



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**
FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA



**“Terpenos del Extracto de Diclorometano de las
Hojas de *Salvia plurispicata*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA

IRVING RAÚL VÁZQUEZ CACHO

DIRECTORAS

D.C. ROSA ELVA NORMA DEL RÍO TORRES
M.C. MÓNICA ALICIA CALDERÓN OROPEZA

MORELIA, MICHOACÁN

MARZO, 2020

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Química de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la asesoría de la D.C. Rosa Elva Norma del Río Torres y la M.C. Mónica Alicia Calderón Oropeza, con apoyo económico de la CIC-UMSNH.

Dedicatoria:

*A mis abuelas, **Alicia**^t y **Guadalupe**^t por todo el amor, por los momentos que vivimos, por cada consejo y llamado de atención que me dieron; por cuidarme y siempre estar conmigo, por eso y mil razones más les dedico este trabajo. Sé que estén donde estén me siguen apoyando y cuidando como lo hicieron siempre.*

*A mis papás **Margarita** y **Raúl**, y mi hermana **Perla**, por ser mi motor, lo que me impulsa a seguir y luchar. Me enseñaron el valor del trabajo duro, a nunca rendirme ni temer. Pese a la distancia, el hablar con ustedes siempre me alegra hasta los peores días. ¡Los amo con todo mi ser!*

*A mi tía **Leticia**, mis primos **Paola** y **Alejandro**, y mis sobrinas **Sofia** y **Marlene** por todo su apoyo y enseñanzas; por ayudarme desde el principio de esta aventura y acompañarme hasta el final. ¡Muchas gracias!*

*A mi asesora, la D.C. **Rosa Elva Norma del Rjo Torres** por mostrarme un camino totalmente diferente al que había pensado, por enseñarme más de lo que alguna vez imaginé y por abrirme las puertas de su maravilloso grupo de trabajo. Le agradezco enormemente cada experiencia y consejo, porque todos ellos me han ayudado a formarme y crecer de manera tanto profesional como personal.*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a mi co-asesora M.C. **Mónica Alicia Calderón Oropeza**, porque desde el inicio de este trabajo me transmitió su conocimiento y me dio confianza cuando la necesité, además de brindarme una amistad sincera; me ha apoyado y alentado en todo momento. Sin duda alguna, este trabajo fue posible en gran parte gracias a ella. ¡Muchas gracias, Moni!

Agradezco a mi comité tutorial integrado por: D.Q. **Mario Armando Gómez Hurtado**, D.C. **Armando Talavera Alemán**, Q.F.B. **Yohana Arroyo Terán**, D.Q. **Gabriela Rodríguez García** y D.C. **Yliana López Castro** por sus correcciones y puntos de vista para enriquecer este trabajo.

De igual manera quiero agradecer al D.C. **Pedro Joseph Nathan** del departamento de Química del CINVESTAV, por su apoyo con el estímulo económico otorgado como Ayudante de Investigador.

Agradezco al Q.F.B. **José Manuel Zaragoza Ríos** del IIQB-UMSNH, por la determinación de los espectros de RMN de 1D y 2D.

Con amor, agradezco a mi hermana de otra madre **Yunuen**, porque durante todos los años que llevo de conocerte siempre me has apoyado y estado para mí tanto en las buenas pero sobre todo en las malas. Tu amistad me ha ayudado a crecer como persona y pese a la distancia sé que puedo contar contigo.

Igualmente agradezco a mi mejor amiga **Paula**, por ofrecerme esta bella amistad, por escucharme y sacarme una sonrisa en todo momento, pero sobre todo por siempre apoyarme y creer en mí. Sabes darme las palabras de aliento perfectas para seguir adelante.

Agradezco a mi segunda familia, **Ponti** y **Lupita**. Ustedes son ese tipo de amigos que se encuentran una vez en la vida, de esos a los que no ves mucho pero siempre están ahí para apoyarte en todo momento, con los que puedes reír, llorar, hablar, etc. Gracias a ustedes y sus consejos es que esto fue posible. Gracias por todo.

Agradezco a **Lupita Cázarez** por haber creído en mí y animarme en todo momento. Eres una persona maravillosa y llena de cualidades, que siempre me alienta, me escucha pero sobre todo, me impulsa. Muchas gracias por tu amistad.

A mis amigos, familiares y ex compañeros de preparatoria **Susy y Carla Pegueros, Aldo, Ian y Gael**. A cada uno de ustedes los conocí en diferentes momentos pero cada uno me ha aportado un sinfín de experiencias, consejos, felicidades, etc. Gracias por su amistad y por confiar en mí; también por estar para mí desde que decidí tomar mi camino en otra ciudad. Gran parte de lo que he logrado ha sido gracias a todos ustedes.

Con cariño a mis amigos de la Honorable y nunca olvidada sección 13, **Meztli, Katia, Kenya, Armando, Lalo, Choche, Jhovanny, Irving y Gabo**. Los primeros años de la carrera nunca hubieran sido lo mismo sin ustedes. Gracias a todos por su amistad que perdura hasta el día de hoy.

También a mis compañeros y amigos de orientación, **Montse, Diego, Chimal, Quiroz, Lupita, Erika, Dani, Ariz, Leslie y Pime**. El último año de la carrera fue de lo mejor y no habría sido igual sin ustedes. Gracias a todos por los buenos momentos que pasamos juntos y, aunque fue breve nuestro tiempo como sección, hicieron más amena mi última etapa en la facultad.

Igualmente agradezco a **Cook, Diana, Tania, Fernanda y Checo**. Todos nosotros creamos una gran amistad y agradezco el tiempo que pasamos juntos; tantas charlas, risas y diversión hicieron que los momentos que estábamos reunidos fueran algo inigualable y eso es algo que no cambiaría por nada.

Con mucho cariño a **Toño Oliveros, Odessa, Sinuhé** y el sensei **Toño Ferreira**, por haberse tomado el tiempo de explicarme, confiar en mí y ayudarme en todo momento, pero especialmente por su gran amistad. Gran parte de lo que sé ahora es debido a ustedes; muchas gracias por todos sus consejos, sabiduría y enseñanzas.

Gracias al Team Rosy: **Gaby, Dalia, Dona, Esaú, Eva, Rosy, Ernesto, Dani, Jan, Giovanni, Campo, Esther, Mitzi, Vero, Gude, Michelle, Alonso y Carlos**. Cada uno de ustedes hace que el trabajo en el laboratorio sea más agradable y especial; les agradezco también su gran amistad y compañía.

Agradezco a mis amigos **Nadia, Montse Cornelio** y **Nicolás**. En algún momento fueron mis instructores, por ello les agradezco que no sólo me transmitieron conocimiento sino que también me ofrecieron una amistad sincera, consejos y experiencias agradables.

También quiero agradecer a mis roomies y amigos médicos **Alicia, Ariana, Adi, Verania, Brayan, Joni, Cinecio, Arturo, Lobato, Cisneros** y **Navarro** por la amistad, la convivencia, pláticas y experiencias que pasamos juntos.

Por último, quiero agradecer al **Señor Carlos** y a la **Señora Juanita** por sus consejos y gestos de buena fe. Muchas gracias a ambos porque son unas personas maravillosas que siempre buscan ayudar a los demás sin recibir nada a cambio y que me han demostrado que la humildad, el trabajo duro y una sonrisa pueden ayudarte en tu camino.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	iii
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Metabolitos Secundarios.....	1
1.2. Terpenos.....	2
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Familia Lamiaceae	3
2.2. Género <i>Salvia</i>	4
2.3. Componentes Químicos de <i>Salvia</i>	5
2.4. Derivados de Productos Naturales.....	8
2.5. Derivados de los Ácidos Ursólico y Oleanólico	9
2.6. <i>Salvia plurispicata</i> Epling.....	12
3. JUSTIFICACIÓN	13
4. OBJETIVOS	14
4.1. Objetivo General.....	14
4.2. Objetivos Específicos.....	14
5. METODOLOGÍA	15
5.1. Material Vegetal.....	15
5.2. Obtención del Extracto	15
5.3. Purificación de Compuestos	15
5.4. Generalidades.....	16
5.5. Obtención de Derivados.....	16
6. RESULTADOS	18
6.1. Extracto Crudo.....	18
6.2. Purificación de Compuestos	20

6.2.1.	β -sitosterol y estigmasterol.....	20
6.2.2.	Obtención del Ácido Oleanólico	23
6.3.	Obtención del Ácido 3-formiloleanólico, obtenido a partir de 9	28
7.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	34
8.	CONCLUSIÓN	37
9.	BIBLIOGRAFÍA	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura química del isopreno.....	2
Figura 2. Distribución de la familia Lamiaceae en la República Mexicana.....	3
Figura 3. Distribución del género <i>Salvia</i> en el Estado de Michoacán.....	4
Figura 4. Componentes químicos procedentes del aceite esencial de <i>S. officinalis</i>	5
Figura 5. Componentes químicos procedentes del extracto acuoso de <i>S. officinalis</i>	5
Figura 6. Diterpenos tipo abietano.....	6
Figura 7. Estructuras de los ácidos ursólico (8) y oleanólico (9).....	6
Figura 8. Ácido melisodórico (10) obtenido de <i>S. melissodora</i>	7
Figura 9. Diterpenos procedentes de <i>S. dugesii</i>	7
Figura 10. Diterpenos de tipo clerodano de <i>S. purepecha</i>	8
Figura 11. Esquema de reacciones de acetilación del ácido oleanólico (9) y oxidación del ácido acetiloleanólico (20).....	10
Figura 12. Derivados 23 y 24 del ácido ursólico (8)	11
Figura 13. Tallos, hojas y flores de la planta <i>Salvia plurispicata</i>	12
Figura 14. Esquema de reacción de formilación de 9	17
Figura 15. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del extracto de diclorometano de hojas de <i>Salvia plurispicata</i>	19
Figura 16. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del β -sitosterol (25) y trazas de estigmasterol (26).....	21
Figura 17. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del ácido oleanólico (9).....	24
Figura 18. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 del ácido oleanólico (9).....	25
Figura 19. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del ácido 3-formiloleanólico (27)...	29

Figura 20. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 del ácido 3-formiloleanólico (27)..	30
Figura 21. Expansión del espectro COSY del ácido 3-formiloleanólico (27).....	31

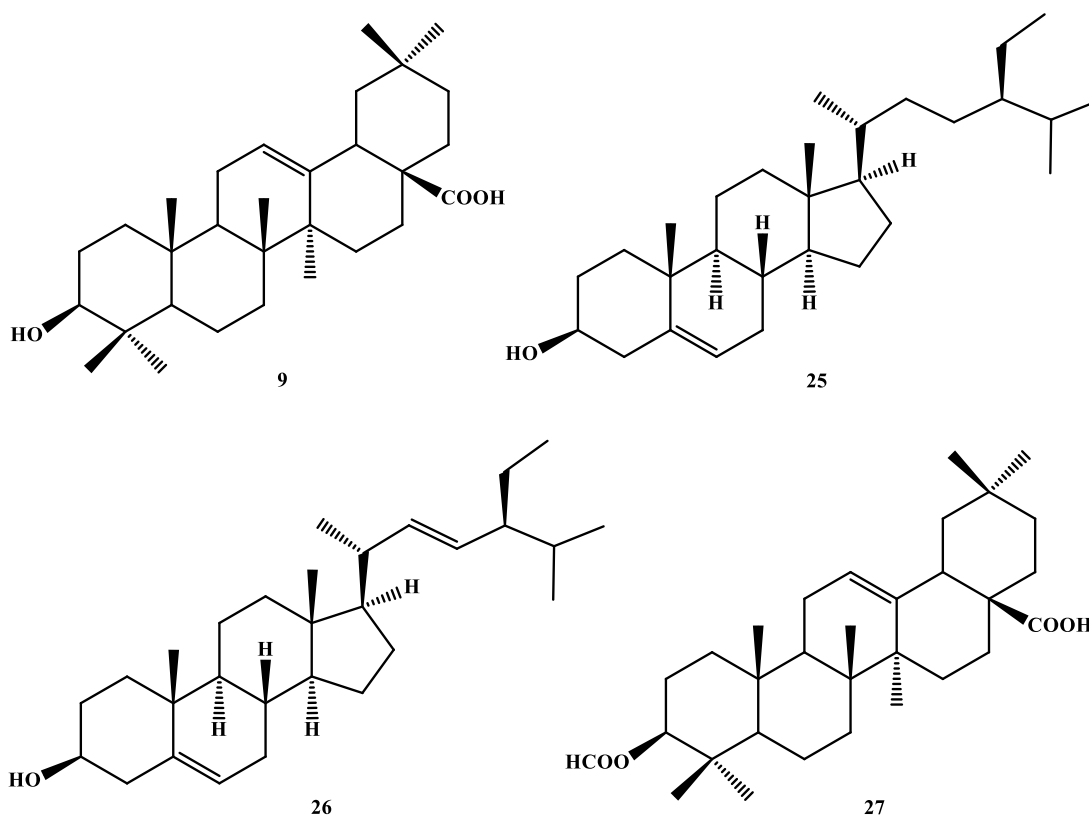
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

° C	Grados Celsius
mL	Militros
mg	Miligramos
h	Horas
m	Metros
mm	Milímetros
MHz	MegaHertz
N	Latitud
W	Longitud
g	Gramo
cm	Centímetro
δ	Desplazamiento químico
TMS	Tetrametilsilano
COSY	Correlated Spectroscopy
^1H	Hidrógeno 1
^{13}C	Carbono 13
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
AcOEt	Acetato de Etilo
Hz	Hertz
1D	Una dimensión
2D	Dos dimensiones
p.f.	Punto de fusión

RESUMEN

En el presente trabajo se describe el primer estudio químico a partir del extracto de diclorometano de las hojas de *Salvia plurispicata*, una especie perteneciente a la extensa familia Lamiaceae. Diversos estudios químicos del género nos indican que los terpenoides son un grupo de compuestos con importancia farmacológica.

El compuesto mayoritario aislado e identificado fue el ácido oleanólico (**9**), el cual fue modificado mediante una reacción de formilación, obteniendo el ácido 3-formiloleanólico (**27**). Como componente minoritario se obtuvo el β -sitosterol (**25**) con trazas de estigmasterol (**26**). Los compuestos fueron caracterizados por espectroscopia de resonancia magnética nuclear de 1D y 2D, además de ser comparados con datos reportados en la literatura.

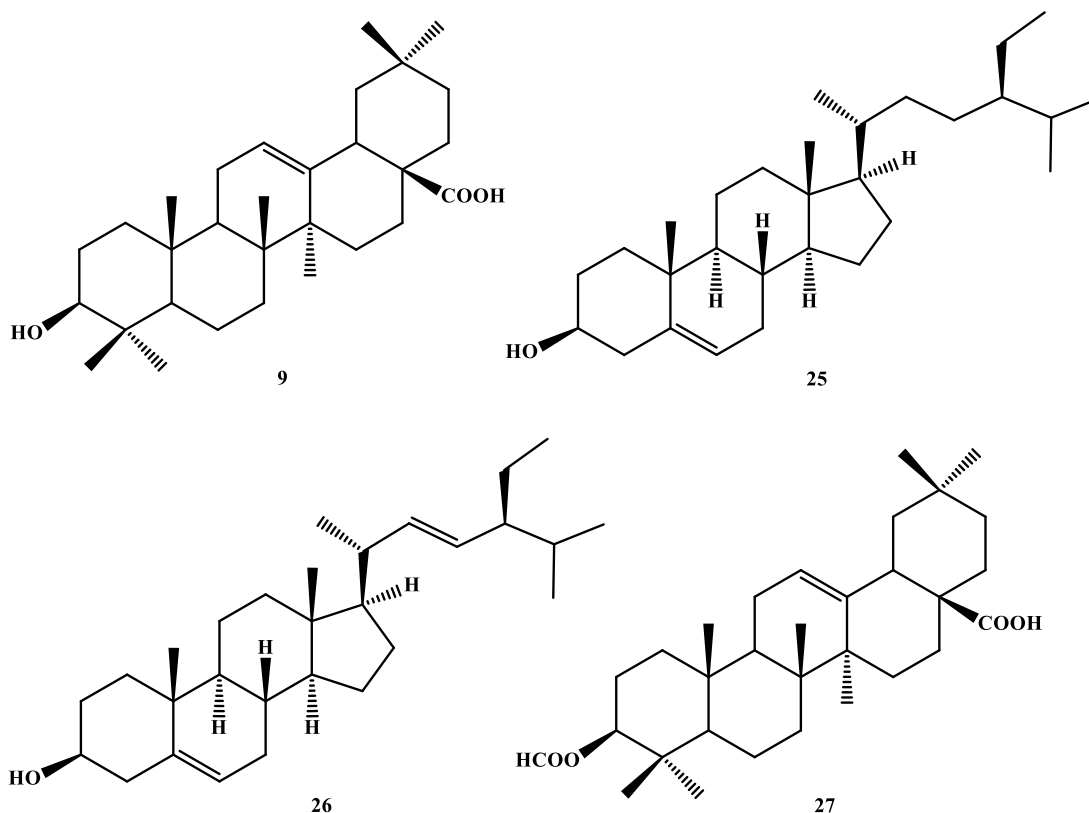


Palabras Clave: Estudio químico, Terpenos, *Salvia plurispicata*.

ABSTRACT

In the present work, describe the first chemical study from the dichloromethane extract of the leaves of *Salvia plurispicata*, a species belonging to the extensive family Lamiaceae. Various chemical studies of the genus indicate that terpenoids are a group of compounds with pharmacological importance.

The isolated and identified major compound was oleanolic acid (**9**), which was modified by a formulation reaction, obtaining 3-formyloleanolic acid (**27**). As a minor component, β -sitosterol (**25**) with traces of stigmasterol (**26**) was obtained. The compounds were characterized by 1D and 2D nuclear magnetic resonance spectroscopy, in addition to being compared with data reported in the literature.



Keywords: Chemical study, Terpenes, *Salvia plurispicata*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Metabolitos Secundarios

Un carácter típico de las plantas es la producción y el almacenamiento de mezclas complejas llamadas “metabolitos secundarios”. Debido a que estas no tienen posibilidad de escapar de sus depredadores herbívoros además de ser atacadas por microorganismos infecciosos, estos compuestos bioactivos pueden repeler, disuadir o envenenar a los herbívoros, además de inhibir el crecimiento y desarrollo de microorganismos pero, durante la evolución, los productos naturales se han optimizando al grado de poseer funciones fisiológicas y ecológicas adicionales como servir a manera de señal para atraer animales que polinizan o dispersan semillas, así como mediar ciertas interacciones simbióticas entre bacterias y hongos (Wink, 2008).

Los metabolitos secundarios han sido una fuente de agentes medicinales desde hace miles de años y un número notable de medicamentos modernos han derivado de fuentes naturales, principalmente con base en el conocimiento disponible en la medicina tradicional. Adicionalmente, estos compuestos son utilizados también como plaguicidas, saborizantes y fragancias, entre otros (Pawar, 2014; Arias *et al.*, 2009).

Durante más de 60 años los fitoquímicos se han dedicado a aislar compuestos, determinando sus estructuras mediante métodos variados como la espectrometría de masas, espectroscopia de resonancia magnética nuclear y cristalografía de rayos X. Se ha sugerido que sólo del 20 al 30% de las 350,000 especies de plantas conocidas en la actualidad han sido examinadas fitoquímicamente a detalle (Wink, 2008). Por lo tanto, el número de metabolitos secundarios reportados en el reino vegetal ha ido aumentando con el paso de los años.

Una de las principales diferencias que presentan los metabolitos secundarios con relación a los primarios es su distribución limitada en el reino vegetal; mientras que los compuestos primarios se encuentran en todo el reino y las diferencias entre especies solo son de índole cuantitativa; los metabolitos secundarios se presentan típicamente en una

especie o un grupo de plantas taxonómicamente relacionadas, por lo que se consideran marcadores taxonómicos de familias y géneros (Ramos *et al.*, 1998).

1.2. Terpenos

Pese a la gran diversidad de metabolitos secundarios, estos provienen de vías metabólicas básicas como la glucólisis, el ciclo de Krebs y la vía del ácido mevalónico. De esta última, deriva uno de los principales grupos de metabolitos secundarios llamados terpenos o isoprenoides (López-Carreras *et al.*, 2012).

Los terpenos constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios. Tienen un origen biosintético común y, aunque son estructuras químicas muy distintas, todos ellos derivan de la unión cabeza-cola de unidades de isopreno (C5) (**Fig. 1**). Por ello, los terpenos son clasificados con base en el número de unidades de isopreno que contenga su estructura. Por ejemplo, los terpenos con diez carbonos contienen dos unidades de isopreno y se les llama monoterpenos; los de 15 carbonos tienen tres unidades de isopreno y se denominan sesquiterpenos, los de 20 carbonos tienen cuatro unidades de isopreno llamados diterpenos. Los triterpenos tienen 30 carbonos, los tetraterpenos 40 carbonos y se habla de politerpenos cuando contiene más de ocho unidades de isopreno (López-Carreras *et al.*, 2012; Ávalos & Pérez, 2009).

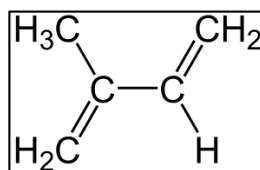


Figura 1. Estructura química del isopreno.

Este grupo incluye una gran variedad de compuestos como hormonas (giberelinas y ácido abscísico), pigmentos (carotenos y xantofilas), esteroides (ergosterol, sitosterol y colesterol) y aceites esenciales, entre otros. Por su diversidad, muchos terpenoides son de interés fisiológico y comercial, algunos son utilizados en la industria cosmética y/o alimenticia, pero otros poseen importancia medicinal (Ávalos & Pérez, 2009).

2. ANTECEDENTES

2.1. Familia Lamiaceae

La familia Lamiaceae está constituida por siete subfamilias, las cuales comprenden cerca de 300 géneros y alrededor de 7,173 especies. Posee una distribución subcosmopolita, siendo muy diversa en regiones cálidas y templadas de ambos hemisferios. Las plantas de esta familia se caracterizan por presentar hojas simples, opuestas, aromáticas y flores bilabiadas (Di-Sapio *et al.*, 2012; Ramasubramania-Raja, 2012).

En la República Mexicana, se encuentra ampliamente distribuida (**Fig. 2**) y es una de las familias más diversas sólo después de Asteraceae, Fabaceae, Orchidaceae, Poacea, Euphorbiaceae, Rubiaceae y Cactaceae; conteniendo alrededor de 601 especies reconocidas (Villaseñor, 2016).

Esta familia tiene importancia económica en varias partes del mundo, debido a que muchas de sus especies se utilizan como condimentos (*Origanum, Thymus, Mentha*), para obtener aceites esenciales (*Lavandula, Pogostemon, Salvia*) y como plantas ornamentales (*Coleus, Salvia, Scutellaria*) (Martínez-Gordillo *et al.*, 2013).



Figura 2. Distribución de la familia Lamiaceae en la República Mexicana.

2.2. Género *Salvia*

El género *Salvia* es amplio por contar con cerca de 1,000 especies distribuidas en varias regiones del mundo como en América, Europa y Asia. Las plantas son típicamente de 30 a 150 cm de alto, herbáceas y perennes, rara vez anuales y poseen flores atractivas de varios colores (Olvera-Mendoza, 2017).

Salvia, proviene del latín “*salvare*” que significa “curar”, lo que hace alusión a sus propiedades medicinales. Desde la antigüedad, sus diferentes especies eran utilizadas para aliviar diversos padecimientos que van desde dolores menstruales hasta epilepsia, además de ser utilizada para el tratamiento de resfriados, bronquitis, tuberculosis, hemorragias, entre otros (Jash *et al.*, 2016; Ulubelen, 2000).

México es una de las regiones con mayor diversidad de este género, estimando un total de 328 especies de *Salvia*, lo que la hace el género más numeroso del país (Cornejo-Tenorio & Ibarra-Manríquez, 2011; Villaseñor, 2016). La mayor diversidad del género se presenta en las zonas montañosas de México, principalmente en las del centro-sur del país, encontrándose en los boques templados, particularmente los de coníferas y encinares. El Estado de Michoacán alberga cerca de 64 especies distribuidas en todo su territorio (**Fig. 3**), de las cuales cinco son endémicas del estado, 43 son endémicas de México y 17 presentan una distribución desde el Centro hasta Sudamérica (Lara-Cabrera *et al.*, 2016).

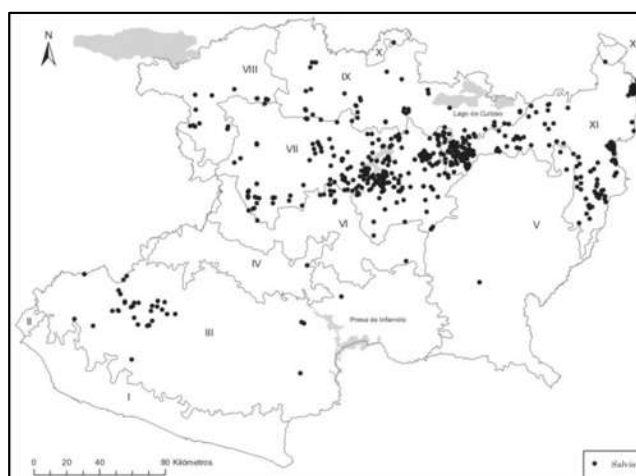


Figura 3. Distribución del género *Salvia* en el Estado de Michoacán.

2.3. Componentes Químicos de *Salvia*

Las especies de *Salvia* contienen una amplia gama de metabolitos secundarios. Las partes aéreas de estas plantas generalmente contienen flavonoides y triterpenoides, así como compuestos volátiles (monoterpenos), mientras que en las raíces, los compuestos principales son diterpenos. Sin embargo, las especies de *Salvia* de América contienen diterpenos en las partes aéreas (Ulubelen, 2000; Abdollahi-Ghehi *et al.*, 2019).

En el aceite esencial de la parte aérea de *Salvia officinalis* se han encontrado monoterpenos como el borneol (1), alcanfor (2) y el sesquiterpeno cariofileno (3) (Fig. 4) (Ghorbani & Esmailzadeh, 2017).

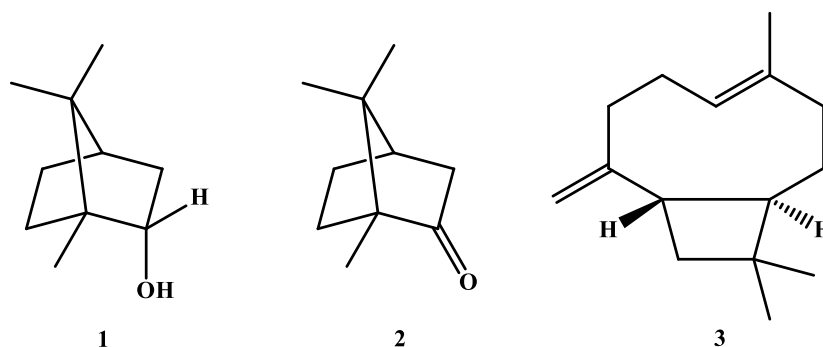


Figura 4. Componentes químicos procedentes del aceite esencial de *S. officinalis*.

Por otro lado, su extracto acuoso es rico en ácido rosmarínico (4) y flavonoides como la luteolina (5) (Fig. 5) (Ghorbani & Esmailzadeh, 2017).

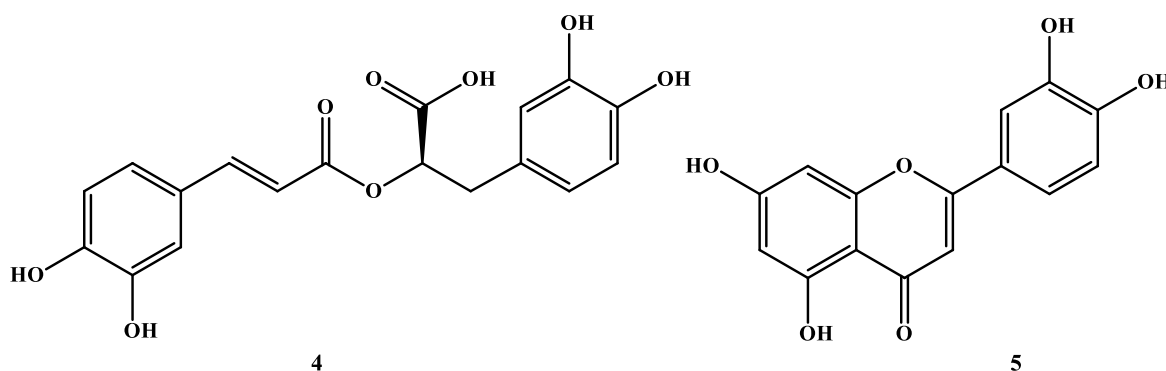


Figura 5. Componentes químicos procedentes del extracto acuoso de *S. officinalis*.

Diterpenos de tipo abietano como las hipageninas A-B (**6**, **7**) (**Fig. 6**), han sido aisladas de especies turcas de *Salvia* (*S. hypargeia*, *S. fich*, *S. mey*), con una importante actividad antibacteriana (Ulubelen, 2000).

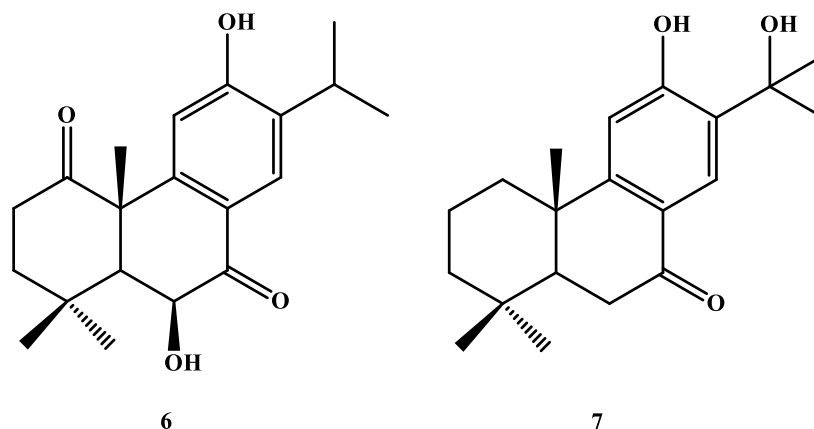


Figura 6. Diterpenos tipo abietano.

Los triterpenos pentacíclicos (**Fig. 7**) han sido aislados en casi todas las especies de *Salvia* presentando múltiples actividades biológicas. Por ejemplo, el ácido ursólico (**8**) posee actividades sedantes, antiinflamatorias, antiulcerosas y anticancerosas; mientras que el ácido oleanólico (**9**) ejerce efectos antioxidantes, antitumorales, antivirales, antialérgicos, antiinflamatorios y hepatoprotectores (Wang *et al.*, 2019; Ghorbani & Esmailizadeh, 2017).

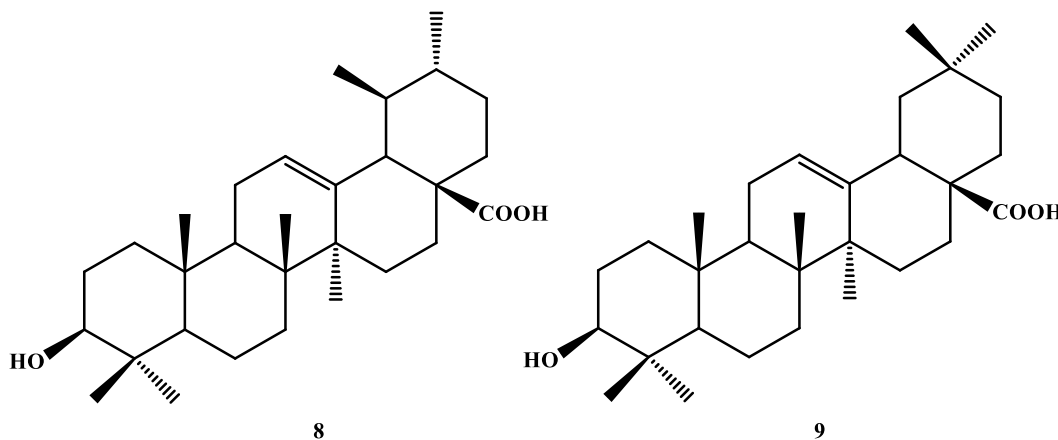
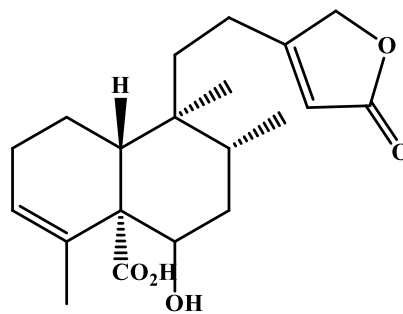


Figura 7. Estructuras de los ácidos ursólico (**8**) y oleanólico (**9**).

El ácido melisodórico (**10**) (**Fig. 8**) un diterpeno *neo*-clerodano con actividad antiepiléptica fue aislado de *Salvia melissodora*, una especie endémica de México que se encuentra desde el suroeste de Chihuahua hasta Oaxaca (Esquivel *et al.*, 1988; Olvera-Mendoza, 2017).



10

Figura 8. Ácido melisodórico (**10**) obtenido de *S. melissodora*.

De *Salvia dugesii* se obtuvieron los diterpenos de tipo clerodano dugesina C (**11**) y D (**12**) que mostraron actividades citotóxicas, antiepilépticas y antivirales (**Fig. 9**) (Xu *et al.*, 2011).

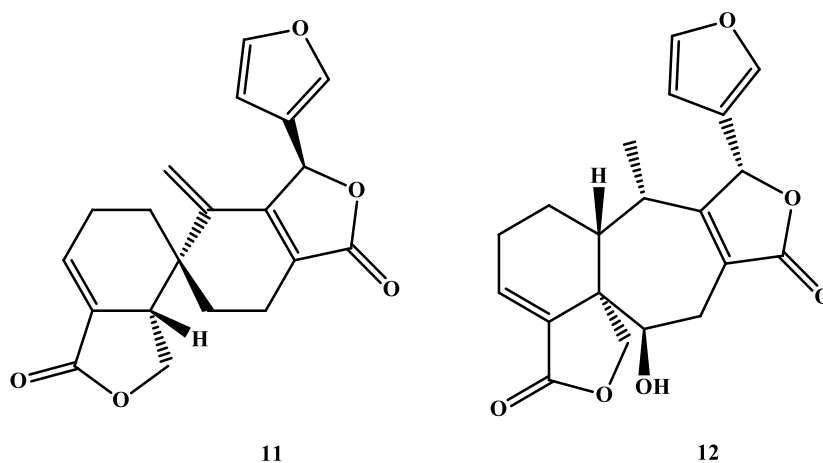


Figura 9. Diterpenos procedentes de *S. dugesii*.

En la especie michoacana *Salvia purepecha* se aislaron los diterpenos **13** a **19** (**Fig. 10**) con posible actividad antiprotozoaria, antiviral y citotóxica (Ortega *et al.*, 2017).

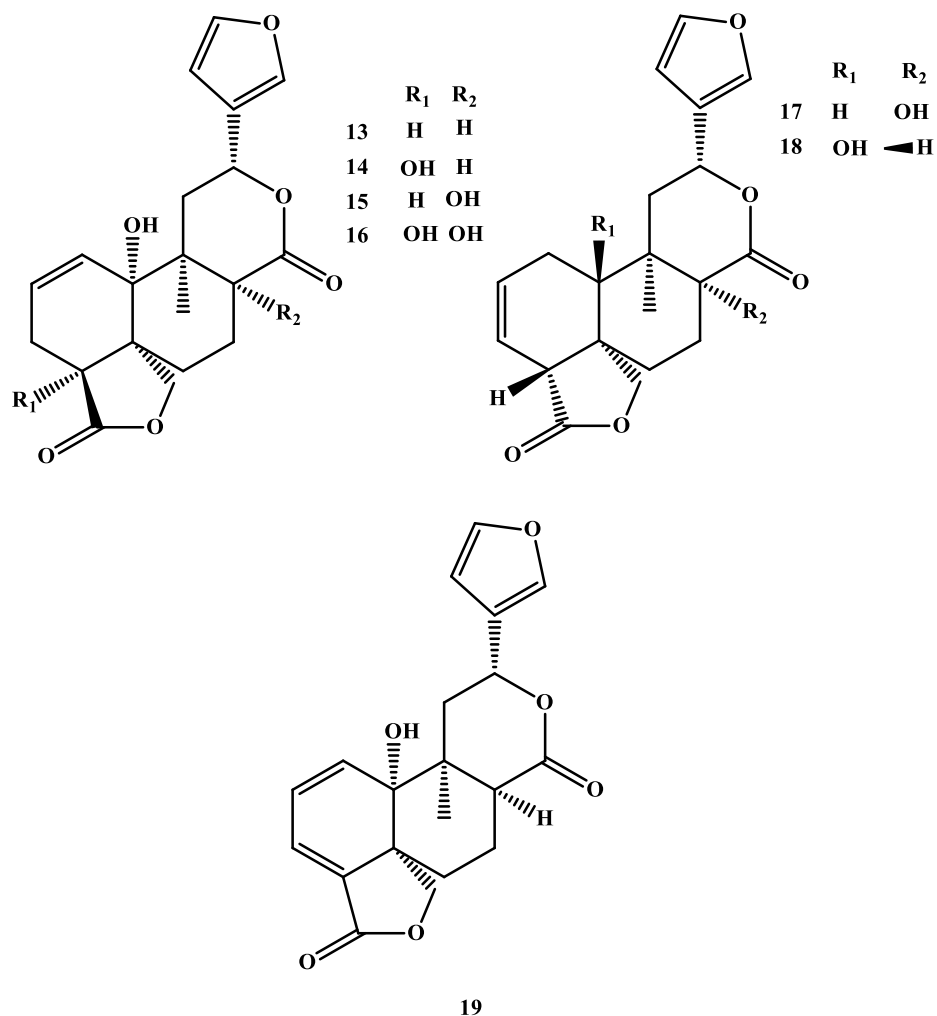


Figura 10. Diterpenos tipo clerodano procedentes de *S. purepecha*.

2.4. Derivados de Productos Naturales

Generalmente, los metabolitos secundarios poseen estructuras complejas que los hacen susceptibles a múltiples reacciones químicas, obteniendo sus derivados con el fin de mejorar su actividad biológica, ya sea incrementando su acción terapéutica o disminuyendo la toxicidad que pueda presentar; de igual manera, la modificación estructural puede proporcionarle efectos terapéuticos a los compuestos que carezcan de ellos (Días *et al.*, 2012).

2.5. Derivados de los Ácidos Ursólico y Oleanólico

Los ácidos ursólico (**8**) y oleanólico (**9**) son triterpenos pentacíclicos que poseen esqueletos de tipo ursano y oleanano, respectivamente. Las modificaciones estructurales a sus esqueletos base pueden derivar en compuestos con mejores propiedades. Los diferentes grupos funcionales que poseen van desde un grupo alcohol en la posición C-3 del anillo A, un doble enlace entre C-12 y C-13 del anillo C, un ácido carboxílico en C-17 entre los anillos D y E, lo que los hace susceptibles a diversas funcionalizaciones, sobre todo en el grupo alcohol (Cano-Flores, 2013).

Por ejemplo, en la literatura se describe el tratamiento del ácido oleanólico (**9**) aislado de la corteza del fruto de *Periploca laevigata*, el cual fue acetilado con anhídrido acético en piridina, obteniendo el ácido acetiloleanólico (**20**); este compuesto mostró una actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*. El compuesto **20** se utilizó como material de partida para la preparación de derivados. Por ejemplo, la oxidación del doble enlace C-12 y C-13, permitió la obtención de las lactonas 12 α -hidroxi- δ -lactona **21** y 12-oxo- δ -lactona **22**, a partir de una mezcla de KMnO_4 – CuSO_4 en reflujo con diclorometano durante 4 h, en presencia de una pequeña cantidad de agua y *tert*-butanol (**Fig. 11**). Ambos compuestos exhibieron actividades antibacterianas contra cepas de *Salmonella typhimurium* (Hichri *et al.*, 2003).

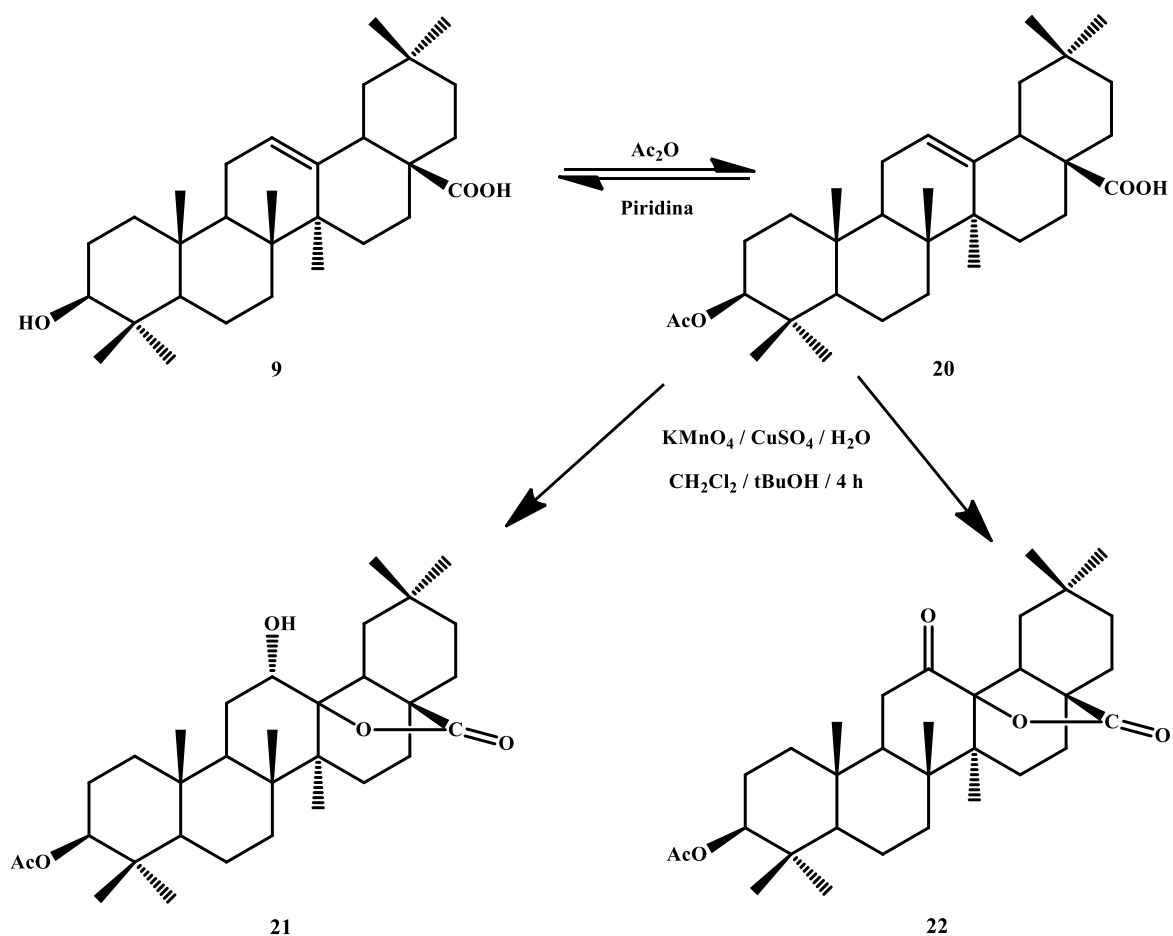


Figura 11. Esquema de reacciones de acetilación del ácido oleanólico (9) y oxidación del ácido acetiloleanólico (20).

En 2014 Nascimento y colaboradores reportaron que a partir de la acetilación del grupo hidroxilo del ácido ursólico (8), obtuvieron el ácido 3 β -acetoxi-urs-12-en-28-oico (23), mientras que del tratamiento con ácido fórmico obtuvieron el ácido 3 β -formiloxi-urs-12-en-28-oico (24) (Fig. 12); ambos mostraron actividad antibacteriana.

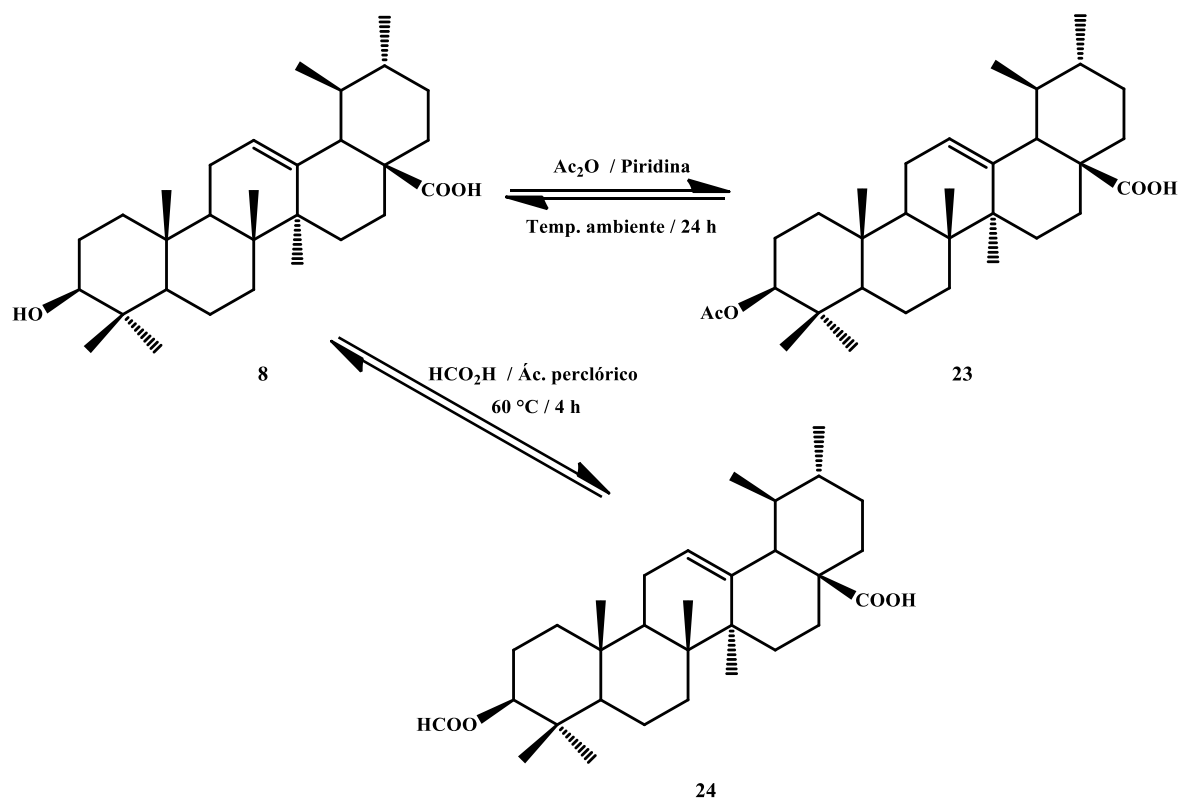


Figura 12. Derivados **23** y **24** del ácido ursólico (**8**).

El ácido oleanólico (**9**) es uno de los principales triterpenos que se ha aislado de especies del género *Salvia* (Wu *et al.*, 2012; Jash *et al.*, 2016), por ello, es posible que pueda ser encontrado en *Salvia plurispicata*, una especie que hasta la fecha no cuenta con estudios químicos.

2.6. *Salvia plurispicata* Epling

Salvia plurispicata es una planta endémica de México. Es arbustiva, perenne, de 1 a 2.5 m de alto, posee flores azul-morado, con guías de néctar y un labio inferior amplio (4 a 8 mm). Cada flor permanece abierta por 3 días en promedio.

Distribución: Michoacán y Estado de México. Floración de julio a abril (Espino-Espino *et al.*, 2014).



Figura 13. Tallos, hojas y flores de la planta *Salvia plurispicata*.

Actualmente se cuenta con información botánica y de distribución geográfica, permitiendo así un estudio químico.

3. JUSTIFICACIÓN

Las especies vegetales son una fuente importante de metabolitos secundarios que, en su mayoría, poseen efectos biológicos interesantes, lo que las convierte en una fuente potencial para el desarrollo de nuevos fármacos. Estudios previos realizados al género *Salvia* han establecido que los componentes predominantes son los terpenos; estos poseen una amplia gama de actividades biológicas, por ello se consideró el estudio químico de *Salvia plurispicata*, una especie endémica de México, con la finalidad de conocer sus componentes mayoritarios y así aportar a la quimiotaxonomía del género.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Realizar el estudio químico del extracto de diclorometano de las hojas de *Salvia plurispicata*.

4.2. Objetivos Específicos

- Obtener el extracto de diclorometano.
- Aislar y purificar los componentes mayoritarios.
- Caracterizar los compuestos aislados mediante técnicas físicas, químicas y espectroscópicas.

5. METODOLOGÍA

5.1. Material Vegetal

El material vegetal se recolectó en Los Azufres, Michoacán. Se depositaron dos ejemplares de la especie en el Herbario del Centro Regional del Bajío, Instituto de Ecología A. C. y fue identificada por la Dra. Brenda Y. Bedolla García. A continuación, se indican los datos de recolección:

Salvia plurispicata Epling

Voucher 257774. Carretera 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.*

5.2. Obtención del Extracto

Las hojas del material vegetal se separaron de sus partes aéreas, obteniendo un lote de 150 g de hojas previamente secadas a la sombra; estas fueron maceradas con hexanos durante 3 días a temperatura ambiente, y posteriormente con diclorometano. El disolvente se filtró y concentró en rotavapor. Este procedimiento se realizó tres veces.

El extracto de diclorometano se desengrasó tres veces con metanol y se llevó a sequedad. Se le realizó un estudio preliminar mediante RMN para determinar la naturaleza y abundancia de sus componentes.

5.3. Purificación de Compuestos

La purificación de los compuestos del extracto total de diclorometano desengrasado, se realizó mediante una cromatografía en columna abierta, empleando gel de sílice marca Merck de 230-400 mallas como fase estacionaria y como fase móvil, mezclas de solventes Hexanos-Acetato de etilo en orden de polaridad ascendente. Se recuperaron fracciones

gruesas de 50 mL cada una. El monitoreo de las fracciones se realizó por cromatografía en capa fina con el mismo sistema de solventes.

5.4. Generalidades

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y ^{13}C , así como los diagramas de correlación bidimensional H/H (COSY) se obtuvieron en un espectrómetro Varian Mercury Plus 400, utilizando como disolvente cloroformo deuterado (CDCl_3) y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los espectros fueron procesados en el programa MestReNova. En la descripción de señales, s: simple; d: doble; dd: doble de dobles; t: triple; m: múltiple.

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

5.5. Obtención de Derivados

A 100 mg de ácido oleanólico (**9**) se le adicionaron 4 mL de tolueno, una vez disuelto, se agregaron 2 mL de ácido fórmico y se mantuvo en reflujo a $70\text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 h (**Fig. 14**). El crudo de reacción se extrajo con diclorometano (CH_2Cl_2) y se lavó con disolución saturada de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) y agua, se filtró sobre sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4), el disolvente fue evaporado en rotavapor. La mezcla de reacción se purificó mediante cromatografía en columna, utilizando gel de sílice como fase estacionaria y mezcla Hexanos-AcOEt como fase móvil.

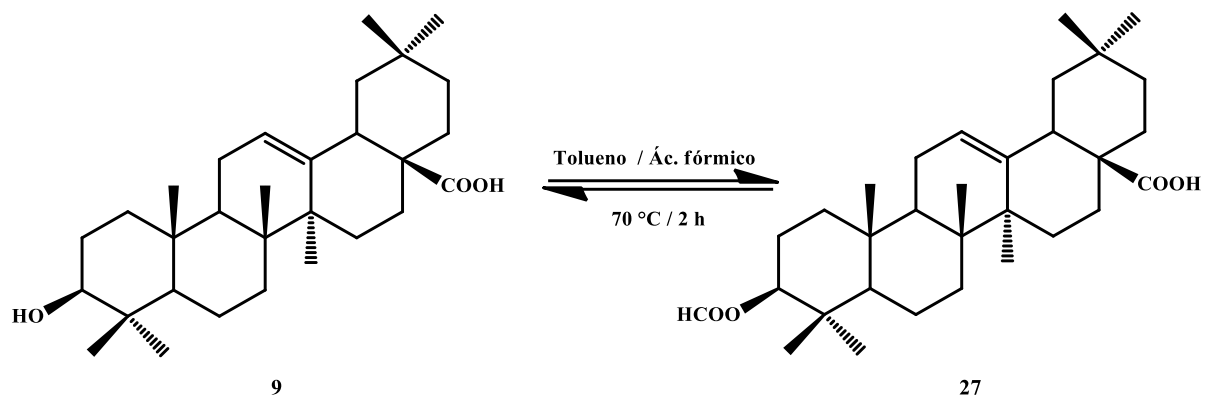


Figura 14. Esquema de reacción de formilación de **9**.

6. RESULTADOS

6.1. Extracto Crudo

El extracto de diclorometano de las hojas de *Salvia plurispicata* se analizó por RMN de ^1H (**Fig. 15**) en el cual se observan señales de protones aromáticos entre δ 7.5 a δ 6.0; de δ 5.8 a δ 5.0 se muestran señales de protones vinílicos. También se observan bases de heteroátomos en δ 4.5 a δ 3.5 y grupos alifáticos entre δ 2.0 a δ 0.5, destacando las señales de metilos característicos de esqueletos de triterpenos.

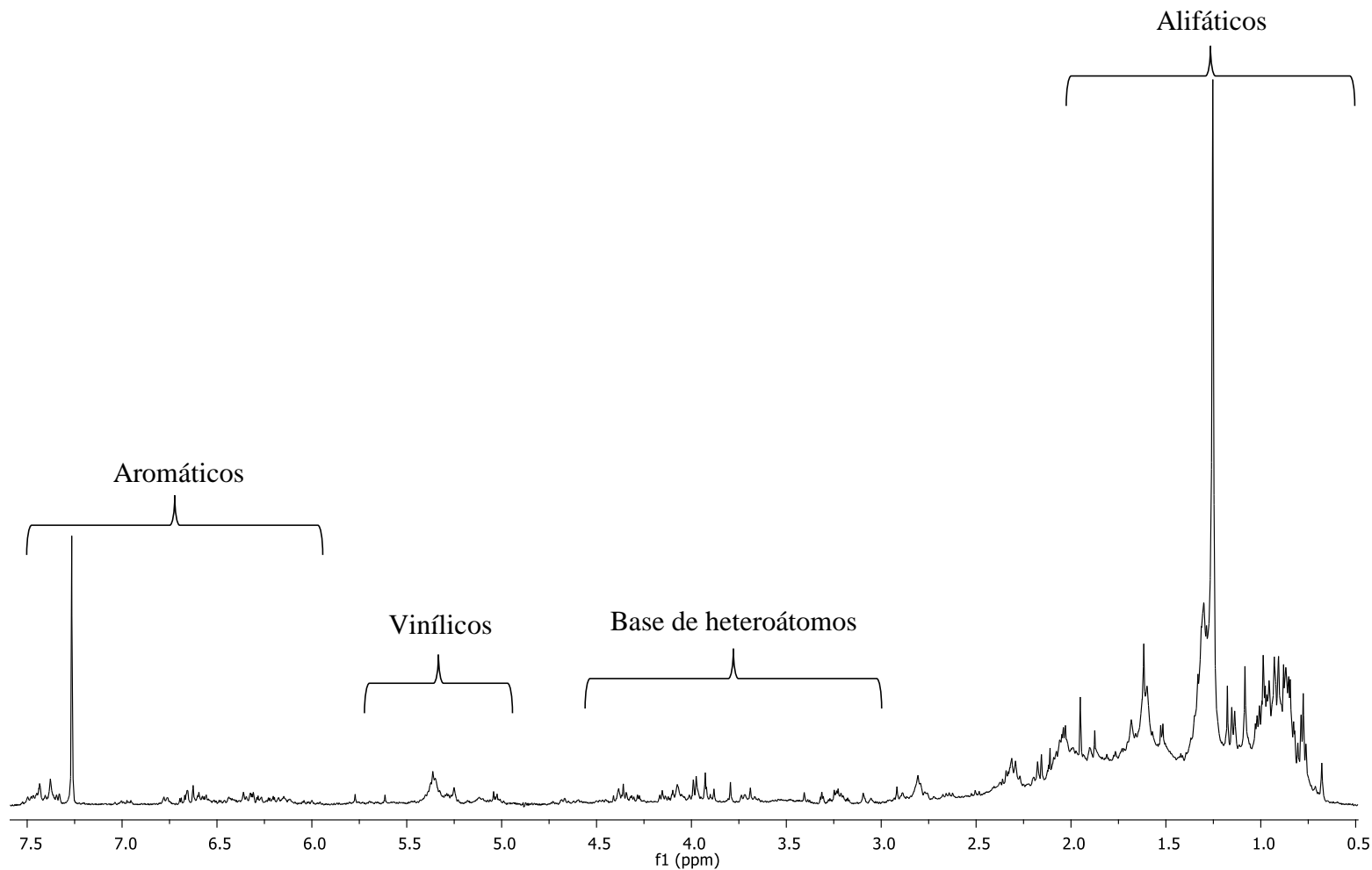


Figura 15. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del extracto de diclorometano de hojas de *Salvia plurispicata*.

6.2. Purificación de Compuestos

6.2.1. β -sitosterol y estigmasterol

De las fracciones 6-8, polaridad 13:7 Hexanos-AcOEt, se obtuvieron 0.240 g de una miel de color oscuro; dicha miel se sometió a una recromatografía de la cual se obtuvieron 88 mg de cristales translucidos en forma de agujas en las fracciones 11 a 14 en la polaridad 9:1 hexanos-AcOEt.

En el espectro de RMN de ^1H (**Fig. 16**) se muestra una señal múltiple en δ 5.35 correspondiente al hidrógeno vinílico H-6; mientras que en δ 3.53 se observa una señal múltiple que se asigna para el hidrógeno H-3 base de alcohol; estas señales son características del compuesto conocido como β -sitosterol (**25**). Las señales de los metilos se observan en δ 1.01 (CH_3 -19), 0.92 (CH_3 -21), 0.85 (CH_3 -29), 0.83 (CH_3 -27), 0.81 (CH_3 -26) y 0.68 (CH_3 -18). El resto de señales alifáticas observadas entre δ 2.4 a δ 0.6 corresponden al resto del esqueleto triterpénico. Sin embargo, en el mismo espectro se pueden notar en δ 5.15 y δ 5.01 dos señales dobles de dobles correspondientes a hidrógenos vinílicos que nos indica que existen trazas de estigmasterol (**26**).

Es importante mencionar que **25** se encuentra en proporción 16:1 respecto a **26**, por lo que fue necesario realizar un aumento en la intensidad del espectro para detectar las señales características de los hidrógenos vinílicos H-22 ($J = 15.3, 8.8$ Hz) y H-23 ($J = 15.2, 8.1$ Hz), mientras que el resto de señales de su esqueleto no son claramente visibles debido a su baja concentración y al traslape con las señales del esqueleto de **25**.

Los datos anteriores se compararon con los reportados por Nguyen *et al.*, (2004) para **25** (**Tabla 1**).

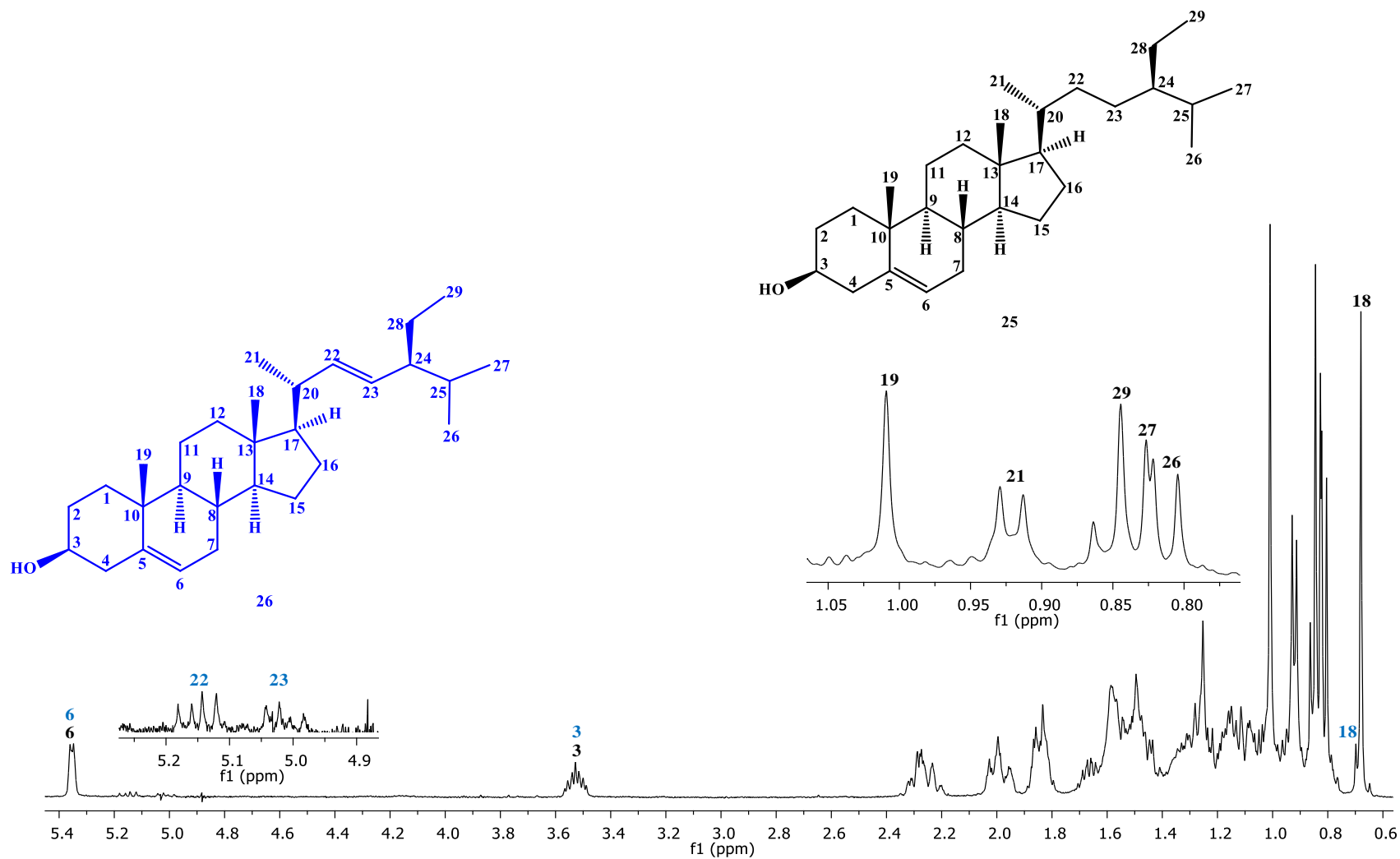
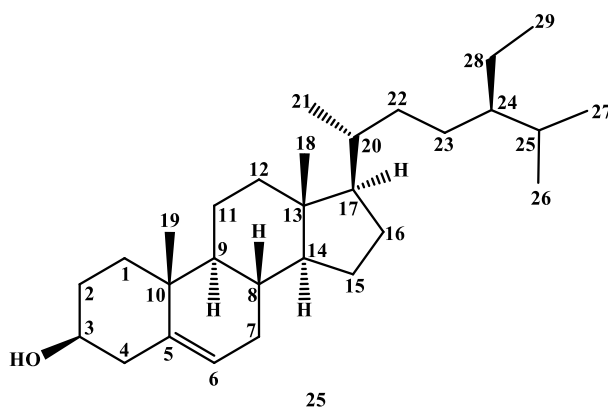


Figura 16. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del β -sitosterol (**25**) y trazas de estigmasterol (**26**).

Tabla 1. Desplazamientos químicos del β -sitosterol (**25**). RMN de ^1H a 400 MHz.

Hidrógeno	Experimental 25 en δ	Nguyen <i>et al.</i> , 2004 en δ
H-3	3.53 (1H, m)	3.53 (1H, m)
H-6	5.35 (1H, m)	5.38 (1H, m)
H-18	0.68 (3H, s)	0.68 (3H, s)
H-19	1.01 (3H, s)	1.00 (3H, s)
H-21	0.92 (3H, d, $J = 6.4$ Hz)	0.92 (3H, d, $J = 6.4$ Hz)
H-22	-	-
H-23	-	-
H-26	0.81 (3H, d, $J = 6.9$ Hz)	0.82 (3H, d, $J = 6.8$ Hz)
H-27	0.83 (3H, d, $J = 7.1$ Hz)	0.84 (3H, d, $J = 6.8$ Hz)
H-29	0.85 (3H, t, $J = 7.4$ Hz)	0.84 (3H, t, $J = 7.6$ Hz)



β -sitosterol RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5.35 (1H, m, H-6), 3.53 (1H, m, H-3), 1.01 (3H, s, CH_3 -19), 0.92 (3H, d, $J = 6.4$ Hz, CH_3 -21), 0.85 (3H, t, $J = 7.4$ Hz, CH_3 -29), 0.83 (3H, d, $J = 7.1$ Hz, CH_3 -27), 0.81 (3H, d, $J = 6.9$ Hz, CH_3 -26), 0.68 (3H, s, CH_3 -18).

6.2.2. Obtención del Ácido Oleanólico

De las fracciones 9-13, polaridad 2:3 Hexanos-AcOEt se recuperó 1 g de un compuesto impuro que por recromatografía se obtuvo un sólido amorfo color blanco con un punto de fusión de 270-273 °C.

Su espectro de RMN de ^1H (**Fig. 17**) mostró una señal triple en δ 5.28 con una $J = 3.3$ Hz correspondiente al protón olefínico H-12. En δ 3.22 con una $J = 11.1, 4.6$ Hz se observa una señal doble de dobles correspondiente al protón H-3 base de alcohol. En δ 2.82 se ubica otra señal doble de dobles con una $J = 13.8, 3.7$ Hz correspondiente al protón H-18. Por último, en frecuencias bajas se muestran siete señales simples en δ 1.13, 0.98, 0.92, 0.91, 0.90, 0.77 y 0.74, correspondientes a los metilos terciarios CH₃-27, CH₃-23, CH₃-29, CH₃-25, CH₃-30, CH₃-26 y CH₃-24, respectivamente.

Mientras que en su espectro de RMN de ^{13}C (**Fig. 18**) se observan en δ 183.5 la señal correspondiente al carbono del ácido carboxílico C-28; también se muestran dos señales de carbonos olefínicos C-13, C-12 en δ 143.7 y δ 122.8, respectivamente. En δ 79.2 vemos la señal del carbono C-3 base de alcohol. Finalmente, en δ 33.2, 28.2, 25.9, 23.7, 17.3, 15.7 y 15.4 observamos las señales corresponden a los metilos CH₃-29, CH₃-23, CH₃-27, CH₃-30, CH₃-26, CH₃-24 y CH₃-25. Las señales restantes ubicadas entre δ 55.0 y δ 15.3 corresponden a los carbonos del esqueleto del triterpeno.

Los datos espectroscópicos obtenidos fueron comparados con los descritos por Ragasa & Lim, 2005, estos se muestran en la **Tabla 2**, con gran concordancia y nos indica que se trata del ácido oleanólico (**9**).

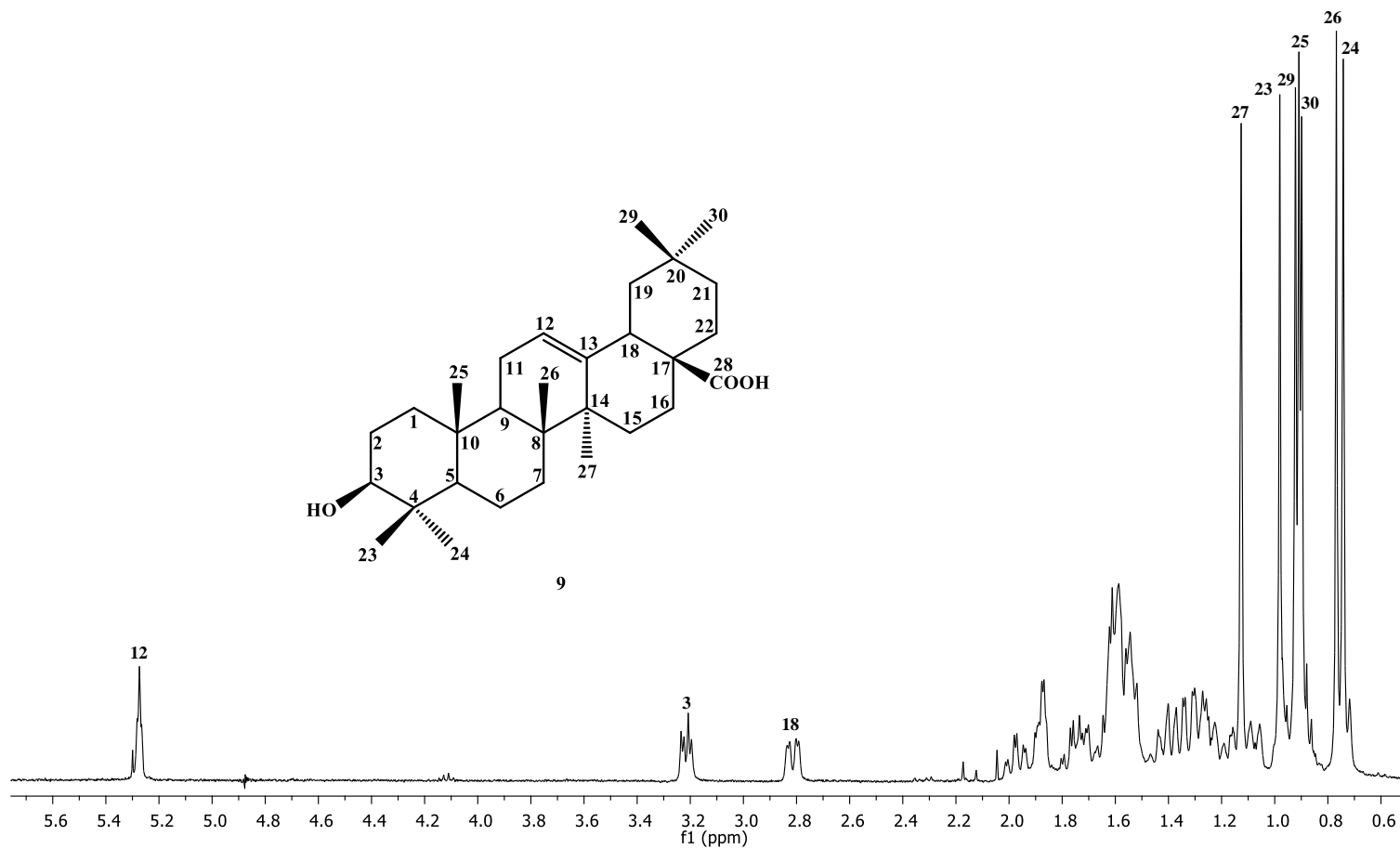


Figura 17. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz en CDCl₃ del ácido oleanólico (9).

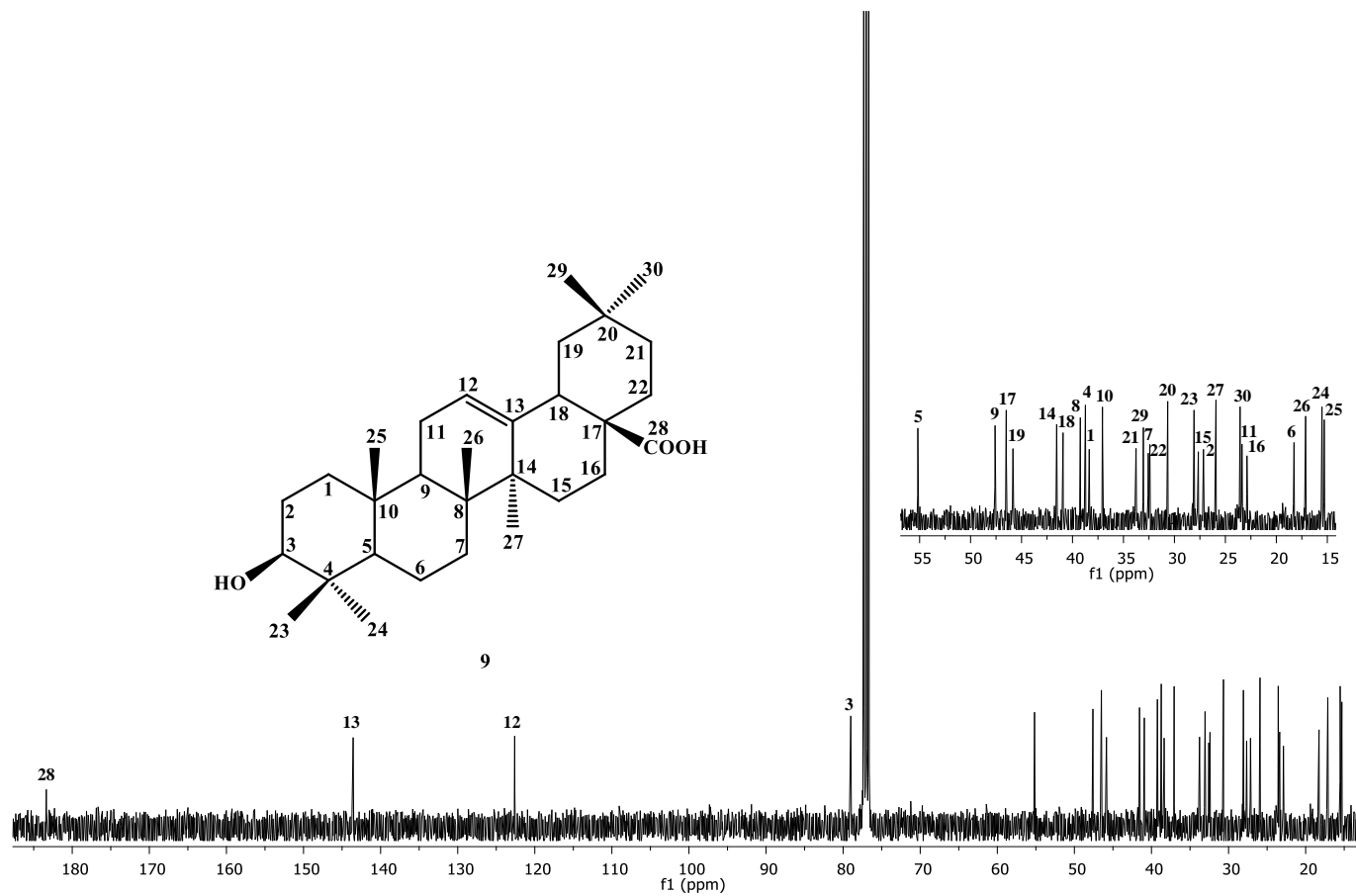
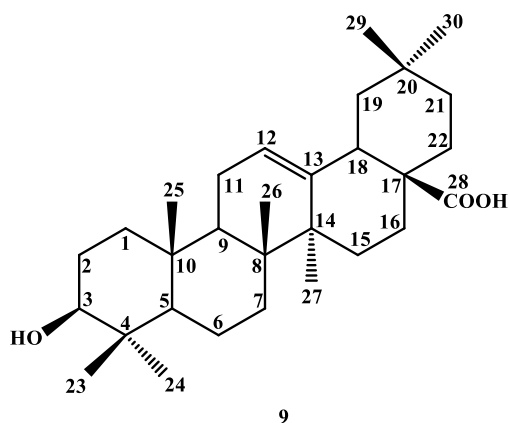


Figura 18. Espectro de RMN de ¹³C a 100 MHz en CDCl₃ del ácido oleanólico (9).

Tabla 2. Desplazamiento químico del ácido oleanólico (9). RMN de ^{13}C a 100 MHz.

Carbono	Experimental en δ	Ragasa & Lim, 2005 en δ
1	38.5	38.3
2	27.3	27.1
3	79.2	79.0
4	38.9	38.7
5	55.3	55.1
6	18.4	18.2
7	32.7	32.5
8	39.4	39.2
9	47.8	47.6
10	37.2	37.0
11	23.5	23.3
12	122.8	122.6
13	143.7	143.2
14	41.7	41.5
15	27.8	27.6
16	23.0	22.9
17	46.7	46.4
18	41.1	40.9
19	46.0	45.8
20	30.8	30.6
21	33.9	33.7
22	32.6	32.4
23	28.2	28.0
24	15.7	15.5
25	15.4	15.3
26	17.3	17.0
27	25.9	25.9
28	183.5	182.6
29	33.2	33.0
30	23.7	23.6



Punto de fusión: 270-273 °C.

Ácido Oleanólico RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 5.28 (1H, t, $J = 3.3$ Hz, H-12), 3.22 (1H, dd, $J = 11.1, 4.6$ Hz, H-3), 2.82 (1H, dd, $J = 13.8, 3.7$ Hz, H-18), 1.13 (3H, s, CH_3 -27), 0.98 (3H, s, CH_3 -23), 0.92 (3H, s, CH_3 -29), 0.91 (3H, s, CH_3 -25), 0.90 (3H, s, CH_3 -30), 0.77 (3H, s, CH_3 -26), 0.74 (3H, s, CH_3 -24).

6.3. Obtención del Ácido 3-formiloleanólico, obtenido a partir de **9**

El compuesto **9** presenta un grupo hidroxilo en la posición C-3 del anillo A, lo que lo hace susceptible a reacciones, por ello, se realizó una reacción de formilación para obtener su derivado formilado. El producto fue extraído en forma de miel amarilla que posteriormente se fraccionó por cromatografía en columna. De las fracciones 60-83 (polaridad 9:1 Hexanos-AcOEt) se obtuvieron 28 mg de un sólido blanco amorfo con un punto de fusión de 183-186 °C.

En su espectro de RMN de ^1H (**Fig. 19**) encontramos una señal simple y alta en δ 8.11 correspondiente al H-31 del grupo formilo; en δ 5.27 con una $J = 3.4$ Hz observamos una señal triple correspondiente al protón vinílico H-12. En δ 4.62 con una $J = 7.5$ Hz se observa una señal triple correspondiente al protón H-3 base de formilo. En δ 2.82 se ubica una señal doble de dobles con una $J = 13.5, 3.4$ Hz correspondiente al protón H-18. Mientras que en frecuencias bajas se observaron siete señales simples en δ 1.13, 0.94, 0.92, 0.90, 0.89, 0.86 y 0.74, correspondientes a los metilos CH₃-27, CH₃-23, CH₃-29, CH₃-25, CH₃-30, CH₃-26 y CH₃-24, respectivamente.

El espectro de RMN de ^{13}C (**Fig. 20**) muestra en δ 184.2 la señal C-28 correspondiente al carbono del ácido carboxílico; en δ 161.1 la señal del C-31 correspondiente al carbono del formilo. También se muestran dos señales de carbonos vinílicos C-13, C-12 en δ 143.5 y δ 122.4, respectivamente. En δ 81.0 vemos la señal del carbono C-3 base de formilo. Finalmente, en δ 33.0, 29.6, 25.8, 23.6, 18.1, 17.0 y 15.3 observamos las señales corresponden a los metilos CH₃-29, CH₃-23, CH₃-27, CH₃-30, CH₃-26, CH₃-24 y CH₃-25. Las señales restantes ubicadas entre δ 55.0 y δ 15.3 corresponden a los carbonos del esqueleto del ácido 3-formiloleanólico (**27**).

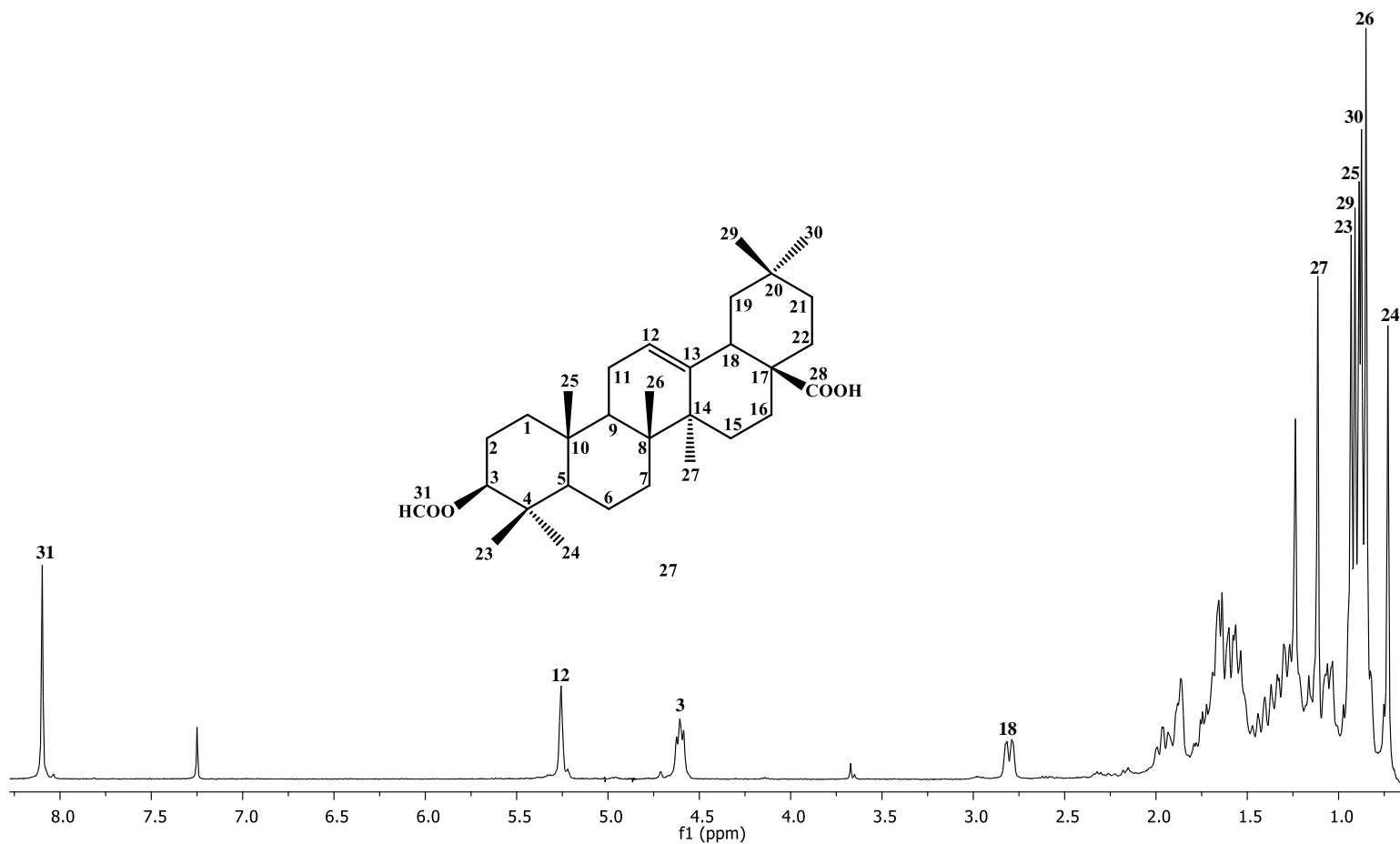


Figura 19. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz en CDCl₃ del ácido 3-formiloleanólico (27).

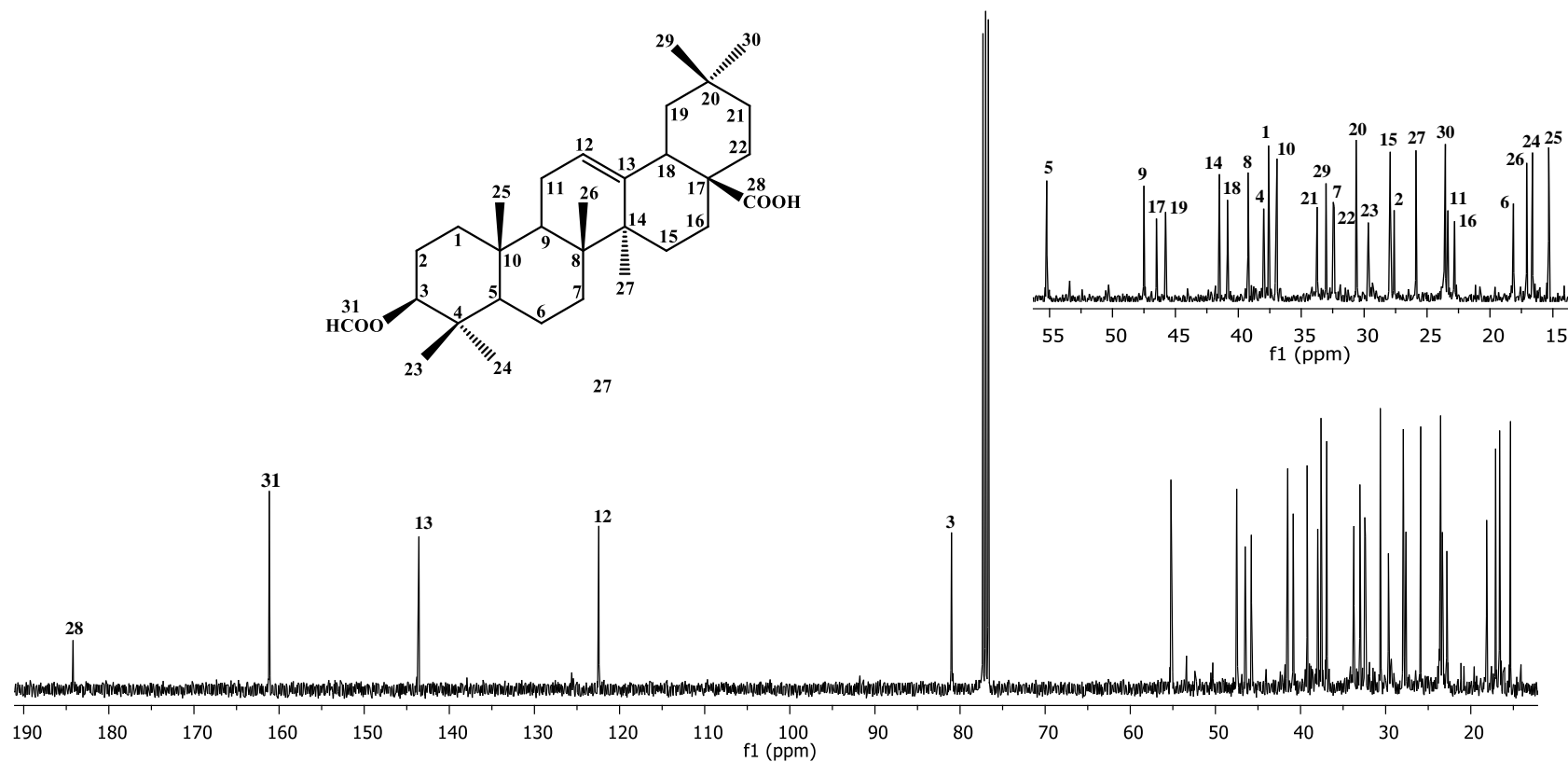


Figura 20. Espectro de RMN de ¹³C a 100 MHz en CDCl₃ del ácido 3-formiloleanólico (27).

Para confirmar la asignación del espectro de RMN de ^1H se llevó a cabo un experimento COSY (**Fig. 21**) donde se muestra una correlación del hidrógeno base de formilo H-3 con señales en δ 1.68 y δ 1.05 correspondientes a los hidrógenos del metileno CH_2 -2. También se correlaciona la señal triple con $J = 8.4$ Hz del hidrógeno vinílico H-12 con uno de los protones vecinos del metileno CH_2 -11 en δ 1.87. La señal doble de dobles del protón H-18 con $J = 4.8, 4.4$ Hz se correlaciona con las señales en δ 1.63 y δ 1.16 de los hidrógenos del metileno CH_2 -19.

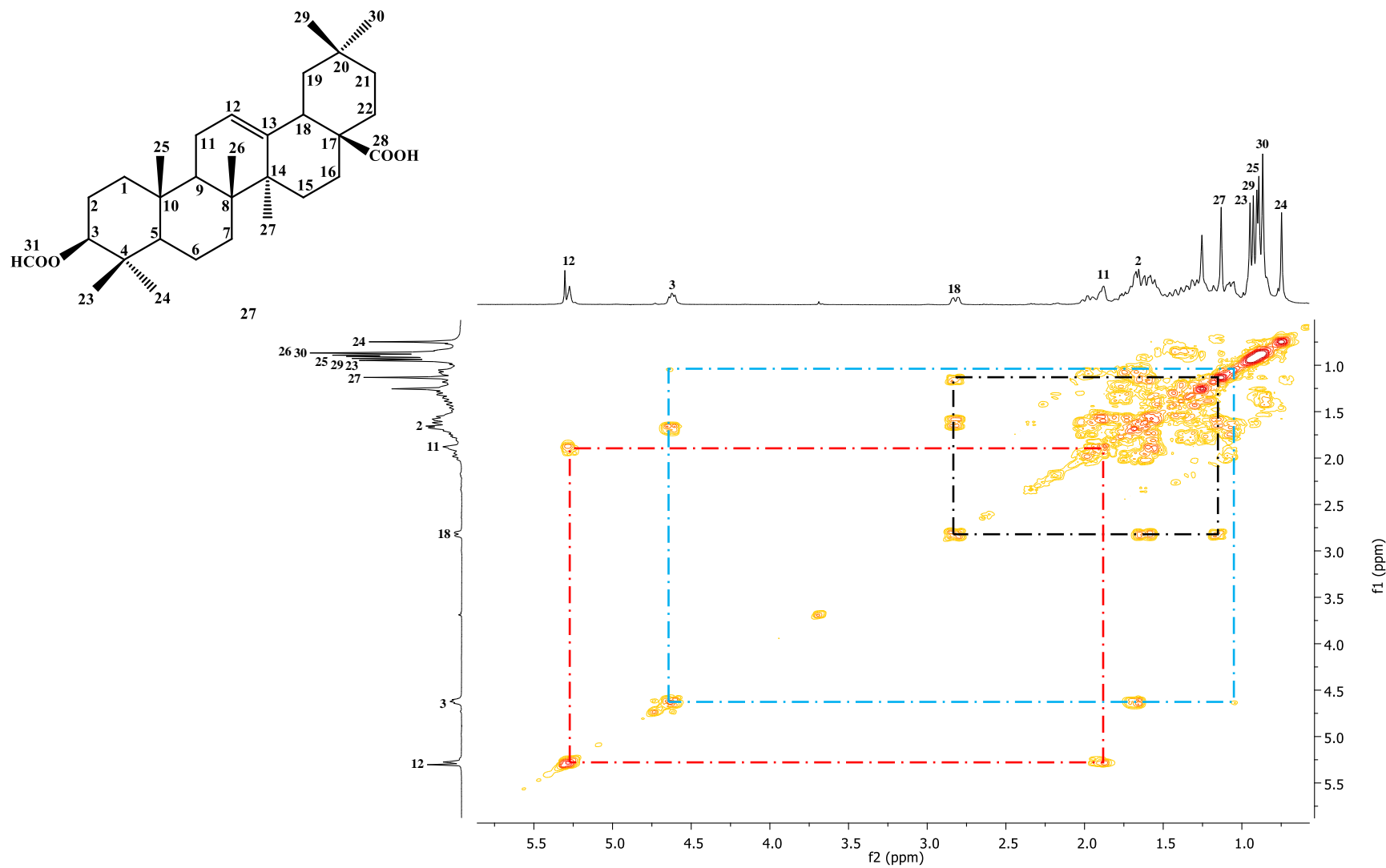
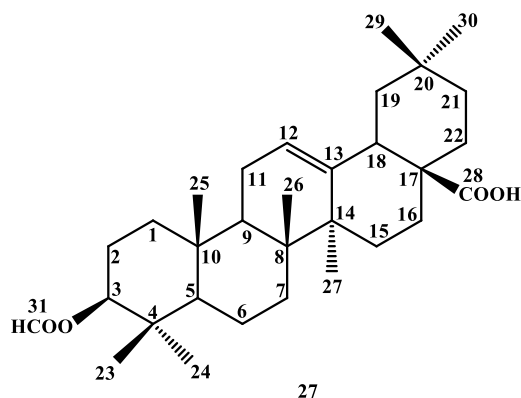


Figura 21. Expansión del espectro COSY del ácido 3-formilleanólico (27).



Punto de fusión: 183-186 °C

Ácido 3-formiloleanólico RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ 8.11 (1H, s, H-31), 5.27 (1H, t, $J = 3.4$ Hz, H-12), 4.62 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-3), 2.82 (1H, dd, $J = 13.5, 3.4$ Hz, H-18), 1.13 (3H, s, CH_3 -27), 0.94 (3H, s, CH_3 -23), 0.92 (3H, s, CH_3 -29), 0.90 (3H, s, CH_3 -25), 0.89 (3H, s, CH_3 -30), 0.86 (3H, s, CH_3 -26), 0.74 (3H, s, CH_3 -24).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ 184.2 (C, C-28), 161.1 (CH, C-31), 143.5 (C, C-13), 122.4 (CH, C-12), 81.0 (CH, C-3), 55.2 (CH, C-5), 47.5 (CH, C-9), 46.5 (C, C-17) 45.7 (CH₂, C-19), 41.5 (C, C-14) 40.8 (CH, C-18), 39.2 (C, C-8), 37.9 (C, C-4), 37.6 (CH₂, C-1), 36.9 (C, C-10), 33.7 (CH₂, C-21), 33.0 (CH₃, C-29), 32.4 (CH₂, C-7), 32.3 (CH₂, C-22), 30.6 (C, C-20), 29.6 (CH₃, C-23), 27.9 (CH₂, C-15), 27.6 (CH₂, C-2), 25.8 (CH₃, C-27), 23.6 (CH₃, C-30), 23.5 (CH₂, C-11), 23.3 (CH₂, C-16), 22.8 (CH₂, C-6), 18.1, (CH₃, C-26), 17.0 (CH₃, C-24), 15.3 (CH₃, C-25).

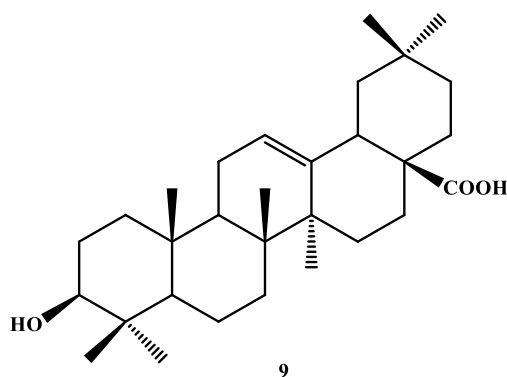
7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las especies vegetales son una fuente importante de metabolitos secundarios, los cuales poseen, en su mayoría, efectos terapéuticos importantes y de interés científico (Pawar, 2014; Arias *et al.*, 2009).

Uno de los géneros más extendidos e importantes en el territorio mexicano por sus acciones terapéuticas es *Salvia*. Se ha reportado que los componentes predominantes son de tipo terpeno (Ulubelen, 2000; Abdollahi-Ghehi *et al.*, 2019).

El espectro de RMN de 1D (^1H) del extracto de diclorometano de las hojas de *Salvia plurispicata* mostró señales características para compuestos de naturaleza triterpénica. Así mismo, se pudieron identificar señales correspondientes a hidrógenos vinílicos y señales típicas de hidrógenos base de heteroátomo.

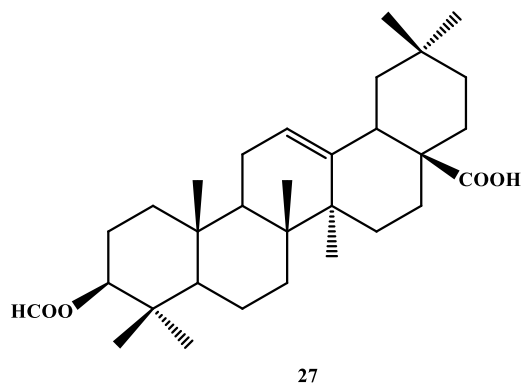
Para aislar y caracterizar los compuestos presentes en el extracto de diclorometano se realizó una columna cromatográfica en donde el componente mayoritario fue el ácido oleanólico (**9**), un triterpeno pentacíclico encontrado también en diferentes especies de *Salvia* como: *S. officinalis*, *S. aegyptiaca*, *S. anastomosans*, entre otras (Wu *et al.*, 2012; Jash *et al.*, 2016). En este trabajo se reporta por primera vez la presencia del ácido oleanólico (**9**) en *S. plurispicata*.



Se sabe que este compuesto posee acciones biológicas de interés debido a sus efectos antitumorales, antioxidantes, antivirales, antialérgicos, hepatoprotectores y antiinflamatorios; y puede ser susceptible a modificaciones químicas gracias a los grupos

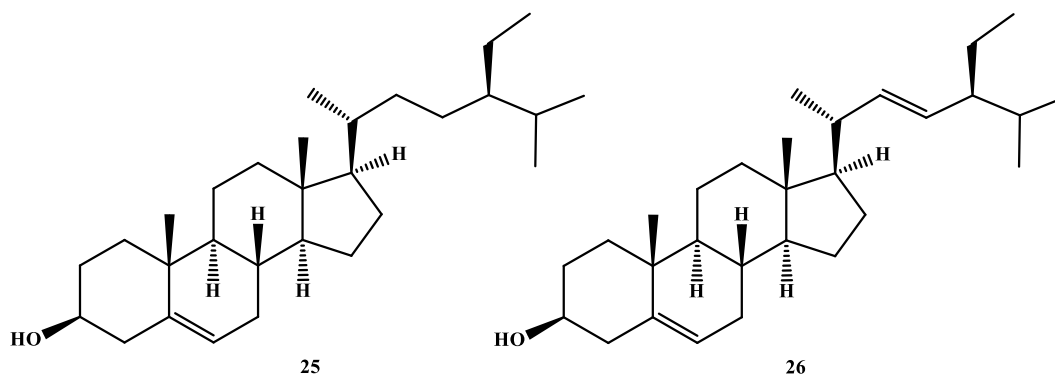
funcionales presentes en su esqueleto. Por ejemplo, por medio de la acetilación del grupo alcohol del ácido oleanólico (**9**) se ha obtenido su derivado con un rendimiento del 98%; mostrando actividades antibacterianas. De igual manera, mediante la esterificación del mismo grupo se han preparado derivados con grupos benzoatos y rendimientos de entre 15 a 32%, pero sin reportes de su acción biológica hasta la fecha (Wang *et al.*, 2019; Hichri *et al.*, 2003).

Por lo mencionado anteriormente, el ácido oleanólico (**9**) fue sometido a una reacción de formilación de donde se obtuvo el producto formilado con un rendimiento del 29%. Fue caracterizado por espectroscopia de RMN de 1D (^1H y ^{13}C) y 2D (COSY). Este derivado se nombró como ácido 3-formiloleanólico (**27**), y cabe destacar que este compuesto no ha sido reportado. También se sabe que las modificaciones del grupo alcohol en el esqueleto de oleanano puede alterar la actividad biológica del compuesto inicial (Cano-Flores, 2013), por lo que el compuesto **27** abre la posibilidad de la realización de estudios que comprueben su actividad biológica.



Como componente minoritario del extracto de hoja de la planta se obtuvo el fitoesterol conocido como β -sitosterol (**25**) el cual contenía trazas de estigmasterol (**26**). La literatura nos dice que ambos compuestos son encontrados comúnmente en mezcla (Pierre & Moses, 2015; Pamatz-Bolaños, 2018; Cruz-Corona, 2018; Chaturvedula-Prakash & Prakash, 2012; Xu *et al.*, 2005); en este caso se aisló mayoritariamente el compuesto **25** en una proporción 16:1 respecto a **26**.

Terpenos del Extracto de Diclorometano de las Hojas de *Salvia plurispicata*



Estos compuestos están ampliamente distribuidos en la naturaleza y poseen funciones estructurales en la membrana celular de las plantas. En humanos, poseen efectos hipocolesterolémicos y son utilizados en el tratamiento de individuos con hipercolesterolemias leves a moderadas, aunque también se producen comercialmente a partir de semillas de soja como materia prima en la semisíntesis de esteroides medicinales (Valenzuela & Ronco, 2004; Dewick, 2009).

Con los datos descritos anteriormente se sabe que los terpenos son parte de los metabolitos secundarios de *Salvia plurispicata*, por lo que, con estos datos se establece el primer estudio químico de esta especie, aportando a la quimiotaxonomía del género *Salvia*.

8. CONCLUSIÓN

Salvia plurispicata contiene ácido oleanólico (9) como componente mayoritario, un triterpeno encontrado en diferentes especies del género *Salvia* y que ha demostrado diversas actividades biológicas. Se comprobó la reactividad del grupo alcohol de C-3 del anillo A para formar un nuevo derivado formilado, permitiendo así la exploración de su actividad biológica.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abdollahi-Ghehi, H., Sonboli, A., Ebrahimi, S.N., Esmaeili, M.A. & Mirjalili, M.H. (2019). Triterpenic Acid Content and Cytotoxicity of Some *Salvia* Species from Iran. *Natural Product Communications*: 1-8.
- Arias, M., Aguirre, A., Angarita, M., Montoya, C. & Restrepo, J. (2009). Aspectos Ingenieriles del Cultivo *In Vitro* de Metabolitos Secundarios. *DYNA*. 76 (157): 109-121.
- Ávalos, A. & Pérez, E. (2009). Metabolismo Secundario de Plantas. *Reduca*. 2 (3): 119-145.
- Cano-Flores, A. (2013). Biotransformación de Triterpenos con Diferentes Microorganismos. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*. 44 (2): 7-16.
- Chaturvedula-Prakash, V.S. & Prakash, I. (2012). Insolation of Stigmasterol and β -sitosterol from the Dichloromethane Extract of *Rubus suavissimus*. *Internationa Current Pharmaceutical Journal*. 1 (9): 239-242.
- Cruz-Corona, R. (2018). Elucidación Estructural de Metabolitos Secundarios Aislados de *Lasianthaea aurea*. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán.
- Dewick, P.M. (2009). The Mevalonate and Methylerythritol Phosphate Pathways: Terpenoids and Steroids. (In: Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach). (3ed Ed) *John Wiley & Sons*. 187-306.
- Días, D.A., Urban, S. & Roessner, U. (2012). A Historial Overview of Natural Products in Drug Discovery. *Metabolites*. 2 (2): 303-336.
- Di-Sapio, O., Bueno, M., Busilacchi, H., Quiroga, M. & Severin, C. (2012). Caracterización Morfoanatómica de Hoja, Tallo, Fruto y Semilla de *Salvia hispanica* L. (Lamiaceae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 11 (3): 249-268.

Terpenos del Extracto de Diclorometano de las Hojas de *Salvia plurispicata*

- 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: 161-166.
- Esquivel, B., Vallejo, A., Gaviño, R., Cárdenas J. & Sánchez, A.A. (1988). Clerodane Diterpenoids from *Salvia melissodora*. *Phytochemistry*. 27 (9): 2903-2905.
- Ghorbani, A. & Esmailizadeh, M. (2017). Pharmacological Properties of *Salvia officinalis* and its Components. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. 7: 433-440.
- Hichri, F., Ben-Jannet, H., Cheriaa, J., Jegham, S. & Mighri, Z. (2003). Antibacterial Activities of a Few Prepared Derivatives of Oleanolic Acid and of Other Natural Triterpenic Compounds. *Comptes Rendus Chimie*. 6 (4): 473-483.
- Jash, S.K., Gorai, D. & Roy, R. (2016). *Salvia* Genus and Triterpenoids. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 7 (12): 4710-4732.
- Lara-Cabrera, S.I., Bedolla-García, B.Y., Zamudio, S. & Domínguez-Vázquez, G. (2016). Diversidad de Lamiaceae en el Estado de Michoacán, México. *Acta Botánica Mexicana*. 116: 107-149.
- López-Carreras, N., Miguel, M. & Aleixandre, A. (2012). Propiedades Beneficiosas de los Terpenos Iridoides Sobre la Salud. *Nutrición clínica y Dietética Hospitalaria*. 32 (3): 81-91.
- 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 (1), 30–86.
- Nascimento, P.G., Lemos, T.G., Bizerra, A.M., Arriaga, A.M., Ferreira, D.A., Santiago, G.M., Braz-Filho, R. & Costa, J.G. (2014). Antibacterial and Antioxidant Activities of Ursolic Acid and Derivatives. *Molecules*. 19: 1317-1327.

Terpenos del Extracto de Diclorometano de las Hojas de *Salvia plurispicata*

- Nguyen, A.T., Malonne, H., Duez, P., Vanhaelen-Fastre., Vanhaelen, M. & Fontaine, J. (2004). Cytotoxic Constituents from *Plumbago zaylanica*. *Fitoterapia*. 75: 500-504.
- Olvera-Mendoza, E.I; Bedolla-García, B.Y & Lara-Cabrera, S.I. (2017). Revisión Taxonómica de *Salvia* Subgénero Calosphace Sección Scorodoniae (Lamiaceae), Endémica de México. *Acta Botánica Mexicana*. 118: 7-40.
- Ortega, A., Ortiz-Pastrana, N., Bedolla-García, B.Y., Toscano, R.A. & Bautista, E. (2017). NMR Analysis and Crystal Structure of Hydroxyclerodanes from Mexican *Salvia* Species. *Journal of Molecular Structure*. 1141: 157-162.
- Pamatz-Bolaños, T. (2018). Estudio Químico de Especies del Género *Caesalpinia* del Estado de Michoacán y su Aplicación en Biocombustibles. Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán.
- Pawar, H.A. (2014). Natural Product as a Source of Lead to the Design of New Drugs. *Natural Products Chemistry & Research*. 2 (6): 2-5.
- Pierre, L.L & Moses, M.N. (2015). Isolation and Characterisation of Stigmasterol and β -Sitosterol from *Odontonema strictum* (Acanthaceae). *Journal of Innovations in Pharmaceuticals and Biological Science*. 2 (1): 88-96.
- Ragasa, C.Y. & Lim, K. (2005). Secondary Metabolites from *Schefflera odorata* Blanco. *Philippine Journal of Science*. 134 (1), 63-67.
- Ramasubramania-Raja, R. (2012). Medicinally Potential Plants of Labiatae (Lamiaceae) Family: An Overview. *Research Journal of Medicinal Plant*. 6 (3): 203-213.
- Ramos, G. P., Frutos, F. J., Giráldez & Mantecón, A. R. (1998). Los Compuestos Secundarios de las Plantas en la Nutrición de los Herbívoros. *Archivos de Zootecnia*. 47: 597-620.
- Ulubelen, A. (2000). Terpenoids in the Genus *Salvia*. (In: SAGE The Genus *Salvia*). (Ed) Kintzios, S. E. *Hardwood Academic Publishers*. 55-81.

Terpenos del Extracto de Diclorometano de las Hojas de *Salvia plurispicata*

- Valenzuela, A. & Ronco, A. M. (2004). Fitoesteroles y Fitoestanoles: Aliados Naturales para la Protección de la Salud Cardiovascular. *Revista Chilena sobre Nutrición*. 1: 161-169.
- Villaseñor, J.L. (2016). Checklist of the Native Vascular Plants of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 87 (3): 559-902.
- Wang, Z., Li, L., Jiang, Y., Liu, Y. & Liang, H. (2019). Oleanolic acid: Biological Activities and Therapeutic Potential in Chronic Diseases. *Chronic Diseases Prevention Review*. 11: 49-52.
- Wink, M. (2008). Plant Secondary Metabolism: Diversity, Function and its Evolution. *Natural Product Communications*. 3 (8): 1205-1216.
- Wu, Y. B., Ni, Q. W., Dong, M., Kiyota, H., Gu, Y. C. & Cong, B. (2012). Constituents from *Salvia* Species and Their Biological Activities. *Chemical Reviews*. 112: 5967-6026.
- Xu, G., Zhao, F., Yang, X., Zhou, J., Yang, L., Shen, X., Hu, Y. & Zhao, Q. (2011). Neo-Clerodane Diterpenoids from *Salvia dugesii* and their Bioactive Studies. *Natural Product Bioprospect*. 1: 81-86.
- Xu, W.L., Huang, Y.B., Qian, J.H., Sha, O. & Wang, Y.Q. (2005). Separation and Purification of Stigmasterol and β -sitosterol from Phytosterol Mixtures by Solvent Crystallization Method. *Separation Purification Technology*. 41: 173-178.