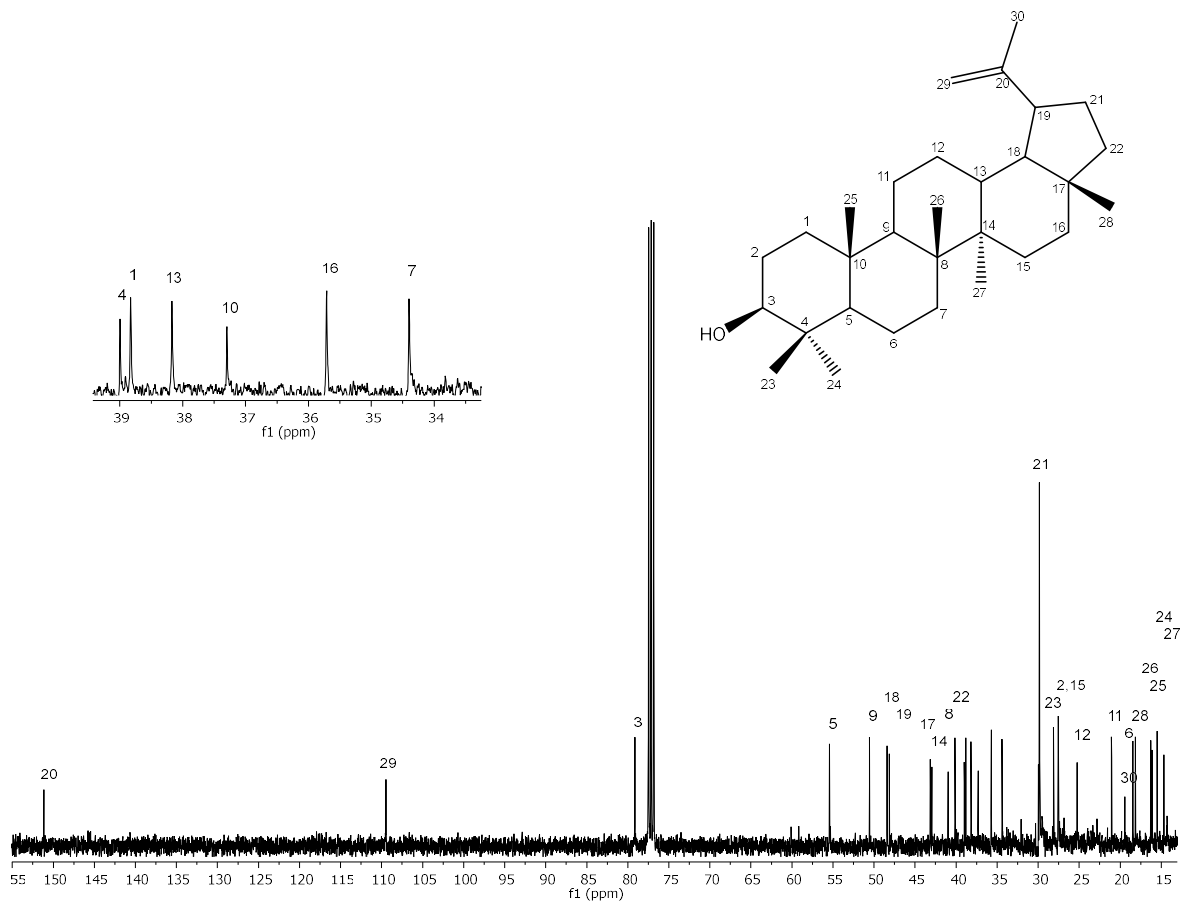


Figura 36. Espectro de RMN ^{13}C del lupeol (**79**) en CDCl_3 a 100 MHz.

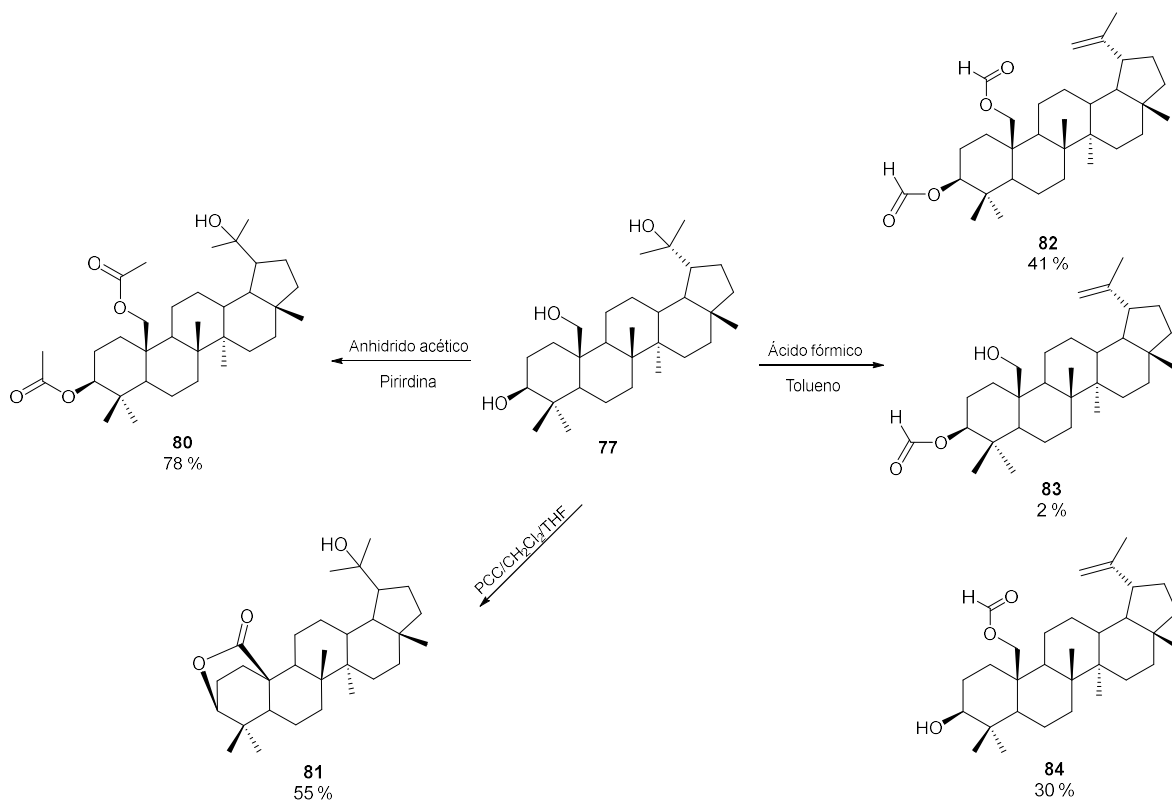
Los triterpenoides tipo lupano han sido investigados debido a sus actividades biológicas, principalmente por su efecto antioxidante y anticolinesterasa (Çulhaoglu et al., 2015). Recientemente se evaluó la actividad antiproliferativa de derivados de lupano frente a células de cáncer de próstata en donde el derivado con un grupo sulfatado en posición 3 resultó ser el más efectivo (Castro et al., 2019).

Tabla 8. Datos espectroscópicos de RMN ^{13}C de lupeol (**79**).

Carbono	δ (ppm) Experimental 79 CDCl ₃	δ (ppm) Suryati et al., (2011) CDCl ₃
1	38.8	38.9
2	27.6	27.6
3	79.1	79.2
4	39.0	39.0
5	55.4	55.5
6	18.4	18.5
7	34.4	34.4
8	41.0	41.0
9	50.6	50.6
10	37.3	37.3
11	21.1	21.1
12	25.3	25.3
13	38.2	38.2
14	43.0	43.0
15	27.5	27.7
16	35.7	35.8
17	43.2	43.2
18	48.4	48.5
19	48.1	48.2
20	151.2	151.2
21	29.9	30.0
22	40.1	40.2
23	28.1	28.2
24	15.5	15.6
25	16.1	16.2
26	16.3	16.3
27	14.7	14.7
28	18.1	18.1
29	109.5	109.5
30	19.4	19.5

6.5 Preparación de derivados

Entre los productos naturales mayoritarios de *Salvia dugesii*, encontramos al compuesto 3 β ,20,25-trihidroxilupano (**77**), que, al estar funcionalizado con grupos alcohol, puede dar lugar a la preparación de derivados. Para ello se consideraron reacciones de acetilación, oxidación y reducción (Esquema 1).



Esquema 1. Reacciones de acetilación, oxidación y reducción del 3 β ,20,25-trihidroxilupano (**77**).

6.5.1 Preparación del 3 β ,25-diacetil-20-hidroxilupano (80)

A partir de la reacción de acetilación del 3 β ,20,25- trihidroxilupano (77) con piridina y anhídrido acético se obtuvo un compuesto sólido cuyos datos de RMN ^1H y ^{13}C corresponden al derivado diacetilado 80. En su espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Figura 37) se puede apreciar una señal triple de un hidrógeno base de éster en 4.51 ppm (1H, t, $J = 10.4$ Hz, H-3), dos señales dobles en 4.48 ppm (1H, d, $J = 12.4$ Hz, H-25) y 4.33 ppm (1H, d, $J = 12.4$ Hz, H-25') correspondientes a los hidrógenos base éster del metileno en posición 25. En 2.05 ppm (6H, s, OAc-3 y 25) se encuentra una señal simple correspondiente a los metilos de los grupos acetilo sustituidos en las posiciones 3 y 25. En la región de hidrógenos alifáticos se encuentran siete señales simples de metilos terciarios, sus desplazamientos se observan en 1.23 ppm para CH_3 -30, en 1.13 ppm se encuentran dos señales traslapadas para CH_3 -29 y CH_3 -26, en 0.96 ppm para CH_3 -27, en 0.89 ppm para CH_3 -23, en 0.88 ppm para CH_3 -24 y finalmente en 0.82 ppm para CH_3 -28.

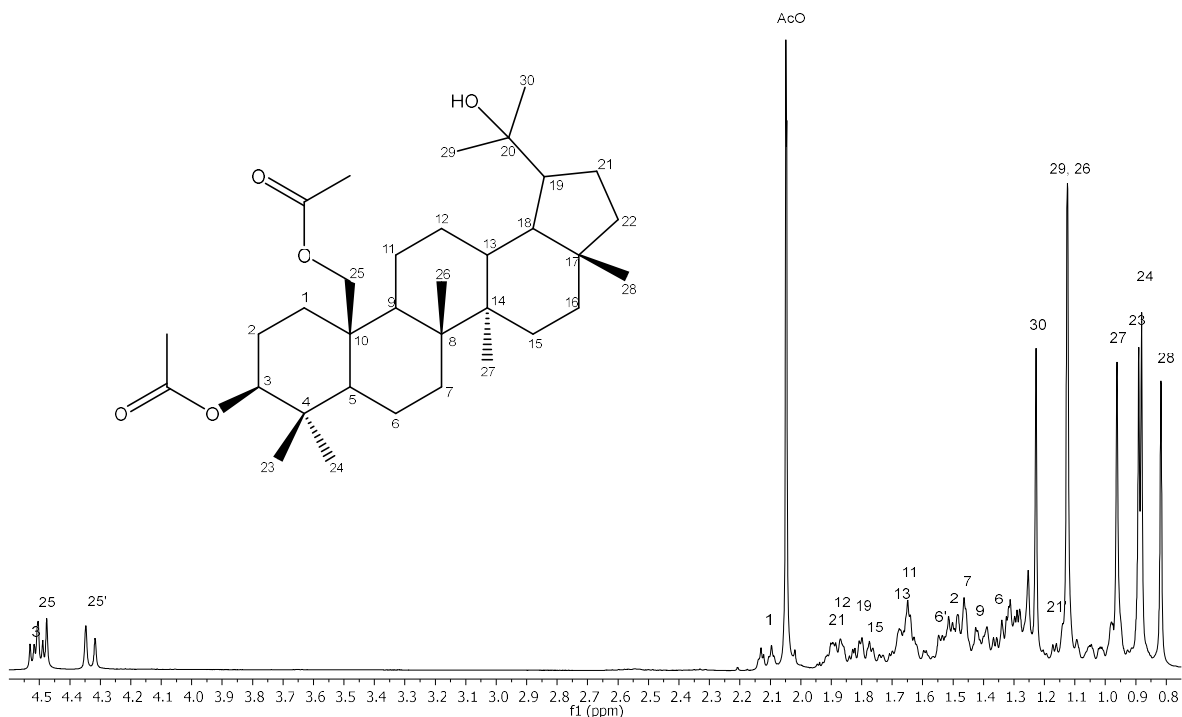


Figura 37. Espectro de RMN ^1H del 3 β ,25-diacetil-20-dihidroxilupano (80) en CDCl_3 a 400 MHz.

En el espectro RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Figura 38) se encuentran 34 señales que indican la sustitución de dos grupos acetilo, entre 15.2 y 55.5 ppm se encuentran 27 señales correspondientes a los carbonos alifáticos, en 171.2 y 171.0 ppm se aprecian las señales de los carbonos carbonílicos de los acetilos sustituidos en posición 3 y 25 respectivamente; mientras que en 80.5 ppm se encuentra la señal del carbono base de éster C-3. En 73.5 ppm se aprecia la señal del carbono base de alcohol ubicado en C-20; en 64.0 ppm encontramos la señal de carbono base de éster del metileno ubicado en C-25; finalmente en 21.3 ppm se encuentran las señales de los metilos de los grupos acetilo ubicados en C-3 y C-25. Los desplazamientos del derivado **80** fueron comparados con los reportados en la literatura y mostraron concordancia (Yürüker et al., 1998) (Tabla 9).

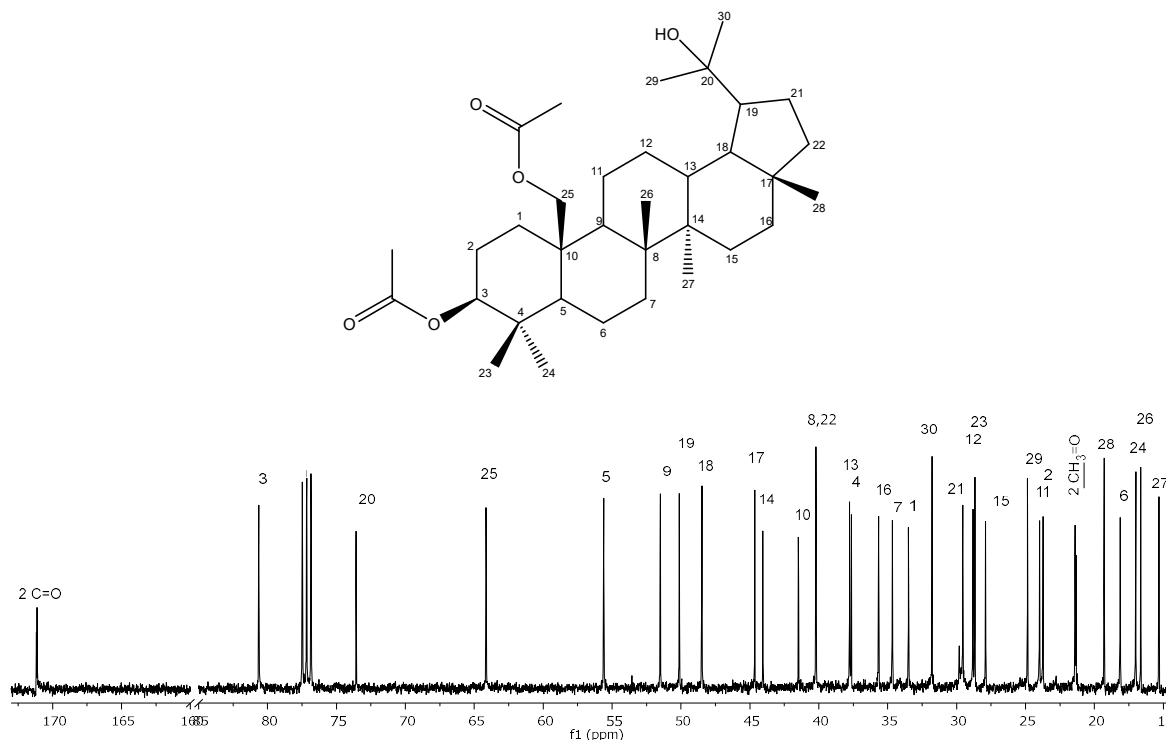


Figura 38. Espectro de RMN ^{13}C del 3β,25-diacetil-20-hidroxilupano (**80**) en CDCl_3 a 100 MHz.

Tabla 9. Datos espectroscópicos de RMN ^{13}C de 3 β ,25-diacetil-20-hidroxiilupano (**80**).

Carbono	δ (ppm) Experimental 80 CDCl_3	Yürüker et al., (1998) CDCl_3
1	33.4	33.4
2	23.6	23.6
3	80.5	80.5
4	37.5	37.5
5	55.5	55.5
6	18.0	18.0
7	34.5	34.5
8	40.1	40.1
9	51.4	51.0
10	41.4	41.4
11	23.9	23.9
12	28.7	28.7
13	37.7	37.6
14	43.9	43.9
15	27.8	27.8
16	35.6	35.6
17	44.5	44.5
18	48.4	48.4
19	50.0	50.0
20	73.5	73.4
21	29.4	29.4
22	40.1	40.1
23	28.6	28.6
24	16.9	16.9
25	64.0	64.0
26	16.5	16.5
27	15.2	15.2
28	19.2	19.2
29	24.7	24.7
30	31.7	31.7

6.5.2 Preparación de la lactona 81

A partir de la reacción de oxidación del 3 β ,20,25-trihidroxilupano (**77**) con clorocromato de piridino se logró la preparación de un derivado sólido e incoloro con punto de fusión de 255-260 °C. En su espectro de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) (Figura 39, tabla 10) se observa una señal doble de doble de un hidrógeno base de oxígeno en 4.04 ppm (1H, dd, $J = 3.4, 1.1$ Hz, H-3), así como siete señales simples en la región de alifáticos, que corresponden a los hidrógenos de los grupos metilo CH_3 -26, CH_3 -30, CH_3 -29, CH_3 -24, CH_3 -23, CH_3 -27 y CH_3 -28, con 1.24, 1.23, 1.12, 1.06, 0.99, 0.95 y 0.83 ppm respectivamente.

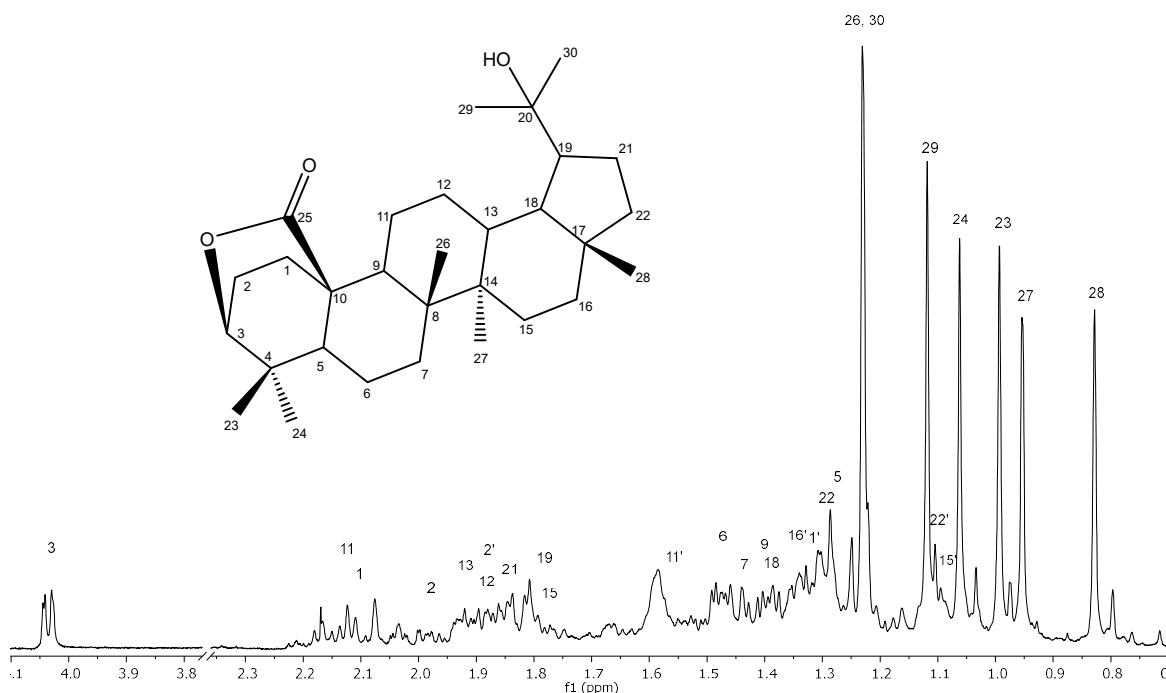


Figura 39. Espectro de RMN ^1H de la lactona 81 derivado de **77**, en CDCl_3 a 300 MHz.

En su espectro de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) (Figura 40, tabla 10) entre 14.6 y 52.2 ppm se observan 27 señales que corresponden a los carbonos alifáticos, mientras que en 176.1 ppm se encuentra la señal del carbonilo de la lactona C-25, en 83.9 ppm se encuentra la señal del carbono base de oxígeno C-3 y finalmente

en 73.5 ppm la señal del carbono base de alcohol C-20. La asignación total de las señales de RMN ^1H y ^{13}C se realizó con base en los espectros HSQC y HMBC.

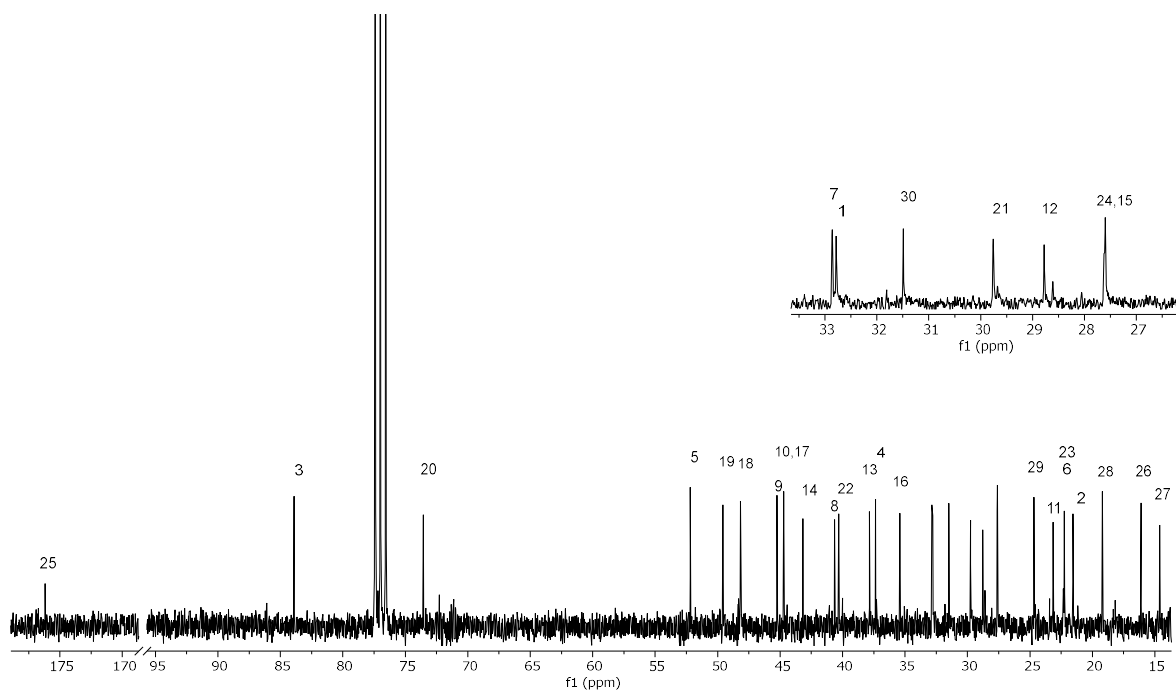


Figura 40. Espectro de RMN ^{13}C de la lactona **81** derivado de **77**, en CDCl_3 a 75 MHz.

Tabla 10. Datos espectroscópicos de RMN ^1H a 300 MHz y ^{13}C a 75 MHz de la lactona **81** en CDCl_3 .

Posición	δ ^1H en ppm (mult., J en Hz)	δ ^{13}C en ppm
1	2.11	32.1
1'	1.33	
2	2.00	21.5
2'	1.88	
3	4.04 (dd, 3.4, 1.1)	83.9
4	-	37.3
5	1.29	52.2
6	1.48	22.2
6'	1.30	
7	1.46	32.8
7'	1.46	
8	-	40.6
9	1.42	45.2
10	-	44.7
11	2.14	23.1
11'	1.56	
12	1.88	28.7
12'	1.32	
13	1.92	37.8
14	-	43.1
15	1.78	27.6
15'	1.10	
16	1.48	35.4
16'	1.46	
17	-	44.7
18	1.41	48.1
19	1.82	49.6
20	-	73.5
21	1.85	29.7
21'	1.23	
22	1.30	40.3
22'	1.11	
23	0.99	22.3
24	1.06	27.6
25	-	176.1
26	1.24	16.1
27	0.95	14.6
28	0.83	19.2
29	1.12	24.7
30	1.23	31.5

6.5.3 Preparación de derivados formilados **82**, **83** y **84**

De la reacción del tratamiento ácido del $3\beta,20,25$ -trihidroxilupano (**77**) se obtuvieron tres derivados con grupos formilo, así como la formación de un doble enlace en las posiciones C-20 y C-29. El espectro de RMN de ^1H del derivado **82** (Figura 41) muestra dos señal simples en 8.10 y 8.08 ppm que corresponden a los hidrógenos de los grupos formilo C-3, y C-25 respectivamente; en 4.67 ppm se aprecia una señal simple ancha que corresponde al hidrógeno vinílico H-29, en 4.64 ppm se encuentra una señal doble de dobles del hidrógeno base de formilo H-3 ($J = 11.0$, 5.5 Hz), en 4.58 ppm se encuentra una señal doble del hidrógeno base de formilo H-25 ($J = 12.3$ Hz), en 4.57 ppm se puede observar la señal simple del otro hidrógeno vinílico H-29'; en 4.45 ppm se aprecia una señal doble del hidrógeno base de formilo H-25' ($J = 12.3$ Hz); mientras que en la región de alifáticos se encuentran seis señales simples de los metilos del esqueleto base. En su espectro de RMN de ^{13}C se aprecian las 32 señales del derivado con dos grupos formilo en C-3 y C-25 (Tabla 11).

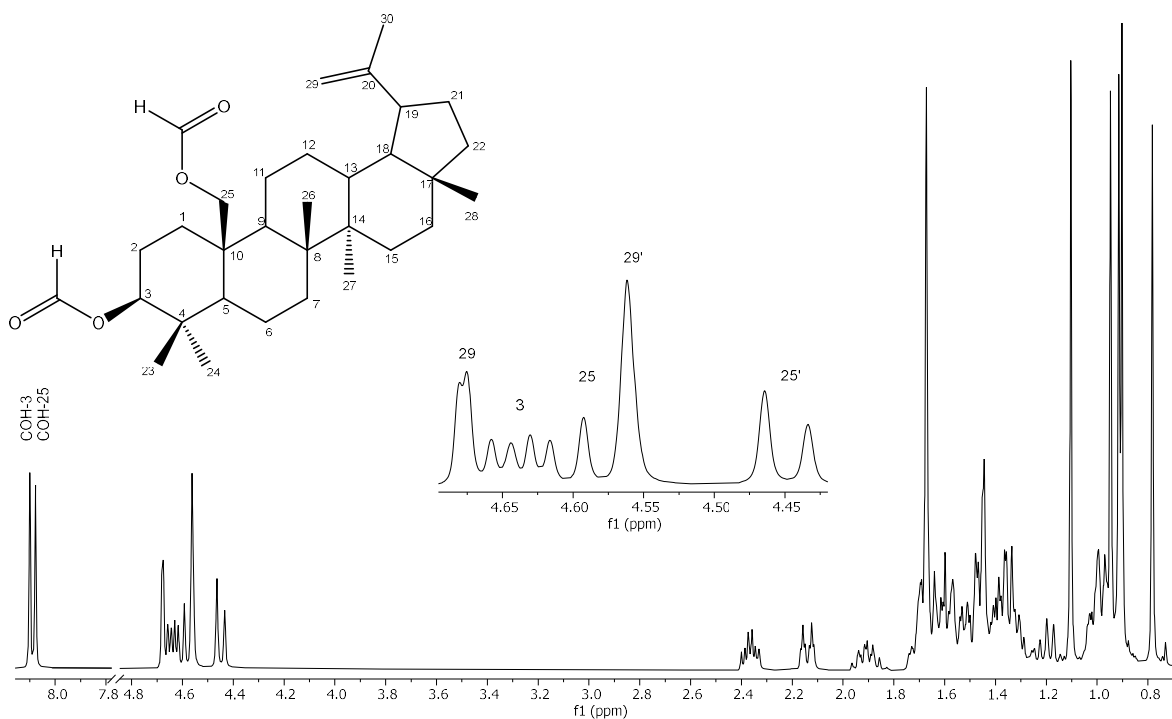


Figura 41. Espectro de RMN ^1H del derivado **82**, en CDCl_3 a 400 MHz.

En el espectro de RMN ^1H del derivado **83** (Figura 42) se observa una señal simple en 8.11 ppm que corresponde al hidrógeno del grupo formilo en posición 3; en 4.68 ppm se encuentra una señal simple que corresponde al hidrógeno vinílico H-29, en 4.64 ppm se aprecia una señal doble de dobles ($J = 11.1, 5.5$ Hz) del hidrógeno base de formilo H-3, en 4.57 ppm una señal simple del hidrógeno vinílico H-29'; en 4.03 y 3.94 ppm se observan dos señales dobles ($J = 11.8$ Hz; H-25 y H-25') que corresponden a los hidrógenos en posición 25, así como seis señales simples en la región de alifáticos que corresponden a los metilos terciarios del esqueleto base. En su espectro de RMN de ^{13}C se aprecian las 31 señales del derivado con un grupo formilo en C-3 (Tabla 11).

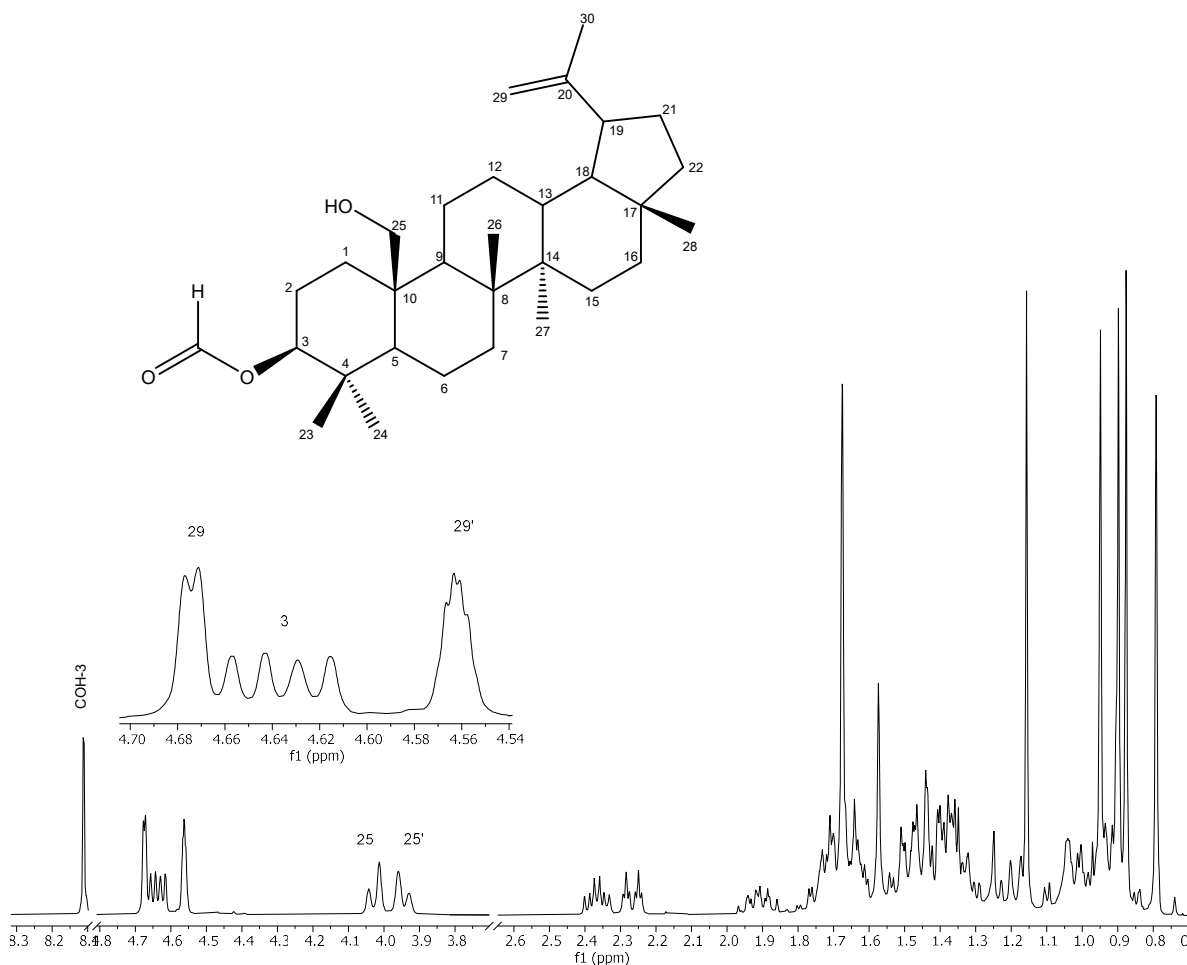


Figura 42. Espectro de RMN ^1H del derivado **83**, en CDCl_3 a 400 MHz.

En el espectro de RMN ^1H del derivado **84** (Figura 43) se muestra la señal del hidrógeno del grupo formilo sustituido en posición 25 con un desplazamiento de 8.07 ppm; en 4.68 y 4.56 ppm se encuentran dos señales simples que corresponden a los hidrógenos vinílicos 29 y 29'; en 4.54 y 4.43 ppm se aprecian dos señales dobles ($J = 12.2$ Hz; H-25 y H-25') que corresponden a los hidrógenos base del grupo formilo sustituido en la posición 25; en 3.23 ppm se aprecia la señal doble de dobles ($J = 11.7, 4.7$ Hz, H-3) del hidrógeno base de alcohol en posición 3; mientras que en la región de alifáticos se encuentran seis señales de los metilos terciarios del esqueleto base. En su espectro de RMN de ^{13}C se aprecian las 31 señales del derivado con un grupo formilo en C-25 (Tabla 11).

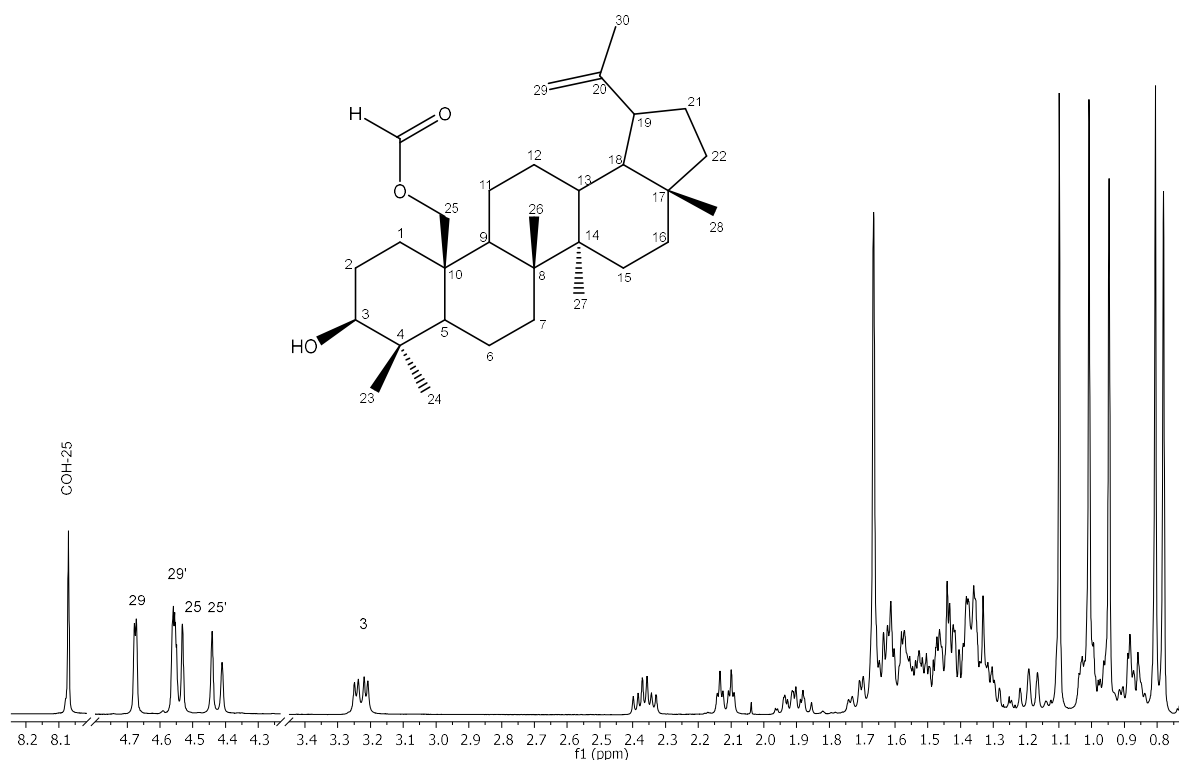


Figura 43. Espectro de RMN ^1H del derivado **84**, en CDCl_3 a 400 MHz.

En la tabla 11 se muestra el comparativo de los desplazamientos químicos de los carbonos funcionalizados tanto de la materia prima como de los derivados **82**, **83** y **84**.

Los productos de la reacción del tratamiento ácido del $3\beta,20,25$ -trihidroxilupano (**77**) pone en evidencia la reactividad de los alcoholes presentes en la materia prima frente al ácido fórmico; en los tres productos se lleva a cabo la formación de un doble enlace en la posición C-20 y C-29, antes como alcohol terciario en C-20; los desplazamientos químicos de ambos carbonos en el compuesto **77**, son de 74.0 y 25.3 ppm respectivamente; mientras que en los derivados se encuentran como vinílicos, con 151.0 y 109.6 ppm. Así, el alcohol terciario genera un doble enlace.

El producto principal de la reacción fue el derivado **82** con un 41 % de rendimiento, dicho compuesto tiene en su estructura dos grupos formilo en las posiciones C-3 y C-25, que en la materia prima se encontraban como alcoholes secundario y primario respectivamente, con desplazamientos de 79.9 ppm y 62.3 ppm; dichos desplazamientos se modifican por la sustitución de los grupos funcionales con 80.6 ppm y 63.6 ppm para el producto **82**.

El derivado **83** se obtuvo como minoritario con un rendimiento del 2 %, a pesar de que la sustitución ocurrió en un alcohol secundario en posición C-3. Finalmente, el derivado **84** se obtuvo con un rendimiento del 30 %, en donde el alcohol sustituido era de tipo primario ubicado en posición C-25.

Tabla 11. Datos espectroscópicos de RMN ^{13}C (δ ppm) de los carbonos funcionalizados del triterpeno **77** y los derivados **82**, **83** y **84**, a 100 MHz, CDCl_3 .

Carbono	77	82	83	84
3	79.9	80.6	81.1	78.7
20	74.0	151.0	151.0	151.0
25	62.3	63.6	62.5	63.8
29	25.3	109.6	109.6	109.5
OCOH-3	-	161.17	161.3	-
OCOH-25	-	161.26	-	161.3

En este trabajo se prepararon cinco derivados, de los cuales solo el derivado **80**, está reportado en la literatura (Yürüker et al., 1998); sin embargo, no ha sido sujeto a pruebas biológicas. El derivado **81** es un triterpeno con un grupo lactona que se formó en las posiciones 3 y 25; lo que comprueba la orientación β de ambos

carbonos. En el género *Salvia* no se han reportado triterpenos semejantes, de hecho, en la búsqueda realizada en bases de datos no hay coincidencias para las estructuras de **81**, **82**, **83** y **84** lo que sugiere que se trata de un nuevos triterpenos.

6.6 Actividad antifúngica de productos naturales de *Salvia* y derivados

Existen algunos reportes sobre el efecto antifúngico de metabolitos de *Salvia*, principalmente de aceites esenciales frente a *Botrytis cinerea* y diversas especies de *Candida* (Ghorbani & Esmailizadeh, 2017).

Al ácido oleanólico (60) se le ha comprobado su actividad antifúngica frente a *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. graminicola* y *Alternaria musae* con una concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) de 72.64, 38.73 y 58.44 µM (Y. Xu et al., 2018). Otro triterpeno que cuenta con reportes de actividad antifúngica es el lupeol (**79**), el cual mostró una inhibición del crecimiento de *Penicillium notatum* del 50 y 90 % a 100 y 200 µg/mL, respectivamente (Manzano et al., 2013); el efecto antifúngico de 1 mg de **79** proporciona una zona moderada de inhibición a hongos como *Aspergillus niger*, *A. flavus* o *Rhizoctonia phaseoli*, mientras que su derivado modificado en posición 3 con un grupo isoferulato a 0.01 mg/mL provoca una fuerte inhibición de *A. niger* (Gallo & Sarachine, 2009).

La bioactividad de los diterpenos con esqueleto de clerodano han mostrado propiedades como antialimentario de insectos, antifúngico, antiulceroso, citotóxico, antiinflamatorio o antimicrobiano (Li et al., 2016). El ácido kerlínico (**76**) solo cuenta con estudios sobre efecto antialimentario en *Spodoptera littoralis* (rosquilla negra que afecta hortalizas de hoja) (Simmonds et al., 1996) y como herbicida frente a *Echinochloa crus-galli* (pasto de corral, considerada una maleza de cultivos de arroz) (Gonzalez-Ibarra et al., 2003), lo cual nos permitió explorar su actividad antifúngica.

Del ensayo para calcular la concentración mínima fungicida de los productos naturales y derivados, la concentración de partida (1.0 mg/mL) no proporcionó una inhibición de los hongos fitopatógenos ya que en el recuento se observaron más de

tres unidades formadoras de colonia y al aumentar la concentración de dichos compuestos, estos precipitaban en el medio de cultivo, lo que ocasiona la disminución de la disponibilidad del metabolito de prueba.

En este trabajo se evaluó el efecto antifúngico *in vitro* de los compuestos **60**, **76**, **77**, **78**, **80**, **82** y **84**, por el método de difusión en agar con las modificaciones indicadas en la parte experimental a las concentraciones de 0.1, 1.0, 10.0, 100.0, 125.0, 250.0 y 500.0 µg/mL.

En la tabla 12, se muestra el índice de crecimiento de los fitopatógenos frente a los productos naturales que inhibieron su crecimiento, así, los compuestos con efecto antifúngico son: el ácido kerlinico (**76**) que inhibió el crecimiento de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* y *F. verticillioides* en un 28.5 % y 35.5 % respectivamente. Mientras que el ácido oleanólico (**60**) inhibió el crecimiento en un 15.1 % para *F. oxysporum* f.sp. *cubense*, una actividad antifúngica débil. Los datos sugieren que el efecto antifúngico es dependiente de la concentración, se aprecia que el IC disminuye conforme aumenta la concentración del terpeno. En el caso de lupeol (**79**), se reporta solo un dato debido a que en el momento del ensayo solo se contaba con la cantidad suficiente para la concentración de 100 µg/mL o concentraciones menores, en donde, el IC mostró valores cercanos a la unidad; sin embargo, el resultado es alentador para realizar pruebas adicionales a concentraciones mayores ya que inhibió el crecimiento de *F. oxysporum* f.sp. *cubense* en un 16.0 %.

Los compuestos **77**, **78**, **80**, **82** y **84** mostraron índices de crecimiento entre 0.928 ± 0.02 y 1.030 ± 0.02 para *F. oxysporum* f.sp. *cubense* y de 0.932 ± 0.02 y 0.985 ± 0.02 para *F. verticillioides*.

En las figuras 44 y 45 se muestran fotografías representativas del crecimiento micelial de los fitopatógenos en PDA de los tratamientos con **60**, **76**, **79** y los controles; así como de preparaciones en fresco con safranina tomadas con un microscopio óptico a diferentes aumentos.

Tabla 12. Índice de crecimiento de *Fusarium oxysporum* f.p. *ubense* y *F. verticillioides*. Control = Azoxystrobin. DE. Desviación estándar. Los datos son promedio de tres experimentos independientes con dos repeticiones. Valores con la misma letra en cada columna, no presentan diferencia estadística significativa. (n=3). Tukey $\alpha=0.05$.

	Compuesto	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>ubense</i>	<i>Fusarium</i> <i>verticillioides</i>
ÍNDICE DE CRECIMIENTO \pm DE	Azoxystrobin (control positivo)	60	0.646\pm0.04^a	0.645\pm0.01^a
	Ácido oleanólico (60)	125	0.940 \pm 0.01 ^{ef}	0.946 \pm 0.02 ^d
		250	0.955 \pm 0.02 ^{efg}	0.964 \pm 0.03 ^d
		500	0.849 \pm 0.01 ^{cd}	0.932 \pm 0.02 ^d
	Ácido kerlinico (76)	125	0.876 \pm 0.02 ^d	0.954 \pm 0.03 ^d
		250	0.817 \pm 0.03 ^c	0.760 \pm 0.02 ^b
		500	0.715 \pm 0.02 ^b	0.648\pm0.02^a
	Lupeol (79)	100	0.840 \pm 0.02 ^{cd}	0.985 \pm 0.02 ^d

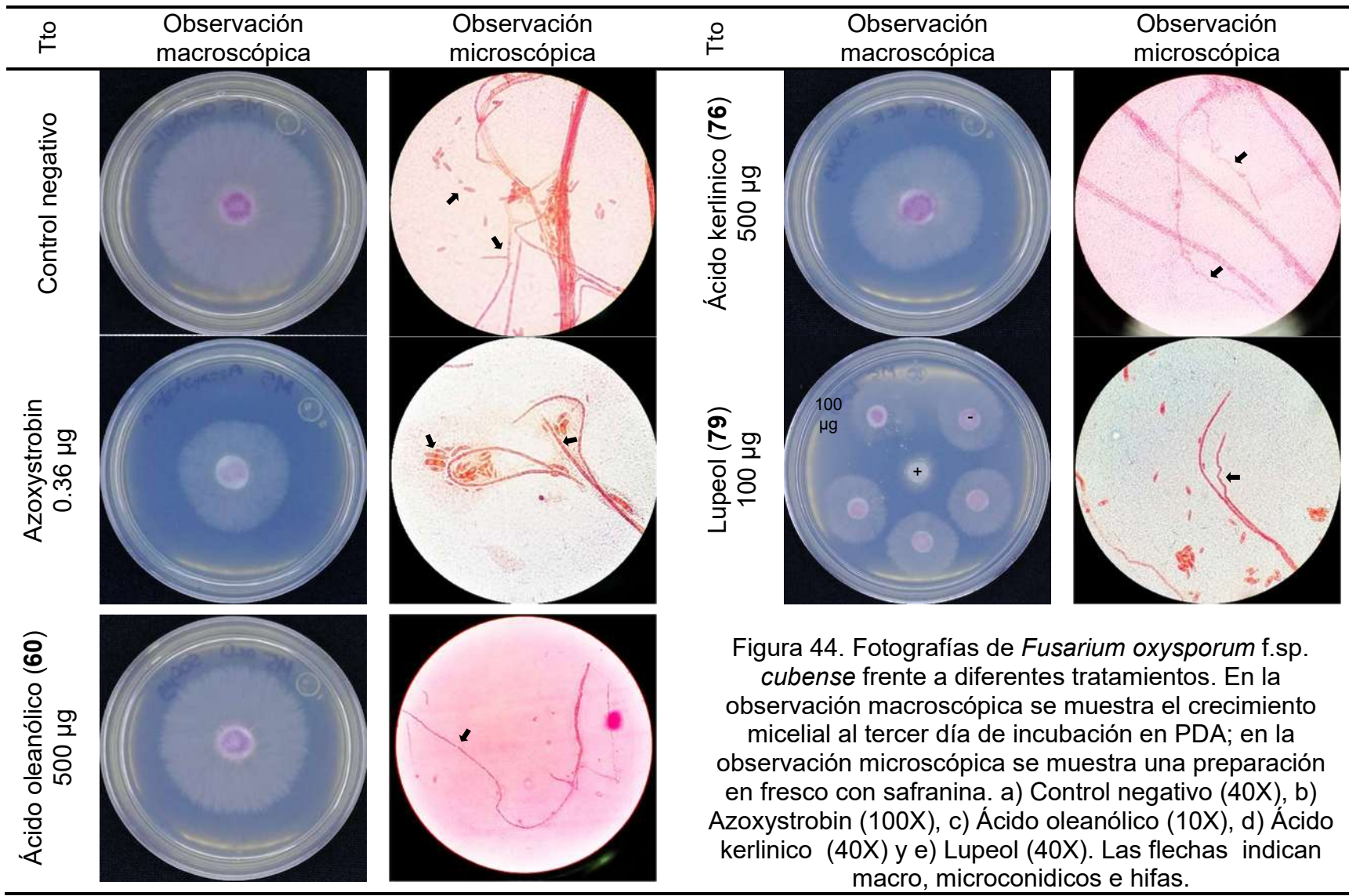


Figura 44. Fotografías de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* frente a diferentes tratamientos. En la observación macroscópica se muestra el crecimiento micelial al tercer día de incubación en PDA; en la observación microscópica se muestra una preparación en fresco con safranina. a) Control negativo (40X), b) Azoxystrobin (100X), c) Ácido oleanólico (10X), d) Ácido kerlinico (40X) y e) Lupeol (40X). Las flechas indican macro, microconidicos e hifas.

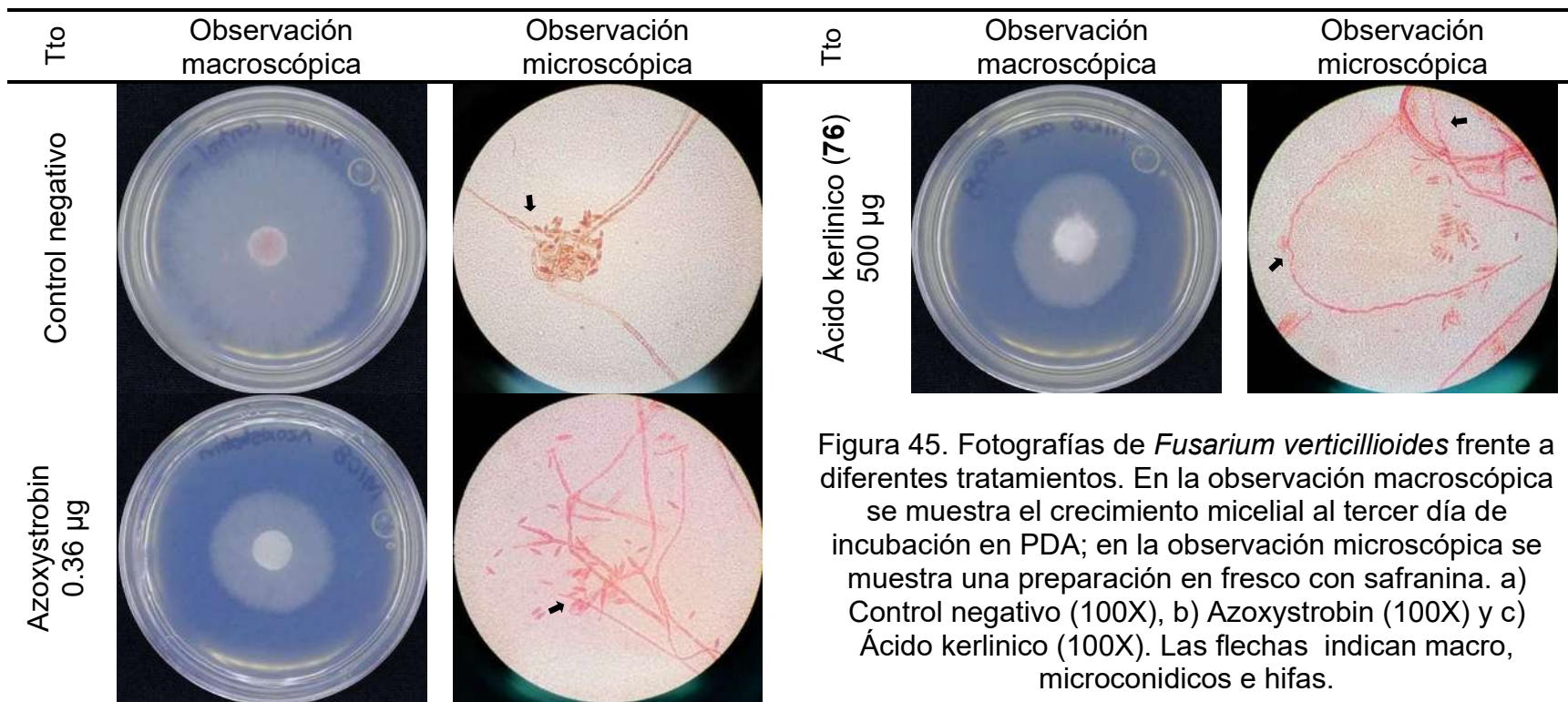


Figura 45. Fotografías de *Fusarium verticillioides* frente a diferentes tratamientos. En la observación macroscópica se muestra el crecimiento micelial al tercer día de incubación en PDA; en la observación microscópica se muestra una preparación en fresco con safranina. a) Control negativo (100X), b) Azoxystrobin (100X) y c) Ácido kerlinico (100X). Las flechas indican macro, microconidicos e hifas.

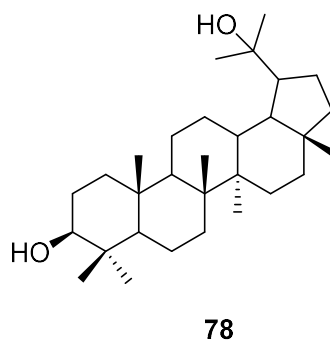
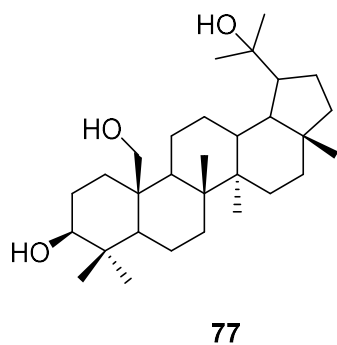
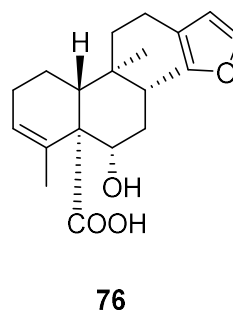
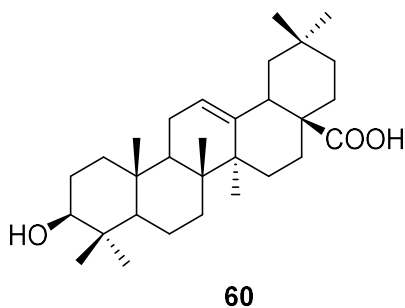
El producto natural que ejerce mayor inhibición del crecimiento y que estadísticamente es igual al efecto del azoxystrobin, es el ácido kerlinico (**76**). Los triterpenos **60** y **79** mostraron un efecto antifúngico en *Fusarium oxysporum* f sp. *cubense*, no así para *F. verticillioides*. En la observación macroscópica de e) solo se indican a los tratamientos 100 µg de lupeol y los controles (positivo y negativo) para fines comparativos; en la fotografía se aprecia que el crecimiento micelial del fitopatógeno se encuentra con un IC intermedio comparado con los controles.

En las observaciones microscópicas de los tratamientos con los productos naturales, se aprecia una modificación de la estructura micelial, algunas de las hifas se encuentran colapsadas en su pared celular, lo que nos sugiere que posiblemente la acción de los terpenos se presenta a nivel de la pared celular del hongo. Las estructuras celulares en el control negativo de ambos fitopatógenos se observan íntegras, tanto macro, microconidios e hifas muestran las características propias de *Fusarium*. Para el caso del tratamiento con azoxystrobin, no se logran apreciar modificaciones en su estructura, lo que sugiere que la inhibición del crecimiento micelial puede estar afectando algún otro punto en el ciclo de vida de los hongos. Este hallazgo nos invita a realizar ensayos que involucren aspectos fisiológicos de *Fusarium* frente a antifúngicos comerciales y productos naturales en un futuro cercano que nos permitan comprender el mecanismo de acción del efecto antifúngico observado.

7. CONCLUSIONES

La búsqueda de productos naturales con actividad biológica dentro de las especies de *Salvia* está justificada por la amplia variedad de metabolitos que se pueden encontrar. El análisis de los aceites esenciales de *Salvia dugesii* y *S. gesneriiflora* reveló al cariofileno (**12**) como componente principal en ambas especies, así como 26 y 24 compuestos entre los que destacan mono y sesquiterpenos con oxígeno, que son característicos del género y a quienes se les atribuyen diversas bioactividades.

El estudio químico de los extractos obtenidos con hexano y diclorometano de *S. dugesii* permitió identificar y caracterizar cinco terpenos, de los cuales, los ácidos oleanólico (**60**), kerlinico (**76**) y el 3 β ,20,25-trihidroxilupano (**77**) se encontraron como productos mayoritarios, al mismo tiempo se comprobó la versatilidad del triterpeno **77** para la preparación de derivados.



En este trabajo se reporta por primera vez a los compuestos **77** y **78** para el género *Salvia*, en donde el rendimiento del 3 β ,20,25-trihidroxilupano (**77**) es cerca de seis veces mayor al obtenido de *Rhus taitensis*, especie en la que se encontró por primera vez. Así, los triterpenos hidroxilados con esqueleto de lupano aportan información fitoquímica para la especie.

Se evidenció la reactividad de los grupos alcohol de **77** frente a las reacciones de acetilación, oxidación y deshidratación, las cuales permitieron la producción de cinco derivados; lo anterior nos permite continuar explorando la reactividad de **77** y el resto de los metabolitos con alcoholes para la producción de derivados adicionales.

Los ensayos para evaluar el efecto antifúngico de *Salvia* sugieren que el ácido kerlinico (**76**), uno de los compuestos mayoritarios, es el responsable de la inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium*. Esta actividad resulta novedosa para dicho compuesto debido a que los estudios sobre bioactividad reportados en la literatura, estuvieron enfocados en su efecto antialimentario y herbicida.

Este trabajo constituye el primer estudio de una población de *S. dugesii*, una especie silvestre encontrada en Michoacán, de la que se ha comprobado la presencia de terpenos, así como su actividad antifúngica frente a hongos fitopatógenos de importancia económica.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Argumedo Delira, R., Parra-Delgado, H., Ramírez Apan, M. T., Nieto-Camacho, A., & Martínez-Vázquez, M. (2003). Isolation and chemical transformations of some anti-inflammatory triterpenes from *Salvia mexicana* L. var. minor Benth. *Revista de la Sociedad Química de México*, 47(2), 167–172. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0583-76932003000200016&lng=es&tlng=en.
- Bayar, Y., & Yilar, M. (2019). The antifungal and phytotoxic effect of different plant extracts of *Salvia virgata* Jacq. *Fresenius Environmental Bulletin*, 28(4), 3492–3497.
- Beladjila, K. A., Cotugno, R., Berrehal, D., Kabouche, Z., De Tommasi, N., Braca, A., & De Leo, M. (2018). Cytotoxic triterpenes from *Salvia buechananii* roots. *Natural Product Research*, 32(17), 2025–2030. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1365072>
- Brauer, V. S., Rezende, C. P., Pessoni, A. M., De Paula, R. G., Rangappa, K. S., Nayaka, S. C., Gupta, V. K., & Almeida, F. (2019). Antifungal agents in agriculture: Friends and foes of public health. *Biomolecules*, 9(10), 1–21. <https://doi.org/10.3390/biom9100521>
- Bustos-Brito, C., Nieto-Camacho, A., Hernandez-Ortega, S., Rivera-Chávez, J., Quijano, L., & Esquivel, B. (2020). Structural Elucidation of Malonylcommunol and 6 β -Hydroxy-trans-communic Acid, Two Undescribed Diterpenes from *Salvia cinnabarina*. First Examples of Labdane Diterpenoids from a Mexican *Salvia* Species. *Molecules*, 25(17). <https://doi.org/10.3390/molecules25081808>
- Calzada, F., Bautista, E., Yépez-Mulia, L., García-Hernandez, N., & Ortega, A. (2015). Antiamoebic and anti-giardial activity of clerodane diterpenes from Mexican *Salvia* species used for the treatment of diarrhea. *Phytotherapy Research*, 29(10), 1600–1604. <https://doi.org/10.1002/ptr.5421>

- Castro, M. J., Careaga, V. P., Sacca, P. A., Faraoni, M. B., Murray, A. P., & Calvo, J. C. (2019). Lupane triterpenoids and new derivatives as antiproliferative agents against prostate cancer cells. *Anticancer Research*, *39*(7), 3835–3845. <https://doi.org/10.21873/anticancerres.13533>
- Cavallini Arauz, L. F. (1998). *Fitopatología: un enfoque agroecológico*. Universidad de Costa Rica.
- CONABIO. (2020). *México megadiverso | Biodiversidad Mexicana*. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). <https://www.biodiversidad.gob.mx/pais/quees>
- Cornejo-Tenorio, G., & Ibarra-Manríquez, G. (2011). Diversidad y distribución del género *Salvia* (Lamiaceae) en Michoacán, México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, *82*(4), 1279–1296. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2011.4.668>
- Craft, J. D., Satyal, P., & Setzer, W. N. (2017). The Chemotaxonomy of Common Sage (*Salvia officinalis*) Based on the Volatile Constituents. *Medicines*, *4*(4), 47. <https://doi.org/10.3390/medicines4030047>
- Çulhaoglu, B., Hatipoglu, S. D., Dönmez, A. A., & Topçu, G. (2015). Antioxidant and anticholinesterase activities of lupane triterpenoids and other constituents of *Salvia trichoclada*. *Medicinal Chemistry Research*, *24*(11), 3831–3837. <https://doi.org/10.1007/s00044-015-1424-7>
- Dubey, N. K., Shukla, R., Kumar, A., Singh, P., & Prakash, B. (2011). Global Scenario on the Application of Natural Products in Integrated Pest Management Programmes. En N. K. Dubey (Ed.), *Natural Products in Plant Pest Management* (pp. 1–20). CABI.
- Elshafie, H. S., Aliberti, L., Amato, M., De Feo, V., & Camele, I. (2018). Chemical composition and antimicrobial activity of chia (*Salvia hispanica* L.) essential oil. *European Food Research and Technology*, *244*(9), 1675–1682. <https://doi.org/10.1007/s00217-018-3080-x>

- Espinel-Ingroff, A., Fothergill, A., Peter, J., Rinaldi, M. G., & Walsh, T. J. (2002). Testing Conditions for Determination of Minimum Fungicidal Concentrations of New and Established Antifungal Agents for *Aspergillus* spp.: NCCLS Collaborative Study. *Journal of Clinical Microbiology*, *40*(9), 3204–3208. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.10.3776-3781.2002>
- Espino-Espino, J., Rosas, F., & Cuevas-García, E. (2014). Variación temporal de visitantes florales en dos especies simpátricas de *Salvia* con floración simultánea y síndrome de polinización contrastante. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, *85*(1), 161–166. <https://doi.org/10.7550/rmb.35248>
- Esquivel, B., Méndez, A., Ortega, A., Soriano-García, M., Toscano, A., & Rodríguez-Hahn, L. (1985). Neo-clerodane-type diterpenoids from *Salvia keerlii*. *Phytochemistry*, *24*(8), 1769–1772. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)82548-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)82548-0)
- Esquivel, Baldomero. (2008). Rearranged clerodane and abietane derived diterpenoids from American *Salvia* species. *Natural Product Communications*, *3*(6), 989–1002. <https://doi.org/10.1177/1934578x0800300628>
- Esquivel, Baldomero, Cardenas, J., & Rodriguez-Hahn, L. (1987). The diterpenoid constituents of *Salvia fulgens* and *Salvia microphylla*. *Journal of Natural Products*, *50*(4), 738–740. <https://doi.org/10.1021/np50052a029>
- Esquivel, Baldomero, Hernández, L. M., Cárdenas, J., Ramamoorthy, T. P., & Rodríguez-Hahn, L. (1989). Further ent-clerodane diterpenoids from *Salvia melissodora*. *Phytochemistry*, *28*(2), 3–8. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(89\)80051-2](https://doi.org/10.1016/0031-9422(89)80051-2)
- Esquivel, Baldomero, Vallejo, A., Gaviño, R., Cárdenas, J., Sánchez, A.-A., Ramamoorthy, T. P., & Rodriguez-Hahn, L. (1988). Clerodane diterpenoids from *Salvia melissodora*. *Phytochemistry*, *27*(9), 2903–2905. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)80685-x](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)80685-x)
- Formisano, C., Senatore, F., Nelly, A. A., Piozzi, F., & Rosselli, S. (2007). GC and

- GC / MS Analysis of the Essential Oil of *Salvia hierosolymitana* Boiss. Growing Wild in Lebanon. *Natural Product Communications*, 2, 181–184.
- Gallo, M. B. C., & Sarachine, M. J. (2009). Biological activities of lupeol. *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, 1, 46–66.
- Gang, X., Fang, Z., Xian-Wen, Y., Juan, Z., Li-Xin, Y., Shen, X. L., Hu, Y. J., & Zhao, Q. S. (2011). neo-Clerodane diterpenoids from *Salvia dugesii* and their bioactive studies. *Natural Products and Bioprospecting*, 1(2), 81–86. <https://doi.org/10.1007/s13659-011-0016-6>
- Georgiev, V., & Pavlov, A. (2017). *Salvia* Biotechnology. En V. Georgiev & A. Pavlov (Eds.), *Springer*. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-73900-7>
- Ghorbani, A., & Esmailizadeh, M. (2017). Pharmacological properties of *Salvia officinalis* and its components. *Journal of Traditional and Complementary Medicines*, 7, 433–440. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2016.12.014>
- Gómez-Rivera, A., González-Cortazar, M., Gallegos-García, A. J., Escobar-Ramos, A., Flores-Franco, G., & Lobato-García, C. E. (2018). Spasmolytic, anti-inflammatory, and antioxidant activities of *Salvia gesneriflora* Lindley. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 15(4), 72. <https://doi.org/10.21010/ajtcam.v15i4.10>
- González-Gallegos, J. G., Bedolla-García, B. Y., Cornejo-Tenorio, G., Fernández-Alonso, J. L., Fragos-Martínez, I., García-Peña, M., Harley, R. M., Klitgaard, B., Martínez-Gordillo, M. J., Wood, J. R. I., Zamudio, S., Zona, S., & Xifreda, C. C. (2020). Richness and distribution of *Salvia* subgenus Calosphace (Lamiaceae). *International Journal of Plant Sciences*. <https://doi.org/10.1086/709133>
- Gonzalez-Ibarra, M. L., Lotina-Hennsen, B., Trejo, C., & Esquivel, B. (2003). Potential activity herbicide of kerlinic acid. Abstracts of Papers, 226th ACS National Meeting, New York, NY, United States. <https://scifinder.cas.org/scifinder/view/scifinder/scifinderExplore.jsf>

- Hamidpour, M., Hamidpour, R., Hamidpour, S., & Shahlari, M. (2014). Chemistry, Pharmacology, and Medicinal Property of Sage (*Salvia*) to Prevent and Cure Illnesses such as Obesity, Diabetes, Depression, Dementia, Lupus, Autism, Heart Disease, and Cancer. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 4(2), 82–88. <https://doi.org/10.4103/2225-4110.130373>
- Harley, R. M., Atkins, S., Bundansev, A. L., Cantino, P. D., Conn, B. J., Grayer, R., Harley, M. M., De Kok, R., Krestovskaia, T., Morales, R., PAton, A. J., Tyding, O., & Upson, T. (2004). Labiatae. En K. Kubitzki & W. Kadereit (Eds.), *Labiatae. The families and genera of vascular plants VII. Flowering plants dicotyledons: lamiales (except Acanthaceae including Avicenniaceae)* (pp. 167–275). Springer, Berlin. <https://doi.org/10.4102/abc.v11i1/2.1986>
- Hernández-Saavedra, D., Pérez-Ramírez, I. F., Ramos-Gómez, M., Mendoza-Díaz, S., Loarca-Piña, G., & Reynoso-Camacho, R. (2016). Phytochemical characterization and effect of *Calendula officinalis*, *Hypericum perforatum*, and *Salvia officinalis* infusions on obesity-associated cardiovascular risk. *Medicinal Chemistry Research*, 25(1), 163–172. <https://doi.org/10.1007/s00044-015-1454-1>
- Hu, G. X., Xiang, C. L., & Liu, E. D. (2013). Invasion status and risk assessment for *Salvia tiliifolia*, a recently recognised introduction to China. *Weed Research*, 53(5), 355–361. <https://doi.org/10.1111/wre.12030>
- Jadulco, R. C., Koch, M., Van Wagoner, R. M., Pond, C., Gideon, O. G., Matainaho, T., Piskaut, P., & Barrows, L. R. (2011). New antimycobacterial triterpenoids from *Rhus taitensis*. *Planta Medica*, 77(14), 1651–1654. <https://doi.org/10.1055/s-0030-1271027>
- Jäger, A. K., & van Staden, J. (2000). *Salvia* in Southern Africa. En S. E. Kintizios (Ed.), *SAGE The Genus Salvia* (pp. 47–54). Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- Jash, S. K., Gorai, D., & Roy, R. (2016). *Salvia* Genus and Triterpenoids.

- International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 7(12), 4710–4732. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.7\(12\).4710-32](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.7(12).4710-32)
- Jeger, M. J., Walle, J. M., Johanson, A., & Gowen, S. R. (1996). Monitoring in banana pest management *. *Crop Protection*, 15(4), 391–397.
- Kamatou, G. P. P., Makunga, N. P., Ramogola, W. P. N., & Viljoen, A. M. (2008). South African *Salvia* species: A review of biological activities and phytochemistry. *Journal of Ethnopharmacology*, 119(3), 664–672. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2008.06.030>
- Karpiński, T. M. (2020). Essential oils of lamiaceae family plants as antifungals. *Biomolecules*, 10(103), 1–35. <https://doi.org/10.3390/biom10010103>
- Khan, T., Zahid, M., Asim, M., Shahzad-ul-Hussan, Iqbal, Z., Choudhary, M. I., & Ahmad, V. U. (2002). Pharmacological activities of crude acetone extract and purified constituents of *Salvia moorcraftiana* Wall. *Phytomedicine*, 9(8), 749–752. <https://doi.org/10.1078/094471102321621386>
- Khedher, M. R. Ben, Khedher, S. Ben, Chaieb, I., Tounsi, S., & Hammami, M. (2017). Chemical composition and biological activities of *Salvia officinalis* essential oil from Tunisia. *EXCLI Journal*, 16, 160–173. <https://doi.org/10.17179/excli2016-832>
- Lakhal, H., Kabouche, A., Alabdul Magid, A., Voutquenne-Nazabadioko, L., Harakat, D., & Kabouche, Z. (2014). Triterpenoids from *Salvia argentea* var. *aurasiaca* (Pomel) Batt. & Trab. and their chemotaxonomic significance. *Phytochemistry*, 102, 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2014.03.009>
- Lara-Cabrera, S. I., Bedolla-García, B. Y., Zamudio, S., & Domínguez-Vázquez, G. (2016). Diversidad de Lamiaceae en el Estado de Michoacán, México. *Acta Botanica Mexicana*, 116, 107–149. <https://doi.org/10.21829/abm116.2016.1120>
- Li, R., Morris-Natschke, S. L., & Lee, K. H. (2016). Clerodane diterpenes: Sources, structures, and biological activities. *Natural Product Reports*, 33(10), 1166–

1226. <https://doi.org/10.1039/c5np00137d>
- Lim Ah Tock, M. J., Kamatou, G. P. P., Combrinck, S., Sandasi, M., & Viljoen, A. M. (2020). A chemometric assessment of essential oil variation of three *Salvia* species indigenous to South Africa. *Phytochemistry*, 172(December 2019), 112249. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112249>
- Lima, C. F., Valentao, P. C. R., Andrade, P. B., Seabra, R. M., Fernandes-Ferreira, M., & Pereira-Wilson, C. (2007). Water and methanolic extracts of *Salvia officinalis* protect HepG2 cells from t-BHP induced oxidative damage. *Chemico-Biological Interactions*, 167(2), 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2007.01.020>
- Lu, Y., & Foo Yeap, L. (2002). Polyphenolics of *Salvia*- a review. *Phytochemistry*, 59, 117–140. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00415-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00415-0)
- Manzano, P. I., Miranda, M., Abreu-Payrol, J., Silva, M., Sterner, O., & Peralta, E. L. (2013). Pentacyclic triterpenoids with antimicrobial activity from the leaves of *Vernonanthura patens* (Asteraceae). *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 25(7), 539–543. <https://doi.org/10.9755/ejfa.v25i7.15989>
- Marques Dos Santos, M. J. (2004). *Probabilidad y Estadística para las Ciencias Químico Biológicas* (Segunda Ed). Universidad Nacional Autónoma de México.
- Martínez-Gordillo, M., Fragoso-Martínez, I., García-Peña, M. del R., & Montiel, O. (2013). Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84, 30–86. <https://doi.org/10.7550/rmb.30158>
- Narukawa, Y., Fukui, M., Hatano, K., & Takeda, T. (2006). Four new diterpenoids from *Salvia fulgens* Cav. *Journal of Natural Medicines*, 60(1), 58–63. <https://doi.org/10.1007/s11418-005-0007-1>
- Olvera-Mendoza, E. I., Bedolla-García, B. Y., & Lara-Cabrera, S. I. (2017). Taxonomic revision of *Salvia* subgenus Calosphace section Scorodoniae (Lamiaceae), endemic to Mexico. *Acta Botanica Mexicana*, 2017(118), 7–39.

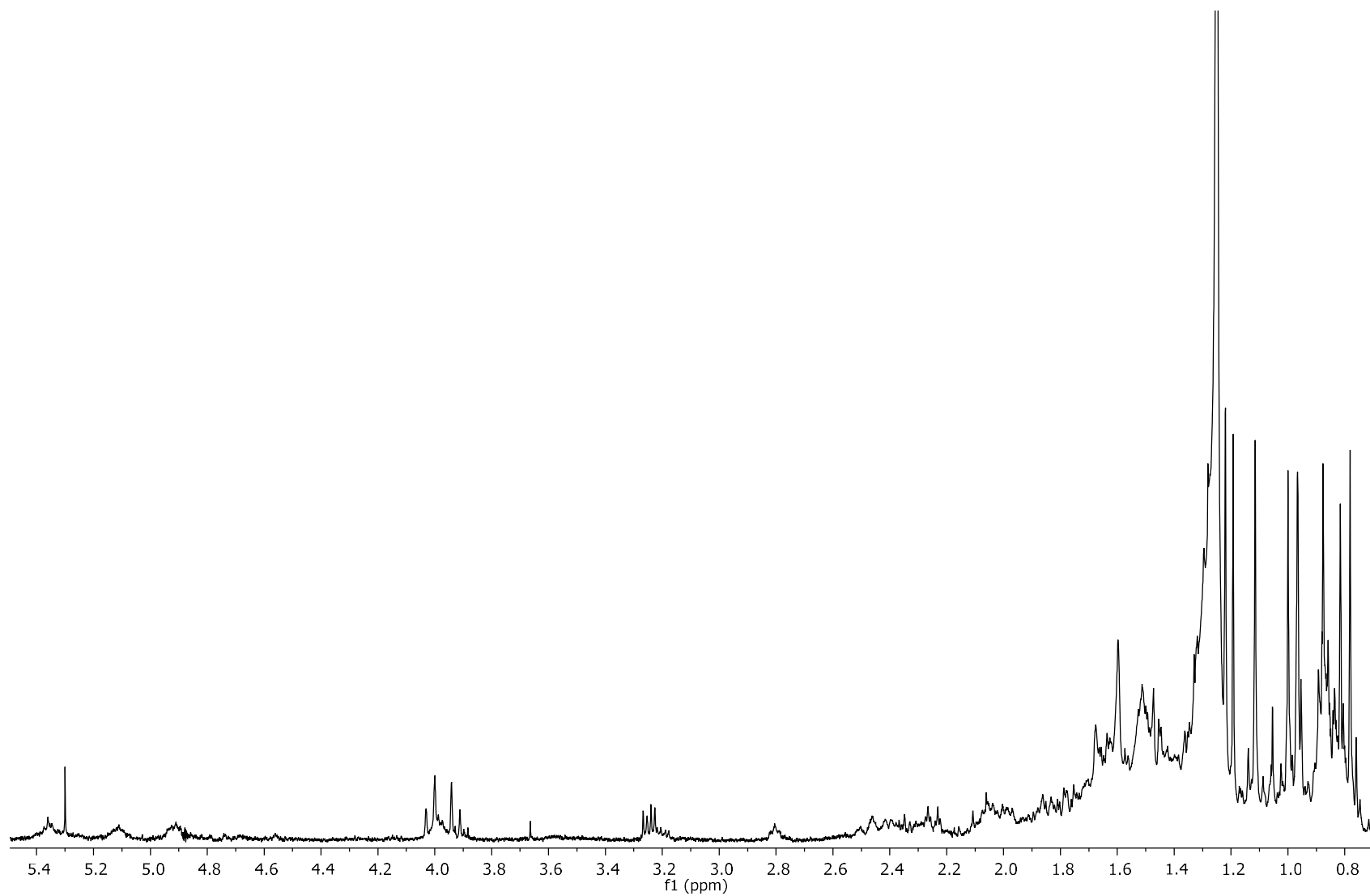
<https://doi.org/10.21829/abm118.2017.1198>

- Ortega, A., Blount, J. F., & Manchand, P. S. (1982). Salvinatorin, a New trans-Neoclerodane Diterpene from *Salvia divinorum* (Labiatae). *Journal of the Chemical Society*, 1, 2505–2508. <https://doi.org/10.1039/P19820002505>
- Ploetz, R. C., Thomas, J. E., & W.R., S. (2003). Diseases of Banana and Plantain. En R. C. Ploetz (Ed.), *Diseases of Tropical Fruit Crops* (pp. 73–134). CABI Publishing. <https://doi.org/10.1079/9780851993904.0073>
- Poulios, E., Giaginis, C., & Vasios, G. K. (2020). Current State of the Art on the Antioxidant Activity of Sage (*Salvia* spp.) and Its Bioactive Components. *Planta Medica*. <https://doi.org/10.1055/a-1087-8276>
- Privitera, G., Luca, T., Castorina, S., Passanisi, R., Ruberto, G., & Napoli, E. (2019). Anticancer activity of *Salvia officinalis* essential oil and its principal constituents against hormone-dependent tumour cells. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 9(1), 24–28. <https://doi.org/10.4103/2221-1691.250266>
- Rodríguez-Hahn, L., Esquivel, B., & Cárdenas, J. (1995). Neo-clerodane diterpenoids from American *Salvia* species. En J. T. Arnason, R. Mata, & J. T. Romeo (Eds.), *Phytochemistry of Medicinal Plants* (pp. 311–332). Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1778-2>
- Rodriguez-Hahn, L., Garcia, A., Esquivel, B., & Cardenas, J. (1987). Structure of kerlinic acid from *Salvia keerlii*. Chemical correlation with melisodoric acid. *Canadian Journal of Chemistry*, 65(12), 2687–2690. <https://doi.org/10.1139/v87-445>
- Rongai, D., Pulcini, P., Pesce, B., & Milano, F. (2015). Antifungal activity of some botanical extracts on *Fusarium oxysporum*. *Open Life Sciences*, 10(1), 409–416. <https://doi.org/10.1515/biol-2015-0040>
- Rustaiyan, A., Masoudi, S., & Tabatabaei-Anaraki, M. (2007). Terpenoids from Iranian *Salvia* Species. *Natural Product Communications*, 2, 1031–1042.

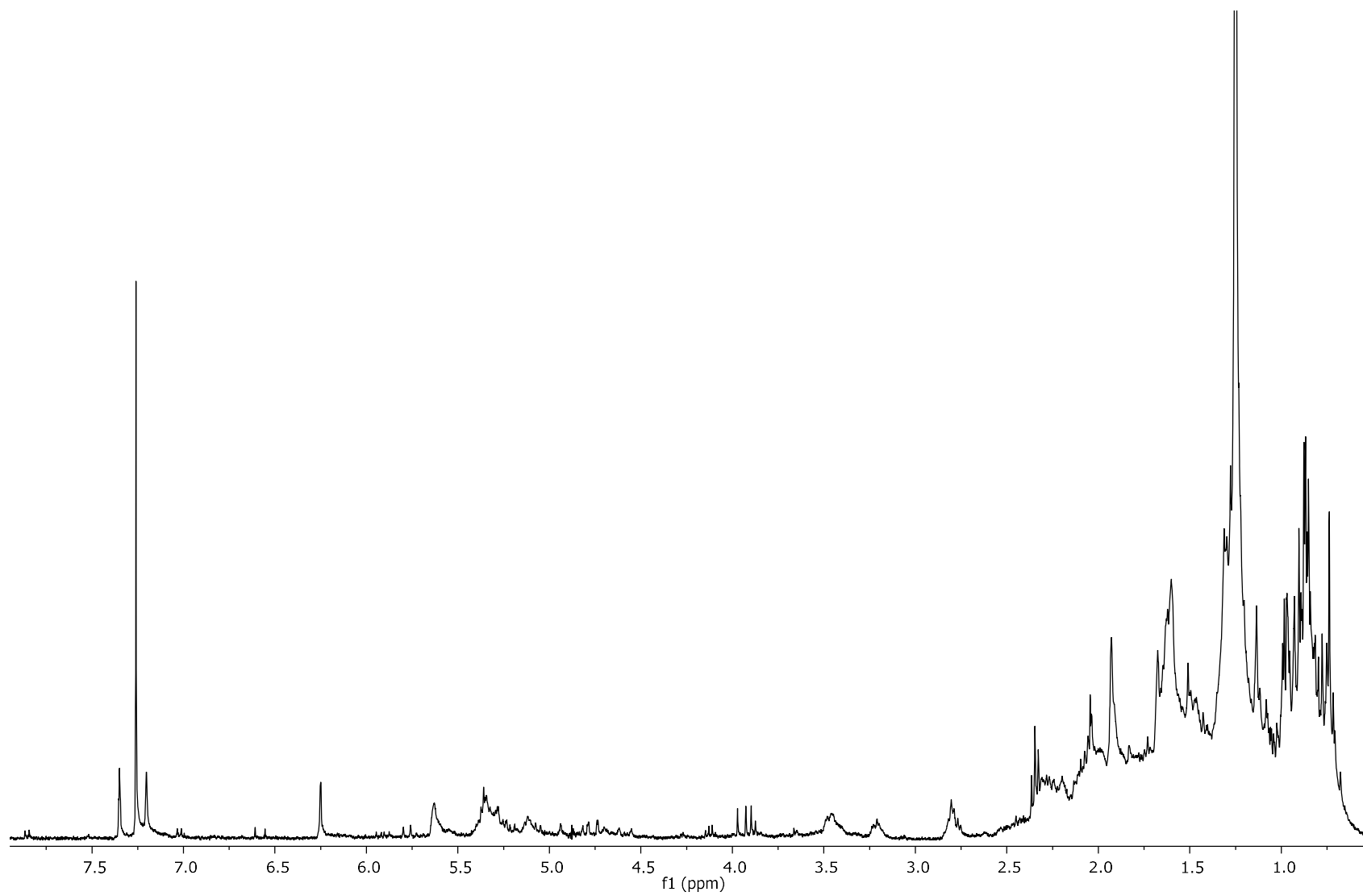
- Rzedowski, J. (1991). Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. *Acta Botánica Mexicana*, 14, 3–21. <https://doi.org/10.1007/BF00489298>
- SADER-SIAP. (2019). Panorama agroalimentario 2019. En *Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural* (Primera). <https://www.gob.mx/fira/documentos/panorama-agroalimentario>
- Schmiderer, C., Grassi, P., Novak, J., & Franz, C. (2008). Diversity of Essential Oil Glands of Spanish Sage (*Salvia lavandulifolia* Vahl, Lamiaceae). *Natural Product Communications*, 3, 1155–1160.
- Segura, M. J. R., Meyer, M. M., & Matsuda, S. P. T. (2000). Arabidopsis thaliana LUP1 converts oxidosqualene to multiple triterpene alcohols and a triterpene diol. *Organic Letters*, 2(15), 2257–2259. <https://doi.org/10.1021/ol006016b>
- Simmonds, M. S. J., Blaney, W. M., Esquivel, B., & Rodriguez-Hahn, L. (1996). Effect of Clerodane-Type Diterpenoids Isolated from *Salvia* spp. on the Feeding Behaviour of *Spodoptera littoralis*. *Pesticide Science*, 47(1), 17–23. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1096-9063\(199605\)47:1<17::aid-ps378>3.0.co;2-i](https://doi.org/10.1002/(sici)1096-9063(199605)47:1<17::aid-ps378>3.0.co;2-i)
- Suryati, S., Nurdin, H., Dachriyanus, D., & Hj Lajis, M. N. (2011). Structure elucidation of antibacterial compound from *Ficus deltoidea* Jack leaves. *Indonesian Journal of Chemistry*, 11(1), 67–70. <https://doi.org/10.22146/ijc.21422>
- Tlacomulco-Flores, L. L., Déciga-Campos, M., González-Trujano, M. E., Carballo-Villalobos, A. I., & Pellicer, F. (2020). Antinociceptive effects of *Salvia divinorum* and bioactive salvinorins in experimental pain models in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 248, 112276. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112276>
- Topcu, G. (2006). Bioactive triterpenoids from *Salvia* species. *Journal of Natural Products*, 69(3), 482–487. <https://doi.org/10.1021/np0600402>
- Ulubelen, A. (2000). Terpenoids in the genus *Salvia*. En S. E. Kintzios (Ed.), *SAGE The Genus Salvia* (pp. 55–68). Harwood Academic Publishers, Amsterdam.

- Valdés III, L. J., Díaz, J. L., & Paul, A. G. (1983). Ethnopharmacology of ska María Pastora (*Salvia divinorum*, Epling and Játiva-M.). *Journal of Ethnopharmacology*, 7, 287–312. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(83\)90004-1](https://doi.org/10.1016/0378-8741(83)90004-1)
- Villaseñor, J. L. (2016). Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87, 559–902. <https://doi.org/10.1016/j.rmb.2016.06.017>
- Walker, J. B., Sytsma, K. J., Treutlein, J., & Wink, M. (2004). *Salvia* (Lamiaceae) is not monophyletic: Implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of *Salvia* and tribe Mentheae. *American Journal of Botany*, 91(7), 1115–1125. <https://doi.org/10.3732/ajb.91.7.1115>
- Wu, Y. B., Ni, Z. Y., Shi, Q. W., Dong, M., Kiyota, H., Gu, Y. C., & Cong, B. (2012). Constituents from *Salvia* species and their biological activities. *Chemical Reviews*, 112(11), 5967–6026. <https://doi.org/10.1021/cr200058f>
- Xu, G., Peng, L., Niu, X., Zhao, Q., Li, R., & Sun, H. (2004). Novel Diterpenoids from *Salvia dugesii*. *Helvetica Chimica Acta*, 87(4), 949–955. <https://doi.org/10.1002/hlca.200490088>
- Xu, Y., Ling, S., Zeng, D., & Tang, W. (2018). Antifungal activities and active ingredients of *Melodinus suaveolens* Champ. ex Benth. *Natural Product Research*, 32(12), 1481–1483. <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1353505>
- Yürüker, A., Orjala, J., Sticher, O., & Rali, T. (1998). Triterpenes from *Rhus taitensis*. *Phytochemistry*, 48(5), 863–866. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00901-1](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00901-1)

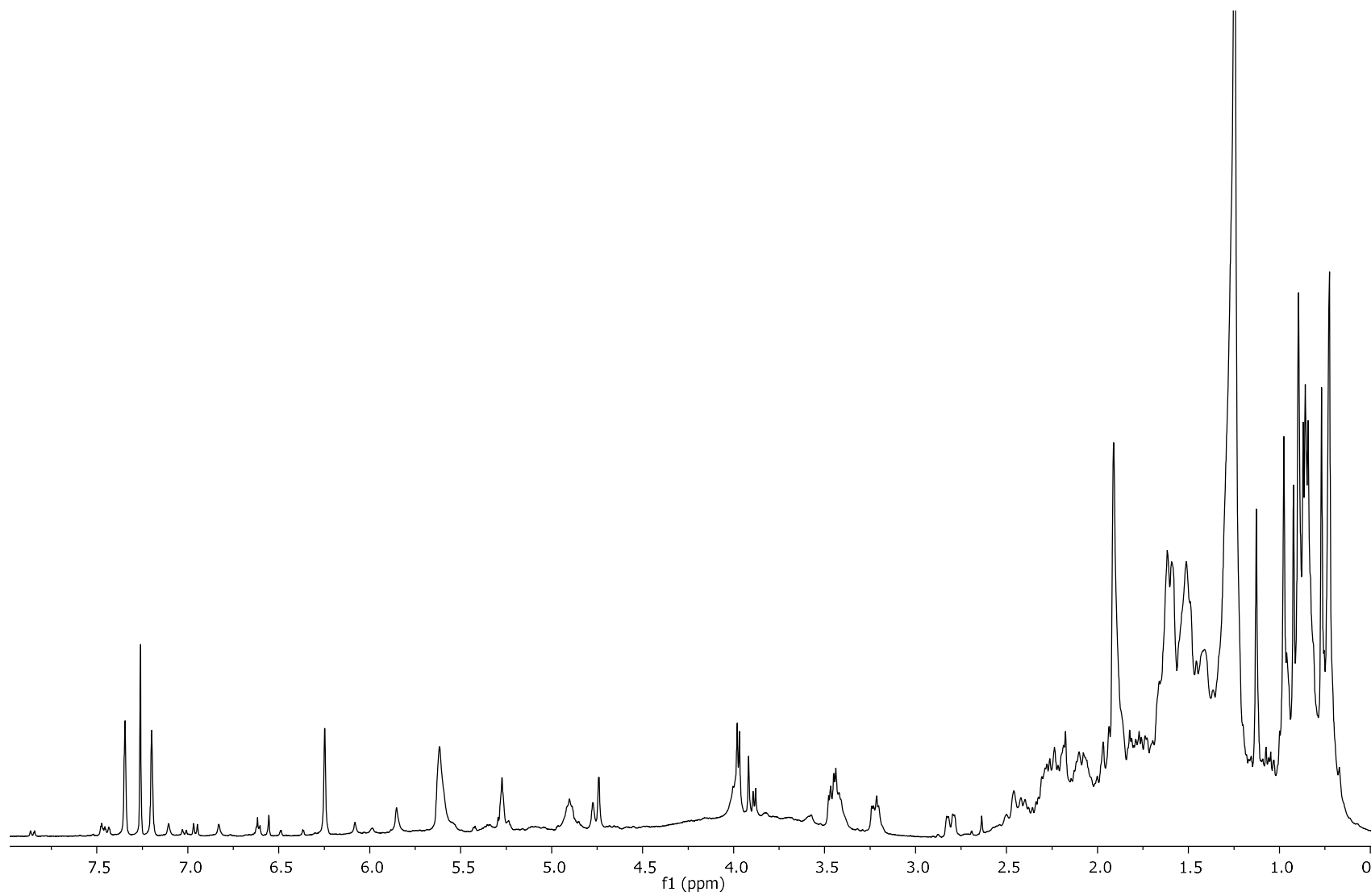
9. ANEXO 1



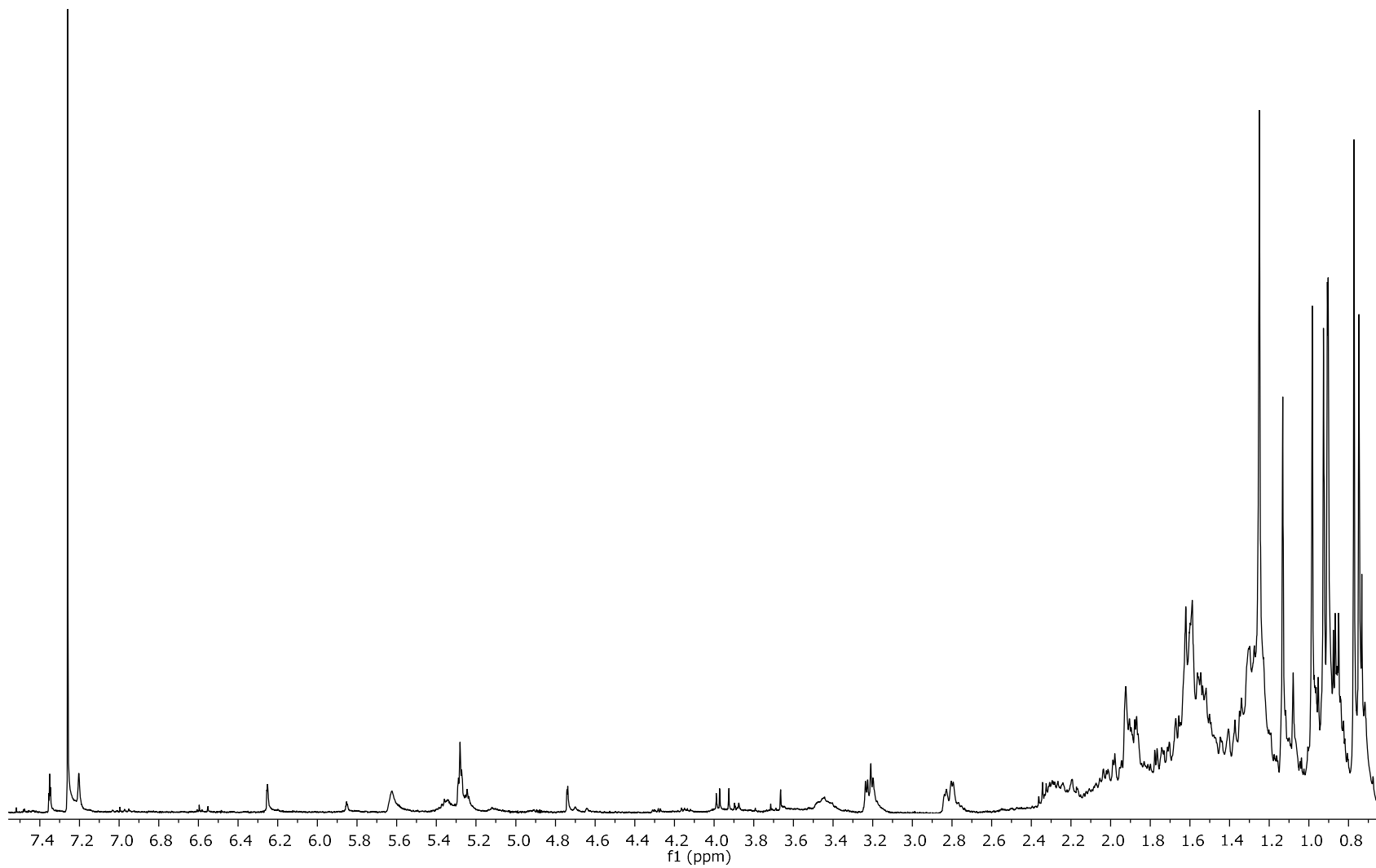
A1.1. Espectro de RMN ^1H del extracto hexánico de hojas de *S. dugesii* en CDCl_3 a 400 MHz.



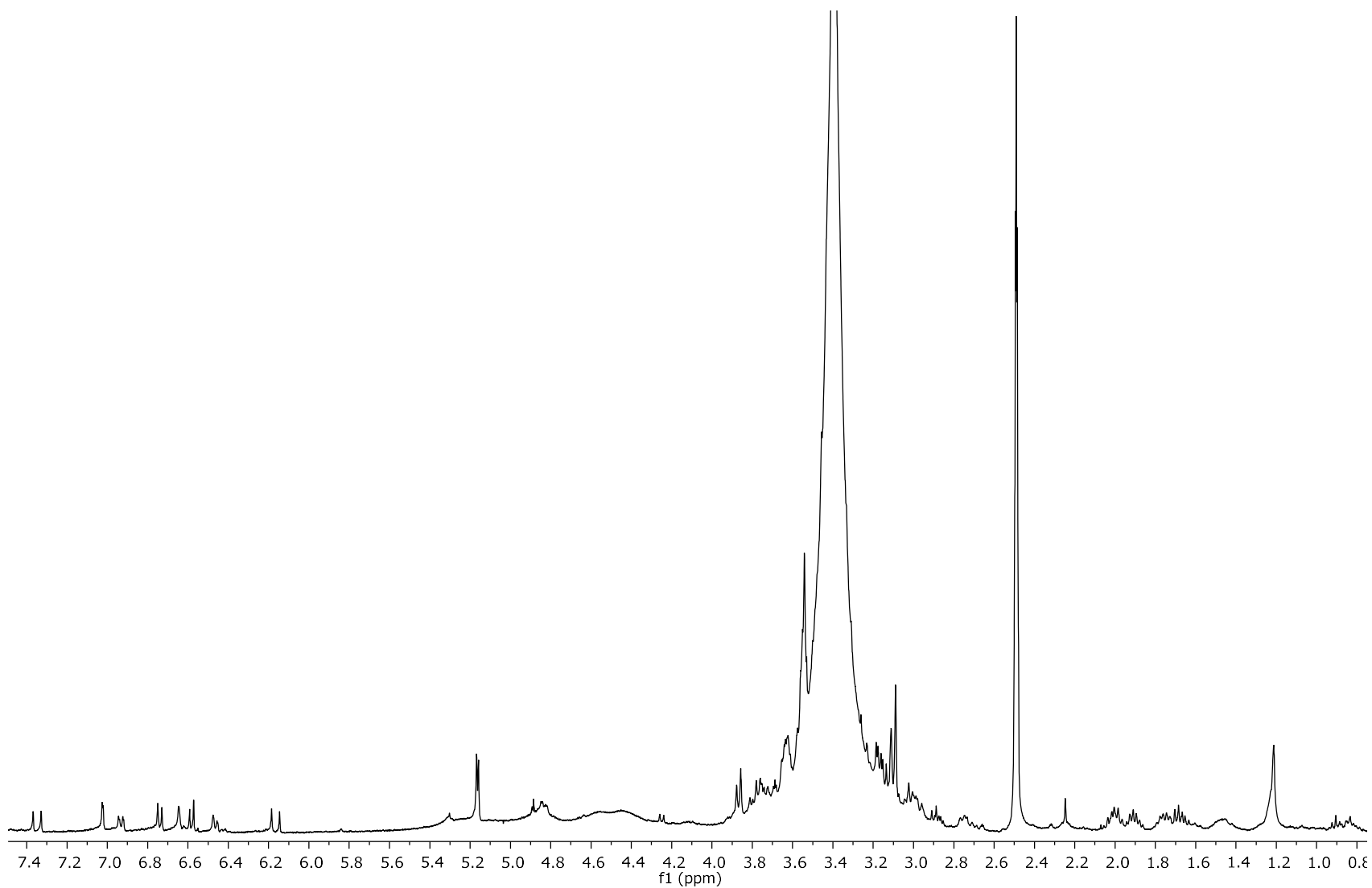
A1.2. Espectro de RMN ^1H del extracto hexánico de flores de *S. dugesii* en CDCl_3 a 400 MHz.



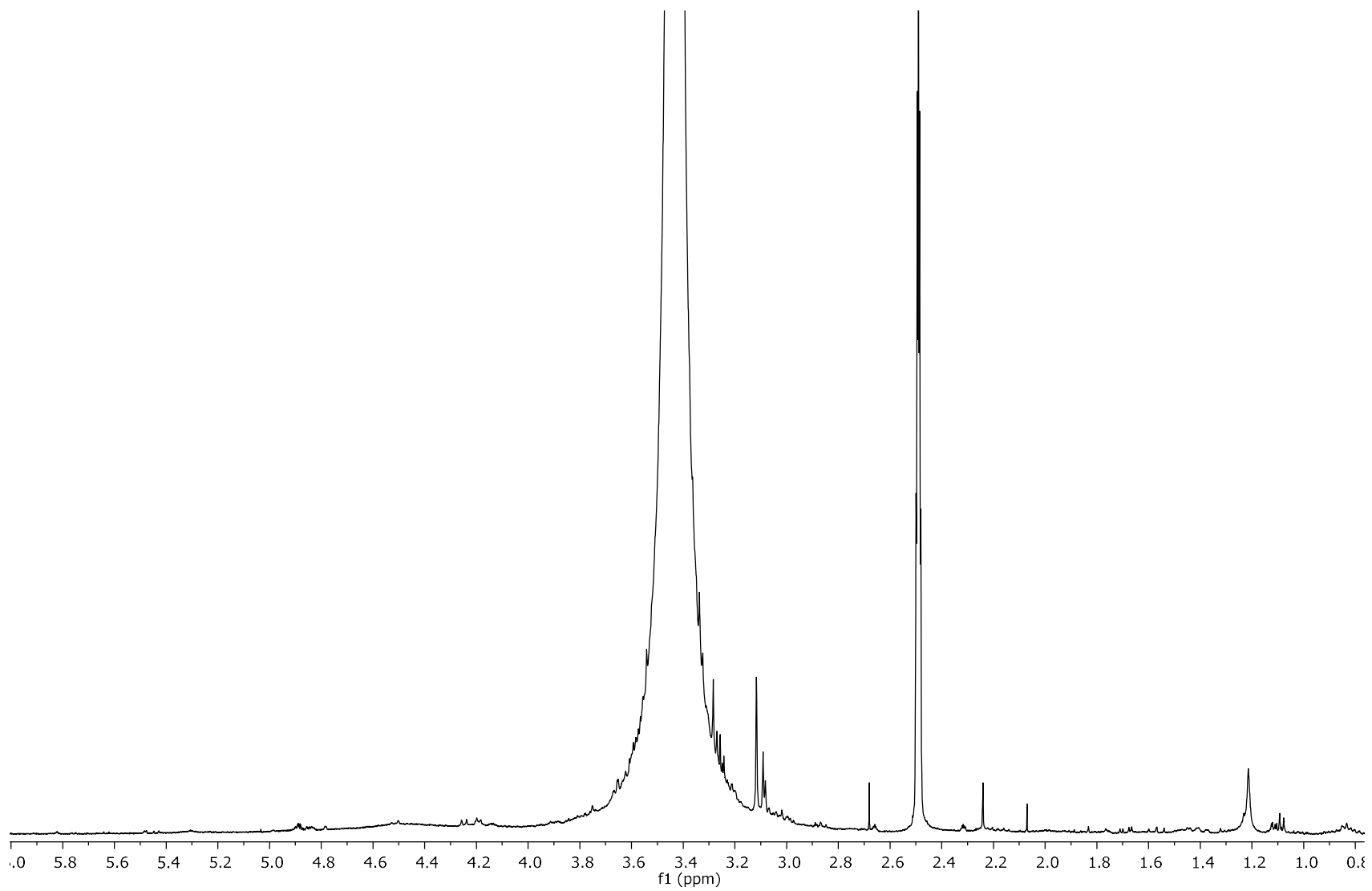
A1.3. Espectro de RMN ^1H del extracto de diclorometano de hojas de *S. dugesii* en CDCl_3 a 400 MHz.



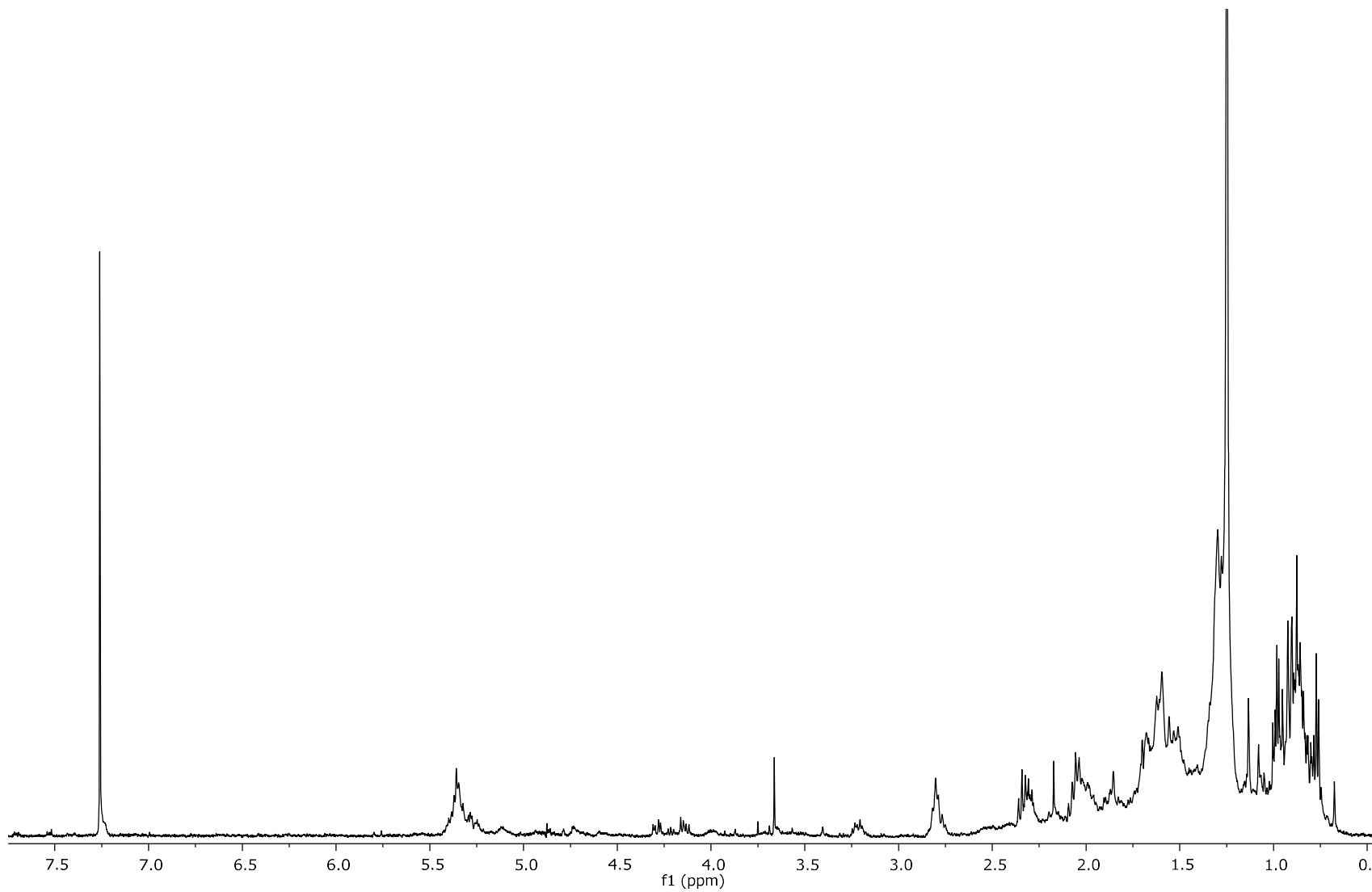
A1.4. Espectro de RMN ^1H del extracto de diclorometano de flores de *S. dugesii* en CDCl_3 a 400 MHz.



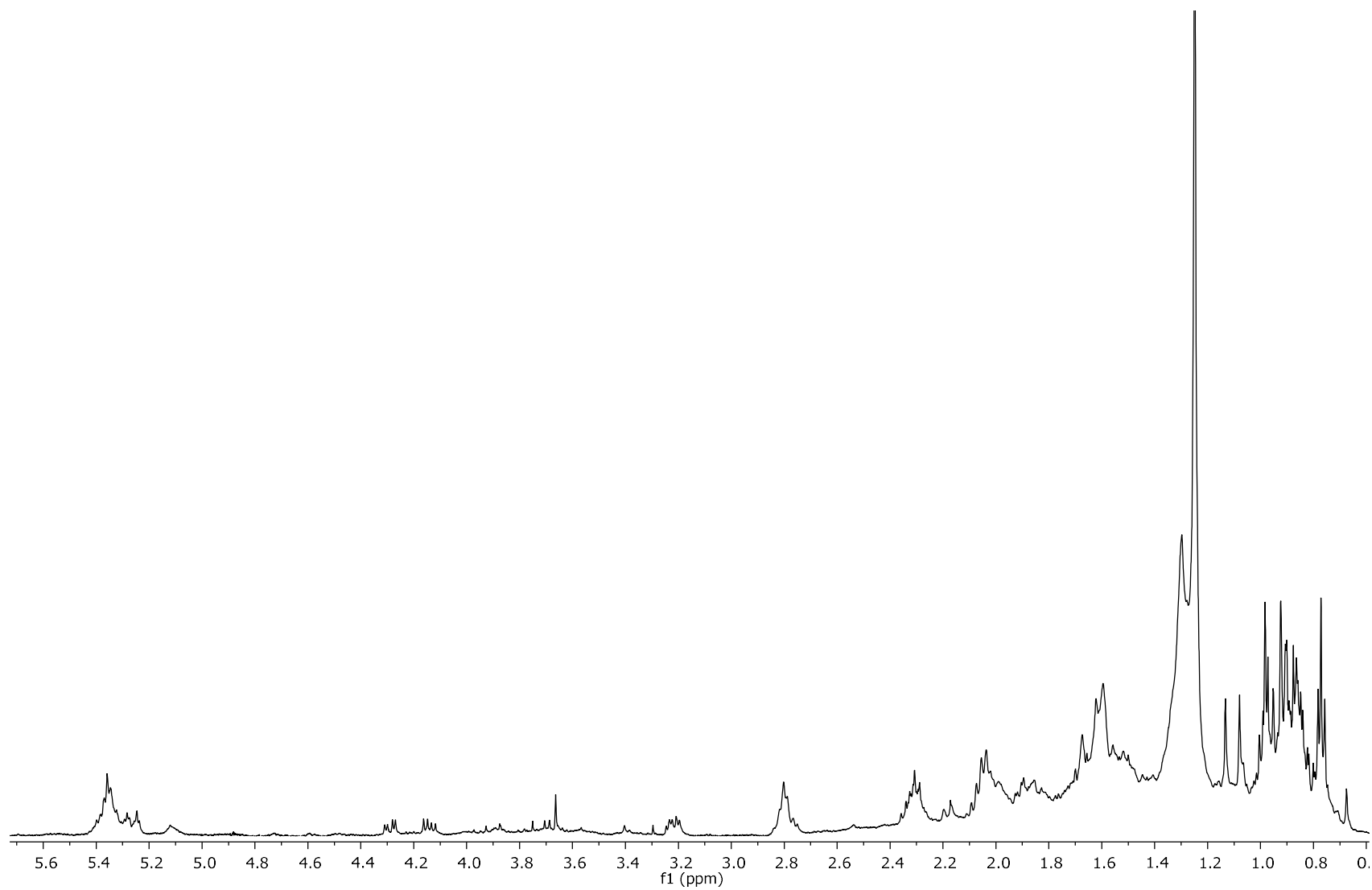
A1.5. Espectro de RMN ^1H del extracto metanólico de hojas de *S. dugesii* en CD_3OD a 400 MHz.



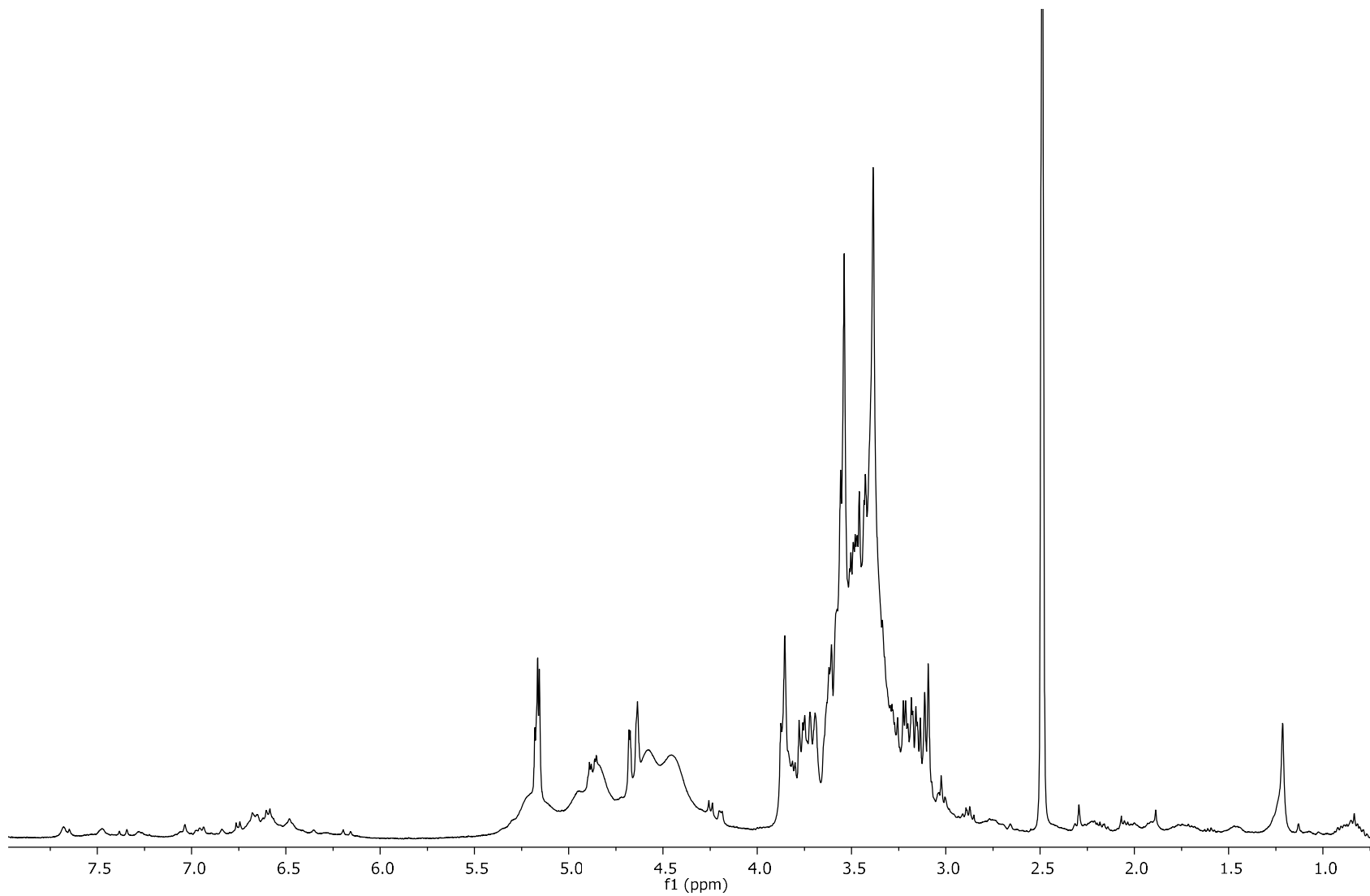
A1.6. Espectro de RMN ^1H del extracto metanólico de flores de *S. dugesii* en CD_3OD a 400 MHz.



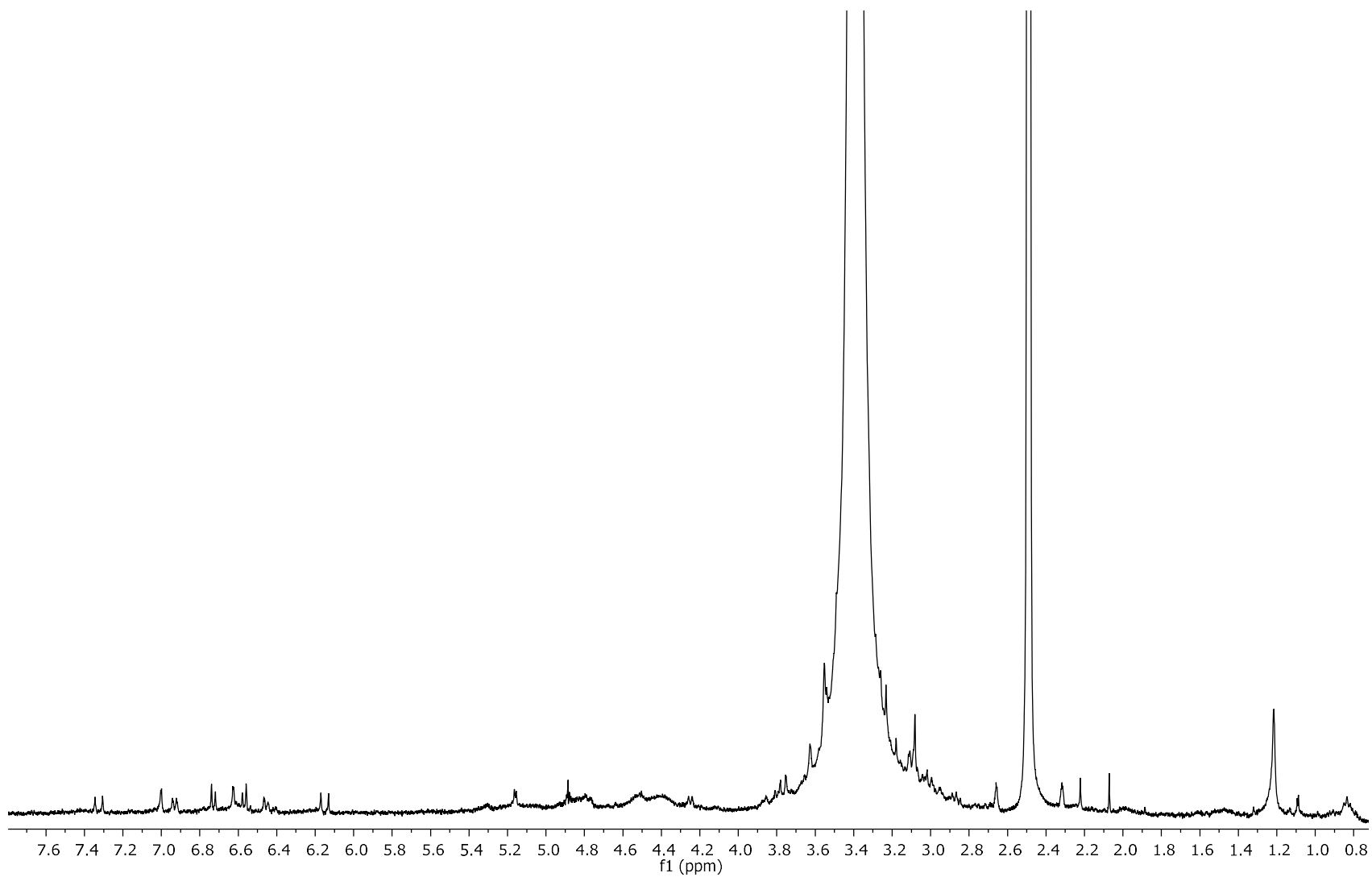
A1.7. Espectro de RMN ^1H del extracto hexánico de flores de *S. mocinoi* en CDCl_3 a 400 MHz.



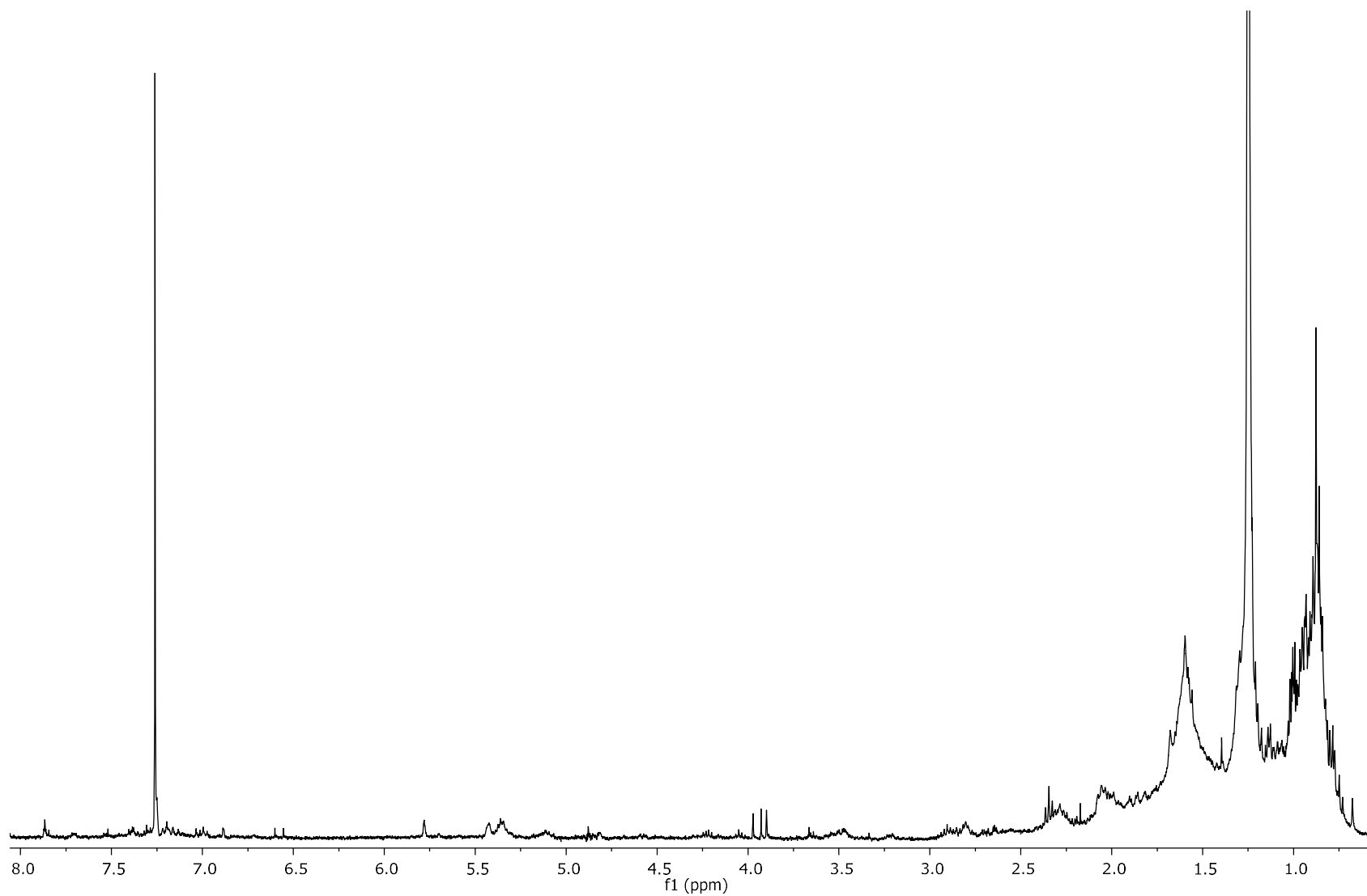
A1.8. Espectro de RMN ^1H del extracto de diclorometano de flores de *S. mocinoi* en CDCl_3 a 400 MHz.



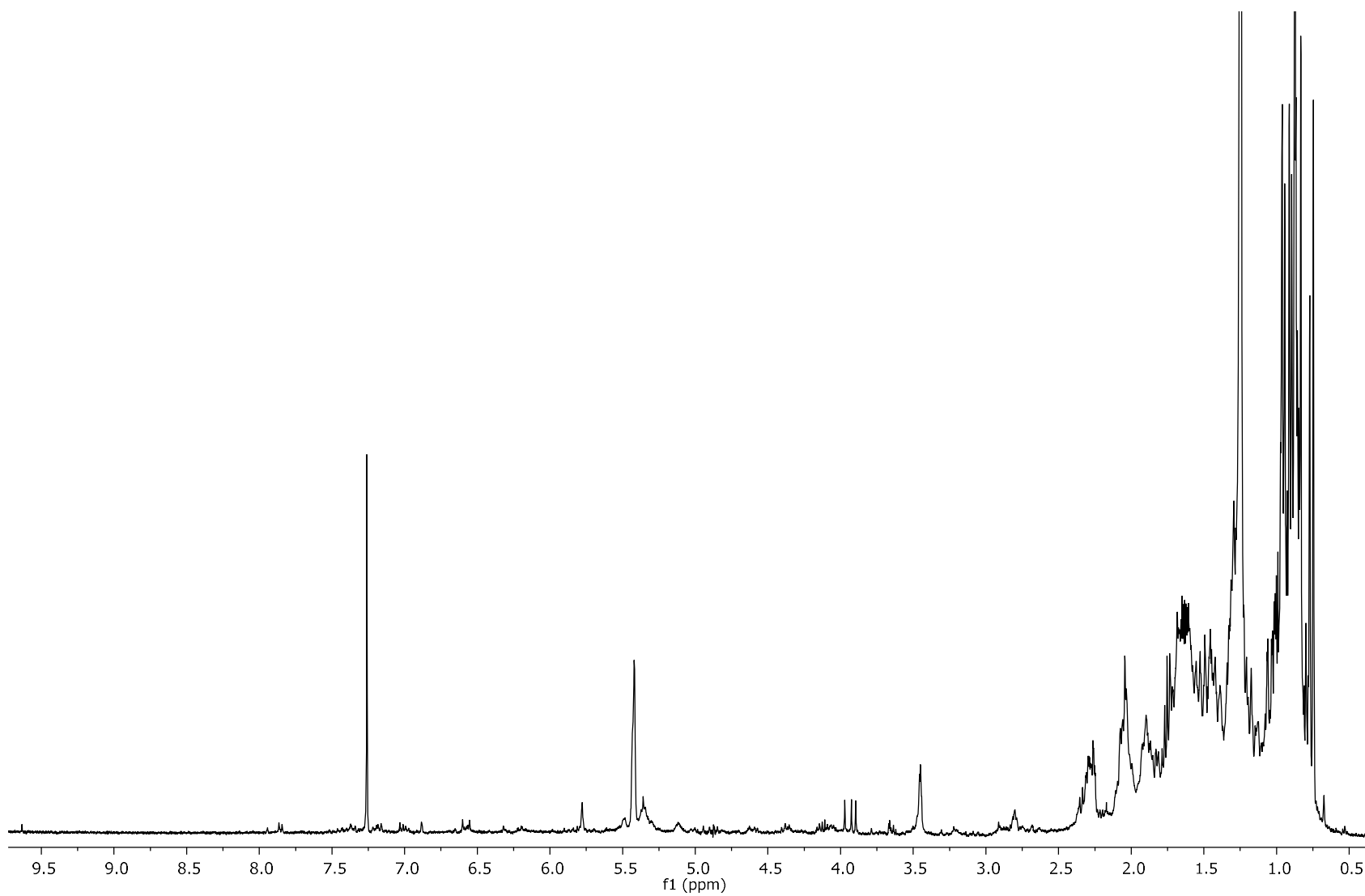
A1.9. Espectro de RMN ^1H del extracto metanólico de raíces de *S. mocinoi* en CD_3OD a 400 MHz.



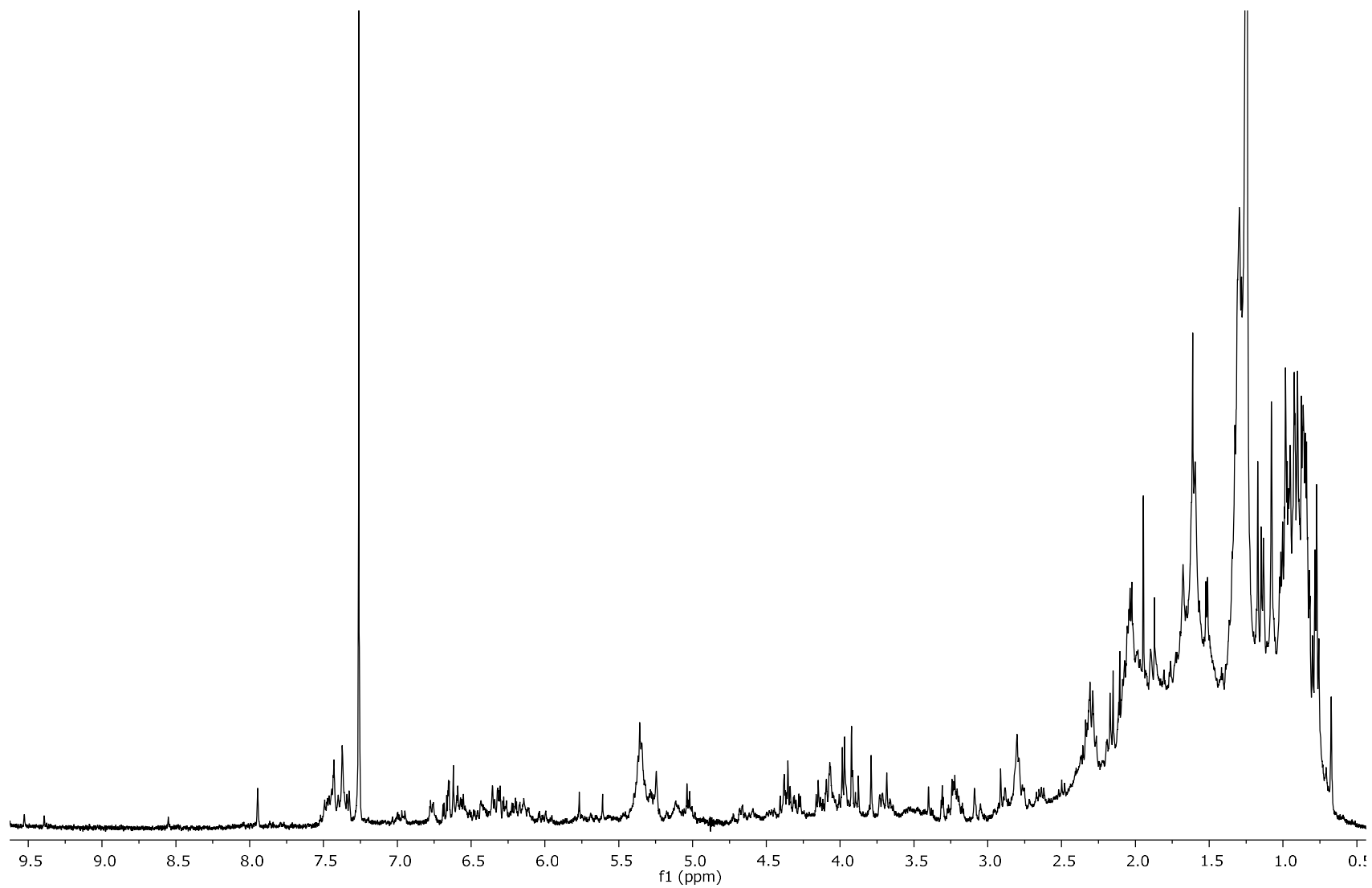
A1.10. Espectro de RMN ^1H del extracto metanólico de flores de *S. mocinoi* en CD_3OD a 400 MHz.



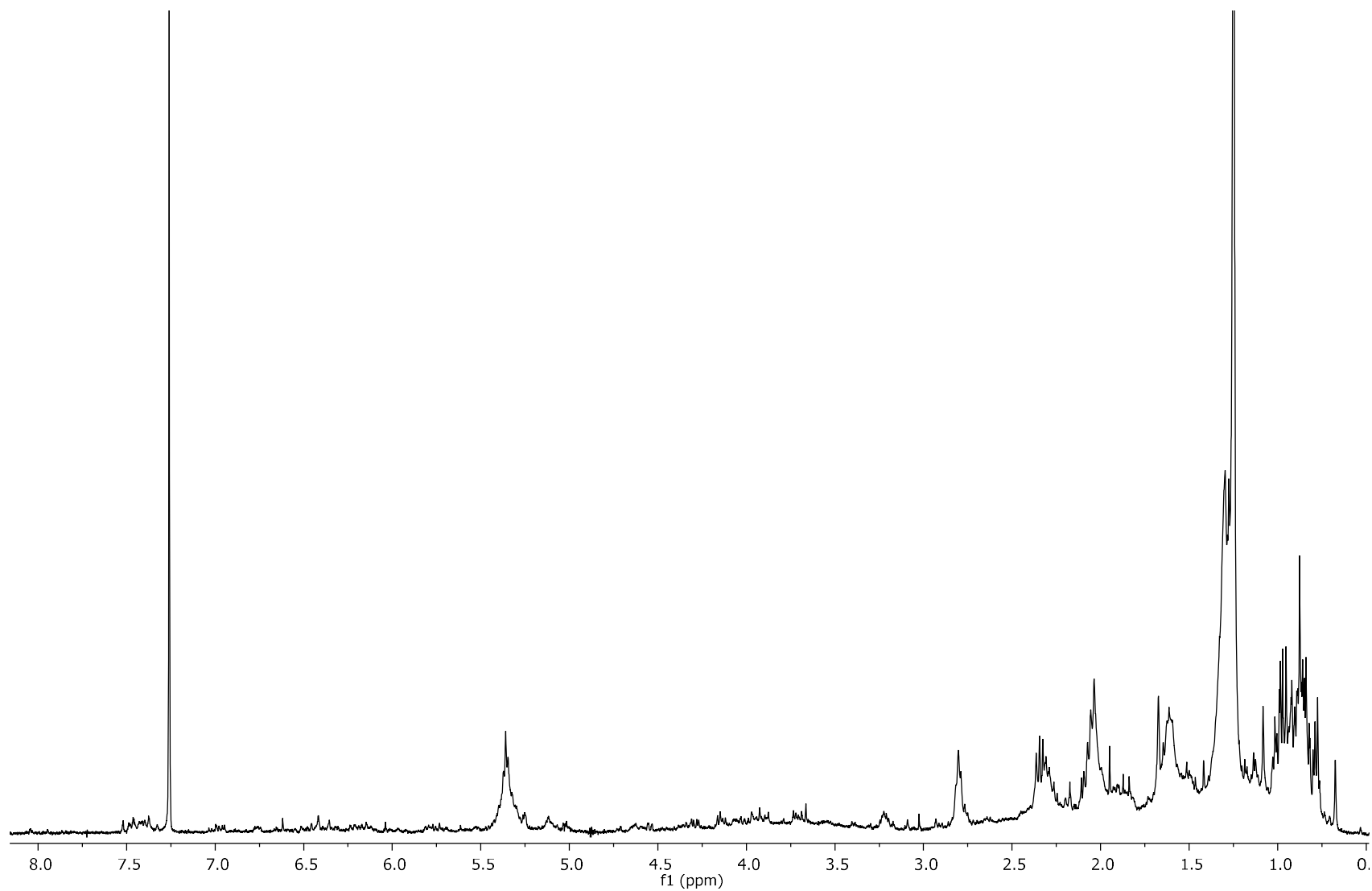
A1.11. Espectro de RMN ^1H del extracto hexánico de hojas de *S. plurispicata* en CDCl_3 a 400 MHz.



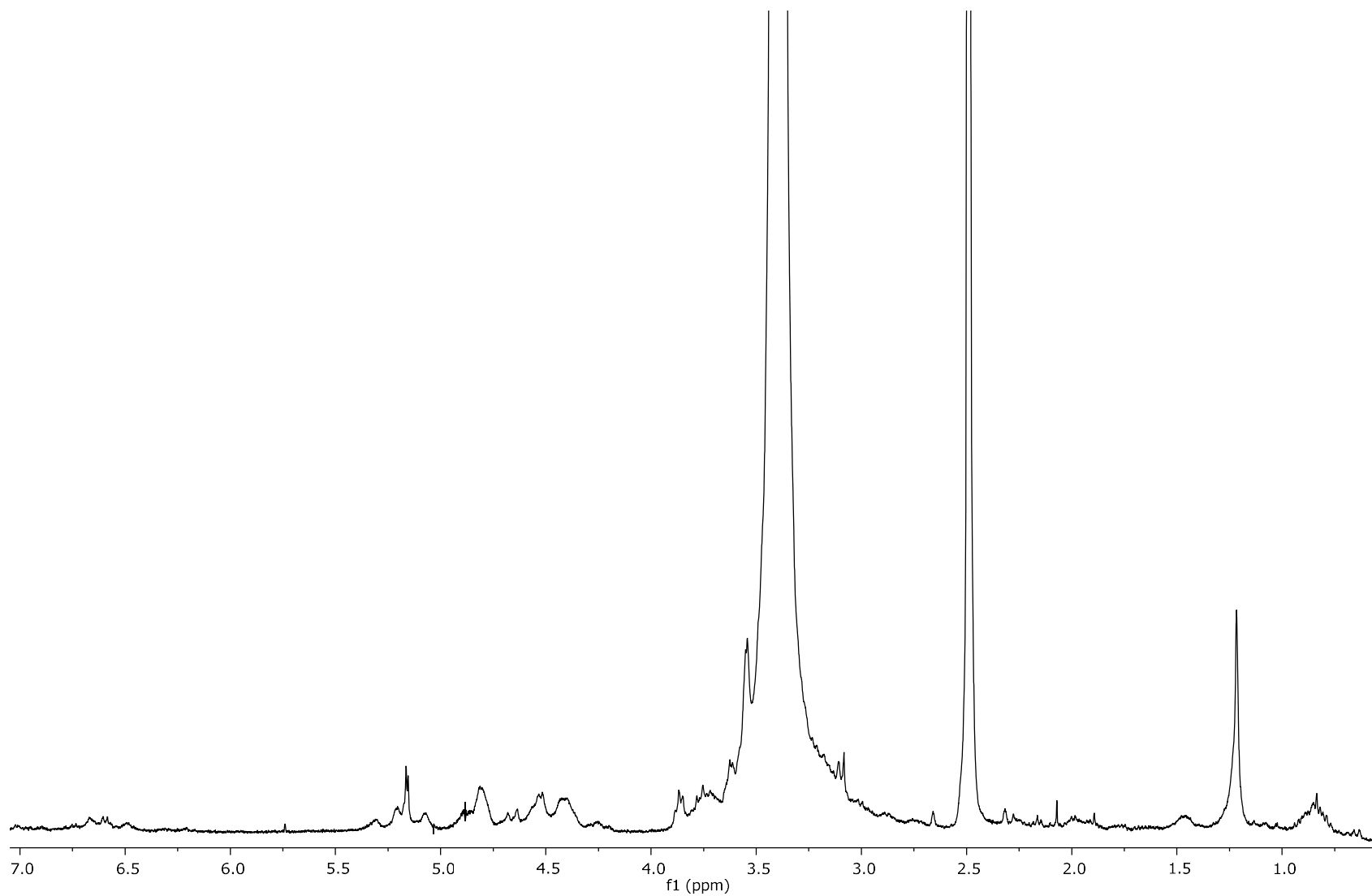
A1.12. Espectro de RMN ^1H del extracto hexánico de flores de *S. plurispicata* en CDCl_3 a 400 MHz.



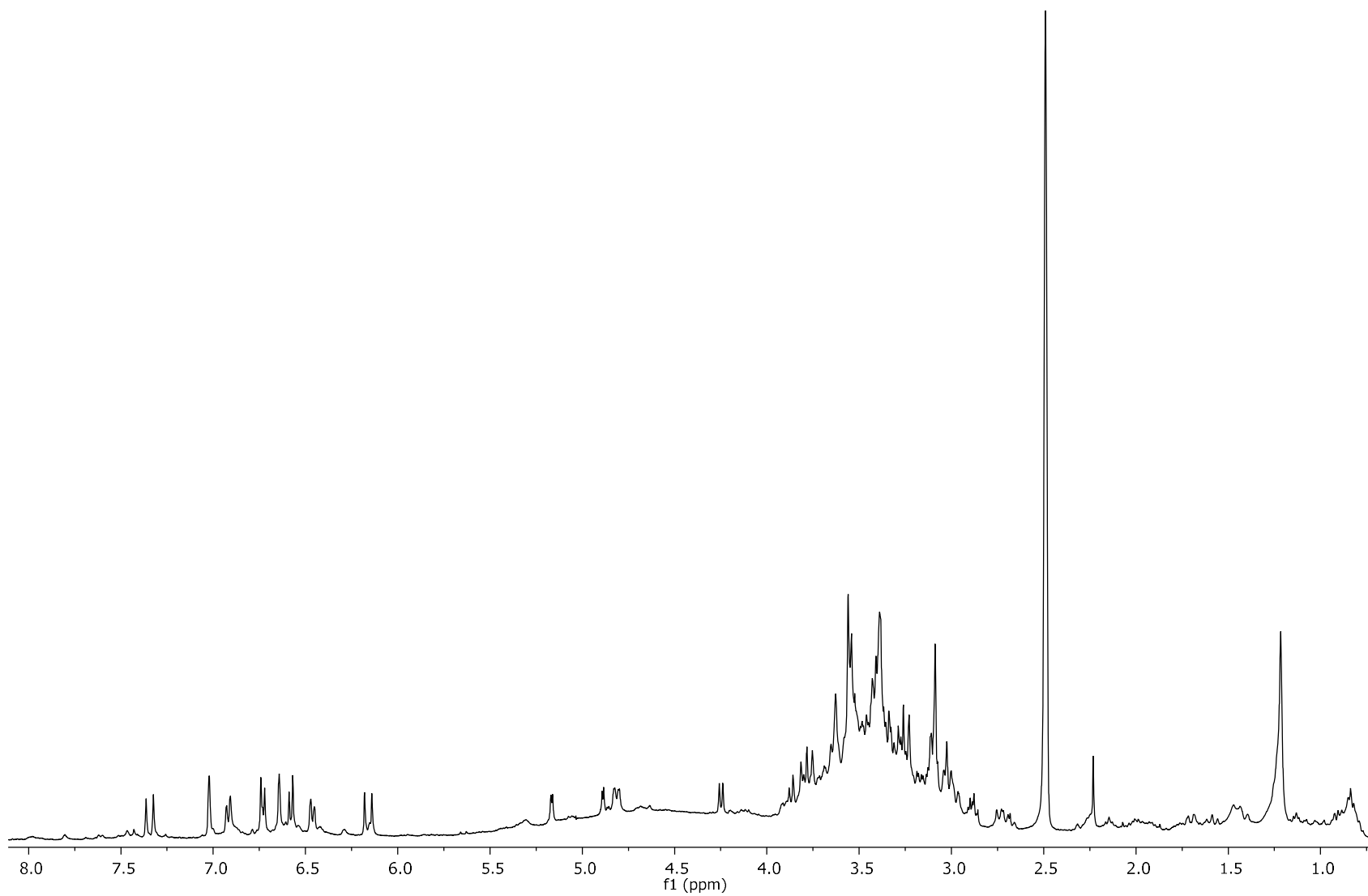
A1.13. Espectro de RMN ^1H del extracto de diclorometano de hojas de *S. plurispicata* en CDCl_3 a 400 MHz.



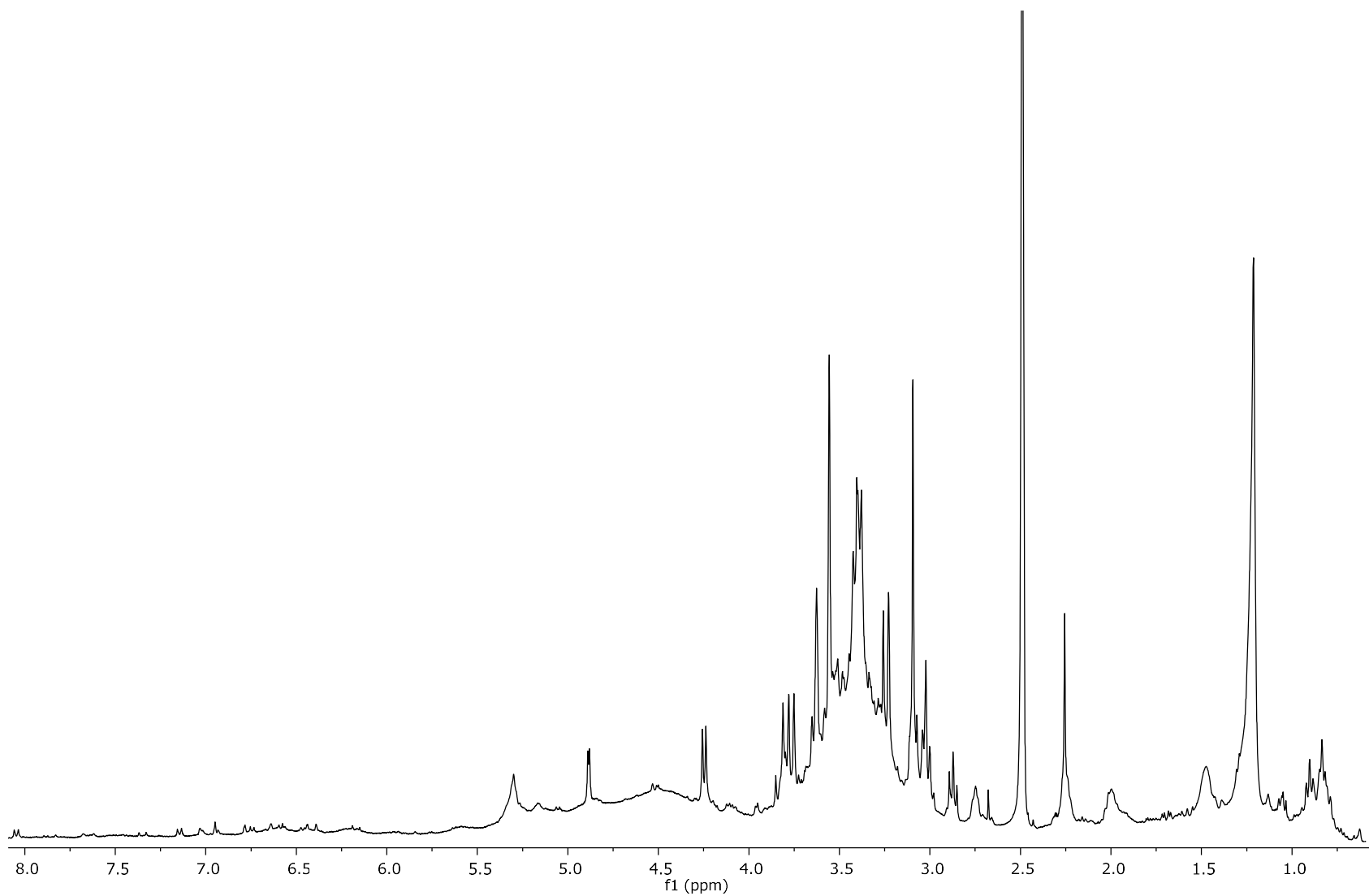
A1.14. Espectro de RMN ^1H del extracto de diclorometano de flores de *S. plurispicata* en CDCl_3 a 400 MHz.



A1.15. Espectro de RMN ^1H del extracto metanólico de raíces de *S. plurispicata* en CD_3OD a 400 MHz.

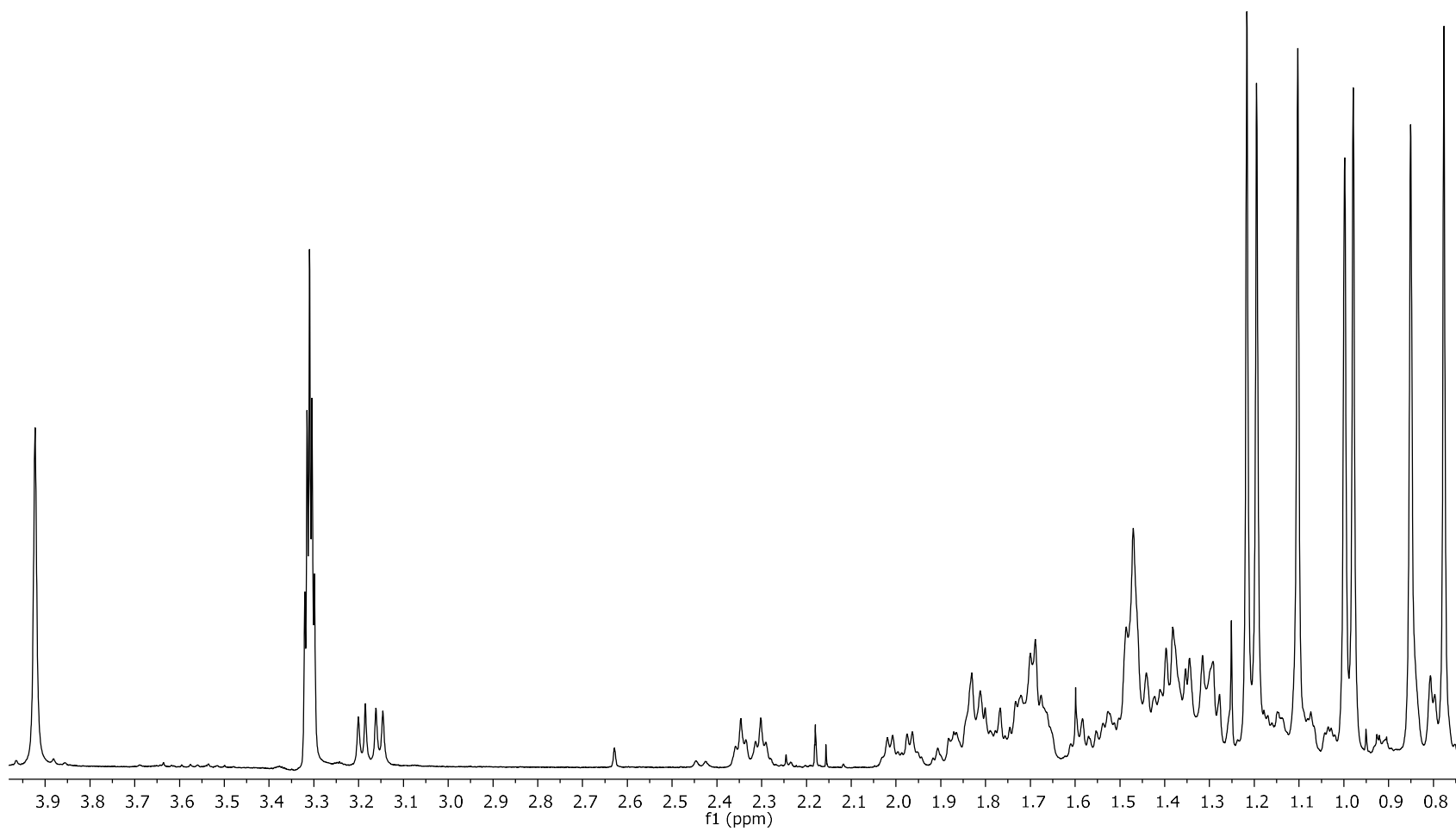


A1.16. Espectro de RMN ^1H del extracto metanólico de hojas de *S. plurispicata* en CD_3OD a 400 MHz.

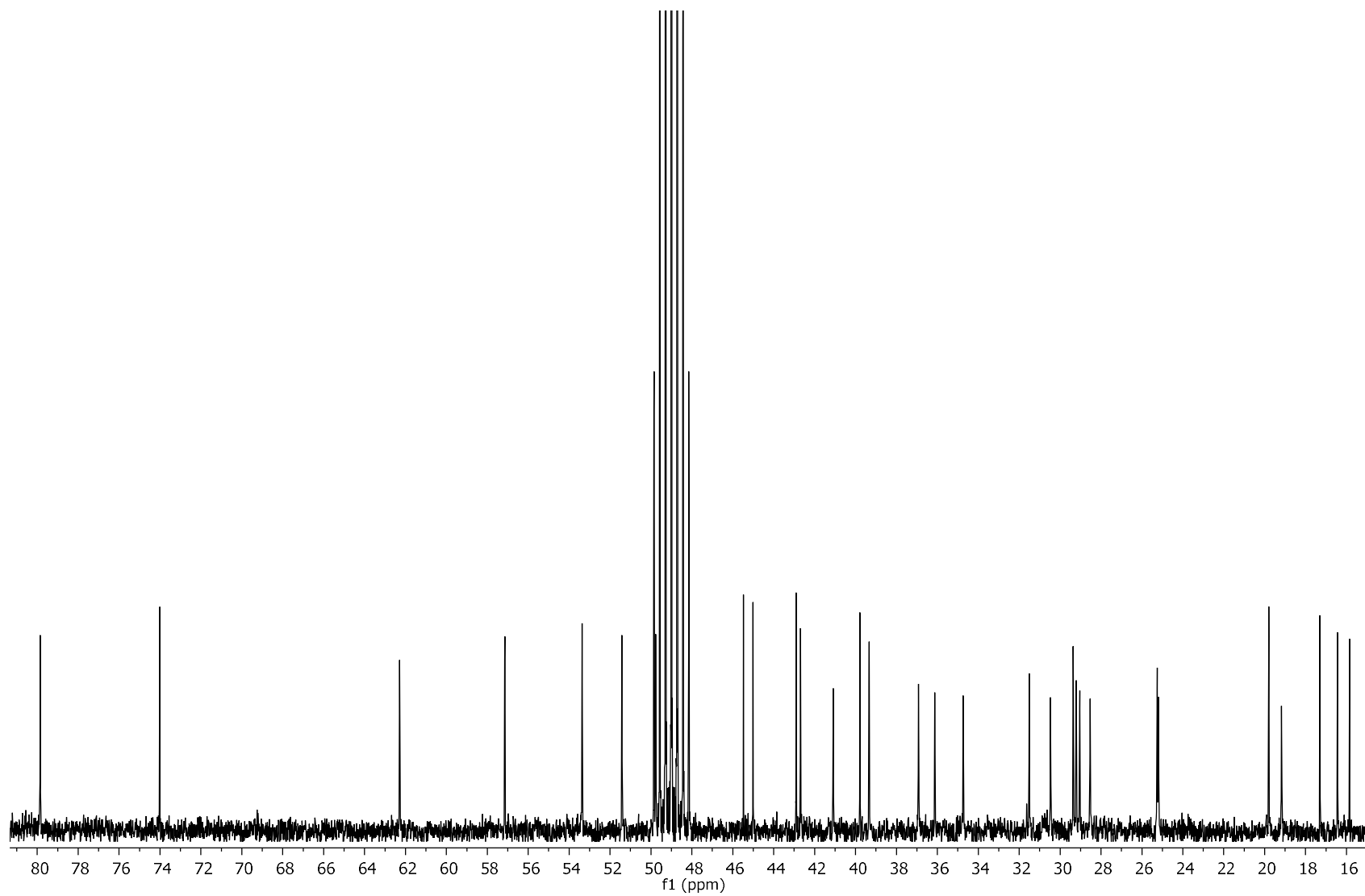


A1.17. Espectro de RMN ^1H del extracto metanólico de flores de *S. plurispicata* en CD_3OD a 400 MHz.

10. ANEXO 2



A2.1. Espectro de RMN ^1H del 3 β ,20,25-trihidroxilupano (77) en CD_3OD a 300 MHz.



A2.2. Espectro de RMN ^{13}C del $3\beta,20,25$ -trihidroxilupano (**77**) en CD_3OD a 300 MHz.