

**AISLAMIENTO Y EVALUACIÓN BIOLÓGICA
DE COMPUESTOS AISLADOS DE LA ESPECIE
VEGETAL *Salvia sessei* BENTH^o**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN FARMACIA

PRESENTA:

M. en C. ABRAHAM GÓMEZ RIVERA

CO-DIRECTORES DE TESIS

DRA. VERÓNICA RODRÍGUEZ LÓPEZ

DR. MANASÉS GONZÁLEZ CORTAZAR

"1919-2019 en memoria del General Emiliano Zapata Salazar"

Cuernavaca, Mor., a 10 de abril de 2019
Folio: FF/D/SAC/CIP/DF/030/2019

**M.C. ABRAHAM GÓMEZ RIVERA
ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE DOCTORADO
PRESENTE**

Por este conducto le informo que Consejo Interno de Posgrado en la sesión ordinaria del 10 abril de 2019, le asignó el siguiente jurado para presentar la defensa oral de la tesis titulada:

"Aislamiento y evaluación biológica de compuestos de la especie vegetal *Salvia sessei* Benth"

Dr. Jorge Alberto Reyes Esparza	PRESIDENTE
Dr. Samuel Enoch Estrada Soto	SECRETARIO
Dra. Laura Patricia Álvarez Berber	VOCAL 1
Dra. Leticia González Maya	VOCAL 2
Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez	VOCAL 3
Dr. Oscar Torres Ángeles	VOCAL 4
Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz	VOCAL 5

De acuerdo al Artículo 101° (Reglamento General de Posgrado). - *Será requisito previo al examen de grado, que los integrantes de la Comisión Revisora, emitan su voto y opinión favorables en términos de que la tesis reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente. Lo cual no compromete el dictamen de la evaluación de examen.*

Asimismo, le recuerdo que es responsabilidad de usted enviar los respectivos ejemplares a su comité sinodal y dar seguimiento a las correspondientes revisiones para poder concluir este importante proceso.

Sin más por el momento, me despido de usted, no sin antes felicitarlo por estar próximo a obtener el título de Doctor en Farmacia.

Atentamente
Por una humanidad culta
Una universidad de excelencia



DR. JULIO CÉSAR RIVERA LEYVA
JEFE DE POSGRADO



**Facultad
de Farmacia
POSGRADO**

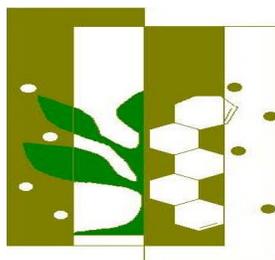
C.c.p. Dr. Jorge Alberto Reyes Esparza, Dr. Samuel E. Estrada Soto, Dra. Laura Patricia Álvarez Berber, Dra. Leticia González Maya, Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez, Dr. Oscar Torres Ángeles y Dra. Maribel Herrera Ruiz.
JCRL/drim

El presente proyecto fue desarrollado en:

Las evaluaciones de la actividad antiinflamatoria y antioxidante fueron realizadas en el Laboratorio de Farmacognosia y Química de Productos Naturales de la Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo la dirección de la Dra Verónica Rodríguez López.



El aislamiento y caracterización de los compuestos, así como las evaluaciones de la actividad antiinflamatoria y antibacteriana se llevaron a cabo en el Laboratorio de Fitoquímica y Farmacología del Centro de Investigación Biomédica del Sur-IMSS bajo la dirección del Dr. Manasés González Cortazar



Dedicatorias

Al único y sabio Dios

Por derramar abundante gracia en vida para seguir adelante

A mis padres

Víctor y Antonia por el amor y apoyo que siempre me han brindado.

A mi familia

Hermanos, hermanas, cuñados, cuñadas, sobrinos y sobrinas de quienes he recibido su cariño y compañía a lo largo de todo el camino.

Por tanto, al Rey de los siglos, inmortal, invisible, al único y sabio Dios, sea honor y gloria por los siglos de los siglos, amén. 1 Timoteo 1:17

Agradecimientos

A mis co-directores de tesis: Dra Verónica Rodríguez López y Dr Manasés González Cortazar por su atinada dirección en este proyecto compartiendo sus conocimientos y capacidades para que lo realizado fuese con excelencia. Aprecio mucho cada uno de los esfuerzos, críticas y orientaciones que hicieron para apoyarme en el logro de los objetivos planteados. Sobre todo, agradezco el aprecio y la confianza que me brindaron

A los miembros de mi comité tutorial: Dra Verónica Rodríguez López, Dr Manasés González Cortazar, Dra Judith González Christien y Dra Laura Patricia Álvarez Berber, por su acompañamiento a lo largo del desarrollo de este proyecto, sus consejos y orientaciones siempre oportunas han sido para mí invaluable; agradezco la confianza que me brindaron de manera cálida y cordial.

Al Dr Alejandro Zamilpa, Álvarez (CIBIS-IMSS), Dra Maribel L. Herrera Ruíz (CIBIS-IMSS), Dra. Patricia Álvarez-Fitz (UAGro), quienes me apoyaron en el trabajo experimental, compartiendo sus recursos de manera desinteresada y oportuna, son ejemplo de trabajo en equipo.

A los técnicos Jonathan Orduño y Arturo Pérez (CIBIS-IMSS) por su apoyo en el trabajo realizado en el laboratorio.

A los compañeros y amigos del CIBIS y del Lab 12 de la Facultad de Farmacia, con quienes compartí muchas jornadas de trabajo.

A los miembros del jurado: Dr. Jorge Alberto Reyes Esparza, Dr. Samuel Enoch Estrada Soto, Dra. Laura Patricia Álvarez Berber, Dra. Leticia González Maya, Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez, Dr. Oscar Torres Ángeles y Dra. Maribel Lucila Herrera Ruíz por sus valiosas aportaciones y recomendaciones que dieron como resultado la mejora en el contenido y estructura del manuscrito de tesis.

Al programa institucional de superación académica (PISA-UJAT) y al programa para el desarrollo profesional docente (PRODEP) por la beca otorgada para realizar estudios doctorales.

Índice general

Resumen	1
Abstract	2
1. Introducción	4
2. Antecedentes	6
2.1 Inflamación	6
2.1.1 Tipos de inflamación	7
2.1.2 Mediadores moleculares en la respuesta inflamatoria	7
2.1.3 Principales agentes antiinflamatorios	8
2.1.4 Compuestos de plantas medicinales con actividad antiinflamatoria	9
2.2 Radicales libres	12
2.2.1 Beneficios y daños ocasionados por radicales libres	13
2.2.2 Antioxidantes	15
2.3 Resistencia a los antibióticos	17
2.3.1 Principales antibióticos	19
2.3.2 Compuestos de plantas medicinales con actividad antibacteriana	23
2.4 Plantas y medicina tradicional: Panorama general	25
2.5 Compuestos bioactivos a partir de plantas medicinales	27
2.6 Plantas medicinales en México	29
2.7 Antecedentes de la especie <i>Salvia sessei</i> Benth	30
2.7.1 Género <i>Salvia</i>	30
2.7.2 Estudios etnofarmacológicos del género <i>Salvia</i>	30
2.7.3 Estudios químicos y farmacológicos del género <i>Salvia</i>	32
2.7.4 Descripción botánica y taxonomía de <i>Salvia sessei</i> Benth	36
3. Justificación	39
4. Hipótesis	41
5. Objetivo general	41
5.1 Objetivos específicos	41
6. Materiales y Métodos	43
6.1 Recolección y obtención de los extractos orgánicos de <i>Salvia sessei</i> B.	43
6.2 Extracción y aislamiento de compuestos	43

6.2.1 Cromatografía en capa fina (CCF)	43
6.2.2 Fraccionamientos cromatográficos y aislamiento de compuestos.	44
6.3 Determinación de puntos de fusión	50
6.4 Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)	50
6.5 Análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) del extracto héxanico de <i>S. sessei</i> (SsH)	50
6.6 Análisis por cromatografía líquida de ultra-alta resolución-espectrometría de masas (UPLC-Masas)	51
6.7 Caracterización por Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	51
6.8 Actividad antiinflamatoria.....	51
6.9 Actividad antibacteriana	53
6.9.1 Cepas bacterianas.....	53
6.9.2 Preparación del Inóculo	53
6.9.3 Concentración mínima inhibitoria (CMI)	53
6.10 Evaluación de la capacidad antioxidante	54
6.10.1 Capacidad antioxidante por 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)	54
6.10.2 Capacidad antioxidante por 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6- sulfónico) (ABTS).....	55
6.10.3 Capacidad antioxidante/reductora de férrico (CARF).....	55
6.11 Análisis Estadístico	55
7. Resultados y Discusión	57
7.1 Recolección y obtención de los extractos de <i>S. sessei</i> B.	57
7.2 Fraccionamiento cromatográfico del extracto diclorometánico (SsD).....	57
7.2.1 Perfil cromatográfico por CLAR del extracto diclorometánico (SsD), sesseína (2) y sesseinol (4)	60
7.3 Fraccionamiento cromatográfico del extracto metanólico (SsM).....	61
7.3.1 Perfil cromatográfico por CLAR del extracto SsM y del ácido cafeíco (8), ácido rosmarínico (9) e isoorientina (10)	66
7.4 Caracterización por UPLC-Masas del isosesseinol (3)	69
7.5 Perfil cromatográfico por CG-EM del extracto héxanico de <i>S. sessei</i> (SsH)	71
7.6 Elucidación por RMN de isosesseina (1) y sesseina (2).....	73
7.7 Elucidación por RMN del ácido gálico (7), ácido cafeíco (8) y ácido rosmarínico (9).....	78
7.8 Actividad antiinflamatoria de extractos, fracciones y compuestos aislados de <i>S. sessei</i>	79
7.9 Actividad antibacteriana	83



Aislamiento y evaluación biológica de compuestos de la especie vegetal
***Salvia sessei* Benth**



7.10 Capacidad antioxidante de los extractos, fracciones y compuestos aislados.....	87
8. Conclusiones	93
9. Perspectivas	95
10. Referencias Bibliográficas	96
11. Anexos	115
12. Publicaciones	123

Listado de Figuras

Figura 1	Eventos involucrados en la respuesta inflamatoria.....	6
Figura 2	Grupos de compuestos aislados de plantas con actividad biológica	12
Figura 3	Enfermedades inducidas por estrés oxidante.....	14
Figura 4	Clasificación de los antibióticos con base a sus estructuras moleculares	23
Figura 5	Esquema típico en el descubrimiento y desarrollo de medicamentos a partir de plantas medicinales	28
Figura 6	Partes del cuerpo afectados por la erisipela.....	32
Figura 7	Ejemplo de compuestos bioactivos presente en el género <i>Salvia</i>	33
Figura 8	Sesseína aislada de <i>S. sessei</i> (7 α -acetil- 12-hidroxyabieta-8,12-diene-11, 14-diona-19,20- δ -lactona).....	34
Figura 9	<i>Salvia sessei</i> Benth.....	37
Figura 10	Estructura del ácido ursólico (5) presente en el extracto SsD	57
Figura 11	Placas cromatográficas CCF-fase normal del extracto SsD	58
Figura 12	Separación por cromatografía “flash” de los compuestos 1 , color morado (Isosesseína) y compuesto 2 , color amarillo (Sesseina)	58
Figura 13	Placas cromatográficas CCF-fase reversa con los compuestos 1 y 2	59
Figura 14	CCF fase reversa, revelador NP-PEG, eluyente H ₂ O: ACN (5:5)	59
Figura 15	a) Perfil cromatográfico por CLAR del extracto diclorometánico (SsD) de <i>S. sessei</i> ; (b) cromatograma por CLAR y (c) espectro UV-Vis del compuesto 2	60
Figura 16	a) Cromatograma por CLAR y b) Espectro UV-Vis del compuesto 4	61
Figura 17	Placas cromatográficas: a) CCF-fase normal (eluyente Hex: AcOEt 7:3, revelador SC) y b) CCF-fase reversa (eluyente H ₂ O: ACN 7:3, revelador NP-PEG) de las reuniones del fraccionamiento de SsM). R = extracto SsM, C2 = Compuesto 2 , AU = ácido ursólico estándar, BS = β -sitosterol estándar.....	62
Figura 18	Estructura del β -sitosterol (6) presente en fracciones del extracto SsM	62
Figura 19	Placas cromatográficas: a) CCF-fase normal (eluyente Hex: AcOEt 5:5, revelador SC) y b) CCF-fase reversa (eluyente H ₂ O: ACN 7:3, revelador NP-PEG) de las reuniones del fraccionamiento de SsM). R = fracción SsM10-12, AU = ácido ursólico estándar.	63
Figura 20	Estructura del ácido gálico (7) y ácido cafeico (8) presentes en la fracción SsM10-1	63

Figura 21 Placas cromatográficas: a) CCF-fase reversa del fraccionamiento de SsM13-15 , R = fracción SsM13-15, AC = ácido cafeico estándar; AR = ácido rosmarínico aislado; b) CCF-fase reversa del fraccionamiento del SsMC2-R3 .	64
Figura 22 Estructura del ácido rosmarínico (9) presente en la fracción SsM13-15 .	64
Figura 23 CCF fase reversa, revelador NP-PEG, eluyente H ₂ O: ACN (7.3). R = SsP2-5	65
Figura 24 Estructura de la isoorientina (10) propuesta para el compuesto aislado de la fracción SsP2-5 .	65
Figura 25 Perfil cromatográfico por CLAR y espectros UV-Vis del extracto metanólico (SsM) de <i>S. sessei</i> .	67
Figura 26 a) Cromatograma por CLAR y b) espectro UV-Vis del compuesto 8 ; c) Cromatograma por CLAR y d) espectro UV-Vis del compuesto 9 .	68
Figura 27 Cromatograma por CLAR del compuesto 10 .	69
Figura 28 Espectro de masas del compuesto 3 ion molecular (m/z) = 361.22 uma [M+] ¹ 70	
Figura 29 Estructuras químicas de los diterpenos tipo royleanona aislados de <i>Salvia sessei</i> Benth.	70
Figura 30 Estructura de los compuestos identificados en el extracto SsH .	72
Figura 31 RMN ¹ H (CD ₃ COCD ₃ , 600 MHz) compuesto 1 .	73
Figura 32 RMN ¹³ C (CD ₃ COCD ₃ , 150 MHz) compuesto 1 .	74
Figura 33 RMN ¹ H (CDCl ₃ , 600 MHz) compuesto 2 .	74
Figura 34 RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 150 MHz) compuesto 2 .	75
Figura 35 Estructura química de los dos diterpenos tipo royleanona aislados de <i>S. sessei</i> Benth.	76
Figura 36 Correlaciones claves de HMBC en los compuestos 1 y 2 .	76
Figura 37 Porcentaje de inhibición de la inflamación (%) de los extractos, fracciones y compuestos aislados de <i>S. sessei</i> en edema inducido por TPA en oreja de ratón a 1.0 mg/oreja.	81
Figura 38 Curvas dosis-respuesta para los compuestos 1 y 2 aislados de <i>S. sessei</i> e Indo (Indometacina).	82
Figura 39 Concentración inhibitoria media por DPPH de extractos y fracciones de <i>S. sessei</i> .	89
Figura 40 Concentración inhibitoria media por DPPH de compuestos aislados de <i>S. sessei</i> .	89
Figura 41 Concentración inhibitoria media por ABTS de extractos y fracciones de <i>S. sessei</i> .	90

Figura 42 Concentración inhibitoria media por ABTS de compuestos aislados de <i>S. sessei</i>	90
Figura 43 Equivalentes de FeSO ₄ de extractos y fracciones de <i>S. sessei</i> . Determinada a una concentración de 5000 µg/mL.....	90
Figura 44 Equivalentes de FeSO ₄ de compuestos aislados de <i>S. sessei</i> . Determinada a una concentración de 2.5 mM.....	90

Listado de Tablas

Tabla 1 Lista OMS de patógenos prioritarios para la I+D de nuevos antibióticos	19
Tabla 2 Sistema de elución empleado para el fraccionamiento primario del extracto SsD de <i>S. sessei</i>	45
Tabla 3 Sistema de elución empleado para el fraccionamiento por columna “flash” de SsD-10R2-4 para el aislamiento de los compuestos 1 y 2	46
Tabla 4 Sistema de elución empleado para la percolación del extracto SsM de <i>S. sessei</i>	47
Tabla 5 Extractos orgánicos obtenidos por maceración de las partes aéreas de <i>S. sessei</i>	57
Tabla 6 Composición química del extracto SsH de <i>S. sessei</i>	71
Tabla 7 Datos espectroscópicos de RMN para los compuestos 1 y 2 (600 Mhz, 1 en CD ₃ COCD ₃ , 2 en CDCl ₃ , δ ppm, J en Hz).....	77
Tabla 8 Actividad antibacteriana de los extractos y compuestos de <i>S. sessei</i> . Concentración mínima inhibitoria (MIC) expresado en µg/mL y micromolar (µM)	86
Tabla 9 Capacidad antioxidante de los extractos (µg/mL) y compuestos aislados (µM) de <i>S. sessei</i> . Concentración inhibitoria 50 (CI ₅₀)	91

Listado de Anexos

Figura A 1 Espectrograma CG-EM del extracto SsH de <i>S. sessei</i>	116
Figura A 2 Espectro del experimento HMBC del compuesto 1	116
Figura A 3 Espectro del experimento HMBC del compuesto 2	117
Figura A 4 Espectro RMN ¹ H (CD ₃ OD, 600 MHz) del compuesto 7	117
Figura A 5 Espectro RMN ¹³ C (CD ₃ OD, 150 MHz) del compuesto 8	118
Figura A 6 Espectro RMN ¹ H (CD ₃ OD, 400 MHz) del compuesto 8	118
Figura A 7 Espectro RMN ¹³ C (100 MHz, CD ₃ OD) del compuesto 8	119
Figura A 8 Espectro RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) del compuesto 9	120
Figura A 9 Espectro RMN ¹³ C (100 MHz, CD ₃ OD) del compuesto 9	121

Listado de Siglas y Abreviaturas

ABTS	2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)
AcOEt	Acetato de etilo
ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
°C	Grados Celsius
CARF	Capacidad antioxidante/reductora de férrico
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
CG	Cromatografía de gases
CLAR	Cromatografía líquida de alta resolución
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CDCl₃	Cloroformo deuterado
CD₃OD	Metanol deuterado
CI₅₀	Concentración Inhibitoria Media
COX-1	Ciclooxigenasa 1
COX-2	Ciclooxigenasa 2
Cs	<i>Camellia sinensis</i>
DE₅₀	Dosis efectiva media
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DMSO	Dimetil sulfóxido
g	Gramos
Gen	Gentamicina
GL	Glucósido de luteolina

Hex	Hexano
H₂O	Agua
Indo	Indometacina
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
iNOS	Óxido nítrico sintetasa inducible
IS	Isosakuranetina
KOM	Reactivo de Komarowsky
L	Litros
LPS	Lipopolisacárido
λ	Longitud de onda
m	Metro
MeOH	Metanol
min	Minuto
mL	Mililitro
mg	Miligramos
mg/mL	Miligramos sobre mililitro
MHz	Megahertz
MTC	Medicina tradicional y complementaria
MTT	Cloruro de 2,3,5-trifeniltetraoilo
nm	Nanómetros
NO	Óxido Nitríco
OMS	Organización Mundial de la Salud
NF-kB	Factor nuclear kappa B
NP-PEG	Reactivo de difenilboriloxietilamina/polietilenglicol
PGE2	Prostaglandinas E2

Rf	Relación de frentes
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SC	Sulfato cérico
SsH	Extracto hexánico de <i>Salvia sessei</i>
SsD	Extracto diclorometánico de <i>Salvia sessei</i>
SsM	Extracto metanólico de <i>Salvia sessei</i>
TNF	Factor de Necrosis Tumoral (por sus siglas en inglés)
TPA	12-O-tetradecanoilforbol -13-acetato
tr	Tiempo de retención
Tx	Trolox
µg/mL	Microgramos sobre mililitro
µL	Microlitos
µM	Micromolar
UPLC-Masas	Cromatografía líquida de ultra-alta resolución-espectrometría de masas
UV-Vis	Ultravioleta-Visible

Resumen

Especies del género *Salvia* se han reportado como parte de los recursos vegetales empleados en la medicina tradicional del Estado de Morelos; una de ellas es la *Salvia sessei* Benth conocida popularmente como “pipilolxochitl” o “sabanito” es una planta utilizada en México en la medicina tradicional para el tratamiento de la erisipela. El objetivo del estudio fue evaluar el potencial antiinflamatorio, antibacteriano y antioxidante de los compuestos aislados de las partes aéreas de la especie vegetal *Salvia sessei* Benth.

La actividad antiinflamatoria fue evaluada en el modelo de edema en oreja de ratón a 1 mg/oreja de los extractos, fracciones y compuestos aislados (**1**, **2**, **3** y **4**), para los compuestos **1** y **2** se realizaron curvas dosis respuesta y se determinó la DE₅₀ de cada uno. La actividad antibacteriana fue determinada calculando la concentración mínima inhibitoria por microdilución a 12.5, 25, 50 y 100 µg/mL y la capacidad antioxidante mediante los ensayos de DPPH, ABTS y CARF donde para los dos primeros ensayos mencionados se calculó la CI₅₀ tanto de los extractos como de los compuestos aislados.

En el extracto hexánico fueron identificados cinco compuestos alifáticos (**11**, **12**, **13**, **14** y **15**) y dos fitosteroles (**6** y **16**); del extracto metanólico se obtuvieron tres fracciones, de las cuales se aislaron y caracterizaron tres polifenoles (**7**, **8** y **9**) y una flavona (**10**), además en una de las fracciones fueron identificados cinco compuestos tipo flavonoide; del extracto diclorometánico fueron aislados y caracterizados cuatro diterpenos tipo royleanona los cuales son tautómeros entre sí, es decir **1** con **2** y **3** con **4**.

El extracto **SsM**, su fracción **SsM13-15** y los compuestos **1** y **2** mostraron un potencial antiinflamatorio elevado; **1** y **2** no presentaron diferencia en sus DE₅₀, además **1** tuvo un efecto similar a **Indo** a una misma dosis. La actividad antibacteriana mostrada por **SsM**, **SsD**, **SsM10-12**, **SsM13-15** y los diterpenos **1**, **2**, **3** y **4** fue de amplio espectro, destáncandose la actividad que mostraron contra *S. pyogenes*, bacteria responsable de la enfermedad de la erisipela; en el caso de la capacidad antioxidante, las fracciones metanólicas en las que se identificaron polifenoles y flavonoides y los compuestos **1** y **2** fueron las que tuvieron la mejor capacidad antioxidante.

El presente estudio mostró que los extractos, fracciones y compuestos aislados de *Salvia sessei* Benth poseen actividad antiinflamatoria, antibacteriana y antioxidante, indicando el potencial farmacológico de *S. sessei* y los metabolitos aislados, los cuales están asociados al uso tradicional que se le da a esta especie.

Abstract

Species of the *Salvia* genus have been reported as part of the vegetal resources used in the traditional medicine of the Morelos State; one of them is *Salvia sessei* Benth popularly known as "pipilolxochitl" or "sabanito" is a plant used in Mexican traditional medicine for the treatment of erysipelas. The objective of the study was to evaluate the anti-inflammatory, antibacterial and antioxidant potential of the compounds isolated from the aerial parts of the plant specie *Salvia sessei* Benth.

The anti-inflammatory activity was evaluated in the edema model in mouse ear at 1 mg / ear of the extracts, fractions and isolated compounds (**1**, **2**, **3** and **4**), for the compounds 1 and 2 dose response curves were made and determined the ED₅₀ of each one. The antibacterial activity was determined by calculating the minimum inhibitory concentration by microdilution at 12.5, 25, 50 and 100 µg / mL and the antioxidant capacity by means of the DPPH, ABTS and CARF assays, where for the first two tests the IC₅₀ was calculated from both the extracts as of the isolated compounds.

Five aliphatic compounds (**11**, **12**, **13**, **14** and **15**) and two phytosterols (**6** and **16**) were identified in the hexane extract; of the methanolic extract, three fractions were obtained, from which three polyphenols (**7**, **8** and **9**) and one flavone (**10**) were isolated and characterized; in addition, in one of the fractions, five flavonoid compounds were identified; of the dichloromethane extract were isolated and characterized four royleanone-type diterpenes which are tautomeric with each other, ie **1** with **2** and **3** with **4**.

The **SsM** extract, its **SsM13-15** fraction and compounds **1** and **2** showed a high anti-inflammatory potential; **1** and **2** had no difference in their ED₅₀, and **1** had an effect similar to **Indo** at the same dose. The antibacterial activity shown by **SsM**, **SsD**, **SsM10-12**, **SsM13-15** and diterpenes **1**, **2**, **3** and **4** was of a broad spectrum, with the activity shown against *S. pyogenes*, bacteria responsible for erysipelas disease; In the case of antioxidant capacity, the methanolic fractions in which polyphenols and flavonoids were identified and compounds **1** and **2** were those that had the best antioxidant capacity.

The present study showed that the extracts, fractions and compounds isolated from *Salvia sessei* Benth possess anti-inflammatory, antibacterial and antioxidant activity, indicating the pharmacological potential of *S. sessei* and the isolated metabolites, which are associated to the traditional use that is given to this species.

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

Nuestro país es poseedor de una amplia biodiversidad y desde tiempos prehispánicos hasta la actualidad se continúan empleando las plantas dentro la medicina tradicional no sólo en comunidades rurales, sino que también en zonas suburbanas donde resultan inaccesibles para la población los medicamentos comerciales (CONABIO y UAEM, 2004). Debido a ello, resulta imperativo desarrollar investigación relacionada con plantas que son empleadas en la etnomedicina, por su riqueza como una fuente de una amplia variedad de compuestos, los cuales pueden ser aislados, caracterizados y modificados químicamente para potenciar sus actividades biológicas.

Además, los compuestos bioactivos provenientes de especies vegetales representan una gran diversidad de estructuras novedosas que en muchos casos han servido de base para generar compuestos análogos para atender enfermedades como la diabetes, cáncer, afecciones cardiacas, hipertensión, etc., que son problemas de salud que afectan a millones a nivel mundial. Por lo tanto, las especies vegetales juegan un papel preponderante en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de diversas enfermedades (Gautam y Jachak, 2009), que a menudo el aislamiento e identificación de estos compuestos se basa en el conocimiento local sobre las especies y su uso en la medicina tradicional (Bremner et al., 2009), constituyéndose en una guía para los expertos que consideran el potencial que en compuestos bioactivos tienen muchas plantas y que falta por explorar.

En el Estado de Morelos existe una gran variedad de especies vegetales con fines etnomédicos, dentro de las cuales se encuentra *Salvia sessei* Benth, a la que le llaman “pipilolxochitl” ó “sabinito” y se emplea para el tratamiento de “disípela roja o blanca”, es decir, la hinchazón de las piernas con manchas rojas o blancas, la forma de empleo es mediante cocción de la planta completa y posterior uso para lavado de la zona afectada (Monroy-Ortíz y Castillo-España, 2007). Por lo anterior, el presente proyecto de investigación tuvo como propósito evaluar el potencial antiinflamatorio, antimicrobiano y antioxidante de los compuestos aislados de la especie vegetal *Salvia sessei* Benth y los resultados obtenidos aporten evidencias que confirmen las propiedades que se le confieren en la medicina tradicional y coadyuven a mejorar los tratamientos para la enfermedad donde es utilizada dicha especie.

ANTECEDENTES

2. Antecedentes

2.1 Inflamación

La inflamación es una respuesta del sistema inmunológico de un organismo, al daño causado a células y tejidos vascularizados por patógenos bacterianos y por cualquier otro agente dañino físico, químico o biológico y tiene fundamentalmente un carácter protector, cuyo objetivo final es librar al organismo de la causa inicial de lesión celular (figura 1). Generalmente, la inflamación se clasifica en dos tipos: *aguda* y *crónica*. Una inflamación inicial puede terminar de dos formas: eliminando al agente patógeno, reparando el tejido y concluir con la reacción o dar origen a una lesión crónica (Robbins y Cotran, 2010).

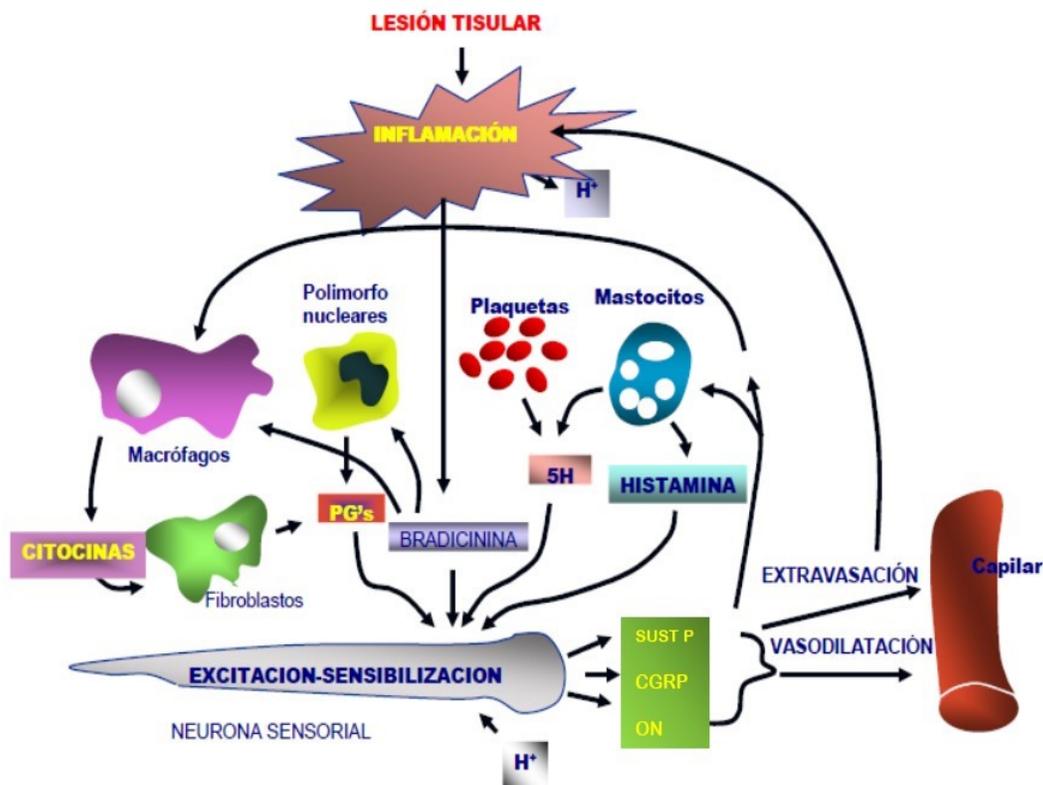


Figura 1 Eventos involucrados en la respuesta inflamatoria (Nathan, 2002)

2.1.1 Tipos de inflamación

Inflamación aguda: Es una respuesta rápida que se desencadena a los pocos minutos u horas de haber ocurrido la lesión tisular y puede caracterizarse por los síntomas clásicos de la inflamación: enrojecimiento, calor, edema. Hay una compleja orquestación de eventos integrados principalmente en dos tipos: 1) modificaciones en el calibre de los vasos sanguíneos: vasodilatación inicial que permite a las proteínas plasmáticas abandonar la circulación (aumento de la permeabilidad vascular) y 2) eventos celulares: migración de proteínas plasmáticas y leucocitos, principalmente neutrófilos (leucocitos polimorfonucleares) y su acumulación en el foco de lesión (reclutamiento). El aumento de la permeabilidad vascular, por el ensanchamiento de los poros en los capilares o lesión endotelial directa, da lugar a un exudado de líquido rico en proteínas (edema). Esta respuesta inflamatoria es útil para el mecanismo de defensa destinado a matar bacterias, virus y parásitos mientras aún facilita la reparación de heridas (Robbins y Cotran, 2010; Ward, 2010).

Inflamación crónica: Es una respuesta inflamatoria que se ha prolongado en el tiempo (semanas, meses o años) y se caracteriza por la infiltración de linfocitos, macrófagos y células plasmáticas resultando en angiogénesis, fibrosis y necrosis tisular (Robbins y Cotran, 2010; Ward, 2010). Además, se ha establecido una asociación entre la inflamación crónica y una variedad de enfermedades como cáncer, diabetes, hipertensión, autoinmunes, cardiovasculares y neurológicas, así como en el proceso de envejecimiento (Scriver et al., 2011).

2.1.2 Mediadores moleculares en la respuesta inflamatoria

El proceso inflamatorio es una combinación de varias vías como la síntesis de prostaglandinas, interleucinas, quimiotoxinas; acción del receptor de la proteína adhesiva; factores activadores de plaquetas y todos pueden actuar como agonistas quimiotácticos. La inflamación se inicia con cualquier estrés en la membrana o por otro desencadenante o estímulo, estos activan la hidrólisis del fosfolípido de membrana mediante la fosfolipasa A en ácido araquidónico, que además es sustrato para las enzimas ciclooxigenasas (COX) y lipooxigenasas (LOX) y subproductos de estas son las prostaglandinas E₂, H₂ (PGE₂, PGH₂) y leucotrienos como LTC₄, LTB₄ (Medzhitov, 2008).

Una de las claves fundamentales en la inflamación es la liberación secuencial de mediadores tales como: aminas bioactivas, eicosanoides, citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento que regulan el aumento de la permeabilidad vascular y el reclutamiento de

leucocitos de transmisión sanguínea. Entre las dianas terapéuticas más importantes en la cascada proinflamatoria incluyen las enzimas COX-1 y COX-2, la inosina monofosfato deshidrogenasa, receptores para citocinas y quimiocinas, factor de necrosis tumoral (TNF- α), la interleucina (IL)-1 β y la IL-1RA, IL-2 e IL-2R, el interferón (IFN)- α 2, IFN- β 1, y IFN- γ , receptores acoplados a proteínas G, histamina 1 y cisteinil leucotrieno 1; receptores nucleares de hormonas, factores nucleares (NF- κ B) (Gautam y Jachak, 2009).

2.1.3 Principales agentes antiinflamatorios

La característica ideal que debe tener un fármaco eficaz es la de inhibir el desarrollo de la inflamación sin interferir en la homeostasis normal, de igual manera la alta prevalencia de la inflamación obliga al desarrollo de nuevos fármacos con moléculas más seguras y eficientes. A partir de la premisa anterior, hoy en día se encuentran disponibles agentes terapéuticos con diferentes mecanismos de acción. A continuación, se mencionan los más importantes.

Inhibidores de prostaglandinas (AINE): Dentro de este grupo, los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) son los más empleados a nivel mundial, con un estimado de alrededor de 30 billones de dosis al año, solo en Estados Unidos (Smith et al., 2017), siendo su principal característica la alta inhibición de las isoenzimas ciclooxigenasas (COX-1 y COX-2) implicadas en la síntesis de los mediadores inflamatorios prostaglandinas y tromboxanos, en especial, se han desarrollado AINES que sean selectivos para COX-2, capaces de inhibir en especial la PGE2 (Dinarello, 2010); sin embargo, este mecanismo de acción está asociado a reacciones adversas en el consumo de estos fármacos, como son los gastrointestinales: esofagitis, úlceras y perforaciones (Lounkine et al., 2012).

Glucocorticoides: El mecanismo principal mediante el cual reducen la inflamación es la reducción de la expresión de genes inducidos por las citocinas. Los glucocorticoides entran en todas las células y se unen al receptor de esteroides citoplásmicos, y luego este complejo se trasloca al núcleo donde es reconocido por secuencias específicas de ADN (Dinarello, 2010). Los glucocorticoides afectan casi todo el organismo, por ello las reacciones adversas especialmente tras la terapia sistémica son múltiples y variadas, tales como, atrofia de la piel y los músculos, retraso en la cicatrización de las heridas, mayor riesgo de infección, osteoporosis y necrosis ósea, glaucoma y cataratas, cambios de comportamiento, hipertensión, úlceras pépticas y hemorragia gastrointestinal y diabetes, en su mayoría que dependientes de la dosis y la duración de la administración (Schäcke et al., 2002).

Mediadores lipídicos: Se han identificado nuevas clases de autacoides implicados en el proceso de resolución de la inflamación: lipoxinas, resolvinas de las series E y D, protectinas y maresinas. Estos mediadores lipídicos especializados pro-resolución previenen la inflamación excesiva y promueven la eliminación de microbios y células apoptóticas, favoreciendo la resolución y el retorno al homeostasis tisular. Su identificación y la de los mecanismos bioquímicos y procesos celulares implicados han cambiado la consideración de la resolución de la inflamación aguda de un proceso pasivo a un proceso tisular activo programado. La aspirina desencadena la biosíntesis de los mediadores lipídicos pro-resolución (Buckley et al., 2014).

Terapias biológicas: Dentro de este grupo destacan los anticuerpos monoclonales, los cuales actúan bloqueando la actividad de citocinas proinflamatorias. El bloqueo de la actividad de las citosinas proinflamatorias IL-1, TNF, IL-6, IL-12, IL-17, IL-18, o IL-23 reduce la inflamación y suprime las vías específicas que activan las células T. El anticuerpo monoclonal anti-TNF- α para el tratamiento de la enfermedad de Crohn es un buen ejemplo de este tipo de terapias (Dinarello, 2010).

2.1.4 Compuestos de plantas medicinales con actividad antiinflamatoria

Las plantas medicinales han sido el principal remedio para tratar varias enfermedades durante mucho tiempo y hoy en día, muchos medicamentos se han desarrollado a partir de la medicina tradicional. El encontrar plantas para el tratamiento de la inflamación ha sido uno de los enfoques de la medicina tradicional desarrollada en diversas regiones del mundo y que a partir del conocimiento generado permite buscar los compuestos presentes en las especies vegetales empleadas con dicho fin, como ejemplo, desde la antigüedad plantas que contienen salicilatos como la corteza del sauce, fueron empleados como antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos y condujeron al desarrollo de la aspirina, muy empleada en la práctica clínica en la actualidad (Yuan et al., 2016).

Los metabolitos con actividad antiinflamatoria provenientes de plantas medicinales reflejan una amplia diversidad en cuanto a su estructura, perteneciendo a grupos químicos como alcaloides, esteroides, terpenos, polifenoles, fenilpropanoides, flavonoides, ácidos grasos y lípidos, etc. Entre los posibles compuestos que en la actualidad se consideran como líderes en actividad antiinflamatoria se contemplan a la curcumina, resveratrol, baicaleína, ácido boswélico, ácido betulínico, ácido ursólico y oleanólico (Gautam y Jachak, 2009). Dentro de los grupos de compuestos que han mostrado actividad antiinflamatoria, en este documento

nos enfocamos a los terpenos, flavonoides y polifenoles que corresponden a las estructuras de los principales metabolitos aislados de la especie en estudio (figura 2).

Terpenos: Dentro de este grupo podemos mencionar a como ejemplo a un nuevo glicósido triterpénico lanostánico aislado de la fruta de *Fomitopsis pinicola*, el cual presentó un mayor efecto inhibitorio sobre la enzima COX-2 que indometacina (CI_{50} 0.60 mM) y un débil efecto sobre la COX-1 (Gautam y Jachak, 2009). El ácido boswélico aislado de *Boswellia serrate* y de *Boswellia carteri* con efecto antiinflamatorio, inmunomodulador y antiasmático, uniéndose a las quinasas $IKK\alpha$ y $IKK\beta$ restringiendo su acción y posterior modulación de la señalización de NF- κ B (Jeong y Bae, 2014). El ácido ursólico, un triterpeno pentacíclico, encontrado en hojas, flores y frutos de muchas plantas medicinales empleadas en el tratamiento de la inflamación, su actividad ha sido asociada a su capacidad de inhibir el metabolismo del ácido araquidónico, en la reducción de la producción de las enzimas óxido nítrico sintasa (iNOS) y COX-2 vía represión de NF- κ B en macrófagos RAW264.7. De las semillas de *Podocarpus nagi* fueron aislados diterpenos tipo abietanos, destacando el 7-oxo-18-hidroxi ferruginol, que inhibió significativamente la producción de NO ($CI_{50} = 5.38 \pm 0.17 \mu\text{M}$), suprimió la expresión iNOS de forma dosis-dependiente (Feng et al., 2017).

Flavonoides: Constituyen una clase importante de compuestos polifenólicos, ampliamente distribuidos en el reino vegetal y que han mostrado una importante actividad antiinflamatoria, como la luteólina y la quercetina que inhibieron la producción de TNF- α y IL-6 en células RAW264.7 estimuladas por lipopolisacárido (LPS). De igual forma, flavonoides como la apigenina, hesperidina y luteolina han mostrado actividad antiinflamatoria y se considera que la vía es mediante la inhibición de sistemas enzimáticos como tirosina y serina-treonina protein quinasa, las cuales están involucradas en la transducción de señal y activación procesos en células del sistema inmune (Kumar y Pandey, 2013).

Polifenoles: Los polifenoles son compuestos sintetizados por las plantas de manera ubicua y se encuentran presentes ya sea como glicósidos o agliconas libres y están asociados con el color y sabor de las especies vegetales, así como de sus propiedades medicinales como la antiinflamatoria. Es un grupo numeroso de compuestos y de acuerdo a su estructura química pueden ser clasificados como flavonoides, chalconas, antocianinas, proantocianidinas, no flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos y aminas fenólicas (Yahfoufi et al., 2018). En el caso del resveratrol, se sabe que regula la respuesta inflamatoria, al inhibir la síntesis y liberación de mediadores proinflamatorios, modificación en la biosíntesis de eicosanos, así como la inhibición de las enzimas iNOS y COX-2 (Rathee et al., 2009).

De la curcumina, que es un polifenol no flavonoide, presente en los rizomas de la *Curcuma longa*, se demostró que reduce la expresión de citocinas inflamatorias: TNF y IL-1, moléculas de adhesión ICAM-1 (molécula-1 de adhesión intercelular) y VCAM-1 (molécula-1 de adherencia de células vasculares) en células endoteliales de la vena umbilical humana y mediadores inflamatorios como prostaglandinas y leucotrienos; también inhibe a enzimas como las ciclooxigenasas (COX) y lipooxigenasas (LOX) involucradas en la respuesta inflamatoria (Marchiani et al., 2014). Los ácidos cafeíco y rosmarínico, son polifenoles presentes en muchas especies del género *Salvia*, las cuales son usadas en la medicina tradicional para el tratamiento de la inflamación, como es la *Salvia miltiorrhiza*, en la cual se encuentran presentes ambos ácidos fenólicos, así como derivados esterificados de los mismos; todos ellos han mostrado un efecto antiinflamatorio muy importante, donde se ha demostrado que inhiben fuertemente la producción de las enzimas iNOS y COX-2 (Choi et al., 2018).

Ácidos Grasos: Cuatro ácidos grasos como el ácido α -linolénico (ALA), ácido docosahexaenoico (DHA), ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido 5-tia-8,11,14,17-icosatetraenoico que están presentes en muchas plantas han sido reportados por su elevado efecto inhibitorio sobre las enzimas COX-2 y COX-1, involucradas en la biosíntesis de prostaglandinas (Gautam y Jachak, 2009). En general, los reportes indican que los ácidos grasos entre 18 a 20 átomos de carbono y con insaturaciones son los que mayor actividad antiinflamatoria presentan, esto puede derivarse que probablemente las enzimas los prefieren como sustratos, contrario a los ácidos grasos saturados que son proinflamatorios en parte al imitar la acción del LPS (Fritsche, 2015).

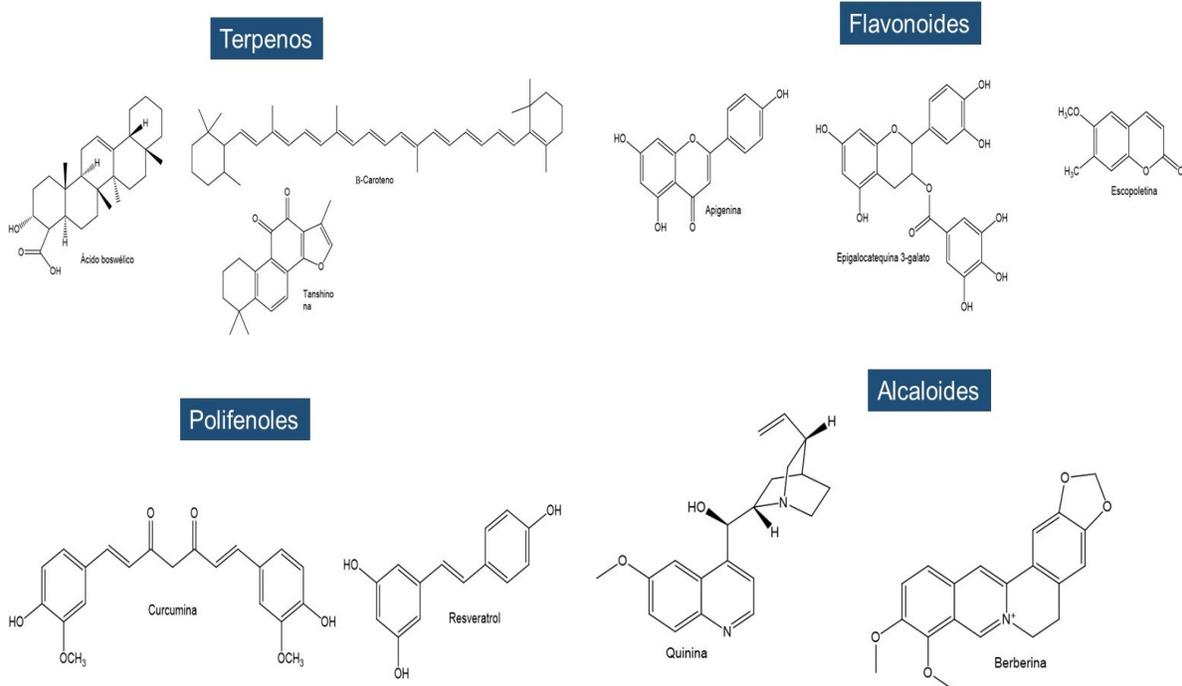


Figura 2 Principales grupos de compuestos aislados de plantas con actividad biológica

2.2 Radicales libres

Es un átomo o molécula que contiene uno o más electrones desapareados y son productos normales de muchas vías metabólicas. Algunos se encuentran en concentraciones controladas ya que realizan funciones esenciales como la de control en las vías de señalización reguladas por redox; otros existen en forma libre e interactúan con varios componentes del tejido, tal interacción puede ocasionar disfunciones tanto agudas como crónicas (Keher y Klotz, 2015). Son altamente reactivos, con tiempos de vida media de microsegundos y pueden generar más radicales libre mediante reacciones en cadena con moléculas aledañas incrementando el daño potencial que pueden causar. Dentro de los grupos más importantes se encuentran las especies reactivas de nitrógeno (ERN), dentro de los cuales se conocen al óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), dióxido de nitrógeno (NO_2), y especies pro-radicales como el ácido nitroso (HNO_2); las especies reactivas de oxígeno (ERO), en este grupo destacan, el ión superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), radical alcóxido ($\text{RO}\cdot$), oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), y especies pro-radicales como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl) y ozono (O_3) (Apel e Hirt, 2004).

A nivel celular existen varios sitios de formación de radicales libres; en el caso de las ERO, la cadena de respiración mitocondrial es el principal sitio de producción seguido por los peroxisomas y el citosol; por otro lado, una de las células en donde existe la mayor

producción es el eritrocito seguido del cerebro, hígado y riñón que son órganos que presentan una alta tasa metabólica. A su vez, los ERN se producen principalmente en reacciones metabólicas en el citosol de la célula y como producto de la acción de enzimas localizadas en las membranas celulares en las células endoteliales de los vasos sanguíneos (Amir Aslani y Ghobadi, 2016).

2.2.1 Beneficios y daños ocasionados por radicales libres

Dentro del metabolismo oxidante de las células, existen muchas reacciones en las cuales se presenta una participación importante de los radicales libres derivados del oxígeno o del nitrógeno. En el caso de las ERO, han sido implicados en la síntesis de hormonas, proteínas, carbohidratos e incluso, la reacción de fusión del óvulo con el espermatozoide es un proceso mediado a través de ellos. Por su parte, las ERN fueron inicialmente descritas como responsables del proceso de la contracción del músculo liso en las células que componen el endotelio de los vasos sanguíneos y actualmente han sido involucradas en los procesos de regulación del metabolismo de las neuronas (Dröge, 2002). Por lo que a concentraciones bajas o moderadas pueden servir en la señalización y regulación en procesos celulares; por ejemplo, el óxido nítrico, es un importante neurotransmisor generado por las neuronas, así como un mediador clave en la respuesta inmune producida por macrófagos activados; de igual forma las ERO, participan en la transducción de señales, transcripción de genes, en la regulación de la actividad de la guanilato ciclasa, como defensa en procesos infecciosos de bacterias invasoras (Amir Aslani y Ghobadi, 2016).

En altas concentraciones, los radicales libres producen estrés oxidante, un proceso perjudicial que puede causar daño a todos los tipos de biomoléculas presentes en nuestro cuerpo, incluyendo proteínas, enzimas, aminoácidos, lípidos, ADN y carbohidratos. El daño a las proteínas y las enzimas que contienen azufre puede provocar desnaturalización, inactivación y reticulación (Pham-Huy et al., 2008); también se ha informado la oxidación de aminoácidos que poseen azufre o anillos aromáticos como la metionina, cisteína, fenilalanina, triptófano y tirosina, los cuales son propensos a ser oxidados por ERO. Aunque oxidativamente las proteínas modificadas son normalmente reconocidas y degradadas dentro de las células, algunas de ellas pueden acumularse gradualmente con el tiempo y conduce a una disfunción celular (Cecarini et al., 2007).

El daño oxidante a los carbohidratos puede resultar en la alteración de cualquiera de las funciones del receptor celular, tales como aquellas asociadas con respuestas hormonales y neurotransmisoras, actividad de interleucinas y formación de prostaglandinas.

Modificaciones como la escisión del ADN, la reticulación ADN-proteína, la oxidación de las purinas pueden ocurrir debido a reacciones con ERO, particularmente OH⁻. Enlaces insaturados en la membrana lipídica también son muy susceptibles al daño de los radicales libres resultando la peroxidación lipídica conduce a la ruptura de la membrana celular que a su vez resulta en modificaciones en fluidez y permeabilidad de la membrana, propiedades de transporte y proteínas incorporadas (Amir Aslani y Ghobadi, 2016).

Por último, si el estrés oxidante no se regula de manera adecuada, puede inducir a una variedad de enfermedades crónicas y degenerativas, como cáncer, enfermedades cardiovasculares, neurológicas, pulmonares, renales, artritis reumatoide, daño ocular, así como un proceso de envejecimiento acelerado y algunas patologías agudas (traumas, apoplejía) (figura 3) (Pham-Huy et al., 2008).

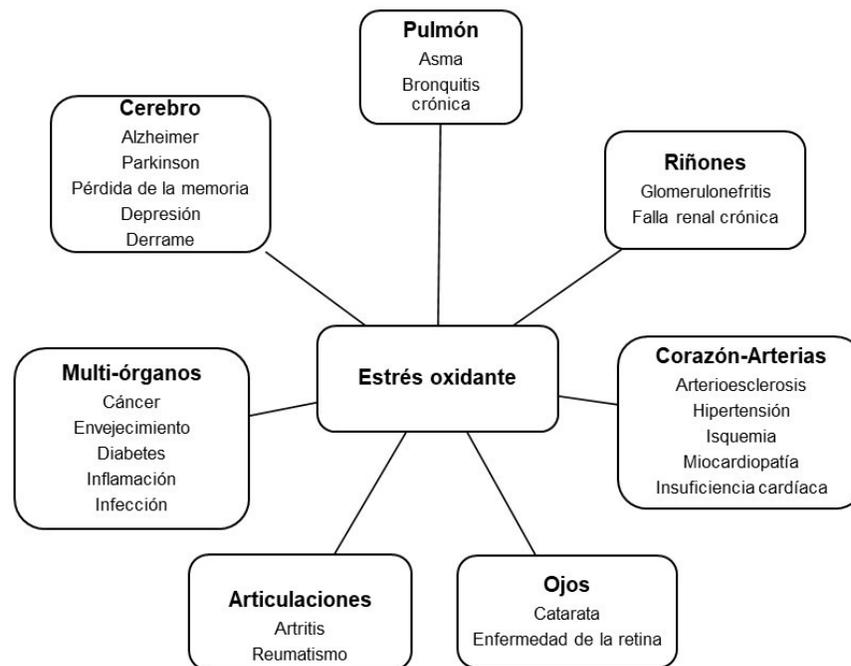


Figura 3 Enfermedades inducidas por estrés oxidante

2.2.2 Antioxidantes

El cuerpo humano tiene varios mecanismos para contrarrestar el estrés oxidante, mediante la producción de antioxidantes, ya sea generados naturalmente *in situ* (antioxidantes endógenos), o suministrados externamente (antioxidantes exógenos). La función de los antioxidantes son neutralizar el exceso de radicales libres para proteger a las células contra sus efectos tóxicos y contribuir a la prevención de enfermedades (Pham-Huy et al., 2008). Los antioxidantes endógenos pueden clasificarse como enzimáticos y no enzimáticos. Las principales enzimas antioxidantes involucradas en la neutralización de las ERO y ERN son: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GRx). SOD es la primera línea de defensa contra los radicales libres, catalizando la dismutación por reducción del radical anión superóxido en peróxido de hidrógeno, el cuál es transformado en agua y oxígeno (O₂) por CAT y/o GPx (Pham-Huy et al., 2008). Los antioxidantes no enzimáticos endógenos se producen por el metabolismo del cuerpo, como el ácido lipoico, el glutatión, la L-arginina, la coenzima Q10, la melatonina, el ácido úrico, la bilirrubina, las proteínas quelantes de metales, la transferrina, etc. (Willcox et al., 2004). Los antioxidantes exógenos se derivan principalmente de alimentos y plantas medicinales, es decir, frutas, verduras, cereales, hongos, flores, especias y hierbas medicinales tradicionales. Estos antioxidantes naturales a partir de materiales vegetales son principalmente polifenoles. (ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas, lignanos y estilbenos), carotenoides (xantofilas y carotenos) y vitaminas (vitamina E y C). En general, estos antioxidantes naturales, especialmente los polifenoles y carotenoides exhiben una amplia gama de efectos biológicos, como los antiinflamatorios, antibacteriano, antiviral, antienvjecimiento y anticancerígeno (Xu et al., 2017).

Terpenos: Dentro de este grupo destacan los tetraterpenos como el β -caroteno y licopeno con una elevada capacidad antioxidante, extracto de *Bixa orellana* que contiene bixina como principal carotenoide mostró capacidad para modular el equilibrio en la concentración de ERO y ERN y otro análogo la cis-bixina mostró capacidad de inhibir enzimas asociadas con el estrés oxidativo (Moraes et al., 2013). Los abietanos, grupo especial de diterpenos presentes en el género *Salvia*, han mostrado una elevada capacidad antioxidante en ensayos *in vitro* igual o mayor al ácido ascórbico, ácido vainílico y naringina. En un estudio comparativo de abietanos aislados del duramen de *Taiwania cryptomerioides*, en orden de mayor a menor capacidad antioxidante fueron, ferruginol, hinokiol, secoabietano, 6 β -acetoxi-7 α -hidroxiroyleanona, isopimarinol y sugiol. Los diterpenos, inuroyleanol, 7 α -

acetoxiroyleanona-12-metil éter, royleanona, horminona, 7-acetilhorminona y criptojaponol, aislados de las raíces de *Salvia barrelieri*, presentaron una elevada capacidad antioxidante en ensayos *in vitro*; se asocia la capacidad antioxidante de estos diterpenos a la presencia de grupos hidroxilos, metoxilos e insaturaciones como los responsables de dicha actividad (González-Burgos y Gómez-Serranillos, 2012).

Polifenoles: Los polifenoles no flavonoides, son ácidos fenólicos, que presentan un grupo carboxilo funcional y se clasifican en derivados de ácido benzoico y cinámico, muchos de ellos han estado presente en la dieta del ser humano y constituyen uno de los principales grupos de antioxidantes exógenos que ayudan a prevenir enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo (Moraes et al., 2013). Por ejemplo, el ácido cafeíco, un ácido hidroxicinámico, encontrado en altas concentraciones en la semilla del café y de algunas frutas, induce la apoptosis en células de cáncer de mama. Además, el uso de este compuesto para la protección contra daños ocasionados por el estrés oxidante ha sido evaluado y evidenciando que ayuda a prevenir los procesos de envejecimiento de la piel (Pluemsamran et al., 2012). Otros polifenoles antioxidantes como el ácido rosmarínico y ácido carnósico eliminan los radicales libres y estimulan las defensas antioxidantes endógenas, por ejemplo, la activación del factor nuclear (derivado de eritroide 2) similar al 2 (Nrf2); otros mecanismos de acción de estos compuestos son la modulación de la transducción en las cascadas de señalización o tienen efecto en la expresión genética (Ataie et al., 2010).

Flavonoides: La capacidad antioxidante de muchos flavonoides puede ser mucho más fuerte que la de las vitaminas C y E. Por ejemplo, el potencial de reducción de un electrón de galato de epigallocatequina presente en *Camellia sinensis*, es de 550 mV, menor que el de glutatión, que es de 920 mV. Además, pueden prevenir los daños ocasionados por los radicales libres por los siguientes mecanismos: captación directa de ERO, activación de enzimas antioxidantes, actividad quelante de metales, reducción de radicales α -tocoferol, inhibición de oxidasas, mitigación del estrés oxidante causado por ERN, aumento de los niveles de ácido úrico, incremento de las propiedades antioxidantes de compuestos de bajo peso molecular (Heim et al., 2002; Procházková et al., 2011).

2.3 Resistencia a los antibióticos

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un problema de salud a nivel mundial, en 2013, alrededor de 700, 000 muertes fueron reportadas por ésta causa y se espera que para el 2050, pueda llegar a constituirse como una de las principales causas de fallecimiento a nivel mundial con alrededor de 10 millones de casos potenciales (O'Neill, 2014). En México, la resistencia a antibióticos ocupa el 17vo lugar con un total de 3 754 casos de mortalidad (INEGI, 2015). La investigación sobre la resistencia bacteriana a los antibióticos en México se centró inicialmente en las infecciones gastrointestinales, aunque también se ha enfocado en la generación de reportes y en la descripción de los mecanismos de resistencia en aislamientos provenientes principalmente de muestras de pacientes con infecciones hospitalarias, así como de brotes, endemias o de patógenos persistentes. Se cuenta, igualmente, con un panorama general de la resistencia en las infecciones comunitarias más frecuentes en nuestro país, como son las de las vías respiratorias (Rodríguez-Noriega et al., 2014).

Los antibióticos son medicamentos utilizados para prevenir y tratar las infecciones bacterianas por lo que la resistencia se produce cuando las bacterias mutan en respuesta al uso de estos fármacos, éstas bacterias farmacorresistentes pueden causar infecciones en el ser humano y en los animales y esas infecciones son más difíciles de tratar que las no resistentes; además, la resistencia a los antibióticos hace que se incrementen los costos médicos, que se prolonguen las estancias hospitalarias y que aumente la mortalidad (OMS, 2018)

La resistencia bacteriana, surge de manera natural, principalmente por modificaciones genéticas o por un proceso de selección adaptativa, éste último ocurre cuando se somete una población bacteriana que contiene tanto mutantes resistentes y sensibles a la acción inhibitoria del antibiótico, llegando a producirse un efecto en el que las bacterias sensibles lleguen a inhibirse mientras que la subpoblación resistente puede continuar su desarrollo, llegando a sustituir a toda la población bacteriana, a esto se le llama proceso de selección adaptativa (Blair et al., 2015). Por lo que los antibióticos que estaban hechos para combatir a este tipo de población ahora pierden su efectividad y por lo tanto los pacientes se agraven aún más, requieren mayor tiempo de hospitalización y que los gastos por el nuevo tratamiento incrementen (O'Neill, 2014). Además, este problema se ha incrementado por el exceso de prescripción de antibióticos, los pacientes que no han acabado su tratamiento, el uso excesivo de antibióticos en la cría de ganado y pescado, el control inadecuado de

las infecciones en los hospitales y clínicas, la falta de higiene y saneamiento deficiente y la falta de desarrollo de nuevos antibióticos (tabla 1) (OMS, 2018).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) publicó en 2017, la lista de “patógenos prioritarios” resistentes a los antibióticos, en la que se incluyen las 12 familias de bacterias más peligrosas para la salud humana. La lista fue elaborada con el propósito de guiar y promover la investigación y desarrollo (I+D) de nuevos antibióticos, como parte de las actividades de la OMS para combatir el creciente problema mundial de la resistencia a los antimicrobianos. En la lista se pone de relieve especialmente la amenaza que suponen las bacterias Gram negativas resistentes a múltiples antibióticos, las cuales tienen la capacidad innata de encontrar nuevas formas de resistir a los tratamientos y pueden transmitir material genético que permite a otras bacterias hacerse farmacorresistentes. La lista de la OMS se divide en tres categorías con arreglo a la urgencia en que se necesitan los nuevos antibióticos: prioridad crítica, alta o media (OMS, 2017).

El grupo de prioridad crítica incluye las bacterias multirresistentes que son especialmente peligrosas en hospitales, residencias de ancianos y entre los pacientes que necesitan ser atendidos con dispositivos como ventiladores y catéteres intravenosos. Entre tales bacterias se incluyen las siguientes: *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y varias enterobacteriáceas como *Klebsiella*, *E. coli*, *Serratia*, y *Proteus*. Son bacterias que pueden provocar infecciones graves y a menudo letales, como infecciones de la corriente sanguínea y neumonías. Estas bacterias han adquirido resistencia a un elevado número de antibióticos, como los carbapenémicos y las cefalosporinas de tercera generación (los mejores antibióticos disponibles para tratar las bacterias multirresistentes). Los niveles segundo y tercero de la lista –las categorías de prioridad alta y media– contienen otras bacterias que exhiben una farmacorresistencia creciente y provocan enfermedades comunes como la gonorrea o intoxicaciones alimentarias por *Salmonella*. Los criterios para incluir patógenos en la lista fueron los siguientes: el grado de letalidad de las infecciones que provocan; el hecho de que el tratamiento requiera o no una hospitalización larga; la frecuencia con que presentan resistencia a los antibióticos existentes cuando infectan a las personas de las comunidades; la facilidad con la que se transmiten entre animales, de animales a personas y entre personas; si las infecciones que provocan pueden o no prevenirse (por ejemplo, mediante una buena higiene y vacunación); cuántas opciones terapéuticas quedan; y si se están investigando y desarrollando nuevos antibióticos para tratar las infecciones que causan (OMS, 2017).

Tabla 1 Lista OMS de patógenos prioritarios para la I+D de nuevos antibióticos (OMS, 2017)

Bacterias resistentes a antibióticos
<p>Prioridad 1: CRÍTICA</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Acinetobacter baumannii</i>, resistente a los carbapenémicos • <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, resistente a los carbapenémicos • Enterobacteriaceae, resistentes a los carbapenémicos, productoras de ESBL
<p>Prioridad 2: ELEVADA</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Enterococcus faecium</i>, resistente a la vancomicina • <i>Staphylococcus aureus</i>, resistente a la meticilina, con sensibilidad intermedia y resistencia a la vancomicina • <i>Helicobacter pylori</i>, resistente a la claritromicina • <i>Campylobacter</i> spp., resistente a las fluoroquinolonas • <i>Salmonellae</i>, resistentes a las fluoroquinolonas • <i>Neisseria gonorrhoeae</i>, resistente a la cefalosporina, resistente a las fluoroquinolonas
<p>Prioridad 3: MEDIA</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Streptococcus pneumoniae</i>, sin sensibilidad a la penicilina • <i>Haemophilus influenzae</i>, resistente a la ampicilina • <i>Shigella</i> spp., resistente a las fluoroquinolonas

2.3.1 Principales antibióticos

En el pasado, se consideraba que los antibióticos eran compuestos orgánicos producidos por un microorganismo que son tóxicos para otros microorganismos; como resultado de esta noción, un antibiótico originalmente se definió como una sustancia, producida por un microorganismo, o de origen biológico que a bajas concentraciones puede inhibir el crecimiento de o son letales para otros microorganismos. Sin embargo, esta definición se ha modificado en los tiempos modernos, para incluir antimicrobianos que también se producen parcial o totalmente por medios sintéticos (Etebu y Arikekpar, 2016). Mientras que algunos antibióticos pueden matar completamente otras bacterias, otros solo pueden inhibir su crecimiento. Los que matan las bacterias se denominan bactericidas, mientras que los que inhiben el crecimiento bacteriano se denominan bacteriostáticos (Walsh, 2003).

Hay varias formas de clasificar los antibióticos, pero los esquemas de clasificación más comunes se basan en sus estructuras moleculares, modo de acción y espectro de actividad.

Los antibióticos dentro de la misma clase estructural generalmente mostrarán un patrón similar de efectividad, toxicidad y efectos secundarios alérgicos potenciales. Algunas clases comunes de antibióticos basados en estructuras químicas o moleculares incluyen beta-lactámicos, macrólidos, tetraciclinas, quinolonas, aminoglicósidos, sulfonamidas, glicopéptidos y oxazolidinonas (figura 4) (Etebu y Arikekpar, 2016).

Beta-lactámicos: Los miembros de esta clase de antibióticos contienen un anillo de 3 carbonos y 1 nitrógeno altamente reactivo. Interfieren con las proteínas esenciales para la síntesis de la pared celular bacteriana y, en el proceso, destruyen o inhiben su crecimiento. De forma general, ciertas enzimas bacterianas denominadas proteína de unión a la penicilina (PBP) son responsables de la unión cruzada de unidades peptídicas durante la síntesis de peptidoglicano; los miembros de los antibióticos beta-lactámicos son capaces de unirse a estas enzimas PBP y, en el proceso, interfieren con la síntesis de peptidoglicano que resulta en la lisis y la muerte celular. Los representantes más destacados de la clase incluyen penicilinas, cefalosporinas, monobactámicos y carbapenémico (Guarlezi et al., 2013).

Macrólidos: Se caracterizan por tener un anillo macrocíclico de lactona con 14 a 16 miembros unidos a desoxiazúcares como L-cladinosa y D-desosamina. Tienen un espectro más amplio de actividad antibiótica que las penicilinas y a menudo se administran a pacientes alérgicos a la penicilina. Los macrólidos matan o inhiben los microorganismos efectivamente inhibiendo la síntesis de proteínas bacterianas; lo hacen uniéndose a los ribosomas bacterianos y, en el proceso, impiden la adición de aminoácidos a las cadenas polipeptídicas durante la síntesis de proteínas. Los macrólidos tienden a acumularse en el cuerpo porque el hígado puede reciclarlo en la bilis y también tienen la capacidad de causar inflamación, como resultado, los médicos generalmente recomiendan administrar dosis bajas, aunque, los macrólidos son generalmente de amplio espectro, algunas especies bacterianas como *Streptococcus pneumoniae* tienen resistencia contra esta clase de antibióticos. Ejemplo de miembros incluye eritromicina, azitromicina y claritromicina (Sköld, 2011).

Tetraciclinas: El primer miembro de esta clase fue la clorotetraciclina y los miembros de esta clase tienen como característica 4 anillos de hidrocarburos, a los que en su nombre se le agrega el sufijo “-ciclina”. Históricamente, los miembros de esta clase de antibióticos son agrupados en diferentes generaciones basados en el método de síntesis; los obtenidos por biosíntesis son considerados como la primera generación como son la tetraciclina, cloroteteciclina, oxitetraciclina y demeclociclina. Dentro de la segunda generación se

cuentan a la doxiciclina, limeciclina, meclociclina, metaciclina, minociclina y rolitetraciclina ya que fueron obtenidos mediante semi-síntesis. Los obtenidos mediante síntesis total como la tigeciclina son considerados como tercera generación.

Su blanco de acción es el ribosoma de las bacterias, interrumpiendo la adición de aminoácidos a las cadenas polipeptídicas durante la síntesis de proteínas en este orgánulo. A pesar de que llegaron a constituirse como antibióticos de amplio espectro, hoy día, numerosas bacterias han desarrollado resistencia a este tipo de fármaco (Chopra y Roberts 2001; Fouco, 2012).

Quinolonas: Esta clase de antibióticos fue descubierta por primera vez como ácido nalidíxico por científicos involucrados en la búsqueda de medicamentos antipalúdicos y se descubrió como una impureza durante el desarrollo de la quinina a principios de los años sesenta. Son capaces de interferir con la replicación y la transcripción del ADN en bacterias. Se han desarrollado dos grupos principales de compuestos a partir de la molécula básica: quinolonas y naftiridonas que incluyen cinoxacina, norfloxacin, ofloxacin, ciprofloxacina, temafloxacina, etc. Su estructura generalmente consiste en dos anillos, pero las generaciones recientes de quinolonas poseen una estructura de anillo adicional que les permite extender su espectro de actividad antimicrobiana a algunas bacterias, particularmente a las bacterias anaeróbicas que hasta ahora eran resistentes a la quinolona (Etebu y Arikekpar, 2016).

Aminoglicósidos: El primer compuesto de esta clase, fue la estreptomina aislada de los *Actinomicetos* del suelo y empleada contra *Mycobacterium tuberculosis*, el agente causal de la tuberculosis. Los aminoglicósidos están constituidos generalmente por 3 amino azúcares unidos mediante enlace glicosídico. Son de amplio espectro de actividad bacteriana al inhibir la síntesis de proteínas mediante la unión a una de las subunidades ribosómica. A pesar de su eficacia contra una amplia gama de infecciones, se encontró que la estreptomina era altamente tóxica; ésta desafortunada característica del medicamento requería la necesidad de buscar nuevos miembros de aminoglicósidos que aún serían efectivos contra las bacterias, pero menos tóxicos para los humanos. La búsqueda fue fructífera con los descubrimientos de antibióticos como gentamicina, neomicina, tobramicina y amikacina. La gentamicina es menos tóxica y se usa ampliamente para las infecciones causadas por bacterias Gram-negativas (*Escherichia*, *Pseudomonas*, *Shigella* y *Salmonella*). La tobramicina, en particular, se utiliza en el tratamiento de infecciones por *Pseudomonas* en pacientes con fibrosis quística (Guarlezi et al., 2013).

Sulfonamidas: Son el primer grupo de antibióticos utilizados en medicina terapéutica y aún desempeñan un papel muy importante en la medicina y la práctica veterinaria. Las sulfonamidas inhiben las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas como *Nocardia*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* y *Enterobacter*, *Chlamydia trachomatis* y algunos *Protozoos*, y se usan ampliamente en el tratamiento de diversas infecciones, como amigdalitis, septicemia, meningitis meningocócica, disentería bacilar y algunas infecciones del tracto urinario. En general, se cree que las sulfonamidas son bacteriostáticas en lugar de bactericidas y aunque se consideran buenas y efectivas para tratar diversas enfermedades e infecciones, se recomiendan y administran con precaución debido a su toxicidad y efectos secundarios, algunos de los cuales incluyen trastornos del tracto urinario, anemia hemolítica, porfiria, y reacciones de hipersensibilidad (Guarlezi et al., 2013).

Glicopéptidos: Los antibióticos glicopeptídicos se obtuvieron originalmente como productos naturales, pero en los últimos 20 años se observó la aparición de derivados semisintéticos con actividad mejorada y propiedades farmacocinéticas. Naturalmente, los glicopéptidos están hechos de un péptido cíclico de 7 aminoácidos, a los que se unen 2 azúcares, de ahí el nombre de glicopéptidos. La unión del antibiótico a su diana se produce a través de la formación de 5 enlaces de hidrógeno con la columna vertebral peptídica del fármaco; a veces, un cloro y / o azúcar adicional se adhiere (como es el caso en oritavancina) durante la síntesis; de manera similar, una cadena lipofílica lateral potencia la actividad antibacteriana y prolonga la vida media de los glicopéptidos (Etebu y Ariekpar, 2016).

Oxazolidinonas: Las oxazolidinonas son un grupo de antibióticos sintéticos aprobados recientemente para su uso. Linezolid que representa el primer miembro a sintetizar, fue aprobado para aplicación clínica solo en el año 2000; aunque el mecanismo de acción de éstos aún no se conoce completamente, se informa que interfieren con la síntesis de proteínas al unirse al sitio P de la subunidad 50S ribosomal; tienen un amplio espectro de actividad contra las bacterias Gram-positivas, como los estafilococos resistentes a la meticilina y la vancomicina, los enterococos resistentes a la vancomicina, los neumococos resistentes a la penicilina y los anaerobios. Las oxazolidinonas constituyen el fármaco de elección para tratar las infecciones quirúrgicas porque penetran y se acumulan fácilmente en el tejido, incluidos los huesos, los pulmones, las vegetaciones (crecimiento de las plantas en los tejidos), el hematoma y el líquido cefalorraquídeo (Bozdogan y Appelbaum, 2004).

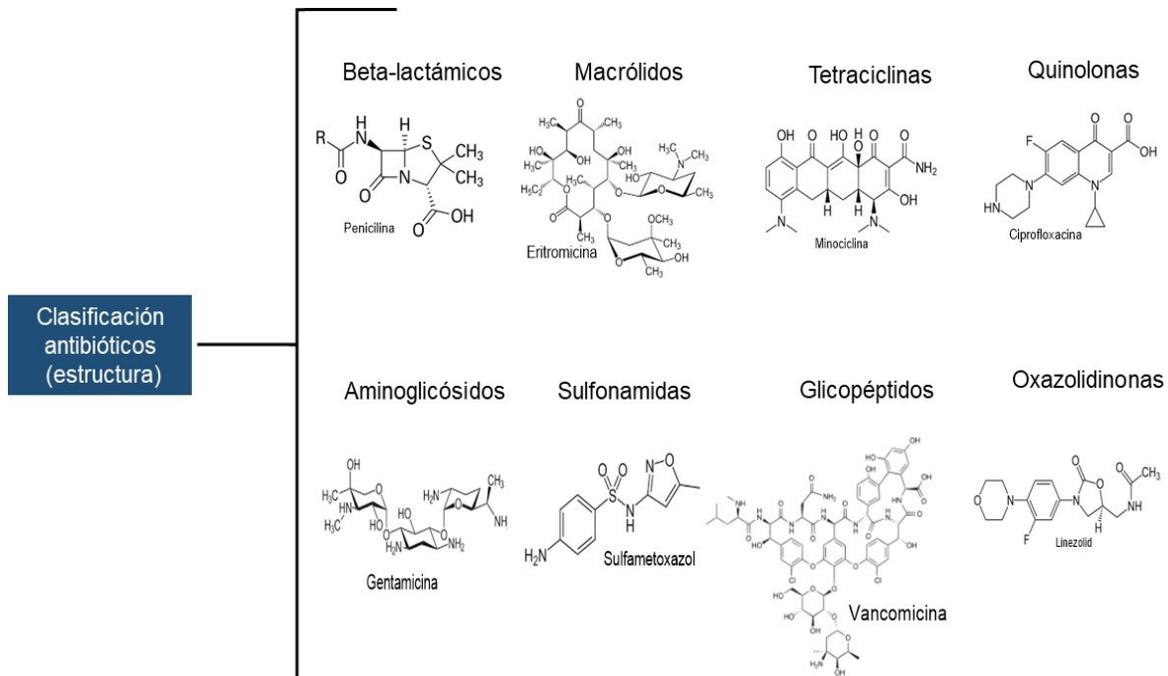


Figura 4 Clasificación de los antibióticos con base a sus estructuras moleculares

2.3.2 Compuestos de plantas medicinales con actividad antibacteriana

La creciente incidencia de patógenos farmacorresistentes ha llamado la atención de las comunidades farmacéutica y científica hacia estudios sobre la posible actividad antimicrobiana de las sustancias derivadas de las plantas, una fuente no explotada de quimiotipos antimicrobianos, que se utilizan en la medicina tradicional en diferentes países. En un estudio realizado por Sharma y colaboradores, se reporta que en México hay alrededor de 343 especies vegetales que han demostrado *in vitro* actividad antibacteriana contra 72 cepas como son, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Sharma et al., 2017). Dentro de los principales compuestos que han mostrado actividad antibacteriana destacan, los flavonoides, polifenoles, terpenos y alcaloides.

Flavonoides: La actividad antibacteriana de los flavonoides depende de las sustituciones que tengan en los anillos aromáticos presentes en sus estructuras, principalmente grupos hidroxilos, mejoran su actividad, mientras que grupos metilos la disminuyen. Los mecanismos antibacterianos propuestos para los flavonoides son los siguientes: inhibición de la síntesis de ácido nucleico, inhibición de la función de la membrana citoplásmica, inhibición del metabolismo energético, inhibición de la unión y formación de biopelículas, inhibición de la porina en la membrana celular, alteración de la permeabilidad de la

membrana, y atenuación de la patogenicidad (Xie et al., 2015). Por ejemplo, Kuete demostró que entre los flavonoides que hidroxilan los grupos prenilo de la estipulina, los compuestos obtenidos, la angusticornina B y la bartericina A, tenían una actividad antimicrobiana superior (Kuete, 2010). Así, el grupo prenilo juega un papel importante en la actividad de los chalconas. Recientemente, dos flavonoides (6-hidroxi-7-metoxiluteolina y 8-carboximetil-1,5,6 trihidroxi-3-metoxixantona) extraídos de las hojas de *Leiothrix spiralis*, una planta sudamericana perteneciente a la familia *Eriocaulaceae*, mostraron una potente actividad contra *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (Araujo et al., 2011).

Polifenoles: Son ampliamente distribuidos en las plantas, donde las protegen contra infecciones microbianas; en especial, las quinonas y los taninos han mostrado una elevada actividad antimicrobiana. Las quinonas (anillos aromáticos con dos sustituciones de cetonas), de naturaleza ubicua, son otro grupo significativo de metabolitos secundarios con posibles propiedades antimicrobianas. Proporcionan una fuente de radicales libres estables e irreversiblemente complejos con aminoácidos nucleófilos en proteínas microbianas que determinan la pérdida de su función. Las antraquinonas en particular tienen un gran espectro antibacteriano basado en la inactivación y la pérdida de la función de proteínas bacterianas, como las adhesinas, los polipéptidos de la pared celular y las enzimas unidas a la membrana, lo que conduce a la muerte de los patógenos (Kurek et al., 2011). Los taninos son un grupo de sustancias fenólicas poliméricas que se encuentran en casi todas las partes de las plantas caracterizadas por su actividad antibacteriana debido a la inactivación de las adhesinas bacterianas, enzimas, envoltura celular y proteínas de transporte. Recientemente, los extractos de plantas ricas en galotaninos demostraron actividades inhibitorias en diferentes bacterias atribuibles a su fuerte afinidad por el hierro ya la inactivación de proteínas unidas a la membrana (Engels et al., 2011).

Terpenos: La actividad antibacteriana de algunos monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos manifiesta una fuerte influencia de la estructura y la función del potencial antibacteriano de los terpenos. Los diterpenos y sesquiterpenos, aislados de diferentes plantas exhibieron actividad bactericida contra las bacterias Gram-positivas e inhibieron el crecimiento de *M. tuberculosis*; el ácido isopimárico, que es un diterpeno tipo abietano, aislado de los conos inmaduros de *Pinus nigra* inhibió el crecimiento de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilicina (Smith et al., 2005). El mecanismo de acción de los terpenos no se comprende completamente, pero se especula que involucra la ruptura de la membrana por los compuestos lipofílicos (Kurek et al., 2011; García et al., 2012). De especial interés son dos triterpenos pentacíclicos: el ácido ursólico y el ácido oleanólico, así

como sus derivados glicosilados; se ha demostrado que ambos ácidos afectaron el metabolismo del peptidoglicano en *Listeria monocytogenes* (Kurek et al., 2010).

Alcaloides: Los alcaloides son compuestos de nitrógeno heterocíclicos caracterizados por diferentes actividades antimicrobianas. Se han identificado varios monómeros de alcaloides antibacterianos potentes (CMI \geq 10 $\mu\text{g/mL}$) como son indol, indolizidina, isoquinolina, piperazina, quinolina, quinolona, agelasina y poliamina; alcaloides diméricos con efecto similar son bisindol, indol-quinolina, piridoacranina, bispirrol, pirrol-indometazol; la información toxicológica de estos compuestos es limitada, pero en *in vitro*, queleritrina, hapalindol y prosopilosindona, mostraron actividad antibacterial en concentraciones que no fueron hemolíticas o no fueron tóxicas para células Vero (Cushnie et al., 2014). La berberina, un alcaloide de la isoquinolina, presente en las raíces y en las especies de *Berberis*, es un catión hidrofóbico ampliamente utilizado en la medicina tradicional debido a su actividad contra bacterias, hongos, protozoos y virus, se acumula en células impulsadas por el potencial de membrana y es un excelente intercalador de ADN activo en varios microorganismos con un objetivo en la ARN polimerasa, girasa y topoisomerasa IV y en el ácido nucleico (Yi et al., 2007).

2.4 Plantas y medicina tradicional: Panorama general

El empleo de plantas para el tratamiento de diversas enfermedades ha sido una práctica recurrente desde cientos de años en casi todos los pueblos del mundo, llegando a constituirse como un elemento fundamental de la cultura de los mismos, lo que comúnmente se ha denominado como medicina tradicional, en donde las plantas medicinales son administradas en forma de extractos crudos, como tinturas, infusiones, cataplasmas y otras formulaciones herbolarias (Balunas et al., 2005).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce y define la medicina tradicional, como la suma total de los conocimientos, capacidades y prácticas basados en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas, bien sean explicables o no, utilizadas para mantener la salud y prevenir, diagnosticar, mejorar o tratar enfermedades físicas y mentales; de igual manera, alude a la medicina complementaria o medicina alternativa como un amplio conjunto de prácticas de atención de salud que no forman parte de la tradición ni de la medicina convencional de un país dado ni están totalmente integradas en el sistema de salud predominante. En algunos países, esos términos se utilizan indistintamente para referirse a la medicina tradicional; por lo anterior, dicho organismo internacional fusiona ambos aspectos y plantea lo que ha denominado como

medicina tradicional y complementaria (MTC), abarcando también, productos, prácticas y profesionales. Actualmente, la estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014 -2023 busca ayudar a las autoridades sanitarias a encontrar soluciones que propicien una visión más amplia respecto del mejoramiento de la salud y la autonomía de los pacientes. La estrategia tiene dos objetivos principales, a saber: prestar apoyo a los Estados Miembros para que aprovechen la posible contribución de la MTC a la salud, el bienestar y la atención de salud centrada en las personas, y promover la utilización segura y eficaz de la MTC mediante la reglamentación de productos, prácticas y profesionales mediante el desarrollo de una base de conocimientos y formulación de políticas nacionales, fortalecimiento de la seguridad, la calidad y la eficacia mediante la reglamentación y fomento de la cobertura sanitaria universal por medio de la integración de servicios de MTC y la autoatención de salud en los sistemas nacionales de salud (OMS, 2013). Lo anterior, apunta la importancia que tendrá la MTC los próximos años y en especial las plantas medicinales dentro de los productos de mayor empleo en la misma, por lo que es necesario realizar estudios sobre las propiedades terapéuticas de las mismas que coadyuven en su eficacia y seguridad.

En México, la MTC es la primera forma de atención a la salud y en muchas situaciones, la única posibilidad de atención para diversos padecimientos, especialmente en zonas de marginación social y económica. Por lo que desde 2001, y con fundamento en la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos, se han venido desarrollado políticas gubernamentales que buscan garantizar el acceso a los servicios de salud a toda la población aprovechando la MTC y en especial el empleo de las plantas medicinales y sus derivados, por lo que en los programas nacionales de salud recientes se promueve el estudio y validación científica de la MTC, y en el caso de las plantas es necesario someterlas a estudios que permitan identificar los principios activos asociados con el uso tradicional, lo cual podrá permitir un uso más racional y establecimiento de esquemas regulatorios que garanticen la eficacia y seguridad en el desarrollo de medicamentos herbolarios (Gómez-Castellanos, 2009).

2.5 Compuestos bioactivos a partir de plantas medicinales

La identificación de la propiedad medicinal de una especie vegetal es en la inmensa mayoría de los casos por ensayo y error, éste conocimiento ha sido en algunos casos documentados en libros y códices, mientras otros fueron preservados mediante la transmisión oral de una generación a otra. Hoy en día este cúmulo de saberes constituyen un elemento central en estudios etnomédicos y que permiten un acercamiento sistemático multidisciplinario con el propósito de reconocer mediante bases científicas las propiedades terapéuticas que una especie vegetal pueda tener y en muchos casos, descubriendo los compuestos presentes y que se relacionan directamente con la propiedad atribuida a la planta (Mustafa et al., 2017). En los últimos años, la demanda de remedios y medicamentos herbolarios ha tenido un gran incremento a nivel mundial; la OMS estima que alrededor de un 65 -80% de la población a nivel mundial los están empleando ya sea para la atención primaria o complementaria en el tratamiento de algún padecimiento (Thomford et al., 2018) por lo que es necesario realizar investigación de las plantas usadas tradicionalmente, así como de nuevas especies vegetales que se han introducido en la MTC, en la búsqueda de nuevos compuestos con potencial terapéutico.

Las plantas medicinales desde épocas tempranas han sido fuente para el descubrimiento de nuevos compuestos y el desarrollo de fármacos, como lo han sido la codeína, empleando como analgésico y aislada del *Papaver somniferum*, la digitoxina, un glucósido cardiotónico aislado de la *Digitalis purpurea* y la quinina, empleado como antipalúdico que fue aislado de la corteza de la *Cinchona officinalis* (Bluter, 2004) y en época reciente, anticancerígenos como el taxol aislado del *Taxus brevifolia* y la vinblastina aislada del *Catharanthus roseus*, se están empleando eficazmente como fármacos para el tratamiento del cáncer (Horwitz, S.B., 2004; Okouneva et al., 2003). Actualmente, hay un interés creciente en el estudio de las plantas medicinales como una alternativa que mediante estrategias de investigación y desarrollo apropiadas puedan obtenerse compuestos activos y desarrollarse medicamentos innovadores que den respuesta a los desafíos en salud a nivel mundial. Sin embargo, esto sigue representando un gran desafío ya que la búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos, se estima la inversión de un tiempo aproximado de 10 años en adelante y una inversión de 800 millones de dólares (Dickson y Gagnon, 2004), por lo que se hace necesario el mejoramiento continuo e implementación de nuevas técnicas que análisis que permitan ir disminuyendo tiempos y costos, así como un mayor aseguramiento de la eficacia y seguridad de los nuevos fármacos (figura 5).

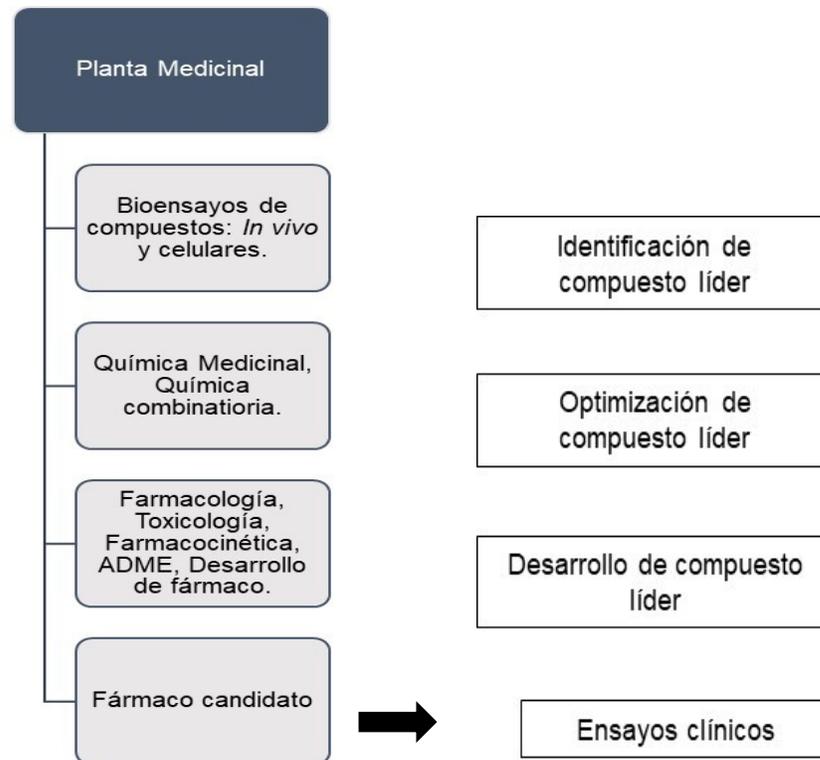


Figura 5 Esquema típico en el descubrimiento y desarrollo de medicamentos a partir de plantas medicinales (Dickson y Gagnon, 2004)

En el estudio de plantas medicinales, el aislamiento y caracterización de compuestos con actividad biológica son estrategias fundamentales hoy en día, en las cuales se están desarrollando mejores técnicas que permiten optimizar los rendimientos y una caracterización apropiada de los mismos; llegando algunas de estas técnicas a emplearse en la estandarización de un compuesto activo en medicamentos herbolarios. Dentro de las técnicas que han venido a contribuir significativamente, se encuentra la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR), la cual se ha acoplado a la Espectrometría de Masas; de igual forma la Resonancia Magnética Nuclear (RMN) tanto uni como bidimensionales han permitido avances significativos en la caracterización de compuestos que pueden aislarse solo en pequeñas cantidades. Hoy día, continúan desarrollando técnicas para una mejor extracción y aislamiento como es el empleo de fluidos supercríticos, uso de microondas y ultrasonido, empleo de membranas selectivas, entre otras (Williams et al., 2012; Gil-Chavez et al., 2013; Hofstetter et al., 2018); por último, la introducción de nuevas tecnologías “omics”, automatización y modelación molecular en años recientes, están permitiendo avances significativos en una mejor elucidación de compuestos complejos, así como estudiar sus efectos moleculares en condiciones fisiológicas (Özdemir, 2015)

Por último, es importante señalar que, en el futuro inmediato, el desarrollo de medicamentos innovadores a partir de especies vegetales, requiere de un enfoque multidisciplinario donde se apliquen diferentes metodologías innovadoras que permitan acercarlos a la práctica médica de forma segura y eficaz, para dar respuesta a los desafíos en salud que enfrentará la próxima generación.

2.6 Plantas medicinales en México

En nuestro país, se considera que unas 4,000 especies de plantas (alrededor del 15% de la flora total), se les atribuye propiedades medicinales, Sin embargo, se estima que la validación química, farmacológica y biomédica de los principios activos que contienen se ha llevado a cabo sólo en 5% de estas especies, tomando en cuenta que una sola planta medicinal puede contener de ocho a diez principios activos, los cuales pueden encontrarse o no dependiendo de la edad de la planta, clima, época del año, suelo, humedad, entre otros (Ocegueda, et al., 2005).

Dentro de los principales esfuerzos para integrar la información generada con respecto a las plantas medicinales en México, se encuentra la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, publicada por la Secretaría de Salud y que tiene como propósito establecer los lineamientos oficiales relacionados con el control de calidad, destinados a asegurar la idoneidad de las plantas utilizadas, haciendo especial énfasis en su identidad (nombre científico) y optimización. Además, trata de establecer los métodos de análisis y especificaciones técnicas que deberán cumplir las plantas y los derivados de ellas utilizados en la elaboración de medicamentos y remedios herbolarios, contribuir al mejoramiento de la calidad de los productos y a su uso adecuado, así como difundir y promover el potencial terapéutico de la flora de México (FHEUM, 2013). Sin embargo, todavía existen una amplia variedad de especies vegetales que se utilizan en la MTC de nuestro país, de las que no se cuenta con información oficial para su correcto empleo y en otros casos no falta integrarla la Farmacopea herbolaria.

En el estado de Morelos, se encuentran reportadas alrededor de 570 especies de plantas y de ellas un 43.3% están catalogadas como medicinales (CONABIO-UAEM, 2004), las cuales están integradas en tres familias principalmente: Asteraceae, Fabaceae y Lamiaceae, dentro de esta última se tiene al género *Salvia* donde se encuentran varias especies reconocidas por su uso en la medicina tradicional, atribuido a los terpenos que poseen (Monroy-Ortiz y Castillo-España, 2007), siendo una de ellas la especie *Salvia sessei*, la cual fue objeto de estudio en el presente trabajo.

2.7 Antecedentes de la especie *Salvia sessei* Benth

2.7.1 Género *Salvia*

El género *Salvia* pertenece a la familia Lamiaceae, la cual está compuesta por 220 géneros y alrededor de 4 000 especies (Frodin, 2004); es un género muy abundante que incluye de 900 a 1000 especies a nivel mundial (Rosua, et al., 1986); encontrándose principalmente en tres regiones del mundo: Centro y Sudamérica (500 especies), Asia Central y Región del Mediterráneo (250 especies) y Asia Oriental (90 especies). Las formas de crecimiento en *Salvia* incluyen hierbas anuales y perennes, arbustos y rara vez arbustos trepadores; las flores presentan cáliz y corola bilabiados, el ovario se divide en 4 lóculos y el estilo es ginobásico. La característica principal que la distingue de otros géneros de Lamiaceae es la presencia de 2 estambres, en los cuales la parte estéril del conectivo funciona como una palanca, lo que permite que el polen se adhiera a la cabeza o cuerpo de los polinizadores, principalmente abejas o colibríes (Jay, et al., 2004).

En México, alrededor de 300 especies del género *Salvia* se encuentra principalmente en las zonas serranas localizadas hacia la vertiente del océano Pacífico, principalmente en la zona centro-sur del país; los subgéneros *Audibertia* y *Calosphace* son las de mayor presencia en nuestro país (Espejo y Ramamoorthy, 1993; Frago-Martínez y Martínez Gordillo, 2013). En el estado de Morelos, se estima que existen alrededor de 8 especies endémicas de éste género localizadas en zonas de bosque tropical caducifolio, dentro de ellas se encuentra la especie *Salvia sessei*. (CONABIO-UAEM, 2004).

2.7.2 Estudios etnofarmacológicos del género *Salvia*

Derivado de la amplia presencia del género *Salvia*, en muchas regiones del planeta, muchas especies se han empleado en la MTC de forma milenaria, por lo que se han hecho estudios etnofarmacológicos con el objetivo de documentar el conocimiento en su uso tradicional, así como los cambios evolutivos derivados de la adopción de nuevos conocimientos en las comunidades donde son empleadas, como ejemplo de ello, Li M. y colaboradores, encontraron en la república de China, alrededor de 40 especies de *Salvia* que han sido empleadas por cientos de años en la medicina tradicional de este país para el tratamiento de una amplia diversidad de enfermedades; el estudio incluyó información detallada sobre el nombre que se le da a las especies en las comunidades, condiciones ambientales de crecimiento, distribución y efectos terapéuticos. Además, se incluyó información sobre reportes de investigación fitoquímica y farmacológica de las especies mayor uso, como la *Salvia miltiorrhiza*, empleada en enfermedades del corazón, otras

especies son empleadas en enfermedades ginecológicas, problemas musculares y esqueléticos, enfermedades urinarias, problemas oftálmicos, entre otros. Por último, destacan la evolución en el uso tradicional, siendo principalmente infusiones de las especies solas o en combinación con otras, hasta la generación actual de preparados herbolarios que se encuentran en el mercado de los fitofármacos (Li, et al., 2013).

En nuestro país, si bien no se encontró un estudio etnofarmacológico exclusivo para el género *Salvia*, podemos destacar la presencia de algunas de sus especies dentro de trabajos donde reportan plantas medicinales en México, como ejemplo puede citarse lo reportado por Esquivel G. E. y colaboradores, acerca de plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas; para lo anterior, realizaron una búsqueda de información (bases de datos) en diversos herbarios del país, tomando en cuenta el uso tradicional, encontrándose que la planta completa de *Salvia officinalis*, tiene actividad antidiabética y su empleo tradicional es mediante la cocción en agua. Otra especie del género *Salvia* que se incluye en este trabajo es la *Salvia elegans*, a la que sus extractos hidroalcohólicos se le atribuyen propiedades antihipertensivas (Esquivel-Gutiérrez, 2012).

Con relación al estado de Morelos, Monroy-Ortiz y Castillo-España, realizaron un estudio sobre las plantas medicinales utilizadas en la región, mencionando a la familia de Lamiaceae, dentro de la que podemos destacar al género *Salvia* y como ejemplo pueden citarse a la *Salvia breviflora*, conocida como “salvia” en varias comunidades del estado, donde su principal uso es calmar el dolor de estómago; *Salvia gesneriflora* conocida como “mirto”, se emplea hervida junto con ramas manzanilla y hierba buena para la disentería, diarrea y dolor de estómago y *Salvia sessei*, llamada como “pipilolxochitl” ó “sabinito” y se emplea para el tratamiento de “disípela” roja o blanca, es decir, la hinchazón de las piernas con manchas rojas o blancas, la forma de empleo es mediante cocción de la planta completa y posterior uso para lavado de la zona afectada (Monroy-Ortiz y Castillo-España, 2007); ésta enfermedad denominada clínicamente como Erisipela, es una infección bacteriana cutánea producida por el estreptococo beta-hemolítico del grupo A o *Streptococcus pyogenes* o, más raramente, por el *Staphylococcus aureus*. Se caracteriza por la presencia de signos inflamatorios agudos (eritema, edema, calor y dolor local) en el tegumento cutáneo, a menudo asociados a síntomas sistémicos de malestar, escalofríos y fiebre. Afecta de forma difusa a la dermis y a la parte superficial del tejido celular subcutáneo, siendo importante el compromiso de los vasos linfáticos locales. Sus localizaciones preferentes son las extremidades inferiores, área centrofacial y pabellones

auriculares y el tratamiento estándar es el empleo de penicilina (figura 6) (Asenjo et al., 2004; Nitto, 2007).



Extremidades inferiores



Área centrofacial



Pabellón auricular

Figura 6 Partes del cuerpo afectados por la erisipela

2.7.3 Estudios químicos y farmacológicos del género *Salvia*

A partir de los usos encontrados en la MTC para el género *Salvia* se han desarrollado investigaciones en donde se busca aislar y caracterizar los principios activos presentes en diversas especies y que permitan construir una quimiotaxonomía apropiada para dicho género; así también, se han generado trabajos donde se estudia la actividad biológica de dichas especies que permitan contribuir a un conocimiento sistemático en el uso tradicional y también identificar nuevos potenciales de actividad terapéutica como es el caso de las enfermedades crónico degenerativas que actualmente afectan la salud millones de personas a nivel mundial.

Los principales metabolitos que se han aislado de diversas especies del género *Salvia* son: aceites esenciales, terpenos como el ácido ursólico y lupeol; flavonoides como apigenina y cirsimarina y polifenoles como el ácido rosmarínico, ácido cafeico, ácido carnósico y ácidos salvianólicos (figura 7); siendo las partes aéreas (hojas y flores) las que contienen flavonoides, triterpenos y monoterpenos, mientras que los diterpenos son encontrados principalmente en las raíces (Shehadeh et al., 2014; Dziurzynsky et al., 2013; Murat et al., 2009) y muchos de ellos han sido probados en estudios de actividad anticancerígena, antimicrobiana y antioxidante (Topçu, 2007; Ayatollahi, et al., 2009).

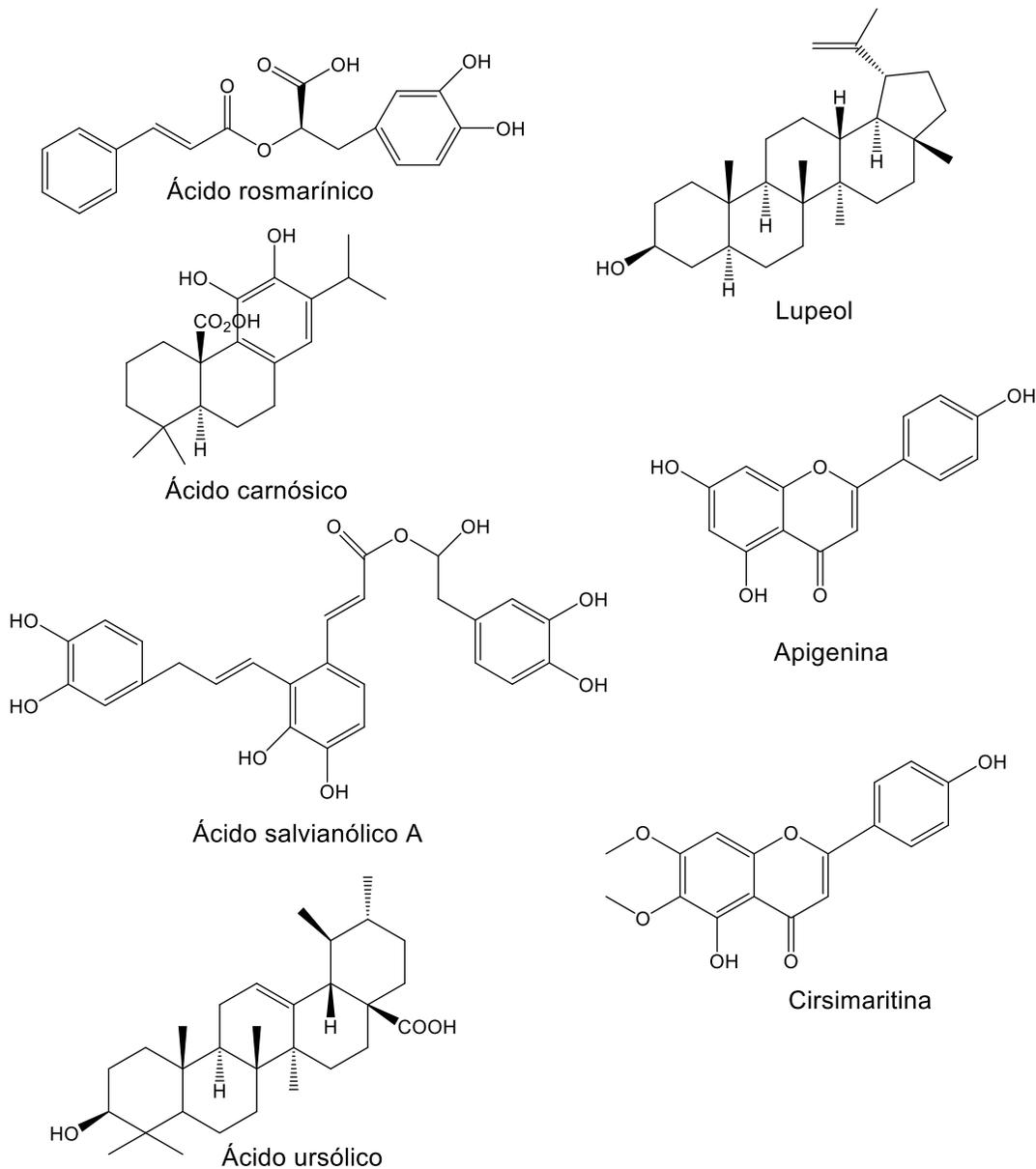


Figura 7 Ejemplo de compuestos bioactivos presente en el género *Salvia*

En el caso de la *Salvia sessei*, el único reporte encontrado hasta antes del presente trabajo es el de Jiménez E.M. y colaboradores (1988), quienes aislaron a partir del extracto de acetona de las partes aéreas de *S. sessei* Benth colectada en Cuernavaca Morelos, un nuevo diterpeno tipo royleanona a la cual nombraron como sesseína y a partir de los datos químicos, espectroscópicos y cristalográficos establecieron que la estructura correspondió a 7 α -acetil- 12-hidroxyabieta-8,12-diene-11, 14-diona-19,20- δ -lactona (figura 8) (Jiménez

et al., 1988). Cabe indicar que tampoco se encontraron reportes sobre estudios de actividad biológica tanto de extractos como del compuesto aislado para esta planta.

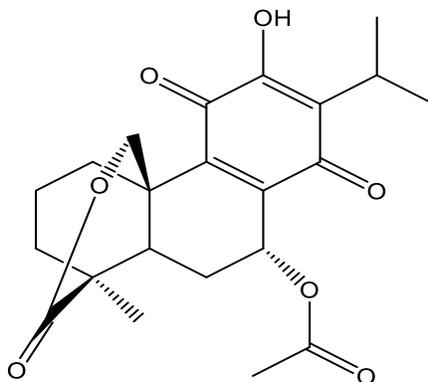


Figura 8 Sesseína aislada de *S. sessei* (7 α -acetil- 12-hidroxyabieta-8,12-diene-11, 14-diona-19,20- δ -lactona)

González Cortazar M y colaboradores, demostraron que el extracto hidroalcohólico de las hojas de *S. elegans* Vahl, que se utiliza en la MTC para el tratamiento de desórdenes del sistema nervioso central, en especial, la ansiedad, presentó actividad, en donde aislaron un terpeno conocido como el ácido ursólico y una nueva flavona, la 5-O-(6-ramnosilglucósido)-7-hidroxi-4'-metoxiflavanona; la elucidación de estas estructuras fue realizada mediante derivatización química (acetilación) y análisis espectroscópicos, tales como RMN de ^1H y ^{13}C y empleando técnicas de correlación bidimensional homo y heteronucleares tales como: COSY, HMQC y HMBC. Los compuestos aislados presentaron una significativa actividad antidepresiva (González-Cortazar, et al., 2013).

Las raíces de *Salvia digitaloides* maceradas en alcohol, son empleadas por comunidades tibetanas en China como una bebida energizante y para fortalecer el sistema inmunológico; con fundamento en lo anterior, Wu y Chan, aislaron 5 nuevos iridoides (nombrados como Salviolócidos A, B, C, D y E) a partir del extracto metanólico de las raíces, la elucidación de estas nuevas estructuras consistieron en una combinación experimentos bidimensionales de RMN y análisis de espectroscopia de masas de alta resolución (Wu y Chan, 2014).

En estudios bio-dirigidos, monitoreando la actividad antioxidante de varias especies del género *Salvia*, se han empleado principalmente extractos etanólicos de las partes aéreas y raíces, donde se han encontrado compuestos del tipo fenólicos y flavonoides a quienes se les ha atribuido dicha actividad. Los polifenoles como el ácido cafeico, ácidos rosmarínico, carnósico y salviaólico aislados de extractos alcohólicos han mostrado una alta actividad

antioxidante (Lu y Yeap, 2001, Xu et al., 2018). Tosun M. y colaboradores estudiaron las propiedades antioxidantes y el contenido de fenoles totales de extractos metanólicos de ocho especies de *Salvia* en Turquía; para lo anterior elaboraron extractos metanólicos de *S. aethiopsis*, *S. candidissima*, *S. limbata*, *S. microstegia*, *S. nemorosa*, *S. pachystachys*, *S. verticillata* y *S. virgata*. La actividad antioxidante fue evaluada mediante el ensayo del radical libre DDPH y el del sistema ácidos β -caroteno/linolínico; siendo *S. verticillata* la que mostró la mayor actividad antioxidante en ambos ensayos antioxidante ($IC_{50} = 18.3 \mu\text{g/mL}$ y 75.8%, respectivamente) y la que mayor contenido de fenoles totales (167.1 mg EqAG/g), por lo que su elevada actividad antioxidante puede estar relacionado directamente con el contenido de compuestos fenólicos en el extracto evaluado (Tosun et al., 2009).

La actividad anti-inflamatoria del género *Salvia* ha sido reconocida en la MTC y se asocia con los aceites esenciales, terpenos y flavonoides que puedan estar presente en una determinada especie, siendo el terpeno ácido ursólico presente en la mayoría de este tipo de plantas, el principal responsable de dicha actividad, como es el caso de la *S. officinalis*, donde sus hojas con una elevada concentración de ácido ursólico son empleadas en preparaciones de uso externo para inflamaciones e infecciones de membranas mucosas, garganta y boca (estomatitis, gingivitis y faringitis) (Baricevic et al., 2001). De igual forma, Abu-Darwish M. y colaboradores, estudiaron el potencial anti-inflamatorio de *Salvia officinalis* presente diferentes regiones de Jordania; para dicho propósito, de las partes áreas de las plantas extrajeron los aceites esenciales mediante hidrodestilación y fueron caracterizados por cromatografía de gases-espectrometría de masas; la actividad antiinflamatoria fue evaluada mediante la medida de producción de óxido nítrico usando macrófagos de ratón estimulados por lipopolisacáridos; los principales aceites encontrados fueron 1,8-cineol y alcanfor; los cuales inhibieron la producción de NO estimulada por LPS en macrófagos, sin afectar la viabilidad celular en concentraciones de $0.64 \mu\text{L/mL}$ (Abu-Darwish et al., 2013). De igual forma, se han reportado flavonoides presentes en varias especies de *Salvia*, como la cirsimarina, salvigenina, apigenina, luteolina, etc. (Wu et al., 2012); en un estudio realizado con *Salvia bicolor*, reportó que un extracto metanólico, el cual mostró un elevado efecto antiinflamatorio y analgésico, evidenció la presencia de flavonoides como el luteolin 7-O-glucosido y apigenina (Ibrahim, 2012)

La actividad antimicrobiana de varias especies de *Salvia*, ha sido reportada y en algunos casos fueron identificados los compuestos relacionados con el mencionado efecto, como ejemplo, la actividad antimicrobiana de 4 nuevos diterpenos aislados de las raíces de *S. deserta*, fue reportada por Búfalo J. y colaboradores; los diterpenos fueron: taxodiona,

ferruginol, horminona y la 7-O-acetihorminona; los resultados mostraron que el ferruginol mostró gran actividad contra *Streptococcus iniae* (CI₅₀ 4.5 µM), la fracción que contenía los compuestos aislados 7-O-acetihorminona y horminona mostró una elevada actividad contra *Staphylococcus aureus* (1.3 mg/mL) y contra *S. aureus* resistente a metilicina y la horminona fue la que mejor actividad mostró contra *S. aureus* (Búfalo et al., 2015)

Por último, es importante mencionar que se han reportado estudios de otras actividades biológicas que se le han atribuido a diversas especies del género *Salvia*, tales como, el tratamiento de cáncer, diabetes, colesterol, obesidad, sofocos (menopausia) y antidiarréico y también buscan identificar los metabolitos asociados con los tipos de actividad anteriormente mencionados (Eidi et al., 2005; Bommer et al., 2011; Keshavarz et al., 2011; Kianbakht et al., 2016).

2.7.4 Descripción botánica y taxonomía de *Salvia sessei* Benth

La especie *Salvia sessei* es un arbusto de hasta 5 m de alto, ramificado, hojas opuestas de 13 cm de largo por 6 cm de ancho, racimos de flores en panículas, flores rojas y pequeñas (6 mm); florece de agosto a febrero. Forma parte del bosque caducifolio y en ocasiones en el bosque de encino, se ha reportado su presencia en los estados de Morelos, Michoacán, Puebla, Guerrero y Oaxaca. En el estado de Morelos se le conoce con los nombres de “pipilolxochitl” y “sabanito”, es empleada en la MTC, sin embargo, solo un estudio químico previo se ha reportado y ninguno con relación a actividad biológica (Clebsch B. y Barner C.D., 2003; Monroy-Ortíz y Catillo-España, 2007) (figura 9).

Familia: Lamiaceae

Género: *Salvia*

Especie: *sessei*

Nombre científico: *Salvia sessei* Benth

Localización: Municipio de Tepoztlán, Morelos (Monroy-Ortíz y Catillo-España, 2007)

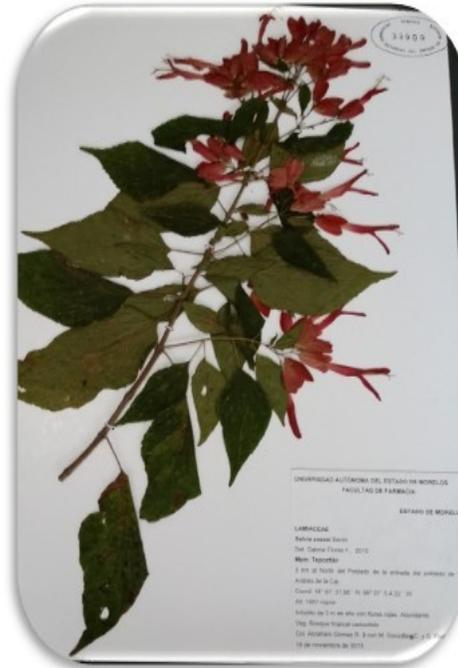


Figura 9 *Salvia sessei* Benth

JUSTIFICACIÓN

3. Justificación

El empleo de plantas medicinales continúa siendo un recurso terapéutico, y en muchas comunidades el único para el alivio de las enfermedades que aquejan a las personas; a nivel mundial se estima que un 80% de la población las utiliza de manera directa o derivados de la misma (Majaz et al., 2016). México cuenta una inmensa riqueza en flora y un milenario conocimiento de plantas utilizadas en la medicina tradicional y complementaria que deben ser preservados y protegidos como patrimonio de nuestra nación.

Las plantas medicinales son fuente de compuestos activos que se han aislado y empleado con fines terapéuticos, ejemplo de lo anterior, lo constituyen, compuestos anti-cancerígenos como vinblastina, etopósido placlitaxel; anti-maláricos como cloroquina, artemisina, anti-diabéticos, como metformina, biguanidas y anti VIH como calanolida A.

Varias especies del género *Salvia* se han empleado con fines etnomédicos y donde también se han identificado y aislado compuestos bioactivos como son del tipo de ácidos grasos, polifenoles, terpenos y flavonoides principalmente y a partir de esto, también se han desarrollado extractos estandarizados que son comercializados como terapias alternativas y/o complementarias para el tratamiento de diversos padecimientos.

En el Estado de Morelos, la especie *Salvia sessei* Benth está presente dentro la medicina tradicional y complementaria para el tratamiento de la erisipela, sin embargo, no se han encontrado reportes suficientes sobre el contenido de compuestos bioactivos en esta especie. Hasta la realización de este proyecto, no se encontró reporte sobre estudios de actividad biológica de extractos o compuestos aislados de esta planta.

Por lo anterior, fue fundamental realizar estudios sistemáticos que permitieran identificar los principales principios activos en la especie *Salvia sessei* Benth y relacionar las actividades biológicas como la anti-inflamatoria, antibacteriana y antioxidante de los extractos, fracciones y compuestos aislados con el uso en la medicina tradicional y aún proponer nuevos usos de las mismas. Lo anterior, podrá coadyuvar también, en el conocimiento quimiotaxonómico y en un uso más sistemático de dicha especie.

HIPOTESIS Y OBJETIVOS

4. Hipótesis

Con base en el uso etnomédico descrito, *Salvia sessei* Benth contiene metabolitos con actividad antiinflamatoria, antibacteriana y/o antioxidante.

5. Objetivo general

Evaluar el potencial antiinflamatorio, antimicrobiano y antioxidante de los compuestos aislados de la especie vegetal *Salvia sessei* Benth.

5.1 Objetivos específicos

- Obtener extractos y fracciones orgánicas de la especie vegetal *Salvia sessei* Benth.
- Aislar y caracterizar los metabolitos secundarios presentes mediante técnicas cromatográficas, espectroscópicas y espectrométricas.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria de los extractos, fracciones y compuestos aislados mediante el modelo *in vivo* de edema de ratón con TPA.
- Evaluar la actividad antibacteriana de los extractos, fracciones y compuestos aislados frente a patógenos de importancia clínica mediante el método de micro dilución en caldo.
- Evaluar la capacidad antioxidante de los extractos, fracciones y compuestos aislados mediante los métodos DPPH, ABTS y CARF.

MATERIALES Y MÉTODOS

6. Materiales y Métodos

6.1 Recolección y obtención de los extractos orgánicos de *Salvia sessei* B.

La recolección de las partes aéreas (5 kg) se llevó a cabo en el poblado de San Andrés de la Cal perteneciente al municipio de Tepoztlán, Morelos, México (18° 57' 31.96" N; 99° 07' 04.33" W. 1557 msnm) en el mes de noviembre de 2015. Un espécimen se depositó en el Herbario HUMO-CyBIC de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos para su resguardo e identificación taxonómica (voucher 33909).

El material vegetal fue secado en estufa a 40 °C por tres días y pulverizado en un molino Pulvex MPP300. Un kilogramo del material vegetal seco fue puesto a maceración con 10 L de *n*-hexano (Merck) por triplicado, el cual fue filtrado y concentrado al vacío empleando rotaevaporador (Heidolph G3) a 40 °C y posterior liofilización (Heto Dpywinner DW3), hasta la obtención de un polvo denominado extracto hexánico (**SsH**). El residuo vegetal seco fue puesto a maceración con diclorometano (Merck) y posteriormente con metanol (Merck) siguiendo el mismo procedimiento mencionado anteriormente, hasta la obtención de los extractos de diclorometano (**SsD**) y metanol (**SsM**), respectivamente. Una porción de cada extracto sirvió para efectuar los ensayos de actividad biológica que se describen más adelante.

6.2 Extracción y aislamiento de compuestos

6.2.1 Cromatografía en capa fina (CCF)

Para el monitoreo de las fracciones obtenidas en las etapas empleadas para la extracción y aislamiento de los compuestos fue empleada la CCF la cual sirvió reunir las fracciones que presentaron un perfil cromatográfico similar y para la identificación de aquéllos compuestos que pudieron aislarse.

La CCF se llevó a cabo empleando placas de aluminio recubiertas de sílica gel 60 F₂₅₄ (fase normal, Merck) y sílica gel RP-18 F_{254S} (fase reversa, Merck); para la fase móvil se utilizaron diferentes disolventes en mezclas como, metanol GR (MeOH, J.T. BAKER), *n*-hexano GR (Hex, Merck), acetato de etilo GR (AcOEt, J.T. BAKER), agua-HPLC (H₂O-HPLC, Merck), acetonitrilo-HPLC (ACN-HPLC, TECSIQUIM). Las placas se analizaron con una lámpara de luz ultravioleta (UVGL-58, UVP, 254-365 nm UV, Cambridge, UK). Para la detección física de terpenos y flavonoides se utilizaron reveladores apropiados como el de Komarowsky (KOM), sulfato sérico al 1% en ácido sulfúrico 2N y NP-PEG

(difenilboriloxietilamina/polietilenglicol). El reactivo KOM contiene 1 mL de ácido sulfúrico-etanólico al 50% y 10 ml de 4-hidroxibenzaldehído metanólico al 2% los cuales son mezclados antes de ser usados, éste reactivo es empleado para detectar aceites esenciales, saponinas, etc. El reactivo NP-PEG contiene 200 mg de difenilboroloxietilamina (NP) y 5 mL de polietilenglicol-400 (PEG) disueltos en 40 mL de etanol. En todos los casos antes de revelar con el agente cromogénico, se visualizaron las placas mediante luz UV de 254 nm y 366 nm. Una vez rociada la placa se calienta a 100 °C durante 1-2 min.

6.2.2 Fraccionamientos cromatográficos y aislamiento de compuestos.

Los extractos **SsD** y **SsM** fueron sometidos a un fraccionamiento primario mediante cromatografía en columna abierta (CCA) empleando eluyentes donde se varió el gradiente de polaridad. Las fracciones fueron analizadas por cromatografía en capa fina, se hicieron reuniones con aquellas que presentaron un contenido químico similar y se eligieron las que presentaron potencial para el aislamiento de compuestos. A continuación, se describe el procedimiento específico para cada uno de los extractos.

El extracto **SsD** (20 g) fue adsorbido en gel de sílice (Silica gel 60 Merck) y colocada en una columna de vidrio (15x30 cm) con gel de sílice (300 g) como fase estacionaria. Para eluir la columna como fase móvil se utilizó un gradiente de *n*-hexano:acetato de etilo con un aumento de polaridad del 5% v/v, colectando 45 fracciones de 2 L cada una (tabla 2). Las fracciones fueron concentradas en un rotaevaporador a presión reducida y analizadas CCF fase normal, eluyente *n*-hexano:acetato de etilo (7:3) y reveladas con solución de sulfato cérico y NP-PEG. Las fracciones que mostraron similitud en su contenido químico fueron agrupadas en 16 reuniones (**SsD1-16**). En las reuniones **SsD1-3** se observó la presencia de un compuesto puro, el cual mediante CCF y comparación con un estándar comercial se identificó como ácido ursólico (**5**, Merck). En la reunión **SsD-10** se observó la presencia de un polvo de color amarillo el cual fue analizado por CCF y mostró la presencia de un compuesto mayoritario, pero con impurezas (Jork et al., 1990).

Tabla 2 Sistema de elución empleado para el fraccionamiento primario del extracto **SsD** de *S. sessei*

Sistema	Proporción (%)	Reuniones Fracciones/clave
Hex:AcOEt	100:0	1/SsD-1
Hex:AcOEt	95:5	2-3/SsD-2
Hex:AcOEt	90:10	4-5/SsD-3
Hex:AcOEt	85:15	6-9/SsD-4
Hex:AcOEt	80:20	10-12/SsD-5
Hex:AcOEt	75:25	11-14/SsD-6
Hex:AcOEt	70:30	15-17/SsD-7
Hex:AcOEt	65:35	18-20/SsD-8
Hex:AcOEt	60:40	21-22/SsD-9
Hex:AcOEt	55:45	23-25/SsD-10
Hex:AcOEt	50:50	26-27/SsD-11
Hex:AcOEt	45:55	28-30/SsD-12
Hex:AcOEt	40:60	31-32/SsD-13
Hex:AcOEt	0:100	33-34/SsD-14
AcOEt: MeOH	70:30	35-40/SsD-15
AcOEt: MeOH	60:40	41-45/SsD-16
AcOEt: MeOH	50:50	
MeOH	100	

La **SsD-10** (5.0 g) fue seleccionada para un segundo fraccionamiento cromatográfico en CCA, para lo cual fue absorbida y colocada en una columna con gel de sílice (150 g) y eluida con un sistema de gradiente *n*-hexano:acetato de etilo con un incremento de polaridad del 5%, obteniéndose 55 fracciones las cuales analizadas por CCF fase normal fueron agrupadas en 13 sub-fracciones (**SsD-10R1-13**). Las sub-fracciones 2 - 4 fueron agrupadas (1.0 g) y adsorbidas con gel de sílice fase reversa (1.0 g, RP-18. 40-63 μ m, Merck) y se montó una columna "flash" (Supelco LC18 TM) fase reversa, empleando como fase móvil un sistema de gradiente agua:acetonitrilo con un cambio en la polaridad del 5% y volúmenes de colecta de 10 mL, obteniéndose 75 fracciones (tabla 3), las cuales fueron concentradas y analizadas por CCF fase reversa (gel de sílice RP-18 F254s, Merck), de la fracción 25 - 35 se obtuvo un compuesto diterpénico en forma de polvo color morado, compuesto **1** (0.38 g), que se denominó **Isosseína**, mientras que de la fracción 41 - 65 se presentó un compuesto diterpénico cristalino amarillo, compuesto **2** (0.45 g), conocido como **Sesseína**. Estos fueron caracterizados por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) y espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) unidimensional (1D) y bidimensional (2D).

Tabla 3 Sistema de elución empleado para el fraccionamiento por columna “flash” de SsD-10R2-4 para el aislamiento de los compuestos **1** y **2**

Sistema	Proporción (%)	Fracción
H ₂ O:ACN	100:0	1-5
H ₂ O:ACN	95:5	6-10
H ₂ O:ACN	90:10	11-15
H ₂ O:ACN	85:15	16-18
H ₂ O:ACN	80:20	19-20
H ₂ O:ACN	75:25	21-24
H ₂ O:ACN	70:30	25-28
H ₂ O:ACN	65:35	29-30
H ₂ O:ACN	60:40	31-35
H ₂ O:ACN	55:45	36-40
H ₂ O:ACN	50:50	41-45
H ₂ O:ACN	45:55	46-50
H ₂ O:ACN	40:60	51-65
H ₂ O:ACN	0:100	66-68
ACN: MeOH	20:80	69-70
ACN: MeOH	30:70	71-72
ACN: MeOH	40:60	73
ACN: MeOH	50:50	74
MeOH	100	75

Fracciones del extracto **SsD** donde se evidenció la presencia de los compuestos **1** y **2** más otro compuesto con una relación de frentes (*R_f*) superior que los anteriores, fueron reunidas (1.0 g) y sometida a fraccionamiento por cromatografía en columna fase reversa (10 g), empleando como eluyente agua:acetonitrilo con gradiente de polaridad variable (10 %), se obtuvieron 52 fracciones y el análisis por CCF fase reversa, eluyente agua:acetonitrilo (5:5) y revelador flavonoides (NP-PEG), poniendo a **1** como referencia, permitió reunir aquellas fracciones con contenido metabólico similar generándose en total 14 reuniones. En la reunión **SsDC2-R3** se evidenció la presencia de un compuesto (**3**) con comportamiento similar a **2** cuando se observó a luz UV, pero con un *R_f* distinto, siendo el *R_f* de este nuevo compuesto menor al observado para **2**. Cabe señalar que el compuesto **3** presente en la SsDC2-R3 presentó un color morado y en la medida que el gradiente de elución fue cambiando a menos polar se observó que ese mismo compuesto en las reuniones **SsDC2-R9** a **SsDC2-R13** con el mismo *R_f* la placa cromatográfica, tomó una coloración amarilla en solución, comportamiento similar observado anteriormente cuando se aislaron a **1** y **2** por lo que se infirió que los compuestos presentes en **SsDC2-R3** (**3**) y **SsDC2-R9-13** (**4**) podrían ser también isómeros estructurales entre ellos. La cantidad obtenida del compuesto **3** fue de 45 mg, mismo que fue caracterizado por CLAR y cromatografía líquida de ultra-alta

resolución (UPLC) sin embargo, por la cantidad obtenida no fue posible generar espectros RMN de ^1H y ^{13}C .

El extracto **SsM** (40 g) fue adsorbido en gel de sílice (Silica gel 60 Merck) para realizar una separación por percolación a *grosso modo*, fue empleada silica gel fase normal y un sistema eluyente de Hex:AcOEt el cual fue variando en su polaridad. Derivado de la separación anterior, se generaron 50 fracciones, las cuales fueron analizadas por cromatografía en CCF-fase normal, eluyente Hex:AcOEt (7:3), revelador de sulfato cérico y se pusieron como referencia a **2** y **5** donde solo de éste último se evidenció su presencia en las fracciones; además se hicieron las reuniones con las fracciones que mostraron un perfil cromatográfico con igual contenido de metabolitos generándose un total de 16 reuniones.

Tabla 4 Sistema de elución empleado para la percolación del extracto **SsM** de *S. sessei*

Sistema	Proporción (%)	Reuniones Fracciones/clave
Hex:AcOEt	100:0	1-5/SsM-1
Hex:AcOEt	95:5	6-7/SsM-2
Hex:AcOEt	90:10	8-9/SsM-3
Hex:AcOEt	85:15	10-11/SsM-4
Hex:AcOEt	80:20	12/SsM-5
Hex:AcOEt	75:25	13-15/SsM-6
Hex:AcOEt	70:30	16-19/SsM-7
Hex:AcOEt	65:35	20-21/SsM-8
Hex:AcOEt	60:40	22-25/SsM-9
Hex:AcOEt	55:45	26-28/SsM-10
Hex:AcOEt	50:50	29-31/SsM-11
Hex:AcOEt	45:55	32-34/SsM-12
Hex:AcOEt	40:60	35-36/SsM-13
Hex:AcOEt	0:100	37-38/SsM-14
AcOEt: MeOH	90:10	39-42/SsM-15
AcOEt: MeOH	80:20	43-50/SsM-16
AcOEt: MeOH	70:30	
AcOEt: MeOH	60:40	
AcOEt: MeOH	50:50	
MeOH	100	

Las fracciones fueron concentradas en un rotaevaporador a presión reducida y analizadas por CCF fase normal (gel de sílice 60 F254, Merck), eluyente *n*-hexano: acetato de etilo (7:3) y reveladas con solución de sulfato cérico y NP-PEG, se puso como referencias a **2** aislada del extracto **SsD** y ácido ursólico donde sólo este último estuvo presente en alguna de las fracciones. Las fracciones que mostraron similitud en su contenido químico fueron

agrupadas en 16 fracciones (**SsM1-16**). En **SsM-8** y **SsM-9** hubo presencia mayoritaria de ácido ursólico, mientras que de **SsM10 – 12** se evidenció la presencia de dos compuestos distintos a **2** y ácido ursólico en comparación con sus *Rf*'s y al observarse en luz UV mostraron una coloración azul-verde, por lo que se decidió juntar dichas reuniones con el propósito de aislar dichos compuestos (**SsM10-12**). De igual forma, las fracciones **SsM13 - 15** fueron reunidas ya que el análisis por CCF evidenciaron presencia de compuestos distintos a **2**, ácido ursólico y a los que estaban presentes en **SsM10 -12**.

200 mg de SsM10-12 fueron empleados para separar mediante cromatografía en columna fase normal (SsMC1), teniendo como eluyente una mezcla de diclorometano:metanol con gradiente de polaridad creciente. Se obtuvieron 84 fracciones, mismas que fueron analizadas por CCF-fase normal y se empleando 2 sistemas de eluyentes: diclorometano: metanol (95:5) y hexano: acetato de etilo (7:3), como revelador se empleó una solución de sulfato cérico y NP-PEG, además **2** y ácido ursólico estándar como referencias; a partir del análisis se reunieron las fracciones que presentaron el mismo contenido de metabolitos dando como resultado un total de 17 reuniones a las cuales se les asignó la clave SsMC1R1-R17. En **SsMC1-R7** a **SsC1-R9** se observó la presencia de un compuesto mayoritario; además se analizaron por CCF-fase reversa las reuniones **SsMC1-R5** a **SsMC1-R8**, empleando como eluyente agua:acetonitrilo 5:5, reveladores sulfato cérico y NP-PEG, de este análisis se constató la presencia de ácido gálico (**7**) y ácido cafeico (**8**) mediante comparación de sus *Rf*'s con estándares comerciales (Merck) de dichos compuestos por CCF, así como también por CLAR y RMN (^1H y ^{13}C)

De **SsM13-15** fueron empleados 1.4 g para separación mediante cromatografía en columna fase normal (SsC2), eluyente diclorometano:metanol con gradiente de polaridad creciente, obteniendo un total de 110 fracciones. Las fracciones fueron analizadas por CCF-fase normal, eluyente diclorometano:metanol (9:1 y 95:5); así como por CCF-fase reversa, eluyente agua:acetonitrilo (6:4 y 8:2); reveladores sulfato cérico y NP-PEG.

De los análisis por CCF-fase normal y CCF-fase reversa fueron reunidas las fracciones con igual contenido metabólico generándose un total de 20 reuniones a las que se les asignó la clave **SsMC2R1 - R20**, además en la reunión **SsMC2-R7** se evidenció la presencia de **8** y en las reuniones **SsMC2-R13** y **SsMC2-R16** se constató la presencia de ácido rosmarínico (**9**), lo cual fue mediante CCF y CLAR donde se empleó un estándar comercial de dicho compuesto para comparación, así como también por RMN (^1H y ^{13}C).

Así mismo, la **SsMC2-R3** fue seleccionada para una separación por cromatografía en columna ya que el análisis por CCF-fase normal y CCF-fase reversa mostró la presencia de un compuesto mayoritario distinto a **8** y **9**, por lo que a partir de 300 mg de **SsMC2-R3** se hizo una separación por cromatografía en columna fase reversa, eluyente agua:acetonitrilo variando el gradiente de polaridad dio como resultado un total de 105 fracciones, las cuales fueron analizadas por CCF-fase reversa, eluyente agua:acetonitrilo (9:1, 6:4 y 5:5), reveladores de sulfato cérico y NP-PEG. Las fracciones que presentaron contenido metabólico similar fueron reunidas generándose un total de 30, a las cuales se les asignó la clave **SsMC3R1-R30**.

Las reuniones obtenidas fueron analizadas nuevamente por CCF-fase reversa, eluyente agua:acetonitrilo 5:5 y como reveladores sulfato cérico y NP-PEG, como referencia se emplearon estándares comerciales de **8**, **9**, luteolina, quercetina y glucósido de quercetina (Merck); de éste análisis se seleccionaron las reuniones **SsMC3R3-8** (16.5 mg), **SsMC3R14-16** (43.0 mg), **SsMC3R21**(7.5 mg) **SsMC3R23** (7.6 mg) y **SsMC3R26** (8.0 mg) donde en cada una de ellas se evidenció un compuesto aislado distintos en sus *Rf*'s y tiempos retención en CLAR a **2**, **5**, **7**, **8**, **9** y entre ellos, teniendo en común que al ser revelados con NP-PEG evidenciaron un comportamiento de tipo flavonoides. Los cromatogramas por CLAR se presentan más adelante y el inconveniente de la cantidad obtenida de los 5 compuestos tipo flavonoide aislados no permitieron generar los espectros de RMN correspondientes.

Del análisis por CCF del primer fraccionamiento de **SsM**, también fue seleccionada la SsM16 ya que se observó la presencia de un compuesto mayoritario que manifestó un color naranja cuando se observó en luz UV-Vis, por lo que se llevó a cabo una percolación (SsP, 5.0 g) empleado sílica gel fase reversa, eluyente agua:acetonitrilo variando el gradiente de polaridad, obteniéndose un total de 8 fracciones, las cuales fueron analizadas por CCF-fase reversa, eluyente agua:acetonitrilo (8:2 y 6:4), reveladores de sulfato cérico y NP-PEG y de éste análisis se evidenció en la fracciones 2 - 5 un compuesto mayoritario que reveló un color naranja al ser observado en luz UV, por lo que se decidió llevar a cabo una separación cromatográfica con dicha fracción (**SsP2-5**).

La separación por cromatografía en columna fase reversa fue empleando 1 g de **SsP2-5** y como eluyente agua: acetonitrilo variando el gradiente de polaridad, esto dio como resultado 90 fracciones, las cuales fueron analizadas por CCF-fase reversa, eluyente agua: acetonitrilo (7:3) y revelador NP-PEG, referencias de Isosakuranetina (IS) y Glucósido de luteolina (GL), de éste análisis se hicieron las reuniones correspondientes con las

fracciones que mostraron un contenido metabólico similar, obteniéndose un total 38 reuniones a las que se les asignó la clave **SsP2-5C1R1-38**. Derivado de este análisis de descartó la presencia de IS y GL, así como que en **SsP2-5C1R23**, **SsP2-5C1R24** (6.9 mg) y **SsP2-5C1R25** se reveló la presencia de un compuesto que mostró color amarillo y del cual **SsP2-5C1R24** se seleccionó para un análisis por CLAR y tuvo un comportamiento similar al de estándar comercial de Isoorientina (Merck).

6.3 Determinación de puntos de fusión

La determinación de los puntos de fusión no corregidos para los compuestos aislados se realizó en un Fusiómetro Thermo scientific 9100; ambos compuestos presentaron puntos de fusión muy similares, para el compuesto **1** (polvo morado) fue de 181.2 – 181.9 °C, para **2** (cristales amarillos) fue de 181.9 – 182.7 °C; para **3** (polvo morado) fue de 185.1 -186.5 °C y para **4** fue de 185.6 – 186.9 °C

6.4 Análisis por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR)

El análisis CLAR de extractos, fracciones y compuestos aislados fue realizado en un equipo Waters 2695 con detector de fotodiodos Water 996 y con el software Empower Pro. La separación fue realizada usando una columna Supelcosil LC-F (4.6 mm × 250 mm i.d., 5-µm particle size) (Sigma-Aldrich, Bellefonte, PA, USA).

Se empleó el método denominado “flavonoides” con un tiempo de duración de 30 min, en el que la fase móvil consistió de una mezcla de 0.5% ácido trifluoroacético (solvente A) y acetonitrilo (solvente B). El gradiente del sistema fue: 0-1 min, 0% B; 2-3 min, 5% B; 4-20 min, 30% B; 21-23 min, 50% B; 24-25 min, 80% B; 26-27 100% B y 28-30 min, 0% B. El flujo fue de 0.9 mL/min y el volumen que se inyectó de las muestras fue de 10 µL. Se realizó un barrido de longitud de onda (λ) de 300-400 nm.

6.5 Análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) del extracto hexánico de *S. sessei* (SsH)

La composición química del extracto **SsH** fue analizada en un cromatógrafo de gases (CG) equipado con un detector de masas cuadrupolo en modo impacto electrónico a 70 eV. Los compuestos volátiles fueron separados en una columna capilar HP 5MS (25 m long, 0.2 mm d.i., con 0.3-µm espesor de la película).

La temperatura del horno se ajustó a 40 ° C durante 2 minutos, luego se programó a 40–260 ° C durante 10 ° C / min y se mantuvo durante 20 minutos a 260 ° C. Las condiciones del detector de masa fueron las siguientes: temperatura de interfase 200 ° C y rango de

adquisición de masa, 20-550. Las temperaturas del inyector y del detector se ajustaron a 250 y 280 ° C, respectivamente. El modo de inyección splitless fue realizado con 1 µL del extracto (3 mg / mL de solución). El gas portador era helio a un caudal de 1 ml / min. Se realizó la identificación de compuestos volátiles, comparando sus espectros de masas con los de la Biblioteca del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST) 1.7 y comparándolos con los datos en la literatura (Adams, 2007).

6.6 Análisis por cromatografía líquida de ultra-alta resolución-espectrometría de masas (UPLC-Masas)

En el caso del compuesto **3** aislado, se corrió una muestra en un equipo de cromatografía líquida de ultra-alta resolución (UPLC) en un equipo UPLC Waters con detector de arreglo de fotodiodos, automuestreador y bomba cuaternaria. La separación fue realizada usando una columna Acquity UPLC Beh C18 1.7 µm (2.1 mm × 50 mm i.d); acoplado a un espectrómetro de masas, Zspray Waters; bajo las condiciones siguientes: La fase móvil consistió en una mezcla de 0.3% ácido fórmico (solvente A) y acetonitrilo (solvente B). El gradiente fue 0-3 min, 0% B; 4 min, 30% B; 5 - 6 min, 50 % B; 7 - 8 min, 100% B; 9 -15 min, 0% B. El flujo fue de 0.3 mL/min y el volumen que se inyectó de las muestras fue de 5 µL.

6.7 Caracterización por Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Las estructuras de los compuestos aislados fueron identificadas por RMN de ¹H, ¹³C y experimentos bidimensionales (COSY, NOESY, HSQC y HMBC) mediante un equipo RMN Agilent Technologies DD2 de 600 MHz, empleando como disolventes CD₃COCD₃ y CDCl₃, el tetrametilsilano se utilizó como referencia interna; los datos de desplazamiento químico (δ) son reportados en ppm; la multiplicidad de las señales (*s*, singulete; *d*, doblete; *t*, triplete; *m*, multiplete), el número de hidrógenos (deducidos por integración), y la constante de acoplamiento *J* (Hz). Los compuestos fueron identificados por comparación con los espectros de RMN de muestras de referencia y/o con datos de RMN consultados en la literatura.

6.8 Actividad antiinflamatoria

La evaluación del efecto antiinflamatorio fue mediante el modelo de edema inducido en oreja de ratón con TPA (acetato 12-O-tetradecanoilforbol) (Young et al., 1983); para lo cual se emplearon ratones machos de la cepa ICR (25-30 g). Los animales (n=5) se colocaron en cajas de acrílico transparente a temperatura constante de 24 °C, con un fotoperiodo de 12/12 horas luz/oscuridad y con agua y alimento ad libitum. Como el proyecto incluyó

animales de experimentación, fue evaluado y aprobado previamente por el Comité Local de Investigación en Salud 1702 (COFEPRIS 17CI031050) con el número de registro R-2018-1702-002; el manejo y cuidado de los animales se realizó de acuerdo a los procedimientos aceptados internacionalmente (SAGARPA, NOM-062-ZOO-1999). La dosis probada de cada extracto, fracción y compuesto, así como de indometacina como fármaco testigo fue de 1.0 mg/oreja. Para los compuestos **1** y **2** también se llevó a cabo una curva dosis-respuesta con las siguientes dosis: 0.125, 0.25, 0.5, 1.0 y 2.0 mg/oreja y a partir de ella se calculó la DE₅₀ para cada uno. En la oreja derecha de cada ratón se aplicó de forma tópica 20 µL de una solución de TPA (0.25 µg/mL). Diez minutos después, en la misma oreja se aplicó la cantidad correspondiente a cada una de las muestras antes mencionadas, es decir, 1.0 mg de la muestra disuelto en 20 µL del vehículo. En la oreja izquierda (control) solo se aplicó 20 µL del vehículo utilizado, es decir, acetona. De igual forma se estableció un grupo control que solo recibió en la oreja derecha 20 µL de una solución de TPA (0.25 mg/mL) y en la izquierda solo 20 µL del vehículo. Cuatro horas después de la aplicación del TPA, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical para tomar una muestra de 6 mm de diámetro de ambas orejas por horadación. El incremento del peso de la muestra derecha con respecto a la izquierda representó el edema. La inhibición del edema se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de inhibición (\%I)} = \frac{C - E}{C} \times 100$$

Donde:

C= Edema del grupo control (tratado con TPA)

E= Edema del grupo experimental (TPA más el compuesto)

Para el caso del compuesto **1**, que presentó una actividad similar al fármaco testigo, se calculó la potencia entre ambos empleando la siguiente expresión:

$$\text{Potencia} = \frac{[\mu\text{M compuesto}]}{[\mu\text{M fármaco}]}$$

µM es la concentración micromolar

6.9 Actividad antibacteriana

6.9.1 Cepas bacterianas

Los extractos, fracciones y compuestos fueron evaluados contra ocho bacterias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus haemolyticus* 1036 (aislado clínico), *Staphylococcus haemolyticus* 1163 (aislado clínico), *Staphylococcus aureus* ATCC 43310 (resistente a meticilina), *Streptococcus fecalis* ATCC 2912, *Staphylococcus pyogenes* ATCC19615, *Staphylococcus epidermidis* 1042, *Staphylococcus hominis* 592 y contra cuatro bacterias Gram-negativas: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Escherichia coli* 4036, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella dublin* ATCC 9676, las cepas ATCC así como las aisladas del Hospital General de Acapulco, Guerrero, México fueron proporcionadas por la Dra Patricia Álvarez Fitz y corresponden al banco de bacterias de la Universidad Autónoma de Guerrero. Las cepas fueron resembradas en Agar antibiótico No 1 (Merck) por 24 h a 37 °C.

6.9.2 Preparación del Inóculo

Para los ensayos fueron tomadas de 3 a 4 colonias de cada una de las cepas a evaluar y resembradas en caldo Müeller-Hinton (Merck) e incubadas a 37 °C por 3 horas, posteriormente se hizo la dilución de cada una ellas empleando agua destilada estéril y ajustando la turbidez con solución de MacFarland 0.5, correspondiendo a 1×10^4 UFC/mL.

6.9.3 Concentración mínima inhibitoria (CMI)

La CMI para los extractos, las fracciones y los compuestos aislados fue determinada por la técnica de microdilución en caldo de acuerdo a lo indicado por el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013) con adecuaciones mínimas (Ríos et al, 1988). El método se realizó en microplacas estériles de 96 pocillos. Las muestras se disolvieron en una mezcla DMSO: agua (20:80) a 5000 µg/mL y las concentraciones ensayadas fueron de 12.5, 25, 50 y 100 µg/mL con 200 µL de caldo Müeller-Hinton; el inóculo (2 µL) conteniendo 1×10^4 UFC/mL fue añadido a cada pocillo. Un número de pocillos fueron reservados para el control de la viabilidad del inóculo con Müeller-Hinton y otros con Müeller-Hinton+DMSO (sin extractos ó compuestos). Como antibiótico de referencia fue utilizado sulfato de gentamicina (**Gen**, Sigma) y las concentraciones ensayadas para determinar la MIC de este antibiótico fueron de 0.625, 1.125, 2,5, 5, 10 y 20 µg/mL. Las placas fueron incubadas a 37

°C por 24 horas. Después de la incubación la CMI fue determinada añadiendo a cada pocillo una solución de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazoilo (MTT, Sigma) al 0.05% del cual se observó desarrollo de color rojo si hubo viabilidad de las bacterias e incoloro en el caso de no haber viabilidad.

En el caso de los compuestos, así como del antibiótico de referencia el valor de la CMI se reporta en micromolar (μM).

6.10 Evaluación de la capacidad antioxidante

6.10.1 Capacidad antioxidante por 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH)

Para el ensayo con DPPH, se siguió lo descrito por Mac Donald-Wicks et al. (2006) con modificaciones menores. La actividad de los extractos, fracciones y compuestos se midió a partir del blanqueo de una solución metanólica de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, DPPH (Sigma) de color púrpura. Se evaluaron 25 μL de diferentes concentraciones de los extractos y fracciones (156.25, 312.5, 625, 1250, 2500 y 5000 $\mu\text{g/mL}$) y compuestos (7.81, 15.62, 31.25, 62.5, 125, 250, 500 y 1000 $\mu\text{g/mL}$) contra 175 μL de una solución de DPPH (0.025 mg/mL). El blanco contenía todos los reactivos menos los extractos, fracciones y compuestos mientras que los controles positivos fueron el extracto estandarizado de *Camellia sinensis* (Cs) que contiene epigalocatequina 3-galato 94% (Teavigo®, 2014), y Trolox Tx (Sigma). Las absorbancias se midieron en un espectrofotómetro UV-Vis a 515 nm, en un lector de placas de Elisa (Perkin-Elmer Lambda 40 UV-Vis). El porcentaje de inhibición se calculó de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\text{Porcentaje de inhibición (\%I)} = \frac{A_0 - A_1}{A_1} \times 100$$

Dónde: A0 es la absorbancia del blanco y A1 es la absorbancia de la muestra con los extractos a evaluar. Las determinaciones se hicieron por triplicado.

A partir de la ecuación de la recta elaborada para cada uno de los extractos, fracciones y compuestos, se determinó por análisis de regresión lineal la concentración inhibitoria media (CI_{50}), la cual fue definida como la concentración para inhibir la formación de 50 % de radicales DPPH.

6.10.2 Capacidad antioxidante por 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS)

Se estimó la capacidad antioxidante por ABTS conforme a lo descrito previamente por Mac Donald-Wicks et al. (2006). En general, el complejo ABTS⁻ se produjo *in situ* por la reacción de una solución de 2,2'-azinobis-(ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) ABTS (Sigma) con persulfato de potasio (Sigma), se tomaron 230 µL y se mezclaron con 20 µL de los extractos, fracciones y compuestos a las concentraciones establecidas en el ensayo por DPPH, el blanco contenía todos los reactivos menos los extractos o compuestos y también se corrieron controles positivos del extracto estandarizado de *C. sinensis* y trolox. Se leyeron las absorbancias a 734 nm, el porcentaje de inhibición y la concentración inhibitoria media (CI₅₀) fueron calculados conforme a lo descrito previamente en el ensayo por DPPH. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

6.10.3 Capacidad antioxidante/reductora de férrico (CARF)

El ensayo CARF se siguió con el método reportado por Firuzi et al. (2005) con modificaciones menores. Para ello, el reactivo CARF fue preparado mezclando: FRAP en tampón de acetatos 300 mM (3,1 g de CH₃COONa en 16 mL de ácido acético glacial); solución 10 mM de 2,4,6-tris-(2-piridil)-s-triazina, TPTZ (Sigma) en ácido clorhídrico 40 mM y solución acuosa 20 mM de FeCl₃•6H₂O, lo anterior en una proporción 10:1:1 (v/v). Los extractos, fracciones y compuestos analizados fueron a las concentraciones previamente indicadas en el ensayo de DPPH. Se tomaron 175 µL de una preparación reciente del reactivo de CARF y se incubó a 37 °C y junto con un blanco de reactivos se leyó a 595 nm; luego se agregaron 25 µL de extractos, fracciones y compuestos a diferentes concentraciones y 50 µL de metanol. Se preparó una curva de calibración con una solución estándar de FeSO₄. Los resultados se expresaron como los mM equivalentes de FeSO₄ por gramo de extracto. Todos los experimentos se hicieron por triplicado.

6.11 Análisis Estadístico

Los resultados se expresan como la media ± error estándar. Los análisis estadísticos se efectuaron utilizando el paquete estadístico (SPSSTM versión 23.0), las diferencias estadísticas de la actividad antiinflamatoria y capacidad antioxidante fueron determinadas mediante ANOVA y prueba de Tukey, se consideraron significativas las diferencias para una $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7. Resultados y Discusión

7.1 Recolección y obtención de los extractos de *S. sessei* B.

La cantidad de material vegetal seco y molido fue 2.74 Kg. Los rendimientos obtenidos de la maceración de 1 Kg de material vegetal son presentados en la tabla 5 donde se indica que el total de extractos obtenidos fue de 132.2 g que corresponden 13.17% de la masa vegetal empleada y siendo el extracto **SsM** el de mayor rendimiento, seguido de **SsD** y de **SsH**.

Tabla 5 Extractos orgánicos obtenidos por maceración de las partes aéreas de *S. sessei*

Extracto	Clave	Peso (g)	Rendimiento (%)
Hexánico	SsH	12.9	1.29
Diclorometánico	SsD	40.6	4.06
Metanólico	SsM	78.8	7.82
Total		132.3	13.17

7.2 Fraccionamiento cromatográfico del extracto diclorometánico (**SsD**)

A partir de los fraccionamientos primario y secundario de extracto **SsD** pudieron identificarse y aislarse el ácido ursólico (**5**, figura 10) y los diterpenos **1** y **2**. La figura 11 muestra las placas cromatográficas donde pudieron identificarse el compuesto **5** el cual fue comparado con el estándar comercial y además se compararon las reuniones del segundo fraccionamiento con **1** y **2** aislados previamente, donde se evidenció que estaban presentes en alguna de las reuniones; también es posible observarse la presencia de otros metabolitos que posteriormente fueron identificados como los compuestos **3** y **4**.

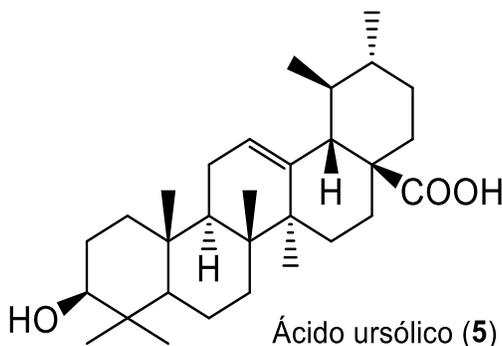


Figura 10 Estructura del ácido ursólico (**5**) presente en el extracto **SsD**

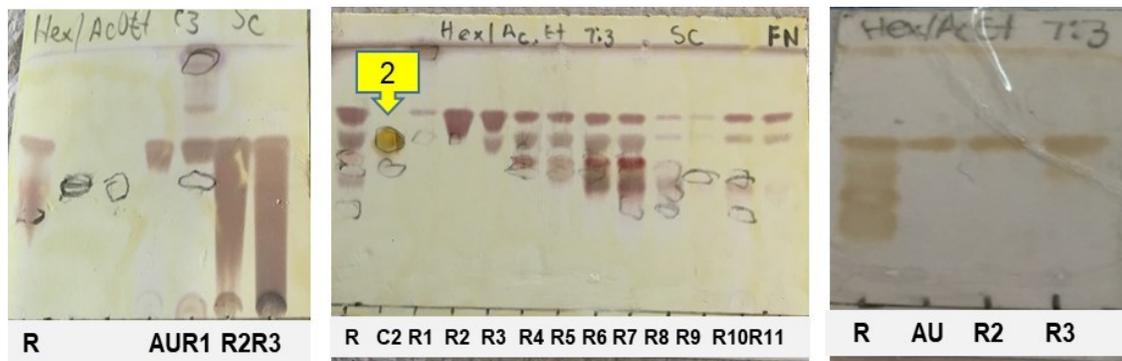


Figura 11 Placas cromatográficas CCF-fase normal del extracto **SsD**
Eluyente Hex: AcOEt 7:3, revelador SC. R= extracto integro, C2 = Sesseina, (2); AU =
ácido ursólico, estándar comercial; R2 y R3 = AU aislado

El aislamiento de los compuestos **1** y **2** por cromatografía “flash” permitió observar que al ser eluidos en la columna uno de ellos tomó una coloración morada y el otro una amarilla (figura 12) y el análisis por CCF-fase reversa mostró que tenían unos *R_f* distintos. Al eliminar el disolvente el compuesto color morado que eluyó primero formó un polvo (1) mientras el amarillo que eluyó posteriormente formó cristales amarillos (2), como puede observarse en la figura 13.

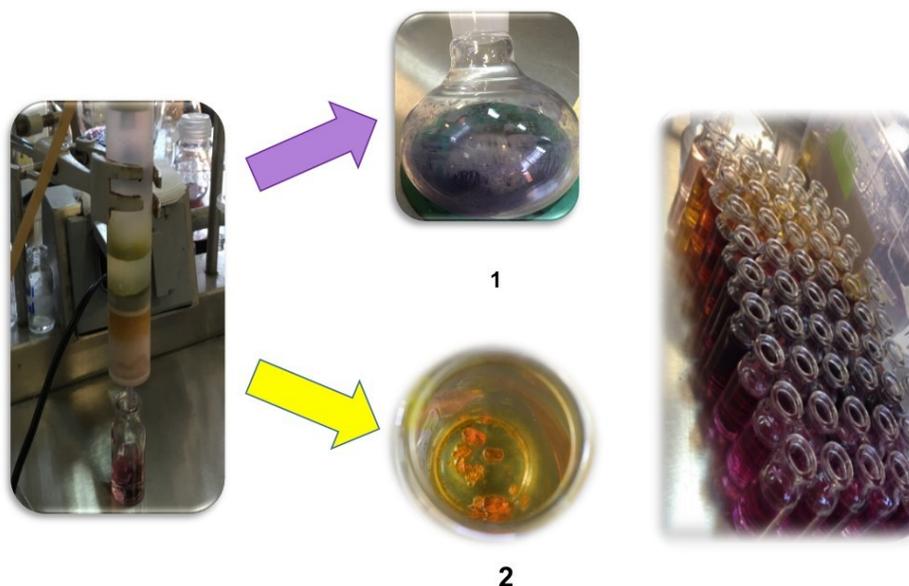


Figura 12 Separación por cromatografía “flash” de los compuestos **1**, color morado (Isosesseina) y compuesto **2**, color amarillo (Sesseina)

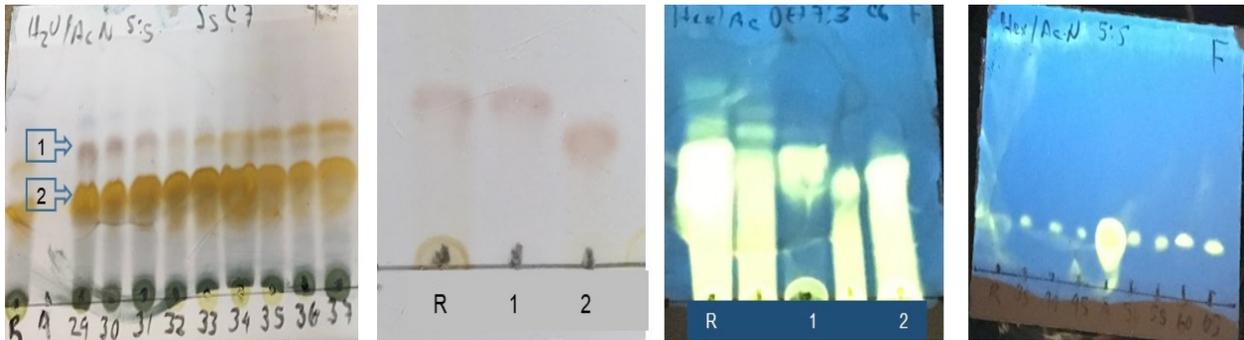


Figura 13 Placas cromatográficas CCF-fase reversa con los compuestos **1** y **2**
Eluyente H₂O: ACN 5:5, revelador NP-PEG.

Los resultados correspondientes a la separación cromatográfica de la reunión de fracciones que contenían al compuesto **1**, permitió también identificar en alguna de las reuniones un nuevo compuesto (**3**), el cual mostró en CCF-fase reversa un *R_f* distinto al de **1**, es decir, el *R_f* de **3** fue mayor que el de **1** (figura 14). En el aislamiento **3** por cromatografía “flash”, se observó el mismo comportamiento que **1** y **2**, es decir, primero fue observado la presencia de un compuesto morado (**4**) y conforme se movió el gradiente de polaridad se observó la presencia de uno de color amarillo (**5**), por lo que, a partir de este comportamiento, se infirió que fuesen análogos a isoseseína (**1**) y seseína (**2**). La caracterización por CLAR y UPLC del compuesto **3** se presentan más adelante.

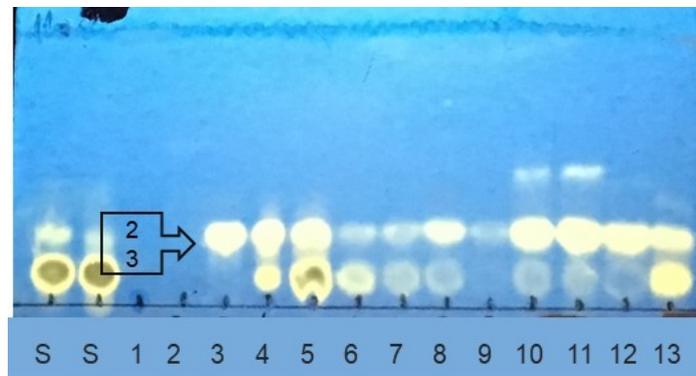


Figura 14 CCF fase reversa, revelador NP-PEG, eluyente H₂O: ACN (5:5)
Fracciones obtenidas por cromatografía “flash” para aislar seseína (S, **2**). En las fracciones **3** y **9** se evidencia la presencia de un compuesto aislado con un *R_f* distinto al de **2**, el cual fue identificado como compuesto **3**.

7.2.1 Perfil cromatográfico por CLAR del extracto diclorometánico (SsD), sesseína (2) y sesseinol (4)

El análisis por CLAR del extracto **SsD** (figura 15) permitió identificar un compuesto mayoritario que presentó un tiempo de retención de 26.169 min con dos longitudes de máxima absorbancia ($\lambda_1 = 270$ y $\lambda_2 = 400$ nm) lo que indicó de acuerdo a los datos descritos por Michavila y colaboradores (1986) que corresponde a una estructura con la presencia del cromóforo quinona, el cual proporciona un color intenso en la molécula que lo contiene debido a la presencia de dobles enlaces conjugados en el anillo de seis carbonos y que presentan dos longitudes de máxima absorbancia entre 260 a 500 nm y que se ha reportado que ésta presente en diterpenos tipo royleanona, como la horminona y 7 α -acetoxiroyleanona (Michavila et al., 1986), el cual fue identificado posteriormente como el compuesto **2**.

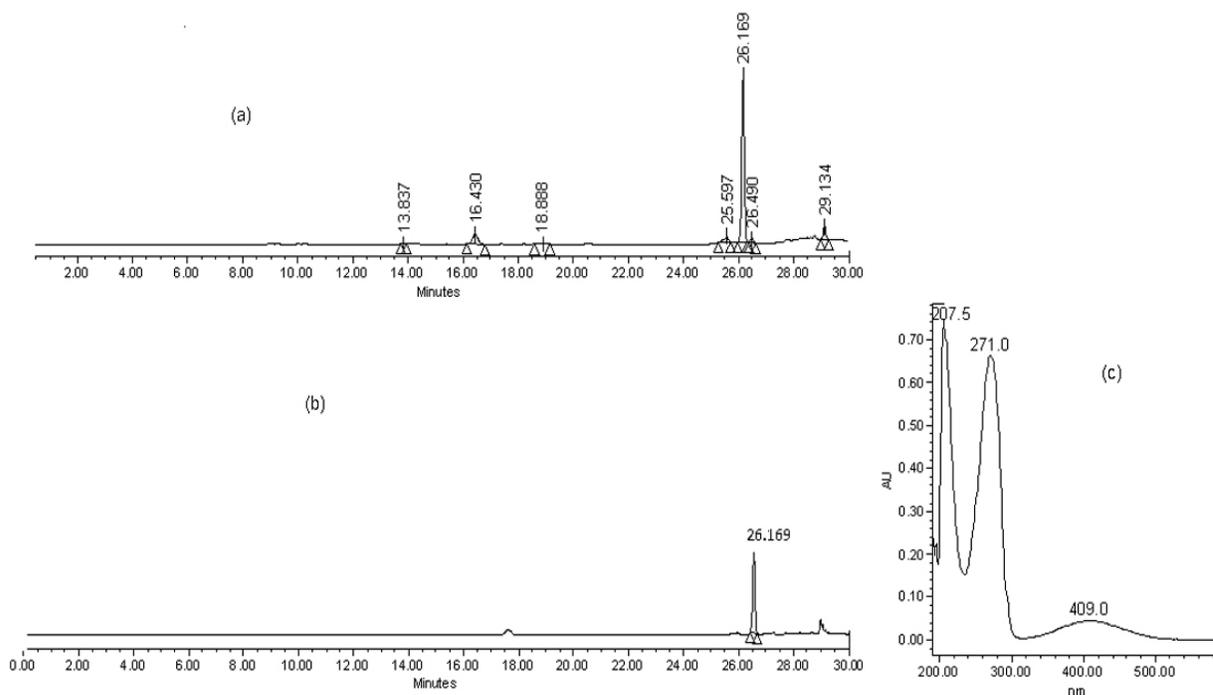


Figura 15 a) Perfil cromatográfico por CLAR del extracto diclorometánico (**SsD**) de *S. sessei*; (b) cromatograma por CLAR y (c) espectro UV-Vis del compuesto **2**

En la figura 16 se presenta el cromatograma correspondiente al compuesto **4** el cual tuvo un tiempo de retención de 26.908 min y mostró en luz UV dos bandas absorbancia ($\lambda_1 = 298.2$ y $\lambda_2 = 434.3$ nm); estos datos corroboraron que es un nuevo metabolito distinto a **2**, el cual en las mismas condiciones de CLAR, presentó un tiempo de retención de 26.154 min y dos bandas de absorbancia a ($\lambda_1 = 269.8$ y $\lambda_2 = 407.8$ nm). Aunque ambos compuestos

presentaron de igual forma dos longitudes de absorbancia, pero siendo éstas diferentes, el desplazamiento de la mismas hizo inferir que pudiesen estar presentes los mismos cromóforos (anillo de quinona y grupos carbonilos) pero con algún cambio en los grupos funcionales sustituyentes presentes en **4**, como la presencia del grupo hidroxilo (OH⁻), el cual estuviera haciendo esos corrimientos a regiones más altas en las longitudes de máxima absorbancia en ambas estructuras, este efecto es conocido como batocrómico que consiste en el desplazamiento del espectro de absorción de una sustancia hacia longitudes de ondas mayores, ocasionado por la presencia de electrones desapareados los grupos funcionales presentes en la estructura molecular (Yadav L.D.S., 2005).

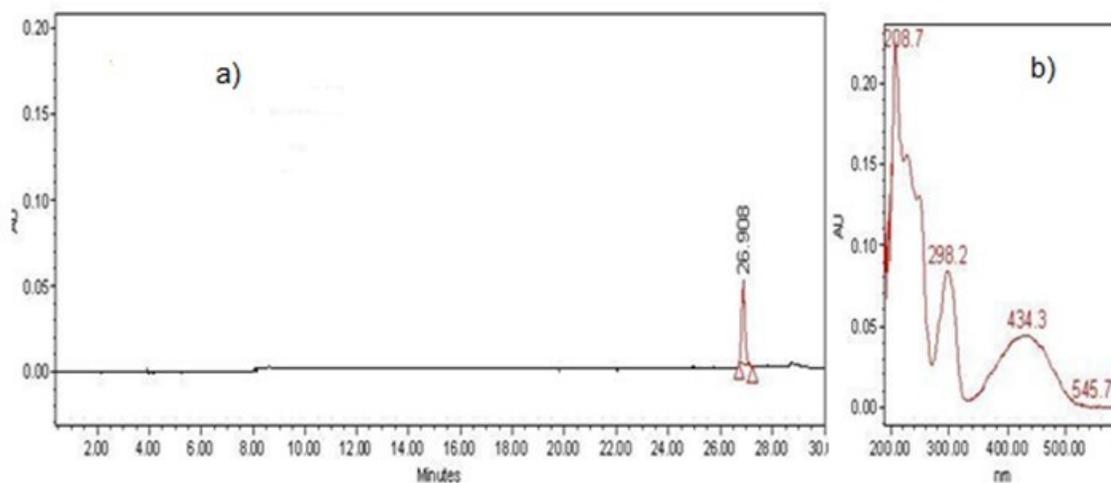


Figura 16 a) Cromatograma por CLAR y b) Espectro UV-Vis del compuesto **4**

7.3 Fraccionamiento cromatográfico del extracto metanólico (SsM)

Del fraccionamiento primario del extracto **SsM** fueron obtenidas 16 reuniones las cuales fueron analizadas por CCF-fase normal y al ser comparadas con **2**, así como con estándares comerciales de ácido ursólico (**5**) y β -sitosterol (**6**); no se evidenció la presencia de **2** en ninguna de las reuniones (figura 17 a y b), la presencia y aislamiento de **6** fue principalmente en las reuniones 4 a 6 (figura 18), de igual manera **5** se encontró en las primeras fracciones, siendo el compuesto mejor identificado en la reunión 9; de igual manera, en las reuniones 10 -12 fue observada la presencia de un metabolito distinto a **1**, **5** y **6** comparado con su desplazamiento en la CCF; en las reuniones 13 a 15 se encontró un compuesto con un desplazamiento similar a **5** pero con un comportamiento diferente al observarse a la luz ultravioleta (UV) (figura 17 b). A partir del anterior análisis se decidió juntar las reuniones 10 a la 12 (**SsM10-12**) con el propósito de aislar el compuesto

identificado distinto a **1** y **5**, así como también se juntaron las reuniones 13 a la 15 para aislar compuestos de interés (**SsM13-15**).

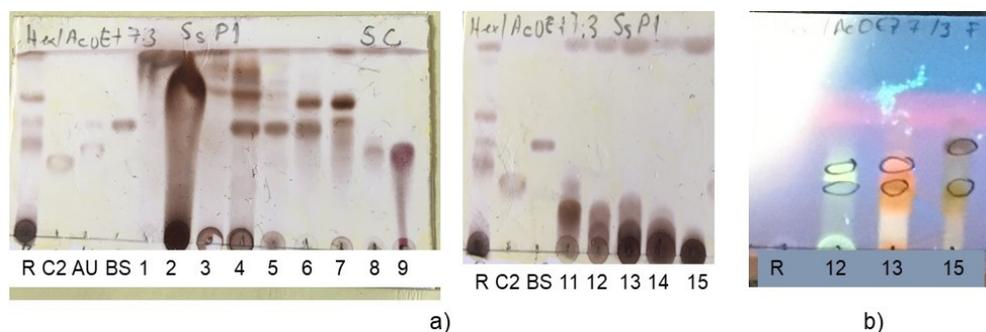


Figura 17 Placas cromatográficas: a) CCF-fase normal (eluyente Hex: AcOEt 7:3, revelador SC) y b) CCF-fase reversa (eluyente H₂O: ACN 7:3, revelador NP-PEG) de las reuniones del fraccionamiento de SsM). R = extracto SsM, C2 = Compuesto **2**, AU = ácido ursólico estándar, BS = β -sitosterol estándar

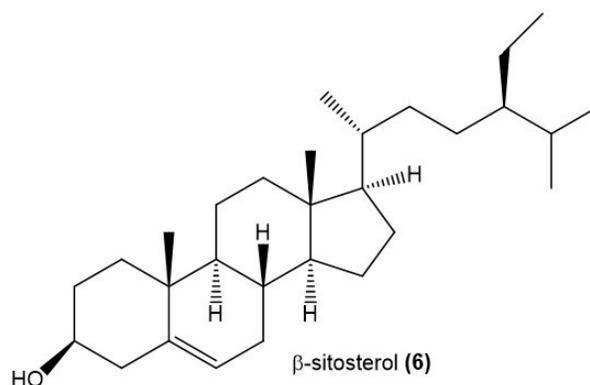


Figura 18 Estructura del β -sitosterol (**6**) presente en fracciones del extracto **SsM**

Del resultado del fraccionamiento cromatográfico de **SsM10-12** y a partir del análisis por CCF se evidenció la presencia de dos compuestos en las fracciones 2 a la 7 (figura 19), los cuales una vez identificados y aislados correspondieron al ácido gálico (**7**) y al ácido cafeico **8** (figura 20) y cuyas estructuras fueron corroboradas por comparación con los *tr*'s de los estándares comerciales en CLAR y por el análisis de sus desplazamientos químicos de las señales de sus espectros de RMN (¹H y ¹³C) (figuras A4, A5, A6, A7).

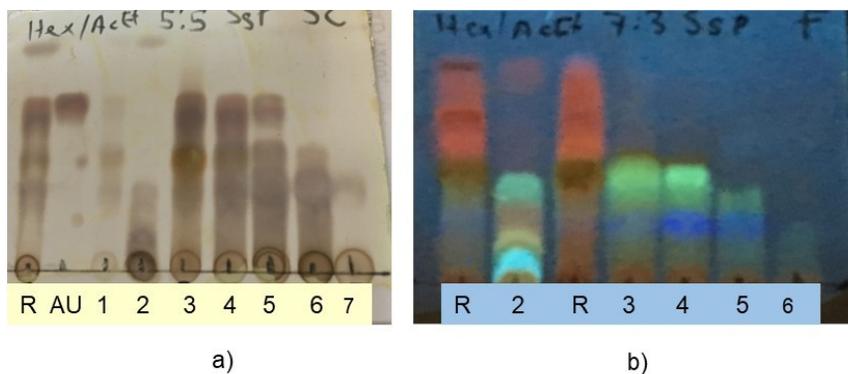


Figura 19 Placas cromatográficas: a) CCF-fase normal (eluyente Hex: AcOEt 5:5, revelador SC) y b) CCF-fase reversa (eluyente H₂O: ACN 7:3, revelador NP-PEG) de las reuniones del fraccionamiento de SsM). R = fracción SsM10-12, AU = ácido ursólico estándar.

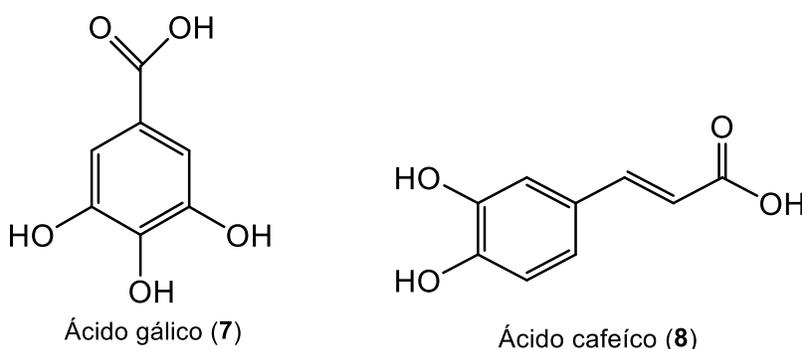


Figura 20 Estructura del ácido gálico (7) y ácido cafeico (8) presentes en la fracción **SsM10-1**

El resultado del fraccionamiento de **SsM13-15** y el análisis por CCF se identificó la presencia del compuesto **8** en la reunión **SsMC2-R7** y en las reuniones **SsMC2R13** y **SsMC2-R15** se identificó al ácido rosmarínico (9) (figura 21 a), lo cual fue corroborado por comparación de su *tr* con el de un estándar comercial, así como también por RMN (¹H y ¹³C) (figura 22). El fraccionamiento de la **SsMC2-R3** y el análisis por CCF se muestran en la figura 21 b) donde se indican los cinco compuestos tipo flavonoides aislados y que fueron comparados en sus *Rf*'s con luteína, quercetina y glucósido de quercetina comerciales, mostrando los cinco metabolitos aislados distintos *Rf*'s comparados con los de los estándares comerciales.

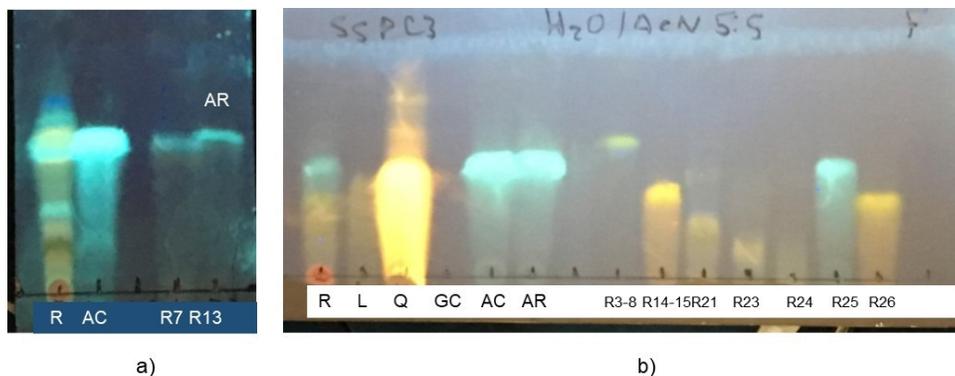


Figura 21 Placas cromatográficas: a) CCF-fase reversa del fraccionamiento de SsM13-15, R = fracción SsM13-15, AC = ácido cafeíco estándar; AR = ácido rosmarínico aislado; b) CCF-fase reversa del fraccionamiento del SsMC2-R3. R = fracción SsMC2-R3, L = luteolína, Q = quercetina, GC = glucósido de quercetina, AC = ácido cafeíco, AC = ácido rosmarínico, fracciones con compuestos tipo flavonoides aislados: SsMC3R3-8, SsMC3R14-16, SsMC3R21, SsMC3R23 y SsMC3R26

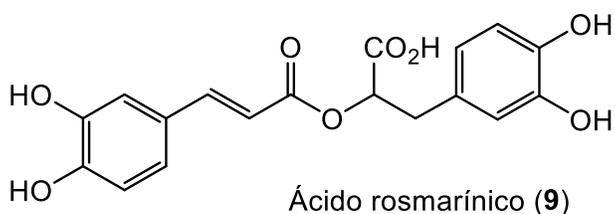


Figura 22 Estructura del ácido rosmarínico (9) presente en la fracción **SsM13-15**

La presencia de **7**, **8** y **9** en el extracto metanólico de *S. sessei* evidenciada en este estudio contribuyen a la quimiotaxonomía de esta especie, ya que en otras especies del género *Salvia* han sido reportado este tipo de compuestos y también se han asociado a sus actividades farmacológicas estudiadas, por ejemplo la *S. palaestina* donde fue reportado la presencia de flavonoides como la luteolína y polifenoles como la salpalaestina, a los cuales se le ha demostrado actividad antiinflamatoria y antioxidante; la *S. miltiorrhiza*, una especie utilizada en la medicina tradicional china, está presente el ácido salvionólico B, que es un polifenol y demostró que tener actividad neuroprotectora; en otras especies como *S. candidissima*, *S. limbata*, *S. microstegia*, *S. nemorosa*, *S. verticillata* y *S. virgata*, se han reportado una elevada concentración de polifenoles y flavonoides con actividad antioxidante, antiinflamatoria, citotóxica y anticancerígena. (Shehadeh et al., 2014; Dziurzynsky et al., 2013; Murat, et al., 2009).

La figura 23 muestra el resultado del análisis por CCF de la **SsP2-5** donde fue identificado y aislado un compuesto tipo flavonoide similar a isoorientina (**10**) (figura 24) pero debido a que la cantidad obtenida fue pequeña (10 mg) no pudo caracterizarse por RMN este compuesto, solo su comportamiento en CLAR fue comparado con un estándar de isoorientina (**10**).

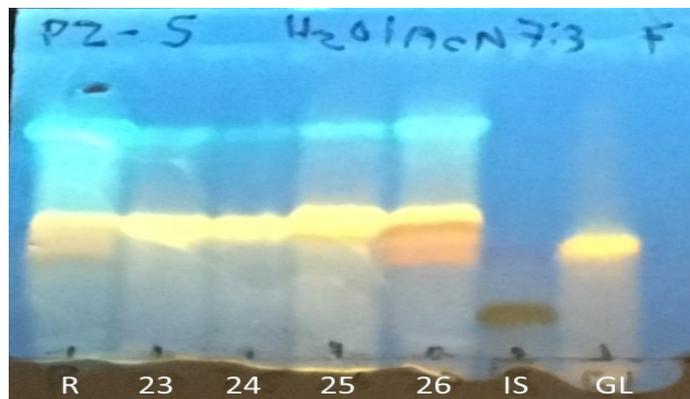


Figura 23 CCF fase reversa, revelador NP-PEG, eluyente H₂O: ACN (7.3). R = SsP2-5; 23,24,25 y 26 fracciones donde se aisló un flavonoide tipo isoorientina (**10**). IS = Isosakuranetina; GL = Glucósido de luteolina.

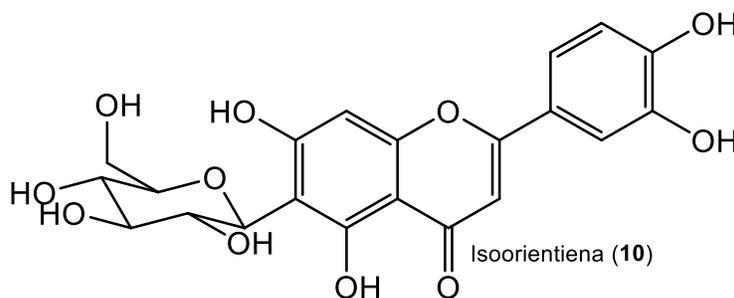


Figura 24 Estructura de la isoorientina (**10**) propuesta para el compuesto aislado de la fracción **SsP2-5**

7.3.1 Perfil cromatográfico por CLAR del extracto SsM y del ácido cafeico (8), ácido rosmarínico (9) e isoorientina (10)

El análisis por CLAR del extracto **SsM** (figura 25) permitió identificar un total de 6 compuestos con los siguientes tiempos de retención y longitudes de máxima absorbancia: $tr = 8.83$ min ($\lambda_1 = 243.9$ y $\lambda_2 = 327.9$ nm); $tr = 8.98$ min ($\lambda_1 = 245.1$ y $\lambda_2 = 327.9$ nm); $tr = 9.11$ min ($\lambda_1 = 215.7$, $\lambda_2 = 273.4$ y $\lambda_3 = 351.7$ nm); $tr = 9.4$ min ($\lambda_1 = 219.2$, $\lambda_2 = 242.7$ y $\lambda_3 = 325.5$ nm); $tr = 9.7$ min ($\lambda_1 = 208.7$ y $\lambda_2 = 284.0$ nm); $tr = 11.3$ min ($\lambda_1 = 207.5$ y $\lambda_2 = 329.1$ nm). Conforme a lo citado en literatura, las longitudes de onda que oscilan entre 200 a 220 nm son características en compuestos con grupos carbonilos en su estructura, mientras que las longitudes de onda que oscilan entre 230 a 250 nm son típicas para insaturaciones y grupos aromáticos, mientras que las que oscilan entre 260 a 330 nm pueden corresponder a la presencia de ácidos carboxílicos en la estructura, por lo que estos compuestos pueden corresponder a polifenoles ácidos, así como flavonoides, los cuales tienen anillos aromáticos y grupos carbonílicos dentro de su estructura y como fue señalado con anterioridad son los tipos de compuestos que mayormente se han reportados en varias especies del género *Salvia* (Yadav L., 2005).

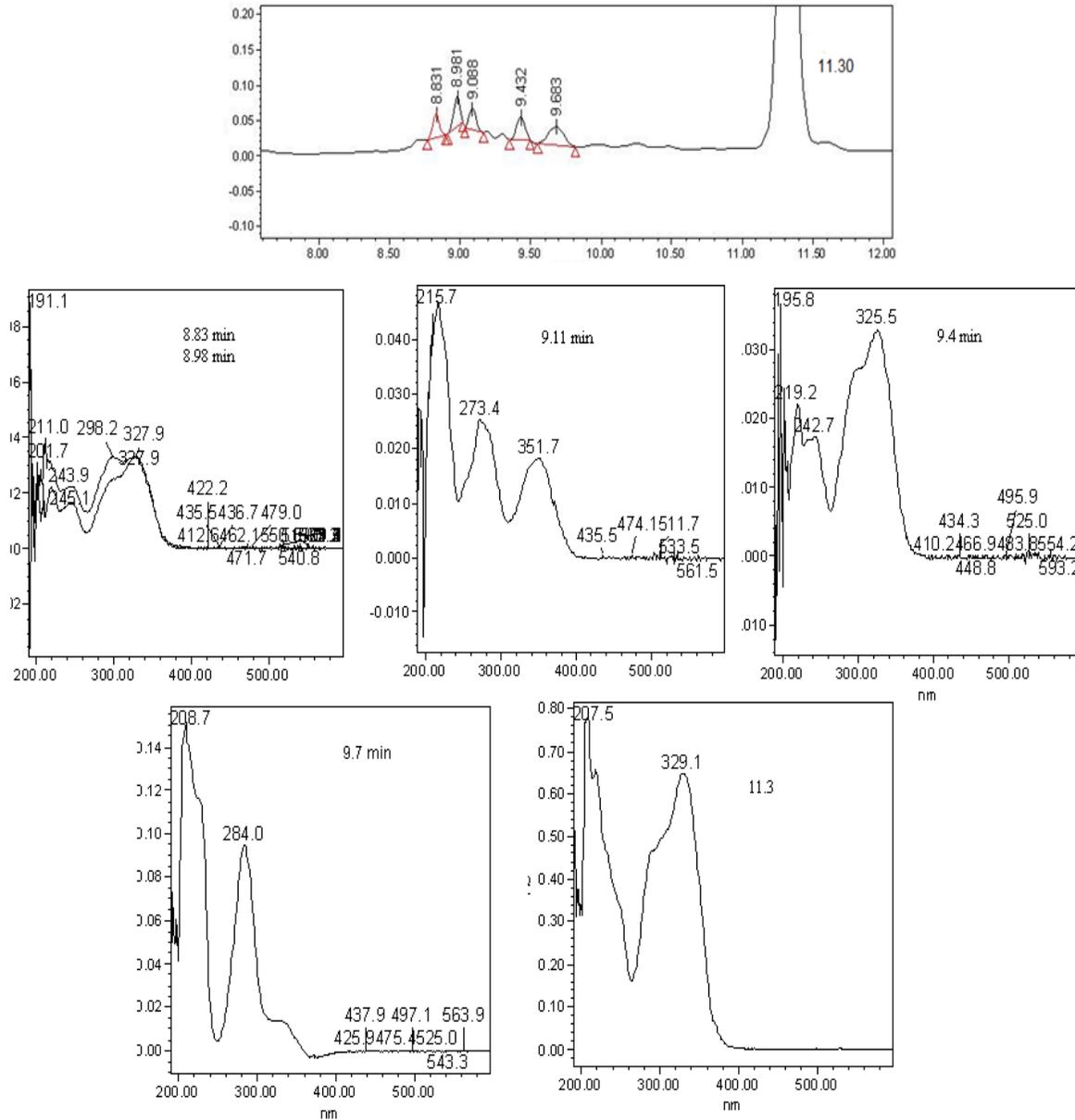


Figura 25 Perfil cromatográfico por CLAR y espectros UV-Vis del extracto metanólico (SsM) de *S. sessei*

En la figura 26 a) muestra el cromatograma de **8** con un $t_r = 9.22$ min y $\lambda_1 = 219.2$, $\lambda_2 = 241.5$ y $\lambda_3 = 325.5$ nm y que comparados con un estándar comercial de ácido cafeico analizado en las mismas condiciones fueron muy similares, por lo que se dedujo que el compuesto aislado y el estándar son el mismo compuesto; de igual forma la figura 26 b) presenta el cromatograma para **9** con un $t_r = 11.01$ min y $\lambda_1 = 207.5$ y $\lambda_2 = 330.3$ nm, los cuales al ser comparados con un estándar comercial de ácido rosmarínico analizado en las mismas

condiciones fueron muy similares por lo que se dedujo que ambos son el mismo compuesto; además en ambos casos, el análisis de sus espectros por RMN (se muestran los resultados más adelante) confirmaron que en ambos metabolitos aislados, las señales correspondieron a la de los estándares con los que se compararon y lo reportado previamente en la bibliografía.

Con respecto al compuesto **10**, la figura 27 presenta el cromatograma obtenido donde se observa un $t_r = 8.97$ min, $\lambda_1 = 218.4$, $\lambda_2 = 255.7$ y $\lambda_3 = 348.2$ nm, mismos que al ser comparados con un estándar comercial de isoorientina analizada en las mismas condiciones cromatográficas fueron muy similares ($t_r = 9.03$ min, $\lambda_1 = 219.1$, $\lambda_2 = 257.7$ y $\lambda_3 = 349.4$ nm) por lo que pudo inferirse que el compuesto aislado puede tratarse de una flavona, pero debido a que no pudo realizarse el análisis de la muestra por RMN, no fue posible confirmarse la estructura, sin embargo, se propone que **10** corresponda a la isoorientina.

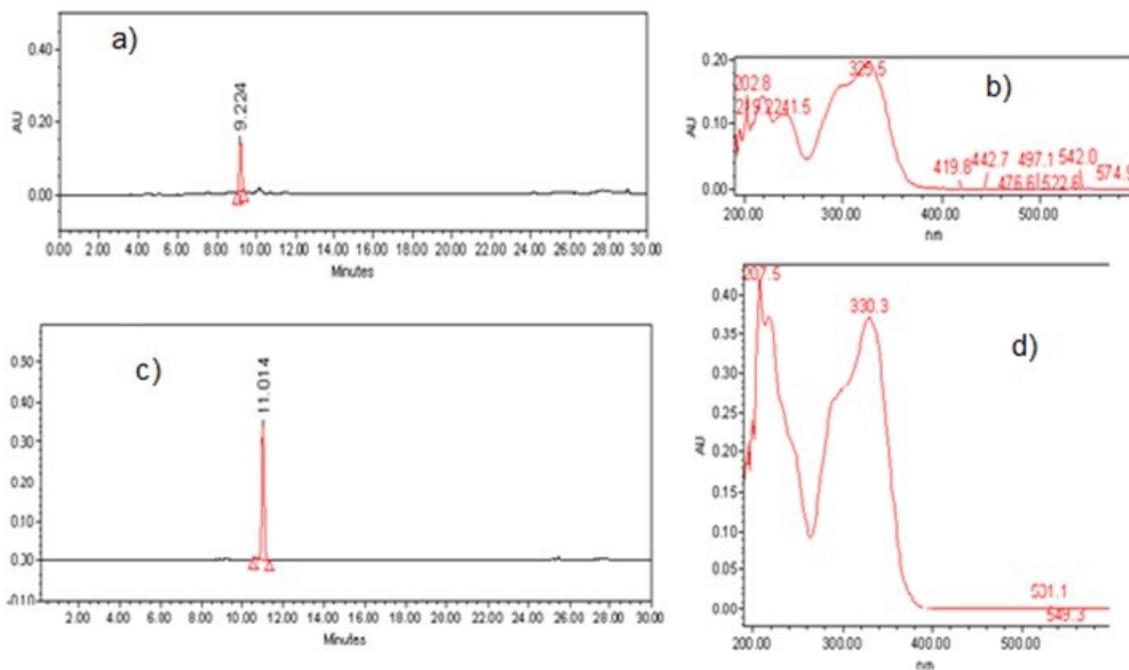


Figura 26 a) Cromatograma por CLAR y b) espectro UV-Vis del compuesto **8**; c) Cromatograma por CLAR y d) espectro UV-Vis del compuesto **9**

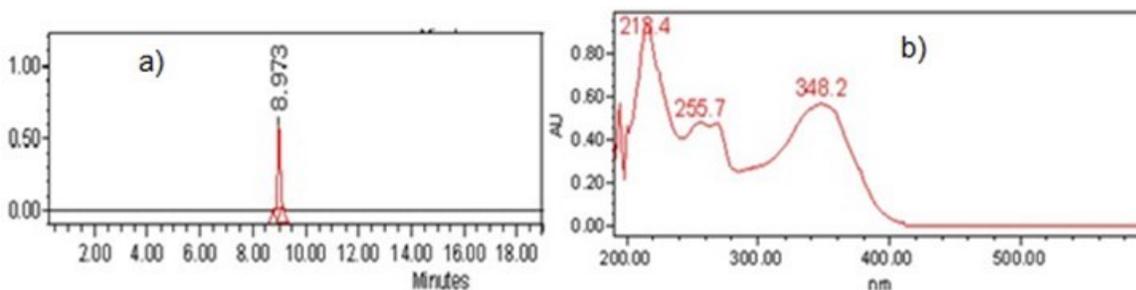


Figura 27 Cromatograma por CLAR del compuesto 10

7.4 Caracterización por UPLC-Masas del isosesseinol (3)

En la figura 28 se presenta el espectrograma correspondiente al compuesto **3** mismo que tuvo ion molecular (m/z) = 361.22 uma [M+1] que comparado con el peso molecular de **2** (402.44 uma) presenta una diferencia de 41.22 uma, lo cual puede ser derivado de la pérdida del grupo acetilo (CH_3CO^- , 43.0 uma) presente en la posición 7 y quedando ahora en esa posición un grupo hidroxilo (OH^-), lo cual nos permite proponer la estructura que denominamos Isosesseinol (**3**) y que su correspondiente isómero sería el sesseinol (**4**) aislados en la misma estrategia experimental, los ion con una m/z = 315.17 uma puede ser generado por la pérdida en la posición 10 del grupo isopropilo [$\text{M} + \text{CH}_3\text{CCH}_3^{+2}$]⁺ y el de m/z = 167.89 uma a la de [benzofenona] (figura 29); la estructura de **4** fue reportado por Jiménez y colaboradores (1988), quienes a partir del compuesto **2** aislado previamente de un extracto acetónico de hojas de *Salvia* y mediante una reacción de derivatización de hidrólisis básica, empleando metanol básico y reflujo pudieron obtenerla (Jiménez et al., 1988), y en el caso del presente trabajo es el primer reporte donde se han aislado ambos compuestos isoméricos (**3** y **4**) a partir de material vegetal, sin ninguna reacción de derivatización previa y junto con los compuestos **1** y **2** permiten destacar la presencia de éste tipo de diterpenos que hasta la fecha no se han reportado en otras especies tanto del género *Salvia* como en las que integran a la familia de las Lamiaceae.

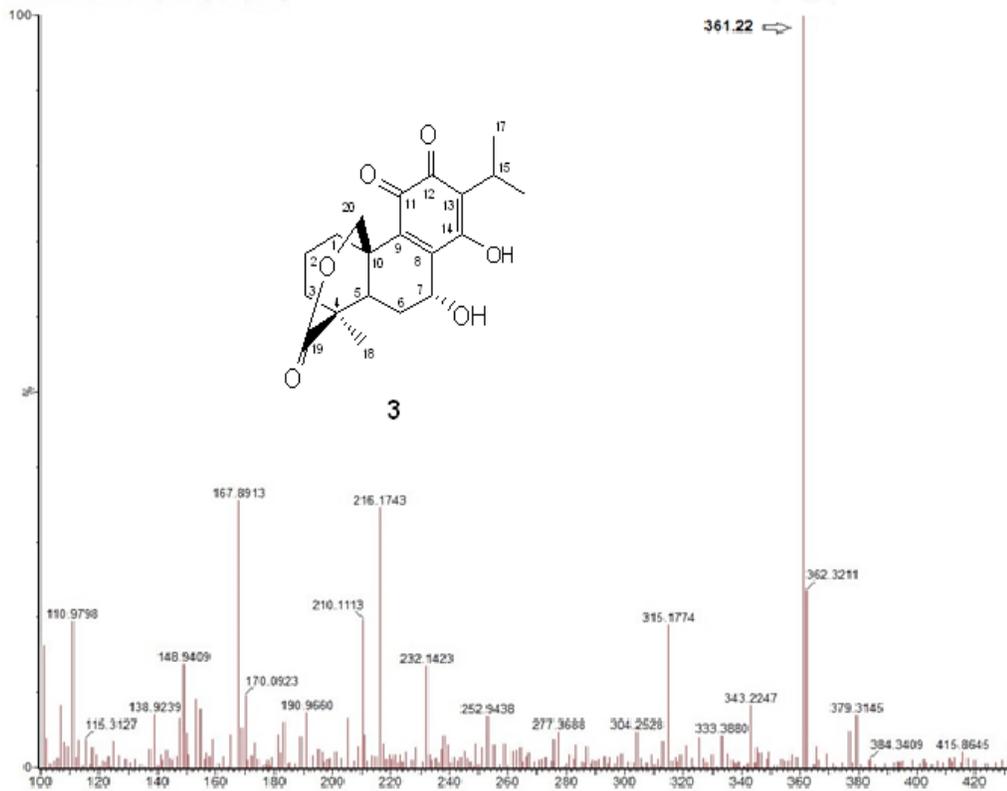


Figura 28 Espectro de masas del compuesto 3 ion molecular (m/z) = 361.22 uma [M+1]

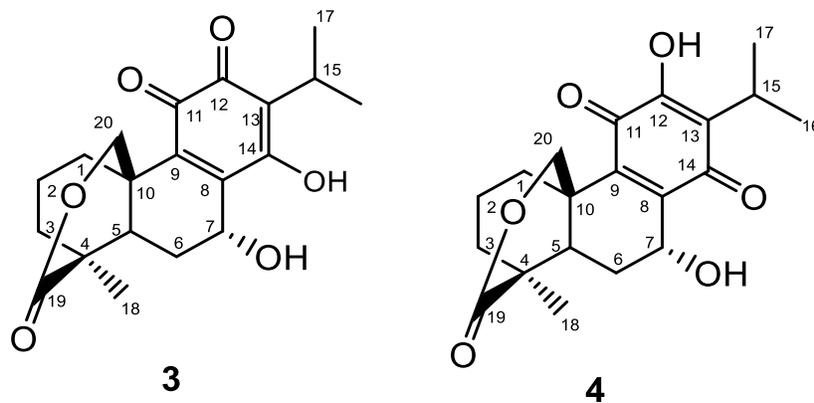


Figura 29 Estructuras químicas de los diterpenos tipo royleanona aislados de *Salvia sessei* Benth.

3: 7,14-dihidroabieta-8,13-diene-11,12-diona-19,20- δ -lactona (Isosesseinol)

4: 7,12-dihidroabieta-8,13-diene-11,14-diona-19,20- δ -lactona (Isosesseína)

7.5 Perfil cromatográfico por CG-EM del extracto hénxanico de *S. sessei* (SsH)

El análisis del espectrograma (figura A1) de **SsH** por CG-EM permitió la identificación de 7 compuestos (figura 30), en la tabla 6 son listados los compuestos en orden de elución: espatulenol (**11**), óxido de β -cariofileno (**12**), heptacosano (**13**), nanocosano (**14**), hentriacontano (**15**), β -sitosterol (**6**) y acetato de β -sitosterol (**16**); de lo anterior, podemos destacar que se encontró una elevada presencia de compuestos alifáticos como el hentriacontano (17.4%), nonacosano (8.35%) y heptacosano (5.39%) y también la presencia de triterpenos como β -sitosterol (5.19%) y acetato de β -sitosterol (2.35%).

Tabla 6 Composición química del extracto **SsH** de *S. sessei*

Tiempo de retención (min)	Peso Molecular (u.m.a)	Compuesto	% en la muestra
15.18	220	Espatulenol	3.54
15.26	220	Oxido de β -cariofileno	6.86
27.37	380	Heptacosano	5.39
28.38	408	Nonacosano	8.35
32.66	436	Hentriacontano	17.4
36.43	414	β -Sitosterol	5.19
39.36	456	Acetato de β -Sitosterol	2.35

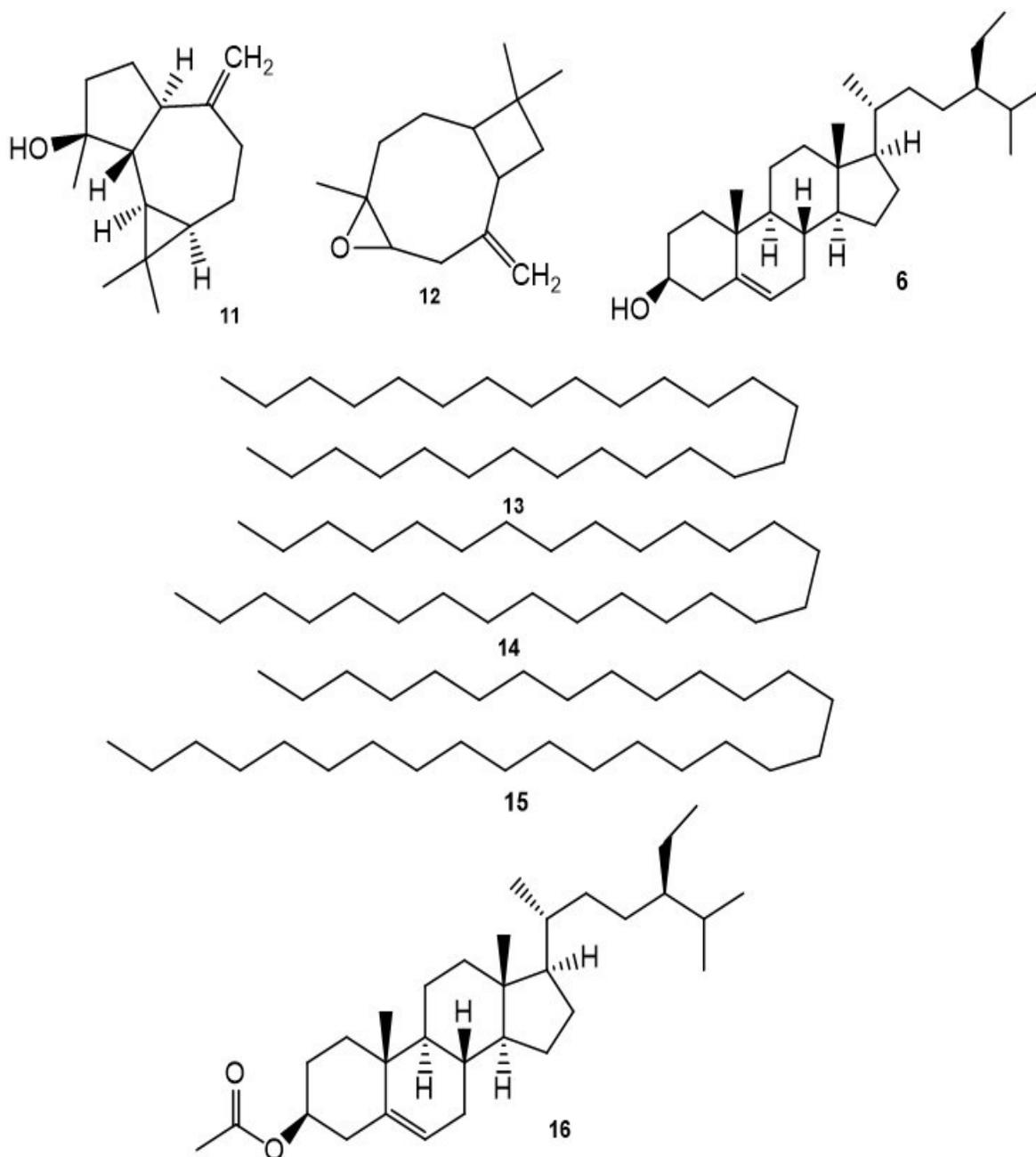


Figura 30 Estructura de los compuestos identificados en el extracto **SsH**.
Epatulenol (11), óxido de β -cariofileno (12), heptacosano (13), nanocosano (14),
hentriacontano (15), β -sitosterol (6) y acetato de β -sitosterol (16)

7.6 Elucidación por RMN de isosesseina (1) y sesseina (2)

El análisis de los espectros de RMN ^1H y ^{13}C (figuras 31, 32, 33 y 34) y de los experimentos bidimensionales COSY, NOESY, HSQC y HMBC (figura A2, figura A3), nos permitió obtener los datos espectroscópicos (tabla 7) de **1** y **2** mismos que fueron comparados con lo descrito en la literatura (Jiménez et al., 1988) lo cual confirmó que, en el caso de **1**, este compuesto diterpénico es el 7 α -acetil- 12-hidroxiabieta-8,13-diene-11,14-diona-19,20- δ -lactona, conocido como “sesseína” (**2**) (figura 35).

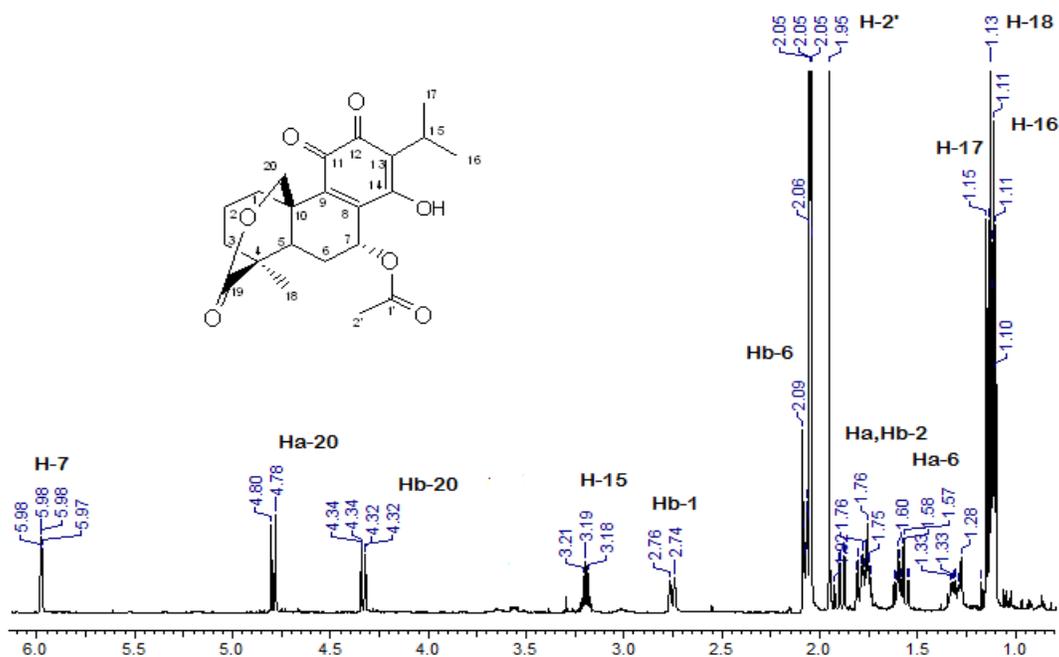


Figura 31 RMN ^1H (CD_3COCD_3 , 600 MHz) compuesto **1**

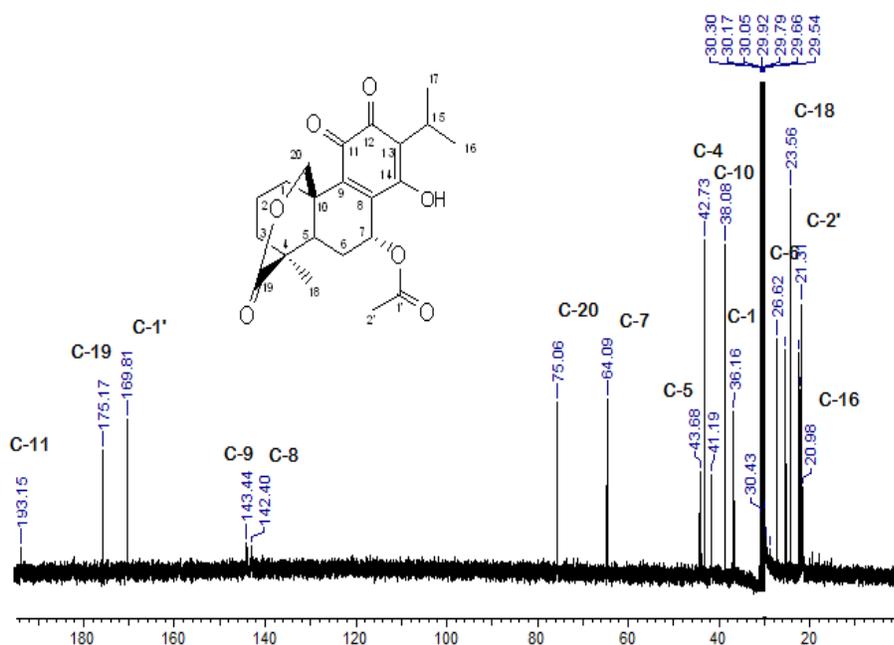


Figura 32 RMN ^{13}C (CD_3COCD_3 , 150 MHz) compuesto 1

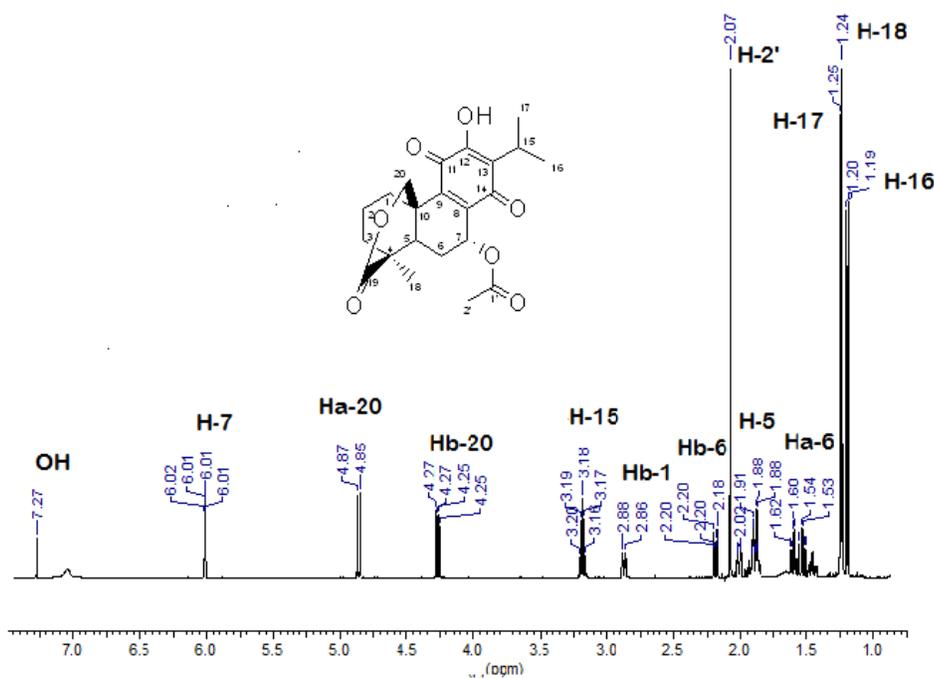


Figura 33 RMN ^1H (CDCl_3 , 600 MHz) compuesto 2

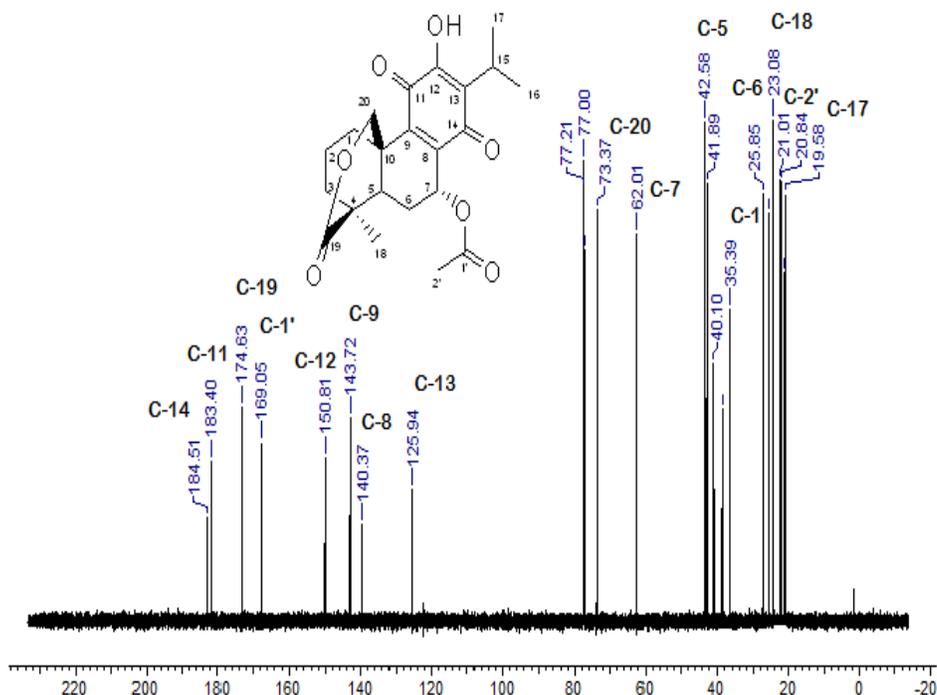


Figura 34 RMN ¹³C (CDCl₃, 150 MHz) compuesto 2

El compuesto **1** presentó los mismos desplazamientos químicos que **2**, excepto en las posiciones C-12 y C-14, ya que se trata del par tautomérico, es decir, hay intercambio de los grupos funcionales de un carbonilo (C=O) a un hidroxilo (OH) y de un hidroxilo (OH) a un carbonilo (C=O), respectivamente. Esto fue corroborado por las correlaciones en los experimentos bidimensionales (figura 36, figura A3), principalmente entre el protón H-7 ($\delta = 5.98$) y el C-14 ($\delta = 184.51$), dando una mayor consistencia para el tautómero de O-quinona, por lo que este compuesto es el isómero estructural 7 α -acetil- 14-hidroxiabieta-8,13-diene-11,12-diona-19,20- δ -lactona (figura 35), al cual se denominó “isosesseína”(1) este efecto se ha reportado previamente para estructuras diterpénicas con el anillo de quinona, como el caso de los diterpenos tipo abietano, la 7-O-acetilhorminona y horminona, que se encuentran en muchas especies de *Salvia* y a los que se le comprobó su tautomerismo mediante el análisis de las correlaciones entre los H-7 y C-14, empleando ensayos bidimensionales como HMBC y NOESY (Rungsimakan y Rowan, 2014); por lo que éste efecto es reportado por primera vez en éste trabajo para la sesseína y solo fue

posible su determinación mediante técnicas de RMN 2D, como el ensayo HMBC y NOESY aplicados para dicho fin en el presente trabajo.

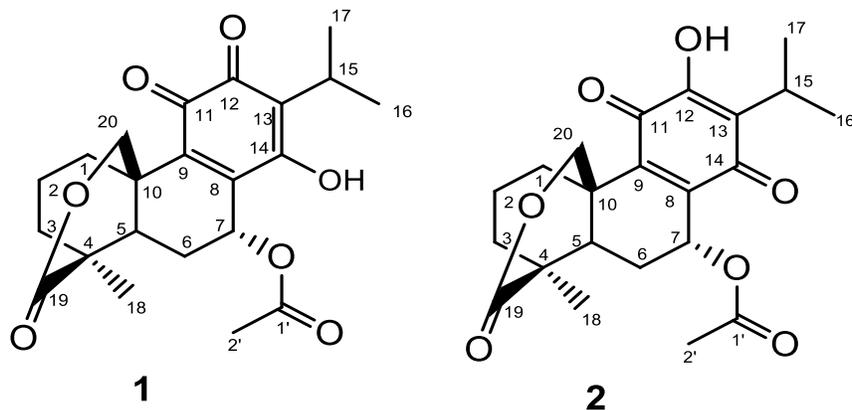


Figura 35 Estructura química de los dos diterpenos tipo royleanona aislados de *S. sessei* Benth.

- 1: el 7 α -acetil- 12-hidroxiabieta-8,13-diene-11,14-diona-19,20- δ -lactona (isosesseína).
- 2: 7 α -acetil- 14-hidroxiabieta-8,13-diene-11,12-diona-19,20- δ -lactona (sesseína)

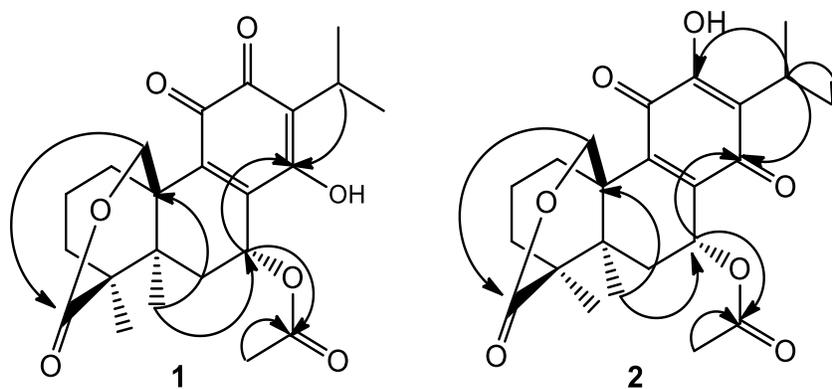


Figura 36 Correlaciones claves de HMBC en los compuestos 1 y 2

Tabla 7 Datos espectroscópicos de RMN para los compuestos **1** y **2** (600 Mhz, **1** en CD₃COCD₃, **2** en CDCl₃, δ ppm, *J* en Hz)

Posición C	HSQC 1		HSQC 2		HMBC
	δ ¹ H-RMN	δ ¹³ C-RMN	δ ¹ H-RMN	δ ¹³ C-RMN	
1	1.33, 275	36.16	Ha 1.46 (<i>td</i> , <i>J</i> = 1.93, 5.15, 12.88) Hb 2.87 (<i>d,br</i> <i>J</i> = 12.88)	35.39	2, 3, 5, 10, 20
2	1.76, 1.76	21.82	Ha 1.86 (<i>m</i>) Hb 1.93 (<i>m</i>)	20.84	1, 3, 4, 10
3	1.81, 1.60	41.19	Ha 2.0 (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 13, 52, 9.01, 3.8) Hb 1.60 (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 13, 5.15, 52, 8.37)	40.10	1, 2, 4, 5, 4, 18, 19
4	-----	42.73	-----	41.84	
5	1.89	43.68	H 1.89 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 3.22, 14.17)	42.58	3, 6, 7, 9, 10, 18, 19, 20
6	1.57, 2.07	26.62	Ha 1.59 (<i>ddd</i> , <i>J</i> = 3.86, 3.86, 14.81) Hb 2.19 (<i>dt</i> , <i>J</i> = 1.93, 4.51, 14.81)	25.85	4, 5, 7, 8, 10
7	5.98	64.09	H 6.01 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 1.93, 3.86 Hz)	62.01	5, 6, 8, 9, 1, 1'
8	-----	142.40	-----	140.37	
9	-----	143.44	-----	143.72	
10	-----	38.08	-----	37.59	
11	-----	193.15	-----	183.4	
12	-----	168.65	-----	150.74	
13	-----	120.34	-----	125.94	
14	-----	181.83	-----	184.51	
15	3.19	24.81	H 3.18 (<i>hept</i> , <i>J</i> = 7.08)	24.25	12, 13, 14, 16, 17
16	1.11	20.97	H 1.19 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7.08)	19.58	13, 15, 17
17	1.14	21.51	H 1.25 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7.02)	19.76	13, 15, 16
18	1.13	23.54	H 1.24 (<i>s</i>)	23.08	3, 4, 5, 14
19	-----	175.17	-----	174.83	
20	4.79, 4.31	75.06	Ha 4.86 (<i>d</i> , <i>J</i> = 12.23) Hb 4.26 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 1.93, 12.23)	73.37	
1'	-----	169.81	-----	169.05	
2'	1.95	21.31	H 2.07 (<i>s</i>)	21.01	
OH-12			7.29		

s: singulete, *d*: doblete, *t*: triplete, *hept*: heptete, *m*: multiplete; *dd*: doble de dobles; *ddd*: doble de doble de dobles, *td*: triplete de dobles; *d*, *br*: doblete ancho

7.7 Elucidación por RMN del ácido gálico (7), ácido cafeico (8) y ácido rosmarínico (9)

En el caso de **7**, el análisis del espectro RMN ^1H (figura A4) se encontró un singulete a $\delta = 7.05$ ppm que integra para dos protones equivalentes (H-2 y H-6). En el espectro de RMN ^{13}C (figura A5) se observó una señal en $\delta = 110.4$ ppm relacionada con los carbonos equivalente C-2 y C-6, la señal en $\delta = 146.5$ ppm correspondieron a los dos carbonos equivalentes C-3 y C-5 y una señal en $\delta = 170.5$ ppm característica de carbono carbonílico en C-1'; estos datos fueron comparados con los reportados en la literatura y corresponden al ácido gálico (Reiersen et al., 2003).

El análisis RMN ^1H (figura A6) y ^{13}C (figura A7) de **8**, mostró señales de protón del tipo aromático en sistema ABX y enlace doble en posición *trans*. De acuerdo con la comparación de los datos espectroscópicos con los de la literatura (Jeong et al., 2011), este compuesto corresponde al ácido cafeico.

El análisis RMN ^1H (figura A8) y ^{13}C (figura A9) de **9**, mostró señales de protón del tipo aromático en sistema ABX y enlace doble en posición *trans* el cual corresponde a un éster de ácido cafeico, el cual se encuentra unido a un ácido 3,4-dihidroxifenilactico. De acuerdo a los datos espectroscópicos este corresponde al ácido rosmarínico.

7.8 Actividad antiinflamatoria de extractos, fracciones y compuestos aislados de *S. sessei*

Debido a que la erisipela (hinchazón roja o blanca de las piernas) cursa con un fondo inflamatorio importante y *S. sessei* es usada en la MTC para tratar dicho padecimiento, se decidió medir su capacidad antiinflamatoria con el método de edema en oreja de ratón inducido por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), por ser un ensayo confiable para evaluar en un modelo de inflamación aguda (Patel et al., 2012); es conocido que esta sustancia es capaz de inducir una respuesta inflamatoria aguda empleando una dosis de 2.5 µg/oreja, la respuesta inflamatoria es caracterizada por la vasodilatación, migración celular, generación de especies reactivas de oxígeno y formación de edema durante las primeras 3 o 4 horas de la aplicación del irritante (Rao et al., 1993; Gábor, 2000).

Los resultados correspondientes al efecto antiinflamatorio de los extractos, fracciones y los compuestos aislados se presentan en la tabla 8 y figura 37 donde a una misma dosis de 1.0 mg/oreja, todos los extractos y compuestos presentaron actividad antiinflamatoria; en el caso de los extractos, el porcentaje de inhibición fue incrementándose conforme se aumentó la polaridad del disolvente empleado, es decir, 40.55 ± 0.5% para el **SsH**, 56.01 ± 1.1% para el **SsD** y 66.0 05 ± 0.3% para el **SsM**. Mientras que de las fracciones provenientes del extracto metanólico, la **SsM13-15** es la que tiene el más alto efecto inhibitorio (72.37 ± 1.6%), seguida de la **SsP2-5** (53.31 ± 1.2 %) y la de menor efecto correspondió a la **SsM10-12** (38.69 ± 1.2%). La comparación estadística de los extractos y fracciones frente al fármaco de referencia mostró que la fracción **SsM13-15** no presentó diferencia significativa en el porcentaje de inhibición de la inflamación ($p < 0.05$).

De los compuestos aislados el mayor porcentaje de inhibición fue de 79.85 ± 3.5% para **1**, seguido de 64.47 ± 0.7% para **4**, de 54.36 ± 1.7% para **2** y de 42.67 ± 0.7% para **3**; para **Indo** fue 75.24 ± 2.4%. La comparación estadística entre compuestos contra **Indo** indicó que el compuesto **1** no es significativamente diferente en el porcentaje de inhibición de la inflamación ($p < 0.05$) y además al calcular su potencia contra este fue de 0.9, lo cual demuestra una equivalencia en actividad antiinflamatoria entre ambos tratamientos.

La actividad antiinflamatoria de los extractos y fracciones puede estar asociada a su contenido metabólico, el caso del extracto **SsH**, que mostró la presencia de hidrocarburos como es el hentriacontano, compuesto más abundante en el extracto, para el cual se ha reportado un potencial supresor en mediadores proinflamatorios como NO, PGE2, LTB4 y

en la translocación de NF- κ B inducida por LPS (Khajuria et al., 2017). De igual manera, es de destacar que la presencia del β -sitosterol puede contribuir de manera significativa en el efecto que alcanzó dicho extracto ya que se ha reportado la capacidad que tiene de inhibir la inflamación (Valerio et al., 2011).

Para el caso del extracto **SsD**, la actividad antiinflamatoria puede estar relacionada directamente con los compuestos aislados del mismo, como fueron el ácido ursólico (**5**) y los diterpenos **1**, **2**, **3**, **4**. En cuanto a **5** que es uno de los principales componentes en muchas plantas, la actividad antiinflamatoria está asociada a su capacidad de inhibir la producción de mediadores de la inflamación al suprimir al NF- κ B, enzimas como la FLA-2 iNOS, COX-2 (Checker et al., 2012). En relación a los cuatro diterpenos tipo abietano aislados en el presente trabajo, es la primera vez que se evalúan y reporta su efecto antiinflamatorio; no obstante, se ha reportado que diterpenos tipo abietanos con anillos de quinona aislados de *Tripterygium hypoglaucum*, tuvieron la capacidad de inhibir la producción de mediador importante de la inflamación como lo es el NO, en el ensayo con macrófagos RAW 264.7 inducidos por LPS (Chen et al. 2018); por lo anterior, es importante profundizar en el mecanismo de acción de éstas nuevas estructuras ya que la posición que tienen los grupos carbonilo e hidroxilo pudiera estar jugando un papel determinante en el efecto que tienen estos compuestos.

La actividad mostrada por el extracto **SsM** y sus fracciones **SsM10-12**, **SsM13-15** y **SsP2-5** puede asociarse a la presencia de los compuestos tipo polifenoles en los mismos, como fueron el ácido gálico(**7**), ácido cafeico (**8**) y rosmarínico (**9**), así como la de una flavona, como fue la isoorientina (**10**), que fueron identificados y aislados en este trabajo para los que se ha reportado su elevada actividad antiinflamatoria inhibiendo el funcionamiento de los leucocitos polimornucleares, en el caso **7** y **10**, se reportó que disminuyen la expresión de NF- κ B y la secreción de la IL-6, para **7** el estudio fue realizado con cultivos primario de endometriosis y para **10** fue con células RAW 264.7, iducidas por LPS; de igual forma para **8**, **9** y **10** se ha reportado en ensayos *in vitro* una elevada actividad al inhibir la producción de NO, iNOS y COX-2; además para **7** se ha reportado que inhibe las reacciones alérgicas inflamatorias al bloquear la liberación de histamina y citosinas proinflamatorias (Choi et al., 2018, Chen et al., 2018, Anilkumar et al., 2017; Kim et al., 2006).

Tabla 8. Porcentaje de inhibición de la inflamación (%) de los extractos, fracciones y compuestos aislados de *S. sessei* a 1.0 mg/oreja.

Muestra	Porcentaje de inhibición (%)
SsH	40.55 ± 0.5
SsD	56.01 ± 1.1
SsM	66.07 ± 0.5
SsM10-12	38.69 ± 1.2
SsM13-15	72.37 ± 1.6
SsP2-5	53.31 ± 1.2
1	79.85 ± 3.5
2	54.36 ± 1.7
3	42.67 ± 0.7
4	64.47 ± 0.7
Indo [1mg/oreja]	75.24 ± 2.4

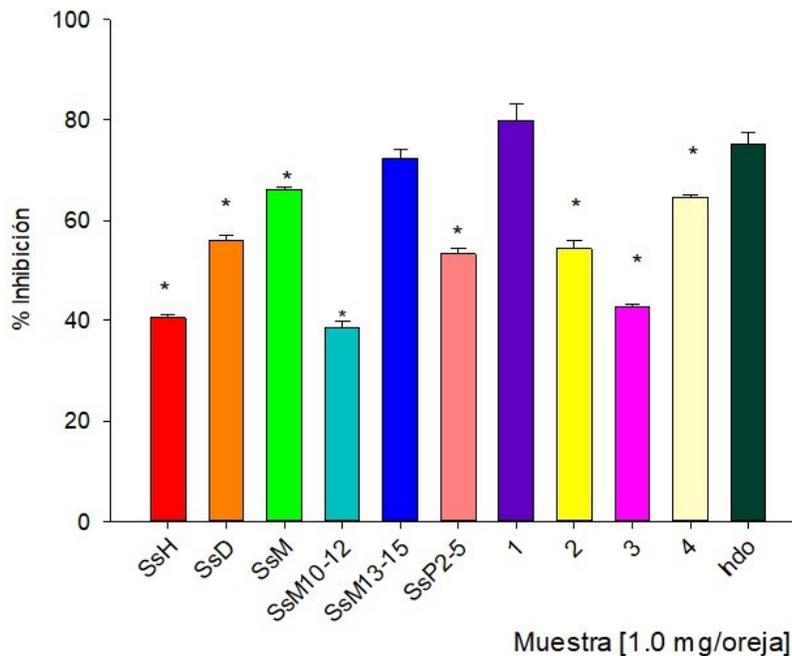


Figura 37 Porcentaje de inhibición de la inflamación (%) de los extractos, fracciones y compuestos aislados de *S. sessei* en edema inducido por TPA en oreja de ratón a 1.0 mg/oreja.

SsH (*S. sessei* hexano), **SsD** (*S. sessei* diclorometano), **SsM** (*S. sessei* metanol), **SsM10-12**, **SsM13-15** y **SsP2-5** (fracciones de **SsM**) **1**, **2**, **3** y **4** (compuestos aislados), Indo (Indometacina). Los valores se reportan como promedio ± sem. n=5. ANOVA, Tukey * $p < 0.05$ Indo.

Los compuestos **1** y **2** probados a diferentes dosis (0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mg/oreja), suprimieron el edema inducido por TPA en oreja de ratón de una manera dosis dependiente como se puede observar en la figura 38. Para el compuesto **1**, los porcentajes de inhibición fueron: 7.73 ± 1.2 , 25.78 ± 1.5 , 49.0 ± 1.4 , 77.85 ± 1.3 y 74.02 ± 1.2 %; para el compuesto **2** fueron: 17.53 ± 1.7 , 30.81 ± 1.0 , 44.88 ± 1.4 , 54.36 ± 3.0 , 43.30 ± 0.6 %. Todas las dosis evaluadas de ambos compuestos presentaron diferencias significativas entre ellas, excepto las dosis del compuesto **1** a 1.0 y 2.0 mg/oreja que tuvieron efecto similar al de indometacina a 1.0 mg/oreja. La dosis efectiva media (DE_{50}) calculada para el compuesto **1** fue de 0.337 ± 0.04 mg/oreja y para el compuesto **2** fue de 0.267 ± 0.06 mg/oreja y no presentaron diferencias significativas entre ambas. Derivado de lo anterior, se puede inferir que la actividad antiinflamatoria de **SsD** se debe a la presencia mayoritaria de los compuestos **1** y **2** para los que no había reportes farmacológicos previos.

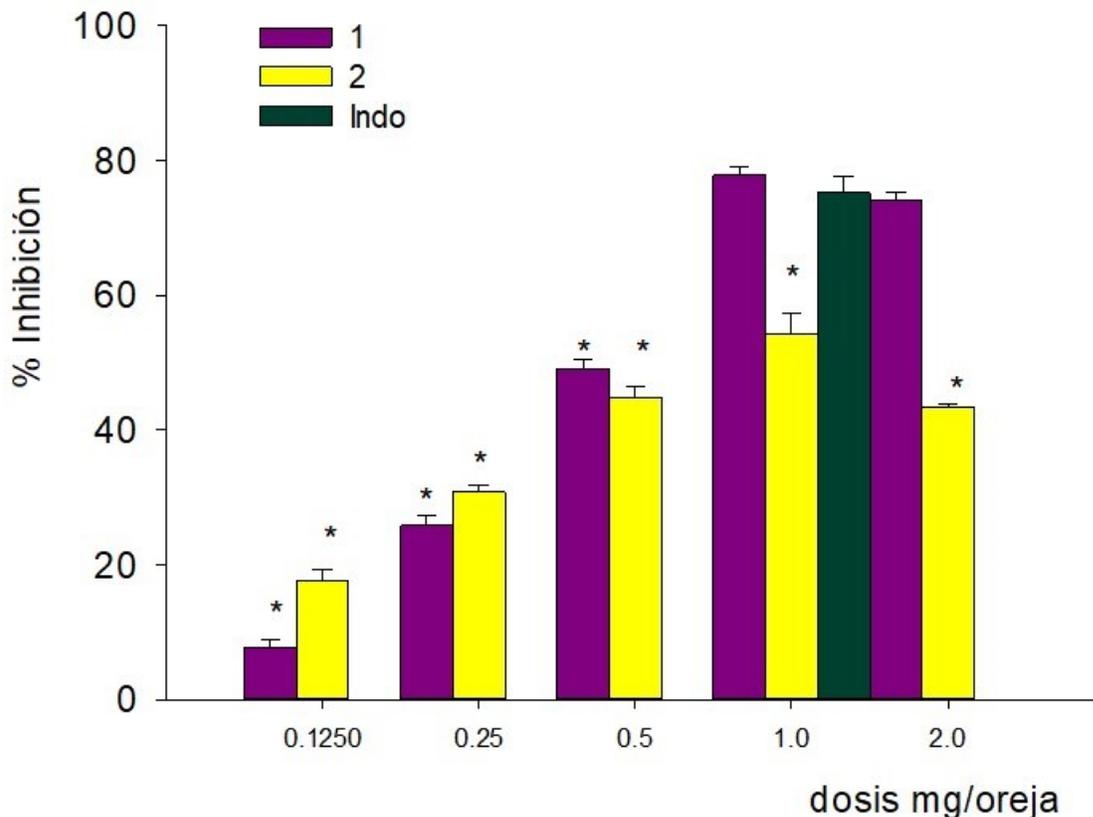


Figura 38 Curvas dosis-respuesta para los compuestos **1** y **2** aislados de *S. sessei* e **Indo** (Indometacina).

Los valores se reportan como promedio \pm sem. n=5. ANOVA, Tukey * $p < 0.05$ **Indo**.

7.9 Actividad antibacteriana

Los resultados de la actividad antibacteriana de los extractos y compuestos determinada como CMI, son mostrados en la tabla 8. El extracto **SsH** presentó una importante actividad contra *S. hominis* 592 (12.5 µg/mL) el cual es un patógeno oportunista, capaz de causar diversas enfermedades (bacteremia, septicemia y especialmente endocarditis) (Gill et al., 1983), en pacientes inmunocomprometidos, aunado con una preocupación creciente de su resistencia a meticilina llegando a constituirse como el tercer patógeno en aislados clínicos (Bouchami, 2011; Soroush et al., 2017); la actividad de este extracto podría deberse a compuestos alifáticos presentes como el hentriacontano que es el compuesto mayoritario y del cual se ha reportado su actividad bacteriana (Shukla et al., 2017), además de los otros aceites esenciales identificado que por lo general están presentes en especies del género *Salvia* y que han mostrado actividad antibacteriana (Tenore et al., 2011; Tan et al., 2016). Los extractos **SsD** y **SsM** presentaron actividad relevante contra las siguientes bacterias Gram-positivas: *S. haemolyticus* 1163 (100 y 50 µg/mL) y *E. faecalis* ATCC 2912 (100 y 12.5 µg/mL); además, el **SsD** presentó actividad contra *S. hominis* 592 (100 µg/mL).

La fracción **SsM10-12** fue la que mostró la mayor actividad bacteriana, con efecto contra Gram-positivas como fueron las del género *Staphylococcus*: *S. aureus* ATCC 25923 (100 µg/mL), *S. aureus* ATCC 43310 (100 µg/mL), *S. pyogenes* ATCC 19615 (12.5 µg/mL), *S. hominis* 592 (100 µg/mL) y contra Gram-negativas del género *Escherichia*: *E. coli* 4036 (50 µg/mL) y *E. coli* ATCC 25922 (50 µg/mL). Cabe destacar que de esta fracción se aislaron los compuestos **7**, **8** y **9** los cuales podrían ser responsables de la elevada actividad de esta fracción con espectro amplio. La fracción **SsM13-15** fue activa contra dos bacterias Gram positivas: *S. pyogenes* ATCC 19615 (12.5 µg/mL) y *S. hominis* 592 (50 µg/mL) y contra tres Gram-negativas: *E. coli* 4036 (25 µg/mL), *E. coli* ATCC 25922 (12.5 µg/mL) y *Salmonella dublin* 9676 (12.5 µg/mL), se destaca la actividad de esta fracción ya que las últimas dos bacterias mencionadas son de la familia Enterobacteriaceae y están asociadas a enfermedades gastrointestinales, por lo que los compuestos **8**, **9** y los 5 flavonoides presentes en ésta fracción podrían ser selectivos para bacterias Gram-negativas, las cuáles están presentando una elevada resistencia a antibióticos (OMS, 2017). Para la fracción **SsMP2-5**, la actividad fue contra *S. pyogenes* ATCC 19615 (100 µg/mL), *E. coli* 4036 (100 µg/mL), *E. coli* ATCC 25922 (25 µg/mL), donde el compuesto **10**, aislado de esta fracción puede estar ejerciendo un papel importante en la actividad mostrada.

El compuesto **1** presentó actividad contra dos bacterias Gram-positivas, *S. haemolyticus* 1163 (12.5 µg/mL, 31.09 µM) y *E. faecalis* ATCC 2912 (12.5 µg/mL, 31.09 µM) y contra una bacteria Gram-negativa: *E. coli* ATCC 25922 (12.5 µg/mL, 31.09 µM). En el caso del compuesto **2** fue de los diterpenos isómericos aislados (**1** y **2**) el que presentó mayor acción antibacteriana, es decir, cinco bacterias Gram-positivas mostraron sensibilidad contra este compuesto: *S. aureus* ATCC 29213 (100 µg/mL, 248.75 µM), *S. haemolyticus* 1036 (100 µg/mL, 248.75 µM), *S. aureus* ATCC 43310 (100 µg/mL, 248.75 µM), *S. pyogenes* (100 µg/mL, 248.75 µM), *S. epidermidis* 1042 (100 µg/mL, 248.75 µM). El compuesto **3** fue activo contra *S. pyogenes* (12.5 µg/mL, 34.72 µM), *S. hominis* 592 (100 µg/mL, 277.76 µM) y *K. pneumoniae* ATCC 700603 (100 µg/mL, 277.76 µM). El compuesto **4**, de los diterpenos isómericos aislados (**3** y **4**), fue el que mayor actividad presentó, el efecto mostrado fue contra dos Gram-positivas, *S. pyogenes* (100 µg/mL, 277.76 µM) y *S. epidermidis* 1042 (100 µg/mL, 277.76 µM) y contra tres Gram-negativas, *K. pneumoniae* ATCC 700603 (50 µg/mL, 138.88 µM), *E. coli* 4036 (25 µg/mL, 138.88 µM) y *E. coli* ATCC 25922 (25 µg/mL, 138.88 µM). Cabe indicar que este es el primer estudio sobre la actividad antibacteriana de éstos diterpenos aislados y que además resultados muestran que el par de isómeros **1** y **2** tienen una mayor selectividad de actuar sobre bacterias Gram-positivas, mientras que el par de isómeros **3** y **4** su mayor selectividad es sobre bacterias Gram-negativas, por lo que podría inferirse que la posición de los grupos carbonilos en el anillo de quinona y la acetilación o deacetilación en la posición 7 en las estructuras de éstos compuestos estaría teniendo un papel relevante en la selectividad que presentan contra las bacterias.

También es importante mencionar la actividad de los extractos, fracciones y de los compuestos aislados de *S. sessei* contra varias especies de *Staphylococcus* empleadas en este trabajo, las cuales tienen hoy en día gran relevancia clínica, como es *S. aureus* y *S. haemolyticus*, ya que ambos se han convertido en patógenos multirresistentes a antibióticos en infecciones nosocomiales (Sader et al., 2010; Barros et al., 2012; Teeraputon et al., 2017). Es relevante indicar que, para las dos bacterias antes mencionadas, el antibiótico de referencia empleado presentó actividad a la concentración más alta utilizada (20 µg/mL, 43.14 µM). De igual forma se destaca que las fracciones **SsM10-12** (12.5 µg/mL), **SsM13-15** (12.5 µg/mL), **SsMP2-5** (100 µg/mL) y los compuestos **2** (100 µg/mL, 248.75 µM), **3** (12.5 µg/mL, 34.72 µM) y **4** (100 µg/mL, 277.76 µM) fueron activos contra *S. pyogenes*, que es el principal agente infeccioso en la erisipela, enfermedad para la cual es empleada la planta en la medicina tradicional y contra cepas de *S. aureus*, que es el segundo agente infeccioso para el desarrollo de la enfermedad antes referida (Celestin et al., 2007; Bläckberg et al.,

2015), por lo que podríamos considerar que en el caso de las fracciones **SsM10-12**, **SsM13-15** y **SsMP2-5** en donde están presentes compuestos como **7**, **8**, **9** y **10**, flavonoides y de los isómeros diterpénicos (**1**, **2**, **3** y **4**) aislados de la planta, están relacionados con el efecto antiinflamatorio y antibacteriano de la *S. sessei*, confirmando el uso que en la MTC ha tenido esta especie. Además, se destaca la actividad contra *E. faecalis* de los extractos **SsD**, **SsM** y el compuesto **1**, obteniendo este último una actividad significativa (12.5 µg/mL, 31.09 µM) comparada con la que alcanzó **Gen**, el antibiótico de referencia (20 µg/mL, 43.14 µM); la relevancia hoy en día de esta especie bacteriana radica en su presencia en bacteremias, infecciones del tracto urinario, pélvicas, intra-abdominales, endocarditis, sepsis neonatal y meningitis, además del desarrollo de resistencia a antibióticos (Saeidi et al., 2017). De igual forma, se destaca que la actividad de las fracciones **SsM10-12**, **SsM13-15**, **SsMP2-5** y de los compuestos **1** y **4** contra *E. coli* asociada a infecciones gastrointestinales y desarrollo de resistencia a antibióticos beta-lactámicos (Chellapandi et al., 2017).

La elevada actividad antibacteriana de los compuestos **1**, **2**, **3** y **4** contra las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas evaluadas en este trabajo, está de acuerdo con lo reportado previamente por varios autores que a partir de algunas especies del género *Salvia* de las que se han aislado diterpenos tipo royleanona que tienen al grupo quinona presente en su estructura y que han mostrado una mayor actividad antimicrobiana comparados con aquellos que no tienen dicho grupo, por lo que sugieren que dicha actividad está relacionada con este grupo funcional, como es el caso para **1**, **2**, **3** y **4** (Yang et al., 2001; Ulubelen 2003; Kuźma et al. 2007), aunado a que estos dos compuestos presentaron un anillo δ-lactona, que puede contribuir significativamente en su actividad antibacteriana y que en general los hacen ser compuestos con potencial de amplio espectro bacteriano.

Tabla 8 Actividad antibacteriana de los extractos, fracciones y compuestos aislados de *S. sessei*. Concentración mínima inhibitoria (MIC) expresado en µg/mL y micromolar (µM)

Muestra	Gram positivos										Gram negativos			
	Sa1	Sa2	Sh1	Sh2	Sf	Sp	Se	Sho	Kp	Ec1	Ec2	Sd		
SsH	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	12.5	>100	>100	>100	>100		
SsD	>100	>100	100	100	>100	>100	>100	100	>100	>100	>100	>100		
SsM	>100	>100	>100	50	12.5	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100		
SsM10-12	100	100	>100	>100	>100	12.5	>100	100	>100	50	50	>100		
SsM13-15	>100	>100	>100	>100	>100	12.5	>100	50	>100	25	12.5	12.5		
SsMP2-5	>100	>100	>100	>100	>100	100	>100	>100	>100	100	25	>100		
1	>100	>100	>100	12.5	12.5	>100	>100	>100	>100	>100	12.5	>100		
2	100	100	>100	>100	31.09	31.09	>100	>100	>100	>100	>100	>100		
3	>100	>100	>100	>100	>100	248.75	248.75	248.75	248.75	248.75	248.75	>100		
4	>100	>100	>100	>100	>100	12.5	>100	100	25	>100	>100	>100		
Gen	<20	20	20	<0.625	20	5	5	>20	>20	>20	10	>20		
	43.14	43.14	43.14	1.34	43.14	10.78	10.78	138.88	69.44	69.44	69.44	21.57		
Controles negativos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		

SsH (*S. sessei* hexano), **SsD** (*S. sessei* diclorometano), **SsM** (*S. sessei* metanol); fracciones activas del extracto metanólico: **SsM10-12**, **SsM13-15**, **SsMP2-5**; compuestos aislados **1**: Isosesseina, **2**: Sesseína **3**: Isosesseinol, **4**: Sesseinol; **Gen** (Gentamicina).

Sa1: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; **Sa2**: *Staphylococcus aureus* ATCC 43310; **Sh1**: *Staphylococcus haemolyticus* 1036; **Sh2**: *Staphylococcus haemolyticus* 1163 (aislado clínico); **Sf**: *Streptococcus faecalis* ATCC 2912; **Sp**: *Staphylococcus pyogenes* ATCC 19615; **Se**: *Staphylococcus epidermidis* 1042; **Sho**: *Staphylococcus hominis* 592; **Kp**: *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 **Ec1**: *Escherichia coli* 4036; **Ec2**: *Escherichia coli* ATCC 25922; **Sd**: *Salmonella dublin* 9676; ---sin crecimiento bacteriano; + crecimiento.

7.10 Capacidad antioxidante de los extractos, fracciones y compuestos aislados

Los resultados obtenidos en los tres ensayos donde se evaluó la capacidad antioxidante de los extractos, fracciones y compuestos aislados de *S. sessei* son mostrados en las figuras 39, 40, 41, 42, 43 y 44 en la tabla 9. El extracto **SsH** presentó baja capacidad antioxidante a las concentraciones evaluadas tanto en el ensayo de DPPH y ABTS por lo que no fue posible determinar su CI_{50} . Sin embargo, presentó mejor capacidad reductora en CARF con 1038.19 ± 10.0 Eq mM $FeSO_4$, aunque menor a los otros dos extractos (**SsD** y **SsM**) y al de *C. sinensis*, por lo que compuestos identificados en éste extracto como los triterpénicos β -sitosterol, acetato de β -sitosterol principalmente, pueden ser los responsables de capacidad reductora mostrada.

Por el contrario, los extractos **SsD** y **SsM** mostraron buena actividad antioxidante; en el ensayo DPPH, **SsD** fue el que obtuvo la mejor actividad de los tres extractos de *S. sessei* (3313.39 ± 20.79 $\mu\text{g/mL}$) la cual mostró un valor de CI_{50} , 1.7 veces mayor comparado con la CI_{50} de *C. sinensis* (1961.80 ± 30.91 $\mu\text{g/mL}$), que fue el extracto de referencia y que alcanzó la mejor actividad, cabe resaltar que en este último, hay una presencia elevada (94%) del polifenol epigallocatequina 3-galato, que posee efecto antioxidante; no obstante, en los ensayos de ABTS y CARF es **SsM** (1.34 ± 0.03 $\mu\text{g/mL}$, 1723.75 ± 1.7 Eq. mM $FeSO_4$) el que mejor capacidad antioxidante y reductora presenta, superando en ambos experimentos al extracto de *C. sinensis* (14.24 ± 0.04 $\mu\text{g/mL}$, 1612.64 ± 0.7 Eq. mM $FeSO_4$) que tuvo una concentración inhibitoria media 10.6 mayor en DPPH y su Eq. mM fue 0.9 menos que el de **SsM**. La actividad manifestada por **SsD** y **SsM** podría estar asociada con compuestos flavonoides, terpenoides y polifenoles reportados en el género *Salvia*, como ejemplo, lo reportado para extractos metanólicos, diclorometánicos y acuosos de *S. blepharochlaena*, *S. euphratica* var. *leiocalycina* y *S. verticillata* subsp. *amasica*, en donde fueron identificados compuestos como el ácido rosmarínico, ácido gálico, luteolina, hesperidina y una amplia variedad de abietanos diterpenicos, mismos que mostraron capacidad antioxidante en ensayos de DPPH, ABTS, CARF y enzimáticos como el de la actividad de la catalasa (Wang et al., 1998; Tepe et al., 2006; Bahadori et al., 2015; Alipić, 2017).

Las fracciones de **SsM** analizadas presentaron capacidad antioxidante y en algunos casos mejor que del extracto estandarizado de *C. sinensis* con el cual fueron comparados, como lo fue la fracción **SsMP2-5** que en el ensayo de DPPH obtuvo la mejor $CI_{50} = 570.5 \pm 22.5$

$\mu\text{g/mL}$, comparada con las obtenidas por los demás extractos, fracciones y el extracto de *C. sinensis*; cabe destacar que en esta fracción se aisló una flavona, la isoorientina (**10**), la cual puede estar contribuyendo de manera significativa a la capacidad antioxidante de esta fracción y del mismo se ha reportado en modelos celulares presenta una elevada actividad al actuar sobre los mecanismos antioxidantes intracelular (Yuan et al., 2016). En el ensayo de ABTS, la fracción **SsM13-15** fue la que alcanzó la mejor concentración inhibitoria media ($\text{CI}_{50} = 1.8 \pm 0.2 \mu\text{g/mL}$), seguido del extracto de **Cs** ($\text{CI}_{50} = 14.24 \pm 0.03 \mu\text{g/mL}$), de igual forma se destaca que la fracción **SsM13-15** evidenció en su contenido metabólico presencia de polifenoles, como el ácido cafeíco y el ácido rosmarínico, a los cuales se les ha reportado una fuerte actividad antioxidante (Chen y Ho, 1997) así como 5 compuestos flavonoides, que estarían ejerciendo una elevada actividad antioxidante en este tipo de ensayo y como se sabe, esta fracción proviene del extracto **SsM** que fue el que presentó la mejor actividad antioxidante en este tipo de ensayo y también están presentes los compuestos polifenólicos y flavonoides aislados en las fracciones que se obtuvieron a partir de dicho extracto. En el ensayo CARF, en donde a mayor Eq mM FeSO_4 empleados representan una mayor capacidad reductora, las fracciones **SsM13-15** ($1718.46 \pm 55.0 \text{ Eq mM FeSO}_4$) y la **SsMP2-5** (1722.36 ± 23.0) presentaron actividad reductora, junto con la del extracto **SsM** ($1723.75 \pm 17.0 \text{ Eq mM FeSO}_4$) de donde provienen ambas fracciones, los cuales al ser comparadas con la actividad reductora del extracto de **Cs** ($1712.64 \pm 70.0 \text{ Eq mM FeSO}_4$) no presentaron diferencias significativas entre ellas; estas fracciones junto con el extracto de **SsM** contienen polifenoles y flavonoides, los cuales pueden ser los responsables de la elevada capacidad reductora de éstos extractos y fracciones.

Para el caso de los compuestos, en los ensayos de DPPH y ABTS, el compuesto **1**, es el de mejor capacidad antioxidante ($470.9 \pm 13.9, 0.46 \pm 0.04 \mu\text{M}$) superando a **Tx** ($531.2 \pm 10.0, 0.84 \pm 0.09 \mu\text{M}$) que al ser comparado con **1** tuvo una CI_{50} 1.13 veces mayor en DPPH y 0.5 veces mayor en ABTS; no así en el ensayo de CARF donde **Tx** ($2184.65 \pm 1.3 \text{ Eq mM FeSO}_4$) presentó una capacidad reductora de 1.42 veces mayor en comparación con **1**. Los compuestos **3** y **4** en los tres ensayos tuvieron una actividad antioxidante con CI_{50} muy altas para los ensayos de DPPH ($2321.2 \pm 16.1, 1853.27 \pm 13.2 \mu\text{M}$) y ABTS ($116.87 \pm 1.0, 162.2 \pm 0.2 \mu\text{M}$) y baja actividad reductora ($699.31 \pm 4.6, 532.36 \pm 12.8 \text{ Eq mM FeSO}_4$) siendo aproximadamente la mitad de la alcanzada por **1** y **2**.

En el caso de los cuatro compuestos aislados tipo diterpenos isómericos, se puede destacar que, si bien es cierto que los compuestos **1** y **2** tienen presencia de los mismos grupos funcionales en su estructura, los resultados diferentes en los ensayos de actividad

antioxidante, sugieren que la posición en que se encuentran estos grupos (OH, C=O y C=C) dentro de las estructuras facilitan la interacción en la estabilización de especies radicalarias mediante la transferencia de protones o electrones como lo analizado para siete diterpenos tipo abietanos aislados de *Salvia barrieleri*, donde la posición de grupos funcionales sustituyendo al anillo de quinona hizo que la capacidad antioxidante fuera distinta, siendo baja para estructura donde se encontraron grupos metoxilos, pero alta donde hubo presencia de grupos oxhidrilos (Kabouche et al., 2007; Kolak et al., 2009); en el caso de los isómeros **3** y **4** la presencia de un grupo hidroxilo en la posición 7, en lugar de un grupo acetato como en los compuestos **1** y **2** puede estar teniendo un efecto directo en la baja capacidad antioxidante que mostraron **3** y **4** comparados con **1** y **2**. No obstante, se puede destacar el hecho que este es el primer reporte sobre la capacidad antioxidante de éstos compuestos diterpénicos isómericos aislados de *S. sessei*.

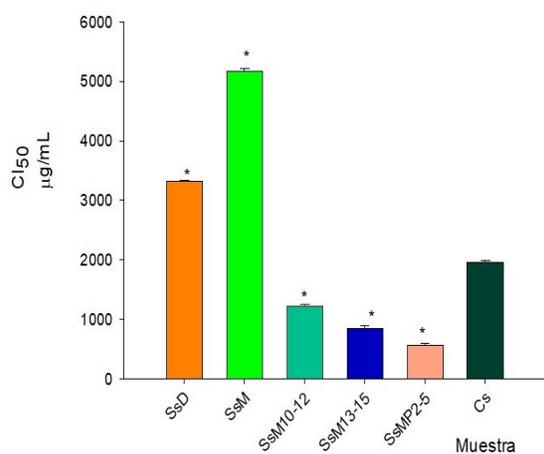


Figura 39 Concentración inhibitoria media por DPPH de extractos y fracciones de *S. sessei*.

SsH (*S. sessei* hexano), **SsD** (*S. sessei* diclorometano), **SsM** (*S. sessei* metanol); fracciones activas del extracto metanólico: **SsM10-12**, **SsM13-15**, **SsMP2-5**. **Cs** (*Camellia sinensis*). Los valores se reportan como promedio \pm sem. n=3. ANOVA, Tukey * $p < 0.05$ Cs

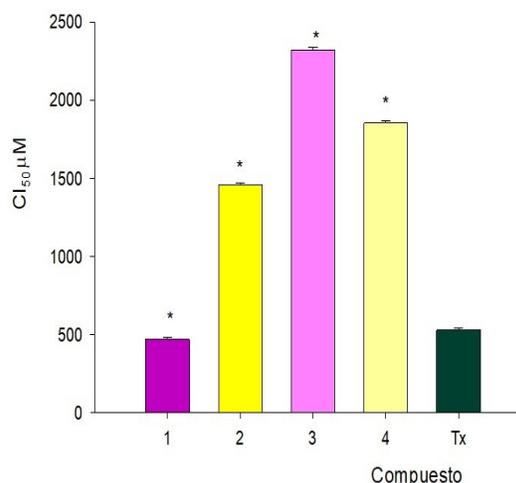


Figura 40 Concentración inhibitoria media por DPPH de compuestos aislados de *S. sessei*.

1: Isosesseina, **2**: Sesseína **3**: Isosesseinol, **4**: Sesseinol, **Tx**: Trolox. Los valores se reportan como promedio \pm sem. n=3. ANOVA, Tukey * $p < 0.05$ Tx.

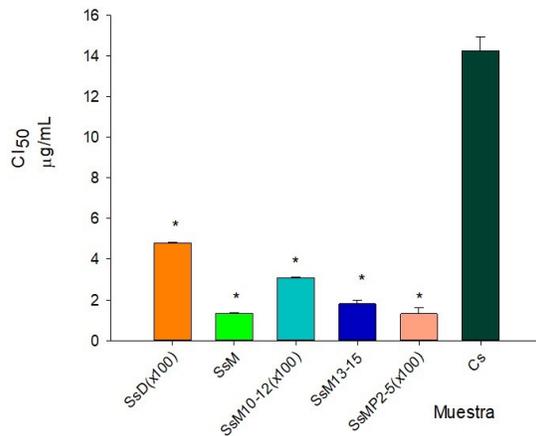


Figura 41 Concentración inhibitoria media por ABTS de extractos y fracciones de *S. sessei*.

SsH (*S. sessei* hexano), **SsD** (*S. sessei* diclorometano), **SsM** (*S. sessei* metanol); fracciones activas del extracto metanólico: **SsM10-12**, **SsM13-15**, **SsMP2-5**. **Cs** (*Camellia sinensis*). Los valores se reportan como promedio \pm sem. n=3. ANOVA, Tukey * p <0.05 **Cs**.

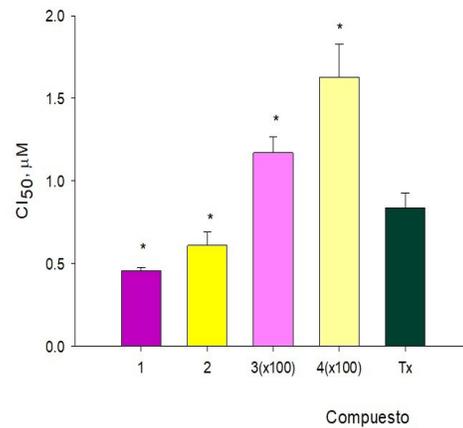


Figura 42 Concentración inhibitoria media por ABTS de compuestos aislados de *S. sessei*.

1: Isosesseina, **2**: Sesseína **3**: Isosesseinol, **4**: Sesseinol, **Tx**: Trolox. Los valores se reportan como promedio \pm sem. n=3. ANOVA, Tukey * p <0.05 **Tx**.

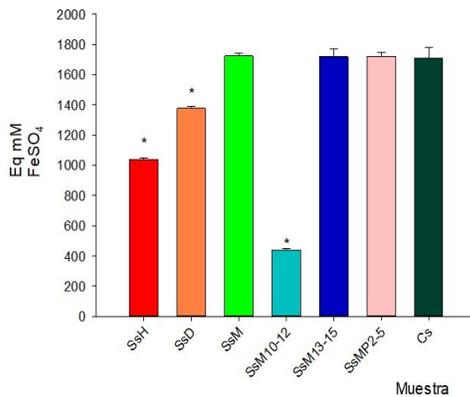


Figura 43 Equivalentes de FeSO₄ de extractos y fracciones de *S. sessei*. Determinada a una concentración de 5000 µg/mL.

SsH (*S. sessei* hexano), **SsD** (*S. sessei* diclorometano), **SsM** (*S. sessei* metanol); fracciones activas del extracto metanólico: **SsM10-12**, **SsM13-15**, **SsMP2-5**. **Cs** (*Camellia sinensis*). Los valores se reportan como promedio \pm sem. n=3. ANOVA, Tukey * p <0.05 **Cs**.

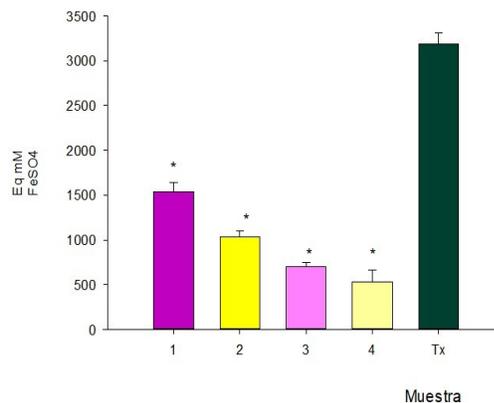


Figura 44 Equivalentes de FeSO₄ de compuestos aislados de *S. sessei*. Determinada a una concentración de 2.5 mM.

1: Isosesseina, **2**: Sesseína **3**: Isosesseinol, **4**: Sesseinol, **Tx**: Trolox. Los valores se reportan como promedio \pm sem. n=3. ANOVA, Tukey * p <0.05 **Tx**.

Tabla 9 Capacidad antioxidante de los extractos, fracciones ($\mu\text{g/mL}$) y compuestos aislados (μM) de *S. sessei*. Concentración inhibitoria 50 (CI_{50})

Muestra	DPPH CI_{50} $\mu\text{g/mL}$, μM	ABTS CI_{50} $\mu\text{g/mL}$, μM	CARF* Equivalente mM FeSO_4
SsH	ND	ND	1038.19 ± 10.0
SsD	3313.39 ± 20.79	479.0 ± 0.06	1377.08 ± 13.0
SsM	5156.73 ± 57.17	1.34 ± 0.03	1723.75 ± 17.0
SsM10-12	1223.16 ± 35.9	308.76 ± 2.5	437.92 ± 10.0
SsM13-15	855.86 ± 35.4	1.8 ± 0.2	1718.47 ± 55.0
SsMP2-5	570.5 ± 22.5	130.18 ± 2.5	1722.36 ± 23.0
Cs	1961.80 ± 30.91	14.24 ± 0.04	1712.64 ± 70.0
1	470.9 ± 13.9	0.46 ± 0.04	1536.53 ± 11.0
2	1458.47 ± 14.1	0.61 ± 0.08	1034.03 ± 7.0
3	2321.2 ± 16.1	116.87 ± 1.0	699.31 ± 4.6
4	1853.27 ± 13.2	162.2 ± 0.2	532.36 ± 12.8
Tx	531.2 ± 10.0	0.84 ± 0.09	2184.65 ± 1.3

SsH (*S. sessei* hexano); **SsD** (*S. sessei* diclorometano); **SsM** (*S. sessei* metanol); **SsM10-12**, **SsM13-15**, **SsMP2-5** fracciones del extracto metanólico; **1**, **2**, **3** y **4** Compuestos aislados; **Cs** (*C. sinensis*); **Tx** (Trolox). Los valores se reportan como promedio \pm sem. $n=3$. ND (No determinado).

*Determinada para los extractos y fracciones a una concentración de $5000 \mu\text{g/mL}$ y para los compuestos a una concentración de 2.5 mM .

CONCLUSIONES

8. Conclusiones

Los metabolitos aislados de *Salvia sessei* Benth mostraron actividad antiinflamatoria, antibacteriana y antioxidante.

De las partes aéreas pudieron aislarse y caracterizarse un total de 16 compuestos; en el extracto hexánico fueron identificados cinco alifáticos (**11**, **12**, **13**, **14** y **15**) y dos fitosteroles (**6** y **16**); del extracto metanólico se obtuvieron tres importantes fracciones, de las cuales pudieron aislarse y caracterizarse tres polifenoles (**7**, **8** y **9**) y una flavona (**10**), además en una de las fracciones se identificaron cinco compuestos tipo flavonoide; del extracto diclorometánico permitieron aislar cuatro diterpenos tipo royleanona los cuales son tautómeros entre sí, es decir **1** con **2** y **3** con **4**.

El compuesto **2** fue previamente reportado como sesseína y en el caso de **1**, **3** y **4** es la primera vez que se reportan sus estructuras, las que se han denominado como isosesseína, isosesseinol y sesseinol, respectivamente.

El extracto **SsM**, su fracción **SsM13-15** y los compuestos **1** y **2** mostraron un potencial antiinflamatorio elevado; la actividad antibacteriana mostrada por **SsM**, **SsD**, **SsM10-12**, **SsM13-15** y los diterpenos **1**, **2**, **3** y **4** fue de amplio espectro, destáncandose la actividad que mostraron contra *S. pyogenes*, que es la bacteria responsable de la enfermedad de la erisipela; en el caso de la capacidad antioxidante, las fracciones metanólicas en las que se identificaron polifenoles y flavonoides y los compuestos **1** y **2** fueron las que tuvieron la mejor capacidad.

Es el primer reporte de la actividad antiinflamatoria, antibacteriana y antioxidante tanto de la especie como de los cuatro compuestos diterpénicos tipo royleanona (**1**, **2**, **3** y **4**), las actividades de los compuestos pueden estar asociadas por la presencia en sus estructuras de anillos de quinona y δ -lactona.

Las actividades biológicas mostradas por los extractos, fracciones, así como de los compuestos aislados confirman el uso de *S. sessei* en la medicina tradicional del Estado de Morelos, México para el tratamiento de infecciones en la piel, principalmente la conocida como erisipela.

PERSPECTIVAS

9. Perspectivas

Aislar y caracterizar los 5 flavonoides presentes en la fracción **SsM13-15**.

Aislar una mayor cantidad del compuesto tipo isoorientina que permita su completa caracterización por RMN 1D y 2D de la estructura de este compuesto aislado.

Determinar el posible mecanismo del efecto antiinflamatorio de las fracciones activas y compuestos aislados.

Determinar si las fracciones activas y compuestos aislados son bacteriostáticos o bactericidas.

Determinar el posible mecanismo de la actividad antibacteriana de las fracciones activas y compuestos aislados.

Estandarizar la fracción **SsM10-12** con base a su contenido metabólico reconocido hasta el presente trabajo para generar una forma farmacéutica para su uso como antiinflamatorio y antibacteriano a nivel tópico.

Desarrollar una forma farmacéutica con los compuestos **1, 2, 3 y 4** para su uso como antiinflamatorio y antibacteriano a nivel tópico.

Gestionar ante las instancias adecuadas la patente en la metodología para obtener los diterpenos tipo royleanona y/o las formulaciones y usos que de ellos se deriven.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

10. Referencias Bibliográficas

Abu-Darwish, M.S., Cabral, C., Ferreira, I.V., Gonçalves, M.J., Cavaleiro, C., Cruz, M.T., Albdour, T.H., Sagueiro, L. (2013). Essential oil of common Sage (*Salvia officinalis* L.) from Jordan: assessment of safety in mammalian cells and its antifungal and anti-inflammatory potential. *BioMed Research International*. 1,1-9.

Adams, R.P. (2007). *Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectrometry*. 4th ed. Carol Stream, IL, USA, 2007: Allured Business Media; pp: 1-804.

Aguilar, C. A., Camacho, J.R., Chino, S., Jáquez, P., López, M.E. (1994). *Herbario medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social*. Información Etnobotánica. Edición del IMSS México. pp. 129-130.

Alipić, A., Knežević, A., Milutinović, M., Stević, T., Šavikin, K., Stajić, M., Marković, S., Marín, D.P., Matevski, V., Duletić-Laušev, S. (2017). Biological activities and chemical composition of *Salvia amplexicaulis* Lam. extracts. *Industrial Crops & Products*. 105, 1-9.

Amir-Aslani, B., Ghobadi, S. (2016). Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the immune system. *Life Sciences*. 146,163-173.

Anilkumar, K., Reddy, G.V., Azad, R., Yarla, N.S., Dharmapuri, G., Srivastava, A., Kamal, M.A., Pallu, R. (2017). Evaluation of anti-inflammatory properties of isoorientin isolated from tubers of *Pueraria tuberosa*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 5498054,1-10.

Apel, K., Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*. 55, 373–399.

Araujo, M.G., Hilario, F., Nogueira, L.G., Vilegas, W., Santos, L.C., Bauab, T.M. (2011). Chemical constituents of the methanolic extract of leaves of *Leiothrix spiralis* Ruhland and their antimicrobial activity. *Molecules*. 16, 10479–10490.

Asenjo C.M., Alonso, P.M.L., Zambrano, C.L.B. (2004). Erisipela. *SEMERGEN*. 30(3):128-131.

Ataie, A., Sabetkasaei, M., Haghparast, A., Moghaddam, A.H., Kazeminejad, B. (2010). Neuroprotective effects of the polyphenolic antioxidant agent, curcumin, against homocysteine-induced cognitive impairment and oxidative stress in the rat. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 96, 378–385.

Ayatollahi, A., Shojaii A., Kobarfard F., Mohammadzadeh M., Choudhary M. (2009). Two flavones from *Salvia leriaefolia*. *Iran Journal of Pharmacy Research*. 8, 179-84.

Bahadori, M.B., Valizadeh, H., Asghari, B., Dinparast, L., Farimani, M.M., Bahadori, S. (2015). Chemical composition and antimicrobial, cytotoxicity, antioxidant and enzyme inhibitory activities of *Salvia spinosa* L. *Journal of Functional Foods*. 18, 727-736.

Balunas, M.J., Kinghorn, A.D. (2005). Drug discovery from medicinal plants. *Life Science*. 78, 431-441.

Baricevic, D., Sosa, S., Loggia, R., Tubaro, A., Simonovska, B., Krasna, A. (2001). Topical anti-inflammatory activity of *Salvia officinalis* L. leaves: The relevance of ursolic acid. *Journal of Ethnopharmacology*. 75, 125-32.

Barros, E.M., Ceotto, H., Bastos, M.C., Dos Santos, K.R., Giambiagi-Demarval, M. (2012). *Staphylococcus haemolyticus* as an important hospital pathogen and carrier of methicillin resistance genes. *Journal of Clinical Microbiology*. 50, 166-168.

Bisio, A., Schito, A.M., Parricchi, A., Mele, G., Romussi, G., Malafrente, N., Oliva, P., De Tommasi N. (2015). Antibacterial activity of constituents from *Salvia buchananii* Hedge (Lamiaceae). *Phytochemistry Letters*. 14, 170-177.

Bläckberg, A., Trell, K., Rasmussen, M. (2015). Erysipelas, a large retrospective study of aetiology and clinical presentation. *BMC Infectious Diseases*. 15, 402.

Blair, J.M.A., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O., Piddock, L.J.V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology*. 13, 43-51.

Bommer, S., Klein, P., Suter, A. (2011). First time proof of sage's tolerability and efficacy in menopausal women with hot flushes. *Advances in Therapy*. 28,490-500.

Bozdogan, B., Appelbaum, P. C. (2004). Oxazolidinones: activity, mode of action, and mechanism of resistance. *International Journal Antimicrobial Agents*. 23(2), 113-119.

Bouchami, O., Ben Hassen, A., de Lencastre, H., Miragaia, M. (2011). Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus hominis* (MRSHo): Low clonality and reservoirs of SCC *mec* structural elements. *PLOS ONE*. 6, e21940.

Bremner, P., Rivera, D., Calzado, M.A., Obon, C., Inocencio, C., Beckwith, C., Fiebich, B.L., Munoz, E., Heinrich, M. (2009). Assessing medicinal plants from South-Eastern Spain for potential anti-inflammatory effects targeting nuclear factor-Kappa B and other pro-inflammatory mediators. *Journal of Ethnopharmacology*. 124, 295-305.

Buckley, C.D., Gilroy, D.W., Serhan, C.N. (2014). Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. *Immunity*. 40, 315-327.

Búfalo, J., Cantrell, C.L., Jacob, R.M., Schrader, K.K., Tekwani, L.B., Kustoya, S.T., Abbas, A., Boaro, C.S.F. (2016). Antimicrobial and antileishmanial activities of diterpenoids isolated from the roots of *Salvia deserta*. *Planta Medica*. 82(1-2), 1-7.

Butler, M.S. (2004). The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of Natural Products*. 67, 12, 2141-2153

Cecarini, V., Gee, J., Fioretti, E., Amici, M., Angeletti, M., Eleuteri, A.M., Keller, J.N. (2007). Protein oxidation and cellular homeostasis: Emphasis on metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1773, 93-104.

Celestin, R., Brown, J., Kihiczack, G., Schwartz, R.A. (2007). Erysipelas: a common potentially dangerous infection. *Acta Dermatovenerol APA*. 16, 123-127.

Checker, R., Sandur, S.K., Sharma, D., Patwardhan, R.S., Jayakumar, S., Kohl, V., Sethi, G., Aggarwal, B.B., Sainis, K.B. (2012). Potent anti-inflammatory activity of ursolic acid, a

triterpenoid antioxidant, is mediated through suppression of NF-kB, AP-1 and NF-AT. *PlosOne*. 7(2): e31318.

Chellapandi, K., Dutta, T.K., Sharma, I., De Mandal, S., Kumar, N.S., Ralte, L. (2017). Prevalence of multi drug resistant enteropathogenic and enteroinvasive *Escherichia coli* isolated from children with and without diarrhea in northeast Indian population. *Annals of Clinical and Microbiological Antimicrobials*.16, 49.

Chen, J.H., Ho, C-T. (1997). Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45, 2374-2378.

Chen, X-L., Liu, F., Xiao, X-R., Yang, X-W., Li, F. (2018). Anti-inflammatory abietanes diterpenoids isolated from *Tripterygium hypoglaucum*. *Phytochemistry*. 156, 167–175.

Choi, H.G., Tran, P.T., Lee, J-H., Min, B.S., Kim, J.A. (2018). Anti-inflammatory activity of caffeic acid derivatives isolated from the roots of *Salvia miltiorrhiza* Bunge. *Archives of Pharmacal Research*. 41:64–70.

Chopra, I., Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 65(2), 232-60.

CONABIO y UAEM. (2004). *La Diversidad Biológica en Morelos: Estudio del Estado*. 1a ed. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad y Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México.

Cotran, Robbins. (2010). *Acute and Chronic Inflammation*, en: Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease. Saunders, pp. 43-75.

Clebsch, Betsy., Barner, C.D. (2003). *The New Book of Salvias*. Timber Press. p. 268. ISBN 978-0-88192-560-9.

Clinical and Laboratory Standards Institute, C.L.S.I. (2013). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. 16th Informational Supplement. CLSIM100-S20. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.

Cushnie, T.P.T., Cushnie, B., Lamb, A. (2014). Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 44, 377–386.

Dickson, M., Gagnon, J.P. (2004). Key factors in the rising cost of new drug discovery and development. *Nature Reviews Drug Discovery*. 3 (5), 417–429.

Dinarello, C. A. (2010). Anti-inflammatory agents: present and future. *Cell*. 140, 935-950.

Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*. 82 (1), 47-95.

Dziurzynsky, T., Ludwiczuk, A., Glowniak, K. (2013). Biological activities of *Salvia* L. species. *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*. 26(3), 326 – 330.

Eidi, M., Eidi, A., Zamanizadeh, H. (2005). Effect of *Salvia officinalis* L. leaves on serum glucose and insulin in healthy and streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 100, 310-313.

Engels, C., Schieber, A., Gänzle, M.G. (2011). Inhibitory spectra and modes of antimicrobial action of gallotannins from Mango Kernels (*Mangifera indica* L.). *Applied and Environmental Microbiology*. 77, 2215–2223.

Esquivel Gutiérrez, E.R., Noriega Cisneros, R., Bello González, M.A., Saavedra Molina, A., Salgado Garciglia, R. (2012). Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas. *Biológicas*. 14, 45-452.

Espejo, S.A., Ramamoorthy T.P. (1993). Revisión Taxonómica de *Salvia* sección Sigmoideae (Lamiaceae). *Acta Botánica Mexicana*. 23,65-102.

Etebu, E., Arikelpar, I. (2016). Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *International Journal of Applied Microbiology Biotechnology Research*. 4, 90-101.

Feng, Z-L., Li, D., Liu, Q-Y., Liu, J.X., Huang, Li., Zhang, H-Q., Wang, Y-T., Lin, L.G. (2017). Anti-inflammatory abietane diterpenoids from the seeds of *Podocarpus nagi*. *Phytochemistry Letters*. 21, 260-263.

FHEUM. (2013). *Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos*. 2a ed Secretaria de Salud.México.

Firuzi, O., Lacanna, A., Petrucci, R., Marrosu, G., Saso L. (2005). Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by “ferric reducing antioxidant power” assay and cyclic voltammetry. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1721, 174-184.

Fuoco, D. (2012). Classification framework and chemical biology of tetracycline-structure-based drugs. *Antibiotics*. 1,1-13.

Fragoso-Martínez, I., Martínez-Gordillo, M. (2013). Una nueva especie del género *Salvia* sección *Membranaceae* de Guerrero, México. *Acta Botanica Mexicana*. 103, 1-9.

Fritsche, K. (2015). The science of fatty acids and inflammation. *Advances in Nutrition*. 6, 293S–301S.

Frodin, D.G. (2004). History and concepts of big plant genera. *Taxon*. 53, 753-776.

Gábor, M. (2000). *Mouse Ear Inflammation models and their pharmacological applications*. 1a ed. Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary.

Garcia, A., Bocanegra-Garcia, V., Palma-Nicolas, J.P., Rivera, G. (2012). Recent advances in antitubercular natural products. *European Journal Medicinal Chemistry*. 49, 1–23.

Gautam, R., Jachak, S.M. (2009). Recent developments in anti-inflammatory natural products. *Medicinal Research Reviews*. 29 (5), 767—820.

Gil-Chávez, J.G., Villa, J.A., Ayala-Zavala, J.F., Heredia, B.J.; Sepulveda, D., Yahia, E.M., González-Aguilar, G.A. (2013). Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: An overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 12(1), 5-23.

Gill, V.J., Selepak, S.T., Williams, E.C. (1983). Species identification and antibiotic susceptibilities of coagulase-negative *Staphylococci* isolated from clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 18, 1314-1319.

Gómez-Castellanos, J.R. (2009). El ambiente regulatorio de los medicamentos herbolarios en México. Antecedentes, situación actual y perspectivas al año 2025. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 8 (1), 33 – 40.

González-Burgos, E., Gómez-Serranillos, M.P. (2012). Terpene compounds in nature: A review of their potential antioxidant activity. *Current Medicinal Chemistry*. 19, 5319-5341.

González-Cortazar, M., Maldonado-Abarca, A.M., Jiménez-Ferrer, E., Marquina, S., Ventura-Zapata, E., Zamilpa, A., Tortoriello, J., Herrera-Ruiz, M. (2013.) Isosakuranetin-5-O-rutinoside: A new flavanone with antidepressant activity isolated from *Salvia elegans* Vahl. *Molecules*. 18,13260-13270.

Guarlezi, C.O., Brandi, L., Fabbretti, A., Pon, C.L. (2013). *Antibiotics: Targets, mechanisms and resistance*. 12 ed. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Boschstr. Weinheim, Alemania.

Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 13, 572–584.

Herrera-Ruiz, M., García-Beltrán, Y., Mora, S., Díaz-Véliz, G., Viana, G.S., Tortoriello, J., Ramírez, G. (2006). Antidepressant and anxiolytic effects of hydroalcoholic extract from *Salvia elegans*. *Journal of Ethnopharmacology*. 107, 53-58.

Hofstetter, R., Fassauer, G.M., Link, A. (2018). Supercritical fluid extraction (SFE) of ketamine metabolites from dried urine and on-line quantification by supercritical fluid chromatography and single mass detection (on-line SFE–SFC–MS). *Journal of Chromatography B*. 1076, 77–83.

Horwitz, S.B. (2004). Personal recollections on the early development of taxol. *Journal of Natural Products*. 67(2), 136–138.

Ibrahim, T.A. (2012). Chemical composition and biological activity of extracts from *Salvia bicolor* Desf. growing in Egypt. *Molecules*. 17, 11315-11334.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2015). *Estadística de defunciones generales: descripción de la base de datos nacional*.

Jay, B., Walker, K.J., Sytsma, J. T., Michael W. (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.

Jeong, H.J., Choi, Y., Kim, M.H. (2011). Rosmarinic acid, active component of Dansam-Eum attenuates ototoxicity of cochlear hair cells through blockage of caspase-1 activity. *PLoS One*. 6, e18815.

Jeong G-S., Bae, J-S. (2014). Anti-Inflammatory effects of triterpenoids; Naturally occurring and synthetic agents. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*. 11, 316-329.

Jiménez, E. M., Portugal, M.E., Lira-Rocha, A., Soriano-García, M., Toscano A.R. (1988). A new royleanone-type diterpene from *Salvia sessei*. *Journal of Natural Products*. 51, 243-248.

Jork, H., Funk, W., Fisher, W., Wimmer, H. (1990). *TLC Reagents & Detection Methods Physical & Chemical Detection Methods: Fundamentals*. Vol 1a, Wiley, NY, USA.

Kabouche, A., Kabouche. Z., Oztürk, M., Kolak, U., Topçu, G. (2007). Antioxidant diterpenoids from the roots of *Salvia barrelieri*. *Food Chemistry*. 102, 1281-1287.

Kehrer, J.P., Klotz, L.O. (2015). Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for health. *Critical Reviews in Toxicology*. 45(9), 765-798.

Keshavarz, M., Bidmeshkipour, A., Mostafavi, A., Mansouri, K., Mohamadi-Motlagh, H. (2011). Anti-tumor activity of *Salvia officinalis* is due to its anti-angiogenic, anti-migratory and anti-proliferative effects. *Cell Journal*. 12,477-482.

Khajuria, V., Gupta, S., Sharma, N., Kumar, A., Lone, N.A., Khullar, M., Dutt, P., Sharma, P.R., Bhagat, A., Ahmed, Z. (2017). Anti-inflammatory potential of hentriacontane in LPS stimulated RAW 264.7 cells and mice model. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 92, 175–186.

Kianbakht, S., Nabati, F., Abasi, B. (2016). *Salvia officinalis* (Sage) leaf extract as add-on to statin therapy in hypercholesterolemic type 2 diabetic patients: a randomized clinical trial. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*. 5(3), 142-148.

Kim, S.H., Jun, C.D., Suk, K., Choi, B.J., Lim, H., Park, S., Lee, S.H., Shin, H.Y., Kim, D.K., Shink, T.Y. (2006). Gallic acid inhibits histamine release and pro-inflammatory cytokine production in mast cells. *Toxicological Sciences*. 91(1), 123–131.

Kolak, U., Kabouche, A., Oztürk, M., Kabouche, Z., Topçu, G., Ulubelen, A. (2009). Antioxidant diterpenoids from the roots of *Salvia barrelieri*. *Phytochemical Analysis*. 20, 320-327.

Kuete, V. (2010). Potential of Cameroonian plants and derived products against microbial infections: a review. *Planta Medica*. 76,1479–1549.

Kurek A., Grudniak, A.M., Szwed, M., Klicka, A., Samluk, L., Wolska, K.I. (2010). Oleanolic acid and ursolic acid affect peptidoglycan metabolism in *Listeria monocytogenes*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 97: 1143-1146.

Kurek, A., Grudniak, A.M. Kraczkiewicz-Dowjat, A., Wolska, K. (20119). New Antibacterial Therapeutics and Strategies. *Polish Journal of Microbiology*. 60(1), 3 -12.

Kumar, S., Pandey, A.K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*. 2013, 162750.

Kuźma, Ł., Rózsalski, M., Walencka, E., Rózsalska, B., Wysokińska, H. (2007). Antimicrobial activity of diterpenoids from hairy roots of *Salvia sclarea* L.: salvipisone as a potential anti-biofilm agent active against antibiotic resistant *Staphylococci*. *Phytomedicine*. 14, 31-35.

Li, M., Li, Q., Zhang, C., Zhang, N., Cui, Z., Huang, L., Xiao, P. (2013). An ethnopharmacological investigation of medicinal *Salvia* plants (Lamiaceae) in China. *Acta Pharmaceutica Sinica B*. 3(4), 273–280.

Lounkine, E., Keiser, M.J., Whitebread, S., Mikhailov, D., Hamon, J., Jenkins, J., Lavan, P., Weber, E., Doak, A.K., Côté, S., Shoichet, B.K., Urban, L. (2012). Large scale prediction and testing of drug activity on side effect targets. *Nature*. 486(7403), 361–367.

Lu, Y., Yeap, F.L. (2001). Salvianolic acid L, a potent phenolic antioxidant from *Salvia officinalis*. *Tetrahedron Letters*. 42, 8223-5.

MacDonald-Wicks, L.K., Wood, L.G., Garg, M.L. (2006). Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: a review. *Journal of Science and Food Agriculture*. 86, 2046-2056.

Majaz, Q., Khurshid, I.M. (2016). Herbal medicine: a comprehensive review. *International Journal of Pharmaceutical Research*. 8(1), 1-5.

Marchiani, A., Rozzo, C., Fadda, A., Delogu, G., Ruzza, P. (2014). Curcumin and curcumin-like molecules: From spice to drugs. *Current Medicinal Chemistry*. 21, 204–222.

Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 454, 428-435.

Michávila, A., Fernández-Gadea, F., Rodríguez, B. (1986). Abietane diterpenoids from the root of *Salvia lavandulaefolia*. *Phytochemistry*. 25, 66.

Monroy-Ortíz, C., Castillo-España, P. (2007). *Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos, México*. 2a ed. CONABIO y UAEM. México.

Moraes, M.N., Zobot, G.L., Prado, J.M., Angela Mireles, M.A.A. (2013). Obtaining antioxidants from botanic matrices applying novel extraction techniques. *Food and Public Health*. 3(4), 195-214.

Murat, T., Sezai, E., Memnune, S., Hakan, O., Taskin, P., Erdogan, O. (2009). Antioxidant properties and total phenolic content of eight *Salvia* species from Turkey. *Biological Research*. 42, 175-181.

Mustafa, G., Arif, R., Atta, A., Sharif, S., Jamil, A. (2017). Bioactive compounds from medicinal plants and their importance in drug discovery in Pakistan. *Matrix Science Pharma*. 1(1), 17-26.

Nathan, C. (2002). Points of control in inflammation. *Nature*. 420, 846-852.

Nitto, D.A., Idiazabal, G.M., Rodríguez, V.M., Rossi, G. (2007). Erisipelas de miembros inferiores. *Flebología y Linfología*. 2(5), 221-284.

NOM-062-ZOO-1999. *Guidelines (Technical Specifications for the Production, Care, and Use of Laboratory Animals)*.

Ocegueda, S., Moreno, E., Koleff, P. (2005). Plantas utilizadas en la medicina tradicional y su identificación científica. CONABIO. *Biodiversitas*. 62,12-15.

Okouneva, T., Hill, B.T., Wilson, L., Jordan, M.A. (2003). The effects of vinflunine, vinorelbine, and vinblastine on centromere dynamics. *Molecular Cancer Therapeutics*. 2(5), 427-436.

O'Neill, J. (2014). *Antimicrobial resistance: review on antimicrobial resistance*. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. HM Government. 1-20.

Organización Mundial de la Salud. (2013). *Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023*. OMS, Ginebra, Suiza.

Organización Mundial de la Salud. (2017). <https://www.who.int/es/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.

(Consultado: 15.02. 2019).

Organización Mundial de la Salud. (2018). *Estrategia Mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos*. OMS, Ginebra, Suiza.

Özdemir, V. (2015). Omics 2.0: An accelerator for global science, systems medicine and responsible innovation. *Omics*. 19, 579–580.

Patel, M., Muruganathan, G., Gowda, K.P. S. (2012). *In vivo* animal models in preclinical evaluation of anti-inflammatory activity- a review. *International Journal of Pharmacological Research and Allied Sciences*. 1, 1-5.

Payá, M., Ferrándiz, M.L., Sanz, M.J., Bustos, G., Blasco, R., Ríos, J.L., Alcaráz, M.J. (1993). Study of the antioedema activity of some seaweed and sponge extracts from the Mediterranean coast in mice. *Phytotherapy Research*. 7, 159-162.

Pham-Huy, L.A., He, H., Pham-Huy, C. (2008). Free radicals, antioxidants in disease and health. *International Journal of Biomedical Science*. 4(2), 89-96.

Pluemsamran, T., Onkoksoong, T., Panich, U. (2012). Caffeic acid and ferulic acid inhibit UVA-induced matrix metalloproteinase-1 through regulation of antioxidant defense system in keratinocyte HaCaT cells. *Photochemistry and Photobiology*. 88, 961–968.

Procházková, D., Boušová, I., Wilhelmová, N. (2011). Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*. 82, 513–523.

Rao, T.S., Curie, J.L., Shaffer, A.F., Isakon, P.C. (1993). Comparative evaluation of arachidonic acid (AA) and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. *Inflammation*. 17, 723-741.

Rathee, P., Chaudhary, H., Rathee, S., Rathee, D., Kumar, V., Kohli, K. (2009). Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: A Review. *Inflammation & Allergy - Drug Targets*. 8, 229-235.

Reiersen, B., Kiremire, B.T., Byamukama, R., Andersen, Ø.M. (2003). Anthocyanins acylated with gallic acid from chenille plant, *Acalypha hispida*. *Phytochemistry*. 64, 867–871.

Ríos, J.L., Recio, M.C., Villar, A. (1988). Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *Journal of Ethnopharmacology*. 23, 127-149.

Robbins, Cotran. (2010). *Acute and Chronic Inflammation*. Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease. Saunders, pp. 43-75.

Rodríguez-Noriega, E., León-Garnica, G., Petersen-Morfín, S., Pérez-Gómez, H., González-Díaz, E., Morfín-Otero, R. (2014). La evolución de la resistencia bacteriana en México, 1973-2013. *Biomédica*. 34(1), 181-190.

Rosua, J.L., Blanca, G. (1986). Revisión del género *Salvia* L. (Lamiaceae) en el mediterráneo occidental: La sección de *Salvia*. *Acta Botánica Malacitana*. 11, 227–272.

Rungsimakan, S., Rowan, M.G. (2014). Terpenoids, flavonoids and caffeic acid derivatives from *Salvia viridis* L. cvar. Blue Jeans. *Phytochemistry*. 108, 177-188.

Sader, H.S., Farrell, D.J., Jones, R.A. (2010). Antimicrobial susceptibility of Gram-positive cocci isolated from skin and skin-structure infections in European medical centers. *International Journal Antimicrobial Agents*. 6, 28–32.

Saeidi, S., Mirnejad, R., Masoumi Zavaryani, S., Rostamzadeh, S. (2017). Molecular epidemiology and antibiotic resistance patterns of *Enterococcus faecalis* isolates from hospitals in Tehran. *Le Infezioni in Medicina*. 25, 116-122.

Schäcke, H., Döcke, W-D., Asadullah, K. (2002). Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacology & Therapeutics*. 96(1), 23 -43.

Scrivo, R., Vasile, M., Bartosiewicz, I., Valesini, G. (2011). Inflammation as “common soil” of the multifactorial diseases. *Autoimmunity Reviews*. 10 (7), 369–374.

Sharma, A., Flores-Vallejo, R.C. Cardoso-Taketa, A., Villarreal, M.L. (2017). Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. 208, 264–329.

Shehadeh, M.B., Sosa, S., Suaifan, G.A., Darwish, M.R., Giangaspero, A., Vassallo, A., Lepore, L., Oran, S.A., Hammad, H., Tubaro, A., De Tommasi, N., Loggia, D.R. (2014). Topical anti-Inflammatory potential of six *Salvia* species grown in Jordan. *Jordan Journal of Pharmaceutical Sciences*. 7(2), 153 -161.

Shukla, S., Hegde, S., Kumar, A., Chaydhary, G., Tewari, S.K., Upreti, D.K., Pal, M. (2017). Chemical composition and antibacterial activity of essential oil from leaves of *Justicia adhatoda* against methicillian resistant and sensitive strain along with their clinical isolates, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 9,46.

Sköld, O., 2011. *Antibiotics and antibiotic resistance*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA.

Smith, C.E., Soti, S., Jones, T.A., Nakagawa, A., Xue, D., Yin, H. (2017). NSAIDs are Caspase Inhibitors. *Cell Chemical Biology*. 24 (3), 281–292.

Smith E., Williamson, E., Zloh, M., Gibbons, S. (2005). Isopimaric acid from *Pinus nigra* shows activity against multidrug-resistant and EMRSA strains of *Staphylococcus aureus*. *Phytotherapy Research*. 19, 538-542.

Soroush, S., Jabalameli, F., Taherikalani, M., Eslampour, M.A., Beigverdi, R., Emaneini, M. (2017). Characterization of biofilm formation, antimicrobial resistance, and staphylococcal cassette chromosome *mec* analysis of methicillin resistant *Staphylococcus hominis* from

blood cultures of children. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 50, 329-333.

Tan, N., Satana, D., Sen, B., Tan, E., Altan, H.B., Demirci, B., Uzun, M. (2016). Antimycobacterial and antifungal activities of four selected *Salvia* species. *Records of Natural Products*. 10, 593-603.

Teavigo® Product Data Sheet, 2014. Available at: <http://www.teavigoinfo.com/pdf/Teavigo%20Data%20Sheet.2014.pdf> (consultado: 07.25.2017).

Teeraputon, S., Santanirand, P., Wogchai, T., Songiang, W., Lapsomthob, N., Jaikasun, D., Toonkaew, S., Tophon, P. (2017). Prevalence of Methicillin resistance and Macrolide-Lincosamide-Streptogramin B resistance in *Staphylococcus haemolyticus* among clinical strains at a tertiary-care hospital in Thailand. *New Microbes and New Infections*. 19, 28-33.

Tenore, G.C., Ciampaglia, R., Arnold, N.A., Piozzi, F., Napolitano, F., Rigano, D., Senatore, F. (2011). Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil of *Salvia lanigera* from Cyprus. *Food Chemistry and Toxicology*. 49, 238-243.

Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H.A., Sokmen, A. (2006). Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chemistry*. 95, 200-204.

Thomford, N.E., Senthebane, D.A., Rowe, A., Munro, D., Seele, P., Maroyi, A., Dzobo, K. (2018). Natural products for drug discovery in the 21st century: innovations for novel drug discovery. *International Journal of Molecular Sciences*. 19(6), E1578.

Topçu, G. (2006). Bioactive triterpenoids from *Salvia* species. *Journal of Natural Products*. 69, 482-487.

Tosun, M., Ercisli, S., Sengul, M., Ozer, H. Polat, T., Ozturk, E. (2009). Antioxidant properties and total phenolic content of eight *Salvia* species from Turkey. *Biological Research*. 42, 175-181.

Ulubelen, A. (2003). Cardioactive and antibacterial terpenoids from some *Salvia* species. *Phytochemistry*. 64, 395-399.

Valerio, M., Awad, A. B. (2011). β -Sitosterol down-regulates some pro-inflammatory signal transduction pathways by increasing the activity of tyrosine phosphatase SHP-1 in J774A.1 murine macrophages. *International Immunopharmacology*. 11, 1012 – 1017.

Walker, J.B., Sytsma, K.J., Treutlein, J., Michael, W. (2004). *Salvia* (Lamiaceae) is not monophyletic: implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of *Salvia* and Tribe Mentheae. *American Journal of Botany*. 91, 1115-1125.

Walsh, C. (2003). *Antibiotics: actions, origins, resistance*. 1a. Ed. ASM Press, Washington DC, USA.

Wang, M., Li, J., Rangarajan, M., Shao, Y., Lavoie, E., Huang, T., Ho, C. (1998). Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 46, 4869-4873.

Ward, P. (2010). Acute and Chronic Inflammation. In S. Ayoub (Author) & C. Serhan, P. Ward, & D. Gilroy (Eds.). *Fundamentals of Inflammation*. Cambridge: Cambridge University Press, USA.

Williams, S., Oatley, D., Abdrahman, A., Butt, T., Nash, R. (2012). Membrane technology for the improved separation of bioactive compounds. *Procedia Engineering*. 44, 2112–2114.

Willcox, J.K., Ash, S., Catignani, G.L. (2004). Antioxidants and prevention of chronic disease. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 44(4), 275-295.

Wu S.J., Chan, Y.Y. (2014). Five new Iridoids from roots of *Salvia digitaloides*. *Molecules*. 19,15521-15534.

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, 5967-6026.

Xie, Y., Yang, W., Tang, F., Chen, X., Ren, L. (2015). Antibacterial activities of flavonoids: structure-activity relationship and mechanism. *Current Medicinal Chemistry*. 22, 132-149.

Xu, D-P., Li, Y., Meng, X., Zhou, T., Zhou, Y., Zheng, J., Zhang, J-J., Li, H-B. (2017). Natural antioxidants in foods and medicinal plants: extraction, assessment and resources. *International Journal of Molecular Sciences*. 18(1), E96.

Xu, J., Wei, K., Zhang, G., Lei, L., Yang, D., Wang, W., Han, Q., Xia, Y., Bi, Y., Yang, M., Li, M. (2018). Ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacology of Chinese *Salvia* species: A review. *Journal of Ethnopharmacology*. 17, 31425-3.

Yadav, L.D.S. (2005). *Organic Spectroscopy*. Cap 2. Anamaya Publishers, New Delhi, India.

Yahfoufi, N., Alsadi, N., Jambi, M., Matar, C. (2018). The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols. *Nutrients*. 10, 1618.

Yang, Z., Yoshikazu, K., Kazuhiro, C., Naohiro, S., Hiroshi, K., Yohei, D., Yoshichika, A., Masahiro, T. (2001). Synthesis of variously oxidized abietane diterpenes and their antibacterial activities against MRSA and VRE. *Bioorganic Medicine and Chemistry*. 9 (2), 347-356.

Yi, Z.B., Yu, Y., Liang, Y.Z., Zeng, B. (2007). Evaluation of the antimicrobial mode of berberine by LC/ESI-MS combined with principal component analysis. *Journal Pharmaceutical Biomedical Analysis*. 44, 301–304.

Yuan, H., Ma, Q., Ye, L., Piao, G. (2016). The traditional medicine and modern medicine from natural products. *Molecules*. 21 (5), 559.

Young, J.M., Wagner, B.M., Spires, D.A. (1983). Tachyphylaxis in 12-O-tetradecanoylphorbol acetate- and arachidonic acid-induced ear edema. *Journal of Investigative Dermatology*. 80, 48-52

Zimmermann, M. (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 16, 109-110.

ANEXOS

11. Anexos

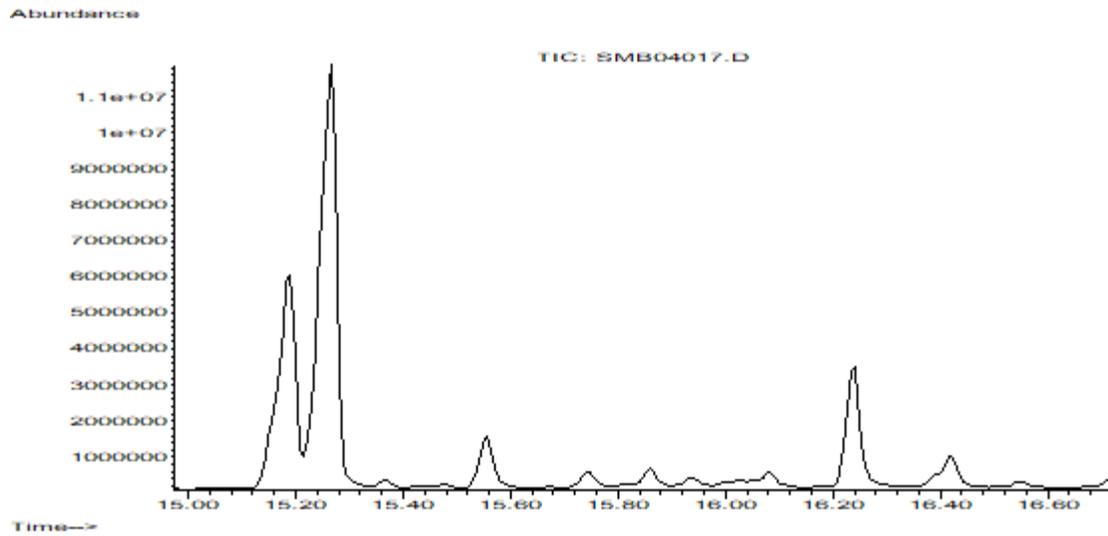


Figura A 1 Espectrograma CG-EM del extracto **SsH** de *S. sessei*

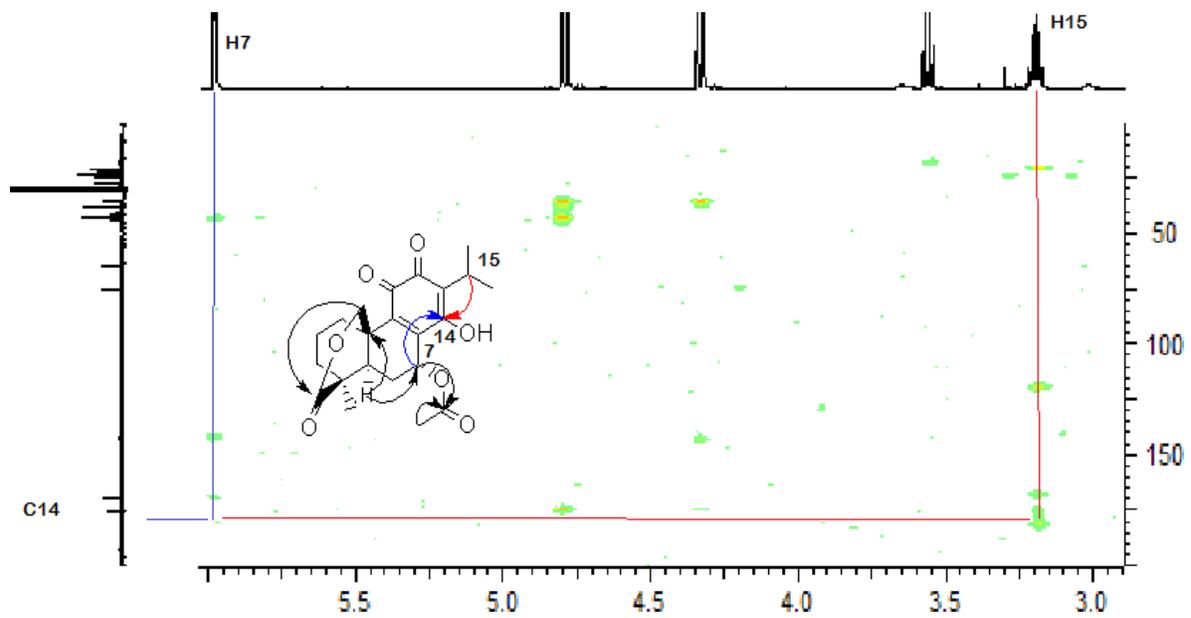


Figura A 2 Espectro del experimento HMBC del compuesto **1**

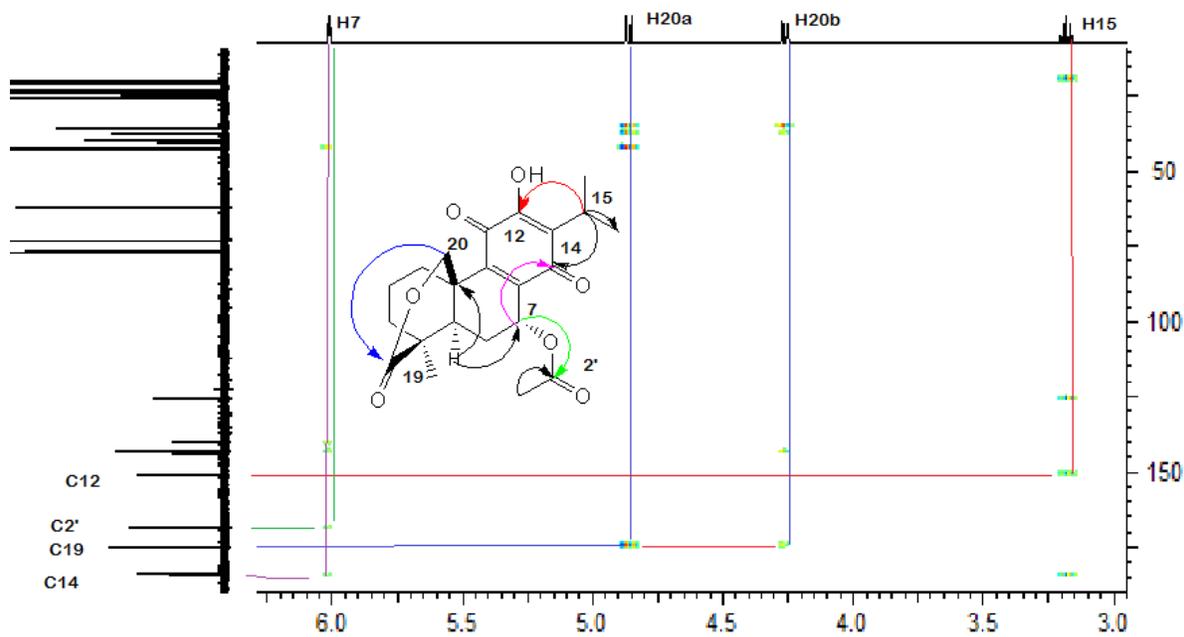


Figura A 3 Espectro del experimento HMBC del compuesto 2

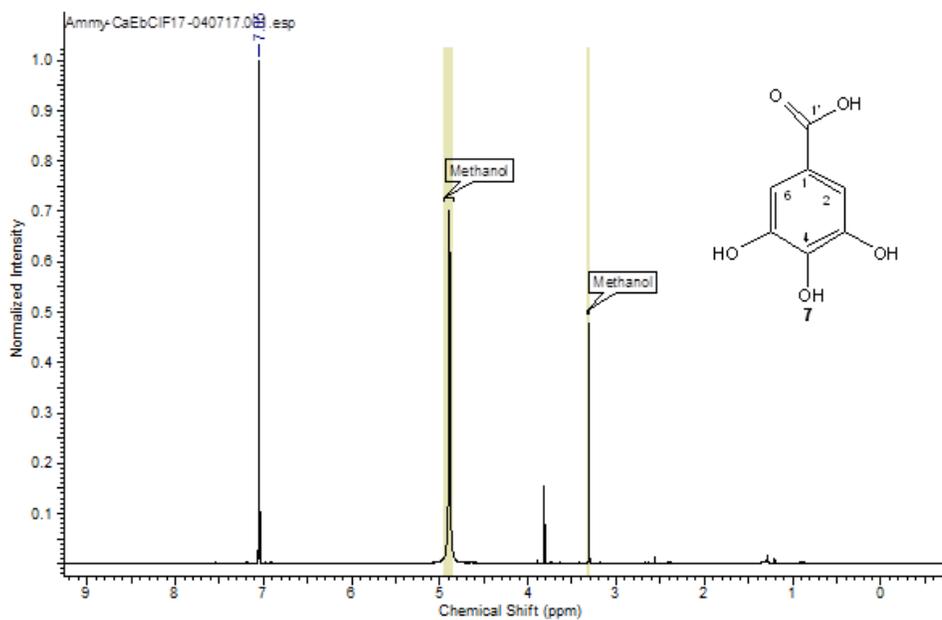


Figura A 4 Espectro RMN ^1H (CD_3OD , 600 MHz) del compuesto 7

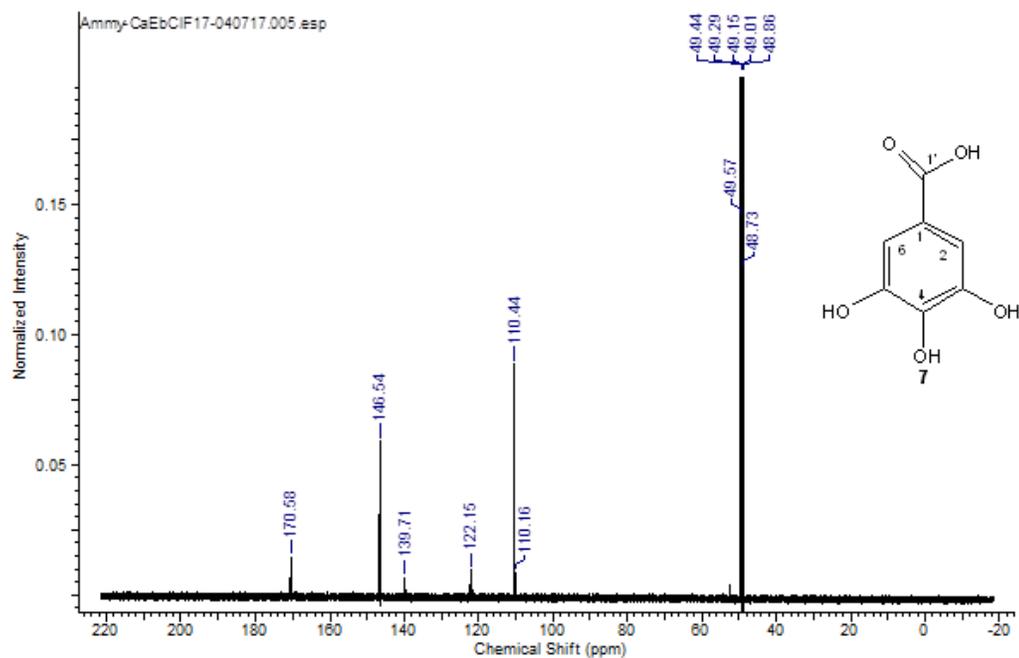


Figura A 5 . Espectro RMN ^{13}C (CD_3OD , 150 MHz) del compuesto 8

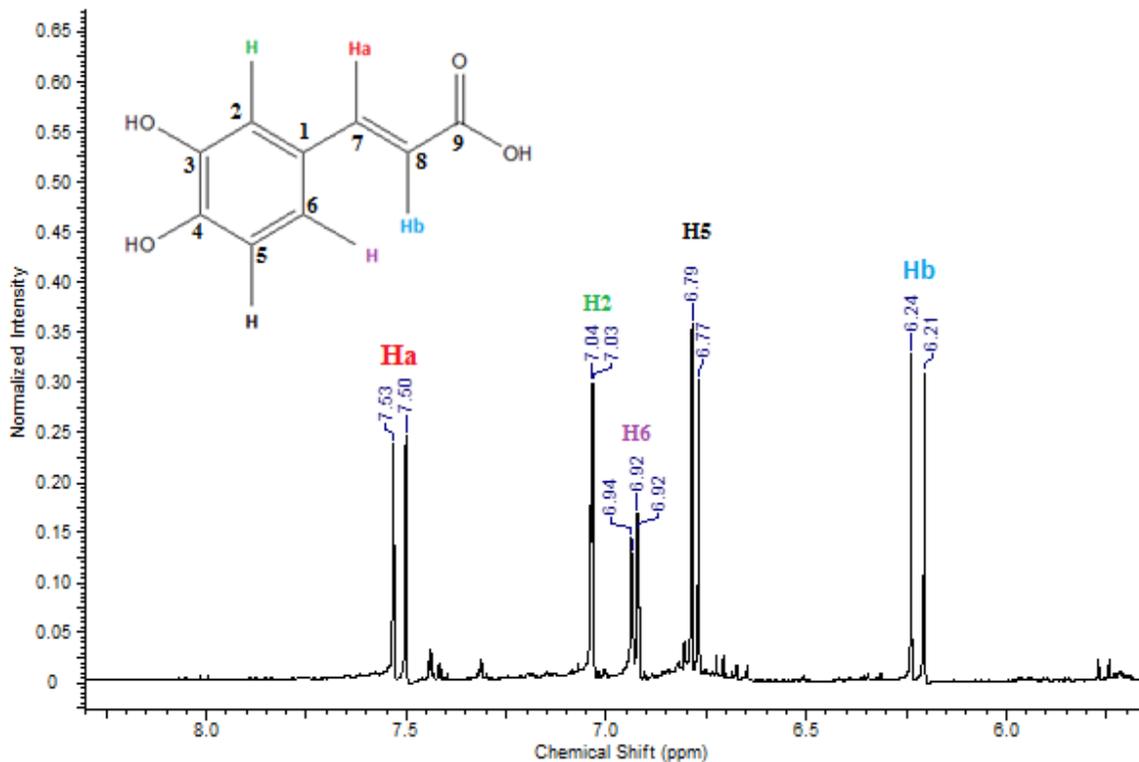


Figura A 6 Espectro RMN ^1H (CD_3OD , 400 MHz) del compuesto 8

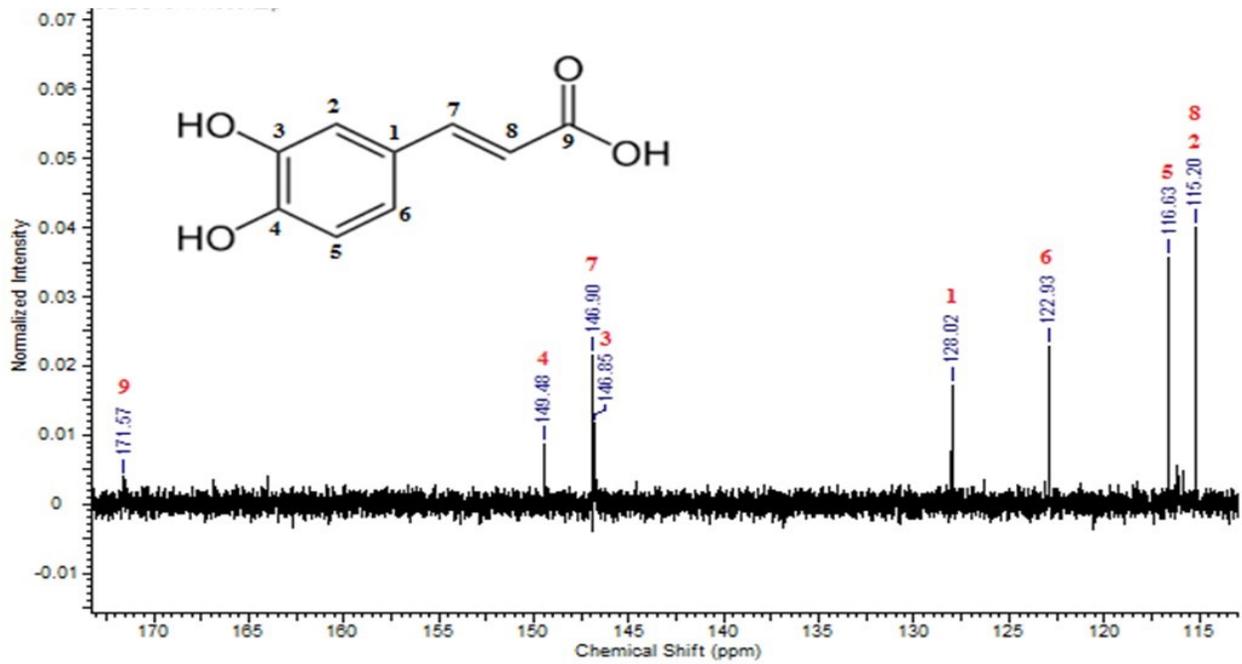


Figura A 7 . Espectro RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD) del compuesto 8

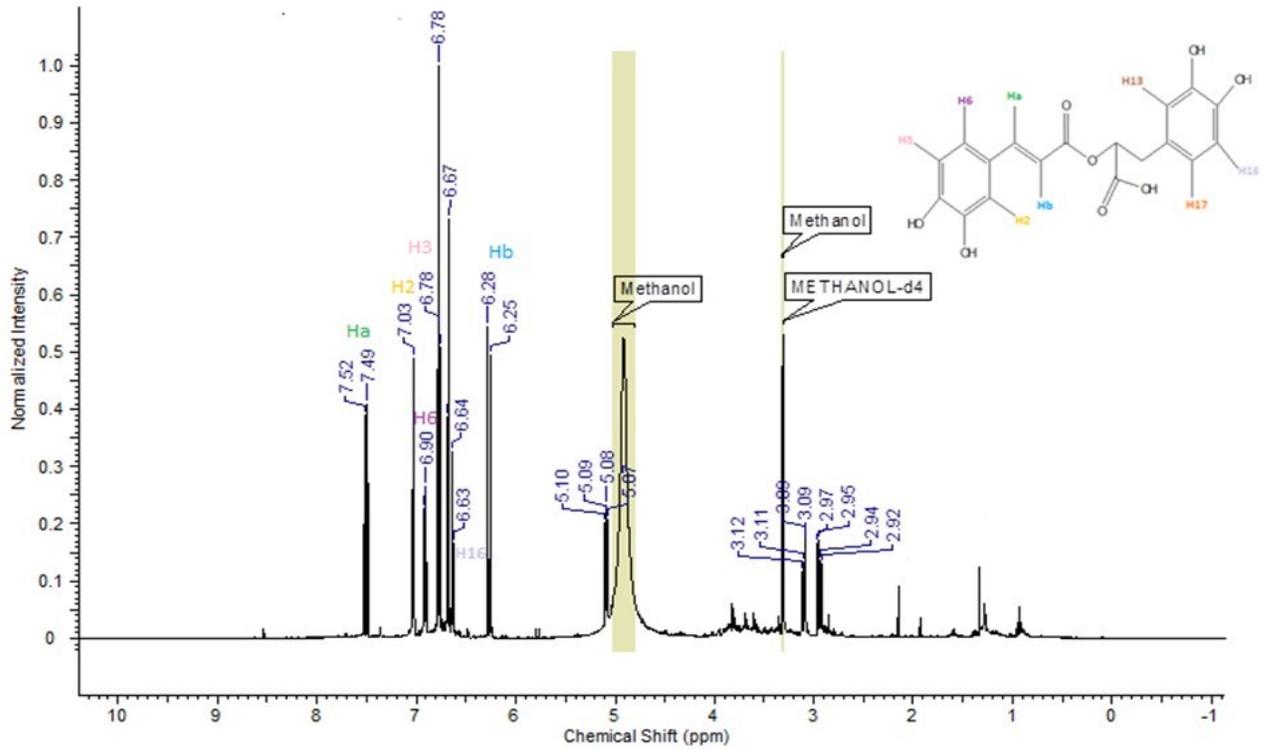


Figura A 8 Espectro RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) del compuesto **9**

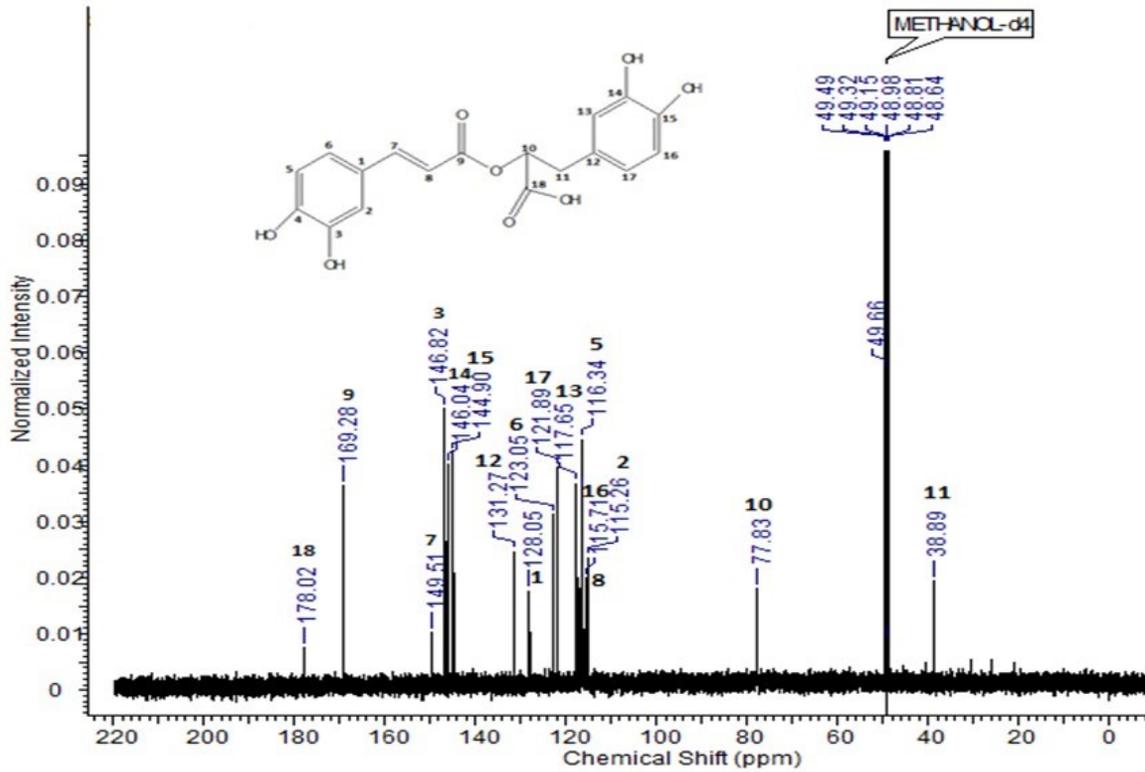


Figura A 9 Espectro RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD) del compuesto **9**

PUBLICACIONES

12. Publicaciones

Los resultados generados a partir de este proyecto se presentaron en los siguientes foros:

Abraham Gómez Rivera, Verónica Rodríguez López, María Crystal Columba Palomares, Alejandro Zamilpa Álvarez, Manasés González Cortázar. Actividad Antiinflamatoria de Tres extractos de *Salvia sessei* Benth. Cartel. 12ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales. 18 – 20 mayo 2016. Xalapa, Veracruz. IV Simposio Multidisciplinario de Plantas Medicinales. 2 – 3 junio 2016. Cuernavaca, Morelos. 12º Encuentro de Estudiantes de Licenciatura y Posgrado en Farmacia. 29 septiembre 2016. Cuernavaca, Morelos.

Abraham Gómez Rivera, Lucía Corona Sánchez, Alejandro Zamilpa Álvarez, Manasés González Cortázar, Verónica Rodríguez López. Evaluación de la capacidad oxidante de dos especies de *Salvia* del estado de Morelos, México. Cartel. 13ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales. 17 – 20 mayo 2017. Morelia, Michoacán.

Abraham Gómez Rivera. Validación del Uso Tradicional de la Especie Vegetal *Salvia sessei* Benth. Ponencia. 5º Simposio Multidisciplinario de Plantas Medicinales.

Abraham Gómez Rivera, Manasés González Cortazar, Maribel Herrera Ruíz, Alejandro Zamilpa Álvarez, Verónica Rodríguez López. Diterpenos aislados de *Salvia sessei* con actividad antiinflamatoria. Cartel. XXVIII Foro Nacional de Investigación en Salud. 4 – 7 septiembre 2018. Zacatecas, Zacatecas.

Abraham Gómez Rivera, Manasés González Cortazar, Maribel Herrera Ruíz, Alejandro Zamilpa Álvarez, Verónica Rodríguez López Sesseína e Isosesseína con actividad antiinflamatoria, antibacterial y antioxidante aisladas de *Salvia sessei* Benth. Cartel. LI Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas. 30 septiembre – 03 octubre 2018. Puerto Vallarta, Jalisco.

La presente tesis generó la siguiente publicación:

Journal of Ethnopharmacology 217 (2018) 212–219



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jethpharm



Sessein and isosessein with anti-inflammatory, antibacterial and antioxidant activity isolated from *Salvia sessei* Benth



Abraham Gómez-Rivera^{a,1}, Manasés González-Cortazar^b, Maribel Herrera-Ruíz^b,
Alejandro Zamilpa^b, Verónica Rodríguez-López^{a,*}

^aLaboratorio de Química Productos Naturales y Farmacognosia, Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad No. 1001, Col. Chamilpa, C.P. 62209 Cuernavaca, Morelos, Mexico

^bCentro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS), IMSS Argentina 1, Col. Centro, C.P. 62790 Xochitlapec, Morelos, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Salvia sessei Benth
Sessein
Isosessein
Diterpenoids
Anti-inflammatory
Antibacterial
Antioxidant

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: *Salvia sessei* Benth, popularly known as “pipiloxochitl” or “sabanito”, is a plant utilized in Mexico in traditional medicine for the treatment of erysipela. To date, only one report, to our knowledge, has been found in which a royleanone-type diterpene of the aerial parts of the species was isolated but, again to our knowledge, studies have not been conducted on the pharmacological activity of extracts and compounds isolated from this plant.

Aim of the study: The objective of the study was to evaluate the anti-inflammatory, antibacterial and antioxidant activity of the organic extracts of the aerial parts of *Salvia sessei* Benth and sessein and isosessein isomers isolated from this.

Materials and methods: Anti-inflammatory activity was evaluated in a model of edema in mouse ear at 1 mg/ear of the isolated extracts and compounds (1 and 2), a dose-response curve was performed on these latter and one-half of the effective dose (ED₅₀) was determined; antibacterial activity was determined through minimal inhibitory concentration (MIC) by microdilution at 100, 50, 25, and 12.5 µg/mL, and antioxidant capacity, by means of DPPH, ABTS, and FRAP assays where, for the first two assays noted, the inhibitory concentration 50% (IC₅₀) was calculated for the extracts as well as for the compounds isolated.

Results: The hexanic extracts (40.55 ± 0.5%), dichloromethanic (56.01 ± 1.1%) and methanolic (66.05 ± 0.3%), as well as isolated compounds 1 (79.85 ± 3.5%) and 2 (54.36 ± 1.7%), demonstrated anti-inflammatory activity; the methanolic extract presented the greatest percentage of inhibition, while isolated compounds 1 and 2 did not present a difference in their ED₅₀; additionally, compound 1 exerted a similar effect to that of the drug-of-reference at the same dose (75.24 ± 2.4%). The antibacterial activity of the extracts and compounds was principally against Gram-positive bacteria: the hexanic extract presented activity against *Staphylococcus hominis* and the methanolic and dichloromethanic extracts, and compound 1 exhibited activity against *Staphylococcus haemolyticus*, *S. hominis*, *E. faecalis*, in addition to that *Escherichia coli* was sensitive to compound 1, while isomer 2 showed activity against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus epidermis* and *Streptococcus pyogenes* bacteria related to erysipela. In the three assays, the extract demonstrating greatest antioxidant capacity was the methanolic extract, while that of the isolated compounds was compound 1.

Conclusions: The results show that the three extracts evaluated in the three models presented activity and the chromatographic separation of the dichloromethanic extract permitted the isolation of compounds 1 and 2 royleanone-type isomers, which also presented significant activities such as anti-inflammatory, antibacterial and antioxidant, thus validate the use of this species in traditional medicine.

1. Introduction

The genus *Salvia*, comprising more than 900 species, belongs to the

Lamiaceae family, which is composed of 220 genera and approximately 4000 species (Frodin, 2004; Wu et al., 2012). This genus is found in three regions of the world: Central and South America (500 species);

* Corresponding author.

E-mail address: veronica_rodriguez@uaem.mx (V. Rodríguez-López).

¹ Taken in part from the D thesis of Abraham Gómez-Rivera.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.02.012>

Received 1 November 2017; Received in revised form 29 January 2018; Accepted 6 February 2018

Available online 16 February 2018

0378-8741/ © 2018 Published by Elsevier B.V.

Central Asia and the Mediterranean Region (250 species) and East Asia (90 species) (Walker et al., 2004). In Mexico, the genus *Salvia* is found in mountainous zones, mainly in the Central-South zone of Mexico. It is estimated that 275 species are found in the country (CONABIO y UAEM, 2004). Some of these are employed in Mexican traditional medicine, and it has been reported that they possess anti-inflammatory, antimicrobial, antihypertensive activity and activity against central nervous system (CNS) disorders, among others (Aguilar et al., 1994; Herrera-Ruiz et al., 2006; Esquivel Gutiérrez et al., 2012; Bisio et al., 2015). In these zones, there are endemic species of this genus that are localized in deciduous forest, and within these is found the species *Salvia sessei* Benth, commonly known as “pipilolxochiltl” or “sabanito”. Its manner of employment is by cooking its aerial parts, and later it is utilized for washing the affected zone of “red dysipela” and “white dysipela” (Monroy-Ortiz and Castillo-España, 2007), that is, the disease known as erysipela, which is a bacterial infection of the skin produced by the group A beta-hemolytic streptococcus or *Streptococcus pyogenes* or, more rarely, as *Staphylococcus aureus*. It is characterized by the presence of acute inflammatory signs (erythema, edema, heat, or local pain) in the cutaneous tegumentum, frequently associated with systemic symptoms of discomfort, chills and fever. It diffusely affects the dermis and the superficial part of the subcutaneous cellular tissue, highlighting here the importance of the local lymphatic vessels. Its preferential localizations are the lower limbs, the central-facial area and the outer ear (Celestin et al., 2007; Bläckberg et al., 2015). With respect to *S. sessei*, the sole report to be found, to our knowledge, is that of a royleanone-type diterpene known as sessein, which was identified by its chemical, spectroscopic and crystallographic data, as 7 α -acetyl-12-hydroxyabieta-8,12-diene-11,14-dione-19,20- δ -lactone denominated sessein and was isolated from the acetone extract of the aerial parts of this species collected in the state of Morelos, Mexico (Jiménez et al., 1988); however, was found no report of the pharmacologic activity of the isolated extracts or compounds. Thus, to our knowledge, their employment has not been validated within traditional medicine for the treatment of skin disorders such as erysipela. Therefore, the purpose of this work was to evaluate the anti-inflammatory, antibacterial and antioxidant potential of the three extracts of increasing polarity, as well as two royleanone-type diterpene isomers isolated from the dichloromethane extract of the aerial parts of the species *Salvia sessei* Benth.

2. Materials and methods

2.1. Plant material

Collection of the aerial parts (5 kg) of the plant was carried out in the town of San Andrés de la Cal, Tepoztlán Municipality, state of Morelos, Mexico (18° 57' 31.96" N; 99° 07' 04.33" W. 1557 msnm) in the month of November 2015. A specimen was deposited at the HUMO-CIByC Herbarium of the National Autonomous University of the State of Morelos (UAEM) for safekeeping and taxonomic identification (Voucher no. 33909) conducted by Gabriel Flores-Franco, M.Sc., herbarium curator.

2.2. Preparation of the extracts

The plant material was oven-dried at 40 °C for 3 days and pulverized in a Pulvex MPP300 mill. One kg of the plant material was macerated with 10 L in hexane (Merck) in triplicate, which was filtered and vacuum-concentrated employing a rotaevaporator (Heidolph G3) at 40 °C for its later lyophilization (Heto Dpywinner DW3) until obtaining a powder denominated hexanic extract (SsH). The dried plant residue was macerated with dichloromethane (Merck) and later with methanol (Merck) following the same procedure denoted previously, until obtaining the extracts dichloromethane (SsD) and methanol (SsM), respectively. A portion of each extract served for conducting the

biological-activity assays that are described later.

From the maceration of 1 kg of the dried and milled plant material were obtained the following extracts in amounts and yields: SsH (12.9 g, 1.29%); SsD (40.6 g, 4.06%) and SsM (78.2 g, 7.82%).

2.3. Extraction and isolation

The SsD extract (20 g) was adsorbed in silica gel (Silica Gel 60, Merck) and placed in a glass column (15 × 30 cm) silica gel (300 g) as stationary phase. To elute the column as mobile phase, was utilized a gradient of *n*-hexane: ethyl acetate gradient with an increase in polarity of 5% v/v, collecting 45 fractions of 2-L each. The fractions were concentrated in a rotaevaporator at reduced pressure and analyzed by normal-phase Thin-Layer Chromatography (TLC) (silica gel at 60 F₂₅₄; Merck) and revealed with cerium sulfate solution. Fractions revealing similarity in their chemical content were grouped into 16 fractions (SsD1–16). In fraction SsD-10 was observed the presence of a yellow-colored powder that was analyzed by TLC and that demonstrated the presence of a majority compound with impurities.

SsD-10 (5.0 g) was submitted to chromatographic column fractionation, adsorbed, placed in a silica gel column (150 g) and eluted with an *n*-hexane: ethyl acetate gradient system with a 5% increase in polarity, obtaining 55 fractions, which were analyzed by normal-phase TLC and grouped into 13 subfractions (SsD-10R1 to SsD-10R13). Subfractions 2–4 were grouped (1.0 g), adsorbed with reverse-phase (RP) silica gel (1.0 g, RP-18. 40–63 μ m; Merck) and mounted on an RP “flash” column (Supelco LC18™), employing a water: acetonitrile gradient system as mobile phase, with a 5% change in polarity and collection volumes of 10 mL, obtaining 75 fractions that were concentrated and analyzed by RP TLCs (silica gel RP-18 F_{254S}; Merck). From the 25–35 fraction was obtained a purple-colored diterpene compound, compound 1 (0.38 g), which was denominated isosessein, while from fraction 41–65, a yellow, crystalline diterpene compound presented, that is, compound 2 (0.45 g), known as sessein. These compounds were characterized by Nuclear Magnetic Resonance (NMR) in one dimension (1D) and in two dimensions (2D).

2.4. HPLC analysis

Chromatographic analysis was performed in a Waters 2695 Separation module system equipped with a Waters 996 photodiode array detector and Empower Pro software (Waters Corporation, USA). Chemical separation was achieved using a Supelcosil LC-F column (4.6 mm × 250 mm i.d., 5- μ m particle size) (Sigma-Aldrich, Bellefonte, PA, USA). Mobile phase consisted of a 0.5% trifluoroacetic acid aqueous solution (solvent A) and acetonitrile (solvent B). The gradient system was as follows: 0–1 min, 0% B; 2–3 min, 5% B; 4–20 min, 30% B; 21–23 min, 50% B; 24–25 min, 80% B; 26–27 100% B and 28–30 min, 0% B. The flow rate was maintained at 0.9 mL/min and the sample injection volume was 10 μ L. Absorbance was measured at 270 nm.

2.5. Determination of points-of-fusion

Determination of the uncorrected points-of-fusion for the compounds isolated was performed in a Thermo Scientific 9100 Fusiometer; -both compounds presented very similar points-of-fusion: for compound 1 (purple powder), these were 181.2–181.9 °C and for compound 2 (yellow crystals), these were 181.9–182.7 °C.

2.6. Characterization by NMR

The structures of the two compounds were identified by the NMR of ¹H, ¹³C and 2-D measurements (COSY, NOESY, HSQC, and HMBC) by means of NMR Agilent Technologies 600-MHz DD2 equipment: for compound 1, the solvent employed was CD₃COCD₃ and for compound 2, the solvent was CDCl₃, while tetramethylsilane was utilized as

internal reference. Chemical displacement data are reported in ppm.

2.7. Anti-inflammatory activity

Male ICR mice weighing 25–30 g each were used ($n = 5$ for each treatment). Experiments were performed according to Official Mexican Regulation NOM-062-ZOO (1999) Guidelines (Technical Specifications for the Production, Care and Use of Laboratory Animals) and international ethical guidelines for the care and use of experimental animals (Zimmermann, 1983). Mice were maintained at a temperature of $22 \pm 3 \text{ }^\circ\text{C}$, with $70\% \pm 5\%$ of humidity, with 12-h light/dark cycles and with food/water *ad libitum*.

Animal inflammation was induced following the method previously described by Payá et al. (Payá et al., 1993). The dose evaluated for the extracts and compounds (1 and 2) was 1.0 mg/ear. A control group received acetone as vehicle, and Indomethacin Indo (Sigma) 1.0 mg/ear was utilized as anti-inflammatory positive control.

For the isolated compounds, we also performed a dose-response curve with the following doses: 0.125; 0.25; 0.5; 1.0, and 2.0 mg/ear and from this, we calculated the ED_{50} for each one. All treatments were dissolved in acetone and applied topically on both ears immediately after the administration of TPA. Six hours after administration of the inflammatory agent, the animals were sacrificed by cervical dislocation. Circular sections 6 mm in diameter were taken from both the treated (t) and non-treated (nt) ears, which were weighed to determine the inflammation. Percentage of inhibition was obtained employing the expression below:

$$\text{Inhibition \%} = \left[\frac{\text{DW control} - \text{DW treatment}}{\text{DW control}} \right] [100]$$

Dw = wt – wnt
wt is the weight of the section of the treated ear
wnt is the weight of the section of the non-treated ear.

For the case of the compound that presented similar activity to that of the witness drug, we calculated the potency between both employing the following expression:

$$\frac{[\mu\text{M compound}]/[\mu\text{M drug}]}{\mu\text{M}} = \text{Potency}$$

μM is the micromolar concentration.

2.8. Antibacterial activity

2.8.1. Bacterial strains

The extracts and compounds 1 and 2 were evaluated against the following eight Gram-positive bacteria: *S. aureus* ATCC 29213; *S. haemolyticus* 1036; *S. haemolyticus* 1163; *S. aureus* ATCC 43310 (methicillin-resistant); *E. faecalis* ATCC 2912; *S. pyogenes*; *S. epidermidis* 1042, and *S. hominis* 592 and against four Gram-negative bacteria: *K. pneumoniae* ATCC 700603; *E. coli* 4036; *E. coli* ATCC 25922, and *S. dublin* ATCC 9676, all ATCC strains, as well as those isolated from the General Hospital of Acapulco, state of Guerrero, Mexico, which were provided by Dr. Patricia Álvarez-Fitz and which correspond to the bacteria bank of the Autonomous University of Guerrero (UAG). The strains were reseeded in Agar antibiotic No. 1 (Merck) for 24 h at $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.8.2. Preparation of the inoculum

For the assays, 3–4 colonies from each of the strains were taken to evaluate and reseed in Müller-Hinton broth (Merck), and these were incubated at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ for 3 h. After this, the corresponding dilution was made for each of these strains employing sterile distilled MacFarland water and adjusting the turbidity with 0.5 solution, corresponding to 1×10^8 colony-forming units per milliliter (CFU/mL).

2.8.3. Minimal Inhibitory Concentration (MIC)

The MIC for these extracts and the isolated compounds was determined by the microdilution technique in the broth according to that

indicated by the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013), with minimal modifications (Ríos et al., 1988). The method was carried out on sterile 96-well microplates. The samples were dissolved in a mixture of DMSO: water (20:80) at 5000 $\mu\text{g/mL}$ and the assayed concentrations included 12.5, 25, 50, and 100 $\mu\text{g/mL}$ for the extracts with 200 μL of Müller-Hinton broth; the inoculum (2 μL) containing 1×10^8 CFU/mL was added to each well. A number of wells were reserved for viability control of the inoculum with Müller-Hinton broth and for the others, with Müller-Hinton + DMSO (without extracts of compounds). As antibiotic-of-reference was utilized Gentamicin sulfate (Gen, Sigma) and the concentrations assayed to determine the MIC of this antibiotic were of 0.625, 1.125, 2.5, 5, 10, and 20 $\mu\text{g/mL}$. The plates were incubated at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ for 24 h. After incubation, the MIC was determined by adding to each well a solution of 2, 3,5-triphenyltetrazolol chloride MTT (Sigma) at 0.05%, from which was observed the development of the color red if there were viability of the bacteria and colorlessness in the case of there being no viability.

In the case of compounds 1 and 2, as that of the antibiotic-of-reference, the MIC value is reported in micromoles (μM).

2.9. Evaluation of the antioxidant capacity

2.9.1. Antioxidant capacity for 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay

For the DPPH assay, was followed that described by MacDonald-Wicks et al. (2006), with minor modifications. The activity of the extracts and compounds was measured from the targeting of a methanolic solution of 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, purple-colored DPPH (Sigma). It was evaluated 25 μL of different concentrations of the organic extracts (156.25, 312.5, 625, 1250, 2500 and 5000 $\mu\text{g/mL}$) and compounds (7.81, 15.62, 31.25, 62.5125, 250, 500 and 1000 $\mu\text{g/mL}$) against 175 μL of a solution of DPPH (0.025 mg/mL). The target contained all of the reagents with the exception of the positive control extracts, which included the following: the standardized extract of *Camellia sinensis*, which contains epigallocatechin-3-galate 94% (Teavigo®, 2014) and Trolox, Tx (Sigma). Absorbencies were measured in an Ultraviolet (UV)-Vis spectrophotometer at 515 nm, in an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) plate reader (Perkin-Elmer Lambda 40 UV-Vis). The percentage of inhibition was calculated according to the following expression:

$$\text{Inhibition (\%)} = \left[\frac{A_0 - A_1}{A_1} \right] \times 100$$

Where: A_0 is the target absorbency and A_1 is the absorbency of the extracts-to-evaluate. The determinations were carried out in triplicate.

From the linear equation of the elaborated for each of the extracts and compounds were determined by linear regression analysis, the inhibitory concentration 50% (IC_{50}), which was defined as the concentration necessary to inhibit the formation of 50% of the DPPH radicals

2.9.2. Antioxidant capacity for 2, 2'-Azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) assay

The antioxidant capacity for ABTS was estimated according to that described by MacDonald-Wicks et al. (2006). In general, the ABTS complex was produced *in situ* by the reaction of a solution of the 2, 2'-Azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) (Sigma) with potassium persulfate (Sigma). 230 μL were taken and mixed with 20 μL of the extracts and the compounds established for the DPPH assay; the target contained all of the reagents except for the extracts or compounds and also evaluated positive controls of the standardized extract of *C. sinensis* and Trolox. The absorbances were read at 734 nm, while percentage of inhibition and the inhibitory concentration 50% (IC_{50}) were calculated according to the process described previously for the DPPH assay. The determinations were carried out in triplicate.

2.9.3. Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay

The FRAP assay was followed according to the method reported by Firuzi et al. (2005), with minor modifications. For the latter, the FRAP reagent was prepared by mixing the following: in a tampon of acetates 300 mM (3.1 g de CH_3COONa in 16 mL of glacial acetic acid); 10-mM of 2, 4, 6-Tris- (2-Pyridyl)-s-triazine (TPTZ) (Sigma) in 40 mM of hydrochloric acid, and a 20-mM solution of $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, the latter at a 10:1:1 proportion (v/v). The extracts and compounds analyzed were at the concentrations previously indicated in the DPPH assay. 175 μL were taken of a recent preparation of the CARF reagent, and were incubated at 37 °C and together with a target of reagents, were read at 595 nm. Afterward, was added 25 μL of the extracts and compounds at different concentrations and 50 μL of methanol. A calibration curve was prepared with a standard solution of FeSO_4 . The results were expressed as the equivalent mM of FeSO_4 per gram of extract. All of the experiments were carried out in triplicate.

2.10. Statistical analysis

The results are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were performed utilizing the SPSS™ ver. 23.0 statistical package and statistical differences were determined by means of analysis of variance (ANOVA) and the Tukey test; the differences were considered significant at $p < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Chromatographic profile by HPLC of the SsD extract and elucidation of compounds 1 and 2

Analysis by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) of the SsD extract (Fig. 1) permitted us to identify the majority compound, which presented a retention time of 26.169 min. In the UV light spectrum, the compound showed two bands ($\lambda_1 = 270$ and $\lambda_2 = 400$ nm). This indicated to us that, according to the data described by Michávilá et al. (1986), it corresponds to a structure with the presence of the quinone chromophore, described previously in royleanone-type diterpenes (Michávilá et al., 1986) and identified later in compound 2.

Analysis of NMR spectra ^1H and ^{13}C and of the two-Dimensional (2D) experiments COSY, NOESY, HSQC and HMBC, allowed us to obtain spectroscopic data (Table 1), which were compared with those described in the literature (Jiménez et al., 1988). This comparison confirmed that this diterpenic compound is 7 α -acetyl-12-

hydroxyabieta-8,13-diene-11, 14-dione-19,20- δ -lactone, known as “sessein” (2) (Fig. 2). Compound 1 presented the same chemical displacements as compound 2, except in positions C-12 and C-14, where there is an exchange of the functional groups of one carbonyl ($\text{C}=\text{O}$) for one hydroxyl (OH) and of one hydroxyl (OH) for one carbonyl ($\text{C}=\text{O}$), respectively. This was corroborated by correlations in the bi-dimensional experiments (HMBC), principally between the proton of H-7 ($\delta = 5.98$) and carbon C-14 ($\delta = 184.51$), providing greater consistency for the *o*-quinone tautomer. Therefore, this compound is the structural isomer 7 α -acetyl- 14-hydroxyabieta-8, 13-diene-11, 12-dione-19, 20- δ -lactone (Fig. 3), which herein denominate “isosessein” (1). This effect has been previously reported for diterpenic structures possessing the quinone ring (Rungsimakan and Rowan, 2014). The result of this effect is reported here, to our knowledge for the first time, in sessein, and its determination was only possible by means of the NMR and 2D techniques.

3.2. Anti-inflammatory activity

With the purpose of validating the traditional use of *S. sessei* in the treatment of erysipela (red or white swelling of the legs), was employed the edema method in mouse ear induced by 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA), because it is a reliable method for evaluating drugs in a model of acute inflammation (Patel et al., 2012); it is known that this substance is capable of inducing an acute inflammatory response on employing a 2.5- $\mu\text{g}/\text{ear}$ dose. The inflammatory response is characterized by vasodilation, cellular migration, generation of reactive oxygen species (ROS) and the formation of edema during the first 3 or 4 h after application of the irritant (Rao et al., 1993; Gábor, 2000).

The results corresponding to the anti-inflammatory effect of the extracts and the isolated compounds are presented in Fig. 4, where at a same dose of 1.0 mg/ear, all of the extracts and compounds presented anti-inflammatory activity. In the case of the extracts, the percentage of inhibition increased according to the polarity of the solvent employed, that is, $40.55 \pm 0.5\%$ for SsH, $56.01 \pm 1.1\%$ for SsD, and $66.05 \pm 0.3\%$ for SsM. In the case of the isolated compounds, the percentage of inhibition was $79.85 \pm 3.5\%$ for compound 1, $54.36 \pm 1.7\%$ for compound 2 and for Indo, this was $75.24 \pm 2.4\%$. Statistical comparison between the extracts and compounds against the drug-of-reference revealed that compound 1 did not present a significant difference in the percentage of inhibition of the inflammation ($p < 0.05$) and, in addition, on calculating its potency against this, it

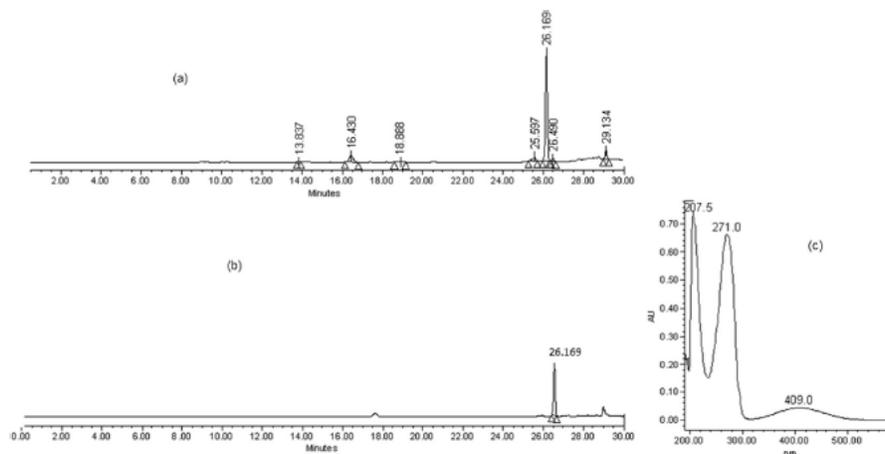


Fig. 1. HPLC chromatogram of a) dichloromethanic extract (SsD), b) compound 2 and c) In the UV light spectrum of compound 2 of *S. sessei*.

Table 1
NMR spectroscopic data for compounds **1** and **2** (600 MHz, **1** in CD₃COCD₃, **2** in CDCl₃, δ ppm, *J* in Hz).

Position	HSQC 1		HSQC 2		HMBC
	δ ¹ H NMR	δ ¹³ C NMR	δ ¹ H NMR	δ ¹³ C NMR	
1	Ha 1.33 (<i>td</i> , 1.93, 5.15, 12.88) Hb 2.75 (<i>d</i> , <i>br</i> , 12.88)	36.16	Ha 1.46 (<i>td</i> , 1.93, 5.15, 12.88) Hb 2.87 (<i>d</i> , <i>br</i> , 12.88)	35.39	2, 3, 5, 10, 20
2	Ha1.76 (<i>m</i>) Hb1.76 (<i>m</i>)	21.82	Ha 1.86 (<i>m</i>) Hb 1.93 (<i>m</i>)	20.84	1, 3, 4, 10
3	Ha 1.81 (<i>ddd</i> , 13, 52, 9.01, 3.8) Hb 1.60 (<i>ddd</i> , 13, 5.15, 52, 8.37)	41.19	Ha 2.0 (<i>ddd</i> , 13, 52, 9.01, 3.8) Hb 1.60 (<i>ddd</i> , 13, 5.15, 52, 8.37)	40.10	1, 2, 4, 5, 4, 18, 19
4	–	42.73	–	41.84	–
5	H 1.89 (<i>dd</i> , 3.22, 14.17)	43.68	H 1.89 (<i>dd</i> , 3.22, 14.17)	42.58	3, 6, 7, 9, 10, 18, 19, 20
6	Ha 1.57 (<i>ddd</i> , 3.86, 3.86, 14.81) Hb 2.07 (<i>dr</i> , 1.93, 4.51, 14.81)	26.62	Ha 1.59 (<i>ddd</i> , 3.86, 3.86, 14.81) Hb 2.19 (<i>dr</i> , 1.93, 4.51, 14.81)	25.85	4, 5, 7, 8, 10
7	H 5.98 (<i>dd</i> , 1.93, 3.86 Hz)	64.09	H 6.01 (<i>dd</i> , 1.93, 3.86 Hz)	62.01	5, 6, 8, 9, 1, 1'
8	–	142.40	–	140.37	–
9	–	143.44	–	143.72	–
10	–	38.08	–	37.59	–
11	–	193.15	–	183.4	–
12	–	168.65	–	150.74	–
13	–	120.34	–	125.94	–
14	–	181.83	–	184.51	–
15	H 3.19 (<i>hept</i> , 7.08)	24.81	H 3.18 (<i>hept</i> , 7.08)	24.25	12, 13, 14, 16, 17
16	H 1.11 (<i>d</i> , 7.08)	20.97	H 1.19 (<i>d</i> , 7.08)	19.58	13, 15, 17
17	H 1.14 (<i>d</i> , 7.02)	21.51	H 1.25 (<i>d</i> , 7.02)	19.76	13, 15, 16
18	1.13 (<i>s</i>)	23.54	H 1.24 (<i>s</i>)	23.08	3, 4, 5, 14
19	–	175.17	–	174.83	–
20	Ha 4.79 (<i>d</i> , 12.23) Hb 4.31 (<i>dd</i> , 1.93, 12.23)	75.06	Ha 4.86 (<i>d</i> , 12.23) Hb 4.26 (<i>dd</i> , 1.93, 12.23)	73.37	–
1'	–	169.81	–	169.05	–
2'	H 1.95 (<i>s</i>)	21.31	H 2.07 (<i>s</i>)	21.01	–
OH-12	–	–	7.29	–	–

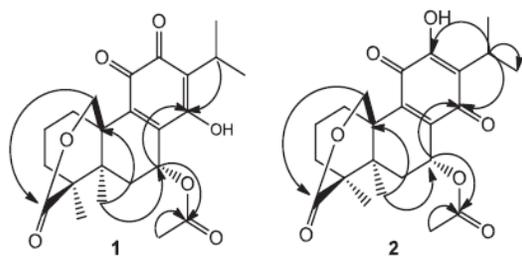


Fig. 2. HMBC correlations of in compounds **1** and **2**.

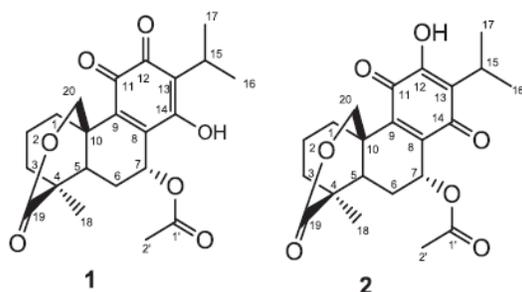


Fig. 3. Chemical structure of the two royleanone-type diterpenes isolated from *Salvia sessei* Benth. **1**: 7 α -acetyl-14-hydroxyabieta-8,13-diene-11,12-dione-19,20- δ -lactone (sessein), and **2**: 7 α -acetyl-12-hydroxyabieta-8,13-diene-11,14-dione-19, 20- δ -lactone (isosessenin).

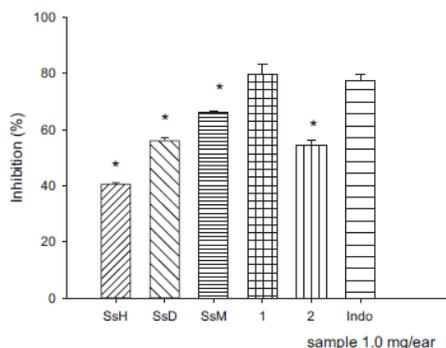


Fig. 4. Percentage of inhibition of the inflammation (%) of the extracts and compounds isolated from *S. sessei* in edema induced by TPA in mouse ear at 1.0 mg/ear. SsH (*S. sessei* hexane), SsD (*S. sessei* dichloromethane), SsM (*S. sessei* methanol), **1** and **2** (the compounds isolated), and Indo (Indomethacin), the values are reported as average \pm standard error of the mean (SEM). $n = 5$. ANOVA, Tukey $^*p < 0.05$ Indo.

was 0.9, which demonstrates equivalence in anti-inflammatory activity between the drug-of-reference and metabolite **1**.

Compounds **1** and **2** tested at different doses (0.125, 0.25, 0.5, 1.0, and 2.0 mg/ear) suppressed TPA-induced edema induced in mouse ear in a dose-dependent manner, as can be observed in Fig. 5. For compound **1**, percentages of inhibition were the following: 7.73 ± 1.2 ; 25.78 ± 1.5 ; 49.0 ± 1.4 ; 77.85 ± 1.3 , and $74.02 \pm 1.2\%$, while for compound **2**, these were 17.53 ± 1.7 ; 30.81 ± 1.0 ; 44.88 ± 1.4 ; 54.36 ± 3.0 and $43.30 \pm 0.6\%$. All of the doses evaluated of both compounds presented significant differences between each other, except for the doses of compound **1** at 1.0 and 2.0 mg/ear, which had a similar effect to that of Indomethacin at 1.0 mg/area. The on-half

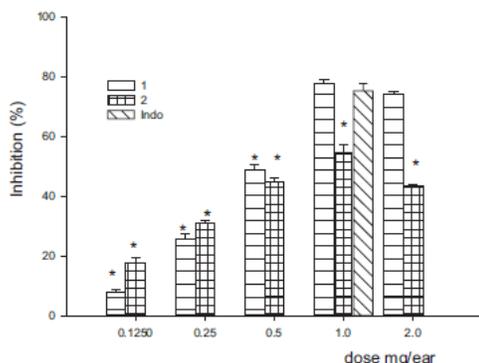


Fig. 5. Dose-response curve for compounds 1 and 2 isolated from *S. sessei* and Indo (Indomethacin). The values were reported as average \pm standard error of the mean (SEM). $n = 5$. ANOVA, Tukey $*p < 0.05$ Indo.

Effective Dose (ED_{50}) calculated for compound 1 was 0.337 ± 0.04 mg/ear, and for compound 2, it was 0.267 ± 0.06 mg/ear and there were no significant differences between the two compounds. Therefore, it can be inferred that the anti-inflammatory activity of SsD is due to the majority presence of compounds 1 and 2.

3.3. Antibacterial activity

The results of the antibacterial activity of the extracts and compounds, determined as Minimal Inhibitory Concentrations (MIC) are presented Table 2. The SsH extract presented important activity against *S. hominis* 592 (12.5 μ g/mL), which is an opportunistic pathogen capable of causing diverse diseases (bacteremia, septicemia and especially, endocarditis) (Gill et al., 1983) in immunocompromised patients, together with a growing concern for its resistance to methicillin, the latter in turn constituting the third pathogen in clinical isolates (Bouchami

Table 2
Antibacterial activity of the extracts and compounds of *S. sessei*. Minimal Inhibitory Concentration (MIC) expressed in μ g/mL and in micromoles (μ M).

Bacterial strain	SsH	SsD	SsM	1	2	Gen
<i>Gram-positive</i>						
<i>S. aureus</i> ATCC 29213	> 100	> 100	> 100	> 100	100 (248.75)	< 20 (43.14)
<i>S. haemolyticus</i> 1036	> 100	> 100	> 100	> 100	100 (248.75)	20 (43.14)
<i>S. haemolyticus</i> 1163	> 100	100	50	12.5 (31.09)	> 100	< 0.625 (1.34)
<i>S. aureus</i> ATCC 43310 (Methicillin-resistant)	> 100	> 100	> 100	> 100	100 (248.75)	20 (43.14)
<i>E. faecalis</i> ATCC 2912	> 100	100	12.5	12.5 (31.09)	> 100	20 (43.14)
<i>S. pyogenes</i>	> 100	> 100	> 100	> 100	100 (248.75)	5 (10.78)
<i>S. epidermidis</i> 1042	> 100	> 100	> 100	> 100	100 (248.75)	5 (10.78)
<i>S. hominis</i> 592	12.5	100	> 100	> 100	> 100	> 20
<i>Gram-negative</i>						
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 20
<i>E. coli</i> 4036	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 20
<i>E. coli</i> ATCC 25922	> 100	> 100	> 100	12.5 (31.09)	> 100	10 (21.57)
<i>S. dublin</i> ATCC 9676	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 20

SsH (*S. sessei* hexane); SsD (*S. sessei* dichloromethane); SsM (*S. sessei* methanol); Compounds 1 and 2 (isolated compounds); Gen (Gentamicin).

et al., 2011; Soroush et al., 2017); the activity of this extract could be due to the essential oils that, in general, are present in species of the genus *Salvia* and that have shown antibacterial activity (Tenore et al., 2011; Tan et al., 2016). Extracts SsD, SsM and compound 1, which was isolated by fractioning from extract SsD, presented relevant activity against the following Gram-positive bacteria: *S. haemolyticus* 1163 (100, 50, and 12.5 μ g/mL respectively) and *Enterococcus faecalis* ATCC 2912 (100, 12.5, and 12.5 μ g/mL respectively). Also, SsD presented activity against *S. hominis* 592 (100 μ g/mL) and only compound 1 presented activity against a Gram-negative bacterium: *E. coli* ATCC 25922 (12.5 μ g/mL, 31.09 μ M). In the case of compound 2, it presented greatest bacterial activity, that is, the following five Gram-positive bacteria demonstrated sensitivity against this compound: *S. aureus* ATCC 29213 (100 μ g/mL, 248.75 μ M); *S. haemolyticus* 1036 (100 μ g/mL, 248.75 μ M); *S. aureus* ATCC 43310 (100 μ g/mL, 248.75 μ M); *S. pyogenes* (100 μ g/mL, 248.75 μ M) and *S. epidermidis* 1042 (100 μ g/mL, 248.75 μ M).

The activity is noteworthy of the extracts and the compounds isolated from *S. sessei* against the various species of *Staphylococcus* employed in this work, which currently possess great clinical relevance, such as *S. aureus* and *S. haemolyticus*, in that both have become pathogens that are multiresistant to antibiotics in nosocomial infections (Sader et al., 2010; Barros et al., 2012; Teeraputon et al., 2017). It is noteworthy that, for the two previously mentioned bacteria, the antibiotic-of-reference presented activity at the highest concentration employed (20 μ g/mL, 43.14 μ M). Likewise, the activity of compound 2 was triggered against *S. pyogenes*, which is the principal infectious agent in erysipela, a disease for which this plant is employed in Mexican traditional medicine and against strains of *S. aureus*, the second infectious agent for the development of the previously referred disease (Celestin et al., 2007; Bläckberg et al., 2015); thus, we could consider that the presence of these diterpenic isomers that are found in the plant are related to the anti-inflammatory and antibacterial effect of *S. sessei*. Additionally, the activity triggered against *E. faecalis* of extracts SsD, SsM and of compound 1 is highlighted, the latter obtaining significant activity (12.5 μ g/mL, 31.09 μ M) compared with that achieved by Gen, the antibiotic-of-reference (20 μ g/mL, 43.14 μ M). The current relevance of this bacterial species lies on its presence in bacteremias as urinary tract infections, pelvic and intra-abdominal infections, endocarditis, neonatal sepsis and meningitis, in addition to the development of resistance to antibiotics (Saeidi et al., 2017). Similarly, it is noteworthy that the activity of compound 1 against *Escherichia coli* (12.5 μ g/mL, 31.09 μ M) is associated with gastrointestinal infections and the development of resistance to beta-lactamic antibiotics (Chellapandi et al., 2017).

The elevated antibacterial activity of compounds 1 and 2, mainly against the Gram-positive bacteria evaluated in this work, is in agreement with that reported previously by various authors who, from some species of the genus *Salvia*, have isolated royleanone-type diterpenes that have the quinone group present in their structure and that have demonstrated greater antimicrobial activity compared with those without this activity. Therefore, it is suggested that this activity is related with this functional group, as is the case for compounds 1 and 2 (Yang et al., 2001; Ulubelen, 2003; Kuźma et al., 2007). In addition, these two compounds presented a δ -lactone ring, which can contribute significantly to its antibacterial activity.

3.4. Antioxidant capacity of the extracts and compounds isolated

The results obtained in the three assays in which the antioxidant capacity was evaluated of the extracts and compounds isolated from *S. sessei* are depicted in Table 3. The SsH extract presented a very low antioxidant capacity in terms of the concentrations assayed in the DPPH assay as well as in the ABTS; thus, it was not possible to determine their IC_{50} . Nonetheless, this extract presented better reducer capacity in the FRAP assay, although less than that of the remaining two extracts (SsD

A. Gómez-Rivera et al.

Journal of Ethnopharmacology 217 (2018) 212–219

Table 3

Antioxidant capacity of the extracts ($\mu\text{g/mL}$) and the compounds isolated (μM) from *S. sessei*, at the inhibitory concentration 50% (IC_{50}).

Extract or Compound	DPPH IC_{50} $\mu\text{g/mL}$, μM	ABTS IC_{50} $\mu\text{g/mL}$, μM	FRAP ^a Equivalent mM FeSO_4
SsH	ND	ND	1038.19 \pm 1.0
SsD	3313.39 \pm 20.79	479.0 \pm 0.06	1377.08 \pm 1.3
SsM	5156.73 \pm 57.17	1.34 \pm 0.03	1723.75 \pm 1.7
Cs	1961.80 \pm 30.91	14.24 \pm 0.04	1612.64 \pm 0.7
1	470.9 \pm 13.9	0.46 \pm 0.04	1536.53 \pm 1.1
2	1458.47 \pm 14.1	0.61 \pm 0.08	1034.03 \pm 0.7
Tx	531.2 \pm 10.0	0.84 \pm 0.09	2184.65 \pm 1.3

SsH (*S. sessei* hexane); SsD (*S. sessei* dichloromethane); SsM (*S. sessei* methanol); Compounds 1 and 2 (compounds isolated); Cs (*C. sinensis*); Tx = Trolox. The values are reported as average \pm standard error of the mean (sem), $n = 3$. ND (Not Determined).

^a Determined for the extracts at a concentration of 5000 $\mu\text{g/mL}$, and for the compounds, at a concentration of 2.5 mM.

and SsM) and that of *C. sinensis*. Contrariwise, extracts SsD and SsM obtained good antioxidant activity; in the DPPH assay, the SsD extract was that which obtained best activity of the three extracts of *S. sessei* (3313.39 \pm 20.79 $\mu\text{g/mL}$), exhibiting a value of IC_{50} 1.7 times greater compared with the IC_{50} extract of the *C. sinensis* extract (1961.80 \pm 30.91 $\mu\text{g/mL}$), the extract-of-reference and that which exhibited greatest activity. It is noteworthy that in this latter extract, there is an elevated presence (94%) of the polyphenol epigallocatechin-3-galate that, as is known, is a powerful antioxidant. Notwithstanding this, in the ABTS and FRAP assays, the SsM extract (1.34 \pm 0.03 $\mu\text{g/mL}$, 1723.75 \pm 1.7 Eq. mM FeSO_4) presented greatest antioxidant and reducer capacity, exceeding in both experiments the *C. sinensis* extract (14.24 \pm 0.04 $\mu\text{g/mL}$, 1612.64 \pm 0.7 Eq. mM FeSO_4), which had an IC_{50} 10.6 greater in DPPH, and its Eq. mM was 0.93 less than that of SsM. The activity exhibited by extracts SsD and SsM could be associated with the flavonoid, terpenoid, and polyphenolic compounds previously reported in the genus *Sabia* (Wang et al., 1998; Tepe et al., 2006; Bahadori et al., 2015; Alipić et al., 2017), as shown the methanolic extracts of *S. syriaca* L., *S. blepharochlaena* and *S. euphratica* var *leicalcylina* evaluated by DPPH and ABTS, where was identified the presence of compounds such as quercetin, caffeic acid, rosmarinic acid, among others, (Bahadori et al., 2017; Zengin et al., 2018).

Regarding the case of the compounds, in the DPPH and ABTS assays, compound 1 was that with greatest antioxidant capacity (470.9 \pm 13.9, 0.46 \pm 0.04 $\mu\text{g/mL}$), exceeding Trolox (531.2 \pm 10.0, 0.84 \pm 0.09 $\mu\text{g/mL}$) that, compared with compound 1, had an IC_{50} 1.13 times greater in the DPPH assay and 0.5 times greater in the ABTS assay. However, this was not so in the FRAP assay, where Tx (2184.65 \pm 1.3 Eq. mM FeSO_4) presented an elevated reducer capacity 1.42 times higher in comparison with that of compound 1 (1536.53 \pm 1.1 Eq. mM FeSO_4). While compounds 1 and 2 exhibited the presence of the same functional groups in their structure, the different results in the assays of the antioxidant activity of both compounds can suggest that the position in which these groups (OH, C=O, and C=C) are found within the structures can facilitate the interaction of radicalary structures through the transfer of protons or electrons (Kabouche et al., 2007; Kolak et al., 2009). According to our knowledge, this is the first report to appear the antioxidant capacity of both isomers isolated from *S. sessei*.

4. Conclusions

The chromatographic fractioning of the dichloromethanic extract allowed the isolation of two royleanone-type diterpenes, which are isomers between each other (compounds 1 and 2). Compound 1 was previously reported as sessein and regarding compound 2, this is the

first time, to our knowledge, that its structure has been reported; it has herein been denominated isosesein. The present study showed that the aerial parts (leaf, stem, and flower) of *Salvia sessei* Benth possess anti-inflammatory, antibacterial, and antioxidant activity. Also, this is the first report of the anti-inflammatory, antibacterial and antioxidant activity of the species, as well as of the two compounds (1 and 2). The activities of the compounds can be associated by means of the presence of their quinone- and δ -lactone-ring structures. The results of the extracts, as well as of the isolated compounds, validate the use of *S. sessei* in the traditional medicine of the state of Morelos, Mexico, for the treatment of skin infections, mainly that known as erysipela. Therefore, given these results, is suggested delving deeper into the search for the mechanisms of action associated with the activities revealed in this work.

Acknowledgments

The authors thank Gabriel Flores-Franco, M.Sc., curator of the HUMO-CIByC Herbarium of the Autonomous University of the State of Morelos (UAEM), for his support in the taxonomic identification, Dr. Patricia Álvarez-Fitz, of the Autonomous University of Guerrero (UAG), for her technical support in the evaluation of antibacterial activity and M.Pharm. Lucía Corona Sánchez of Pharmacy Faculty of the Autonomous University of the State of Morelos (UAEM) for her technical support on the antioxidant capacity evaluation.

Supplementary materials

Figure S1-S4 of ^1H and ^{13}C NMR spectra for compounds 1 and 2. Figure S5-S6 HMBC spectra for compounds 1 and 2.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2018.02.012>.

References

- Aguilar, C. A., Camacho, J.R., Chino, S., Jáquez, P., López, M.E., 1994. Herbario medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información Etnobotánica. Edición del IMSS México. pp. 129–130.
- Alipić, A., Knežević, A., Milutinović, M., Stević, T., Šavikin, K., Stajić, M., Marković, S., Marín, D.P., Matevski, V., Dulčić-Laušev, S., 2017. Biological activities and chemical composition of *Sabia amplicaulis* Lam. extracts. Ind. Crops Prod. 105, 1–9.
- Bahadori, M.B., Valizadeh, H., Asghari, B., Dinparast, L., Farmani, M.M., Bahadori, S., 2015. Chemical composition and antimicrobial, cytotoxicity, antioxidant and enzyme inhibitory activities of *Salvia spinosa* L. J. Funct. Foods 18, 727–736.
- Bahadori, M.B., Dinparast, L., Zengin, G., Sariurku, C., Bahadori, S., Asghari, B., Movahhedini, N., 2017. Functional components, antidiabetic, anti-Alzheimer's disease, and antioxidant activities of *Sabia syriaca* L. Int. J. Food Prop. 20, 1761–1772.
- Barros, E.M., Ceotto, H., Bastos, M.C., Dos Santos, K.R., Giambiagi-Demarval, M., 2012. *Staphylococcus haemolyticus* as an important hospital pathogen and carrier of methicillin resistance genes. J. Clin. Microbiol. 50, 166–168.
- Bisio, A., Schito, A.M., Parricchi, A., Mele, G., Romussi, G., Malafronte, N., Oliva, P., De Tommasi, N., 2015. Antibacterial activity of constituents from *Sabia buchananii* Hedge (Lamiaceae). Phytochem. Lett. 14, 170–177.
- Bläckberg, A., Trell, K., Rasmussen, M., 2015. Erysipelas, a large retrospective study of aetiology and clinical presentation. BMC Infect. Dis. 15, 402.
- Bouchami, O., Ben Hassen, A., de Lencastre, H., Miragaia, M., 2011. Molecular epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus hominis* (MRSHo): low clonality and reservoirs of SCCmec structural elements. PLoS One 6, e21940.
- Celestin, R., Brown, J., Kihiczak, G., Schwartz, R.A., 2007. Erysipelas: a common potentially dangerous infection. Acta Dermatovenerol. APA 16, 123–127.
- Chellapandi, K., Dutta, T.K., Sharma, I., De Mandal, S., Kumar, N.S., Ralte, L., 2017. Prevalence of multi drug resistant enteropathogenic and enteroinvasive *Escherichia coli* isolated from children with and without diarrhea in Northeast Indian population. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 16, 49.
- CONABIO y UAEM, 2004. La Diversidad Biológica en Morelos: Estudio del Estado, 1a ed. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad y Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, C.L.S.I., 2013. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 16th Informational Supplement. CLSI M100-S20. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
- Esquivel Gutiérrez, E.R., Noriega Cisneros, R., Bello González, M.A., Saavedra Molina, A.,

- Salgado Garcéglia, R., 2012. Plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana con propiedades antidiabéticas y antihipertensivas. *Biológicas* 14, 45–452.
- Prodin, D.G., 2004. History and concepts of big plant genera. *Taxon* 53, 753–776.
- Firuzi, O., Lacanna, A., Petrucci, R., Marrosu, G., Saso, L., 2005. Evaluation of the antioxidant activity of flavonoids by "ferric reducing antioxidant power" assay and cyclic voltammetry. *Biochim. Et. Biophys. Acta* 1721, 174–184.
- Gábor, M., 2000. Mouse Ear Inflammation Models and Their Pharmacological Applications. *Akadémiai Kiadó, Budapest, Hungary*.
- Gill, V.J., Selepak, S.T., Williams, E.C., 1983. Species identification and antibiotic susceptibilities of coagulase-negative staphylococci isolated from clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 18, 1314–1319.
- Herrera-Ruiz, M., García-Beltrán, Y., Mora, S., Díaz-Vélez, G., Viana, G.S., Tortoriello, J., Ramírez, G., 2006. Antidepressant and anxiolytic effects of hydroalcoholic extract from *Salvia elegans*. *J. Ethnopharmacol.* 107, 53–58.
- Jiménez, E.M., Portugal, M.E., Lira-Rocha, A., Soriano-García, M., Toscano, A.R., 1988. A new royleanone-type diterpene from *Salvia sessel*. *J. Nat. Prod.* 51, 243–248.
- Kuźma, L., Różalski, M., Walencka, E., Różalska, B., Wysokińska, H., 2007. Antimicrobial activity of diterpenoids from hairy roots of *Salvia sclarea* L.: salviposone as a potential anti-biofilm agent active against antibiotic resistant *Staphylococci*. *Phytomedicine* 14, 31–35.
- Kolak, U., Kabouche, A., Oztürk, M., Kabouche, Z., Topçu, G., Ulubelen, A., 2009. Antioxidant diterpenoids from the roots of *Salvia barrelieri*. *Phytochem. Anal.* 20, 320–327.
- Kabouche, A., Kabouche, Z., Oztürk, M., Kolak, U., Topçu, G., 2007. Antioxidant diterpenoids from the roots of *Salvia barrelieri*. *Food Chem.* 102, 1281–1287.
- MacDonald-Wicks, L.K., Wood, L.G., Garg, M.L., 2006. Methodology for the determination of biological antioxidant capacity *in vitro*: a review. *J. Sci. Food Agric.* 86, 2046–2056.
- Michávil, A., Fernández-Gadea, F., Rodríguez, B., 1986. Abietane diterpenoids from the root of *Salvia lananduaefolia*. *Phytochemistry* 25, 266.
- Morroy-Ortiz, C., Castillo-España, P., 2007. Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos. Morelos, México, 2a ed. CONABIO y UAEM, México.
- NOM-062-ZOO, 1999. -Guidelines (Technical Specifications for the Production, Care, and Use of Laboratory Animals).
- Payá, M., Ferrándiz, M.L., Sanz, M.J., Bustos, G., Blasco, R., Ríos, J.L., Alcaráz, M.J., 1993. Study of the antioedema activity of some seaweed and sponge extracts from the mediterranean coast in mice. *Phytother. Res.* 7, 159–162.
- Patel, M., Muruganathan, G., Gowda, K.P.S., 2012. *In vivo* animal models in preclinical evaluation of anti-inflammatory activity- a review. *Int. J. Pharmacol. Res. Allied Sci.* 1, 1–5.
- Rao, T.S., Curie, J.L., Shaffer, A.F., Isakon, P.C., 1993. Comparative evaluation of arachidonic acid (AA) and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. *Inflammation* 17, 723–741.
- Ríos, J.L., Recio, M.C., Villar, A., 1988. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *J. Ethnopharmacol.* 23, 127–149.
- Rungsimakan, S., Rowan, M.G., 2014. Terpenoids, flavonoids and caffeic acid derivatives from *Salvia viridis* L. cvar. blue Jeans. *Phytochemistry* 108, 177–188.
- Sader, H.S., Farrell, D.J., Jones, R.A., 2010. Antimicrobial susceptibility of Gram-positive cocci isolated from skin and skin-structure infections in European medical centers. *Int. J. Antimicrob. Agents* 6, 28–32.
- Saeidi, S., Mirnejad, R., Masoumi Zavaryani, S., Rostamzadeh, S., 2017. Molecular epidemiology and antibiotic resistance patterns of *Enterococcus faecalis* isolates from hospitals in Tehran. *Infect. Med.* 25, 116–122.
- Soroush, S., Jabalameli, F., Taherikalani, M., Eslampour, M.A., Beigverd, R., Emani, M., 2017. Characterization of biofilm formation, antimicrobial resistance, and staphylococcal cassette chromosome *mec* analysis of methicillin resistant *Staphylococcus hominis* from blood cultures of children. *Rev. da Soc. Bras. De. Med. Trop.* 50, 329–333.
- Tan, N., Satana, D., Sen, B., Tan, E., Altan, H.B., Demirci, B., Uzun, M., 2016. Antimycobacterial and antifungal activities of four selected *Salvia* species. *Rec. Nat. Prod.* 10, 593–603.
- Teavigo* Product Data Sheet, 2014. Available at: <http://www.teavigoinfo.com/pdf/Teavigo%20dat%20Sheet.2014.pdf> (Accessed 25 July 2017).
- Teeraputon, S., Santanirand, P., Wogchai, T., Songiang, W., Lapsomthob, N., Jaikasun, D., Toonkaew, S., Tophon, P., 2017. Prevalence of methicillin resistance and macrolide-lincosamide-streptogramin B resistance in *Staphylococcus haemolyticus* among clinical strains at a tertiary-care hospital in Thailand. *New Microbes New Infect.* 19, 28–33.
- Tenore, G.C., Ciampaglia, R., Arnold, N.A., Piozzi, F., Napolitano, F., Rigano, D., Senatore, F., 2011. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil of *Salvia lanigera* from Cyprus. *Food Chem. Toxicol.* 49, 238–243.
- Tepe, B., Sokmen, M., Akpulat, H.A., Sokmen, A., 2006. Screening of the antioxidant potentials of six *Salvia* species from Turkey. *Food Chem.* 95, 200–204.
- Ulubelen, A., 2003. Cardioactive and antibacterial terpenoids from some *Salvia* species. *Phytochemistry* 64, 395–399.
- Walker, J.B., Sysma, K.J., Treutlein, J., Michael, W., 2004. *Salvia* (Lamiaceae) is not monophyletic: implications for the systematics, radiation, and ecological specializations of *Salvia* and tribe Menthaeae. *Am. J. Bot.* 91, 1115–1125.
- Wang, M., Li, J., Rangarajan, M., Shao, Y., Lavie, E., Huang, T., Ho, C., 1998. Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). *J. Agric. Food Chem.* 46, 4869–4873.
- 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. *Chem. Rev.* 112, 5967–6026.
- Yang, Z., Yoshikazu, K., Kazuhiro, C., Naohiro, S., Hiroshi, K., Yohei, D., Yoshichika, A., Masahiro, T., 2001. Synthesis of variously oxidized abietane diterpenes and their antibacterial activities against MRSA and VRE. *Bioorg. Med. Chem.*
- Zengin, G., Ilirent-Martínez, E.J., Fernández-de Córdova, M.L., Bahadori, M.B., Mocan, A., Locatelli, M., Aktumsek, A., 2018. Chemical composition and biological activities of extracts from three *Salvia* species: *S. blepharochlora*, *S. euphratica* var. *leucalycina*, and *S. verticillata* subsp. *amasica*. *Ind. Crops Prod.* 111, 11–21.
- Zimmermann, M., 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109–110.



Aislamiento y evaluación biológica de compuestos de la especie vegetal
Salvia sessei Benth





VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Abraham Gómez Rivera

Título de la tesis: "Aislamiento y evaluación biológica de compuestos aislados de la
especial vegetal *Salvia sessei* Benth"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Jorge Alberto Reyes Esparza

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____



Firma del miembro del jurado

17 mayo 2019

Fecha



VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Abraham Gómez Rivera

Título de la tesis: "Aislamiento y evaluación biológica de compuestos aislados de la
especie vegetal *Salvia sessei* Benth"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Samuel Enoch Estrada Soto

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____



Firma del miembro del jurado

16 mayo 2019

Fecha



VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Abraham Gómez Rivera

Título de la tesis: "Aislamiento y evaluación biológica de compuestos aislados de la especie vegetal *Salvia sessei* Benth"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Laura Patricia Álvarez Berber

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____



Firma del miembro del jurado

16 mayo 2019

Fecha



VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Abraham Gómez Rivera

Título de la tesis: "Aislamiento y evaluación biológica de compuestos aislados de la especie vegetal *Salvia sessei* Benth"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Leticia González Maya

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____



Firma del miembro del jurado

17 mayo 2019
Fecha



VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Abraham Gómez Rivera

Título de la tesis: "Aislamiento y evaluación biológica de compuestos aislados de la especie vegetal *Salvia sessei* Benth"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____



Firma del miembro del jurado

13 mayo 2019

Fecha

VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Abraham Gómez Rivera

Título de la tesis: "Aislamiento y evaluación biológica de compuestos aislados de la
especie vegetal *Salvia sessei* Benth"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Oscar Torres Ángeles

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____



Firma del miembro del jurado

17 mayo 2019
Fecha

VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Abraham Gómez Rivera

Título de la tesis: "Aislamiento y evaluación biológica de compuestos aislados de la
vegetal *Salvia sessei* Benth"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión
es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):



Firma del miembro del jurado

13 mayo 2019

Fecha