



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO QUÍMICO SISTEMÁTICO DEL GÉNERO
SALVIA (LAMIACEAE) EN MÉXICO**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. BALDOMERO ESQUIVEL RODRÍGUEZ

Dr. LEOVIGILDO QUIJANO
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

Ciudad de México, Diciembre de 2017

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Dr. Alfredo Ortega Hernández
VOCAL	Dra. Martha Yolanda Ríos Gómez
VOCAL	Dr. Francisco Hernández Luis
VOCAL	Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava
SECRETARIO	Dr. José Fausto Rivero Cruz

La presente tesis se llevó a cabo en el laboratorio 2-6 del
Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México
bajo la dirección del Dr. Leovigildo Quijano.

PUBLICACIONES

1.- Baldomero Esquivel*, Celia Bustos-Brito, Mariano Sánchez-Castellanos, Antonio Nieto-Camacho, Teresa Ramírez-Apan, Pedro Joseph-Nathan and Leovigildo Quijano* **Structure, Absolute Configuration, and Antiproliferative Activity of Abietane and Icetexane Diterpenoids from *Salvia ballotiflora*.** *Molecules* **2017**, *22*, 1690; doi:10.3390/molecules22101690
Impact Factor: 2.861 (2016); 5-Year Impact Factor: 2.988 (2016)

2.- Baldomero Esquivel, Eleuterio Burgueño-Tapia, Celia Bustos-Brito, Nury Pérez-Hernández, Leovigildo Quijano and Pedro Joseph-Nathan. **Absolute configuration of the diterpenoids icetexone and conacytone from *Salvia ballotaeiflora*.** *Chirality* **2017**, *in press*; DOI: 10.1002/chir.22781
Impact Factor: 1.956

CONGRESOS

1.- Baldomero Esquivel Rodríguez, Celia Bustos Brito, Leovigildo Quijano. Estudio fitoquímico del extracto de diclorometano de *Salvia cinnabarina*. 13^a Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales (17-20 de mayo de 2017), Morelia, Michoacán. México

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, mi *Alma Mater*, por darme la oportunidad de concluir con mi formación académica a través del programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas.

Al Dr. Leovigildo Quijano mi más profundo y sincero agradecimiento por la confianza brindada, sus enseñanzas y todo el tiempo que dedicó a este trabajo. *Muchas gracias Leo.*

A la Dra. Celia Bustos Brito mi más profundo, perenne y genuino agradecimiento por su importante y significativa contribución a esta tesis y su apoyo incondicional. *Muchas gracias Celia.*

A la Dra. Adela Rodríguez Romero, al Dr. Jorge Peón Peralta y a la Q.F.B. Josefina Tenopala García por su constante apoyo e interés en este proyecto.

Asimismo, agradezco al Dr. Pedro Joseph Nathan por su contribución científica a este trabajo y por sus enseñanzas.

A los miembros del jurado: Dr. Alfredo Ortega Hernández, Dra. Martha Yolanda Ríos Gómez, Dr. Francisco Hernández Luis, Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava y Dr. José Fausto Rivero Cruz por sus valiosos comentarios que mejoraron notablemente este documento.

Al personal técnico del Instituto de Química: a la Q. F. B. Rocío Patiño Maya por la obtención de los espectros de UV-VIS, IR y RO. A la Dra. María del Carmen García González por la obtención de las masas de alta resolución por la técnica DART y al M. en C. Simón Hernández Ortega por la determinación de la difracción de rayos X. A los maestros en ciencias María Teresa Obdulia Ramírez Apan y Antonio Nieto Camacho por la determinación de la actividad biológica.

Asimismo, agradezco a las doctoras Nuria Esturau Escofet y Beatriz Quiroz García por la determinación de los espectros de RMN de campo alto que fueron obtenidos en el Laboratorio Universitario de Resonancia Magnética Nuclear (LURMN) cuya instrumentación fue adquirida con fondos CONACYT, proyecto 0224747 “Aplicaciones novedosas de la Resonancia Magnética Nuclear a la investigación multidisciplinaria de frontera en la Universidad Nacional Autónoma de México”.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	I
RESUMEN	IV
ABSTRACT	V
I.- INTRODUCCIÓN	1
I.1 Consideraciones generales sobre la familia Lamiaceae.	1
I.2 La familia Lamiaceae en México.	3
II.- GENERALIDADES	6
II.1 Consideraciones sobre el género <i>Salvia</i> a nivel global y en México.	6
II.2 Perfil químico del género <i>Salvia</i> .	8
II.3 Estudio químico de <i>Salvias</i> mexicanas.	9
II.4 Esqueletos modificados de <i>Salvias</i> mexicanas.	11
II.5 Resultados previos sobre el estudio de <i>Salvia ballotiflora</i> Benth.	19
II.6 Resultados previos sobre el estudio de <i>Salvia cinnabarina</i> M. et G.	23
II.7 Actividad biológica de diterpenos aislados de <i>Salvias</i> mexicanas.	25
III.- JUSTIFICACIÓN	28
IV.- OBJETIVOS	30

V.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS	31
V.1 Los diterpenos de tipo abietano e icetexano de la <i>Salvia ballotiflora</i> Benth. Elucidación estructural y evaluación de su actividad biológica.	31
V.2 Elucidación de la estructura de la ballotiquinona (1).	33
V.3 La estructura de la 6,7-anhidroballotiquinona (2), un nuevo icetexano con un anillo de cicloheptatrieno.	36
V.4 La estructura y configuración absoluta de la 7 α -acetoxi-6,7-dihidroicetexona (3).	40
V.5 Aislamiento como producto natural de la 6,7,11,14-tetrahydro-7-oxo-icetexona (4).	46
V.6 Determinación de la estructura del 18-acetoxi-11-hidroxisugiol (5), un nuevo abietano aromático.	49
V.7 Determinación de la configuración absoluta de la anastomosina (6). Implicaciones taxonómicas.	52
V.8 Determinación de la configuración absoluta de la 7, 20-dihidroanastomosina (7).	56
V.9 Determinación de la configuración absoluta de la icetexona (8), el primer 9(10 \rightarrow 20)-abeo-abietano (icetexano) descrito. Asignación completa de sus espectros de RMN de ^1H y ^{13}C . Comentarios sobre la 5- <i>epi</i> -icetexona.	58
V.10 Determinación de la configuración absoluta de la conacytona (10) y la asignación completa de sus espectros de RMN de ^1H y ^{13}C .	64
V.11 Asignaciones completas e inambiguas de los espectros de ^1H y ^{13}C de la 1,2-anhidroballotiquinona (9) y de la 7 α -acetoxi-19-hidroxiroyleanona (11).	68
V.12 Evaluación de la actividad biológica de algunos de los diterpenos aislados de <i>Salvia ballotiflora</i> .	69
V.12.1 Actividad antiproliferativa.	69
V.12.2 Actividad antiinflamatoria en el modelo del edema inducido por TPA.	74
V.12.3 Actividad antioxidante, evaluada mediante la reacción de captura del radical DPPH.	75

V.13 Aislamiento de los metabolitos secundarios de <i>Salvia cinnabarina</i> M. et G. Elucidación estructural del malonilcommunol (19) y del ácido-6 β hidroxi- <i>trans</i> -communico (22), dos nuevos diterpenos con esqueleto de labdano. Primeros ejemplos de diterpenos con esqueleto de labdano de una <i>Salvia</i> mexicana.	77
V.14 Diterpenos con esqueleto de labdano aislados de <i>S. cinnabarina</i> . El ácido <i>trans</i> -communico (13) y el communol (17).	79
V.15 Elucidación estructural del malonilcommunol (19), un nuevo diterpeno con esqueleto de labdano de <i>Salvia cinnabarina</i> .	81
V.16 Elucidación estructural del ácido 6 β -hidroxi- <i>trans</i> -communico (22).	85
V.17 Diterpenos con esqueleto de pimarano aislados de <i>S. cinnabarina</i> .	89
V.18 β -eudesmol (15) y cryptomeridiol (21) dos sesquiterpenos derivados del eudesmano aislados de <i>S. cinnabarina</i> .	90
V.19 Derivados aromáticos aislados de <i>S. cinnabarina</i> .	90
VI.- CONCLUSIONES	93
VII.- PARTE EXPERIMENTAL	96
VII.1 Procedimientos generales.	96
VII.2 Material vegetal.	96
VII.2.1 <i>Salvia ballotiflora</i> .	96
VII.2.2 <i>Salvia cinnabarina</i> .	97
VII.3 Extracción y aislamiento.	97
VII.3.1 Extracción y purificación de los metabolitos secundarios de <i>Salvia ballotiflora</i> .	97
VII.3.1.1 Análisis por difracción de rayos X de los compuestos 6 , 7 , 8 y 10 .	100
VII.3.1.2 Mediciones experimentales de DCV.	101

VII.3.1.3 Determinación teórica del DCV para los compuestos 3, 6 y 7 .	101
VII.3.2 Extracción y purificación de los metabolitos secundarios de <i>Salvia cinnabarina</i> .	102
VII.3.2.1 Estudio fitoquímico del extracto de diclorometano.	102
VII.3.2.2 Análisis por difracción de rayos X del ácido <i>trans</i> -commúnicico (13).	104
VII.4 Determinación de la actividad biológica.	105
VII.4.1 Evaluación de la actividad citotóxica.	105
VII.4.2 Evaluación de la actividad antiinflamatoria.	106
VII.4.3 Evaluación de la actividad antioxidante en el modelo DPPH.	106
VIII.- ESPECTROS	108
IX.- PUBLICACIONES	139

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
$[\alpha]_D$	Rotación específica utilizando la línea D del sodio a 25 °C
Å	Ångström
Ac ₂ O	Anhídrido acético
ACN	Acetonitrilo
AcOEt	Acetato de etilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATCC	American Type Culture Collection
ANOVA	Análisis de varianza
c	Concentración en g/mL
CC	Cromatografía en columna abierta
CCDa	Cromatografía en capa delgada analítica
CCDC	Cambridge Crystallographic Data Center
CCDp	Cromatografía en capa delgada preparativa
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
CH ₂ Cl ₂	Cloruro de metileno
CHCl ₃	Cloroformo
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria media
COSY	CO rrelation S pectroscop Y : Espectroscopía de correlación ¹ H- ¹ H en dos dimensiones.
DART	D irect A nalysis in R eal T ime: Espectrometría de masas mediante Análisis Directo en Tiempo Real
DCM	Diclorometano
DCV	Dicroísmo Circular Vibracional
DE	Desviación estándar
DFT	D ensity F unctional T heory: Teoría del funcional de la densidad
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetil sulfóxido deuterado
DPPH	Radical 2,2- D i P henyl-1- P icryl H ydrazyl: Radical 2,2,-difeníl-1-picirilhidrazilo.
EEM	Error Estándar de la Media

EM-DART-AR	Espectrometría de Masas por DART de Alta Resolución
FCME	Herbario de la Facultad de Ciencias de la UNAM, México.
g	Gramo
h	Hora
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation : Correlación Heteronuclear a través de Enlaces Múltiples, (^{13}C - ^1H a larga distancia).
HPLC-EM (Q-TOF)	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplado a masas Q-TOF
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence ó Heteronuclear Single Quantum Correlation : Correlación Heteronuclear ^{13}C - ^1H a un enlace.
Hz	Herz
IR	Infrarrojo
IS	Índice de Selectividad
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
K	Grados Kelvin
Kcal/mol	Kilocalorías/mol
L	Litros
LiAlH_4	Hidruro de litio y aluminio
M	Concentración Molar
<i>m/z</i>	Relación masa/carga
MeOH	Metanol
mg	miligramo
mg/dL	Miligramos/decilitro
mg/Kg	Miligramos/kilogramo
MHz	Megahertz
min	Minuto
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MM2	Mecánica Molecular ²
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -Butanol
NCI	National Cancer Institute : Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos.
nm	Nanómetros

NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy. Espectroscopía de Efecto Nuclear de Overhauser.
°C	Grados Celsius
p.f.	Punto de fusión
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RO	Rotación óptica
SRB	Sulforrodamina B
TPA	12- <i>O</i> -TetradecanoylPhorbol-13-Acetate: Acetato del 12- <i>O</i> -tetradecanoilforbol.
UV	Ultravioleta
ϵ	Coefficiente de absortividad molar
$\lambda_{\text{máx}}$	Longitud de onda máxima
δ	Escala <i>Delta</i> para describir el desplazamiento químico en RMN.
$\nu_{\text{máx}}$	Número de onda máximo
μL	Microlitros
μM	Micromolar
ppm	Partes por millón

RESUMEN

En esta tesis se describe el estudio fitoquímico y la evaluación de la actividad biológica de los metabolitos secundarios de la *Salvia ballotiflora* Benth (Sección Tomentellae) y de la *S. cinnabarina* M. et G. (Sección Incarnatae), ambas pertenecientes al Subgénero *Calosphace*.

De las partes aéreas de una población de *Salvia ballotiflora* recolectada en el Estado de Nuevo León se aislaron mediante técnicas cromatográficas, once compuestos de tipo diterpénico (1-11), de los cuales ocho presentan un esqueleto de icetexano (1-4 y 6-9) y tres de abietano (5, 10-11). Las estructuras asignadas a estos productos fueron establecidas mediante el empleo de técnicas espectroscópicas, fundamentalmente Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de alto campo (700 MHz, para ^1H y 175 MHz para ^{13}C). De acuerdo con la literatura química, cinco de estos compuestos, cuatro icetexanos (1-4) y un abietano (5), no se encuentran descritos y constituyen nuevas aportaciones al conocimiento de la biodiversidad química de las salvias mexicanas. Los diterpenoides 6-11 son productos naturales previamente descritos y fueron identificados como: anastomosina (6), 7,20-dihidroanastomosina (7), icetexona (8), 1,2-anhidroballotiquinona (9), conacytona (10) y 7 α -acetoxi-19-hidroxiroyleanona (11). Otra aportación del presente estudio es la determinación de la configuración absoluta de los diterpenos 6, 7, 8 y 10 las cuales se establecieron por difracción de Rayos-X y por Dicroísmo Circular Vibracional (DCV).

La *Salvia cinnabarina* es una especie clasificada en la sección Incarnatae la cual ha sido estudiada previamente en relación a la composición de su aceite esencial y del exudado de la superficie foliar. Dichos estudios se han realizado con material cultivado en el Jardín Botánico Hanbury de La Mortola en Ventimiglia, Italia. En esta tesis se describe el primer estudio realizado sobre una población silvestre de esta especie, recolectada en el Estado de Puebla. Del extracto de CH_2Cl_2 de las partes aéreas de esta planta se obtuvieron mediante sucesivas separaciones cromatográficas once metabolitos secundarios (12-22). Los compuestos 12 y 16 son diterpenos con esqueleto de pimarano y las sustancias 13, 17, 19 y 22 poseen esqueleto de labdano. Se aislaron e identificaron dos sesquiterpenos, 15 y 21, pertenecientes al grupo del eudesmano, así como un flavonoide, identificado como salvigenina (20) y dos productos aromáticos identificados como ácido ftálico y una mezcla de ésteres de ácidos grasos con el tirosol (14).

Se llevó a cabo la evaluación de la actividad biológica de algunos de los diterpenos aislados de estas especies utilizando modelos establecidos en el laboratorio de pruebas biológicas del Instituto de Química de la UNAM. Los bioensayos utilizados fueron: inhibición de la proliferación de células cancerosas mediante la técnica de la sulforrodamina B; evaluación de la actividad antiinflamatoria utilizando el modelo murino de edema auricular inducido por TPA, y el de capacidad atrapadora del radical DPPH.

ABSTRACT

This thesis describes the phytochemical study and evaluation of biological activity of the secondary metabolites of *Salvia ballotiflora* Benth (Section Tomentellae) and *S. cinnabarina* M. et G. (Section Incarnatae), both belonging to the subgenus *Calosphace*.

From the aerial parts of a population of *Salvia ballotiflora* collected in the State of Nuevo Leon, eleven diterpene-type compounds (**1-11**) were isolated by chromatographic techniques, eight of them have an icetexane skeleton (**1-4** and **6-9**) and three of abietane-type (**5, 10-11**). The structures assigned to these products were established using spectroscopic techniques, mainly High-field Nuclear Magnetic Resonance (NMR) (700 MHz, for ^1H and 175 MHz for ^{13}C). According to the chemical literature, five of these compounds, four icetexanes (**1-4**) and one abietane (**5**), are not described and constitute new contributions to the knowledge of the chemical biodiversity of Mexican salvias. The diterpenoids **6-11** are natural products previously described and were identified as: anastomosin (**6**), 7,20-dihydroanastomosin (**7**), icetexone (**8**), 1,2-anhydroballotiquinone (**9**), conacytona (**10**) and 7 α acetoxy-19-hidroxiroyleanone (**11**). Another contribution of the present study is the determination of the absolute configuration of diterpenes **6, 7, 8** and **10** which were established by X-ray diffraction and by Vibrational Circular Dichroism (VCD).

Salvia cinnabarina is a species classified in the section Incarnatae which has been previously studied in relation to the composition of its essential oil and the exudate of the leaf surface. These studies have been conducted with material grown in the Hanbury Botanical Garden of La Mortola in Ventimiglia, Italy. This thesis describes the first study conducted on a wild population of this species, collected in the State of Puebla. From the CH_2Cl_2 extract of the aerial parts of this plant, eleven secondary metabolites (**12-22**) were obtained by successive chromatographic separations. Compounds **12** and **16** are diterpenes with a pimarane skeleton and substances **13, 17, 19** and **22** have a labdane skeleton. Two sesquiterpenes, **15** and **21**, belonging to the eudesmane group, were isolated and identified, as well as a flavonoid, identified as salvigenin (**20**) and two more aromatic products identified as phthalic acid and a mixture of fatty acid esters with tyrosol (**14**).

The evaluation of the biological activity of some of the diterpenes isolated from these species was carried out using models established in the biological testing laboratory of the Chemistry Institute of the UNAM. The bioassays used were: inhibition of the proliferation of cancer cells by the technique of sulforhodamine B; evaluation of the anti-inflammatory activity using the murine model of auricular edema induced by TPA and the scavenging capacity of the DPPH radical.

I.- INTRODUCCIÓN

I.- INTRODUCCION

I.1 Consideraciones generales sobre la familia Lamiaceae.

La Familia Lamiaceae (Labiatae) es un grupo muy amplio y diversificado de plantas con 236 géneros y más de 7000 especies.¹ Los miembros de esta familia se encuentran distribuidas en todo el mundo con excepción de las regiones polares, y están particularmente bien adaptadas en las áreas tropicales, subtropicales y en las zonas templadas del mundo. En esta familia podemos encontrar tanto especies adaptadas a climas semi-áridos como a hábitats húmedos. Debido a esto las áreas de mayor diversidad de esta familia son la zona Mediterránea, Asia Central, el Continente Americano (México, Centro y Sudamérica), las Islas del Pacífico y las zonas tropicales de África y China. A pesar de la abundancia de géneros, de acuerdo con Cronquist² aproximadamente la mitad de las Lamiaceas pertenecen a los 8 géneros mostrados en la Tabla A. Existen, sin embargo, géneros minoritarios que nos son familiares, por su uso tan extenso, ya sea en medicina tradicional, como plantas ornamentales o por su uso culinario, como son: *Lavandula*, *Marrubium*, *Agastache*, *Mentha* y *Thymus*, entre otros.

Tabla A. Géneros más abundantes de la familia Lamiaceae

Género	No. de Especies	Género	No. de Especies
<i>Salvia</i>	1000	<i>Isodon</i>	200
<i>Hyptis</i>	350	<i>Stachys</i>	200
<i>Scutellaria</i>	360	<i>Nepeta</i>	100
<i>Coleus</i>	200	<i>Teucrium</i>	100

Desde el punto de vista taxonómico, la diversidad de la familia en zona Mediterránea y Asia Central sugiere la posibilidad de que los ancestros de las Lamiaceas actuales tuvieron su origen en esta parte del mundo durante el período Cretácico (hace 140-100 millones de años) cuando los actuales continentes que conforman la Tierra se encontraban cercanos entre si facilitando el movimiento y migración de especies y desde lo que es actualmente Norteamérica hacia

¹ Martínez-Gordillo, M., Fragoso-Martínez, I., García-Peña, M. R. y Montiel, O. Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **84**, 30-86 (2013).

² Cronquist A. An integrated system of classification of flowering plant. p 924-927 (1981). Columbia University Press, New York.

Sudamérica a través de Asia y hacia el actual continente Asiático directamente,³ aunque no se cuenta con evidencias fósiles que apoyen estas rutas migratorias. En el caso de los géneros *Scutellaria* y *Salvia*, la evidencia química de las especies americanas en relación a las europeas y asiáticas sugieren que estos fenómenos de migración fueron factibles.^{4a-b}

Una de las características más distintivas de las Lamiaceas es la presencia en la superficie de sus hojas de glándulas que almacenan aceites esenciales por lo que son conocidas como plantas aromáticas y en consecuencia muchas especies son utilizadas en diferentes sistemas de medicina popular y en la preparación de alimentos. Sin embargo, es importante mencionar que las raíces de muchas de estas especies son también utilizadas en la medicina tradicional de diversas partes del mundo.⁵

Desde el punto de vista químico, la familia ha sido objeto de intensivos estudios orientados al aislamiento de diferentes tipos de metabolitos secundarios. Los géneros más estudiados hasta ahora son: *Isodon* (que incluye a *Rabdosia* y *Plectranthus*),^{6a-b} *Teucrium*,^{7a-e} *Ajuga*,⁸ *Salvia*,⁹ *Scutellaria*,¹⁰ *Stachys*,¹¹ *Sideritis*¹² y *Coleus*.¹³ Como resultado de estos estudios se han aislado un gran número de metabolitos secundarios, tales como esteroides, flavonoides, iridoides,

³ Ramamoorthy, T.P. and Elliot, M. Mexican Lamiaceae: Evolution, Distribution and Endemism. In T.P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot and J. Fa (Editors). Biological Diversity of Mexico: Origins and Distribution (1993) Oxford University Press, New York.

⁴ a) Esquivel, B., Sánchez, A. A., Vergara, F. Matus, W., Hernández-Ortega, S. and Ramírez-Apan, M. T. *Chem.Biodivers.* **2**, 738-747 (2005). b) Esquivel, B., Calderón, J. S., Flores, E., Sánchez, A-A and Rivera, R. R. *Phytochemistry*. **46**, 531-534 (1997).

⁵ Ver por ejemplo Xiwen, Li and Hedge I.C. Lamiaceae (Labiata) in Flora of China Vol. 17 p 50-299 (1994) Science Press (Beijing) and Missouri Botanical Garden (St. Louis)

⁶ a) Han-Dong, S., Sheng-Xiong, H. and Quan-Bin, H. *Nat. Prod. Rep.* **23**, 673-698 (2006). Actualmente las especies de *Rabdosia* y *Plectranthus* están incluidas en el género *Isodon* ver referencia 5. b) Miao, L., Wei-Guang, W., Han/Dong, S. and Jian-Xin, P. *Nat. Prod. Rep.* DOI: 10.1039/c7np00027h

⁷ a) Piozzi, F., Rodríguez, B. and Savona, G. *Heterocycles* **25**, 807 (1987). b) Piozzi, F. *Heterocycles* **37**, 603 (1994). c) Merrit, A.T. and Ley, S.V. *Nat. Prod. Rep.* **9**, 243 (1992). d) Rodríguez-Hahn, L., Esquivel, B. and Cárdenas, J. *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* **63**, 107-196 (1994) e) Piozzi, F., Bruno, M., Rosselli, S. and Maggio, A. *Heterocycles* **65**, 1221-1234 (2005).

⁸ Coll, J. and Tandrón, Y.A. *Phytochem. Rev.* **7**, 25-49 (2008) y referencias citadas, ver también referencia 7d.

⁹ Yi-Bing, W., Zhi-Yu, N., Qing-Wen, S., Mei, D., Hiromasa, K., Yu-Cheng, G. and Bin, C. *Chem. Rev.*, **112**, 5967-6026 (2012). Ver también referencia 7d.

¹⁰ Shang, X., He, X., He, X., Li, M., Zhang, R., Fan, P., Zhang, Q. and Jia, Z. *Journal of Ethnopharmacology* **128**, 279-313 (2010).

¹¹ Tundis, R., Peruzzi, L. and Menichini, F. *Phytochemistry* **102**, 7-39 (2014). Ver asimismo referencia 7d

¹² Fraga, B.M. *Phytochemistry* **76**, 7-24 (2012).

¹³ Saraswati, Katnoria, J.K. and Nagpal, A. K. *J. Pharm. Sci. and Res.* **8**, 227-237 (2016).

monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos y sesterterpenos entre otros. En la revisión más reciente sobre la composición química del género *Salvia*, se reportan más de 773 componentes aislados como resultado del estudio de 134 especies, lo que representa el 13.4% del total.¹⁴ Para el género *Isodon* se han descrito más de 1200 diterpenos.^{6b} La familia es una fuente muy abundante y diversa de productos naturales principalmente de tipo terpénico y más en concreto de diterpenos. El género *Salvia* L. es el más abundante y diverso de la familia Lamiaceae, con probablemente 1000 especies a escala mundial, las cuales crecen en todo el planeta excepto Australia y las regiones frías. Sus centros de diversificación más importantes son: México, la cuenca del Mediterráneo, China y Medio Oriente (en donde probablemente se originó el género). Existen diferentes tratamientos taxonómicos para el género, pero estudios recientes basados en secuencias del DNA de algunas especies sugieren cambios importantes en la forma como estas plantas se encuentran clasificadas actualmente.¹⁵

I.2 La familia Lamiaceae en México.

La Familia Lamiaceae está representada en México por 591 especies pertenecientes a 32 géneros considerando tanto los nativos como los naturalizados.¹ Esto significa que el 8.11% de las especies y el 13.56% de los géneros del planeta existen en México. El endemismo de las especies mexicanas de esta familia es del 65.82%. La familia es la octava más abundante en el país.¹ Los géneros más abundantes son *Salvia* y *Scutellaria* con aproximadamente 307 (51.94% del total de especies en México) y 56 (9.5%) especies respectivamente, seguidos por *Hyptis* 35 especies, (5.92%), *Stachys* 41 especies, (6.93%) y *Hedeoma* 29 especies, (4.90%). Aunque se pueden encontrar en todos los tipos de vegetación existentes en el país, los miembros de esta familia muestran una predilección notable por las áreas montañosas y se pueden localizar en hábitats compuestos por pinos, encinos y abetos. La mayor parte de las especies del género *Salvia* se pueden localizar en este tipo de ecosistema. La República Mexicana es el país con el mayor número de especies del género *Salvia* (aproximadamente el 30% del total de especies a nivel mundial) y puede ser considerado como uno de los centros de diversificación más activos del planeta en lo que se refiere a este género. Esta situación se repite para el género *Scutellaria*,

¹⁴ Ver referencia 9. La lectura cuidadosa de este trabajo permite concluir que no es una revisión exhaustiva ya que hay varias omisiones sobre todo en lo que respecta a especies mexicanas del género por lo que las cifras que se manejan en esta revisión deben considerarse solamente como una aproximación.

¹⁵ González-Gallegos, J.G. and Aguilar-Santelisis, R. *Acta Botánica Mexicana* **109**, 1-22 (2014).

para el cual se considera que el centro de México es el sitio de mayor diversificación que existe en América. De los datos anteriores se puede concluir que, aunque México no es un país muy rico en plantas de la familia Lamiaceae, dados los porcentajes de géneros y especies representadas, es la región más rica del planeta en lo que respecta al género *Salvia*. Con base en trabajos recientes *Salvia* L. es el género más abundante en México con aproximadamente 319 especies (307 especies en la parte continental y 12 en la península de Baja California),¹ seguido por *Mammillaria* L. (Cactaceae) con 306 especies.¹⁶

La familia Lamiaceae tiene una legendaria tradición de uso en México, tanto en medicina tradicional como para la preparación de alimentos. En algunos estados del país, por ejemplo, Chiapas, es la familia de mayor uso para el tratamiento de padecimientos gastrointestinales con una contribución del 21.15% seguida de las familias Asteraceae (19.23%) y Malvaceae (7.69%).¹⁷ En el caso particular del género *Salvia* se ha identificado la existencia de complejos de plantas medicinales,¹⁸ es decir plantas de diferentes especies que comparten el mismo nombre común, características morfológicas y/o aromáticas y propiedades curativas, tal es el caso de los complejos “mirto” y “cantueso”. El primero agrupa diferentes especies de salvias que se utilizan en varias partes del país para tratar problemas gastrointestinales y del sistema nervioso central incluye a: *Salvia microphylla* Kunth, *S. elegans* Vahl., *S. coccinea* Juss ex Murr., *S. fulgens* Cav. y *S. involucrata* Cav. El complejo “cantueso” el cual es utilizado para tratar problemas respiratorios incluye a la *Salvia lavanduloides* Kunth y *S. longispicata* M. et G.¹⁹

El estudio de la composición química de las especies mexicanas de plantas de la familia Lamiaceae, es una línea de investigación de una gran pertinencia que inició en forma sistemática en el Instituto de Química de la UNAM (IQ-UNAM) en 1984 fundamentalmente enfocado en el género *Salvia*. El perfil químico de estas plantas ha sido una herramienta útil para establecer una clasificación más adecuada de las mismas y ha contribuido además a la obtención de productos

¹⁶ Villaseñor, J.L. *Bol. Soc. Bot. Méx.* **75**, 105-135 (2004).

¹⁷ De la Cruz-Jiménez, L., Guzmán-Lucio, M. and Viveros-Valdez, E. *World Appl. Sci. J.* **31**, 508-515, (2014).

¹⁸ Linares, E. and Bye, R. A. *Journal of Ethnopharmacology* **19**, 153-183, (1987).

¹⁹ Jenks, A. A. and Seung-Chul, K. *Journal of Ethnopharmacology*, **146**, 214-224, (2013).

bioactivos. El estudio químico y biológico de las Lamiaceas mexicanas es uno de los grandes proyectos de largo plazo que se han desarrollado en el IQ-UNAM.²⁰

²⁰ Baldomero Esquivel Rodríguez. El Departamento de Productos Naturales del Instituto de Química de la UNAM. Setenta y dos años de aportaciones relevantes a la química mundial. En “Aportaciones Recientes a la Historia de la Química en México”. María de La Paz Ramos Lara y Felipe León Olivares, Coordinadores. 287-303, Universidad Nacional Autónoma de México, 2014.

II.- GENERALIDADES

II.- GENERALIDADES

II.1 Consideraciones sobre el género *Salvia* a nivel global y en México.

El género *Salvia* L. es el más grande de la Familia Lamiaceae con aproximadamente 1000 especies distribuidas por todo el mundo.¹ Existen varios tratamientos botánicos para este género, sin embargo, en todos ellos se subdivide en subgéneros y secciones. Uno de los tratamientos más antiguos es el de Bentham (1836), el cual divide al género en 4 subgéneros: *Salvia*, *Leonia*, *Sclarea* y *Calosphace (Jungia)* y cada uno a su vez en diversas secciones. A pesar de lo sencillo del tratamiento de Bentham, los datos botánicos y químicos actuales indican claramente que su esquema debe de ser reconsiderado.² Tomando como base estudios taxonómicos recientes y la composición química de las especies analizadas se ha postulado una clasificación más adecuada la cual se muestra en la Tabla B.³

Tabla B. Clasificación y distribución de los subgéneros del género *Salvia*

Subgénero	Distribución	Referencias
<i>Audibertia</i>	California (EU) y Baja California (México)	Epling 1939
<i>Calosphace (Jungia)</i>	México, Centro y Sudamérica	Epling 1939
<i>Leonia</i>	Asia, Europa, África y México	Bentham 1876, González- Gallegos 2013
<i>Salvia</i>	Asia, Europa y México	Bentham 1876
<i>Sclarea</i>	Asia y Europa	Bentham 1876

Independientemente del sistema de clasificación del género, la mayoría de las especies que crecen en México (excluyendo la península de Baja California), Centro y

¹ González-Gallegos, J.G. and Aguilar-Santelisis, R. *Acta Botánica Mexicana* **109**, 1-22 (2014).

² Bentham, G. Labiatae, in *Genera Plantarum*, edited by G. Bentham and J.D. Hooker, vol. **2**, 1160-1223 (1876). Reeve & Co., London.

³ Esquivel, B., Sánchez, A. A., Aranda, E. Natural products of agrochemical interest from Mexican Labiate. In *Phytochemicals and Phytopharmaceuticals*. Shahidi, F., Ho, C.T. (Ed.). AOCS Press, Champaign, Illinois, USA, 371-385, (2000).

Sudamérica, presentan una estructura floral muy constante y se considera que pertenecen al mismo subgénero, el cual se denominará *Calosphace* siguiendo la nomenclatura de Bentham,⁴ a reserva de que futuros tratamientos del género puedan introducir cambios en esta nomenclatura.⁵ Se estima que este subgénero está constituido por más de 550 especies, de las cuales en México se localizan 307 (sin incluir las existentes en Baja California), lo cual representa aproximadamente el 30% del género a nivel mundial y se estima que el 88% de éstas son endémicas. El tratamiento más reciente sobre las salvias del subgénero *Calosphace* fue publicado por C. Epling en 1939⁶ y organiza las especies conocidas en esa época en aproximadamente 100 secciones. Con el descubrimiento, aún en nuestros días, de nuevas especies de *Salvia*, el número de secciones se ha incrementado hasta 105. En opinión de varios autores, el tratamiento de Epling no es el más adecuado al considerar un número tan grande de secciones y se propone una reestructuración que refleje mejor la evolución natural de estas especies, sin embargo, a la fecha no existe un nuevo tratamiento integral del subgénero por lo que la gran mayoría de los trabajos tanto químicos como botánicos siguen refiriéndose a éste. Al igual que muchas otras lamiaceas, las salvias muestran una fuerte predilección por las áreas montañosas, aunque se pueden localizar en prácticamente todos los tipos de vegetación en México. Los hábitats compuestos por pinos, encinos y abetos incluyen a la mayor parte de las salvias en nuestro país. Este hecho sugiere que el género debe tener por lo menos entre 40 y 50 millones de años evolucionando en México y por lo tanto cada millón de años se originan 6 nuevas especies. Este índice de especiación es particularmente alto, pero es muy difícil de demostrar debido a la falta de evidencias fósiles.

¿Porque existen tantas especies en México y Sudamérica? Esto se debe en parte a la historia geológica de la región. Sin embargo, puede argumentarse que el éxito evolutivo

⁴ Existen en México algunas especies de los subgéneros *Leonia* y *Salvia* tales como: *Salvia henryi* A. Gray, *S. roemeriana* Sheele, *S. summa* A. Nelson, *S. texana* (Sheele) Torr. y *S. whitehousei* Alziar. Estas especies son un material de estudio idóneo para comparar el perfil químico con las especies de *Calosphace* y observar si estas especies conservan rasgos químicos que las relacionen más con las especies europeas y asiáticas.

⁵ Estos podrían incluir el cambio del nombre del Subgénero *Calosphace* por el de *Jungia*, ver Wood, J.R.I. and R. M. Harley. The genus *Salvia* (Labiatae) in Colombia, *Kew Bull.* **44**, 211-278 (1989).

⁶ Epling, C. A Revision of *Salvia*, subgenus *Calosphace*. In *Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis*; Fedde, F., Ed.; Verlag des Repertoriums, Dahlem dei Berlin 1939; University of California Press: Berkley, CA, 1940; Vol. **110**.

de estas plantas se debe también a que han desarrollado mecanismos de defensa muy eficientes en contra de depredadores naturales (herbívoros, nematodos, hongos fitopatógenos e insectos) y son capaces de inhibir el desarrollo e incluso la germinación de plantas competitivas en su hábitat. Estos hechos se han observado frecuentemente durante el trabajo de recolección de estas especies y en conjunción con los factores geológicos son los responsables del éxito evolutivo del género *Salvia*. La base química de los mecanismos de defensa de estas plantas, muy probablemente, son los metabolitos secundarios que biosintetizan. El género *Salvia* es por lo tanto un material excelente para el aislamiento de compuestos con propiedades alelopáticas (insecticidas, herbicidas, y anti-fúngicas, entre otras) las cuales pueden ser útiles en agricultura. Sin embargo, la actividad biológica descrita para los metabolitos secundarios aislados de estas plantas abarca una gama mucho más amplia de actividades que se mencionarán más adelante.

II.2 Perfil químico del género *Salvia*.

El estudio químico sistemático de un gran número de especies de *Salvia*, a nivel mundial, ha permitido establecer un perfil químico muy interesante para este género. Es frecuente aislar de estas especies compuestos esteroidales tales como β -sitosterol y estigmasterol. Los flavonoides son constituyentes comunes en las partes aéreas de estas plantas, así como productos triterpénicos con esqueleto de lupano, ursano, damarano y oleanano. Se han aislado, asimismo, compuestos de tipo fenólico derivados de los ácidos cafeíco y ferúlico, principalmente de especies chinas. De algunas especies de Medio Oriente se han aislado algunos sesterterpenos.⁷ Sin embargo, los metabolitos secundarios más diversificados y que caracterizan mejor a estas plantas son los compuestos de tipo diterpénico, los cuales se han postulado como marcadores taxonómicos tanto a nivel de subgéneros, como de secciones botánicas. Dentro de este grupo se han aislado labdanos, clerodanos, abietanos, y pimaranos principalmente, aunque también se han descrito kauranos y totaranos.⁷ Con mucha frecuencia se describen diterpenos con esqueletos transpuestos derivados principalmente del abietano y clerodano. Más de 250 abietanos y abietanos transpuestos se han descrito tanto en las partes aéreas como en las raíces de especies pertenecientes a todos los subgéneros, aunque la mayor concentración y

diversidad de estos tipos de metabolitos secundarios se encuentran en los subgéneros *Salvia* y *Sclarea*. Un ejemplo muy claro de esta biodiversidad lo podemos encontrar en los diterpenos aislados de las salvias de Turquía las cuales pertenecen a los subgéneros *Salvia*, *Sclarea* y *Leonia*.⁸ Por otro lado, un elevado número de diterpenos con esqueleto de neo-clerodano y neo-clerodanos transpuestos se han aislado de salvias del subgénero *Calosphace*.⁹

II.3 Estudio químico de Salvias Mexicanas.

A partir de 1984 se ha llevado a cabo en México, un estudio químico sistemático del género *Salvia* principalmente en el Instituto de Química de la UNAM. Como resultado del análisis de más de 50 especies se han aislado una gran cantidad de metabolitos secundarios, principalmente diterpenos del tipo del abietano, pimarano, totarano y clerodano, así como una gran variedad de diterpenos con esqueletos modificados derivados del abietano y del clerodano, aunque se ha descrito también al menos un ejemplo de un pimarano modificado.⁹ A diferencia de las salvias de Europa y Asia, que se caracterizan por bio-sintetizar principalmente diterpenos de tipo abietano, las especies mexicanas se caracterizan por sintetizar mayoritariamente diterpenos derivados del esqueleto de *neo*-clerodano siendo este tipo de compuestos los más distintivos de estas plantas. En especies mexicanas no se han descrito hasta el momento la presencia de diterpenos de tipo labdano y no se han aislado sesterterpenos, los cuales se han descrito en especies europeas y asiáticas. Asimismo, se han planteado durante los primeros años del desarrollo de estos estudios, una serie de hipótesis quimiotaxonómicas, basadas en la distribución de los diterpenos aislados de las especies estudiadas tomando en cuenta la sección botánica en las que se encuentran clasificadas de acuerdo con el tratamiento de C. Epling.⁶ Con base en resultados más recientes es claro que se requiere de una revisión de dichas hipótesis.

A pesar de la participación de varios grupos de investigación y debido a la abundancia de estas plantas, se han analizado hasta el momento aproximadamente el 18% de las salvias

⁷ Yi-Bing, W., Zhi-Yu, N., Qing-Wen, S., Mei, D., Hiromasa, K., Yu-Cheng, G., Bin, C. *Chem. Rev.*, **112**, 5967-6026 (2012).

⁸ Topcu, G. and Goren, A. C. *Records of Natural Products*, **1**, 1-16, (2007).

⁹ Esquivel, B. *Natural Products Communications* **3**, 989-1002 (2008).

que crecen en el país y la gran mayoría de estos estudios se han centrado en las partes aéreas, por lo que el estudio de las raíces ha sido poco explorado. La mayoría de las publicaciones corresponden a poblaciones recolectadas en México, sin embargo, también se han publicado trabajos realizados en el extranjero de especies originarias de México ya sea introducidas como el caso de *Salvia dugessi* Fernald¹⁰⁻¹¹ y *S. leucantha* Cav.¹² en China, o cultivadas en jardines botánicos como ha ocurrido con *Salvia cinnabarina* M. et G.¹³, *S. chamaedryoides* Cav.¹⁴, *S. greggii* Gray,¹⁵ *S. coccinea* Juss,¹⁶ *S. divinorum* Epling et Játiva,¹⁷ *S. adenophora* Fernald,¹⁸ *Salvia fulgens* Cav.¹⁹, o bien usadas como plantas de ornato como *S. microphylla* Kunth,²⁰ y *Salvia miniata* Fernald.²¹

Durante el estudio fitoquímico de las salvias mexicanas se ha puesto en evidencia que el perfil metabólico de una especie, tomando como base su contenido de diterpenos, puede ser muy variable en función de la región geográfica donde crecen, la época de recolección, de las condiciones de crecimiento (es decir si son silvestres o cultivadas) y de las interacciones ecológicas en las cuales participan estas plantas. Estas variaciones

¹⁰ De acuerdo con Carl Epling, la *Salvia dugessii* es sinónimo de *S. melissodora*, sin embargo, la composición química descrita para *S. dugessi* no está relacionada con la documentada para varias poblaciones analizadas de *S. melissodora*, por lo que es posible que haya un error en la identificación de la planta. **Nota adicional:** Se ha descrito recientemente que efectivamente esta especie (*S. dugessii*) estaba mal identificada. La especie que ha sido analizada es realmente *S. tiliifolia* Vahl, ver Fan, M., Bao, Y., Zhang, Z. J., Zhang, H. B. and Zhao, Q. S. *Fitoterapia* **123**, 44-50, (2017).

¹¹ Xu, G., Zhao, F., Yang, X.W., Zhou, J., Yang, L.X., Shen, X.L., Hu, Y.J. and Zhao, Q.S. *Nat. Prod. Bioprospect.* **1**, 81-86 (2011).

¹² Jiang, Yong-Jun; Su, Jia; Shi, Xin; Wu, Xing-De; Chen, Xuan-Qin; He, Juan; Shao, Li-Dong; Li, Xiao-Nian; Peng, Li-Yan; Li, Rong-Tao; Zhao, Qin-Shi. *Tetrahedron* **72**, 5507-5514 (2016) y referencias ahí citadas.

¹³ Sarpietro, M.G., Ottimo, S., Accolla, M.L., Di Sotto, A. and Castelli, F. *Thermochimica Acta* **549**, 166-171 (2012) y referencias ahí citadas.

¹⁴ Bisio, A., De Mieri, M., Milella, L., Schito, A.M., Parricchi, A., Russo, D., Alfei, S., Lapillo, M., Tuccinardi, T., Hamburger, M., and De Tommasi, N. *J. Nat. Prod.* **80**, 503-514 (2017).

¹⁵ Kawahara, Nobuo; Tamura, Toru; Inoue, Mayumi; Hosoe, Tomoo; Kawai, Ken-ichi; Sekita, Setsuko; Satake, Motoyoshi; Goda, Yukihiro. *Phytochemistry* **65**, 2577-2581, (2004) y referencias ahí citadas.

¹⁶ Savona, G., Bruno, M., Paternostro, M., Marco, J. L. and Rodriguez, B. *Phytochemistry* **21**, 2563-2566, (1982).

¹⁷ Casselman, I., Nock, C. J., Wohlmuth, Weatherby, R. P. and Heinrich, M. *Journal of Pharmacology* **151**, 768-783 (2014).

¹⁸ Bisio, A., Anna Maria Schito, A. M., Ebrahimi, S. N., Hamburger, M., Mele, G., Piatti, G., Romussi, G., Dal Piaz, F. and De Tommasi, N. *Phytochemistry* **110**, 120-132 (2015).

¹⁹ Narukawa, Yuji., Fukui, Mari., Hatano, Keiichiro., Takeda, Tadahiro. *J. Nat. Med.* **60**, 58-63, (2006)

²⁰ Aydogmus, S., Yesilyurt, V. and Topcu, G. *Natural Products Research* **20**, 775-781 (2006).

²¹ Bisio, A., Damonte, G., Fraternali, D., Giacomelli, E., Salis, A., Romussi, G., Cafaggi, S., Ricci, D. And De Tommasi, N. *Phytochemistry* **72**, 265-275 (2011).

han sido documentadas para especies tales como *Salvia melissodora*,^{22a-c} *S. keerlii*,^{23a-b} *S. fulgens*,^{24a-c} *S. microphylla*,^{25a-c} *S. amarissima*,^{26a-c} *S. leucantha*,^{27a-b} *S. gesneriflora* (*S. gesneraeflora*)^{28a-c} y *S. ballotiflora* (*S. ballotaeflora*).^{29a-b}

II.4 Esqueletos modificados de Salvias mexicanas.

En las salvias mexicanas se manifiesta una gran actividad biosintética que trae como consecuencia una notable diversidad estructural, ya que de ellas se han aislado un gran número de esqueletos modificados derivados del clerodano, abietano y pimarano. Esta diversidad biosintética se ha observado en varias especies,⁹ pero de una forma muy marcada en *Salvia leucantha* Cav,³⁰ *S. fulgens* Cav³¹ y *S. xalapensis* Benth³² las cuales

²² a) Esquivel, B., Hernandez, L. M., Cardenas, J., Ramamoorthy, T. P. and Rodriguez-Hahn, L. *Phytochemistry* **28**, 561-566, (1989). b) Esquivel, B., Vallejo, A., Gavino, R., Cardenas, J., Sanchez, A. A., Ramamoorthy, T. P. and Rodriguez-Hahn, L. *Phytochemistry* **27**, 2903-2905(1988). c) Rodriguez-Hahn, L., Martinez-Casas, G. and Romo, J. *Rev. Latinoamer. Quim.* **4**, 93-100, (1973).

²³ a) Rodriguez-Hahn, L., Garcia, A., Esquivel, B. and Cardenas, J. *Canadian Journal of Chemistry* **65**, 2687-2690 (1987). b) Esquivel, B., Mendez, A., Ortega, A., Soriano-Garcia, M., Toscano, A., Rodriguez-Hahn, L. *Phytochemistry* **24**, 1769-1772 (1985).

²⁴ a) Narukawa, Y., Fukui, M., Hatano, K. and Takeda, T. *Journal of Natural Medicines* **60**, 58-63, (2006). b) Esquivel, B., Cardenas, J., Rodriguez-Hahn, L. and Ramamoorthy, T. P. *J. Nat. Prod.* **50**, 738-740, (1987). c) Esquivel, B., Cardenas, J., Toscano, A., Soriano-Garcia, M. and Rodriguez-Hahn, L. *Tetrahedron* **41**, 3213-3217, (1985).

²⁵ a) Bautista, E., Toscano, R. A. and Ortega, Alfredo. *J. Nat. Prod.* **77**, 1088-1092, (2014). b) Bautista, E., Toscano, R. A. and Ortega, A. *Organic Letters* **15**, 3210-3213, (2013). c) Esquivel, B., Martinez, N. S., Cardenas, J., Ramamoorthy, T. P. and Rodriguez-Hahn, L. *Planta Medica* **55**, 62-63, (1989).

²⁶ a) Bautista, E., Fragoso-Serrano M., Ortiz-Pastrana N., Toscano R. A. and Ortega A. *Fitoterapia* **114**, 1-6, (2016). b) Bautista, E., Fragoso-Serrano, M., Toscano, R. A., Garcia-Peña, M. R. and Ortega, A. *Organic Letters* **17**, 3280-3282, (2015). c) Maldonado, E., Cardenas, J., Bojorquez, H., Escamilla, E. M. and Ortega, A. *Phytochemistry* **42**, 1105-1108, (1996).

²⁷ a) Jiang, Yong-Jun; Su, Jia; Shi, Xin; Wu, Xing-De; Chen, Xuan-Qin; He, Juan; Shao, Li-Dong; Li, Xiao-Nian; Peng, Li-Yan; Li, Rong-Tao; Zhao, Qin-Shi. *Tetrahedron* **72**, 5507-5514 (2016) y referencias ahí citadas. b) Esquivel, B., Dominguez, R. M., Hernandez-Ortega, S., Toscano, R. A. and Rodriguez-Hahn, L. *Tetrahedron*, **50**, 11593-11600, (1994).

²⁸ a) Calzada, F., Bautista, E., Lilian Yépez-Mulia, L., García-Hernandez, N. and Alfredo Ortega *Phytother. Res.* **29**. 1600–1604 (2015) . b) Esquivel, B. and Flores, E. A. *Heterocycles* **55**, 505-509, (2001). c) Jiménez, M., Moreno, E.D., Díaz, E. *Rev. Latinoamer. Quím.*, **10**, 166. (1979).

²⁹ a) Domínguez, X. A.; González, F. H. Aragón, R.; Gutiérrez, M.; Marroquín, J. S.; Watson, W. *Planta Med.* **1976**, 237-241. b) Esquivel, B., Calderón, J. S. Flores, E., Sánchez, A. A., Rivera, R. R. *Phytochemistry*. **46**, 531-534 (1997).

³⁰ Jiang, Yong-Jun; Su, Jia; Shi, Xin; Wu, Xing-De; Chen, Xuan-Qin; He, Juan; Shao, Li-Dong; Li, Xiao-Nian; Peng, Li-Yan; Li, Rong-Tao; Zhao, Qin-Shi. *Tetrahedron* **72**, 5507-5514 (2016) y referencias ahí citadas

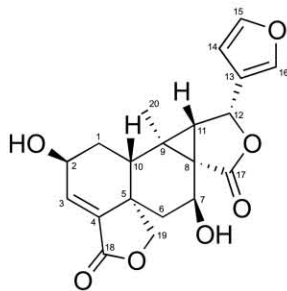
³¹ Narukawa, Yuji., Fukui, Mari., Hatano, Keiichiro., Takeda, Tadahiro. *J. Nat. Med.* **60**, 58-63, (2006)

son capaces de biosintetizar diterpenos con varios esqueletos modificados. Ejemplos de estas sustancias se muestran en las Figuras 1-3.

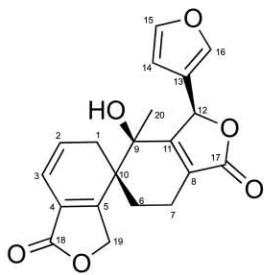
El primer esqueleto modificado aislado de una salvia mexicana es el denominado *icetexano*, [9(10→20)-*abeo* abietano] el cual se caracteriza por un sistema anular 6/7/6 debido a la expansión del anillo B de un abietano a través de la incorporación del carbono C-20 como se muestra en el Esquema 1. Esta hipótesis biogenética cuenta con apoyo experimental a través del trabajo de A. Kelecom³³ quien realizó la síntesis biomimética del barbatusol (**I**), diterpeno de tipo icetexano aislado de *Coleus barbatus* Benth (Lamiaceae), a partir del carnosol (**II**) como se muestra en el Esquema 2.

³² Esquivel, B., Tello, R. And Sánchez, A.A. *J. Nat. Prod.* **68**, 787-790, (2005).

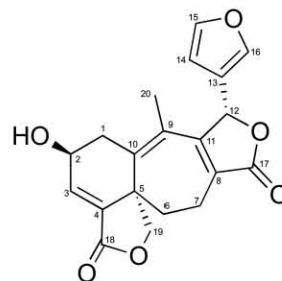
³³ Kelecom, A. *Tetrahedron*, **39**, 3603-3608 (1983).



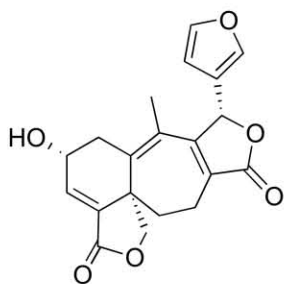
Salvileucantina A
Isosalvigenano



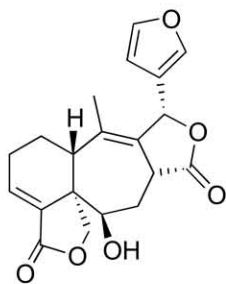
Salvileucantina B
Salvileucalano



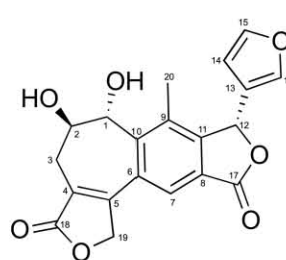
6,7-dihidrosalviandulina E
Salvigenano



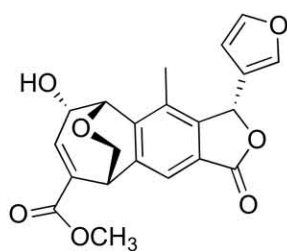
2-epi-6,7-dihidrosalviandulina E
Salvigenano



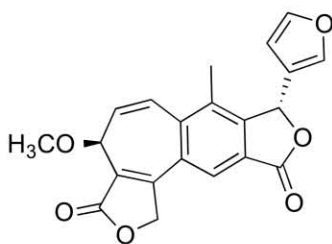
Desacetilsalvigenólida
Salvigenano



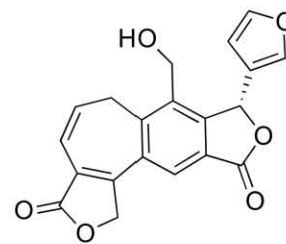
Salvileucantina C
Isosalvipuberulano



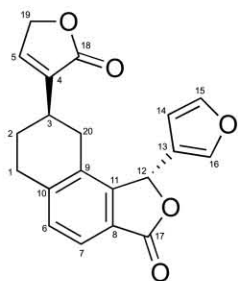
Salvileucantina D
Isosalvipuberulano



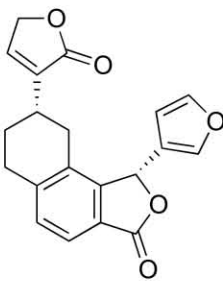
3β-metoxi-isopuberulina
Isosalvipuberulano



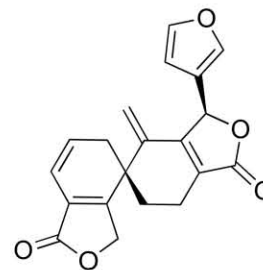
20-hidroxidugesina B
Isosalvipuberulano



3-epi-tilifodiólida
Tilifolano



Tilifodiólida
Tilifolano



Salvileucalina A
Salvileucalano

Figura 1. Ejemplos de diterpenos con esqueleto de *neo-clerodano* y *neo-clerodano* modificado aislados de *Salvia leucantha* Cav.

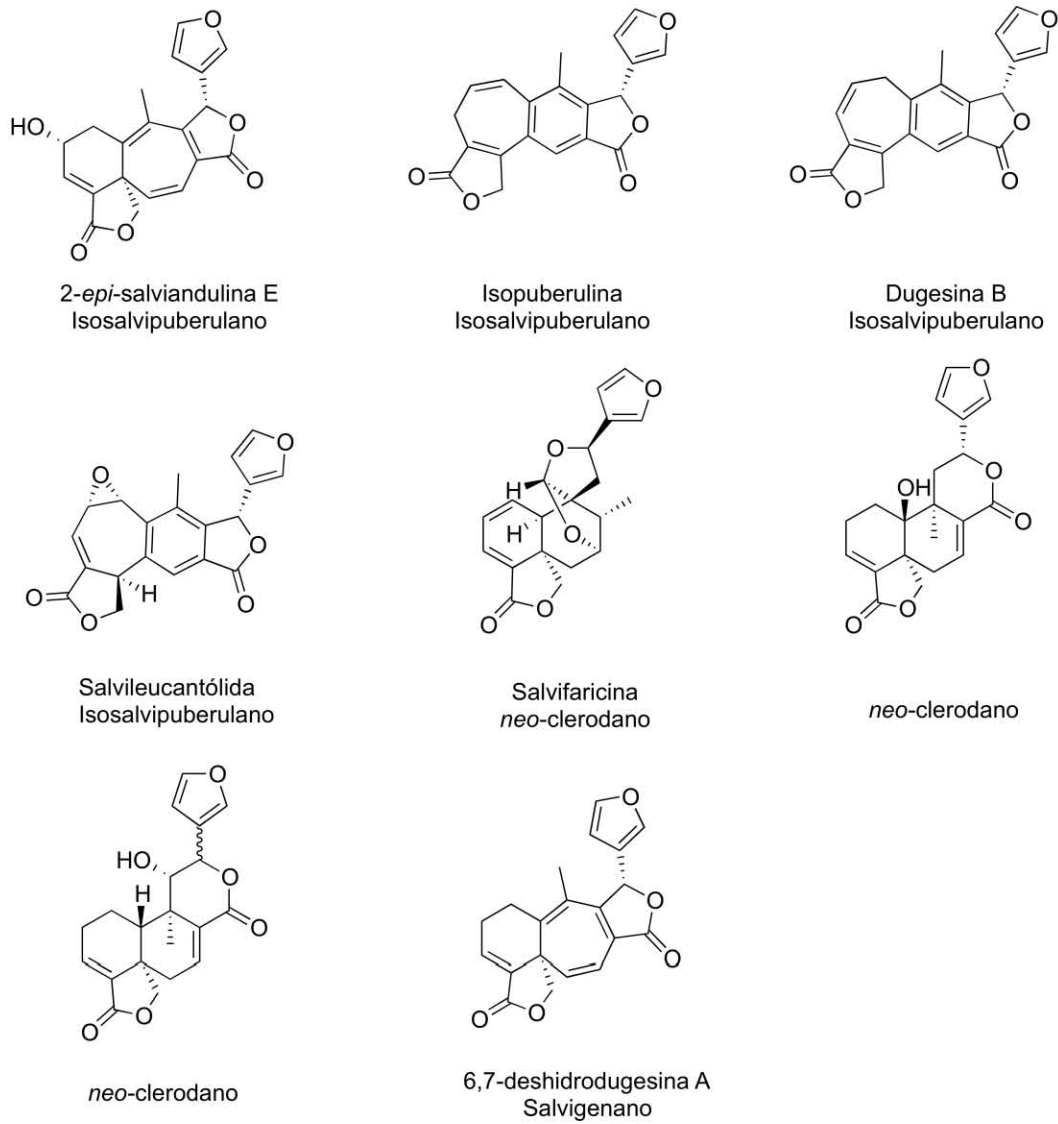
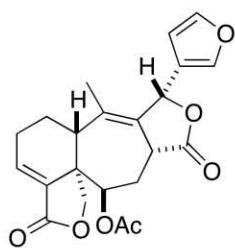
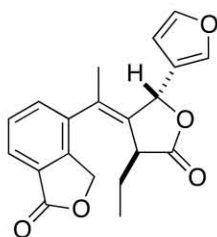


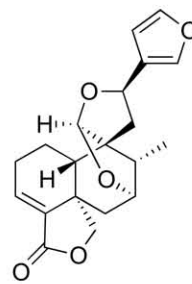
Figura 1 (Continuación). Ejemplos de diterpenos con esqueleto de neo-clerodano y neo-clerodano modificado aislados de *Salvia leucantha* Cav.



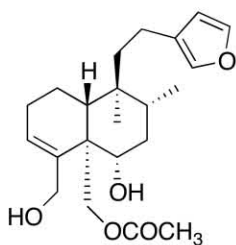
Salvigenólida
Salvigenano



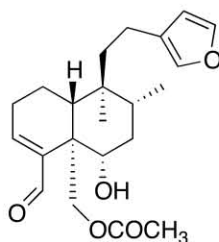
Salvifulgenólida
Salvixalapano



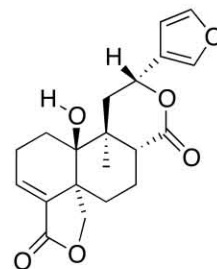
trans-1,2-Dihidrosalvifarcina
neo-clerodano



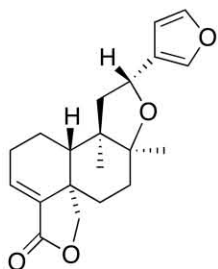
neo-clerodano



neo-clerodano



10 β -hidroxiabacchotricuneatina A
neo-clerodano



Dehidrokerlina
neo-clerodano

Figura 2. Ejemplos de diterpenos con esqueleto de *neo*-clerodano y *neo*-clerodano modificado aislados de *Salvia fulgens* Cav.

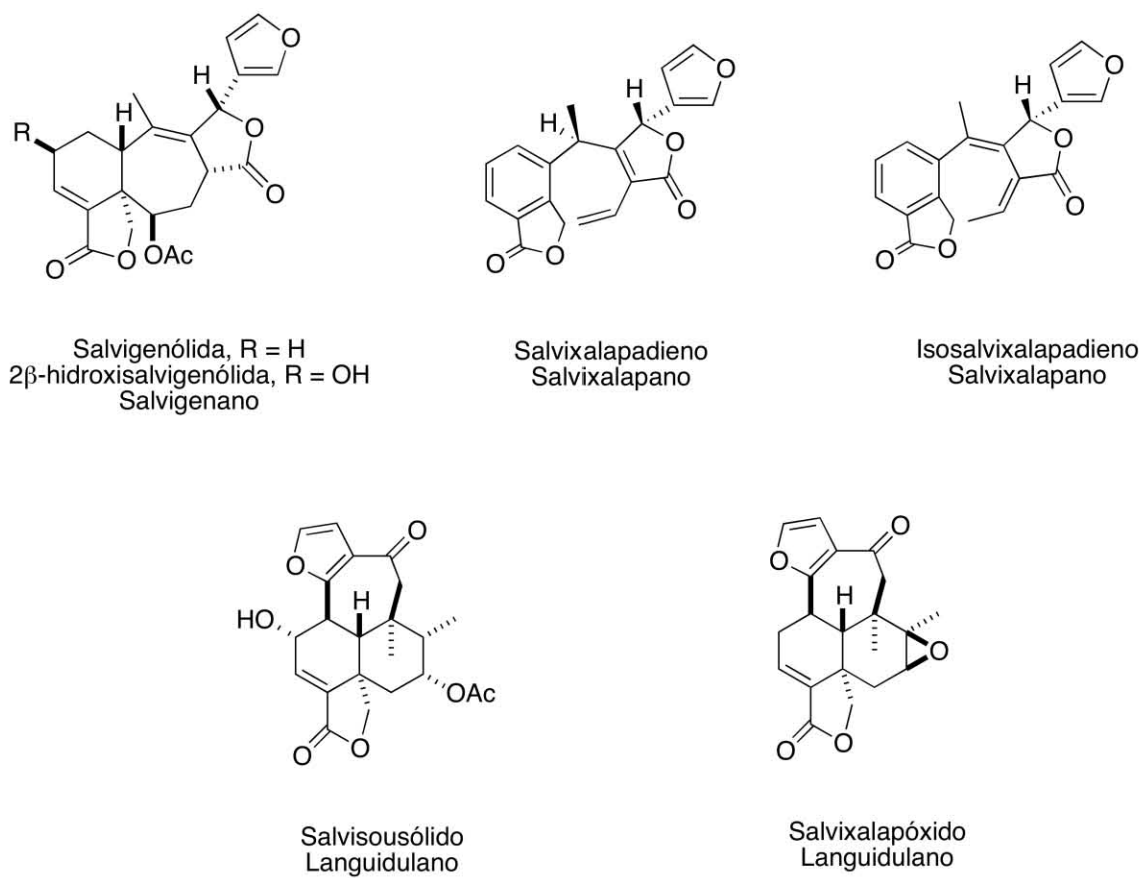
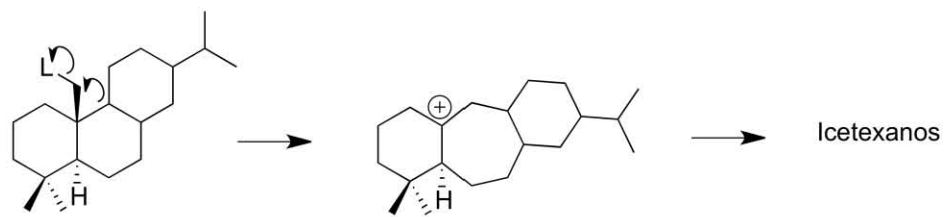
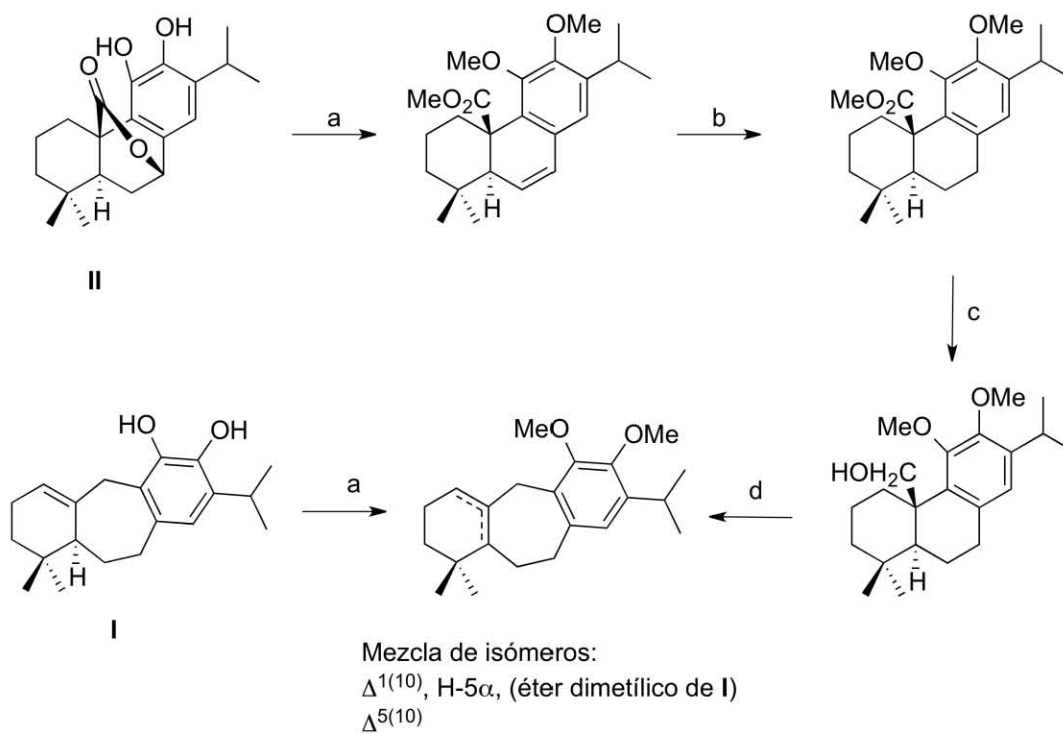


Figura 3. Ejemplos de diterpenos con esqueletos modificados aislados de *Salvia xalapensis* Benth.



L = grupos saliente

Esquema 1. Propuesta biogénica para la formación de un esqueleto de icetexano



Esquema 2. Síntesis biomimética del barbatusol a partir del carnosol.

(a) $\text{CH}_3\text{I-K}_2\text{CO}_3$, agua-acetona, t.a. 1 día (b) H_2 , 10% Pd-C AcOEt, t.a. 3h (c) LiAlH_4 , THF, reflujo, 3h
 (d) TsCl en exceso, piridina, t.a., 20h

El nombre de *icetexano*, deriva de icetexona (**III**), que es el nombre asignado al primer compuesto de este tipo el cual fue aislado en 1976 de *Salvia ballotiflora* (*S. ballotaeiflora*) Benth. junto con su tautómero la romulogarzona (**IV**) y el abietano conacytona (**V**).^{34, 35} Los icetexanos constituyen actualmente un grupo cada vez más numeroso de diterpenos que se pueden encontrar en varias especies vegetales pertenecientes a diferentes familias botánicas, pero el mayor número de ejemplos que se conocen provienen de las plantas del género *Salvia*.³⁶ Posteriormente, en 1985, se describe la estructura de la salvigenólida (**VI**) aislada de la especie endémica de México, *Salvia fulgens* Cav.,³⁷ este producto, es el primer ejemplo de un diterpeno con un esqueleto modificado de *neo*-clerodano al cual se le denominó *salvigenano*. Posteriormente, se han aislado una gran cantidad de compuestos diterpénicos con esqueletos modificados principalmente derivados del *neo*-clerodano y en menor proporción del abietano y pimarano. En varios trabajos de revisión sobre este tema se presentan estos nuevos arreglos y se discuten sus posibles orígenes biogénéticos con base en mecanismos químicamente viables. La última revisión publicada fue en 2008,⁹ pero posteriormente se han descrito algunos diterpenos con esqueletos modificados adicionales de *Salvia occidentalis* Sw.,³⁸ *Salvia leucantha* Cav.,³⁹ *Salvia amarissima* Ort.⁴⁰ y *Salvia microphylla* Kunth.⁴¹

³⁴ Domínguez, X. A., González, F. H. Aragón, R., Gutiérrez, M., Marroquín, J. S. and Watson, W. *Planta Med.* **1976**, 237-241.

³⁵ Es frecuente en el campo de los productos naturales nombrar a las sustancias que se aíslan asociándolas a las fuentes naturales de las que se extraen, pero también en ocasiones los nombres se dedican a instituciones o personas. En el caso de la icetexona (**3**), esta fue dedicada al ICETEX una organización colombiana que otorga créditos a sus ciudadanos para realizar estudios en el extranjero. En reconocimiento a Rómulo Garza (fundador del ITESM en Monterrey, Nuevo León) se acuñó el nombre romulogarzona (**4**) y la conacytona (**5**) fue dedicada al CONACyT.

³⁶ Simmons, E. M.; Sarpong, R. *Nat. Prod. Rep.* **26**, 1195-1217, (2009).

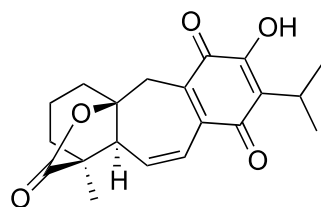
³⁷ Esquivel, B., Cardenas, J., Toscano, A., Soriano-Garcia, M. and Rodriguez-Hahn, L. *Tetrahedron* **41**, 3213-3217, (1985).

³⁸ Jaime-Vasconcelos, M. A., Frontana-Uribe, B., Morales-Serna, J. A., Salmon, M. and Cardenas, J. *Molecules* **16**, 9109-9115, (2011).

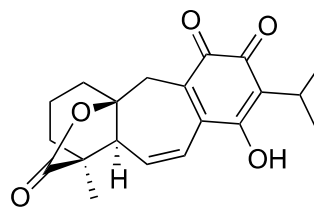
³⁹ Jiang, Y.J., Su, J., Shi, X., Wu, X. D., Chen, X. Q., He, J., Shao, L. D., Li, X, N., Peng, L. Y., Li, R. T. and Zhao, Q. S. *Tetrahedron* **72**, 5507-5514 (2016)

⁴⁰ Bautista, E., Fragoso-Serrano, M., Toscano, R. A., Garcia-Pena, M. R. and Ortega, A. *Organic Letters* **17**, 3280-3282, (2015)

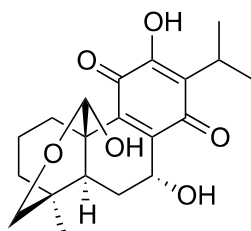
⁴¹ Bautista, E., Toscano, R. A. and Ortega, A. *Organic Letters* **15**, 3210-3213, (2013).



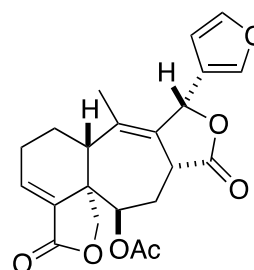
Icetexona (III)



Romulogarzona (IV)



Conacytona (V)



Salvigenólida (VI)

II.5 Resultados previos sobre el estudio de *Salvia ballotiflora* Benth.

Como ya se ha mencionado anteriormente, el perfil metabólico de una salvia puede variar en función de diversos factores ambientales y geográficos. Una de las plantas para las cuales se cuenta con información que demuestra este fenómeno es la *Salvia ballotiflora* Benth, la cual ha sido estudiada en diferentes ocasiones y por diferentes grupos de investigación y se puede observar una variación interesante en la diversidad y el patrón de oxidación de los metabolitos secundarios que produce, en particular en los diterpenos que se aíslan de esta especie. Este arbusto se conoce comúnmente como "mejorana" y en las regiones de San Marcos Tlacoyalco y San Juan Atzingo en el Estado de Puebla se le conoce como "kandatukuthe" (en lengua Popoloca) y es utilizada por las mujeres después del parto para desinflamar el abdomen.⁴² En el noreste de México el té de esta planta se usa para malestares estomacales, el cual es un uso muy frecuente que se le da a las salvias en diversas regiones del país.⁹

⁴² Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana.
http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/flora2.php?l=4&t=Kandatukuthe&po=&id=6178&clave_region=21. Consultada en junio del 2017.



Salvia ballotiflora Benth. (Sección Tomentellae)

El primer estudio fitoquímico sobre esta especie fue publicado por el Dr. X. A. Domínguez y colaboradores en 1972. En éste se describe el aislamiento del β -sitosterol y de los ácidos oleanólico y *epi*-oleanólico del extracto poco polar de las partes aéreas.⁴³ En 1976 el mismo grupo describe el aislamiento y elucidación estructural de los diterpenos **III**, **IV** y **V**.³⁴ Las estructuras y configuraciones relativas de la icetexona (**III**)⁴⁴ y de la conacytona (**V**)⁴⁵ se confirmaron por difracción de Rayos-X en ese mismo año. La conacytona (**V**) presenta la posición C-20 oxidada lo cual es un requisito necesario para la expansión del anillo B que da origen al anillo de siete miembros de la icetexona (**III**) y de la romulogarzona (**IV**), es decir al esqueleto de icetexano. Aunque el producto **III** fue el primer ejemplo de este tipo de compuestos, el término icetexano fue propuesto hasta 1986 durante el estudio químico de la *Salvia fruticulosa* Benth de la cual se aislaron nuevos ejemplos de este tipo de compuestos.⁴⁶

De una población de *S. ballotiflora* recolectada en el estado de San Luis Potosí en 1997, se aislaron cuatro icetexanos, uno de los cuales fue identificado como anastomosina

⁴³ Domínguez, X.A. y Gonzáles F. H. *Phytochemistry* **11**, 2641 (1972).

⁴⁴ Taira, Z., Watson, W.H. and Domínguez, X. A. *J. Chem. Soc. Perkin II*, 1728-1730, (1976).

⁴⁵ Taira, Z. and Watson, W.H. *Acta Cryst.* **B32**, 2149-2152, (1976).

⁴⁶ Rodríguez-Hahn, L., Esquivel, B., Sánchez, C., Cárdenas, J., Estebanes, L., Soriano-García, M., Toscano, R. and Ramamoorthy, T.P. *Tetrahedron Letters*, **27**, 5459-54612 (1986).

(VII).⁴⁷ La estructura de los icetexanos aislados de esta población se muestra en la Figura 4. La anastomosina (VII) fue aislada en 1989 de la *Salvia anastomosans* Ramamoorthy, especie clasificada en la Sección Tomentellae⁴⁸ a la cual también pertenece la *S. ballotiflora* y la *S. fruticulosa* Benth. La presencia de anastomosina (VII) en *S. ballotiflora* apoya la inclusión de *S. anastomosans* en la Sección Tomentellae. Los otros tres icetexanos aislados de esta población cuyas estructuras VIII-X fueron establecidas por métodos espectroscópicos están relacionados con la icetexona (III) y la anastomosina (VII). Es interesante observar los patrones de oxidación de estos compuestos. En el caso de la icetexona (III) y la romulogarzona (IV) la γ -lactona presente se forma entre las posiciones C-19 y C-10, mientras que en la anastomosina (VII) y el producto X (7, 20-dihidroanastomosina) este grupo funcional se forma entre las posiciones C-19 y C-6. En todos los casos el anillo C se encuentra oxidado a una *orto*-hidroxi-*para*-benzoquinona siendo este cromóforo el que genera el color característico de estas sustancias. De esta misma población se aisló la conacytona (V).

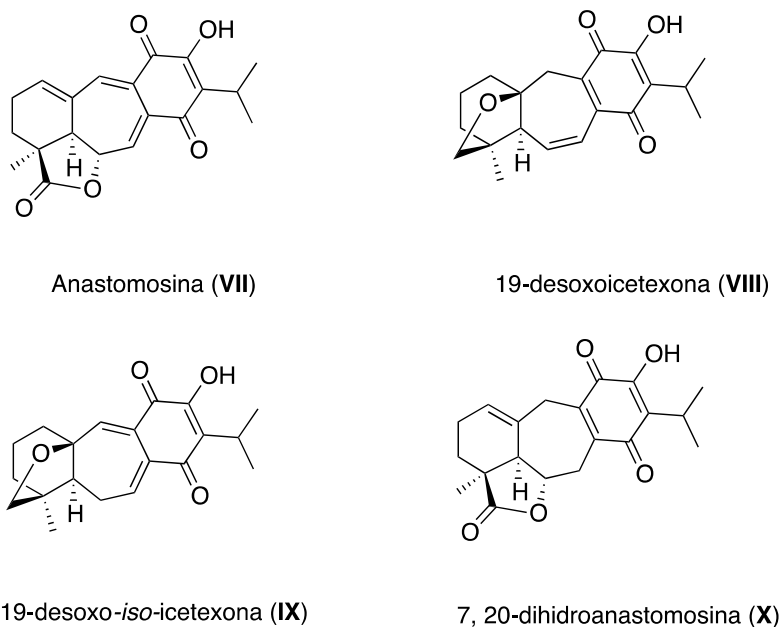


Figura 4. Componentes diterpénicos de una población de *S. ballotiflora* recolectada en el Estado de San Luis Potosí.

⁴⁷ Esquivel, B., Calderón, J. S. Flores, E., Sánchez, A. A., Rivera, R. R. *Phytochemistry*. **46**, 531-534 (1997).

En el año 2013 se describió el aislamiento de la 19-desoxoicetexona (**VIII**) de otra población de *S. ballotiflora* recolectada en San Luis Potosí y se llevó a cabo la evaluación biológica de esta sustancia como anti-diarreico en varios modelos murinos, pero no se describió ningún otro componente diterpénico.⁴⁹

En el mismo año también se describe la actividad del extracto hidro-metanólico de esta especie contra el virus del herpes simple (HSV-1) y el virus del herpes genital (HSV-2), previamente se ensayó la citotoxicidad del extracto con líneas celulares Vero (células epiteliales normales obtenidas del riñón del mono *Cercopithecus aethiopsis*).⁵⁰

Como se ha mencionado previamente las lamiaceas son plantas aromáticas por su alto contenido de aceites esenciales y debido a los diferentes usos que se han descrito para estos, en 2015 se llevó a cabo el estudio de la composición del aceite esencial de *S. ballotiflora* obtenido por hidrodestilación.⁵¹ Se lograron identificar 37 componentes en este extracto siendo los principales el cariofileno (12.74%) y el óxido de cariofileno (15.97%). Para ambos componentes se describió una actividad insecticida e insectistática en los diferentes estadios del insecto *Spodoptera frugiperda* J. E. Smith. El extracto clorofórmico de una población de esta planta recolectada en Tenancingo, Estado de México, se ha propuesto también como una alternativa para el manejo integrado de este insecto conocido como gusano cogollero del maíz.⁵²

En un trabajo reciente, en 2017, se describió la actividad citotóxica del extracto clorofórmico y de cuatro diterpenos aislado de *S. ballotiflora*. La localidad de colecta es la misma de la cual se aisló la 19-desoxoicetexona (**VIII**) en 2013. Los diterpenos obtenidos en esta ocasión fueron identificados como icetexona (**III**), 19-desoxoicetexona (**VIII**), 19-desoxo-*iso*-icetexona (**IX**) y 7,20-dihidroanastomosina (**X**). Tanto el extracto

⁴⁸ Sánchez, C., Cárdenas, J., Rodríguez-Hahn, L. and Ramamoorthy, T. P. *Phytochemistry*. **28**, 1681-1684, (1989).

⁴⁹ Pérez-Gutiérrez, S., Zaval-Mendoza, D., Hernández-Munive, A., Mendoza-Martínez, A., Pérez-González, C., Sánchez-Mendoza, E. *Molecules*. **18**, 8895-8905, (2013).

⁵⁰ Silva-Mares, D., Torres-Lopez, E., Rivas-Estilla, A. M., Cordero-Perez, P., Waksman-Minsky, N. and Rivas-Galindo, V. M. *Nat. Prod. Commun.* **2013**, 8, 297-298.

⁵¹ Cárdenas-Ortega, N. C., González-Chávez, M. M., Figueroa-Brito, R., Flores-Macías, A., Romo-Asunción, D., Martínez-González, D. E., Pérez-Moreno, V. and Ramos-López, M. *Molecules*. **20**, 8048-8059, (2015).

⁵² León-Herrera, L.R., Ramos-López, M.A., Mondragón-Olguín, V.M., Romero-Gómez, S., Campos Guillen, J. and Lucas-Deecke, G. *Entomología Mexicana*. **3**, 401-406, (2016).

clorofórmico como los cuatro diterpenos aislados se ensayaron para determinar su efecto citotóxico en las siguientes líneas celulares de cánceres humanos: HeLa (cervical), MCF-7 (mama) y A549 (pulmón), se utilizaron además dos líneas celulares normales de origen murino y *cis*-platino como control positivo. En este bioensayo la 19-desoxo-*iso*-icetexona (IX), así como el extracto clorofórmico presentaron la mayor actividad siendo ésta cercana a la del *cis*-platino.⁵³

II.6 Resultados previos sobre el estudio de *Salvia cinnabarina* M. et G.

El perfil metabólico de una especie de *Salvia*, puede variar en función en diversos factores entre ellos las condiciones de crecimiento, es decir si son silvestres o cultivadas. La *Salvia cinnabarina* M. et G es una especie originaria de México que crece desde el Estado de Puebla hasta Guatemala.



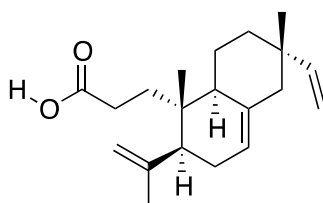
Salvia cinnabarina M. et G. (Sección Incarnatae)

El único estudio sobre los componentes diterpénicos de esta especie se ha realizado sobre poblaciones cultivadas en jardín botánico. En 2001 se describió el aislamiento y elucidación estructural por RMN de ^1H y de ^{13}C del ácido 3,4-*seco*-isopimarano-4(18),7,15-trien-3-oico (XI) obtenido de un extracto de la superficie foliar de esta especie.⁵⁴ La configuración relativa de este *seco*-pimarano fue establecida por difracción

⁵³ Campos-Xolalpa, N., Alonso-Castro, A. J., Sánchez-Mendoza, E., Zavala-Sánchez, M.A. and Pérez-Gutiérrez, S. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 27, 302-305, (2017).

⁵⁴ Romussi, G., Ciarallo, G., Bisio, A., Fontana, N., De Simone, F., De Tommasi, N., Mascolo, N., Pinto, L. *Planta Medica*, 67, 153-155, (2001).

de Rayos-X en 2007 por el mismo grupo de investigación.⁵⁵ Esta sustancia ha sido ensayada en diferentes modelos biológicos y se ha establecido para la misma una amplia variedad de actividades entre las cuales están: actividad espasmolítica no-específica en un modelo de íleon de cobayo;⁵⁵ inhibidora de la contractibilidad de la vejiga urinaria aislada de rata *in vitro*;⁵⁶ inhibidora de la motilidad intestinal en ratón, *in vivo*;⁵⁷ hipotensora debido a un mecanismo periférico independiente de la liberación de óxido nítrico en el endotelio vascular en ratas anestesiadas;⁵⁸ antibacteriana;⁵⁹ antimutagénica en el ensayo de Ames;⁶⁰ ansiolítica⁶¹ y anticlastogénica en linfocitos humanos (en la forma de sal sódica).⁶²



Ácido 3,4-*seco*-isopimara-4(18),7,15-triene-3-oico (XI)

Estos estudios fueron realizados con material cultivado en el Jardín Botánico Hanbury de La Mortola en Ventimiglia, Italia. La revisión bibliográfica sobre esta especie indica que no se han realizado estudios sobre poblaciones silvestres de esta planta. La *Salvia cinnabarina* M. et G. se conoce como tzajalpomt'zun en lengua Maya y es utilizada en

⁵⁵ Bisio, A., Pagano, B., Romussi, A., Bruno, O., De Tommasi, N., Romussi, G., Mattia, C.A. *Molecules*, **12**, 2279-2287, (2007).

⁵⁶ Capasso, R., Izzo, A.A., Romussi, G., Capasso, F., De Tommasi, N., Bisio, A., Mascolo, N. *Planta Medica*, **70**, 185-188, (2004).

⁵⁷ Capasso, R., Izzo, A.A., Capasso, F., Romussi, G., Bisio, A., Mascolo, N. *Planta Medica*, **70**, 375-377 (2004).

⁵⁸ Alfieri, A., Maione, F., Bisio, A., Romussi, G., Mascolo, N., Cicala, C. *Phytotherapy Research*, **21**, 690-692, (2007).

⁵⁹ Capasso, R.; Avello, G.; Ascione, V.; D'Alessio, A.; De Fusco, R.; Romussi, G. et al. *Proceedings 3rd International Symposium on Natural Drugs*; Naples, **2003**; pp. 193-197.

⁶⁰ Di Sotto, A., Mastrangelo, S., Romussi, G., Bisio, A., Mazzanti, G. *Food and Chemical Toxicology*, **47**, 2092-2096, (2009).

⁶¹ Maione, F., Bonito, M.C., Colucci, M., Cozzolino, V., Bisio, A., Romussi, G., Cicala, C., Pieretti, S., Mascolo, N. *Natural Product Communications*, **4**, 469-472, (2009).

⁶² Di Sotto, A., Carbone, F., Hrelia, P., Maffei, F., Castelli, F., Sarpietro, M.G., Mazzanti, G. *J. Nat. Prod.* **75**, 1294-1298, (2012).

el estado de Chiapas para el tratamiento de cólicos,⁶³ es un arbusto perenne de aproximadamente 1 a 1.5 m de alto con vistosas flores rojas, para el cual se han descrito actividades antibacterianas⁶⁴ y espasmolíticas.⁶⁵ También es utilizada, en el mismo estado, para el tratamiento de las reumas.⁶⁶ La población silvestre estudiada en esta tesis es utilizada en el estado de Puebla para aliviar problemas estomacales.

II.7 Actividad biológica de diterpenos aislados de *Salvias* mexicanas.

Como se ha mencionado anteriormente el género *Salvia* es un material excelente para el aislamiento de compuestos con propiedades insecticidas, herbicidas, alelopáticas y anti-fúngicas, las cuales pueden ser útiles en agricultura. Esta afirmación se desprende de observaciones de campo sobre la capacidad que tienen muchas especies para no ser atacadas por insectos en su hábitat natural y para evitar el desarrollo y floración de otras especies a su alrededor. Algunos de los diterpenos aislados de *Salvia* han mostrado interesantes propiedades biológicas algunas de las cuales pueden explicar las observaciones de campo referidas, ya que se han descrito propiedades antialimentarias contra insectos tales como *Spodoptera littoralis*⁶⁷ y *S. frugiperda*³ y actividad fitotóxica utilizando diferentes modelos vegetales.⁶⁸

Uno de los diterpenos más estudiados es la salvinatorina A debido a su actividad psicotrópica.⁶⁹ Este compuesto fue aislado de *Salvia divinorum* Epling & Jativa⁷⁰ en 1983 por Ortega y col. en el Instituto de Química de la UNAM y es uno de los productos naturales mejor explorados en cuanto a su mecanismo de acción y sus posibilidades de uso para el control de adicciones.

⁶³ De la Cruz-Jiménez, L., Guzmán-Lucio, M. and Viveros-Valdez, E. *World Appl. Sci. J.* **31**, 508-515, (2014).

⁶⁴ Meckes, M., Villarreal M. L., Tortoriello J., Berlin, B. and Berlin, E.A. *Phytother. Res.* **9**, 244-250, (1995).

⁶⁵ Tortoriello, J., Meckes-Fischer M., Villarreal, M. L., Berlin, B. and Berlin, E. *Phytomedicine*, **2**, 57-66, (1995).

⁶⁶ Gabriela Domínguez-Vázquez, G. and Castro-Ramírez, A. E. *Etnobiología* **2**, 19-31, (2002).

⁶⁷ Simmonds, M. S. J., Blaney, S. M., Esquivel, B. and Rodríguez-Hahn, L. *Pestic. Sci.* **47**, 17-23 (1996).

⁶⁸ Rial, C., Varela, R. M., Molinillo, J. M. G., Bautista, E., Ortega-Hernández, A. and Macías, F. A. *Phytochemistry Letters*, **18**, 68-76, (2016).

⁶⁹ Riley, A. P. Groer, C. E. Young, D. Edwald, A. W. Kivell, B. M. and Prisinzano, T. E. *J. Med. Chem.*, **57**, 10464-10475 (2014).

⁷⁰ Ortega, A., Blount, J.F., Manchand, P.S. *J. Chem. Soc. Perkins Trans.* **1**, 2505-2508, (1982).

También se han descrito propiedades antiparasitarias (contra *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica*),⁷¹ antimicrobianas,¹⁹ inhibidora (*in vitro*) de la replicación de células de cáncer humano,⁷² y moduladoras de la resistencia a fármacos en líneas de cáncer, entre otras.⁷³

Varios componentes terpénicos aislados de plantas del género *Salvia* han mostrado actividades citotóxicas interesantes en modelos *in vitro* utilizando una amplia variedad de líneas celulares en cultivo de diferentes tipos de cáncer principalmente humano.⁷⁴ Los datos actuales indican que los diterpenos de tipo abietano y derivados muestran actividad citotóxica más frecuentemente que en el caso de los derivados de *neo-clerodano*.

Los Productos Naturales han sido la fuente más útil de moléculas con actividad biológica y su influencia ha sido particularmente importante en la obtención de fármacos contra el cáncer, enfermedad que es la principal causa de muerte a escala mundial. Se le atribuyen 8.2 millones de defunciones ocurridas en todo el mundo en 2012 y se espera que este número se incremente a 12 millones para el año 2030, por lo que la búsqueda de nuevos compuestos con potenciales efectos anticancerosos es una línea de investigación de una gran importancia. Con base en los resultados obtenidos a la fecha a escala global, los diterpenos del género *Salvia*, y principalmente los derivados del abietano, pueden proveer nuevos productos líder para el desarrollo de nuevos agentes anticancerosos.

Es importante asimismo la exploración sistemática de otras actividades biológicas para los componentes de estas plantas, tales como antiinflamatoria, mejoradora de la capacidad de aprendizaje⁷⁵ y contra una variedad amplia de parásitos por ejemplo *Trypanosoma cruzi*, el agente causal del mal de Chagas y otros relacionados con enfermedades tropicales para las cuales se ha dedicado poca atención desde el punto de vista de la investigación. Para algunas de estas enfermedades, tales como dengue, leishmaniasis, lepra, filariasis, malaria, eschistosomiasis y tuberculosis se han descrito

⁷¹ Calzada, F., Bautista, E., Yépez-Mulia, L., García-Hernández, N. and Ortega, A. *Phytother. Res.* **29**, 1600-1604, (2015)

⁷² Esquivel, B.; Sánchez, A.A.; Vergara, F.; Matus, W.; Hernandez-Ortega, S.; Ramírez-Apan, M.T. *Chem. Biodivers.*, **2**, 738–747, (2005).

⁷³ Bautista, E., Fragosó-Serrano, M., Ortiz-Pastrana, N., Toscano, R. A. and Ortega, A. *Fitoterapia*, **114**, 1-6, (2016).

⁷⁴ Jassbi, A. R., Zare, S., Firuzi, O. and Xiao, J. *Phytochem. Rev.* **15**, 829-867, (2016).

diterpenos con actividades muy prometedoras,⁷⁶ por lo que la evaluación de los diterpenos de las salvias contra las mismas puede ser de mucha importancia para la identificación de nuevas moléculas líder para combatirlas.

⁷⁵ Lopresti, L. A. *Drugs R D*, **17**, 53-64, (2017).

⁷⁶ Marcus Vinicius Oliveira Barros de Alencar, João Marcelo de Castro e Sousa, Hercília Maria Lins Rolim, Maria das Graças Freire de Medeiros, Gilberto Santos Cerqueira, Fernanda Regina de Castro Almeida, Antônia Maria das Graças Lopes Citó, Paulo Michel Pinheiro Ferreira, José Arimatéia Dantas Lopes, Ana Amélia de Carvalho Melo-Cavalcante and Md. Torequl Islam. *Phytother. Res.* **31**, 175-201, (2017).

III.- JUSTIFICACIÓN

III.- JUSTIFICACIÓN

El estudio de las variaciones en el perfil metabólico de una especie vegetal en diferentes condiciones de desarrollo es importante para conocer de una forma más integral las capacidades biosintéticas de la misma y en muchos casos permiten obtener una mayor diversidad de metabolitos secundarios. Asimismo, en ocasiones se aíslan compuestos conocidos previamente y al realizar nuevamente su elucidación estructural se pueden corregir errores en las asignaciones espectroscópicas originales o bien con las nuevas muestras aisladas se puede determinar la configuración absoluta de los mismos por técnicas tales con el Dicroísmo Circular Vibracional (DCV) o difracción de Rayos-X. Esto es particularmente importante cuando se aíslan metabolitos secundarios cuya elucidación estructural se llevó a cabo hace varios años cuando las técnicas espectroscópicas no tenían la versatilidad y sensibilidad que actualmente las caracterizan y la determinación de la configuración absoluta era una tarea a veces difícil y complicada.

Adicionalmente, el estudio de una especie vegetal recolectada en diferentes localidades, permite también la evaluación de la actividad biológica de una mayor variedad de metabolitos secundarios. La búsqueda de actividades biológicas definidas puede guiarse por el uso tradicional que los grupos humanos han descubierto para una determinada especie, pero también es probable encontrar efectos fisiológicos diferentes a los previamente establecidos. Cuando un compuesto es biológicamente activo el conocimiento de su configuración absoluta cobra mayor relevancia.

Por otro lado, el conocimiento más profundo de la composición química de una planta es un dato que ayuda a establecer la correcta posición de una especie en una jerarquía evolutiva, lo que conocemos como quimiotaxonomía, ya que los metabolitos secundarios son finalmente la expresión última de los genes de un vegetal. Este tipo de estudios, aunque son cada vez menos frecuentes, son fundamentales en un género como *Salvia* el cual, al contar con un número de especies elevado, determina que existan problemas muy frecuentes para establecer una taxonomía acorde con el desarrollo evolutivo de las mismas. El único tratamiento integral que abarca a las salvias mexicanas fue publicado en 1939, desde entonces el número de especies ha aumentado y con ellos las dificultades que enfrentan los botánicos para definir una escala evolutiva para estas plantas e incluso delimitar las secciones botánicas en las que se encuentra dividido.

Si bien las especies analizadas en este trabajo, *Salvia ballotiflora* y *S. cinnabarina* han sido estudiadas previamente, las poblaciones examinadas en esta tesis son geográficamente diferentes

y en el caso de *S. cinnabarina*, los estudios previamente publicados se han realizado con material cultivado en un jardín botánico, por lo que en esta tesis se describe por primera vez la composición química de una población silvestre de esta especie, la cual puede ser muy diferente a la publicada. Para el caso de *S. ballotiflora*, el estudio realizado en esta tesis permitió aclarar ciertas discrepancias encontradas en la literatura en específico con un producto natural de particular importancia, por ser el primer icetexano descrito, denominado icetexona (8) y, por otro lado, se establecieron las configuraciones absolutas de varios diterpenos previamente aislados de esta especie.

IV.- OBJETIVOS

IV.- OBJETIVOS

Tomando en cuenta la discusión de los capítulos anteriores, en esta tesis se presenta el estudio químico de las partes aéreas de una población de *Salvia ballotiflora* Benth. colectada en el municipio de Linares del estado de Nuevo León y de una población natural de la *S. cinnabarina* M. et G. colectada en las afueras de Zoquitlán, en el estado de Puebla, ambas especies están clasificadas en el subgénero *Calosphace* (*Jungia*) en las secciones Tomentellae e Incarnatae respectivamente. Los objetivos centrales de este trabajo son:

- 1.- Contribuir al estudio químico sistemático de las especies del género *Salvia* que crecen en México.
- 2.- Llevar a cabo la evaluación de la actividad biológica de los metabolitos secundarios presentes en ellas como inhibidores de la proliferación de líneas celulares de diferentes tipos de cáncer humano, antiinflamatorios y antioxidantes.
- 3.- Documentar la variabilidad del perfil químico de las especies, considerando principalmente su contenido de diterpenos.
4. - Aportar datos de importancia quimiotaxonómica que complementen los estudios de taxonomía clásica y filogenéticos que se llevan a cabo en las especies del género *Salvia* pertenecientes al subgénero *Calosphace*.

Para cumplir con estos objetivos se llevará a cabo el aislamiento y la elucidación estructural de los metabolitos secundarios presentes en estas especies. El aislamiento se llevará a cabo por los métodos rutinarios de laboratorio y la elucidación estructural con las técnicas usuales, fundamentalmente RMN de campo alto (700 MHz). Se determinará la configuración absoluta de los compuestos aislados utilizando DCV o bien difracción de Rayos-X.

Se llevará a cabo la evaluación de la actividad antiproliferativa de los compuestos aislados utilizando las líneas celulares de diferentes tipos de cáncer con los que se cuenta en el Laboratorio de Pruebas Biológicas del Instituto de Química, siguiendo los protocolos establecidos en el mismo. En este mismo laboratorio se llevarán a cabo las evaluaciones como antiinflamatorios y antioxidantes.

V.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS

V.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS

V.1 Los diterpenos de tipo abietano e icetexano de la *Salvia ballotiflora* Benth. Elucidación estructural y evaluación de su actividad biológica

De las partes aéreas de una población de *Salvia ballotiflora* Benth¹ recolectada en el Municipio de Linares en el Estado de Nuevo León se aislaron mediante técnicas cromatográficas, once compuestos de tipo diterpénico (1-11) (Esquema 1), de los cuales ocho presentan un esqueleto de icetexano (1-4 y 6-9) y tres de abietano (5, 10-11). Las estructuras asignadas a estos productos fueron establecidas mediante el empleo de técnicas espectroscópicas, fundamentalmente RMN de alto campo (700 MHz, para ¹H y 175 MHz para ¹³C). De acuerdo con la literatura química, cinco de estos compuestos, cuatro icetexanos (1-4) y un abietano (5), no se encuentran descritos y constituyen nuevas aportaciones al conocimiento de la biodiversidad química de las salvias mexicanas. Los diterpenoides 6-11 son productos naturales previamente descritos y fueron identificados como: anastomosina (6),² 7,20-dihidroanastomosina (7),³ icetexona (8),⁴ 1,2-anhidroballotiquinona (9)⁵, conacytona (10)⁴ y 7 α -acetoxi-19-hidroxiroyleanona (11).⁶ Estos compuestos han sido aislados de diferentes fuentes naturales y en este trabajo se abordarán algunas precisiones sobre la asignación de sus espectros de RMN de ¹H y ¹³C ya que durante el análisis de los mismos se encontraron discrepancias con las asignaciones originales. Otra aportación del presente estudio es la determinación de la configuración absoluta de la anastomosina (6), la 7,20-dihidroanastomosina (7), la icetexona (8) y la conacytona (10) las cuales se establecieron por difracción de Rayos-X mediante los parámetros de Flack y Hooft y por DCV.

¹ Martínez-Gordillo, M., Fragoso-Martínez, I., García-Peña, M. R. y Montiel, O. Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **84**, 30-86 (2013). En las primeras publicaciones sobre esta especie es referida como *Salvia ballotaeflora* Benth, sin embargo, el nombre actualmente aceptado para esta planta es *Salvia ballotiflora* Benth., de tal forma que el nombre anterior, se debe considerar como sinónimo.

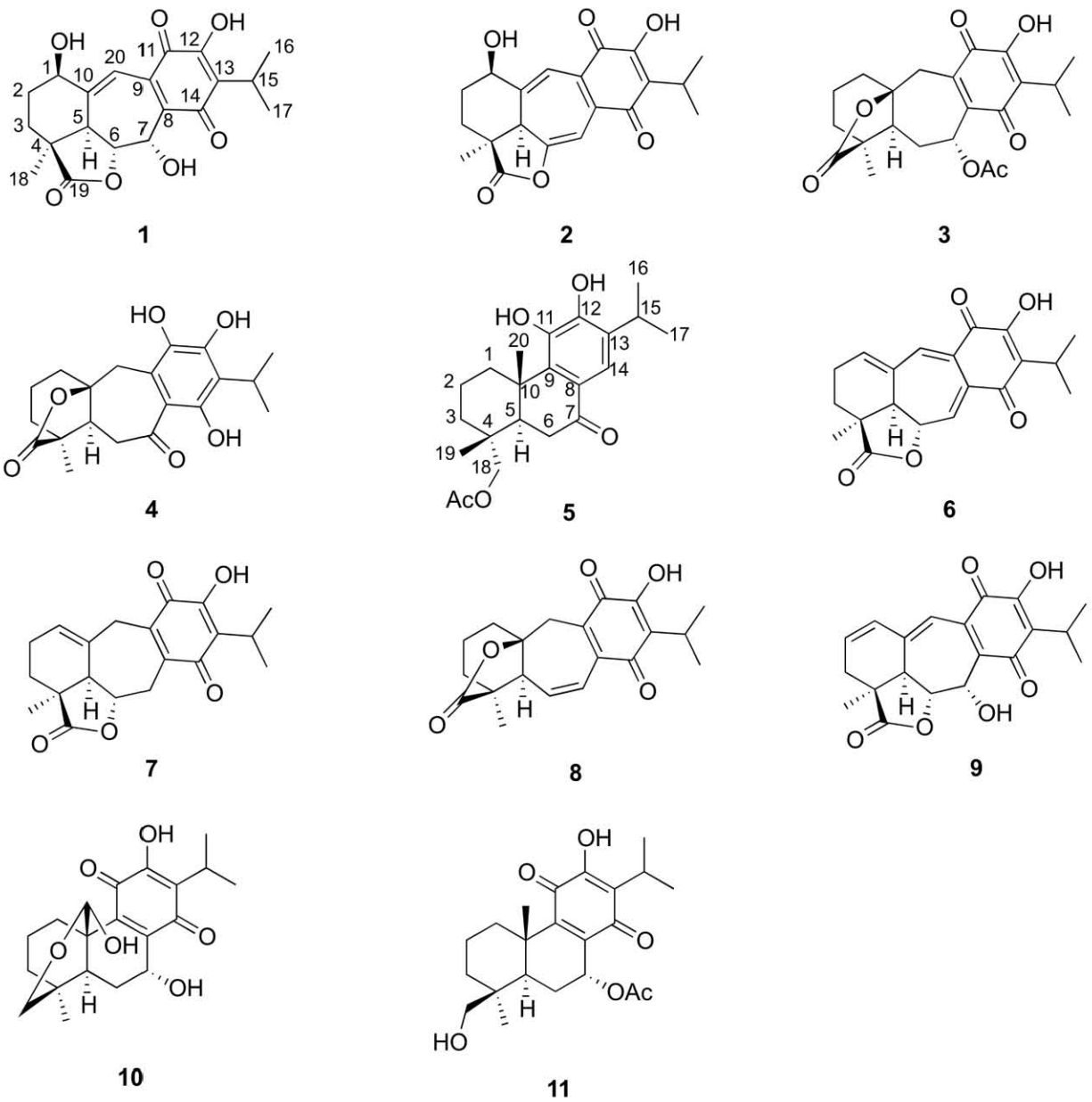
² Sánchez, C., Cárdenas, J. Rodríguez-Hahn, L. and Ramamoorthy, T. P. *Phytochemistry* **28**, 1681-1684 (1989).

³ Esquivel, B., Calderón, J. S., Flores, E., Sánchez, A. A. and Rivera, R. R. *Phytochemistry* **46**, 531-534 (1997).

⁴ Domínguez, X. A., González, F. H., Aragón, R., Gutiérrez, M., Marroquín, J. S. and Watson, W. *Planta Med.* 237-241(1976).

⁵ Cárdenas, J. and Rodríguez-Hahn, L. *Phytochemistry* **38**, 199-204, (1995).

⁶ Hernández, M., Esquivel, B., Cárdenas, J., Rodríguez-Hahn, L. and Ramamoorthy, T. P. *Phytochemistry* **26**, 3297-3299, (1987).



Esquema 1. Componentes diterpénicos de *S. ballotiflora* Benth.

Los icetexanos aislados tienen en común la presencia de una γ -lactona y de acuerdo con el patrón de oxidación establecido para los mismos se pueden agrupar en dos tipos: **a**) los que tienen la γ -lactona entre las posiciones C-19 y C-10 (compuestos **3**, **4** y **8**) y **b**) aquellos en los que este heterociclo se forma entre las posiciones C-19 y C-6 (productos **1**, **2**, **6**, **7** y **9**). Los primeros ejemplos descritos de cada tipo de conectividad son la icetexona (**8**), para los icetexanos tipo **a** y la anastomosina (**6**) para el tipo **b**. La estructura de los diterpenoides no descritos en la literatura (**1-5**) fue establecida con base en el siguiente análisis de sus propiedades espectroscópicas.

V.2 Elucidación de la estructura de la ballotiquinona (**1**)

El compuesto **1**, fue aislado como un aceite amarillo en cuyo espectro en el IR se pueden observar bandas en 3597 y 3412 cm^{-1} que se atribuyen a grupos hidroxilo; en 1778 cm^{-1} que corresponde al carbonilo de una γ -lactona; en 1654 y 1621 cm^{-1} dos bandas que se atribuyen a los carbonilos de una quinona así como en 1583 cm^{-1} a dobles ligaduras. En el espectro en el UV de **1** se pueden observar bandas cuyos máximos se localizan en 213, 243 y 332 nm lo que sugiere la presencia de una *orto*-hidroxi-*p*-benzoquinona en su estructura.^{4,5} En el espectro de RMN de ^1H (Espectro 1, Tabla 1) se observan las señales características de un grupo isopropilo en 3.25 ppm (*hept*, $J = 7.1$ Hz) y 1.26 ppm (6H, *d*, $J = 7.1$ Hz), las cuales se asignan al metino de la posición C-15 y a los átomos de hidrógeno de los metilos de las posiciones C-16/C-17 respectivamente. El desplazamiento químico de los átomos de hidrógeno del grupo isopropilo permiten situarlo en la posición C-13. Este grupo está presente en todos los diterpenos aislados de esta población de *S. ballotiflora*. El espectro de ^{13}C del compuesto **1** (Espectro 2, Tabla 1) confirma la presencia de la *orto*-hidroxi-*p*-benzoquinona y del grupo isopropilo ya que se observan las señales esperadas para estos grupos en 132.2 (C-8), 137.7 (C-9), 184.3 (C-11), 150.3 (C-12), 126.8 (C-13), 187.3 (C-14), 24.7 (C-15), 19.9 (C-16) y 20.0 (C-17) ppm.^{3,5} En el espectro 2 (Tabla 1) se observan, asimismo señales en 179.8 y 22.7 ppm que se asignan al carbonilo de la γ -lactona de la posición C-19 (evidenciada por el espectro en el IR) y al metilo de la posición C-18 respectivamente. El desplazamiento químico del metilo indica que la γ -lactona es similar a la descrita para la anastomosina (**6**) (lactona C-19/C-6, tipo b),² ya que para una funcionalidad tipo icetexona (**8**) (lactona C-19/C-10, tipo a) se esperaría observar la señal de este metilo alrededor de 18 ppm.⁷ En

⁷ Esquivel, B., Burgueño-Tapia, E., Bustos-Brito, C., Pérez-Hernández, N., Quijano, L. and Joseph-Nathan, P. *Chirality* (2017) (en revisión).

el espectro de RMN de ^1H (Espectro 1, Tabla 1) de este producto el átomo de hidrógeno de la posición C-6 se observa en 4.29 ppm como un doble de dobles con constantes de acoplamiento de 10.3 y 2.3 Hz. La constante de mayor magnitud indica una orientación *pseudo-axial* para H-6. En el espectro COSY (Espectro 3) de este compuesto se puede observar que H-6 correlaciona con una señal doble en 3.41 ppm ($J = 10.2$ Hz), el cual se asigna a H-5 y con una señal simple ancha en 5.53 ppm que se atribuye al átomo de hidrógeno geminal de un grupo hidroxilo, el cual debe de estar, por lo tanto, unido a C-7. El desplazamiento químico de H-7 se explica por estar adyacente al sistema de *orto*-hidroxi-*p*-benzoquinona, lo que determina que se observe a una frecuencia más alta que H-6 el cual es geminal a una lactona. Al equilibrar la muestra con D_2O la señal para H-7 se observa como una señal doble cuya constante de acoplamiento ($J = 2.2$ Hz) indica una orientación α *pseudo-axial* para el grupo hidroxilo. Esta estereoquímica se ha observado en otros diterpenos de tipo abietano e icetexano también aislados del género *Salvia* con funciones oxigenadas (hidroxilo y acetato) en C-7.^{6,7}

En el espectro de RMN de ^1H de **1** se pueden observar otras señales relevantes para la elucidación estructural. Una de ella es una señal triple ancha en 4.73 ppm ($J = 7.7$ Hz) que se asignó al átomo de hidrógeno geminal de otra función hidroxilo en la posición C-1 y otra que corresponde a una señal triple centrada en 7.07 ppm ($J = 2.5$ Hz). El desplazamiento químico de la primera señal es consistente con una disposición alílica para este grupo hidroxilo, mientras que para la segunda señal se propone que corresponda a un átomo de hidrógeno vinílico adyacente a la *orto*-hidroxi-*p*-benzoquinona y se asignó al átomo de hidrógeno de la posición C-20. La ubicación del hidroxilo en la posición C-1 se confirma al realizar experimentos de doble resonancia, ya que al saturar la señal en 4.73 ppm (H-1) las señales del metileno de la posición C-2 observadas como señales múltiples en 1.70 y 2.49 ppm se simplifican. El espectro de ^{13}C de **1** (Tabla 1) confirma las asignaciones previas ya que las señales para C-1 y C-7 se observan en 68.2 y 65.0 ppm respectivamente, mientras que las correspondientes a la doble ligadura entre las posiciones C-10/C-20 se observan en 153.1 (C) y 112.3 (CH) ppm.

Tabla 1. Datos de RMN de ^1H , ^{13}C y correlaciones HMBC de **1**.

Posición	δ_c	Tipo*	δ_H (J en Hz)	HMBC
1	68.2	CH	4.73, <i>ta</i> (7.7)	3, 5, 10, 20
2 α	29.0	CH ₂	2.49, <i>ddt</i> (13.3, 10.5, 8.4)	3, 4, 10
2 β			1.69, <i>dtd</i> (13.4, 8.2, 2.4)	
3	26.8	CH ₂	1.81, <i>m</i>	1, 2, 4, 5, 18
4	44.4	C		
5	44.1	CH	3.41, <i>d</i> (10.2)	3, 4, 6, 7, 10, 18, 20
6	79.9	CH	4.29, <i>dd</i> (10.3, 2.3)	5, 7, 10
7	65.0	CH	5.53, <i>sa</i>	6, 8, 9
8	132.2	C		
9	137.7	C		
10	153.1	C		
11	184.3	C		
12	150.3	C		
13	126.8	C		
14	187.3	C		
15	24.7	CH	3.25, <i>hept</i> (7.1)	12, 13, 14, 16, 17
16, 17	19.9, 20.0	2CH ₃	1.26, <i>d</i> (7.1)	13, 15
18	22.7	CH ₃	1.47, <i>s</i>	3, 4, 5, 19
19	179.8	C		
20	112.3	CH	7.07, <i>t</i> (2.5)	1, 5, 6, 9, 11
1-OH			1.97, <i>sa</i>	
7-OH			3.11, <i>d</i> (4.33)	
12-OH			7.14, <i>sa</i>	12, 13, 11

^1H 700 MHz, ^{13}C 175 MHz, CDCl₃. *Obtenido del espectro HSQC.

El espectro de HMBC de este compuesto (Espectro 4, Tabla 1, Figura 1) confirma las asignaciones previamente discutidas, ya que para H-1 se observan correlaciones con C-10, C-20 y C-5. Por otro lado, H-20 correlaciona con C-1, C-5, C-6, C-9 y C-11. En este mismo espectro se observa que H-6 correlaciona con C-5, C-7 y C-10, mientras que H-7 muestra contornos de correlación con C-6,

C-8 y C-9. En la Tabla 1 y en la Figura 1 se ilustran estas correlaciones y algunas más que son consistentes con la conectividad propuesta para este nuevo diterpeno aislado de *S. ballotiflora*.

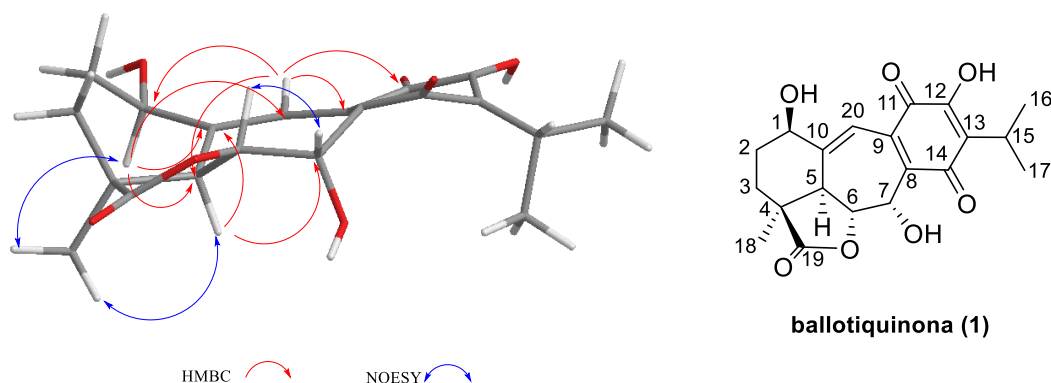


Figura 1. Correlaciones HMBC y NOESY para el compuesto **1**.

La configuración relativa de **1**, fue establecida con base en los valores de las constantes de acoplamiento ya discutidas y con ayuda del espectro NOESY (Espectro 5, Figura 1). La magnitud de la constante de acoplamiento observada para H-1 ($J = 7.7$ Hz) indica una orientación *axial* para este átomo de hidrógeno y por lo tanto una orientación β para el grupo hidroxilo. En el espectro 5 se puede observar que H-5 muestra efecto nuclear de Overhauser con los átomos de hidrógeno del metilo unido a C-4, que a su vez correlacionan con H-1. Estos hechos indican que tanto H-5, el Me-18 y H-1 deben tener la misma orientación. Por otro lado, H-6 muestra correlación en el espectro NOESY con H-7 y ya que H-5 y H-6 tienen una disposición *anti-periplanar*, lo cual se deduce de su constante de acoplamiento ($J = 10.2$ Hz), se puede concluir que si asignamos una orientación α -*axial* para H-5, con base en consideraciones biogénicas, la configuración relativa de este compuesto es la mostrada en la estructura **1**. Este nuevo icetexano está relacionado con la anastomosina (**6**) y se propone el nombre de ballotiquinona (**1**) para esta nueva sustancia.

V.3 La estructura de la 6,7-anhidroballotiquinona (**2**), un nuevo icetexano con un anillo de cicloheptatrieno

Del análisis del espectro de masas del compuesto **2** se puede deducir una fórmula molecular $C_{20}H_{20}O_6$ lo que indica un alto grado de insaturación ($\Omega = 11$). Los espectros de RMN de 1H (Espectro 6, Tabla 2) y de ^{13}C (Espectro 7, Tabla 2) de este producto permiten establecer la estructura **2** para el mismo, la cual está relacionada con la ballotiquinona (**1**). La eliminación del hidroxilo de la posición C-7 del compuesto **1** a través de la pérdida de una molécula de agua puede

dar origen al producto **2**, el cual se debe denominar como 6,7-anhidroballotiquinona (**2**). De manera similar a **1**, en el espectro de RMN de ^{13}C de **2** (Tabla 2) se observan las señales para una *orto*-hidroxi-*p*-benzoquinona y un grupo isopropilo en 140.0 (C-8), 149.9 (C-9), 182.8 (C-11), 151.2 (C-12), 126.5 (C-13), 185.3 (C-14), 24.8 (C-15), 20.0 y 20.1 (C-16 y C-17). En este mismo espectro se pueden observar una señal en 179.3 ppm y otra en 27.5 ppm que se asignan al carbonilo de una γ -lactona y al metilo C-18. El desplazamiento químico de estas señales indica que el tipo de lactonización en el compuesto **2**, es similar al de la ballotiquinona (**1**), sin embargo, el átomo de hidrógeno geminal a esta funcionalidad no se observa en el espectro de RMN de ^1H de **2**. Este hecho sumado a que en el espectro de RMN de ^{13}C de **2** se observan dos señales para carbonos sp^2 en 130.2 y 100.5 ppm permite establecer la presencia de una doble ligadura adicional entre los carbonos C-6 y C-7. En el espectro de RMN de ^1H se observa una señal doble con $J = 1.1$ Hz, en 6.77 ppm la cual se asigna a H-7 ya que en el espectro de HSQC (Espectro 8) se observa que correlaciona con la señal de 100.5 ppm (C-7) y en el espectro de HMBC con la señal en 130.2 ppm (C-6) (Tabla 2). En consistencia con estas consideraciones, en el espectro de IR del compuesto **2**, la banda para el carbonilo de la γ -lactona se observa en 1811 cm^{-1} , es decir desplazada 33 cm^{-1} a mayor número de onda con respecto a la observada en la ballotiquinona (**1**), ya que se trata de una enol- γ -lactona.⁸ Otras señales relevantes para la asignación de la estructura de la 6,7-anhidroballotiquinona (**2**) observadas en su espectro de RMN de ^1H son una señal simple ancha en 2.85 ppm y una señal doble en 6.91 ppm ($J = 1.82$ Hz), las cuales se asignan a H-5 y H-20. En el espectro COSY de **2** (Espectro 9) se puede observar que la señal para H-5 correlaciona con H-20 y con H-7. Estos hechos permiten concluir que el anillo B de la 6,7-anhidroballotiquinona (**2**) es un cicloheptatrieno en el cual una de las dobles ligaduras forma parte también de la *orto*-hidroxi-*p*-benzoquinona, lo que es consistente con los máximos observados en el espectro de UV de **2** en 213, 243 y 332 nm y con el alto grado de insaturación que se deduce del espectro de masas.

⁸ Jones, R. N., Angell, C. L., Ito, T. and Smith, R. J. D. *Can. J. Chem.* **37**, 2007-2022, (1959).

Tabla 2. Datos de RMN de ^1H , ^{13}C y correlaciones HMBC de **2**.

Posición	δ_c	Tipo*	δ_H (J en Hz)	HMBC
1	66.6	CH	4.57, <i>t</i> (2.9)	3,5, 20
2 β	28.1	CH ₂	2.01, <i>dc</i> (14.7, 3.5)	1, 4, 10
2 α			1.41, <i>dddd</i> (14.7, 11.9, 5.6, 2.8)	3
3 α	25.5	CH ₂	2.18, <i>m</i>	1, 2, 4, 19
3 β			2.16, <i>m</i>	1, 2, 4, 19
4	42.7	C		
5	44.8	CH	2.85, <i>sa</i>	1, 4, 10, 9, 18, 19, 20
6	130.2	C		
7	100.5	CH	6.77, <i>d</i> (1.1)	5, 6, 9, 14
8	140.0	C		
9	149.9	C		
10	138.0	C		
11	182.8	C		
12	151.2	C		
13	126.5	C		
14	185.3	C		
15	24.8	CH	3.28, <i>hept</i> (7.1)	12, 13, 14, 16, 17,
16, 17	20.0, 20.1	2CH ₃	1.27, 1.26, <i>d</i> (7.1)	13, 15
18	27.5	CH ₃	1.44, <i>s</i>	3, 4, 5, 19
19	179.3	C		
20	122.8	CH	6.91, <i>d</i> (1.82)	1, 5, 8, 11, 9

^1H 700 MHz, ^{13}C 175 MHz, CDCl₃. *Obtenido del espectro HSQC.

Continuando con el análisis del espectro de RMN de ^1H (Tabla 2) del producto **2**, se observan en 1.44 ppm una señal simple que integra para tres átomos de hidrógeno, que se asigna al metilo C-18 y en 4.57 ppm una señal triple ($J = 2.9$) que integra para un átomo de hidrógeno. El

desplazamiento químico de esta última indica que corresponde a un átomo de hidrógeno geminal a un hidroxilo en posición alílica, similar al que presenta la ballotiquinona (**1**), por lo que se asigna a la posición C-1. El valor de la constante de acoplamiento medido para esta señal indica que H-1 debe de estar formando un ángulo diedro de aproximadamente 60° con los átomos de hidrógeno del metileno vecino. El estudio de un modelo Dreiding⁹ y de los conformeros más estables para **2** obtenidos mediante Mecánica Molecular (MM2)¹⁰ permiten concluir que el anillo A puede adoptar dos conformaciones de media silla (half chair) debido a la presencia del sistema de cicloheptatrieno del anillo B, ya que introduce una mayor rigidez a la molécula. En uno de los conformeros (Figura 2), H-1 adopta una orientación α -ecuatorial, formando ángulos de 60° con cada uno de los átomos de hidrógeno de C-2, por lo que es razonable asumir que esta es la conformación más estable ya que explica la constante de acoplamiento observada para H-1 en su espectro de RMN de ^1H . El hidroxilo unido a C-1 tiene, por lo tanto, una orientación β -axial. La estequímica relativa del resto de la molécula fue establecida con base en las correlaciones observadas en el espectro NOESY del producto **2** (Figura 2). En este espectro se puede observar que H-5 muestra correlación con el metilo unido a C-4 indicando con ello que están del mismo lado de la molécula. Para el átomo de hidrógeno H-1 se pueden observar correlaciones con H-20 y con los átomos de hidrógeno de C-2, los cuales se observan en 2.01 y 1.41 ppm, este hecho es consistente con la orientación α -ecuatorial asignada a H-1.

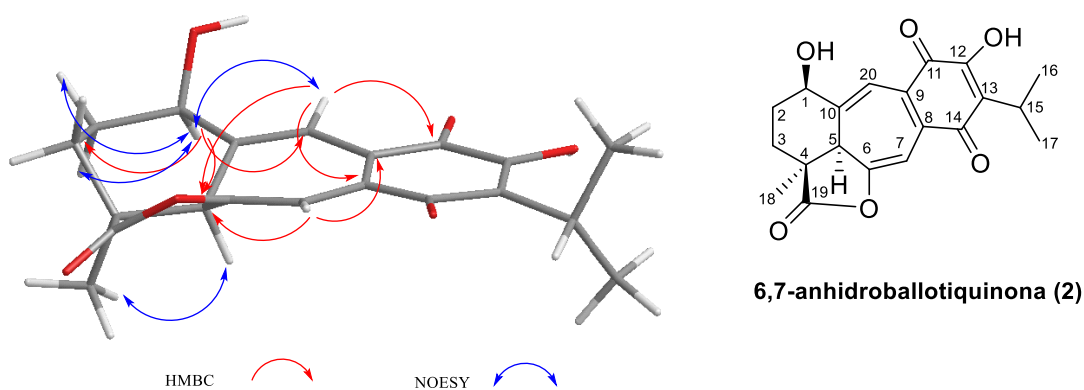


Figura 2. Correlaciones HMBC y NOESY para el compuesto **2**.

Asumiendo una orientación α -axial para H-5, la configuración relativa para este compuesto es la mostrada en la estructura **2**. Los icetexanos **1** y **2** no se encuentran descritos en la literatura y están

⁹ Dreiding Stereomodels Büchi (Flawil, Switzerland)

¹⁰ MM2, Molecul Mechanics 2 paquete de química computacional incorporado en el Chem 3D, versión 15.0

relacionados con la anastomosina (6), la 7,20-dihidroanastomosina (7) y con el compuesto 9, con los cuales coexisten en esta población de *S. ballotiflora*. El compuesto 9, el cual fue descrito como constituyente de *Salvia candicans* puede considerarse también como derivado de la ballotiquinona (1) mediante la eliminación de una molécula de agua entre las posiciones C-1 y C-2 y por lo tanto lo podemos designar como 1,2-anhidroballotiquinona (9), ya que en el trabajo original no le fue asignado nombre alguno.⁵

V.4 La estructura y configuración absoluta de la 7 α -acetoxi-6,7-dihidroicetexona (3).

El siguiente compuesto novedoso obtenido de las partes aéreas de *S. ballotiflora* fue aislado como un polvo amarillo y le fue asignada la estructura 3. El espectro de masas de alta resolución obtenido mediante la técnica de Análisis Directo en Tiempo Real (DART por sus siglas en inglés), permite obtener una fórmula molecular C₂₂H₂₆O₇ para este producto natural. En el espectro de IR se pueden observar bandas en 3414, 1771, 1744 y 1646 cm⁻¹ las cuales se asignan a grupos hidroxilo, carbonilo de γ -lactona, carbonilo de éster y carbonilos de quinona respectivamente. En el espectro de ¹³C de esta sustancia (Espectro 10, Tabla 3) se pueden observar 22 señales, las cuales se clasifican con base en el espectro HSQC (Tabla 3) en 4 metilos, 5 metilenos, 3 metinos y 10 carbonos cuaternarios. En estos últimos, se pueden diferenciar 2 carbonos cuaternarios de tipo *sp*³, 4 carbonilos y 4 carbonos olefínicos. Además, de las señales características para una isopropil-*orto*-hidroxi-*p*-benzoquinona, en el espectro 10 se observan las señales típicas de un grupo acetoxi en 169.6 y 20.7 ppm (Tabla 3). Otras señales relevantes para la elucidación estructural de este compuesto son observadas en su espectro de RMN de ¹³C en 179.6 (C), 81.8 (C), 17.2 (CH₃) y 30.2 (CH₂) ppm. La señal a la frecuencia más alta fue asignada al carbonilo de la γ -lactona evidenciada por el espectro de IR. Aunque el desplazamiento químico de esta señal es similar al observado en los icetexanos 1 y 2, la presencia de las señales en 81.8 ppm y en particular la del metilo en 17.2 ppm indican un sistema de γ -lactona relacionada a la icetexona (8), por lo tanto, la señal simple de 81.8 se asigna a C-10 y el cuarteto en 17.2 ppm a C-18. La señal triple observada en 30.2 ppm se asigna al metileno de C-20, el cual es característico de un 9(10 \rightarrow 20)-*abeo* abietano relacionado con la icetexona (8).³ El espectro de RMN de ¹H del producto 3 (Espectro 11, Tabla 3) confirma las conclusiones anteriores, ya que en él se observa un sistema AB en 3.43 y 3.01 ppm (*J* = 15.7 Hz) que se asigna a los átomos de hidrógeno de la posición C-20, así como una señal simple que integra para tres átomos de hidrógeno en 1.11 ppm que corresponde a los átomos de

hidrógeno del metilo C-18. También se observa la señal típica del metilo de un grupo acetoxi en 2.09 ppm. El átomo de hidrógeno geminal a este grupo se localiza en 6.21 ppm como una señal doble con $J = 7.1$ Hz. El desplazamiento químico de esta señal indica que el acetato se encuentra adyacente a la *orto*-hidroxi-*p*-benzoquinona y permite asignarlo a la posición C-7.

El análisis detallado del espectro COSY (Espectro 12) del compuesto **3** fue fundamental para la elucidación de su estructura. En este espectro se puede observar que el átomo de hidrógeno geminal al grupo acetoxi (*d*, $J = 7.1$ Hz, H-7) está acoplado con un átomo de hidrógeno, que se observa en 2.27 ppm (*ddd*, $J = 14.8, 7.1$ y 5.5 Hz) el cual forma parte de un metileno, ya que a su vez está acoplado con su átomo de hidrógeno geminal el cual se observa en 1.43 ppm (*dda*, $J = 14.8$ y 12.1 Hz). Por otro lado, los átomos de hidrógeno del metileno muestran correlación en el espectro COSY con una señal doble de dobles que integra para un hidrógeno, localizada en 2.37 ppm ($J = 12.1$ y 5.5 Hz). El análisis de las constantes de acoplamiento permite concluir que la constante de 14.8 Hz entre las señales en 2.27 y 1.43 ppm corresponde al acoplamiento geminal entre los átomos de hidrógeno del metileno vecinal a H-7 y que se asignan por lo tanto a la posición C-6. La constante de acoplamiento de 12.1 Hz medida para el átomo de hidrógeno en 1.43 ppm indica que tiene una orientación β -axial (H-6 β -pseudoaxial), por lo que la señal observada en 2.27 ppm debe de corresponder a H-6 α -pseudoecuatorial, lo cual es consistente con la constante de acoplamiento de 5.5 Hz observada para este átomo de hidrógeno. Dado que estas constantes de acoplamiento (12.1 y 5.5 Hz) son compartidas con la señal en 2.37 ppm se concluye que esta última corresponde a H-5 el cual debe tener una orientación α -axial. De lo anterior se deduce que H-7, geminal al grupo acetoxi, está acoplado solamente con H-6 α (2.27 ppm) por lo que debe estar formando un ángulo diedro de 90° con H-6 β , lo que permite inferir que el grupo acetoxi tiene una orientación

Tabla 3. Datos de RMN de ^1H , ^{13}C y correlaciones HMBC de **3**.

Posición	δ_c	Tipo*	δ_H (J en Hz)	HMBC
1a	37.4	CH ₂	1.98, <i>dd</i> (12.6, 4.9)	3, 5, 10, 20
1b			1.77, <i>d</i> (12.0, 5.4)	3, 5
2a	20.0	CH ₂	1.84, <i>m</i>	3, 4, 10
2b			1.65, <i>m</i>	3, 4
3a	35.5	CH ₂	1.73, <i>m</i>	1, 5
3b			1.66, <i>dd</i> (12.9, 6.1)	5
4	49.6	C		
5	51.0	CH	2.37, <i>dd</i> (12.0, 5.4)	3, 4, 6, 19
6a	27.2	CH ₂	2.27, <i>ddd</i> (15.0, 7.2, 5.5)	5, 7, 8 10
6b			1.43, <i>dda</i> (14.6, 12.2)	5, 10, 8,
7	65.9	CH ₂	6.21, <i>d</i> (7.0)	1', 5, 6, 8, 9, 14
8	144.4	C		
9	135.4	C		
10	81.8	C		
11	183.5	C		
12	150.4	C		
13	125.6	C		
14	184.3	C		
15	24.7	CH	3.21, <i>hept</i> (7.0)	12, 13, 14, 16, 17
16, 17	19.9, 19.8	2CH ₃	1.24, 1.27, <i>d</i> (7.0)	13, 15
18	17.2	CH ₃	1.11, <i>s</i>	3, 4, 19
19	179.6	C		
20a	30.2	CH ₂	3.43, <i>d</i> (15.7)	1, 5, 8, 9, 10, 11
20b			3.01, <i>d</i> (15.7)	5, 8, 9, 10, 11
1'	169.6	C		
2'	20.7	CH ₃	2.09, <i>s</i>	1'
12-OH			7.01, <i>sa</i>	12, 13, 11

^1H 700 MHz, ^{13}C 175 MHz, CDCl₃. *Obtenido del espectro HSQC.

α -pseudoaxial (Figura 3). La inspección de un modelo Dreiding⁹ y el análisis de predicción de los conformeros más estables de **3** utilizando MM2,¹⁰ confirma la relación espacial de H-7 β con H-6 β

los cuales efectivamente forman un ángulo diedro de 90° en la conformación más estable (Figura 3).

El espectro de HMBC de **3** (Espectro 13, Tabla 3, Figura 3) confirma y sustenta las asignaciones previas, ya que se observan contornos de correlación entre H-7 y la señal asignada al carbonilo del grupo acetoxi, así como con C-5, C-6, C-8, C-9 y C-14. Por otro lado, H-5 correlaciona con C-3, C-4, C-6 y C-19. En el espectro 13, se observa que mientras que los dos átomos de hidrógeno de la posición C-6 correlacionan con C-10 y C-5, los del metileno de la posición C-20 lo hacen con C-5, C-8, C-9, C-10 y C-11.

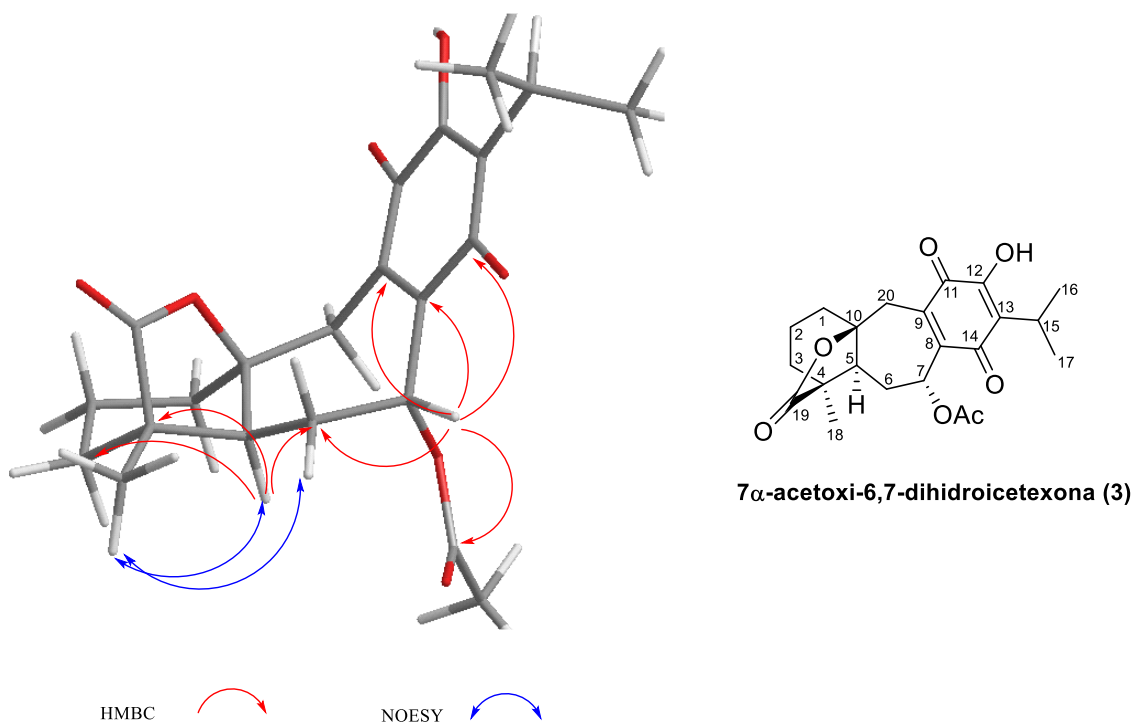


Figura 3. Correlaciones HMBC y NOESY para el compuesto **3**

La configuración relativa de **3** se estableció con ayuda de las constantes de acoplamiento ya discutidas y con ayuda del espectro NOESY (Figura 3), sin embargo, se pudo establecer la configuración absoluta de este diterpeno por DCV en combinación con cálculos teóricos.^{11,12} Este método para la asignación de la configuración absoluta involucra la comparación de los espectros de DCV e IR experimentales con los calculados teóricamente utilizando la teoría del funcional de

¹¹ Joseph-Nathan P. and Gordillo-Román B. In: Kinghorn, A. D., Falk, H. and Kobayashi J. editors, *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Switzerland: Springer International Publishing, **100**, 311-451, (2015).

¹² Tapia, E. and Joseph-Nathan P. *Nat Prod Commun.* **10**,1785-1795, (2015) y **12**, 641-651, (2017).

la densidad (DFT por sus siglas en inglés). Los detalles del procedimiento de cálculo para obtener los espectros teóricos se incluyen en la parte experimental de esta tesis. La Figura 4 muestra los espectros teóricos y calculados para el compuesto **3**, los cuales permiten determinar su configuración absoluta. Los parámetros de comparación, determinados usando el programa *CompareVOA*¹³ se muestran en la Tabla 4, en la cual se puede observar que la determinación de configuración absoluta se llevó a cabo con un nivel de confianza del 100%.

De acuerdo con la discusión previa, el compuesto **3** es un nuevo derivado de la icetexona (**8**) el cual se denominó *7 α -acetoxi-6,7-dihidroicetexona* (**3**). La estructura **3** representa la configuración absoluta de este nuevo diterpeno aislado de *S. ballotiflora* Benth. Las configuraciones absolutas de los centros de quiralidad de **3** son: *4S*, *5S*, *7R* y *10S*.

¹³ Debie, E., De Gussem, E., Dukor, R. K., Herrebout, W., Nafie, L.A. and Bultinck, P. *ChemPhysChem, Special Issue: Jacobus van't Hoff*, **12**, 1542-1549, (2011).

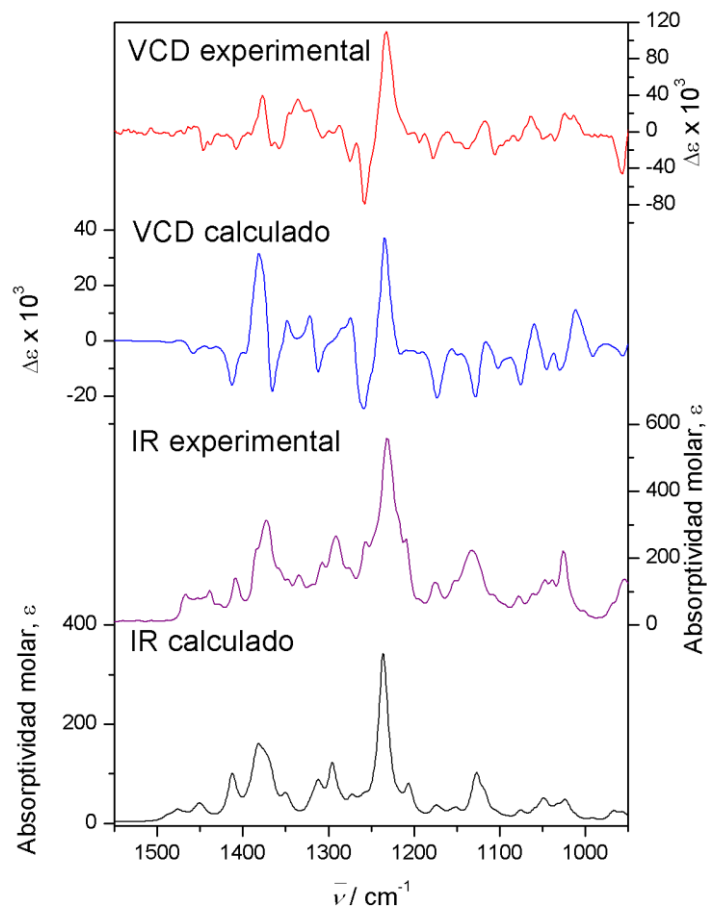


Figura 4.- Espectros de IR y DCV experimentales y calculados para la 7 α -acetoxi-6,7-dihidroicetexona (**3**).

Tabla 4. Datos de Nivel de Confianza para los Espectros IR y DCV del compuesto **3**.

Método	anH^a	S_{IR}^b	S_E^c	S_{-E}^d	ESI^e	C^f (%)
B3PW91/DGDZVP	0.973	95.6	79.7	13.1	66.6	100

^a Factor de anarmonización o escalamiento. ^b Índice de similitud del espectro de IR. ^c Índice de similitud del espectro de DCV del enantiómero correcto. ^d Índice de similitud del espectro de DCV del enantiómero incorrecto. ^e Índice de similitud enantiomérica calculado como $S_E - S_{-E}$. ^f Nivel de confianza de las asignaciones estereoquímicas.

V.5 Aislamiento como producto natural de la 6,7,11,14-tetrahidro-7-oxo-icetexona (4).

El compuesto **4** fue aislado como un polvo amarillo para el cual se estableció una fórmula molecular $C_{20}H_{24}O_6$ con base en su espectro de masas de alta resolución. El espectro de RMN de ^{13}C de **4** (Espectro 14, Tabla 5) permitió establecer que en este diterpeno el anillo C no está oxidado a una *orto*-hidroxi-*p*-benzoquinona, ya que no se observan las señales para los carbonilos (C-11 y C-14)¹⁴ esperados para este agrupamiento entre 183.0 y 186.0 ppm, pero se observan las señales para 6 carbonos sp^2 no enlazados a átomos de hidrógeno (HSQC) en 113.1, 120.0, 134.9, 150.3, 119.9 y 159.2 ppm lo que indica que este anillo es de tipo bencénico y está totalmente sustituido, siendo uno de los sustituyentes un grupo isopropilo (Tabla 5). En el espectro de IR de este diterpeno se observan bandas en 3602, 3564 y 3514 cm^{-1} , lo que indica que los demás sustituyentes del sistema aromático son grupos hidroxilo, los cuales se asignan a las posiciones C-11, C-12 y C-14. En el espectro 14 se puede observar una señal en 204.7 ppm que se asigna al carbonilo de una cetona conjugada. Además de éste, se observan las señales para un carbonilo de γ -lactona en 179.1, de un metilo en 17.4 y de un carbono sp^3 unido a oxígeno características de un icetexano derivado de la icetexona (**8**) y que se asignan en consecuencia a C-19, C-18 y C-10, respectivamente. En congruencia con estas conclusiones se observan en el espectro de IR dos bandas en 1771 y 1612 cm^{-1} que se atribuyen a los carbonilos de la γ -lactona y de la cetona conjugada deducidos del espectro de ^{13}C . Con base en estos hechos se concluye que la señal en 204.7 ppm corresponde a C-7, de tal forma que este carbonilo se encuentra conjugado al anillo bencénico, como se muestra en la estructura **4**.

El espectro de RMN de 1H del diterpeno **4** (Espectro 15, Tabla 5), sustenta la estructura propuesta ya que se observa una señal simple en 13.0 ppm que corresponde al átomo de hidrógeno de un grupo hidroxilo que se asigna en la posición C-14. El desplazamiento químico de este hidrógeno indica que está formando un enlace de hidrógeno y este fenómeno se explica por la proximidad espacial con el carbonilo de la posición C-7 como se puede apreciar en la figura 5. En este mismo espectro se observan las señales para un sistema AB en 3.59 y 2.95 ppm ($J = 13.9$ Hz) que se asignaron a los átomos de hidrógeno del metileno de la posición C-20 y que son características de diterpenos de tipo icetexano.³ Asimismo, se pueden observar las señales para un sistema ABX en 2.84 (*dd*, $J = 17.4$ y 12.0 Hz), 2.80 (*dd*, $J = 17.4$ y 2.0 Hz) y 2.00 (*dd*, $J = 12.0$ y 2.0 Hz).

¹⁴ Estos valores son el promedio observado para C-11 y C-14 en los diterpenos **1-3**.

Tabla 5. Datos de RMN de ^1H , ^{13}C y correlaciones HMBC de **4**.

Posición	δ_c	Tipo*	δ_H (J en Hz)	HMBC
1 β	35.9	CH ₂	2.07, <i>dd</i> (13.4, 5.6)	1, 2, 4, 5, 18
1 α			1.71, <i>ddd</i> (13.4, 10.8, 7.6)	1, 2, 4, 5, 19
2	19.5	CH ₂	1.82, <i>m</i>	1, 3, 4
3 β	32.7	CH ₂	1.76, <i>m</i>	2, 3, 5, 20
3 α			1.53, <i>ddd</i> (12.8, 12.6, 7.6)	2, 5
4	47.7	C		
5	50.9	CH	2.00, <i>dd</i> (12.0, 2.0)	1, 3, 4, 6, 7, 19
6 β	40.6	CH ₂	2.84, <i>dd</i> (17.4, 12.0)	4, 5, 7, 10
6 α			2.80, <i>dd</i> (17.4, 2.0)	4, 5, 7, 8, 10
7	204.8	C		
8	113.1	C		
9	120.0	C		
10	85.2	C		
11	134.9	C		
12	150.3	C		
13	119.9	C		
14	159.2	C		
15	24.8	CH	3.46, <i>hept</i> (7.0)	12, 13, 14, 16, 17
16, 17	20.47, 20.51	CH ₃	1.37, 1.36, <i>d</i> (7.0)	13, 15
18	17.1	CH ₃	1.18, <i>s</i>	3, 4, 5, 19
19	179.1	CH ₃		
20 α	33.6	CH ₂	3.59, <i>d</i> (13.9)	1, 5, 8, 9, 10, 11
20 β			2.95, <i>d</i> (13.9)	1, 8, 9, 10, 11
11-OH			6.13, <i>s</i>	9, 11, 12, 13
12-OH			4.86, <i>s</i>	9, 11, 12, 13
14-OH			13.00, <i>s</i>	8, 12, 9, 13, 14, 7

^1H 700 MHz, ^{13}C 175 MHz, CDCl₃. *Obtenido del espectro HSQC.

La magnitud de la constante de acoplamiento geminal de las señales en 2.84 y 2.80 ppm (17.4 Hz) indica que este metileno se encuentra vecino al carbonilo de la posición C-7 y se asigna por lo tanto a los átomos de hidrógeno unidos a C-6. La señal en 2.00 ppm se asigna, en consecuencia, al átomo de hidrógeno de la posición C-5, el cual debe de tener una orientación α -axial con base en los valores de sus constantes de acoplamiento. El espectro de HMBC de este diterpeno (Espectro 16, Tabla 5, Figura 5) es consistente con la estructura propuesta ya que muestra las correlaciones esperadas las cuales se muestran en la Tabla 5 y en la Figura 5. La estereoquímica relativa se estableció con base en las constantes de acoplamiento de H-5 y las correlaciones observadas en el espectro NOESY (Espectro 17, Figura 5). Este diterpeno está relacionado con la icetexona (**8**) y se le denomina 6,7,11,14-tetrahidro-7-oxo-icetexona (**4**) y es la primera ocasión que se obtiene como producto natural. En un estudio de las partes aéreas de *Salvia candicans* se describen los derivados diacetilado (en C-11 y C-12) y triacetilados de este diterpeno.⁵

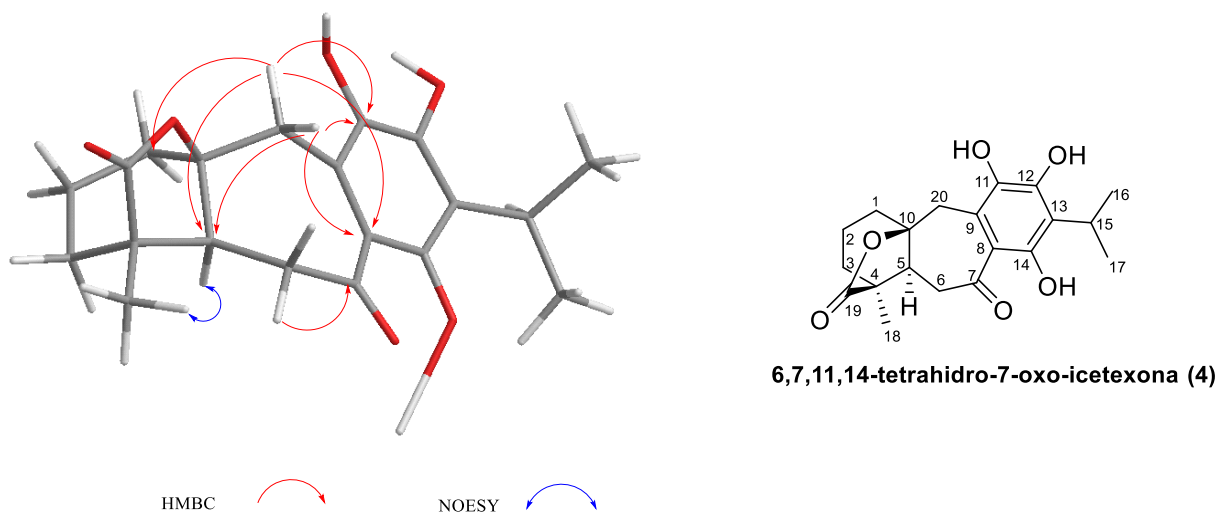


Figura 5. Correlaciones HMBC y NOESY para el compuesto **4**.

V.6 Determinación de la estructura del 18-acetoxi-11-hidroxisugiol (**5**), un nuevo abietano aromático.

El último diterpeno no descrito en la literatura, aislado de esta población de *S. ballotiflora* es un polvo amarillo para el cual se asignó la estructura **5** con base en las siguientes consideraciones. En el espectro de IR se observan bandas en 3599 y 3534 cm^{-1} que se asignan a grupos hidroxilo y en 1730 y 1672 cm^{-1} para un carbonilo de éster y de cetona conjugada, respectivamente. El espectro de masas de este producto natural establece una fórmula molecular $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_5$. Los datos obtenidos del espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 18, Tabla 6) de este producto confirma la presencia de 22 átomos de carbono, los cuales se clasifican con base en el espectro HSQC (Tabla 6) en 5 grupos metilo, 5 metilenos, 3 metinos (2 sp^3 y 1 sp^2) y 9 carbonos no enlazados a hidrógeno (2 sp^3 , 2 carbonilos y 5 carbonos sp^2). El desplazamiento químico de los carbonos sp^2 en 125.4, 138.3, 141.3, 146.2, 131.8 y 118.1 ppm indican que **5**, al igual que la 6,7,11,14-tetrahidro-7-oxo-icetexona (**4**), tiene el anillo C aromático. El metino sp^2 que se observa en el espectro de RMN de ^{13}C de **5** tiene un desplazamiento químico de 118.1 ppm y en el espectro HSQC (Espectro 19, Tabla 6), se observa que correlaciona con una señal simple en 7.64 ppm presente en el espectro de RMN de ^1H (Espectro 20, Tabla 6), de lo cual se concluye que el anillo aromático presente en **5** es penta-sustituido, siendo uno de los sustituyentes un grupo isopropilo (Tabla 6) en la posición C-13 y los dos restantes, muy probablemente, grupos hidroxilo en las posiciones C-11 y C-12 como en el caso del diterpeno **4**. Con base en lo anterior se concluye que la señal observada en el espectro 20 en 7.64 ppm corresponde al átomo de hidrógeno aromático de la posición C-14.

Adicionalmente, en el espectro de RMN de ^{13}C de **5** se observan en 198.2 y 171.3 ppm dos señales que se asignan a los carbonilos de cetona conjugada y de éster, respectivamente cuyas bandas se observan en el espectro de IR (*vide supra*). Los desplazamientos químicos observados para los átomos de carbono del anillo aromático y del carbonilo de cetona conjugada son similares a los descritos para el 11-hidroxisugiol (desmetilcriptojaponol) un diterpeno de tipo abietano aislado originalmente de *Salvia phlomoides* Asso¹⁵ y posteriormente de otras fuentes vegetales.¹⁶ Este hecho permite asignar el carbonilo a la posición C-7. El desplazamiento químico del átomo de hidrógeno aromático observado en 7.64 ppm en el espectro de RMN de ^1H de **5** (Tabla 6) es

¹⁵Hueso, J. A., Jimeno, M. L., Rodríguez, B., Savona, G. and Bruno, M. *Phytochemistry* **22**, 2005-2009, (1983).

¹⁶ Horvath, T., Linden, A., Yoshizaki, F., Eugster, C. H. and Rüedi, P. *Helv. Chim. Acta.* **87**, 2346-2353, (2004).

consistente con esta asignación, ya que se encuentra cercano en el espacio, en la zona de desprotección del carbonilo en C-7. La inspección del modelo Dreiding⁹ de **5**, permite confirmar esta proximidad.

Tabla 6. Datos de RMN de ¹H, ¹³C y correlaciones HMBC de **5**.

Posición	δ_c	Tipo*	δ_H (J en Hz)	HMBC
1a	36.2	CH ₂	3.17, <i>dd</i> (13.2, 2.8)	1, 3, 5
1b			1.55, <i>dd</i> (13.6, 3.7)	2, 20
2a	18.4	CH ₂	1.82, <i>dddd</i> (17.3, 13.7, 8.7, 3.7)	4, 10
2b			1.68, <i>ddt</i> (14.2, 7.2, 3.6)	4, 10
3a	35.1	CH ₂	1.50, <i>td</i> (13.6, 3.7)	19
3b			1.41, <i>dt</i> (14.0, 2.7)	1, 5
4	36.9	C		
5	44.2	CH	2.22, <i>dd</i> (11.9, 5.5)	1, 7, 10, 18, 19
6a	35.4	CH ₂	2.58, <i>d</i> (17.0)	4, 5, 8, 10
6b			2.55, <i>d</i> (17.0)	4, 5, 8, 10
7	198.2	C		
8	125.4	C		
9	138.3	C		
10	40.1	C		
11	141.3	C		
12	146.2	C		
13	131.8	C		
14	118.1	CH	7.64, <i>s</i>	
15	27.5	CH	3.01, <i>hept</i> (6.9)	12, 13, 14, 16, 17
16, 17	22.5, 22.6	CH ₃	1.30, 1.28, <i>d</i> (6.86)	13, 15
18	17.7	CH ₃	0.99, <i>s</i>	3, 4, 5, 19
19a	72.0	C	3.84, <i>d</i> (11.3)	3, 5, 18, 1'
19b			3.73, <i>d</i> (11.3)	3, 5, 18, 1'
20a	19.2	CH ₃	1.43, <i>s</i>	1, 5, 9, 10
20b				
11-OH			5.70, <i>s</i>	11
12-OH			5.61, <i>s</i>	11, 12
1'	171.3	C		
2'	21.1	CH ₃	2.02, <i>s</i>	1', 19

¹H 700 MHz, ¹³C 175 MHz, CDCl₃. *Obtenido del espectro HSQC.

Otras señales relevantes para la elucidación estructural de este diterpeno, observadas en el espectro de RMN de ^1H de **5** (Tabla 6) son las correspondientes al grupo isopropilo unido al anillo C y dos grupos metilos adicionales en 1.43 (s, 3H) y 0.99 ppm (s, 3H) los cuales se asignan con base en su desplazamiento químico, a los átomos de hidrógeno de los metilos C-20 y C-19 respectivamente. Una señal doble de dobles en 2.22 ppm ($J = 11.9$ y 5.5 Hz) se asigna a H-5, el cual debe de tener una orientación α -axial, lo que explica los valores de sus constantes de acoplamiento.

Los datos presentados en la Tabla 6 permiten identificar el grupo éster presente en **5**, como un acetato, ya que en el espectro de RMN de ^1H se observa una señal simple que integra para tres átomos de hidrógeno en 2.02 ppm y que corresponde al desplazamiento químico característico para el metilo de este grupo. En el espectro de RMN de ^1H (Espectro 20, Tabla 6) se observa adicionalmente un sistema AB ($J = 11.3$ Hz) en 3.73 y 3.84 ppm que por su desplazamiento químico se asignan a los átomos de hidrógeno de un metileno unido al grupo acetoxi. Con base en estos hechos y los datos del espectro de HMBC (Espectro 21, Tabla 6) se asignó la posición de este grupo en C-18, ya que los átomos de hidrógeno del sistema AB muestran correlación con la señal del carbonilo del grupo acetoxi observado en 171.1 ppm en el espectro de RMN de ^{13}C de **5**.

El análisis del espectro NOESY (Espectro 22, Figura 6) del diterpeno **5**, en combinación con los valores de las constantes de acoplamiento observadas para H-5, permitió establecer la configuración relativa para este nuevo abietano.

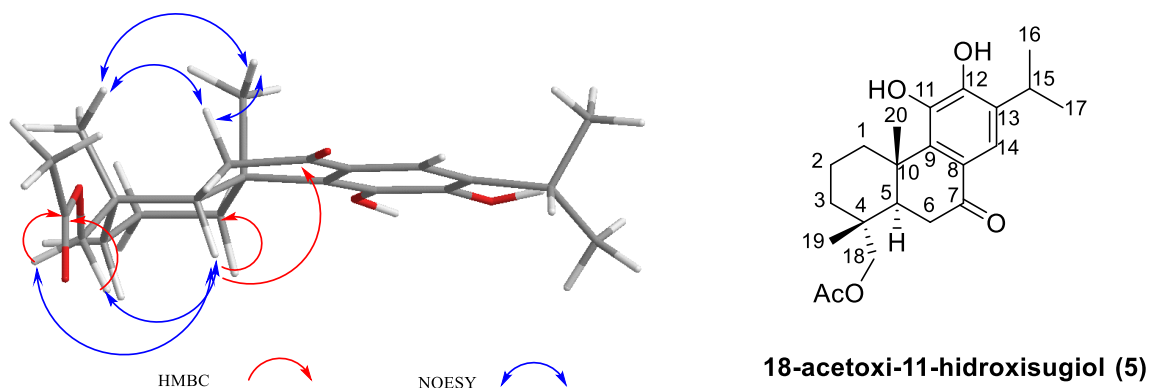


Figura 6. Correlaciones HMBC y NOESY para el compuesto **5**.

En el espectro NOESY de **5**, se observan correlaciones entre las señales del metileno unido al grupo acetoxi (CH_2 -18) con las correspondientes a H-5 (α -axial), H6 α y el metilo C-19. Estos hechos son consistentes si el grupo acetoxi tiene una orientación α -ecuatorial. Congruentemente

el metilo C-19 (β -axial) muestra correlaciones con el metilo C-20 (β -axial), H-2 β , H-6 β y H-1 β , lo cual es consistente con la estereoquímica mostrada en la estructura **5**. Este compuesto no se encuentra descrito en la literatura y debe nombrarse 18-acetoxi-11-hidroxisugiol (**5**).¹⁷

V.7 Determinación de la configuración absoluta de la anastomosina (**6**). Implicaciones taxonómicas.

La anastomosina (**6**) es un icetexano descrito originalmente como constituyente de las partes aéreas de la *Salvia anastomosans* Ramamoorthy² y posteriormente se ha descrito su presencia en *S. candicans* M. et G.⁵ y en una población de *S. ballotiflora* Benth³ recolectada en una región geográficamente diferente a la que se describe en esta tesis. El análisis de los espectros de ¹H (700 MHz), ¹³C (175 MHz), HSQC, HMBC y NOESY obtenidos con la muestra aislada en este trabajo permitieron la asignación completa y sin ambigüedad de las señales de todos los átomos de hidrógeno y carbono de **6**. En particular, se encontraron varias discrepancias con la asignación original del espectro de ¹³C (*i.e.* en C-1, C-2, C-3, C-7, C-8, C-9, C-10 y C-13), por lo que en la sección experimental de esta tesis se incluyen las asignaciones correctas. En ninguno de los trabajos previos se estableció la configuración absoluta de este diterpeno, por lo que se procedió a establecerla por dos métodos diferentes e independientes: difracción de Rayos-X y DCV. El primero de ellos permite la verificación de la estructura y la asignación de la configuración absoluta mediante la determinación de los parámetros de Flack (**x**)¹⁸ y Hooft (**y**).¹⁹ Como se ha mencionado previamente la determinación de la configuración absoluta por DCV involucra la comparación de los espectros de DCV e IR experimentales con los calculados teóricamente utilizando la teoría del funcional de la densidad. Los detalles del procedimiento de cálculo para obtener los espectros teóricos se incluyen en la parte experimental de esta tesis.

Un monocristal de la anastomosina (**6**) se montó en una fibra de vidrio para la recolección de datos de difracción de Rayos-X a temperatura ambiente, utilizando la radiación Cu *Ka* monocromada con grafito. La colección se hizo en el modo $\omega/2\theta$. El cristal de anastomosina (**6**) seleccionado tenía unas dimensiones de 0.34 x 0.26 x 0.15 mm, una geometría *orto*-rómica y pertenece al grupo

¹⁷ Este nuevo diterpeno debe de nombrarse como derivado del 11-hidroxisugiol y no del desmetilcriptojaponol, ya que sugiol es un término utilizado desde 1902 y cryptojaponol desde 1962. Ambos diterpenos se han aislado de *Cryptomeria japonica* (árbol del sugi).

¹⁸ Parsons, S., Flack, H. D. and Wagner, T. *Acta Crystallogr.* **B69**, 249-259, (2013).

¹⁹ Hooft, R. W. W., Straver, L. H. and Spek, A. L. *J. Appl. Cryst.* **43**, 665-668, (2010).

espacial $P2_12_12_1$, $Z = 4$, $\rho = 1.361 \text{ mg/mm}^3$. De un total de 4044 reflexiones recolectadas se consideraron 3178 observadas. La estructura se resolvió por métodos directos utilizando el programa SHELXS-97. Los índices R finales fueron $R_1 = 3.9\%$ y $wR_2 = 10.3\%$. La configuración absoluta se obtuvo mediante el cálculo de los parámetros de Flack (x) y Hooft (y), los cuales fueron calculados con el programa Olex2 v1.1.5. Estos parámetros fueron $x = 0.1(2)$ y $y = 0.09(5)$ para el enantiómero mostrado en la figura 7, mientras que los parámetros para la imagen especular son $x = 0.9(2)$ y $y = 0.91(5)$.

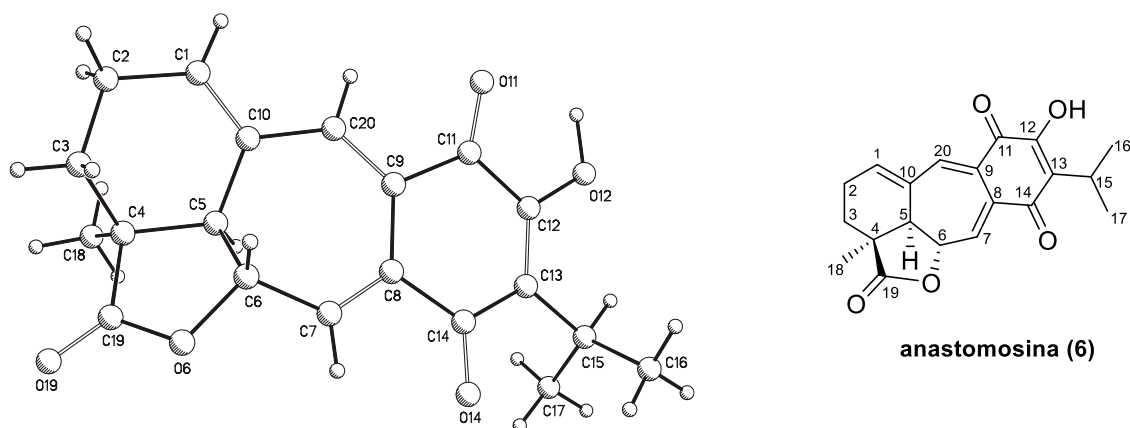


Figura 7. Proyección generada por computadora de la anastomosina (**6**) mostrando la configuración absoluta, obtenida mediante los parámetros de Flack y Hooft.

En forma independiente se determinó la configuración absoluta de la anastomosina (**6**) por DCV. En la figura 8 se muestran los espectros de DCV e IR obtenidos en forma experimental y por cálculos teóricos mediante la teoría de funcionales de la densidad (DFT) con un nivel de teoría B3PW91/DGDZVP. En la tabla 7 se muestran los parámetros de comparación con los cuales se deduce que la determinación de la configuración absoluta se llevó a cabo con un 100% de confianza y es coincidente con lo determinado por difracción de Rayos-X. Las configuraciones absolutas en los centros de quiralidad de **6** son: $4S$, $5R$ y $6S$.

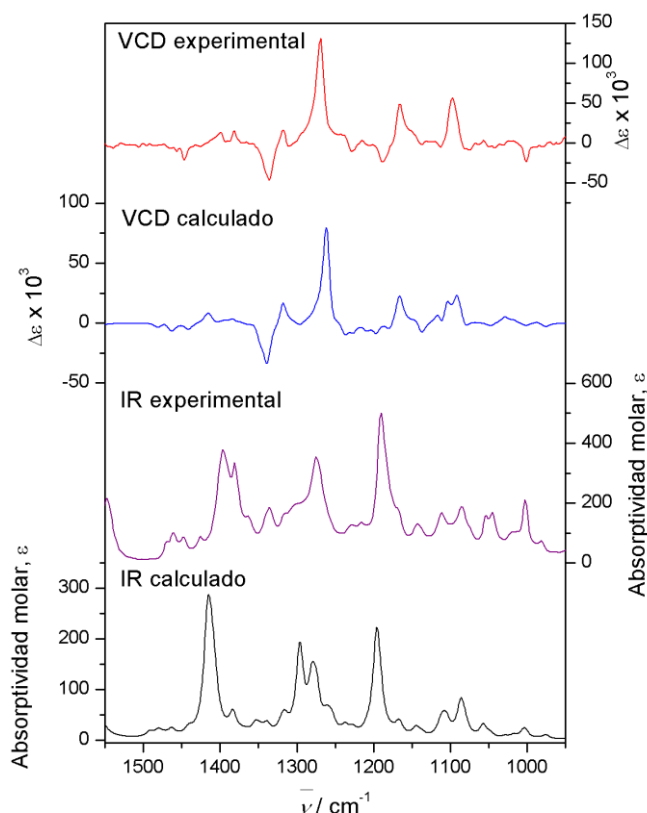


Figura 8.- Espectros de IR y DCV experimentales y calculados para la anastomosina (**6**).

Tabla 7. Datos de Nivel de Confianza para los Espectros IR y DCV del compuesto **6**.

Método	anH^a	S_{IR}^b	S_E^c	S_{-E}^d	ESI^e	C^f (%)
B3PW91/DGDZVP	0.975	82.4	87.0	4.2	82.8	100

^a Factor de anarmonización o escalamiento. ^b Índice de similitud del espectro de IR. ^c Índice de similitud del espectro de DCV del enantiómero correcto. ^d Índice de similitud del espectro de DCV del enantiómero incorrecto. ^e Índice de similitud enantiomérica calculado como $S_E - S_{-E}$. ^f Nivel de confianza de las asignaciones estereoquímicas.

La presencia de la anastomosina (**6**) en *S. ballotiflora*, *S. anastomosans* y *S. candicans* es importante desde un punto de vista quimiotaxonómico ya que las tres especies están clasificadas según C. Epling en la Sección Tomentellae.²⁰ *S. anastomosans* es una especie descrita en 1984 y

²⁰ Epling, C. A Revision of *Salvia*, subgenus *Calosphace*. In *Repertorium Specierum Novarum Regni Vegetabilis*; Fedde, F., Ed.; Verlag des Repertoriums, Dahlem dei Berlin 1939; University of California Press: Berkley, CA, 1940; Vol. **110**

fue clasificada en esta sección²¹ por sus características morfológicas y su contenido de diterpenos que apoyan dicha clasificación. La *Salvia ballotiflora* es una de las especies típicas de esta sección y la presencia de la anstomosina (6), y de los diterpenos 1, 2, 7 y 9 en esta especie refuerza la relación química con *S. anastomosans*. El análisis filogenético realizado en varias especies de *Salvia* del Subgénero *Calosphace* indica la existencia de al menos 4 “clados” en la Sección Tomentellae, los cuales se muestran en la Tabla 8.²²

Tabla 8. Clados en los que se subdivide la Sección Tomentellae.

CLADO	ESPECIES	ORIGEN DE LA ESPECIE	TIPOS DE DITERPENOS AISLADOS
I	<i>Salvia fruticulosa</i> Benth.	México (Oaxaca)	Icetexanos
	<i>S. parryi</i> Gray	México (Monterrey)	Pimaranos (raíces)
II	<i>Salvia retinerva</i> Briq.	Bolivia	No ha sido estudiada
	<i>S. gilliesi</i> Benth.	Argentina	Icetexanos y abietanos
	<i>S. bangii</i> Rusby	Bolivia	No ha sido estudiada
III	<i>Salvia ballotiflora</i> Benth.	México (SLP, Nuevo León) Sur de USA	Icetexanos y abietanos
	<i>Salvia pinguifolia</i> Fern.		No ha sido estudiada
IV	<i>Salvia candicans</i> M. & Gal.	México (Puebla)	Icetexanos y abietanos

Los clados I y II están más separados filogenéticamente de los III y IV. El clado I contiene especies que crecen al norte y al sur de México. Las especies agrupadas en el clado II son todas ellas sudamericanas. Los clados III y IV son muy cercanos filogenéticamente y agrupan a especies del sur de Estados Unidos y México. El perfil de diterpenos aislados en este trabajo refuerza la relación estrecha entre *S. ballotiflora* (Clado III) y *S. candicans* (Clado IV), desafortunadamente no existen datos de secuencia de genes para *S. anastomosans* para reforzar la estrecha relación con *S. ballotiflora* y *S. candicans* indicada por la composición química tomando a los diterpenos como marcadores quimiotaxonómicos.

²¹ Ramamoorthy T.P. *J. Arnold Arboretum* **65**, 134-143, (1984).

²² Jens, A. A., Walker, J. B. and Kim, S-C. *J. Plant. Res.*, **123**, 483-496, (2013).

V.8 Determinación de la configuración absoluta de la 7, 20-dihidroanastomosina (7).

Este producto fue aislado previamente de una población diferente de *S. ballotiflora*.³ Como en el caso de la anastomosina (6) en las asignaciones originales del espectro de RMN de ¹³C se detectaron ciertos errores al compararlas con las obtenidas en este trabajo (*i.e.* en C-8, C-9, C-10 y C-13), por lo que en la parte experimental de esta tesis se incluyen las correctas, las cuales fueron establecidas con base en los experimentos de ¹H (700 MHz), ¹³C (175 MHz), HSQC, HMBC y NOESY. La configuración absoluta de este producto no fue establecida en el estudio original, por lo que se procedió a determinarla utilizando los mismos métodos aplicados en el caso de la anastomosina (6).

La cristalización de 7 permitió obtener cristales adecuados para el análisis por difracción de Rayos-X. Se seleccionó para el análisis un cristal monoclinico perteneciente al grupo espacial P2₁ y de dimensiones de 0.25 x 0.16 x 0.09 mm. De un total de 7988 reflexiones recolectadas se consideraron 2552 observadas. La estructura se resolvió utilizando el mismo procedimiento descrito para 6. Los valores de los índices R finales fueron: R₁ = 3.1% y wR₂ = 7.1% y la configuración absoluta obtenida mediante los parámetros de Flack (x) y Hooft (y) es la indicada en la figura 9. Los valores encontrados fueron x = 0.07(18) y y = 0.13(9) para la configuración absoluta mostrada en la figura 9 y para su enantiómero fueron x = 0.90(17) y y = 0.87(9).

La configuración absoluta determinada por Rayos-X es consistente con la obtenida por DCV. El análisis de un modelo Dreiding⁹ de 7 indica que es una molécula muy rígida como en el caso de la anastomosina (6), por lo tanto, los conformeros utilizados para el análisis teórico fueron los obtenidos por la rotación del enlace del sistema quinoideo con el grupo isopropilo. En la figura 10 se muestran los espectros de DCV e IR obtenidos en forma experimental y por cálculos teóricos mediante la teoría de funcionales de la densidad (DFT) con un nivel de teoría B3PW91/DGDZVP. En la tabla 9 se muestran los parámetros de comparación con los cuales se deduce que la determinación de la configuración absoluta se llevó a cabo con un 100% de confianza y es coincidente con lo determinado por difracción de Rayos-X. La configuración absoluta de la 7, 20-dihidroanastomosina es la que se muestra en la estructura 7. Las configuraciones absolutas en los centros de quiralidad de 7 son: 4*S*, 5*R* y 6*S*.

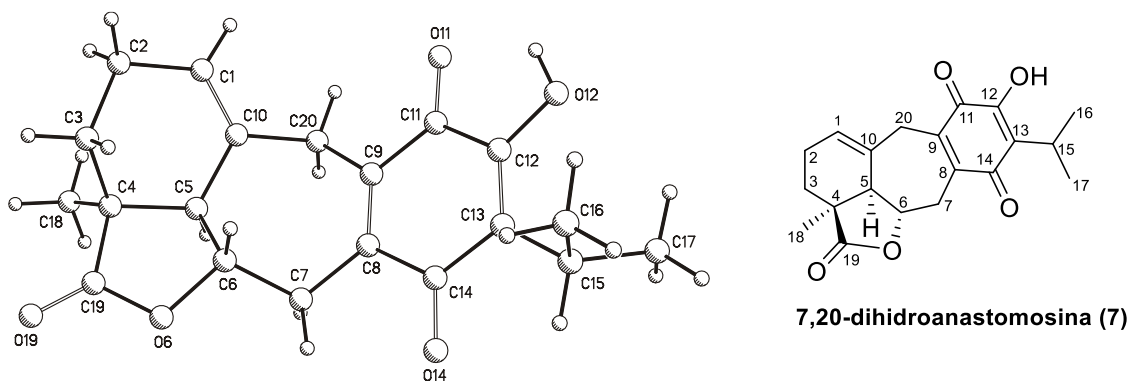


Figura 9. Proyección generada por computadora de la 7, 20 dihidroanastomosina (7) mostrando la configuración absoluta, obtenida mediante los parámetros de Flack y Hooft.

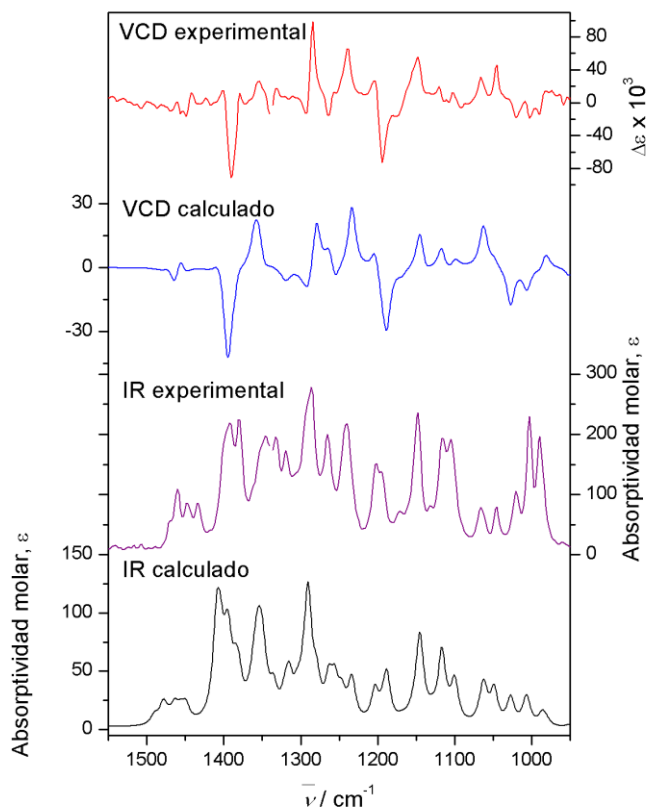


Figura 10.- Espectros de IR y DCV experimentales y calculados para la 7, 20-dihidroanastomosina (7).

Tabla 9. Datos de Nivel de Confianza para los Espectros IR y DCV del compuesto **7**.

Método	anH^a	S_{IR}^b	S_E^c	S_{-E}^d	ESI^e	C^f (%)
B3PW91/DGDZVP	0.974	93.2	84.7	10.9	73.8	100

^a Factor de anarmonización o escalamiento. ^b Índice de similitud del espectro de IR. ^c Índice de similitud del espectro de DCV del enantiómero correcto. ^d Índice de similitud del espectro de DCV del enantiómero incorrecto. ^e Índice de similitud enantiomérica calculado como $S_E - S_{-E}$. ^f Nivel de confianza de las asignaciones estereoquímicas.

V.9 Determinación de la configuración absoluta de la icetexona (**8**), el primer 9(10→20)-*abeo*-abietano (icetexano) descrito. Asignación completa de sus espectros de RMN de ¹H y ¹³C. Comentarios sobre la 5-*epi*-icetexona.

La icetexona (**8**) fue aislada de la *Salvia ballotiflora* Benth (*Salvia ballotaeflora* Benth) en 1976 por el Prof. X. A. Domínguez y colaboradores.²³ La estructura de este compuesto fue establecida por difracción de Rayos-X²⁴ pero su configuración absoluta no fue determinada ya que en esa época para lograr este objetivo era necesario la introducción de un átomo pesado, como el bromo, para que, por medio de la dispersión anómala causada por éste, se pudiera establecer la configuración absoluta. Los datos de RMN de ¹H fueron obtenidos a 60 MHz y se describen muy someramente en la publicación.²³ La icetexona (**8**) ha sido aislada, posteriormente, de las partes aéreas de varias especies del género *Salvia*, tales como *S. candicans*,⁵ *S. anastomosans*² y *S. pubescens*,²⁵ sin embargo, en todos estos trabajos si bien se establece la identidad de esta sustancia, no se publicaron los datos completos de RMN de ¹H y tampoco los de ¹³C, a pesar de que estos últimos nunca se habían publicado. En el año 2009, Majetich y Grove²⁶ publicaron la síntesis asimétrica total de la icetexona (**8**) lo cual es una aportación importante para establecer la configuración absoluta de la misma. La estructura del producto sintético fue confirmada por difracción de Rayos-X. Al determinar los parámetros de la celda unitaria estos concordaron con los publicados en 1976, de donde se concluye que tanto el producto sintético como el natural tienen la estructura representada por **8**. Los datos de IR de la icetexona sintética y natural fueron coincidentes, sin embargo, los autores de la síntesis no compararon sus datos de RMN de ¹H con

²³ Domínguez, X. A.; González, F. H. Aragón, R.; Gutiérrez, M.; Marroquín, J. S.; Watson, W. *Planta Med.*, 237-241, (1976).

²⁴ Taira, Z., Watson, W.H. and Domínguez, X. A. *J. Chem. Soc. Perkin II*, 1728-1730, (1976).

²⁵ Esquivel, B., Calderon, J. S., Flores, E., Chavez, C. and Juarez, M. *Nat. Prod. Lett.* **10**, 87-93, (1997).

²⁶ Majetich, G. and Grove, J. L. *Org. Lett.*, 11, 2904-2907, (2009).

los publicados y de hecho no hacen mención del trabajo de Domínguez y colaboradores. En donde se encuentra una diferencia importante entre la icetexona natural y la sintética es en el punto de fusión y la rotación específica, ya que los datos reportados para la icetexona sintética²⁶ son 247-253 °C y $[\alpha]_D = -70$ (CHCl₃) respectivamente, mientras que para el producto natural²³ se describen 226-227 °C y $[\alpha]_D = +33.3$ (CHCl₃). De lo anterior se podría pensar que la icetexona natural podría ser el enantiómero de la sintética la cual es representada apropiadamente por la estructura **8**. Estas discrepancias, así como la falta de los datos completos de RMN de ¹H y ¹³C y de la configuración absoluta de la icetexona (**8**), motivaron que con la muestra de este compuesto obtenido de la población de *S. ballotiflora* analizada en este trabajo se aclararan dichas discrepancias y se completaran los datos espectroscópicos faltantes de este producto. Esta es una aportación necesaria e importante dado que la icetexona (**8**) es el primer producto aislado con el arreglo estructural de icetexano.⁷

En relación al punto de fusión de la icetexona (**8**), la muestra aislada en este trabajo cristaliza como prismas de color anaranjado-rojizo, los cuales al calentarse en la platina del equipo Fisher-Jhons, alrededor de 230 °C muestran una transición a un sólido anaranjado el cual empieza a oscurecerse y funde entre 260-264 °C dejando un líquido café oscuro. El intervalo de fusión, cuidadosamente obtenido en esta ocasión, es más cercano al del producto sintético que al descrito en 1976. La rotación específica de la icetexona (**8**) reportada en 1976 y la descrita para el producto sintético crean también una confusión, por lo que se determinó nuevamente obteniéndose en este trabajo un valor de $[\alpha]_D = -94.1$ (c 0.56, CHCl₃). El signo negativo indica nuevamente que la icetexona natural (**8**) y el producto sintético tienen la misma configuración y que hubo un error en la descripción de la rotación específica en el trabajo de 1976.

Una forma segura para obtener la configuración absoluta de la icetexona (**8**) es determinando la estructura en fase cristalina por difracción de Rayos-X utilizando la radiación Cu K α monocromada con grafito para calcular los parámetros de Flack y Hooft, los cuales dan evidencia concluyente sobre la configuración absoluta. La estructura molecular fue refinada hasta un valor de R = 3.3% y los parámetros de Flack, x = 0.04 (19) y Hooft, y = 0.12 (9) indican la configuración absoluta mostrada en la figura 11 y en la estructura **8**. Las configuraciones absolutas de acuerdo con Cahn, Ingold y Prelog en los centros de quiralidad de **8** son: 4*S*, 5*S* y 10*S*.

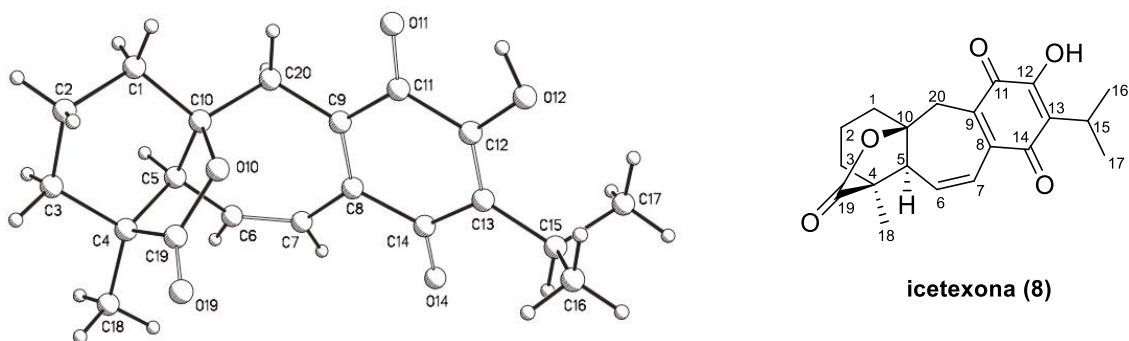


Figura 11. Proyección generada por computadora de la icetexona (**8**) mostrando la configuración absoluta, obtenida mediante los parámetros de Flack y Hooft.

Para tener más evidencias sobre la configuración absoluta de la icetexona (**8**) se seleccionó el DCV como el método de elección, el cual ha sido ampliamente utilizado para el estudio de diterpenoides.^{11,12} El método fue aplicado al acetato de icetexona ya que **8** es muy poco soluble en CHCl_3 , el cuál es el disolvente más utilizado para la determinación del DCV. El acetato de la icetexona (**8**) fue obtenido mediante el procedimiento rutinario utilizando Ac_2O y piridina el cual no afecta la configuración de ninguno de los centros de quiralidad de la icetexona (**8**). En la figura 12 y en la tabla 10 se muestran los resultados obtenidos para el acetato de icetexona de donde se concluye que su configuración absoluta es la mostrada ($4S$, $5S$ y $10S$) y por lo tanto se confirma que la configuración absoluta de la icetexona es la misma que la obtenida por difracción de Rayos-X (figura 11) y que se representa con la estructura **8**.

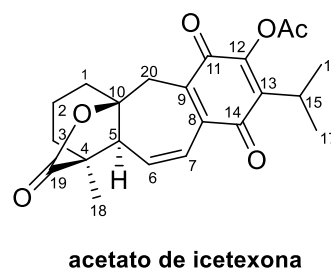
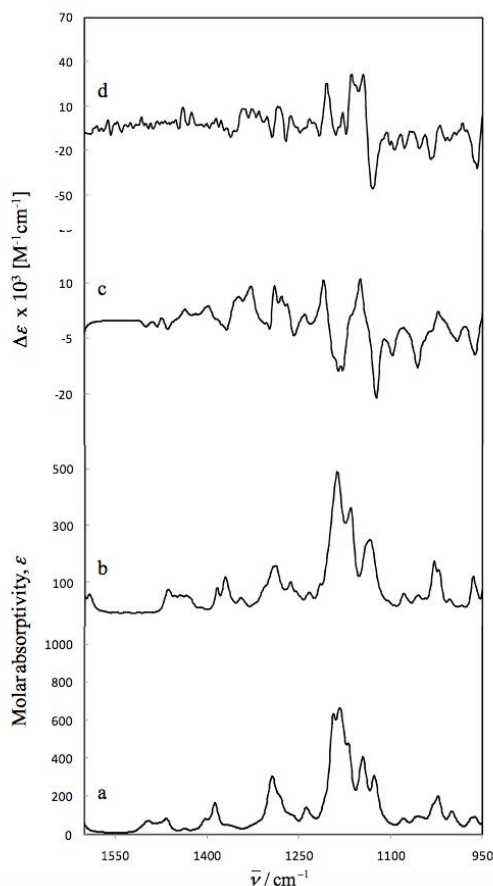


Figura 12.- Espectros de IR y DCV experimentales y calculados para el acetato de la icetexona. a IR calculado, b IR experimental, c VCD calculado y d VCD experimental

Tabla 10. Datos de Nivel de Confianza para los Espectros IR y DCV del acetato de la icetexona

Método	anH^a	S_{IR}^b	S_E^c	S_{-E}^d	ESI^e	C^f (%)
B3PW91/DGDZVP	0.984	98.1	76.8	14.8	62.0	100

^a Factor de anarmonización o escalamiento. ^b Índice de similitud del espectro de IR. ^c Índice de similitud del espectro de DCV del enantiómero correcto en %. ^d Índice de similitud del espectro de DCV del enantiómero incorrecto en %. ^e Índice de similitud enantiomérica calculado como $S_E - S_{-E}$. ^f Nivel de confianza de las asignaciones estereoquímicas en %.

Finalmente, en la tabla 11 se muestran los datos de RMN de 1H y ^{13}C obtenidos a 300 y 75 MHz respectivamente para la icetexona (**8**), con lo que se completa la caracterización de este importante diterpeno.

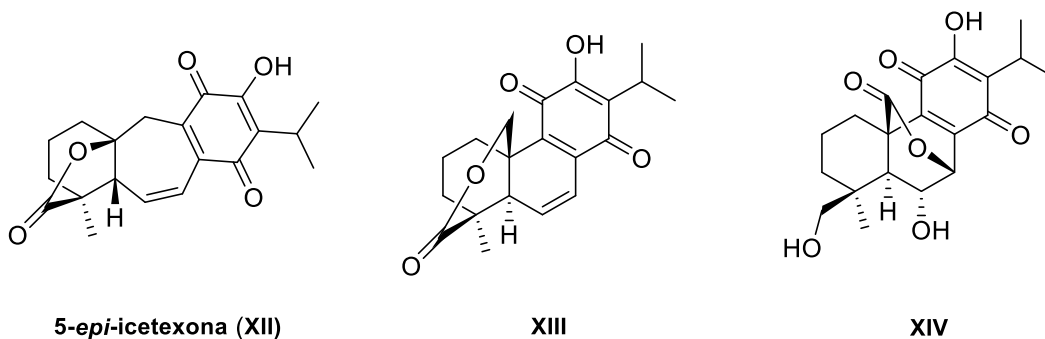
Tabla 11. Datos de RMN de ^1H , ^{13}C de la icetexona (**8**).

Posición	δ_{C}	Tipo*	δ_{H} (J en Hz)
1a	35.6	CH ₂	2.01, <i>m</i>
1b			1.81, <i>m</i>
2a	19.5	CH ₂	1.81, <i>m</i>
2b			1.81, <i>m</i>
3a	35.9	CH ₂	1.77, <i>m</i>
3b			1.62, <i>m</i>
4	47.7	C	
5	57.7	CH	2.55, <i>dd</i> (5.0, 2.0)
6	138.7	CH	6.43, <i>dd</i> (12.3, 5.0)
7	125.4	CH	6.86, <i>dd</i> (12.3, 2.0)
8	140.5	C	
9	133.6	C	
10	92.3	C	
11	182.8	C	
12	150.8	C	
13	125.1	C	
14	185.6	C	
15	24.4	CH	3.22, <i>hept</i> (7.0)
16, 17	19.9, 19.8	CH ₃	1.24, 1.23, <i>d</i> (7.0)
18	18.2	CH ₃	1.26, <i>s</i>
19	178.8	C	
20a	32.7	CH ₂	3.16, <i>d</i> (13.9)
20b			2.79, <i>d</i> (13.9)
12-OH			7.11, <i>s</i>

^1H 300 MHz, ^{13}C 75 MHz, CDCl₃. *Obtenido del espectro HSQC.

En el año 2000 Nieto y colaboradores,²⁷ describieron los componentes diterpénicos de la *Salvia gilliessi* Benth, la cual está clasificada en la Sección Tomentellae al igual que *S. ballotiflora* Benth, aunque su análisis filogenético las sitúa en clados diferentes (Tabla 8). En este trabajo se describió

el aislamiento y elucidación estructural de tres diterpenos cuyas estructuras se muestran a continuación.²⁷



Las estructuras de estos compuestos **XII-XIV** fueron establecidas con base en el análisis de sus datos espectroscópicos, principalmente RMN de ^1H y ^{13}C , así como experimentos bidimensionales (HMQC y HMBC). El componente más abundante fue denominado 5-*epi*-icetexona (**XII**), el cual fue descrito como un sólido naranja con punto de fusión (p.f.) de 259-260 °C y $[\alpha]_{\text{D}} = -92.8$ (c 1.04, CHCl_3). Aunque los datos de RMN de ^1H y ^{13}C indicaban que este compuesto era idéntico a la icetexona (**8**), los valores tan diferentes en el p.f. y en el valor de la rotación específica de la 5-*epi*-icetexona (**XII**) con los descritos en 1976²³ para **8** condujeron a suponer a Nieto y colaboradores, que existía una diferencia en alguno de los centros de quiralidad, concluyendo que este producto era el epímero en C-5 de la icetexona (**8**). En 2009 Majetich y Grove publican la síntesis asimétrica total de la (+)-5-*epi*-icetexona (**XII**).²⁶ La difracción de Rayos-X de la 5-*epi*-icetexona sintética corresponde con la estructura **XII**, sin embargo, al comparar los datos de RMN de ^1H y ^{13}C de la 5-*epi*-icetexona (**XII**) descritos por Nieto y colaboradores con la muestra sintética se observan importantes discrepancias. En las tablas 12 y 13 se muestran los datos de RMN de ^1H y ^{13}C , respectivamente para la icetexona natural (**8**) (aislada en este trabajo), la 5-*epi*-icetexona (**XII**) (publicada por Nieto y colaboradores) y se comparan con los correspondientes productos sintéticos publicados por Majetich y Grove. La comparación de los datos de RMN de ^1H de **XII** con los de **8** indica que son la misma sustancia como se puede apreciar en la tabla 12.

²⁷ Nieto, M., García, E. E., Giordano, O. S. and Tonn C. E. *Phytochemistry*, **53**, 911-915, (2000).

Tabla 12.- Datos comparativos de RMN de ^1H de **8** y **XII** con sus correspondientes productos sintéticos.

	XII	8	Icetexona sintética	5-epi-icetexona sintética
H	$^A\delta_{\text{H}}$	$^B\delta_{\text{H}}$	$^C\delta_{\text{H}}$	$^D\delta_{\text{H}}$
OH	7.0, <i>s</i>	7.11, <i>s</i>	7.14, <i>s</i>	7.20, <i>s</i>
7	6.80, <i>dd</i> (12.3, 3.8)	6.86, <i>dd</i> (12.3, 2.0)	6.86, <i>dd</i> (12.0, 2.0)	7.14, <i>dd</i> (10.0, 2.8)
6	6.40, <i>dd</i> (12.3, 4.5)	6.43, <i>dd</i> (12.3, 5.0)	6.44, <i>dd</i> (12.0, 5.0)	6.18, <i>dd</i> (14.0, 2.0)
15	3.29, <i>hept</i> (6.8)	3.22, <i>hept</i> (7.0)	3.22, <i>hept</i> (6.0)	3.24, <i>hept</i> (6.0)
20	3.10, <i>d</i> (14.3)	3.16, <i>d</i> (13.9)	3.16, <i>d</i> (13.5)	3.58, <i>d</i> (15.6)
20'	2.81, <i>d</i> (14.3)	2.80, <i>d</i> (13.9)	2.80, <i>d</i> (14.0)	2.94, <i>d</i> (15.6)
5	2.60, <i>dd</i> (4.5, 3.8)	2.55, <i>dd</i> (5.0, 2.0)	2.56, <i>dd</i> (4.5, 1.5)	2.86, <i>sa</i>
1	no reportados	2.01, <i>m</i>	2.04 – 1.56	1.51 – 1.71, <i>m</i>
1'	no reportados	1.81, <i>m</i>		
2	no reportados	1.81, <i>m</i>	2.04 – 1.56	1.51 – 1.71, <i>m</i>
2'	no reportados	1.81, <i>m</i>		
3	no reportados	1.77, <i>m</i>	2.04 – 1.56	1.51 – 1.71, <i>m</i>
3'	no reportados	1.62, <i>m</i>		
18	1.25, <i>s</i>	1.26, <i>s</i>	1.27, <i>s</i>	1.27, <i>s</i>
16	1.20, <i>d</i> (6.8)	1.23, <i>d</i> (7.0)	1.24, <i>d</i> (7.0)	1.25, <i>d</i> (6)
17	1.20, <i>d</i> (6.8)	1.24, <i>d</i> (7.0)	1.24, <i>d</i> (7.0)	1.25, <i>d</i> (6)

^A datos tomados de Nieto et al²⁷, ^B tomados de Esquivel et al,⁷ ^{C, D} tomados de Majetich y Grove²⁶

Como se desprende del análisis de la tabla 12, los desplazamientos químicos de los átomos de hidrógeno de los productos **XII**, **8** y la icetexona sintética son idénticos dentro del error experimental, mientras que para la (+)-5-*epi*-icetexona sintética se observan diferencias en los desplazamientos químicos de H-6, H-7 y H-5 como es de esperarse en un producto epimérico en C-5. Para apoyar esta afirmación se solicitaron los espectros de RMN de ^1H y de ^{13}C a uno de los autores del trabajo sobre *Salvia gilliessi* (Prof. Carlos E. Tonn). La comparación visual directa de los espectros de RMN de ^1H de **XII** y **8** indican que efectivamente son el mismo compuesto y que corresponden a la icetexona (**8**).

El análisis de los desplazamientos químicos de los espectros de RMN de ^{13}C de los compuestos **XII**, **8**, la icetexona sintética y la 5-*epi*-icetexona sintética, permiten llegar a la misma conclusión. En este caso el análisis directo de los espectros de ^{13}C de **XII** y **8** no pudo realizarse, ya que el espectro de **XII** fue obtenido en una mezcla de CDCl_3 y $\text{DMSO-}d_6$, lo que modifica los desplazamientos químicos²⁸. Sin embargo, si observamos la quinta columna de la tabla 13 podemos apreciar las diferencias importantes entre los desplazamientos químicos en ^{13}C de la icetexona y los de la 5-*epi*-icetexona sintética. Se observan diferencias significativas en el caso de los siguientes átomos de carbono: C-20, C-1, C-3, C-5 y C-10, siendo este último el más pronunciado (-10.4 ppm). Estas diferencias son las esperadas para dos compuestos epiméricos en C-5. Al comparar los desplazamientos químicos entre **XII** y **8**, a pesar de la diferencia en el disolvente utilizado, no se observan variaciones de esa magnitud, por ejemplo, la diferencia en el desplazamiento químico de C-10 en **XII** y **8** es de tan solo -1 ppm. Las variaciones entre los desplazamientos químicos de los átomos de carbono correspondientes a **XII** y **8** [$\Delta\delta_{\text{C}}(\text{XII-8})$] en la tabla 13, que se observan en la tercera columna, se pueden explicar con base en la diferencia del disolvente deuterado utilizado y se puede observar que tienen una tendencia negativa similar en casi todos los casos. Estos hechos indican que los diterpenos **XII** y **8** son idénticos, es decir **XII** es icetexona de lo cual se concluye que la 5-*epi*-icetexona (**XII**) aislada de una fuente natural no existe y que la conclusión a la que llegaron Nieto y colaboradores se debió a las diferencias tan marcadas entre el punto de fusión y el valor de $[\alpha]_{\text{D}}$ del producto aislado de *S. gilliesii* con los publicados en 1976 para la icetexona (**8**).

²⁸ Esto se ve claramente en el material enviado por el Prof. Carlos E. Tonn, pero en el artículo publicado se indica erróneamente que el espectro de RMN de ^{13}C fue obtenido en CDCl_3 .

Tabla 13.- Datos comparativos de RMN de ^{13}C de **8** y **XII** con sus correspondientes productos sintéticos.

	XII	8	$\Delta\delta_c$	icetexona sintética	5-epi-icetexona sintética	$\Delta\delta_c$ (productos sintéticos)
C	$^A\delta_c$	$^B\delta_c$	(XII)- (8)	$^C\delta_c$	$^D\delta_c$	(icetexona) – (5-epi-icetexona)
18	16.8	18.2	-1.4	18.4	18.9	+0.5
2	18.2	19.5	-1.3	19.7	19.3	+0.4
17	18.9	19.8	-0.9	20.1	20.1	0
16	18.7	19.9	-1.2	20.1	20.1	0
15	22.8	24.4	-1.6	24.6	25.0	+0.4
20	28.2	32.7	-4.5	32.9	27.5	-5.4*
1	31.3	35.6	-4.3	35.6	27.8	-7.8*
3	34.0	35.9	-1.9	36.1	38.8	+2.7*
4	46.2	47.7	-1.5	47.9	46.9	-1.0
5	55.8	57.7	-1.9	57.9	54.7	-3.2*
10	91.3	92.3	-1.0	92.5	82.1	-10.4*
13	123.6	125.1	-1.5	125.3	124.1	-1.7
7	124.0	125.4	-1.4	125.5	125.5	0
9	132.8	133.6	-0.8	133.8	133.0	-0.8
6	136.8	138.7	-1.9	138.9	133.7	-0.2
8	138.0	140.5	-2.5	140.7	137.8	-2.9
12	151.6	150.8	0.8	151.0	150.8	-0.2
19	175.0	178.8	-3.8	179.0	179.0	0
11	181.5	182.8	-1.3	183.0	184.0	+1.0
14	184.6	185.6	-1.0	185.8	185.8	0

^A datos tomados de Nieto et al³⁶, ^B tomados de Esquivel et al,⁷ ^{C,D} tomados de Majetich y Grove²⁷

* Diferencias muy significativas.

Los valores de punto de fusión y $[\alpha]_D$ descritos en 1976, los de la muestra sintética y los obtenidos en este trabajo para la icetexona (**8**), y los de la supuesta 5-epi-icetexona (**XII**) se muestran en la tabla 14 con fines de comparación. La conclusión evidente de esta tabla es que los datos publicados en 1976 son erróneos y que la comparación de los datos de la muestra de icetexona (**8**), tomados cuidadosamente en este trabajo, con los descritos para el diterpeno **XII**, son iguales dentro del error experimental y confirman la no existencia de la 5-epi-icetexona. Este hecho tiene dos connotaciones importantes. La primera es que entre 2006 y 2016 se publicaron cuatro artículos relacionados con el efecto de la 5-epi-icetexona (**XII**) sobre el ciclo de vida de *Trypanosoma*

cruzi,^{29,30,31,32} el agente causal del mal de Chagas, por lo que, con base en la discusión previa, este efecto debe de atribuirse a la icetexona (**8**) y este error debería de hacerse del conocimiento de la comunidad científica. La segunda connotación importante es de corte quimiotaxonómico ya que *S. gilliesii* y *S. ballotiflora* pertenecen a la Sección Tomentellae y a pesar de la enorme distancia geográfica que separa a ambas especies su perfil químico en lo que respecta a diterpenos es muy similar y ambas biosintetizan icetexona (**8**). Esta consistencia en el perfil químico se ha observado en otras especies de salvias pertenecientes a la Sección Tomentellae. Este hecho se discutirá más adelante en esta tesis.

Tabla 14. Valores de punto de fusión y $[\alpha]_D$ de la icetexona (**8**) de diferentes orígenes y de la 5-*epi*-icetexona (**XII**).

Compuesto	Punto de Fusión (°C)	$[\alpha]_D$ (CHCl ₃)
Icetexona natural (1976) (<i>Salvia ballotiflora</i>)	226-227	+33.3
Icetexona sintética (2009)	247-253	-70.0
Icetexona natural (2017) (<i>Salvia ballotiflora</i>)	260-264	-94.1
5-<i>epi</i>-icetexona “natural” (2000) (<i>Salvia gilliesii</i>)	259-260	-92.8
5- <i>epi</i> -icetexona sintética (2009)	219-223	+327

²⁹ Lozano, E., Barrera, P., Salinas, R., Vega, I., Nieto, M., Tonn, C., Kemmerling, U., Mortara, R. A. and Sosa, M. A. *Parasitology International*, **61**, 628-633, (2012).

³⁰ Lozano, E., Barrera, P., Tonn, C., Nieto, M., Sartor, T. and Sosa, M. A. *Parasitology International*, **61**, 275-279, (2012).

³¹ Sánchez, A. M., Jiménez-Ortiz, V., Sartor, T., Tonn, C.E., García, E.E., Nieto, M., Burgos, M. H. And Sosa, M.A. *Acta Tropica*, **98**, 118-124, (2006).

³² Lozano, E., Strauss, M., Spina, R., Cifuentes, D., Tonn, C., Rivarola, H.W. and Sosa, M. A. *Parasitology International*, **65**, 23-26, (2016).

V.10 Determinación de la configuración absoluta de la conacytona (**10**) y la asignación completa de sus espectros de RMN de ^1H y ^{13}C .

Junto con la icetexona (**8**), en 1976 se describió el aislamiento y elucidación estructural por difracción de Rayos-X de la conacytona (**10**),^{23,33} la cual ha sido aislada posteriormente de las partes aéreas de *Eupatorium turbinatum*,³⁴ *Salvia pubescens*,³⁵ *S. anastomosans*,² *S. candicans*,⁵ de otra población de *S. ballotiflora*³ y de *S. corrugata*.³⁶ Para la conacytona (**10**) ha ocurrido un fenómeno similar al de la icetexona (**8**), en relación a que a pesar de haber sido aislada en varias ocasiones nunca se había determinado su configuración absoluta y no se habían publicado sus datos completos de RMN de ^{13}C .³⁷ Siguiendo los mismos procedimientos utilizados para la icetexona (**8**) se estableció, con la muestra de **10** obtenida en este trabajo, su configuración absoluta y se llevó a cabo la asignación completa de los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de esta sustancia. Nuevamente, se eligieron dos métodos independientes para la asignación de la configuración absoluta de **10**: la difracción de Rayos-X y el DCV.

Los parámetros de celda obtenidos en este estudio fueron coincidentes con los descritos previamente.³¹ La estructura fue resuelta y el valor final de $R = 3.4\%$, los parámetros de Flack y Hooft obtenidos fueron $x = 0.00(18)$ $y = 0.05(9)$ respectivamente para el enantiómero correcto el cual se representa en la estructura **10**. Los parámetros para la imagen especular fueron $x = 0.99(18)$ y $y = 0.94(9)$. La figura 13 muestra la perspectiva generada por computadora para la conacytona (**10**). Las configuraciones absolutas en los centros de quiralidad de **10** son: $4S$, $5S$, $7R$, $10R$ y $20R$.

³³ Taira Z. and Watson W.H. Acta Cryst., **B32**, 2149-2152, (1976).

³⁴ Jakupovic, J., Ellmauerer, E., Bohlmann, F., Whittetori, A. and Gage, D. *Phytochemistry*, **25**, 2677-2678, (1986).

³⁵ Galicia, M.A., Esquivel, B., Sánchez, A.A., Cárdenas, J., Ramamoorthy, T.P. and Rodríguez-Hahn, L. *Phytochemistry*, **27**, 217- 219, (1988).

³⁶ Bisio, A., Fraternali, D., Schito, A. M., Parricchi, A., Piazz, F. D., Ricci, D., Giacomini, M., Ruffoni, B. and De Tommasi, N. *Phytochemistry*, **122**, 276-285, (2016).

³⁷ La RMN de ^1H de la conacytona (**10**) se encuentra publicada en la referencia 32, sin embargo, llama la atención que los autores de este trabajo sobre *Eupatorium turbinatum*, no se hayan percatado de una estructura descrita 10 años antes, al grado que la bautizan nuevamente con el nombre de turbinatona.

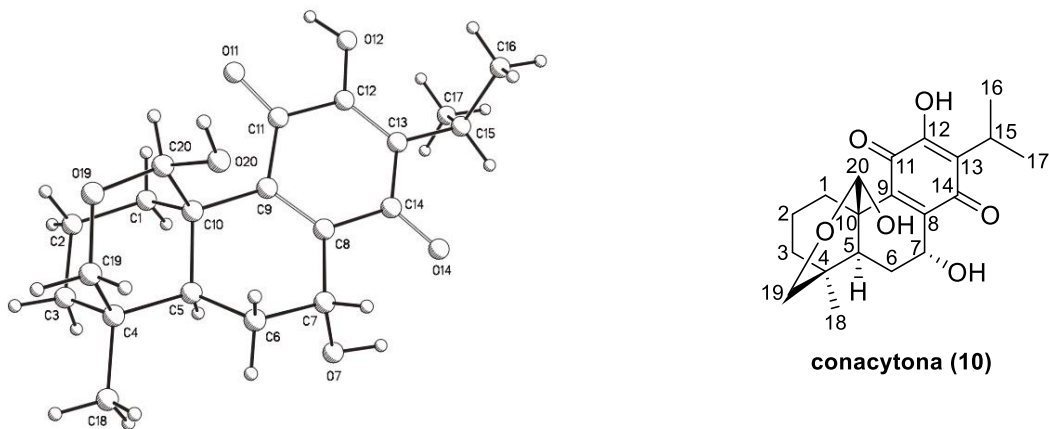


Figura 13. Proyección generada por computadora de la conacytona (**10**) mostrando la configuración absoluta, obtenida mediante los parámetros de Flack y Hooft.

En el caso del DCV, debido a la existencia de dos grupos hidroxilos que no están formando enlaces de hidrógeno en la conacytona (**10**) fue necesario preparar el derivado triacetilado, ya que la presencia de estos grupos puede propiciar la formación de agregados intermoleculares lo que dificultaría la comparación del espectro de DCV experimental con el calculado mediante DFT. El triacetato de conacytona fue obtenido usando el procedimiento estándar de acetilación (Ac_2O -Piridina). Con estas condiciones no se afecta la configuración de ninguno de los centros de quiralidad de la conacytona (**10**). Los resultados se muestran en la figura 14 y en la tabla 15, de donde se concluye que la configuración absoluta para el triacetato de conacytona es la mostrada en la figura 14 (4*S*, 5*S*, 7*R*, 10*R* y 20*S*) y por lo tanto se confirma que la configuración absoluta de la conacytona (**10**) es la misma que la obtenida por difracción de Rayos-X (figura 13).

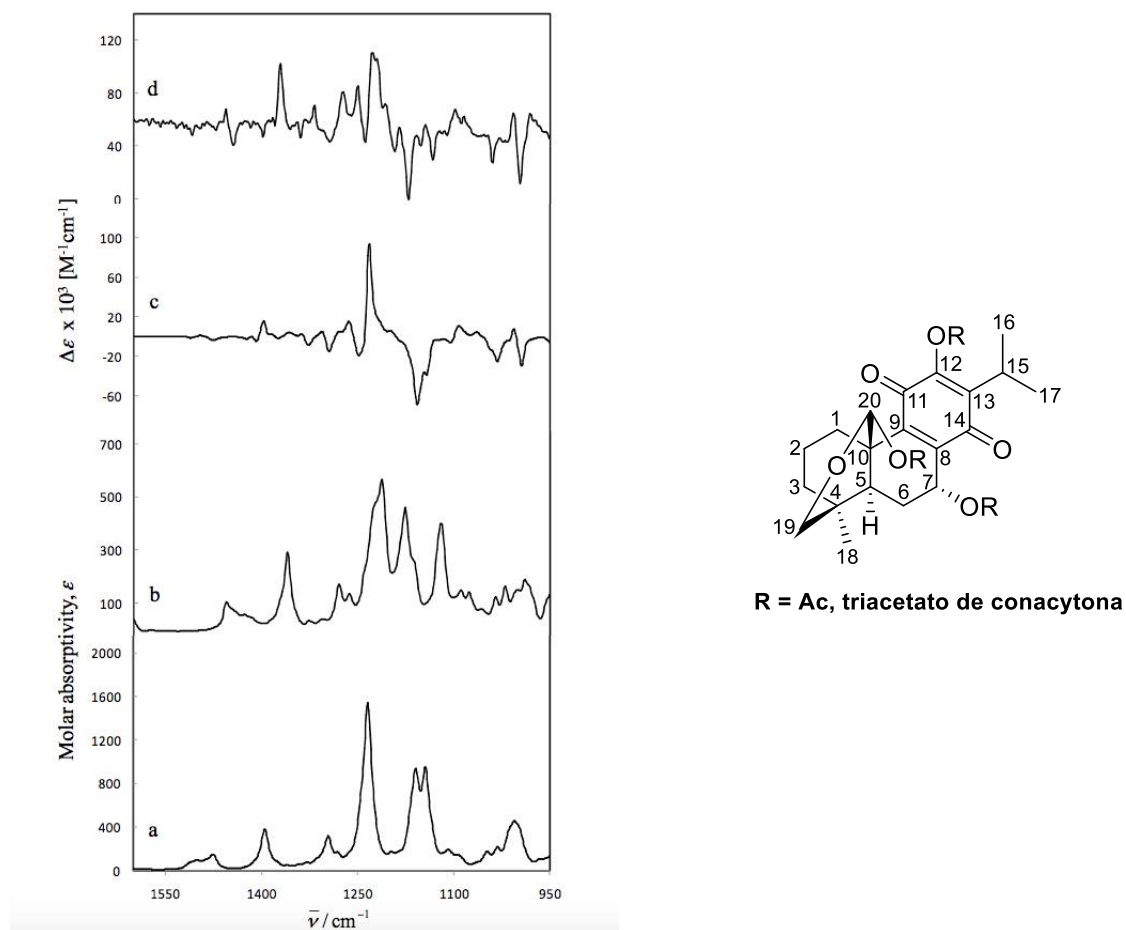


Figura 14.- Espectros de IR y DCV experimentales y calculados para el triacetato de conacytona. a IR calculado, b IR experimental, c VCD calculado y d VCD experimental

Tabla 15. Datos de Nivel de Confianza para los Espectros IR y DCV del triacetato de conacytona

Método	anH^a	S_{IR}^b	S_E^c	S_{-E}^d	ESI^e	C^f (%)
B3PW91/DGDZVP	0.989	86.7	71.3	16.8	54.5	100

^a Factor de anarmonización o escalamiento. ^b Índice de similitud del espectro de IR. ^c Índice de similitud del espectro de DCV del enantiómero correcto en %. ^d Índice de similitud del espectro de DCV del enantiómero incorrecto en %. ^e Índice de similitud enantiomérica calculado como $S_E - S_{-E}$. ^f Nivel de confianza de las asignaciones estereoquímicas en %.

En la tabla 16 se muestran los datos de RMN de 1H y ^{13}C obtenidos a 300 y 75 MHz respectivamente para la conacytona (**10**), con lo que se completa la caracterización de este diterpeno.

Tabla 16. Datos de RMN de ^1H , ^{13}C de la conacytona (**10**).

Posición	δ_{C}	Tipo*	δ_{H} (J en Hz)
1α	34.9	CH_2	1.312, <i>ddd</i> (13.72, 13.11, 6.10)
1β			2.558, <i>ddd</i> (13.11, 5.89, 1.29)
2α	21.1	CH_2	1.599, <i>dddd</i> (13.52, 6.85, 6.10, 1.29, 0.73)
2β			2.432, <i>dddd</i> (13.72, 13.68, 13.52, 6.28, 5.89)
3α	39.9	CH_2	1.469, <i>dddd</i> (13.68, 13.12, 6.85, 2.66)
3β			1.754, <i>dddd</i> (13.12, 6.28, 0.73)
4	32.5	C	
5	40.0	CH	1.725, <i>ddd</i> (14.19, 2.96, 1.43)
6α	26.2	CH_2	1.880, <i>ddd</i> (13.65, 2.96, 1.64)
6β			2.300, <i>ddd</i> (14.19, 13.65, 4.59)
7	62.2	CH	4.836, <i>ddd</i> (4.59, 2.54, 1.64)
8	145.1	C	
9	142.5	C	
10	41.6	C	
11	183.9	C	
12	151.0	C	
13	124.7	C	
14	188.8	C	
15	24.1	CH	3.192, <i>hept</i> (7.08)
16, 17	19.9, 19.8	CH_3	1.240, 1.235, <i>d</i> (7.0)
18	23.6	CH_3	0.826, <i>s</i>
19 <i>pro-R</i>	66.2	CH_2	3.877, <i>dd</i> (11.24, 2.66)
19 <i>pro-S</i>			3.349, <i>dd</i> (11.24, 1.43)
20	95.3	CH_3	5.601, <i>d</i> (2.05)
7-OH			2.220, <i>d</i> (2.54)
12-OH			7.190, <i>s</i>
20-OH			2.858, <i>d</i> (2.05)

^1H 300 MHz, ^{13}C 75 MHz, CDCl_3 . *Obtenido del espectro HSQC.

V.11 Asignaciones completas e inambiguas de los espectros de ^1H y ^{13}C de la 1,2-anhidroballotiquinona (9) y de la 7 α -Acetoxi-19-hidroxiroyleanona (11).

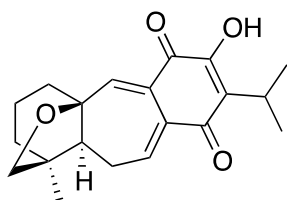
El compuesto **9** fue aislado previamente de la *Salvia candicans* en 1995 y su estructura fue asignada mediante métodos espectroscópicos.⁵ El espectro de RMN de ^1H obtenido en este trabajo coincide con el descrito previamente, sin embargo, algunas discrepancias se observan en las asignaciones del espectro de RMN de ^{13}C , por lo que en la parte experimental se incluyen las correctas con base en experimentos bidimensionales de correlación heteronuclear tales como HMBC y HSQC. El compuesto **9** no fue nombrado en el trabajo original, por lo que en este trabajo se propone el nombre de 1,2-anhidroballotiquinona (**9**) por su relación estructural con la ballotiquinona (**1**).

El producto **11** fue aislado como un polvo amarillo, sus datos espectroscópicos permiten identificarlo como la 7 α -acetoxi-19-hidroxiroyleanona, diterpeno abietánico aislado previamente de *Salvia regla* en 1987.⁶ Dado que los datos de RMN fueron obtenidos en un equipo 80 MHz, se observan varias discrepancias con los adquiridos con la muestra obtenida en este trabajo los cuales se obtuvieron en un equipo de 700 MHz. En la parte experimental de esta tesis se incluyen los datos completos y asignados sin ambigüedad para los espectros de ^1H y ^{13}C para este diterpeno.

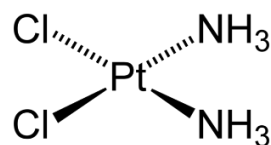
V.12 Evaluación de la actividad biológica de algunos de los diterpenos aislados de *Salvia ballotiflora*.

V.12.1 Actividad antiproliferativa³⁸

Del estudio de la actividad biológica de los compuestos aislados del género *Salvia* se ha puesto de manifiesto que algunos abietanos tienen propiedades citotóxicas y que estos actúan en diferentes blancos moleculares.^{39,40} La misma actividad biológica ha sido descrita recientemente para algunos icetexanos aislados de algunas especies de los géneros *Premna* y *Amentotaxus*.^{41,42,43} Una actividad citotóxica significativa contra células Hela,⁴⁴ comparable a la del *cis*-platino, ha sido descrita para la 19-desoxo-*iso*-icetexona (**IX**), aislada de una población diferente de *Salvia ballotiflora*.⁴⁵



19-desoxo-*iso*-icetexona (**IX**)



cis-platino

Con estos antecedentes se llevó a cabo la evaluación de la actividad antiproliferativa de los icetexanos **3**, **4**, **6-8** y del abietano **10** utilizando seis líneas celulares obtenidas de cánceres humanos (U251 = glioblastoma; PC-3 = cáncer de próstata; K562 = leucemia mielógena crónica; HCT-15 = cáncer de colon; MCF-7 = adenocarcinoma mamario; SKLU-1 = adenocarcinoma de

³⁸ En este trabajo el término antiproliferativo se usa como sinónimo de citotóxico, aunque algunos autores consideran que no son equivalentes, en la literatura se usan indistintamente.

³⁹ Akaberi, M., Mehri, S. and Iranshahi, M. *Fitoterapia*, **100**, 118-132, (2015).

⁴⁰ Guerrero, I. C., Andrés, L. S., León, L. G., Machín, R. P., Padrón, J. M., Luis, J. G. and Delgadillo, J. *J. Nat. Prod.*, **69**, 1803-1805, (2006).

⁴¹ Hui-Ling, C., Kai-Wei, L., Kim-Hong, G., Jih-Pyang, W., Shen-Jeu, W. and Chun-Nan, L. *Fitoterapia*, **82**, 219-224, (2011).

⁴² Suresh, G., Suresh Babu, K., Rama Subba Rao, V., Suri Appa Rao, M., Lakshma Nayak, V. and Ramakrishna, S. *Tetrahedron Letters*, **52**, 1273-1276, (2011).

⁴³ Gonzalez, M. A. *Nat. Prod. Rep.*, **32**, 684-704, (2015).

⁴⁴ HeLa, es la línea celular de cáncer cérvico-uterino más antigua, fueron tomadas de una paciente llamada **Henrietta Lacks**.

⁴⁵ Campos-Xolalpa, N., Alonso-Castro, A.J., Sánchez-Mendoza, E., Zavala-Sánchez, M.A., Pérez-Gutiérrez, S. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, **27**, 302-305, (2017).

pulmón) y un cultivo primario de fibroblastos gingivales humanos sanos (FGH) a concentraciones de 1 ó 50 μM , utilizando el ensayo de la sulforrodamina B.⁴⁶ Como blanco positivo se utilizó adriamicina a una concentración 0.5 μM . Los resultados de la evaluación primaria se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17. Evaluación primaria de la actividad antiproliferativa de los diterpenos **4**, **7**, **8** y **10** a una concentración de 50 μM y **3**, **6** a 1 μM , 48 h.

Compuesto	Actividad antiproliferativa (%)						
	U251	PC-3	K562	HCT-15	MCF-7	SKLU-1	FGH
3*	65.4	34.2	48.6	33.4	NC	64.5	12.4
4	100	80.3	100	76.7	99.0	96.9	87.0
6*	98.4	82.3	76.4	85.6	51.3	100	46.5
7	10.1	17.8	63.2	26.8	62.6	46.5	NC
8	35.8	39.6	83.1	29.0	71.6	52.9	NC
10	NC	NC	NC	NC	14.7	11.8	NE
Adriamicina 0.5 μM	96.0	85.2	100	86.9	99.1	90.0	53.4

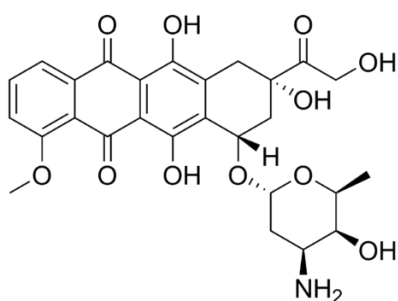
Promedio de al menos tres repeticiones; U251 = glioblastoma; PC-3 = cáncer de próstata; K562 = leucemia mielógena crónica; HCT-15 = cáncer de colón; MCF-7 = adenocarcinoma mamario; SKLU-1 = adenocarcinoma de pulmón; FGH = fibroblastos gingivales sanos; NC = No citotóxico; NE = No Ensayado;

*Compuestos probados a 1 μM por su actividad.

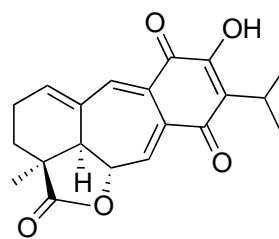
La anastomosina (**6**) muestra una actividad antiproliferativa muy significativa contra las líneas celulares U251 y SKLU-1 a una concentración de 1 μM y es moderadamente tóxica contra las líneas FGH y MCF-7, debido a esto fue uno de los productos seleccionados para la determinación de su CI_{50} (μM). Por otro lado, la 7,20-dihidroanastomosina (**7**) mostró una toxicidad moderada contra K562 y MCF-7 pero a una concentración 50 veces superior con respecto a la anastomosina (**6**). Para el icetexano **7**, se ha descrito en la literatura una actividad moderada contra células HeLa

⁴⁶ Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J. and Boyd, M. *J. Natl. Cancer. Inst.*, **83**, 757-766, (1991).

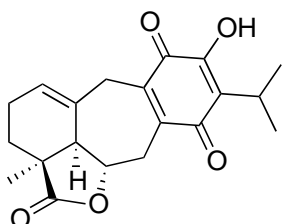
y A549,⁴⁷ pero utilizando un protocolo experimental distinto, el del MTT.⁴⁸ En forma general, la actividad de **7** es menor que la de **6**. Esto sugiere que la presencia de un mayor número de dobles ligaduras conjugadas y en consecuencia una mayor rigidez y planaridad es importante para la actividad citotóxica de la anastomosina (**6**). Es interesante señalar que la actividad anticancerosa de la adriamicina se debe a su capacidad de intercalarse en el ADN debido a su rigidez y planaridad, por lo que podría especularse que la anastomosina (**6**) podría ejercer su actividad citotóxica por un mecanismo de acción similar.



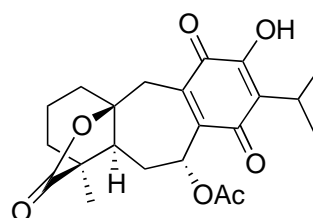
adriamicina (doxorubicina)



anastomosina (6)



7,20-dihidroanastomosina (7)



7a-acetoxi-6,7-dihidroicetexona (3)

Otro de los icetexanos activos en este bioensayo es la 7 α -acetoxi-6,7-dihidroicetexona (**3**), la cual a una concentración de 1 μ M mostró una actividad significativa, aunque moderada, contra las líneas U-251 y SKLU-1, siendo prácticamente no tóxica a las líneas MCF-7 y FGH. Estas características, resaltadas en la Tabla 17, fueron tomadas en cuenta para obtener la CI_{50} (μ M) de **3** contra las líneas U-251 y SKLU-1. Por otro lado, la icetexona (**8**), la cual está muy relacionada

⁴⁷ Línea celular de adenocarcinoma alveolar humano.

⁴⁸ Método colorimétrico para cuantificar la actividad metabólica celular mediante la reducción por las reductasas mitocondriales del bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólio (MTT).

estructuralmente con el producto **3**, mostró una actividad significativa contra las líneas K562 y MCF-7 a una concentración de 50 μM , además de carecer de toxicidad contra las células sanas FGH, siendo su actividad contra el resto del panel de prueba solo moderada. Debido a su falta de toxicidad contra células sanas y a la selectividad mostrada contra las líneas K562 y MCF-7 se procedió a obtener su CI_{50} (μM). La comparación de los resultados obtenidos para **3** y **8** sugieren que la ausencia de la doble ligadura entre las posiciones C-6:C-7 y la presencia de una función oxigenada en C-7 en el producto **3** incrementan la citotoxicidad de este compuesto cuando lo comparamos con la icetexona (**8**). El icetexano aromático (**4**) y la conacytona (**10**) fueron descartados para experimentos posteriores debido a la alta toxicidad que mostró el compuesto **4** en todo el panel de células y a la no toxicidad de **10** como puede apreciarse en la Tabla 17.

Con base en la discusión previa y tomando en cuenta los resultados mostrados en la Tabla 17, los diterpenos **3** y **6-8** fueron seleccionados para obtener su CI_{50} (μM) y su índice de selectividad (IS).⁴⁹ Este último se obtiene dividiendo la CI_{50} en células normales entre la CI_{50} en células cancerosas y es una medida de la selectividad de un compuesto hacia las células cancerosas tomando como referencia la actividad sobre células sanas. De esta forma se considera que un $\text{IS} > 6$ indica que la sustancia es selectiva y daña preferentemente a las células malignas, un valor de IS en el intervalo $3 < \text{IS} < 6$ implica una baja selectividad y un valor de $\text{IS} < 3$ significa que el compuesto es muy citotóxico, inhibe la proliferación de células normales y cancerosas siendo igualmente citotóxico para ambas. Un valor de $\text{IS} > 6$ es lo deseable ya que indica que la inhibición de la proliferación de las células cancerosas puede deberse a un mecanismo diferente a una citotoxicidad general y es probable que la sustancia tenga un mecanismo de acción específico. Los valores de CI_{50} (μM) para los diterpenos **3** y **6-8** se muestran en la Tabla 18.

⁴⁹ Badisa, R. B., Mina, D.A., Latinwo, L. M., Soliman, K. F. A. *Anticancer Res.*, **34**, 5447–5452, (2014).

Tabla 18. Valores de CI_{50} (μM) para la actividad antiproliferativa de los compuestos **3**, **6**, **7**, y **8**.

Compuesto	CI_{50} (μM) (IS)				
	U251	SKLU-1	COS-7	K562	MCF-7
3	1.4 \pm 0.03 (1.2)	0.82 \pm 0.06 (2.0)	1.62 \pm 0.1		
6	0.27 \pm 0.08 (2.3)	0.46 \pm 0.05 (1.3)	0.61 \pm 0.007		
7				31.2 \pm 1.1	33.24 \pm 1.2
8				17.0 \pm 1.4	28.7 \pm 1.6
Adriamicina	0.08 \pm 0.003 (3.1)	0.05 \pm 0.003 (5.0)	0.25 \pm 0.009	0.20 \pm 0.02	0.23 \pm 0.02

Los resultados representan el promedio \pm DE de al menos tres experimentos independientes; U251= glioblastoma; SKLU-1 = adenocarcinoma de pulmón; K562 = leucemia mielógena crónica; MCF-7 = adenocarcinoma mamario; COS-7 células normales de riñón de mono; IS = índice de selectividad.

La anastomosina (**6**) y la 7 α -acetoxi-6,7-dihidroicetexona (**3**) fueron los productos más activos con valores de $CI_{50}(\mu M) = 0.27 \pm 0.08$ y 1.4 ± 0.03 , respectivamente para la línea U251 y $CI_{50}(\mu M) = 0.46 \pm 0.05$ y 0.82 ± 0.06 para la línea de adenocarcinoma de pulmón (SKLU-1). El valor de CI_{50} para el compuesto **6** en el caso de la línea U251 es tan solo 3.4 veces superior al de la adriamicina, mientras que para la línea celular SKLU-1 el valor de la IC_{50} es 9.2 veces superior. Estos resultados indican que la anastomosina (**6**) tiene una potencia que se aproxima a la adriamicina. Por otro lado, en el caso del producto **3** las CI_{50} son 17.5 y 16.4 veces superiores al control positivo, en las líneas U251 y SKLU-1, respectivamente. Para evaluar la selectividad de los diterpenos **3** y **6** se obtuvieron las respectivas CI_{50} utilizando la línea celular normal COS-7 obtenida de riñón de mono. Para obtener el IS también se obtuvo la CI_{50} para la adriamicina en la misma línea. Los valores del índice de selectividad calculados se muestran en la tabla 18 entre paréntesis, los cuales indican que los diterpenos **6** y **3** muestran una baja selectividad, mientras que la adriamicina muestra una selectividad moderada. La CI_{50} obtenida para los diterpenos **7** y **8** fue tan alta comparada con el control positivo que no se procedió a obtener su índice de selectividad.

Con los datos a la mano no se pueden establecer relaciones estructura-actividad biológica, sin embargo, con estos resultados los compuestos **3** y **6** deben de ser evaluados en otras líneas celulares

cancerosas y sometidos a los experimentos pertinentes para comprender mejor el mecanismo de acción que origina a su actividad antiproliferativa.

V.12.2 Actividad antiinflamatoria en el modelo del edema inducido por TPA⁵⁰

Tomando como base a algunos diterpenos de tipo labdano, abietano y clerodano que tienen una actividad antiinflamatoria significativa,^{39,41,51} se decidió evaluar los productos **3**, **6**, **7** y **10** como antiinflamatorios en el modelo de inflamación aguda inducida por TPA en oreja de ratón.⁵² En un experimento utilizando una concentración de 1.0 $\mu\text{mol}/\text{oreja}$, los diterpenos **6** y **7** no mostraron una actividad significativa, mientras que **3** y **10** mostraron un porcentaje de inhibición de $37.4 \pm 2.8\%$ y $25.4 \pm 3.0\%$, respectivamente. Estos resultados se muestran en la tabla 19.

Tabla 19. Efecto antiinflamatorio de los compuestos **3**, **6**, **7** y **10** en el modelo de inflamación aguda inducida por TPA en oreja de ratón.

Compuesto	Edema (mg)	Inhibición del edema (%)
Control (TPA)	15.77 ± 0.78	
3	$9.87 \pm 0.44^{**}$	$37.4 \pm 2.8^{**}$
6	15.97 ± 0.61	NA
7	15.50 ± 0.76	NA
10	$11.77 \pm 0.47^{**}$	$25.4 \pm 3.0^{**}$
Indometacina	$2.88 \pm 0.73^{**}$	$78.8 \pm 7.7^{**}$
Celecoxib	$6.94 \pm 1.56^*$	54.3 ± 10.3

Efecto en el edema inducido en oreja de ratones hembras CD-1; Concentración ($1.0 \mu\text{mol oreja}^{-1}$); cada valor representa el promedio $3 - 7$ animales \pm EEM; Los resultados fueron analizados con la prueba de *Dunnett*; Los valores $p \leq 0.05$ (*) y $p \leq 0.01$ (**) fueron considerados como diferencias significativas con respecto al grupo control. NA = No activo.

Aunque los diterpenos **3** y **10** mostraron una reducción significativa en el edema inducido, su actividad es menor a la indometacina ($78.8 \pm 7.7\%$) y al celecoxib ($54.3 \pm 10.3\%$) que fueron usados como compuestos de referencia. La inhibición del edema en el caso de la indometacina es

⁵⁰ TPA es el 12-O-tetradecanoil-13-acetilforbol.

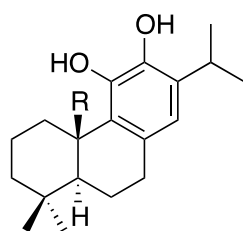
⁵¹ Salae, A.-W., Rodjun, A., C. Karalai, Ponglimanont, C., Chantrapromma, S., Kanjana-Opas, A., Tewtrakul, S.; and Fun, H.-K. *Tetrahedron*, **68**, 819–829, (2012).

⁵² Carlson, R.P., O'Neill-Davis, L., Chang, J. and Lewis, A.J. *Agent Actions*, **17**, 197-204, (1985).

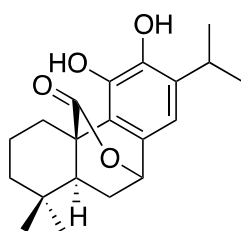
el doble y el triple de la correspondiente a los diterpenos **3** y **10**, respectivamente. Por otro lado, el celecoxib es 1.5 veces más activo que el icetexano **3** y 2 veces más que la conacytona (**10**).

V.12.3 Actividad antioxidante, evaluada mediante la reacción de captura del radical DPPH⁵³

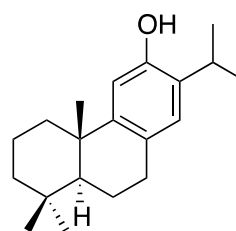
Tomando en cuenta que los diterpenos aislados de esta población de *S. ballotiflora* presentan el anillo C oxidado ya sea a una *o*-hidroxi-*p*-benzoquinona o a un sistema bencénico y dado que se ha descrito un efecto antioxidante para algunos diterpenos con estas características estructurales, se decidió evaluar la actividad antioxidante de los diterpenos **3**, **6-8** y **10** (con una *o*-hidroxi-*p*-benzoquinona) y el diterpeno **4** (anillo C de tipo bencénico) utilizando el modelo de captura del radical DPPH.⁵⁴ En una serie de experimentos a una concentración de 100 μM los compuestos **3**, **6-8** y **10** tuvieron un efecto de inhibición muy bajo de 6.1, 8.2, 6.6, 3.7 y 4.8%, respectivamente. En estos experimentos solo el compuesto **4** inhibió el radical DPPH en un 64.5% por lo que se procedió a obtener su CI_{50} , la cual fue de $98.4 \pm 3.5 \mu\text{M}$. Al compararlo con dos compuestos de referencia, el α -tocoferol ($\text{CI}_{50} = 31.7 \pm 1.0 \mu\text{M}$) y quercetina ($\text{CI}_{50} = 10.9 \pm 0.5 \mu\text{M}$), el diterpeno **4** resultó ser 3 y 10 veces menos activo, respectivamente (Figura 15). Se ha descrito previamente que compuestos de tipo fenólico poseen fuerte actividad antioxidante. En el campo de los diterpenos, compuestos como el ácido carnósico,⁵⁵ el carnosol⁵⁶ y el ferruginol⁵⁷ y derivados, poseen fuertes efectos antioxidantes y son al igual que el producto **4** diterpenos de tipo aromático derivados del abietano.



R = COOH, ácido carnósico



carnosol



ferruginol

⁵³ DPPH es la abreviatura utilizada para el radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo

⁵⁴ Mellors, A. and Tappel, A.L. *J. Biol. Chem.*, **241**, 4353-4356, (1966).

⁵⁵ Escuder, B., Torres, R., Lissi, E., Labbé, C. and Faine, F. *Nat. prod. Let.*, **16**, 277-281, (2002).

⁵⁶ Ai-Hsiang, L., Yu-Chih L., Shoei-Yn, L. S., Chi-Tang, H. and Jen-Kun, L. *Carcinogenesis*, **23**, 983-991, (2002).

⁵⁷ Saijo, H., Kofujita, H., Takahashi, K. and Ashitani, T. *Nat. Prod. Res.*, **29**, 1739-1743, (2015).

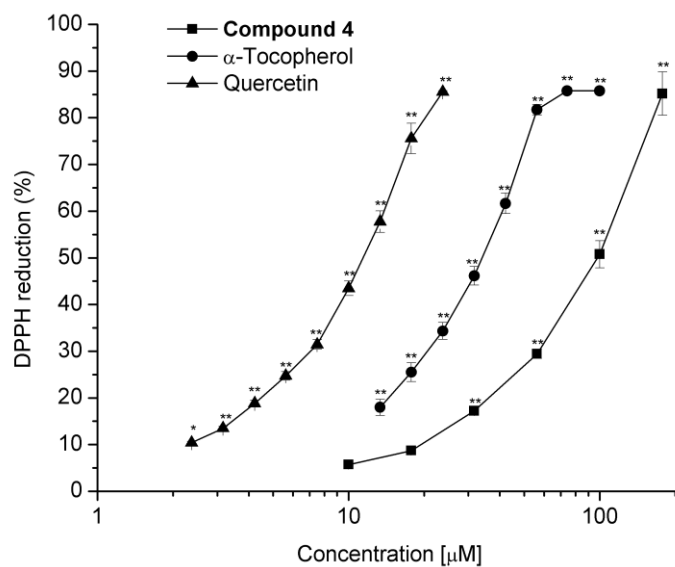


Figure 15. Curva dosis-respuesta para determinar la CI_{50} del producto 4 como atrapador del radical DPPH. Se incluyen las correspondientes al α -tocoferol y la quercetina para comparación. Los valores representan el promedio de al menos tres experimentos \pm EEM, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ diferencias significativas comparadas con el grupo control (se aplicó una ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Dunnett).

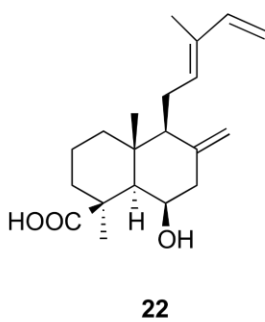
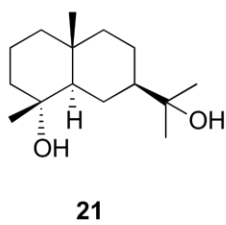
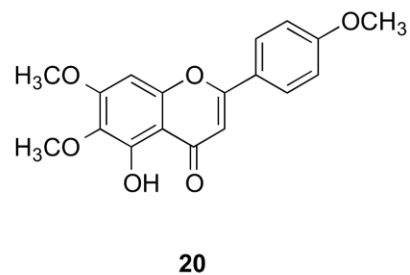
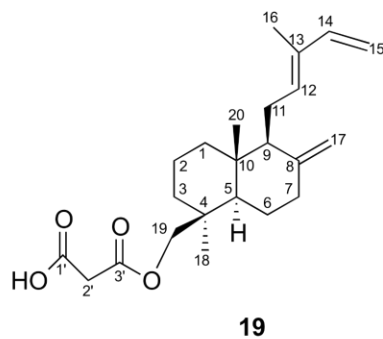
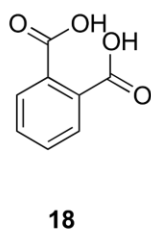
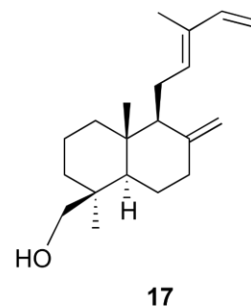
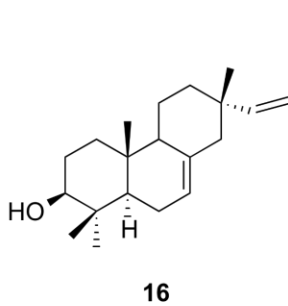
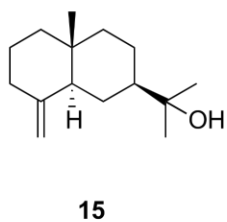
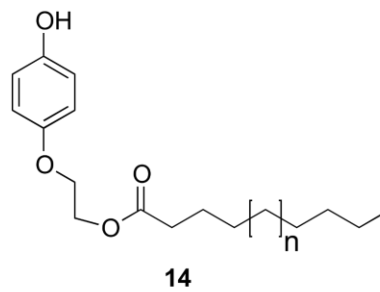
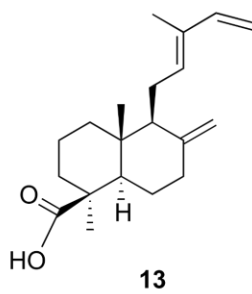
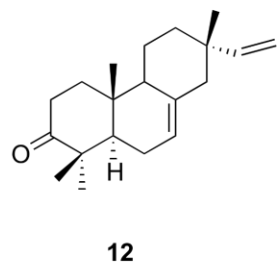
V.13 Aislamiento de los metabolitos secundarios de *Salvia cinnabarina* M. et G. Elucidación estructural del malonilcommunol y del ácido 6 β -hidroxi-trans-communico, dos nuevos diterpenos con esqueleto de labdano. Primeros ejemplos de diterpenos con esqueleto de labdano de una salvia mexicana.

La *Salvia cinnabarina* M. et G. es una especie clasificada de acuerdo con Epling en la sección Incarnatae del Subgénero *Calosphace*. Se han realizado estudios químicos previos sobre esta especie en relación a la composición de su aceite esencial⁵⁸ y del exudado de la superficie foliar.⁵⁹ De este último se aisló y describió el ácido 3,4-*secoisopimara*-4(18),7,15-trien-3-oico (**XI**), el cual ha mostrado una gran diversidad de actividades biológicas las cuales se han descrito en el capítulo de “Generalidades” de esta Tesis. Estos estudios se han realizado con material cultivado en el Jardín Botánico Hanbury de La Mortola en Ventimiglia, Italia.

En esta tesis se describe el primer estudio realizado sobre una población silvestre de esta especie, recolectada en el Estado de Puebla. Del extracto de CH₂Cl₂ de las partes aéreas de esta planta se obtuvieron mediante sucesivas separaciones cromatográficas once metabolitos secundarios, los cuales se muestran, en el orden en que fueron separados, en el esquema 2. Los compuestos **12** y **16** son diterpenos con esqueleto de pimarano y las sustancias **13**, **17**, **19** y **22** poseen esqueleto de labdano. Se aislaron e identificaron dos sesquiterpenos, **15** y **21**, pertenecientes al grupo del eudesmano, así como un flavonoide, identificado como salvigenina (**20**) y dos productos aromáticos más identificados como ácido ftálico y una mezcla de ésteres de ácidos grasos con el tirosol (**14**).

⁵⁸ Bisio A., Ciarallo, G., Romussi, G., Fontana, N., Mascolo, N. Capasso, R. and Biscardi, D. *Phytother. Res.* **12**, S117-S120, (1998).

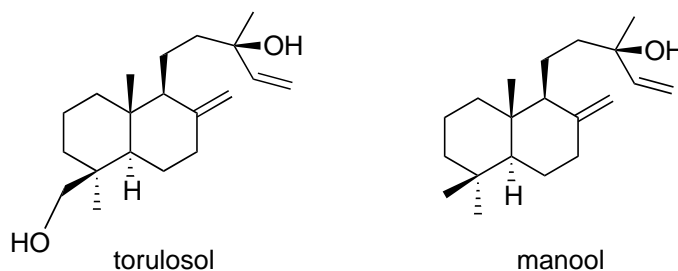
⁵⁹ Romussi, G., Ciarallo, G., Bisio, A., Fontana, N., De Simone, F., De Tommasi, N., Mascolo, N., Pinto, L. *Planta Medica*, **67**, 153-155, (2001).



Esquema 2. Productos naturales aislados de *S.cinnabarina* M. et G.

V.14 Diterpenos con esqueleto de labdano aislados de *S. cinnabarina*. El ácido *trans*-communico y el comunol.

Es importante destacar la presencia de los productos **13**, **17**, **19** y **22** los cuales fueron identificados como diterpenos derivados del esqueleto del labdano, siendo esta la primera ocasión que se aíslan este tipo de sustancias de una salvia mexicana perteneciente al subgénero *Calosphace*. El compuesto **13** fue identificado como el ácido *trans*-communico con base en sus propiedades espectroscópicas obtenidas y por comparación con los datos descritos en la literatura para el ácido natural,⁶⁰ su sal sódica y sus derivados.⁶¹ El ácido *trans*-communico (**13**) ha sido aislado de diversas fuentes naturales,⁶² siendo aislado por primera vez de *Juniperus communis* L. (Cupressaceae).⁶³ La estructura y configuración de este compuesto fue establecida mediante un extenso trabajo químico y por correlación con labdanos de configuración conocida tales como el torulosol y el manool.⁵⁹



Una revisión de la literatura indica que no se ha confirmado la configuración absoluta del ácido *trans*-communico (**13**) por difracción de Rayos-X ya que se ha descrito que es un producto inestable, sensible al medio ácido y que polimeriza con el tiempo. En 1987 Shie-Ming Peng y colaboradores aíslan el ácido *trans*-communico (**13**) de las hojas frescas de *Calocedrus formosana*, pero lo transforman en el éster metílico por tratamiento con diazometano, para obtener la difracción de Rayos-X de este derivado más estable, confirmando la estructura y configuración relativa de **13** y de su éster metílico.⁶⁰

La muestra de ácido *trans*-communico (**13**) obtenida de *S. cinnabarina* fue manejada con el cuidado suficiente para ser cristalizada y obtener la difracción de Rayos-X del producto natural

⁶⁰ Gene-Hsiang, L., Chun-Chi, L., Yu-Shia, C. and Shie-Ming, P. *Acta Cryst.* **C43**, 1382-1384, (1987).

⁶¹ Arya, V. P., Erdtman, H. and Kubota, T. *Tetrahedron*, **16**, 225-263, (1961).

⁶² Barrero, A. F., Herrador, M. M., Arteaga, P., Arteaga, J.F. and Arteaga A.F. *Molecules*, **17**, 1448-1467, (2012).

⁶³ Arya, V. P., Enzell, C., Erdtman, H. and Kubota, T. *Acta Chem. Scand.* **15**, 225-226, (1961).

directamente. La figura 16 muestra la proyección generada por computadora del enantiómero natural del ácido *trans*-communico (**13**). La configuración absoluta fue confirmada al calcular el parámetro de Flack cuyo valor, $x = 0.1(3)$, confirma la configuración absoluta mostrada en la estructura **13**. La configuración absoluta en los centros de quiralidad de **13** es: $4S$, $5R$, $9S$ y $10R$.

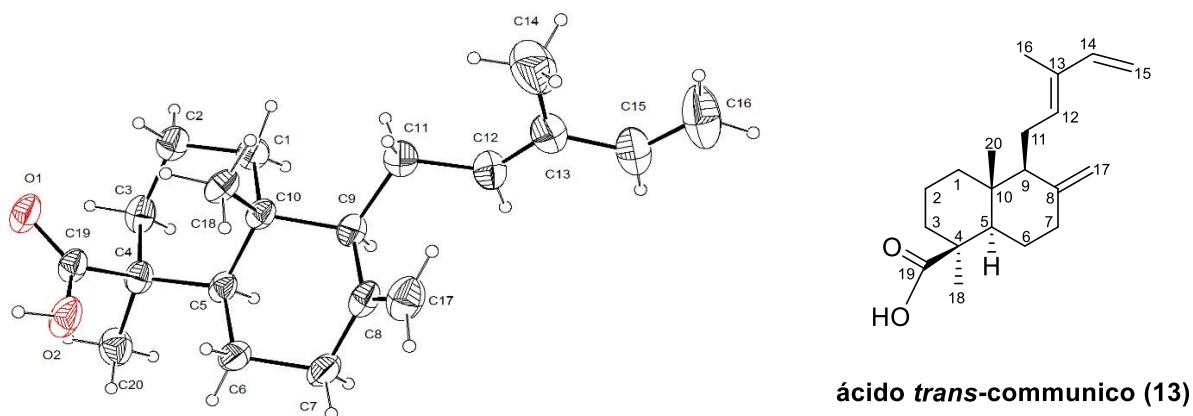


Figura 16. Perspectiva generada por computadora del ácido *trans*-communico (**13**) mostrando la configuración absoluta obtenida mediante el parámetro de Flack.

El ácido *trans*-communico (**13**) no ha sido descrito en el género *Salvia* y como se ha mencionado previamente este tipo de diterpenos pertenecientes al grupo del labdano no habían sido descritos de salvias mexicanas.

Otro de los labdanos aislados de esta especie fue identificado como communol (**17**), el cual fue obtenido por primera vez por reducción con LiAlH_4 del éster metílico del ácido *trans*-communico (**13**).⁶³ El communol (**17**) ha sido aislado de diversas fuentes naturales, tales como *Pinus*

thunbergii,⁶⁴ *Chamaecyparis obtusa*,⁶⁵ *C. formosensis*⁶⁶ y *Fritillariae thunbergii*⁶⁷ entre otras. El communol (**17**) ha sido identificado también en los productos de pirólisis del ámbar.⁶⁸

V.15 Elucidación estructural del malonilcommunol (**19**), un nuevo diterpeno con esqueleto de labdano de *Salvia cinnabarina*.

El compuesto **19**, fue aislado como un producto sólido que presentó un p. f. = 85-90 °C, el espectro de masas obtenido por la técnica DART permite establecer una fórmula $C_{23}H_{34}O_4$ y un grado de insaturación $\Omega = 7$. El espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 23, Tabla 20) corrobora la presencia de 23 átomos de carbono, los cuales corresponden, de acuerdo con el espectro HSQC (Espectro 24, Tabla 20) a 10 metilenos (CH_2 , dos con hibridación sp^2 y los 8 restantes sp^3), 4 metinos (CH , dos sp^2 y dos sp^3), 6 carbonos cuaternarios (C , cuatro sp^2 y 2 sp^3) y 3 metilos (CH_3). En el espectro 23 se observan en 147.7 (C) y 108.2 (CH_2) ppm las señales para un metileno exocíclico como el presente entre las posiciones C-8:C-17 del ácido *trans*-communico (**13**) y el communol (**17**). En 141.7 (CH) y 110.1 (CH_2) ppm se observan las señales para los átomos de carbono de un grupo vinilo terminal, las cuales junto con las observadas en 133.8 (CH), 133.7 (C), 23.3 (CH_2) y 12.0 (CH_3) ppm permiten concluir que el compuesto **19** posee una cadena lateral idéntica a la presente en los diterpenos **13** y **17**. Las señales en 141.7 y 110.1 ppm se asignan, en consecuencia, a los carbonos de las posiciones C-14 y C-15, respectivamente y las observadas en 133.8, 133.7, 23.3 y 12.0 ppm, corresponden por lo tanto a C-12, C-13, C-11 y al metilo C-16. El desplazamiento químico de C-14 (141.7) y C-16 (12.0), permiten confirmar que la configuración del doble enlace de las posiciones C-12:C-13 es *E* (*trans*). El desplazamiento químico de estos átomos de carbono es muy sensible a la configuración de dicha doble ligadura, observándose en aproximadamente 130 y 20 ppm en el caso de una doble ligadura *Z* (*cis*).^{69,70}

⁶⁴ Shpatov, A. V., Popov, S. A., Salnikova, O. I., Khokhrina, E. A., Shmidt, E. N. and Um, B. H. *Natural Product Communications*, **8**, 1759-1762 (2013).

⁶⁵ Fukushima, J., Yatagai, M. and Ohira, T. *Journal of Wood Science*, **48**, 326-330, (2002).

⁶⁶ Lin, T., Fang, J. and Cheng, Y. *Phytochemistry* **51**, 793-801, (1999).

⁶⁷ Kitajima, J., Noda, N., Ida, Y., Komori, T. and Kawasaki, T. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **30**, 3922-3931, (1982).

⁶⁸ Poulin, J. and Helwig, K. *Organic Geochemistry* **86**, 94-106, (2015).

⁶⁹ Garbarino, J. A. and Molinari, A. *J. Nat. Prod.* **56**, 624-626, (1993).

⁷⁰ Noma, M., Suzuki, F., Gamou, K. and Kawashima, N. *Phytochemistry*, **21**, 395-397, (1982).

Tabla 20. Datos de RMN de ^1H , ^{13}C y correlaciones HMBC de **19**.

Posición	δ_{C}	Tipo*	δ_{H} (J en Hz)	HMBC
1a	39.0	CH ₂	1.83, <i>da</i> (12.5)	2, 3, 5, 20
1b			1.13, <i>td</i> (13.5, 5.4)	2, 3, 5, 10, 20
2a	19.0	CH ₂	1.52, <i>m</i>	1, 3, 4
3a	36.2	CH ₂	1.73, <i>da</i> (13.0)	1, 2, 4, 5, 18, 19
3b			1.04, <i>td</i> (13.0, 5.5)	1, 2, 4, 18, 19
4	37.6	C		
5	56.2	CH	1.30, <i>da</i> (12.5)	1, 6, 7, 18, 19, 20
6a	24.3	CH ₂	1.83, <i>da</i> (12.5)	5, 8
6b			1.34, <i>dc</i> (12.8, 3.8)	5, 7
7a	38.3	CH ₂	2.39, <i>da</i> (14.0)	5, 6, 9, 17,
7b			1.97, <i>td</i> (13.0, 6.5)	5, 6, 8, 17
8	147.7	C		
9	57.2	CH	1.75, <i>da</i> (13.0)	8, 11, 12, 17, 20
10	39.5	C		
11a	23.3	CH ₂	2.36, <i>m</i>	8, 9, 12, 13, 14, 17
11b			2.14, <i>m</i>	8, 9, 12, 13, 14
12	133.8	CH	5.39, <i>t</i> (6.2)	9, 11, 14, 16
13	133.7	C		
14	141.7	CH	6.32, <i>dd</i> (17.3, 10.7)	12, 13, 16
15a	110.1	CH ₂	5.04, <i>d</i> (17.0)	12, 13, 14
15b			4.88, <i>d</i> (10.7)	12, 13, 14
16	12.0	CH ₃	1.74, <i>s</i>	12, 13, 14
17a	108.2	CH ₂	4.82, <i>sa</i>	6, 7, 8
17b			4.47, <i>sa</i>	6, 7, 8, 9
18	27.6	CH ₃	0.97, <i>s</i>	3, 5, 19,
19a	68.5	CH ₂	4.38, <i>d</i> (10.9)	3, 5, 3', 18
19b			3.95, <i>d</i> (10.9)	3, 5, 3', 18
20	15.4	CH ₃	0.72, <i>s</i>	1, 5, 9, 10,
1'	169.6	C		
2'	40.7	CH ₂	3.41, <i>s</i>	1', 3', 19
3'	168.3	C		

^1H 700 MHz, ^{13}C 175 MHz, CDCl₃. *Obtenido del espectro HSQC.

En el espectro de RMN de ^1H de **19** (Espectro 25, Tabla 20), el cual es similar al del comunol (**17**), se observan las señales para el grupo vinilo terminal en 6.32 (1H, *dd*, $J= 17.15$ y 10.7 Hz, H-14), 5.04 (1H, *d*, $J= 17.15$ Hz, H-15*t*) y 4.88 (1H, *d*, $J= 10.7$ Hz, H-15*c*). Una señal triple en 5.39 ppm ($J= 6.2$ Hz) se asigna a H-12 y una señal simple que integra para tres átomos de hidrógeno observada en 1.74 ppm se atribuye al metilo C-16. Las señales características para los átomos de hidrógeno del metileno exocíclico de la posición C-17, se observan en el espectro 25 en 4.82 y 4.47 ppm como una señal simple ancha.

Otra señal relevante para la asignación estructural del diterpeno **19**, observada en su espectro de RMN de ^1H (Espectro 25), como una señal simple que integra para dos átomos de hidrógeno en 3.41 ppm, el cual desaparece al obtener el espectro en presencia de D_2O . Esta señal correlaciona en el espectro de HMBC (Espectro 26, Tabla 20) con tres señales en el espectro de RMN de ^{13}C , localizadas en 169.6, 168.3 y en 68.5 ppm. Las dos primeras se asignan a los carbonilos de un ácido y de un éster respectivamente y la tercera a un metileno (Espectro 24, HSQC, Tabla 20) cuyas señales en el espectro de RMN de ^1H se observan como un sistema AB en 4.38 y 3.95 ppm ($J= 10.9$). El espectro en el IR de **19** es congruente con la existencia de un ácido carboxílico y de un grupo éster en este compuesto, ya que se observa una banda ancha centrada en aproximadamente 3000 cm^{-1} característica de un $-\text{OH}$ de ácido y un carbonilo en 1721 cm^{-1} correspondiente al carbonilo de este grupo funcional. En 1736 cm^{-1} se observa otra banda de carbonilo que corresponde al carbonilo del éster evidenciado por el espectro de RMN de ^{13}C . Los datos anteriores permiten concluir con la presencia de un éster del ácido malónico en la posición C-19 y la similitud entre los espectros de RMN del comunol (**17**) y los de **19** indican que este último es el malonilcomunol (**19**).

El espectro NOESY (Espectro 27, Figura 17) confirma la estructura y estereoquímica relativa propuesta para este nuevo diterpeno aislado de *S. cinnabarina*, ya que se observan las interacciones esperadas, las cuales se ilustran en la Figura 17.

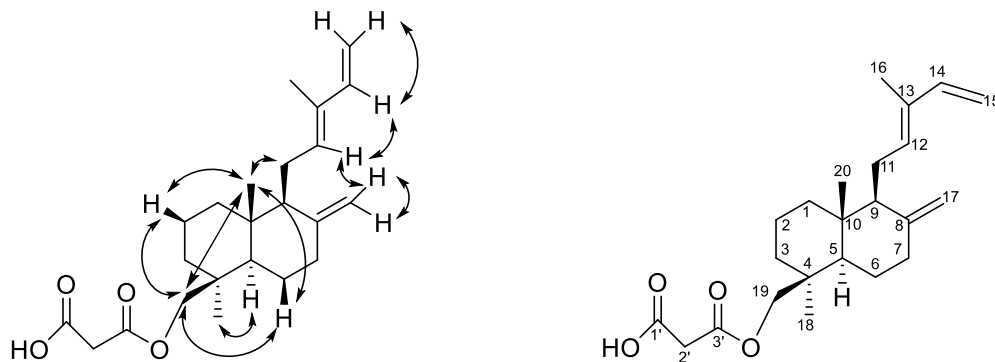
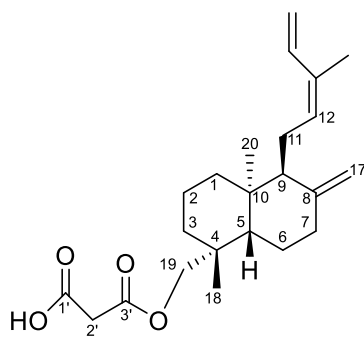


Figura 17. Interacciones NOESY observadas para el malonilcommunol (**19**).

En 1993 Garbarino y Molinari⁶⁷ aislaron un malonato de un labdano de *Calceolaria corymbosa* (Scrophulariaceae) para el cual asignaron la estructura mostrada a continuación. Aunque este diterpeno y el producto **19** tienen la misma conectividad, se observan diferencias importantes en la configuración con respecto al malonilcommunol (**19**). La doble ligadura entre los carbonos C-12 y C-13 del diterpeno de *C. corymbosa* tiene una configuración *Z* y de acuerdo con los autores pertenece a la serie *ent*-labdano, pero con una configuración epimérica en C-9, ya que la orientación de la cadena lateral en un *ent*-labdano debería de ser α .



Diterpeno aislado de *Calceolaria corymbosa*

Los malonatos de diterpenos son relativamente comunes habiéndose descrito varios ejemplos e incluso productos en los cuales ambas funciones ácidas del ácido malónico se encuentran

esterificadas con alcoholes diterpénicos.^{71,72,73,74,75} El producto **19** es el primer malonato diterpénico descrito en el género *Salvia*.

V.16 Elucidación estructural del ácido 6 β -hidroxi-*trans*-communico (**22**)

El último labdano aislado del extracto clorofórmico de la *S. cinnabarina* es un sólido blanco de p. f. de 170-173 °C, cuya fórmula molecular establecida por espectrometría de masas es C₂₀H₃₀O₃. En el espectro en el IR de esta sustancia se observan bandas características para grupos –OH en 3684, 3590 y 3531 cm⁻¹, así como una banda ancha centrada en aproximadamente 3000 cm⁻¹ que se atribuye al grupo hidroxilo de un ácido carboxílico, cuyo grupo carbonilo se observa en 1725 cm⁻¹. En este mismo espectro se observan señales atribuibles a dobles ligaduras en 1647 y 1605 cm⁻¹. Estos datos sumados a los de RMN de ¹H y de ¹³C permiten proponer la estructura **22** para este diterpeno. El espectro de RMN de ¹H (Espectro 28, Tabla 21) de esta sustancia presenta señales similares a las observadas para el ácido *trans*-communico (**13**). La principal diferencia es debida a la presencia en el espectro de **22** de un cuarteto ancho centrado en 4.52 ppm que se asigna al átomo de hidrógeno geminal a un grupo hidroxilo el cual interacciona con una señal simple ancha en 1.46 ppm y con las señales de un metileno en 2.34 y 2.50 ppm de acuerdo con las correlaciones observadas en su espectro COSY (Espectro 29). La señal en 1.46 ppm correlaciona en el espectro de HSQC (Espectro 30, Tabla 21) con un carbono sp³ que se observa en 57.47 ppm en el espectro de RMN de ¹³C de **22** (Espectro 31, Tabla 21) el cual se asigna por su desplazamiento químico a C-5. Estos hechos permiten localizar el grupo hidroxilo en la posición C-6 y la forma de la señal observada para su átomo de hidrógeno geminal, (H-6) indican una orientación β -*axial* para el mismo. El análisis del espectro NOESY (Figura 18) confirma la estructura y la estereoquímica relativa asignada a este producto, ya que se observan las correlaciones esperadas, siendo las más relevantes las de H-5 con H-6 y el metilo C-18.

⁷¹ Fraga, B. M., Mestres, T., Díaz, C. E. and Arteaga, J. M. *Phytochemistry*, **35**, 1509-1512, (1994).

⁷² Toyota, M. and Asakawa, Y. *Phytochemistry*, **34**, 751-753, (1993).

⁷³ Urones J. G., Marco, I. S., Cubillo, L., Martín-Garrido, N. and Basabe, P. *Phytochemistry*, **29**, 2223-2228, (1990).

⁷⁴ Zdero, C., Bohlmann, F., Solomon, J. C., King, R. M. and Robinson, H. *Phytochemistry*, **28**, 531-542, (1989).

⁷⁵ Langenbahn, U., Burkhardt, G. and Becker, H. *Phytochemistry*, **36**, 1173-1179, (1993).

Tabla 21. Datos de RMN de ^1H , ^{13}C y correlaciones HMBC de **22**.

Posición	δ_{C}	Tipo*	δ_{H} (J en Hz)	HMBC
1a	20.19	CH ₂	1.76, <i>cd</i> (14.3, 3.5)	3
1b			1.56, <i>dt</i> (14.3, 2.8)	10
2a	41.55	CH ₂	1.88, <i>da</i> (13.0)	1, 3, 10, 20
2b			1.19, <i>td</i> (13.3, 3.7)	1, 3, 9, 10, 20
3	40.38	CH ₂	2.38, <i>da</i> (13.0)	1, 2, 4
			1.01, <i>td</i> (13.3, 3.3)	1, 4, 5, 18, 19
4	46.58	C		
5	57.47	CH	1.46, <i>sa</i>	4, 6, 9, 10, 18, 19, 20
6	67.89	CH	4.52, <i>ca</i> (2.1)	4, 5, 7, 8, 10
7a	45.44	CH ₂	2.50, <i>dd</i> (13.6, 2.6)	5, 6, 8, 9, 17
7b			2.34, <i>da</i> (13.2)	6, 8, 9, 17
8	133.9	C		
9	56.72	CH	1.82, <i>da</i> (11.1)	5, 7, 8, 10, 11, 17, 20
10	41.33	C		
11a	23.35	CH ₂	2.40, <i>dd</i> (14.0, 6.0),	8, 9, 12, 13, 15
11b			2.23, <i>ddd</i> (16.6, 11.3, 6.8)	9, 12, 13
12	132.9	CH	4.43, <i>ta</i> (6.43)	9, 11, 14, 16
13	142.3	C		
14	141.4	CH	6.32, <i>dd</i> (17.4, 10.8)	12, 16
15	110.3	CH ₂	5.06, <i>d</i> (17.4)	11, 12, 14
			4.90, <i>d</i> (10.7)	11, 12, 14
16	11.86	CH ₃	1.76, <i>s</i>	12, 14
17a	111.9	CH ₂	5.03, <i>sa</i>	7, 8, 9
17b			4.76, <i>sa</i>	7, 8, 9
18	28.43	CH ₃	1.33, <i>s</i>	3, 4, 5
19	180.2	C		
20	15.83	CH ₃	0.87, <i>s</i>	9, 10

^1H 700 MHz, ^{13}C 175 MHz, CDCl₃. *Obtenido del espectro HSQC.

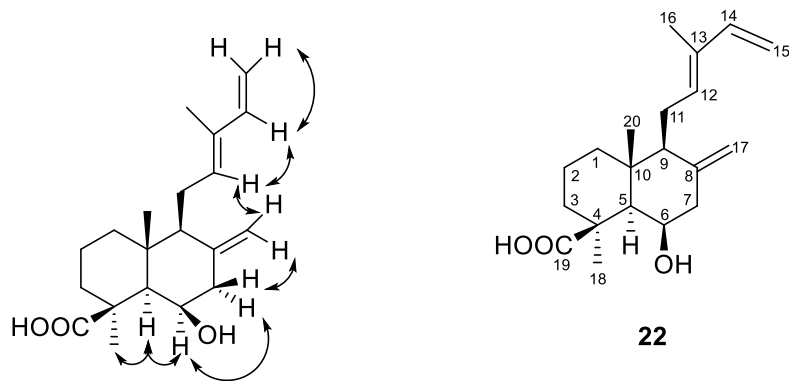
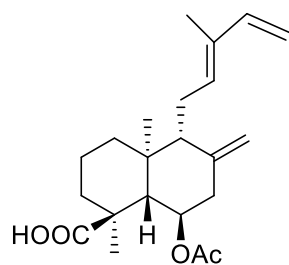


Figura 17. Interacciones NOESY observadas para el ácido-6 β -hidroxi-*trans*-communico (**22**)

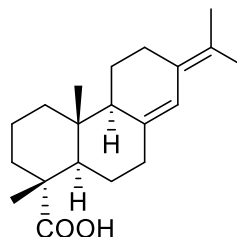
Con base en la discusión previa el producto **22** debe nombrarse ácido 6 β -hidroxi-*trans*-communico, el cual no ha sido descrito previamente y es otra aportación de este trabajo al conocimiento del perfil químico de las salvias mexicanas. La configuración absoluta de communol (**17**), del malonilcommunol (**19**) y del ácido 6 β -hidroxi-*trans*-communico (**22**) no pudo ser establecida, sin embargo, por un argumento biogénico, se propone que sea la misma que la del ácido *trans*-communico (**13**) con el cual coexisten en *S. cinnabarina*.

En 1965, se aisló de *Trachylobium verrucosum*, un diterpeno denominado ácido zanzibárico, cuya estructura y configuración absoluta fueron establecidas por medios espectroscópicos y químicos, así como por correlación con un derivado del ácido neoabiético, lo que permitió establecer que el ácido zanzibárico es un *ent*-labdano.⁷⁶ El tratamiento del éster metílico del ácido zanzibárico con NaOH en etanol dio un producto denominado ácido 6-desacetilzanzibárico, cuya conectividad es similar a la encontrada para el producto **22**, sin embargo, la comparación del p.f. y de la rotación específica indica que son sustancias diastereoisómericas.

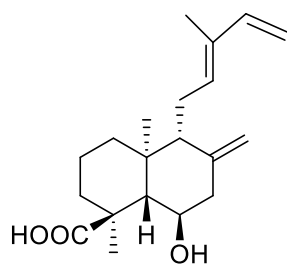
⁷⁶ Hugel, G. and Ourisson, G. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 2903-2908, (1965).



ácido zanzibárico



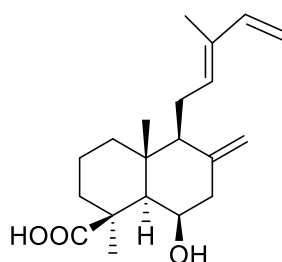
ácido neoabiético



ácido desacetilzanzibárico

p. f. = 202-205 °C

$[\alpha]_D = -17$ (c = 0.4, CHCl₃)



ácido 6β-hidroxi-*trans*-communico (**22**)

p. f. = 170-173 °C

$[\alpha]_D = +23.02$ (c = 0.265, CHCl₃)

Se han aislado diterpenos del grupo del labdano de otras especies del género *Salvia*, tales como: *Salvia sclarea*, *S. officinalis*, *S. palaestina*, *S. aethiopsis*, *S. yosgadensis*,^{77,78} *Salvia leriaefolia*⁷⁹, *S. rhytidea*⁸⁰ y *S. reuterana*⁸¹ las cuales crecen en Europa o el Medio Oriente, siendo esta la primera ocasión en que se aíslan labdanos de una salvia del subgénero *Calospahce*. Es importante mencionar que del estudio previo de *S. cinnabarina* (material cultivado) no se describe este tipo de productos.⁵⁹

⁷⁷ Yi-Bing, W., Zhi-Yu, N., Qing-Wen, S., Mei, D., Hiromasa, K., Yu-Cheng, G., Bin, C. *Chem. Rev.*, **112**, 5967-6026 (2012).

⁷⁸ En el trabajo de revisión de Yi-Bing y colaboradores (referencia 75), se menciona la presencia de labdanos en una especie denominada *Salvia eupatorium*, sin embargo, esta especie no está registrada como perteneciente al género *Salvia* (www.tropicos.org). ¡Al revisar la referencia citada por Yi-Bing y colaboradores, se encontró que la especie estudiada y de la cual se aíslan labdanos es *Eupatorium salvia*, una planta de la familia Asteraceae y no una salvia!

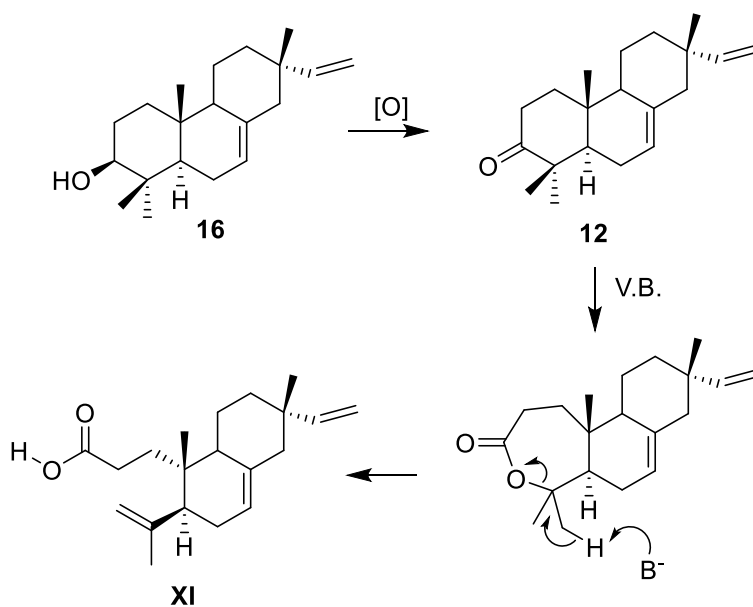
⁷⁹ Habibi, Z., Eftekhar, F., Samiee, K. and Rustaiyan, A. *J. Nat. Prod.* **63**, 270-271, (2000).

⁸⁰ Jassbi, A. R., Eghtesadi, F., Hazeri, H., Ma'sumi, H., Valizadeh, J., Chandran, J. N., Schneider, B. and Baldwin, I. T. *Natural Product Research*, **31**, 477-481, (2017).

⁸¹ Farimani, M. M. and Miran, M. *Phytochemistry*, **108**, 264-269, (2014).

V.17 Diterpenos con esqueleto de pimarano aislados de *S. cinnabarina*.

Otras sustancias aisladas de la población silvestre de *S. cinnabarina* analizada en este trabajo, son los pimaranos **12** (isopimara-7,15-dien-3-ona) y **16** (isopimara-7,15-dien-3-ol), que han sido previamente descritos de otras fuentes naturales tanto vegetales como por ejemplo, *Guarea macrophylla* (Meliaceae)⁸², *Nepeta clarkei* (Lamiaceae)⁸³ y de origen animal como en las heces de *Trogopterus xanthipes* (ardilla voladora)⁸⁴ Los pimaranos **12** y **16** pueden considerarse precursores del ácido 3,4-*secoisopimara*-4(18),7,15-trien-3-oico (**XI**), previamente aislado del exudado foliar de la *S. cinnabarina* cultivada, de acuerdo con hipótesis biogenética que se muestra en el esquema 3.



Esquema 3. Hipótesis biogenética para la obtención de **XI**

⁸² Lago, J. H. G., Brochini, C. B. and Roque, N.F. *Phytochemistry*, **55**, 727-731, (2000).

⁸³ Rather, M. A. and Hassan, T. *Int. J. ChemTech Res.* **3**, 959-962, (2010).

⁸⁴ Jun Zhao, Hua-Jie Zhu, Xiao-Jiang Zhou, Tong-Hua Yang, Yuan-Yuan Wang, Jia Su, Yan Li. and Yong-Xian Cheng. *J. Nat. Prod.* **73**, 865-869, (2010).

V.18 β -Eudesmol y cryptomeridiol dos esquiterpenos derivados del eudesmano aislados de *S. cinnabarina*

Los sesquiterpenos **15** y **21** fueron identificados con base en sus datos espectroscópicos como β -eudesmol y cryptomeridiol respectivamente. El β -eudesmol (**15**) ha sido aislado de diversas fuentes vegetales, por ejemplo, de *Manglietia hookeri* (Magnoliaceae),⁸⁵ *Ocimum basilicum* (Lamiaceae),⁸⁶ y *Salvia microphylla* (Lamiaceae),⁸⁷ entre otras. La presencia de este compuesto en *S. microphylla* amerita un comentario adicional, ya que, aunque esta especie es originaria de México el trabajo en el cual se describe la presencia del β -eudesmol (**15**) se realizó en Turquía con material cultivado. La composición química descrita en la referencia 87 es muy diferente a la encontrada en varios trabajos realizados en México sobre esta especie, por lo cual es posible que la planta trabajada por los colegas turcos este mal identificada.^{88,89} El cryptomeridiol (**21**) ha sido descrito previamente de *Phaulopsis imbricata* (Acanthaceae), *Artemisia pygmaea* (Asteraceae) y *Blumea balsamifera* (Asteraceae).⁹⁰

V.19 Derivados aromáticos aislados de *S. cinnabarina*.

Los productos aromáticos **20**, **18** y **14** aislados de *Salvia cinnabarina*, fueron identificados como el flavonoide salvigenina (**20**), ácido ftálico (**18**) y una mezcla de esteres de ácidos grasos saturados con el tirosol (alcohol 4-hidroxifenético) (**14**).

La salvigenina fue aislada originalmente de *Salvia triloba* (Lamiaceae)⁹¹ en 1968 y posteriormente se ha descrito en varias especies de *Salvia*, tales como, *S. barrelieri*,⁹² *S. dominica*,⁹³ *S. apiana*⁹⁴ y

⁸⁵ Bao, Y., Wang, W., Wu, H., Qi, M., Li, J. and Yang, Y. *Natural Products Research*, **30**, 2396-2401, (2016).

⁸⁶ Koroch, A. R., Simon, J. E. and Juliani, H. R. *Industrial Crops & Products* (2017) en prensa. doi: 10.1016/j.indcrop.2017.04.066

⁸⁷ Aydogmus, Z., Yesilyurt, Y. and Topcu, G. *Natural Products Research*, **20**, 775-781, (2006).

⁸⁸ Esquivel, B., Martinez, N. S., Cardenas, J., Ramamoorthy, T. P. and Rodriguez-Hahn, L. *Planta Medica* **55**, 62-63, (1989).

⁸⁹ Bautista, E., Toscano, R. A. and Ortega, A. *Organic Letters* **15**, 3210-3213, (2013).

⁹⁰ Kengne, A. B. O., Tene, M., Tchinda, A. T., Tane, P. and Frédérick, M. *Journal of Medicinal Plant Research*, **10**, 122-129 (2016).

⁹¹ Ulubelen, A. and Isildatici, S. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **57**, 1037-1038, (1968).

⁹² Lehbili, M., Magid, A. A., Kabouche, A., Voutquenne-Nazabadioko, L., Abedini, A., Morjani, H., Gangloff, S. C. and Kabouche, Z. *Natural Products Research*, (2017). doi: 10.1080/14786419.2017.1378207

⁹³ Hasan, M. R., Al-Jaber, H. I., Al-Qudah, M. A. and Zarga, M. H. A. *Phytochemistry Letters*, **16**, 12-17, (2016).

⁹⁴ Srivedavyasasri, R., Hayes, T. and Ross, S. A. *Natural Products Research*, **31**, 2058-2061, (2017).

*S. sahendica*⁹⁵ entre otras. Se han descrito varios efectos biológicos para este flavonoide tales como antiinflamatorio, analgésico, anticanceroso y relajante de la aorta.⁹⁶

El ácido ftálico (**18**) ha sido aislado esterificado con alcoholes de cadena larga, de diversas fuentes vegetales, por ejemplo, de *Ajuga bracteosa* (Lamiaceae),⁹⁷ de *Hedyotis uncinella* (Rubiaceae)⁹⁸ y de *Phyllanthus rheedii* (Euphorbiaceae)⁹⁹ y también de organismos marinos como el alga roja *Acantophora spicifera* (Rhodomelaceae).¹⁰⁰ El ácido ftálico libre es producto de la degradación de sus ésteres por acción de algunas bacterias y se sabe que puede tener efectos nocivos al propiciar la formación de especies reactivas de oxígeno que causan daño celular como se ha descrito en *Malus prunifolia*.¹⁰¹ En experimentos de laboratorio se ha demostrado que las plantas de trigo, maíz y soya son capaces de incorporar ácido ftálico cuando las semillas se germinan en suelo en donde se ha adicionado este compuesto. La germinación del trigo se ve afectada hasta en un 13% pero el maíz y la soya no se ven afectados. Las plantas arriba referidas son capaces de incorporar de ácido ftálico tanto en las semillas como en las plantas maduras.¹⁰²

Es conocido que el material de plástico suele liberar ftalato de diisooctilo y que este es un contaminante que con cierta frecuencia viene impurificando el éter de petróleo ligero que se usa para la separación y purificación de los extractos de plantas. En el análisis de la *S. cinnabarina* no se usó material de plástico y los disolventes estaban rigurosamente purificados, estos hechos sumados a que se aislaron 25 mg de ácido ftálico, no de algún éster, indican que fueron extraídos de la planta, lo cual puede ser indicativo de que esta especie es capaz de incorporarlo y que probablemente está presente en el suelo en donde crece.

El último compuesto aromático fue identificado con base en sus características espectroscópicas como una mezcla de ésteres de ácidos grasos y el tirosol, debido a la baja cantidad aislada no se pudo establecer el tamaño de la cadena del ácido graso, pero un análisis de HPLC-Masas (Q-TOF)

⁹⁵ Tabatabaei, S. M., Salehi, P., Farimani, M. M., Neuburger, M., De Mieri, M., Hamburger, M. and Nejad-Ebrahimi, S. *Natural Product Research*, **31**, 1758-1765, (2017).

⁹⁶ Mansourabadi, A. H., Sadeghi, H. M., Razavi, N. and Rezvani, E. *Advanced Herbal Medicine*, **1**, 31-41, (2015).

⁹⁷ Singh, N., Mahmood, U., Kaul, V.K. and Jirovetz, L. *Natural Products Research* **20**, 593-597, (2006).

⁹⁸ Pan, Y., Ye, Ji., Zhang, Y. and Jin, H.Z. *Chemistry of Natural Compounds*, **53**, 738-739, (2017).

⁹⁹ Sivajothi, V. and Shruthi S.D. *Int. J. Res. Ayurveda Pharm.* **4**, 889-892, (2013).

¹⁰⁰ Wahidulla, L. D., Souza, M. and Govenkar, M. *Phytochemistry*, **48**, 1203, (1998).

¹⁰¹ Bai, R., Ma, F., Liang, D. and Zhao, X. *J. Chem. Ecol.* **35**, 488-494, (2009).

¹⁰² Dorney, J. R., Weber, J. B., Overcash, M. R. and Streck, H. J. *J. Agric. Food Chem.* **33**, 398-403, (1985).

indica que hay más de un éster y que las cadenas pueden ser de más de 30 átomos de carbono. Este tipo de derivados se han aislado previamente en diferentes especies vegetales^{103,104} y es de destacar su presencia en el estudio realizado en Turquía sobre la *Salvia microphylla*.⁸⁷ Estos derivados del tirosol no se habían descrito durante el transcurso del análisis químico y biológico de salvias mexicanas.

El ácido *trans*-communico (**13**), el β -eudesmol (**15**) y el ácido 6 β -hidroxi-*trans*-communico (**22**) fueron probados como antiinflamatorios en el modelo de edema inducido por TPA. Los porcentajes de inhibición obtenidos fueron 21.72%, 9.09% y 9.51% respectivamente, por lo que ninguno de ellos mostró una actividad significativa.

¹⁰³ Chen, J. J., Wu, H. M., Peng, C. F., Chen, I. S. and Chu, S. D. *J. Nat. Prod.* **72**, 223-228, (2009).

¹⁰⁴ Ding, L. J., Yuan, W., Li, Y. X., Liao, X. J., Sun, H., Peng, Q., Han, B. N., Lin, H. W., Li, Z. Y., Yang, F. and Xu, S. H. *Natural Products Research*, **30**, 1633-1638, (2016).

VI.- CONCLUSIONES

VI.- CONCLUSIONES

Del estudio de las partes aéreas de *S. ballotiflora* Benth y de *S. cinnabarina* M. et G. se obtienen las siguientes conclusiones:

1.- De las hojas de *S. ballotiflora* se aislaron 11 diterpenos cuyas estructuras fueron elucidadas por métodos espectroscópicos. De éstos, cuatro icetexanos (**1-4**) y un abietano (**5**) no se encuentran descritos en la literatura y constituyen aportaciones nuevas al conocimiento del perfil químico de la *S. ballotiflora*.

2.- Se estableció la configuración absoluta de los compuestos **6**, **7**, **8** y **10** por difracción de Rayos-X y DCV y para el diterpeno **3** por DCV solamente ya que no fue cristalino.

3.- Se obtuvieron los espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC, COSY y NOESY de todos los productos aislados. De los compuestos **6**, **7** y **11** se corrigieron algunos errores encontrados en las asignaciones originales de los mismos.

4.- En el caso particular de la icetexona (**8**) se llevó a cabo la asignación total e inambigua de sus espectros de ^1H y ^{13}C . Se determinó su configuración absoluta por difracción de Rayos-X y DCV. Se obtuvieron nuevamente los valores del p. f. y de la rotación específica los cuales difieren de los descritos originalmente en 1976 y que habían generado confusiones a lo largo de los años. Una de estas confusiones es la publicación de la 5-*epi*-icetexona, un diterpeno tripanocida aislado de *Salvia gilliesii*, como una sustancia diferente a la icetexona (**8**) con base en las diferencias observadas entre el p. f. y la rotación específica de este diterpeno y los datos originales publicados para **8**. Con base en el estudio realizado en esta tesis se demuestra que la 5-*epi*-icetexona y la icetexona (**8**) son iguales y se declara la no existencia de la 5-*epi*-icetexona y por lo tanto la actividad biológica encontrada para ésta debe de atribuirse a la icetexona.

5.- Se estableció la configuración absoluta de la conacytona (**10**), la cual era desconocida a pesar de que esta sustancia fue aislada desde 1976, asimismo se obtuvieron sus datos de RMN y se llevó a cabo la asignación de todos sus átomos de hidrógeno y de carbono.

6.- Los compuestos **3**, **4**, **6**, **7**, **8** y **10** fueron probados en el biensayo de la sulforrodamina B para evaluar su efecto antiproliferativo en líneas celulares de cáncer humano. Los compuestos **3** y **6**

mostraron una actividad antiproliferativa que se aproxima a la adriamicina en las líneas celulares de glioblastoma (U251) y adenocarcinoma de pulmón (SKLU-1).

7.- Los compuestos **3** y **10** mostraron una actividad antiinflamatoria significativa en el modelo de inducción de edema auricular en ratón inducido por TPA.

8.- El diterpeno aromático **4** fue el único que mostró una actividad atrapadora del radical DPPH significativa, con una IC_{50} (μM) = 98.4 ± 3.5 .

9.- El contenido y patrón de oxidación de los diterpenos aislados de *S. ballotiflora* son importantes desde el punto de vista quimiotaxonómico, ya que refuerza su proximidad evolutiva con *S. candicans* y *S. anastomosans* establecida por métodos de análisis filogenéticos. Las tres especies comparten compuestos de esqueletos y patrones de oxidación similares (abietanos e icetexanos) y apoyan la clasificación de estas especies en la sección Tomentellae. El perfil químico de otros miembros analizados de esta sección (*S. coultierii*, *S. goldmanii*, *S. fruticulosa* y *S. gilliesii*) es muy consistente y estrechamente relacionado con *S. ballotiflora*, *S. candicans* y *S. anastomosans*. La presencia de icetexona (**8**) (antes 5-epi-icetexona) en *S. gilliesii* es por sí mismo interesante, ya que a pesar de que esta última, es una especie que crece en Argentina su perfil químico es consistente con las especies mexicanas de la sección Tomentellae a pesar de la enorme separación geográfica.

10.- Del extracto de diclorometano de las partes aéreas de *S. cinnabarina* se aislaron once metabolitos secundarios. Dos de ellos, los productos **12** y **16** son diterpenos con esqueleto de pimarano. Las sustancias **13**, **17**, **19** y **22** poseen un arreglo de labdano y fueron identificados con base en sus propiedades espectroscópicas. El labdano **13** fue identificado como el ácido *trans*-communico y en este trabajo se confirmó su configuración absoluta por difracción de Rayos-X. El diterpeno **17** fue identificado como communol. La estructura de **19** fue establecida, con base en sus propiedades espectroscópicas, como el malonilcommunol, el cual no ha sido descrito previamente en la literatura. El labdano **22** fue identificado como el ácido 6 β -hidroxi-*trans*-communico y es asimismo una nueva aportación al conocimiento de la biodiversidad química del género *Salvia*.

11.- Se aislaron de *S. cinnabarina*, dos sesquiterpenos (**15** y **21**) identificados como β -eudesmol y cryptomeridiol respectivamente, así como tres metabolitos secundarios aromáticos, el ácido ftálico (**18**), la flavona salvigenina (**20**) y una mezcla de ésteres de ácidos grasos con el tirosol (**14**).

12.- Este trabajo constituye el primer análisis de una población silvestre de *Salvia cinnabarina* M. et G. La composición química encontrada es diferente a la descrita en un estudio previo realizado con una planta cultivada, confirmándose una vez más que las condiciones de crecimiento de una especie influyen de manera notable en su composición química. 13.- Se describe por primera vez la presencia de diterpenos de tipo labdano en una especie de *Salvia* del subgénero *Calosphace*. Este tipo de metabolitos secundarios se conocían previamente solamente de especies que crecen en Europa y el Medio Oriente. 14.- Como resultado del análisis de estas dos especies se aislaron un total de 22 productos naturales, de los cuales 7 no habían sido descritos previamente, contribuyéndose así al conocimiento de la composición química del género *Salvia* en México, como parte del proyecto del estudio sistemático de este género, que inició desde 1984 en el Instituto de Química de la UNAM.

VII.- PARTE EXPERIMENTAL

VII.- DESARROLLO EXPERIMENTAL.

VII.1 Procedimientos generales

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Fisher-Jhons y no están corregidos. Las RO fueron medidas en un polarímetro Perkin-Elmer 323. Los espectros en el UV fueron realizados en un espectrómetro Shimadzu UV 160U. Los espectros de DCV fueron adquiridos en un espectrómetro BioTools DualPEM Chiral/IR FT-VCD (Jupiter, FL). Los espectros en el IR fueron obtenidos en un espectrómetro IR Bruker Tensor 27. Los experimentos de RMN 1D y 2D fueron realizados en un espectrómetro Bruker Advance III HD a 700 MHz para ^1H y 175 MHz para ^{13}C y un Bruker Advance III a 400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C . Los experimentos a 300 MHz para ^1H y 75 MHz para ^{13}C fueron realizados en un espectrómetro Varian Mercury 300. Los desplazamientos químicos (δ) están referenciados con la señal del disolvente residual, CDCl_3 ($\delta_{\text{H}} = 7.26$, $\delta_{\text{C}} = 77.16$) y las constantes de acoplamiento (J) están dadas en Hz. Los espectros de masas de alta resolución por la técnica DART (EM-DART-AR) se determinaron en un espectrómetro de masas Jeol The AccuTOF JMS-T100LC. Los datos de rayos X fueron colectados en un difractor Agilent Xcalibur Atlas Gemini ó en un Bruker D8 Venture, en ambos casos se utilizó como fuente de Rayos-X la radiación $\text{Cu } K\alpha$ monocromada con grafito ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) a 293 K.

Las separaciones por cromatografía en columna se realizaron sobre gel de sílice de malla 230-400 (Macherey-Nagel), Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech) y octadecilsilicio (C18) (Sigma Aldrich). La cromatografía en capa delgada preparativa (CCDp) fue realizada en placas Macherey Nagel Sil G/UV₂₅₄ de 20 x 20 cm de longitud y 0.25 a 2.00 mm de espesor, según el caso. El seguimiento del progreso de las separaciones cromatográficas se realizó mediante cromatografía en capa delgada analítica (CCDa) utilizando cromatofolios de gel de sílice de 0.20 mm de espesor con indicador de fluorescencia adquiridas de Macherey Nagel. La visualización de las placas se llevó a cabo con una lámpara de luz UV Espectroline modelo CX-20 a dos longitudes de onda (254 y 365 nm) y utilizando soluciones de sulfato cérico amoniacal y/o óleum como reveladores.

VII.2 Material vegetal.

VII.2.1 *Salvia ballotiflora*

La *Salvia ballotiflora* Benth fue colectada en Linares, Nuevo León, México en junio de 2016. El material botánico fue identificado por la Dra. Martha Martínez-Gordillo (Facultad de Ciencias de

la UNAM) y una muestra del espécimen (FCME 161792) fue depositado en el Herbario de la Facultad de Ciencias de la UNAM (FCME). *Salvia ballotiflora* Benth¹ es el nombre actualmente aceptado para esta especie a la cual se le ha denominado previamente como *S. bellotaeflora*,² y *S. ballotaeflora* Benth.³

VII.2.2 *Salvia cinnabarina*

La *Salvia cinnabarina* M. et G. fue recolectada en Zoquitlán, Puebla en diciembre del 2016. El material botánico fue identificado por la Dra. Martha Martínez-Gordillo (Facultad de Ciencias de la UNAM) y una muestra del espécimen (FCME 161531) fue depositado en el Herbario de la Facultad de Ciencias de la UNAM (FCME).

VII.3 Extracción y aislamiento

VII.3.1 Extracción y purificación de los metabolitos secundarios de *Salvia ballotiflora*

El material vegetal se secó a temperatura ambiente y en la sombra, posteriormente se molió en un molino de cuchillas. Se pesaron 800 g de material el cual se extrajo exhaustivamente por percolación, utilizando éter de petróleo ligero y posteriormente CH₂Cl₂. El extracto de CH₂Cl₂ se concentró obteniéndose 10 g de residuo. El extracto crudo se separó por cromatografía en columna (CC) en gel de sílice empleando un gradiente de elución con AcOEt/hexanos (0:100-100:0) hasta obtener 101 eluatos de 250 mL cada uno. Las fracciones se reunieron de acuerdo con su similitud en cromatografía en capa delgada analítica (CCDa) en 12 fracciones primarias (A-L). Los compuestos 7,20-dihidroanastomosina (**7**) (50 mg) e icetexona (**8**) (18 mg) se obtuvieron como sólidos cristalinos en las fracciones A y B respectivamente. La fracción C (450 mg) se purificó por CC en sílica gel utilizando una mezcla de hexanos:AcOEt (2:1) como fase móvil, obteniéndose anastomosina (**6**) (125 mg) y conacytona (**10**) (320 mg). La fracción D (350 mg) se sometió a CC en gel de sílice utilizando un gradiente de elución de CH₂Cl₂:acetona (100:0-0:100) hasta obtener 48 eluatos de 100 mL cada uno. Los eluatos se combinaron en cinco fracciones secundarias (DA-DE) de acuerdo con su perfil cromatográfico. La fracción DE se purificó por CCDp eluyendo con

¹ Martínez-Gordillo, M.; Fragoso-Martínez, I.; García-Peña, M. R.; Montiel, O. *Revista Mexicana de Biodiversidad* **84**, 30-86, (2013).

² Domínguez, X. A.; González, H. Extractives from *Salvia bellotaeflora*. *Phytochemistry* **11**, 2641-2641, (1972).

³ Domínguez, X. A.; González, F. H. Aragón, R.; Gutiérrez, M.; Marroquín, J. S.; Watson, W. *Planta Med.* 237-24, (1976).

una mezcla de CH₂Cl₂ :acetona (9:1) para obtener el compuesto **3**. La fracción E (56 mg) fue sometida a CCDp utilizando una mezcla de AcOEt:Hexanos:MeOH:H₂O (60:33:5:2) como fase móvil para obtener el compuesto **2** (2.4 mg). La fracción F (500 mg) se sometió a sucesivas cromatografías en columna y preparativas para dar los compuestos **4** (7.3 mg), **5** (6.4 mg) y **11** (8.2 mg). La fracción I (2.10 g) se recromatografió en columna eluyendo con Hexanos:AcOEt (100:0 – 0:100) obteniendo 68 eluatos de 150 mL cada uno, los cuales se reunieron en ocho fracciones secundarias (IA-IE). La fracción IE se sometió a una CCDp sobre C18 y usando una mezcla de MeOH:H₂O (2:1) como disolvente de elución, para obtener el compuesto **9** (3.2 mg). La fracción K (25 mg) se sometió a CCDp usando una mezcla de AcOEt:hexanos:MeOH:H₂O (60:33:5:2) como disolvente de elución para obtener el compuesto **1** (3.0 mg).

Ballotiquinona (**1**): Aceite amarillo; $[\alpha]_{589} = +108.8$ (*c* 0.0017, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\text{máx}}$ (log ϵ) 206 (2.93), 237 (2.88), 325 (2.54) nm; IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx}}$ 3597, 3412, 2931, 2875, 1778, 1654, 1621, 1583, 1458, 1380 cm⁻¹; RMN ¹H y ¹³C NMR, ver tabla 1; HR-DART-MS *m/z* [M – H₂O]⁺ 357.13138 (calculado para C₂₀H₂₁O₆, 357.13381).

6,7-Anhidroballotiquinona (**2**): Aceite amarillo; $[\alpha]_{589} = +265.5$ (*c* 0.0022, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\text{máx}}$ (log ϵ) 213 (4.16), 243 (4.07), 332 (3.77) nm; IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx}}$ 3601, 3396, 2930, 2875, 1811, 1639, 1621, 1458, 1364 cm⁻¹; RMN ¹H y ¹³C, ver Tabla 2; HR-DART-MS *m/z* [M]⁺ 357.13265 (calculado para C₂₀H₂₁O₆, 357.13381).

7 α -Acetoxi-6,7-dihidroicetexona (**3**): Sólido cristalino amarillo; p.f. 110-115 °C; $[\alpha]_{589} = -41.11$ (*c* 0.0018, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\text{máx}}$ (log ϵ) 205 (4.10), 275 (3.93) nm; IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx}}$ 3412, 2941, 2879, 1770, 1645, 1373 cm⁻¹; RMN ¹H y ¹³C NMR, ver Tabla 3; EM-DART-AR *m/z* [M]⁺ 403.17557 (calculado para C₂₂H₂₇O₇, 403.17568).

6,7,11,14-Tetrahidro-7-oxoicetexone (**4**): Sólido cristalino amarillo; p.f. 130-135 °C; $[\alpha]_{589} = -72.0$ (*c* 0.0015, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\text{máx}}$ (log ϵ) 206 (2.90), 295 (2.60), 355 (2.33), 421 (1.67) nm; IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx}}$ 3602, 3564, 3514, 2930, 2960, 2877, 1771, 1612, 1450, 1352 cm⁻¹; RMN ¹H y ¹³C NMR, ver Tabla 5; EM-DART-AR *m/z* [M]⁺ 361.16436 (calculado para C₂₀H₂₅O₆, 361.16511).

18-Acetoxi-11-hidroisugiol (**5**): Sólido amorfo amarillo; p.f. 90-95 °C; $[\alpha]_{589} = +25.2$ (*c* 0.0015, CHCl₃); UV (MeOH) $\lambda_{\text{máx}}$ (log ϵ) 213 (4.01), 235 (3.85), 289 (3.73), 421 (1.67) nm; IR (CHCl₃)

$\nu_{\text{máx}}$ 3599, 3534, 3514, 2932, 2873, 1730, 1672, 1612, 1468, 1369 cm^{-1} ; RMN ^1H y ^{13}C , ver Tabla 6; EM-DART-AR m/z $[\text{M}]^+$ 375.21725 (calculado para $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{O}_5$, 375.21715).

Anastomosina (**6**): Sólido cristalino naranja; p.f. 220-224 °C; $[\alpha]_{589} = +119.1$ (c 0.0021, CHCl_3); RMN ^1H (CDCl_3 , 700 MHz) δ 7.76 (1H, *s*, 12-OH), 7.755 (1H, *s*, H-20), 7.51 (1H, *d*, $J = 2.8$, H-7), 6.66 (1H, *brd*, $J = 5.6$, H-1), 4.75 (1H, *dd*, $J = 10.5, 2.8$, H-6), 3.37 (1H, *hep*, $J = 6.7$, H-15), 2.59 (1H, *brd*, $J = 10.3$, H-5), 2.50 (1H, *m*, H-2a), 2.48 (1H, *m*, H-2b), 1.84 (1H, *dd*, $J = 12.9, 3.8$, H-3a), 1.52 (1H, *td*, $J = 12.6, 5.5$, H-3b), 1.34 (3H, *s*, CH_3 -18), 1.26, 1.27 (3H, *d*, $J = 6.7$, CH_3 -16, 17); RMN ^{13}C (CDCl_3 , 175 MHz) δ 183.0 (C, C-14), 181.5 (C, C-11), 180.0 (C, C-19), 155.2 (C, C-12), 143.3 (CH, C-1), 141.7 (CH, C-20), 140.5 (CH, C-7), 133.7 (C, C-10), 132.0 (C, C-13), 129.1 (C, C-8), 124.2 (C, C-9), 78.7 (CH, C-6), 47.7 (CH, C-5), 41.6 (C, C-4), 25.4 (CH, C-15), 25.0 (CH_2 , C-3), 23.1 (CH_2 , C-2), 21.3 (CH_3 , C-18), 19.7, 19.5 (CH_3 , C-16, C-17); (EM-DART-AR m/z $[\text{M}]^+$ 341.13955 (calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{O}_5$, 341.13890).

7,20-Dihidroanastomosina (**7**): Sólido cristalino amarillo; p.f. 223-227 °C (descrito, 217-220 °C); Los datos de RMN ^1H fueron idénticos a los publicados.⁴ RMN ^{13}C (CDCl_3 , 175 MHz) δ 185.3 (C, C-14), 183.4 (C, C-11), 180.3 (C, C-19), 150.2 (C, C-12), 142.5 (C, C-9), 139.8 (C, C-8), 128.3 (C, C-10), 125.7 (C, C-13), 123.9 (CH, C-1), 78.6 (CH, C-6), 57.6 (CH, C-5), 42.0 (C, C-4), 33.2 (CH_2 , C-20), 31.0 (CH_2 , C-7), 24.9 (CH, C-15), 24.6 (CH_2 , C-3), 21.5 (CH_2 , C-2), 20.3 (CH_3 , C-18), 20.02, 19.99 (CH_3 , C-16, C-17); EM-DART-AR m/z $[\text{M}]^+$ 343.15359 (calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{O}_5$, 343.15455).

1,2-Anhidroballotiquinona (**9**): Sólido amarillo; p.f. 95-98 °C; $[\alpha]_{589} = +665$ (c 0.001, CHCl_3); los datos de UV (MeOH) y RMN ^1H son esencialmente iguales a los ya descritos en la literatura;⁵ RMN ^{13}C (CDCl_3 , 175 MHz) δ 188.2 (C, C-14), 184.1 (C, C-11), 179.2 (C, C-19), 150.3 (C, C-12), 140.1 (C, C-10), 139.0 (C, C-9), 132.6 (C, C-8), 131.4 (CH, C-2), 128.4 (CH, C-1), 127.5 (C, C-13), 117.4 (CH, C-20), 81.0 (CH, C-6), 74.5 (CH, C-7), 44.9 (CH, C-5), 40.3 (C, C-4), 30.8 (CH_2 , C-3), 24.7 (CH, C-15), 23.4 (CH_3 , C-18), 20.0, 19.9 (CH_3 , C-16, C-17); EM-DART-AR m/z $[\text{M}]^+$ 357.13261 (calculado para $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{O}_6$, 357.13381).

7 α -Acetoxi-19-hidroiroleanona (**11**): Sólido amorfo amarillo; p.f. 277-282 °C; $[\alpha]_{589} = +0.9$ (c 0.0011, MeOH); RMN ^1H (CDCl_3 , 700 MHz) δ 7.13 (1H, *s*, 12-OH), 5.91 (1H, *brd*, $J = 2.1$, H-

⁴ Esquivel, B.; Calderón, J. S. Flores, E.; Sánchez, A-A, Rivera, R. R. *Phytochemistry* **46**, 531-534, (1997)

⁵ Cárdenas, J.; Rodríguez-Hahn, L. *Phytochemistry* **38**, 199-204, (1995)

7), 3.71 (1H, *d*, $J = 10.9$, H-20a), 3.57 (1H, *d*, $J = 10.9$, H-20b), 3.15 (1H, *hep*, $J = 7.0$, H-15), 2.75 (1H, *d*, $J = 13.1$, H-1a), 2.07 (1H, *brd*, $J = 14.8$, H-6a), 2.04 (3H, *s*, H2'), 1.79 (1H, *brd*, $J = 13.7$, H-3a), 1.73 (1H, *m*, H-2a), 1.69 (1H, *m*, H-6b), 1.62 (1H, *d*, $J = 13.4$, H-5), 1.58 (1H, *m*, H-2b), 1.26, (1H, *m*, H-1b), 1.25 (3H, *s*, CH₃-20), 1.22, 1.18 (3H, *d*, $J = 7.0$, CH₃-16, 17), 1.01 (1H, *td*, $J = 13.5, 3.8$, H-3b), 0.97 (3H, *s*, CH₃-18); RMN ¹³C (CDCl₃, 175 MHz) δ 185.5 (C, C-14), 183.8 (C, C-11), 169.5 (C, C-1'), 150.9 (C, C-12), 149.8 (C, C-9), 139.5 (C, C-8), 124.9 (C, C-13), 66.0 (CH₂, C-19), 64.6 (CH, C-7), 46.7 (CH, C-5), 39.0 (C, C-10), 38.3 (C, C-4), 36.1 (CH₂, C-1), 35.5 (CH₂, C-3), 27.0 (CH₃, C-18), 25.3 (CH₂, C-6), 24.3 (CH, C-15), 21.3 (CH₃-C-2'), 19.8, 19.9 (CH₃, C-16, C-17), 18.9 (CH₃, C-20), 18.7 (CH₂, C-2); (EM-DART-AR m/z [M]⁺ 391.21198 (calculado para C₂₁H₂₂O₆, 391.21209).

VII.3.1.1 Análisis por difracción de rayos X de los compuestos 6, 7, 8 y 10

Los cristales de anastomosina (**6**) y de 7,20-dihidroanastomosina (**7**), se montaron en una fibra de vidrio para la colección de los datos usando radiación de Cu $K\alpha$ ($\lambda = 1.54184$ Å) a 293(2) K en el modo de barrido $\omega/2\theta$. En el caso del compuesto **6** se utilizó un cristal de color naranja con dimensiones de celda unitarias de 0.34 x 0.26 x 0.15 mm, C₂₀H₂₀O₅, M = 340.36, que cristalizó en un sistema cristalino ortorrómbico, con un grupo espacial P2₁2₁2₁, $a = 7.558(2)$ Å, $b = 10.421(3)$ Å, $c = 21.093(5)$ Å, $V = 1661.4(7)$ Å³, $Z = 4$, $\rho = 1.361$ mg/mm³, $\mu = 0.802$ mm⁻¹, se colectaron 4044 reflexiones totales, 3341(R_{int} 0.046) independientes y 3178 observadas. En el caso del compuesto **7** se utilizó un cristal de color amarillo de dimensiones de celda unitaria de 0.25 x 0.16 x 0.09 mm, C₂₀H₂₂O₅, M = 342.38, que cristalizó en un sistema cristalino monoclinico, con un grupo espacial P₂₁, $a = 10.1571(6)$ Å, $b = 7.7387(4)$ Å, $c = 10.6394(6)$ Å, $\beta = 95.401(3)$ deg, $V = 832.57(8)$ Å³, $Z = 2$, $\rho = 1.366$ mg/mm³, $\mu = 0.801$ mm⁻¹, se colectó un total de 7988 reflexiones y 2708 (R_{int} 0.032) independientes. Cristales de la icetexona (**8**) de 0.15 x 0.10 x 0.08 mm, C₂₀H₂₂O₅, M = 342.38 cristalizaron en un sistema ortorrómbico, grupo espacial P2₁2₁2₁, $a = 7.7453(3)$ Å, $b = 10.3664(3)$ Å, $c = 21.0064(7)$ Å, $V = 1686.6(1)$ Å³, $Z = 4$, $\rho = 1.348$ mg/mm³, $\mu = 0.790$ mm⁻¹, se colectaron un total de 17373 reflexiones, 2904 se consideraron reflexiones únicas (R_{int} 0.044), y 2436 se consideraron observadas. Para el caso de la conacytona (**10**) se utilizó un cristal amarillo de dimensiones 0.41 x 0.37 x 0.51 mm C₂₀H₂₆O₆, M = 362.41 los cristales fueron también ortorrómbicos, pertenecientes al grupo espacial P2₁2₁2₁, $a = 10.956(1)$ Å, $b = 12.635(1)$ Å, $c = 13.602(2)$ Å, $V = 1882.9(4)$ Å³, $Z = 4$, $\rho = 1.278$ mg/mm³, $\mu = 0.773$ mm⁻¹, reflexiones totales

13780, reflexiones únicas 3208 (R_{int} 0.038), reflexiones observadas 2599. Cada estructura fue resuelta por métodos directos usando el programa cristalográfico SHELXS-97 incluido en el software del paquete WinGX v1.70.01. Para el refinamiento, los átomos de hidrógeno fueron tratados anisotrópicamente y los átomos de hidrógeno fueron refinados isotópicamente. Los índices R finales fueron [$I > 2\sigma(I)$] $R1 = 3.9\%$ and $wR2 = 10.3\%$. El software Olex2 v1.1.5⁶ permitió calcular los índices de Flack⁷ y Hooft.^{8,9} En el caso del compuesto **6**, dichos parámetros correspondieron a $x = 0.1(2)$, $y = 0.09(5)$ respectivamente para el enantiómero correcto, mientras que $x = 0.9(2)$, $y = 0.91(5)$ para la estructura inversa. Para el caso del compuesto **7**, fueron $x = 0.07(18)$, $y = 0.13(9)$ para la estructura mostrada en el esquema 1 y $x = 0.90(17)$, $y = 0.87(9)$ para la estructura inversa. Para la icetexona (**8**), $x = 0.04(19)$, $y = 0.12(9)$ para el enantiómero correcto y $x = 0.95(19)$, $y = 0.88$ para la imagen especular. Para la conacytona (**10**), $x = 0.00(18)$, $y = 0.05(9)$ para la configuración mostrada en el esquema 1 y $x = 0.99(18)$, $y = 0.94(9)$ para la configuración inversa. Los datos cristalográficos (excluyendo los factores de estructura) se depositaron en el Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) con los números de referencia CCDC 1570292, CCDC 1570293, CCDC 1562319 y CCDC 1562343 para los compuestos **6**, **7**, **8** y **10** respectivamente.

VII.3.1.2 Mediciones experimentales de DCV

Se tomaron muestras de 7.2 mg del compuesto **3**, 7.5 de **2** y 3.8 de **7**, se disolvieron en 150 μL de cloroformo deuterado al 100 % y se colocaron en una celda de BaF_2 con un paso de luz de 0.1 mm. Los datos se adquirieron durante 6 h con 4 cm^{-1} de resolución para las muestras y disolvente. Los seis bloques de una hora se promediaron y se obtuvo el espectro final sustrayendo el espectro del disolvente medido en las mismas condiciones de la muestra. La estabilidad se monitoreó a través de RMN ^1H a 300 MHz antes y después de la determinación de los espectros de DCV.

VII.3.1.3 Determinación teórica del DCV para los compuestos **3**, **6** y **7**

La búsqueda de los conformeros más estables de los compuestos **3**, **6** y **7** se realizó utilizando modelos moleculares construidos en Spartan 04 seguidos por una búsqueda de todos los

⁶ Dolomanov, O.; Bourhis, L. J.; Gildea, R. J.; Howard, J. A. K.; Puschmann, H. *J Appl Cryst* **42**, 339-341, (2009).

⁷ Parsons, S.; Flack, H. D.; Wagner, T. *Acta Crystallogr.* **B69**, 249-259, (2013).

⁸ Hooft, R. W. W.; Straver, L. H.; Spek, A. L. *J Appl. Cryst.* **43**, 665-668, (2010).

⁹ Hooft R, W. W.; Straver, L. H.; Spek, A. L. *J Appl Cryst.* **41**, 96-103, (2008).

confórmeros contenidos en un intervalo de energía inicial de 10 kcal/mol para cada molécula mediante mecánica molecular (MM). De esta manera se obtuvieron veintisiete confórmeros para **3**, mientras que para **6** y **7** se obtuvieron cuatro y siete, respectivamente. A continuación, se seleccionaron los confórmeros en un intervalo de 5 kcal/mol tomando como referencia el confórmero más estable para la optimización de su geometría con un nivel de teoría B3PW91/DGDZVP. En este caso, se obtuvieron nueve confórmeros para el compuesto **3**, y dos para los compuestos **6** y **7** que representaron el 99.9 % de la población conformacional. Seis de los confórmeros de **3** y dos de **6** y **7**, en un intervalo de 3 kcal/mol, que representaron el 99.8% de la población conformacional fueron sometidos a cálculos de sus frecuencias vibracionales, momentos dipolares y fuerzas vibracionales. Los espectros de IR y DCV se obtuvieron tomando en consideración la contribución de cada confórmero, con una distribución de Boltzman y un ancho de banda de 6 cm^{-1} para cada uno de los confórmeros considerados. Se obtuvieron valores mayores del 82% para los espectros IR, mientras que el índice de similitud enantiomérica (S_E) para los espectros de DCV fue de 89 % para el compuesto **3**, mientras que para **6** y **7** fueron mayores de 84%. Todos los valores fueron obtenidos con nivel de confianza del 100%.

VII.3.2 Extracción y purificación de los metabolitos secundarios de *Salvia cinnabarina*

El material vegetal se secó a temperatura ambiente y a la sombra, y se molió en un molino de cuchillas. Se pesaron 370 g del material vegetal y se extrajeron por percolación con diclorometano.

VII.3.2.1 Estudio fitoquímico del extracto de diclorometano

El extracto de diclorometano (16 g) se sometió a cromatografía en columna abierta utilizando hexanos: AcOEt (100:0-0:100) como disolvente de elución hasta obtener 44 fracciones de 250 mL cada una. Las fracciones obtenidas se reunieron en 15 fracciones primarias de acuerdo a su perfil cromatográfico en CCDa (A-Ñ). La fracción B (200 mg) se sometió a CC en sephadex LH-20 usando como disolvente una mezcla de hexano:DCM:MeOH (3:1:1); se colectaron 17 fracciones (B1-B17) de 10 mL cada una. La fracción B5 (25 mg), se purificó por CCDp utilizando una mezcla de hexanos:acetona (98:2) como disolvente de elución para obtener el compuesto **12** (5.3 mg). En la fracción B7 se obtuvo el compuesto **13**. En la fracción C se precipitó el compuesto **14** (7.2 mg). La fracción D (466 mg) fue sometida a CC en sephadex LH-20 empleando metanol como disolvente de elución hasta obtener 14 fracciones de 5 mL cada una. La fracción D10 (40 mg) se sometió a CCDp en C18 utilizando como disolvente de elución una mezcla de ACN:H₂O (4:1)

para obtener los compuestos **15** (10.3 mg) y **16** (4.2). La fracción E fue sometida a CC en sephadex LH-20 (150 g) utilizando una mezcla de hexanos:DCM:MeOH:Ac. fórmico (3:1:1:0.5%) hasta obtener 54 fracciones de 3 mL cada una (E1-E54). Se reunieron las fracciones E24-E25 y se purificó por CC en sílica gel usando como disolvente de elución una mezcla de DCM:EtOH (98:2) para obtener el compuesto **17** (4.7 mg). En la fracción F cristalizó espontáneamente el compuesto **18** (25 mg). La fracción K se sometió a CC en sephadex LH-20 (150g) usando metanol como disolvente de elución hasta obtener 15 fracciones de 10 mL cada una, las cuales se reunieron en cinco fracciones secundarias (KA-KE) con base en su perfil cromatográfico en capa delgada. El compuesto **19** (5.3 mg) se obtuvo por CCDp en sílica gel de la fracción KB (70 mg) eluida con MeOH:H₂O (3:1). La fracción KD (15 mg) se sometió a CCDp utilizando una mezcla de hexanos:acetona como disolvente de elución para obtener el compuesto **20** (6 mg). La fracción L (938 mg) fue sometida a CC en sephadex-LH20 (150 g) utilizando metanol como disolvente de elución hasta obtener 15 fracciones de 20 mL cada una. Las fracciones se reunieron en cuatro fracciones secundarias (LA-LD) con base en su perfil cromatográfico en cromatografía en capa delgada. La fracción LC (302.8 mg) se sometió a CC en Sephadex LH-20 eluyendo con Hexanos:DCM:MeOH (1:1:3) hasta obtener 20 fracciones de 5 mL cada una. Las fracciones se reunieron en siete fracciones terciarias (LCA-LCG); en la fracción LCD (34.3 mg) se obtuvo el compuesto **21** (9.3 mg) por CC eluyendo con *n*-butanol:AcOH:H₂O (95:3:1:1). La fracción secundaria LD (227 mg) se separó por CC “flash” empacada con sílica gel con un flujo de 2.5 mL/min, eluida con DCM y colectando fracciones de 25 mL cada una hasta obtener 35 fracciones que se reunieron en seis fracciones terciarias (LDA-LDF). De la fracción LDC se obtuvieron 15 mg del compuesto **22**.

Malonilcommunol (**19**): Sólido blanco; p.f. 85-90 °C; $[\alpha]_{589} = +2.2$ (*c* 0.010, MeOH); IR (CDCl₃) $\nu_{\text{máx}}$ 3607, 3512, 2933, 2854, 1732, 1624 cm⁻¹; RMN ¹H and ¹³C, ver Tabla 20; EM-DART-AR *m/z* [M]⁺ 375.25347 (calculado para C₂₃H₃₅O₄, 375.25353).

Acido 6β-hidroxi-*trans*-communico (**22**): Sólido blanco; p.f. 170-173 °C; $[\alpha]_{589} = +23.0$ (*c* 0.0053, MeOH); IR (CHCl₃) $\nu_{\text{máx}}$ 3601, 3591, 2941, 2853, 1726, 1519, 1406, 1239, 1223 cm⁻¹; RMN ¹H y ¹³C, ver Tabla 21; EM-DART-AR *m/z* [M]⁺ 319.24747 (calculado para C₂₀H₃₀O₃, 319.24845).

VII.3.2.2 Análisis por difracción de rayos X del ácido *trans*-communico (13)

Para el caso del ácido *trans*-communico, los detalles de la determinación de la estructura cristalina se muestran en el siguiente anexo. El parámetro de Flack $x = -0.1(3)$ indica que la configuración absoluta de este compuesto es la mostrada en la estructura **13** (Esquema 2).

Anexo: Datos cristalográficos para el ácido *trans*-communico (13)

Table 1. Crystal data and structure refinement for **SC-DCM1-B7-13**.

Identification code	145QUL17	
Empirical formula	C ₂₀ H ₃₀ O ₂	
Formula weight	302.44	
Temperature	298(2) K	
Wavelength	1.54178 Å	
Crystal system	Orthorhombic	
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	
Unit cell dimensions	a = 11.2270(5) Å	$\alpha = 90^\circ$.
	b = 11.9270(5) Å	$\beta = 90^\circ$.
	c = 27.9572(12) Å	$\gamma = 90^\circ$.
Volume	3743.6(3) Å ³	
Z	8	
Density (calculated)	1.073 Mg/m ³	
Absorption coefficient	0.518 mm ⁻¹	
F(000)	1328	
Crystal size	0.449 x 0.258 x 0.252 mm ³	
Theta range for data collection	3.161 to 68.239°.	
Index ranges	-13 ≤ h ≤ 13, -14 ≤ k ≤ 14, -33 ≤ l ≤ 33	
Reflections collected	27625	
Independent reflections	6852 [R(int) = 0.0921]	
Completeness to theta = 67.679°	99.9 %	
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²	
Data / restraints / parameters	6852 / 2 / 409	
Goodness-of-fit on F ²	1.075	
Final R indices [I > 2σ(I)]	R1 = 0.0488, wR2 = 0.1306	
R indices (all data)	R1 = 0.0538, wR2 = 0.1374	
Absolute structure parameter	-0.1(3)	
Largest diff. peak and hole	0.135 and -0.126 e.Å ⁻³	

VII.4 Determinación de la actividad biológica

VII.4.1 Evaluación de la actividad citotóxica

Se evaluó la actividad citotóxica de los compuestos aislados utilizando las líneas celulares humanas: Adenocarcinoma mamario (MCF-7), leucemia mielógena crónica (K562), glioblastoma (U251), adenocarcinoma de pulmón (SKLU-1), cáncer de colón (HCT-15), cáncer de próstata (PC-3), fibroblastos gingivales sanos (FGH) y células sanas de riñón de mono (COS-7). Todas las líneas celulares fueron adquiridas del National Cancer Institute (NCI, USA) y de la American Type Culture Collection (ATCC). La evaluación se llevó a cabo utilizando el ensayo de la sulforrodamina B (SRB) en microcultivo para determinar el crecimiento celular de acuerdo con el protocolo establecido por el NCI (National Cancer Institute).¹⁰ Las líneas celulares fueron cultivadas en medio RPMI-1640 (Medio Roswell Park Memorial Institute) adicionado con suero fetal de bovino al 10%, 2 mM de glutamina, 10000 u/mL de penicilina, 1000 µg/mL de sulfato de estreptomicina y 25 µg/mL de anfotericina B (Gibco) y 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco). Las células se incubaron a 37 °C en atmosfera de CO₂ al 5%. La viabilidad de las células fue determinada con azul de tripano y se las células empleadas presentaron una viabilidad mayor al 95 %.

Las células fueron removidas de las botellas de cultivo mediante tratamiento con tripsina y se diluyeron con medio de cultivo para inactivar la tripsina. Las células en suspensión, 100 µL con 5 000-10 000 células por pocillo, se transfirieron a placas de microtitulación de 96 pocillos (Costar) y se incubaron por 24 horas a 37 °C, en atmosfera de CO₂ al 5%. Después, se adicionaron 100 µL de una solución a 50 µM o 1 µM de compuesto en el caso de los estudios de crecimiento primario o a las concentraciones adecuadas (al menos cuatro concentraciones) para la determinación de las CI₅₀, y se almacenaron por 48 horas. Después del período de incubación las células se fijaron al sustrato plástico mediante la adición de 50 µl de ácido tricloroacético acuoso al 50% frío. Las placas se incubaron a 4 °C por 1h y se lavaron con agua de la llave. Las células fijadas con ácido tricloroacético se tiñeron por adición de 0.4% de SRB. Se eliminó la solución SRB libre mediante lavado con ácido acético acuoso al 1%. Las placas se secaron al aire, y el colorante unido se

¹⁰ Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; Gray-Goodrich, M.; Campbell, H.; Mayo, J.; Boyd, M. *J. Natl. Cancer. Inst.* **83**, 757-766, (1991)

disolvió mediante la adición de 10 mM de base Tris sin tampón (100 μ l). Las placas se agitaron durante 10 min, y se determinó la absorción a 515 nm usando un lector de placas ELISA (Bio-Tex Instruments). Para el caso del cernimiento primario, el experimento se realizó por duplicado y en el caso de las CI_{50} se realizaron tres experimentos independientes para cada concentración.

VII.4.2 Evaluación de la actividad antiinflamatoria

Para la evaluación de la actividad antiinflamatoria, se utilizó el modelo de TPA (por sus siglas en inglés, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate). Se utilizaron ratones de la cepa CD-1 con peso entre 20-25 g, los cuales se mantuvieron bajo las condiciones estándar de laboratorio ($24 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura) y con un ciclo de 12/12 h de luz-oscuridad y se alimentaron con dieta normal y agua *ad libitum* siguiendo la Norma Oficial Mexicana NOM-062-Z00-1999.

El ensayo de edema auricular inducido por TPA se llevó a cabo como se ha descrito.¹¹ En la oreja derecha se aplicaron 10 μ L de una solución etanólica de TPA a una concentración de 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la oreja izquierda se usó como control, aplicándose en ella solo el vehículo. Transcurridos 10 min, se aplicaron 10 μ L de solución del compuesto de prueba disuelto en etanol a las concentraciones adecuadas para cada uno en la oreja derecha. Se desarrolló la inflamación por un periodo de 4 horas y los ratones fueron sacrificados en cámara de CO_2 . Se extrajo una porción de 7 mm de diámetro de la parte central de cada oreja.

Cada una de las porciones de orejas tratadas y controles fue pesada y el % de inhibición se calculó con la ecuación $EI \% = 100 - (B \times 100/A)$, donde A corresponde al edema inducido por TPA solo y B es el edema inducido por TPA más el compuesto de muestra. La indometacina y celecoxib fueron usados como compuestos de referencia.

VII.4.3 Evaluación de la actividad antioxidante en el modelo DPPH

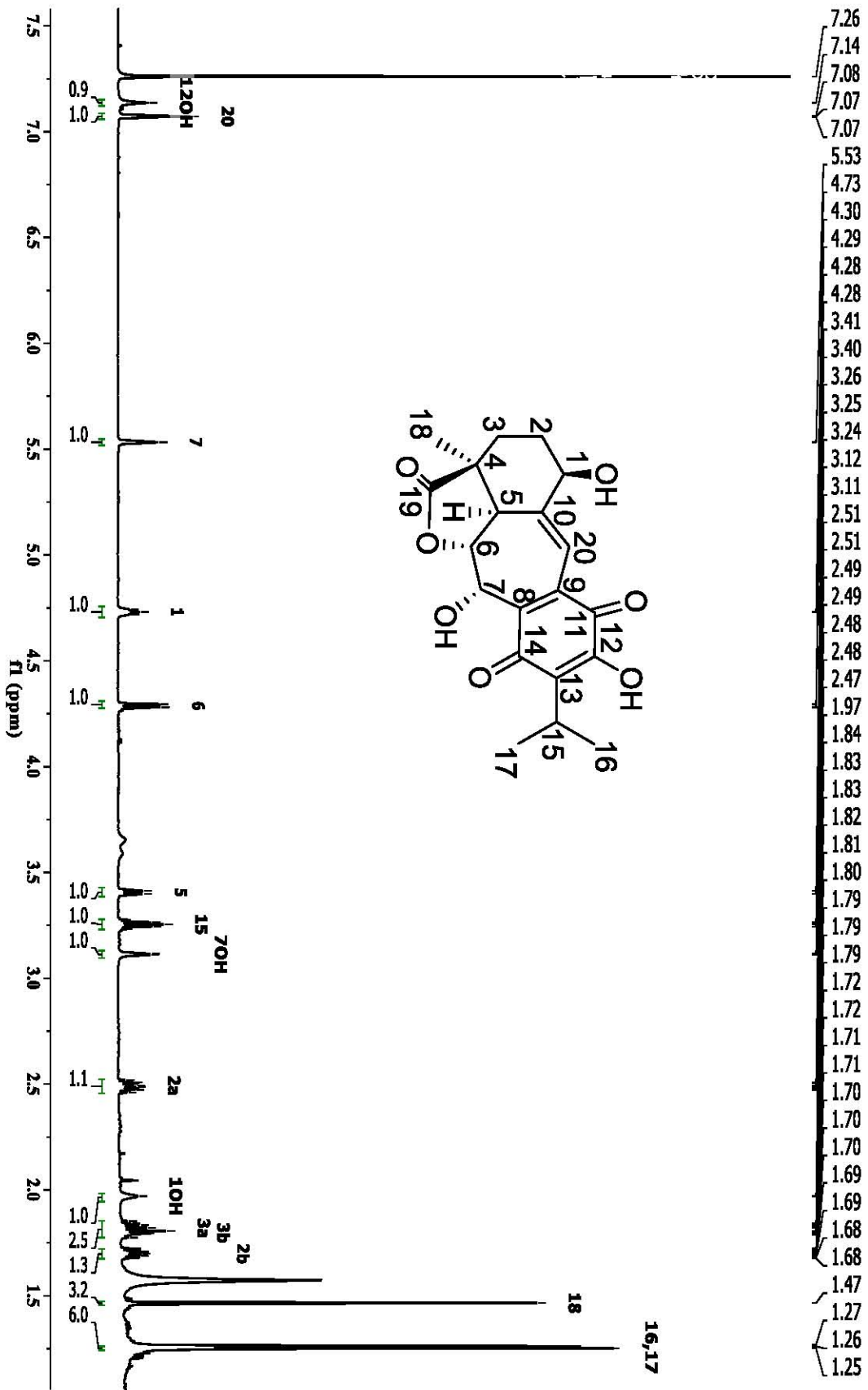
La actividad antioxidante de los compuestos aislados fue determinada empleando una adaptación del método descrito por Mellors y Tappel.¹² La prueba se realizó utilizando microplacas de 90 pocillos. Los compuestos de prueba (50 μ L) se mezclaron con 150 μ L de una solución etanólica de DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazilo). La mezcla se incubó por 30 min a 37°C y se midió la

¹¹ Carlson, R.P.; O'Neill-Davis, L.; Chang, J.; Lewis, A.J. *Agent actions* **17**, 197-204, (1985)

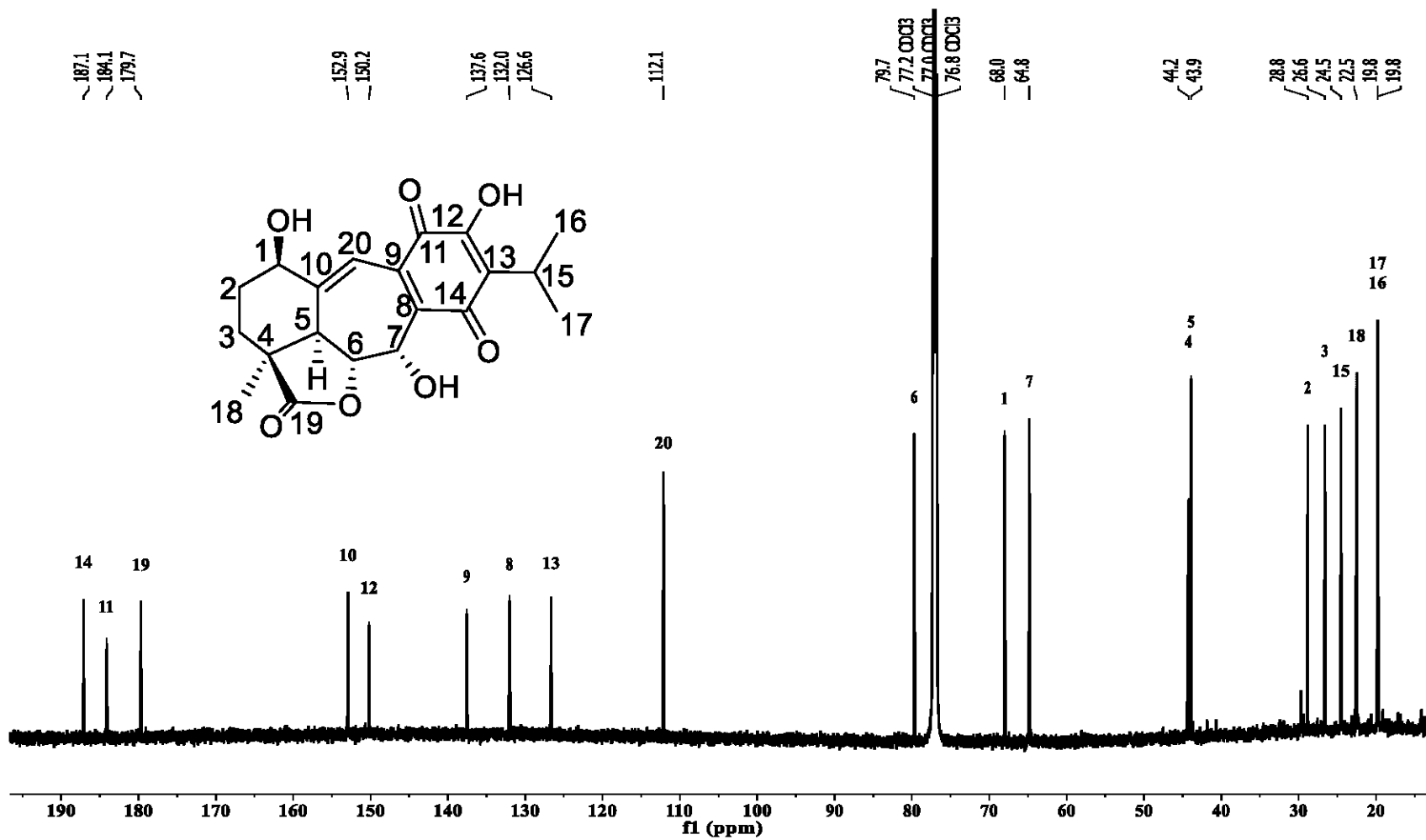
¹² Mellors, A. and Tappel, A.L. *J. Biol. Chem.* **241**, 4353-4356, (1966).

absorbancia a 515 nm usando un lector de microplacas SYNERGY HT (BioTek). El % de inhibición se determinó por comparación con 100 μ L de DPPH en etanol como solución blanco.

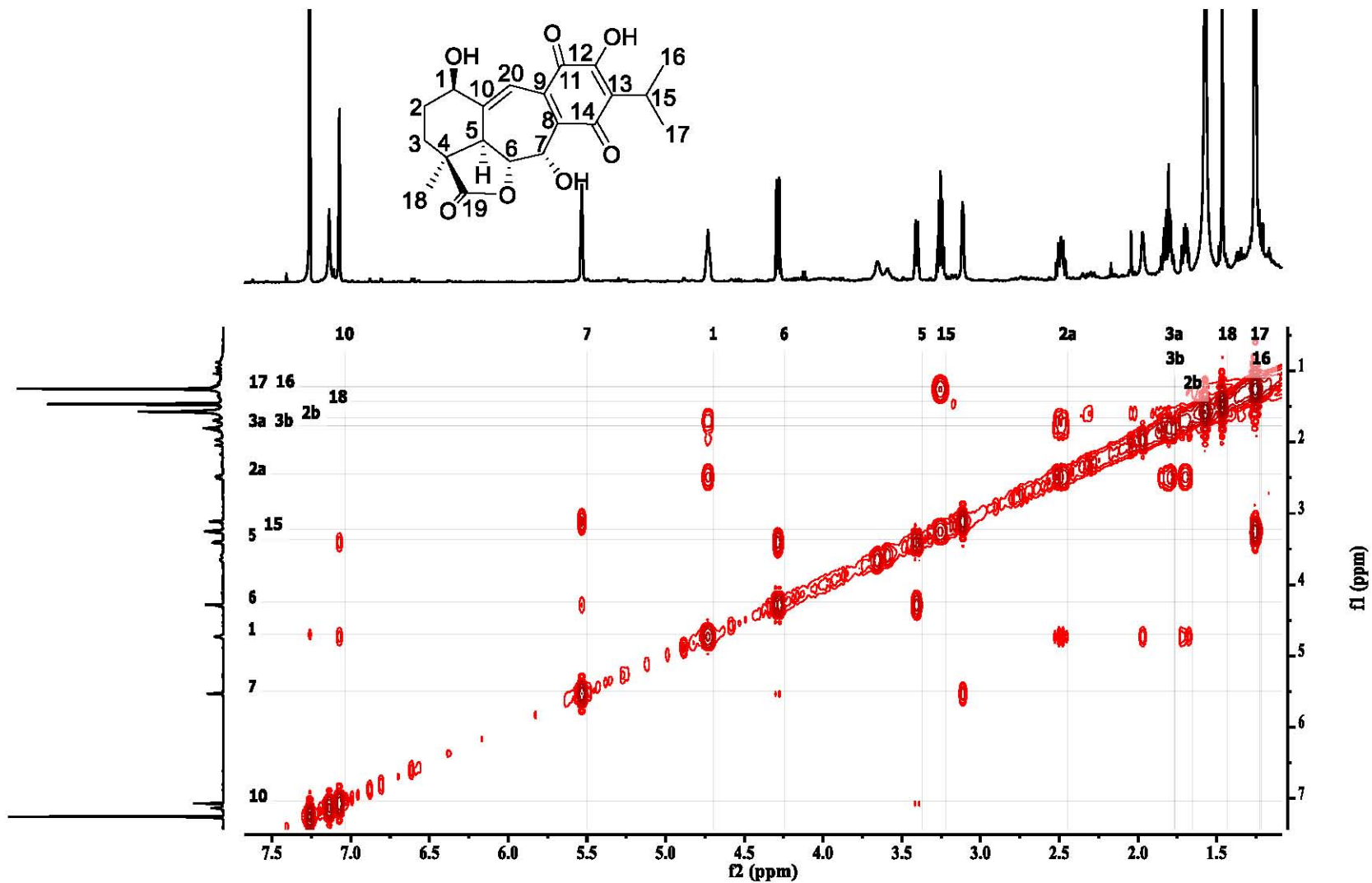
VIII.- ESPECTROS



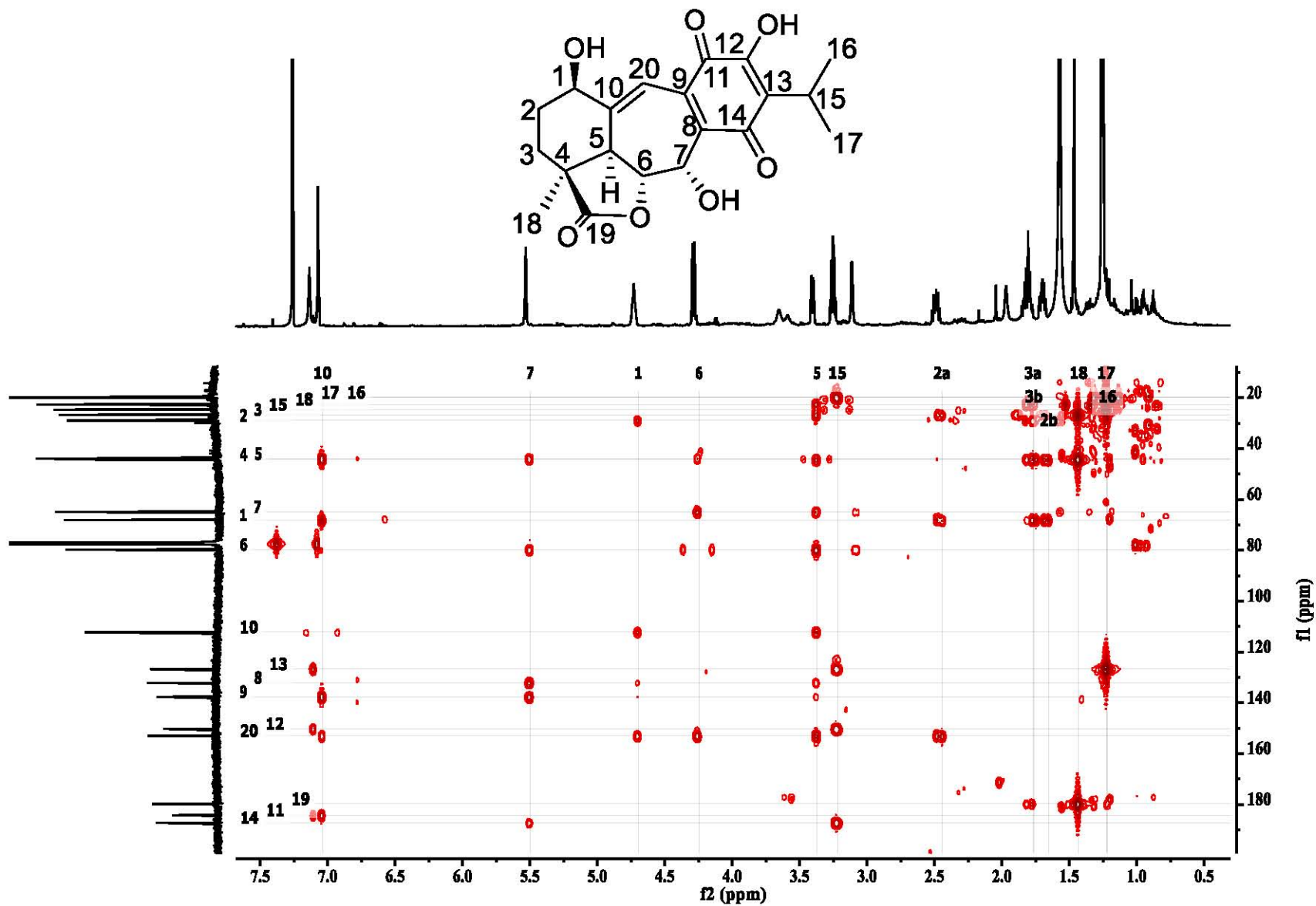
Espectro 1. RMN de ^1H del compuesto 1 (CDCl_3 , 700 MHz).



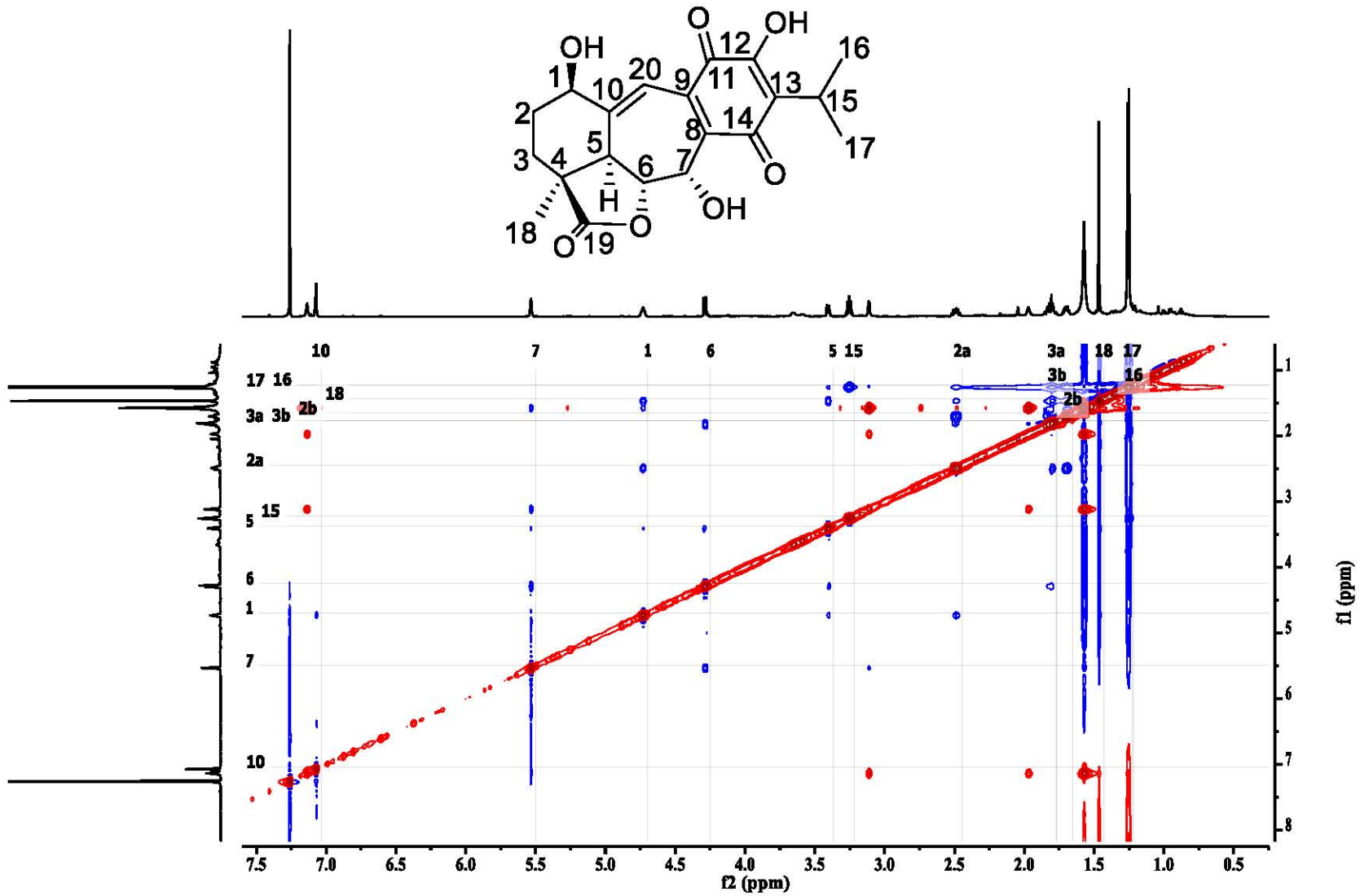
Espectro 2. RMN de ¹³C del compuesto 1 (CDCl₃, 175 MHz).



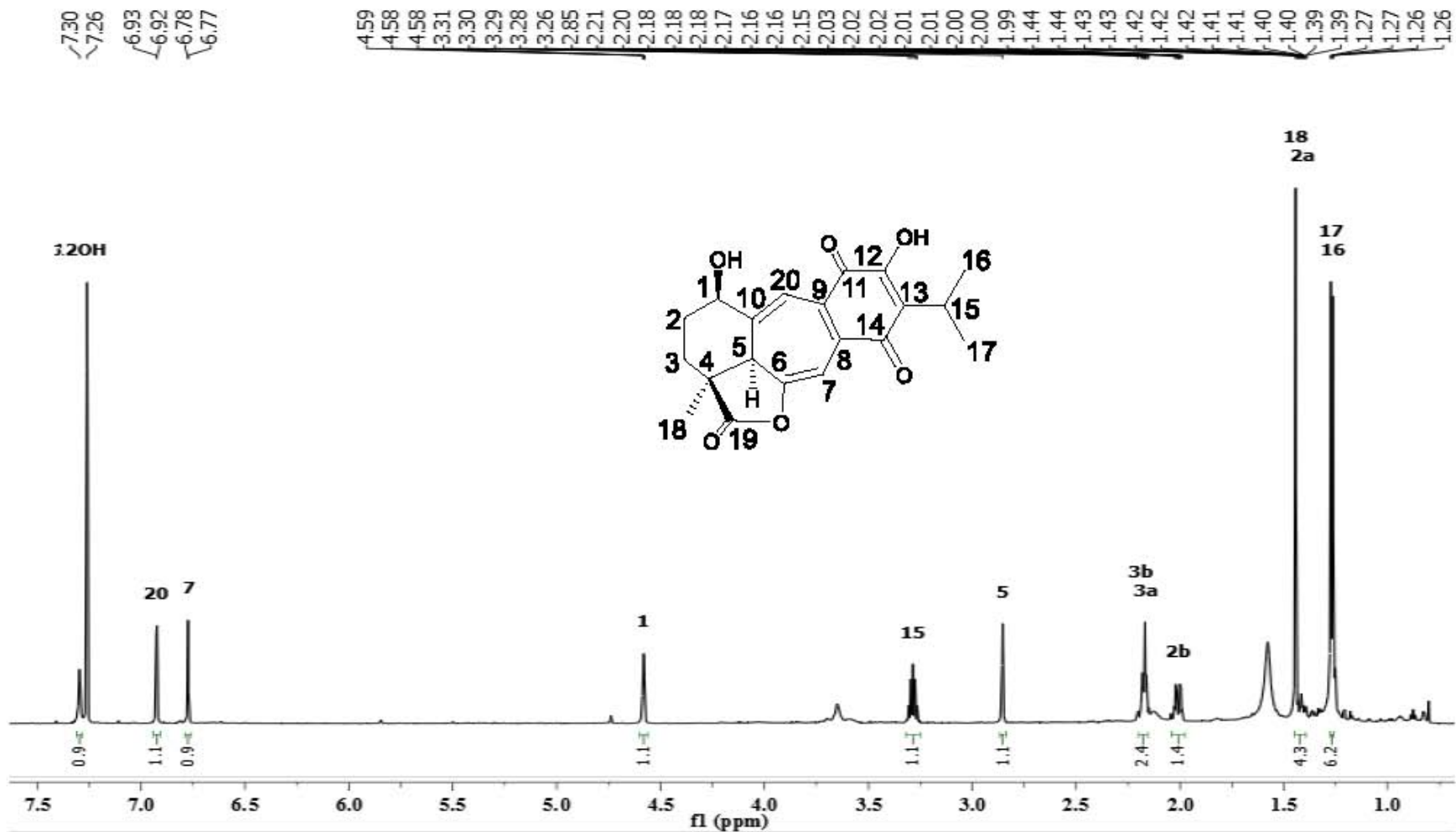
Espectro 3. COSY del compuesto 1 (CDCl₃, 700 MHz).



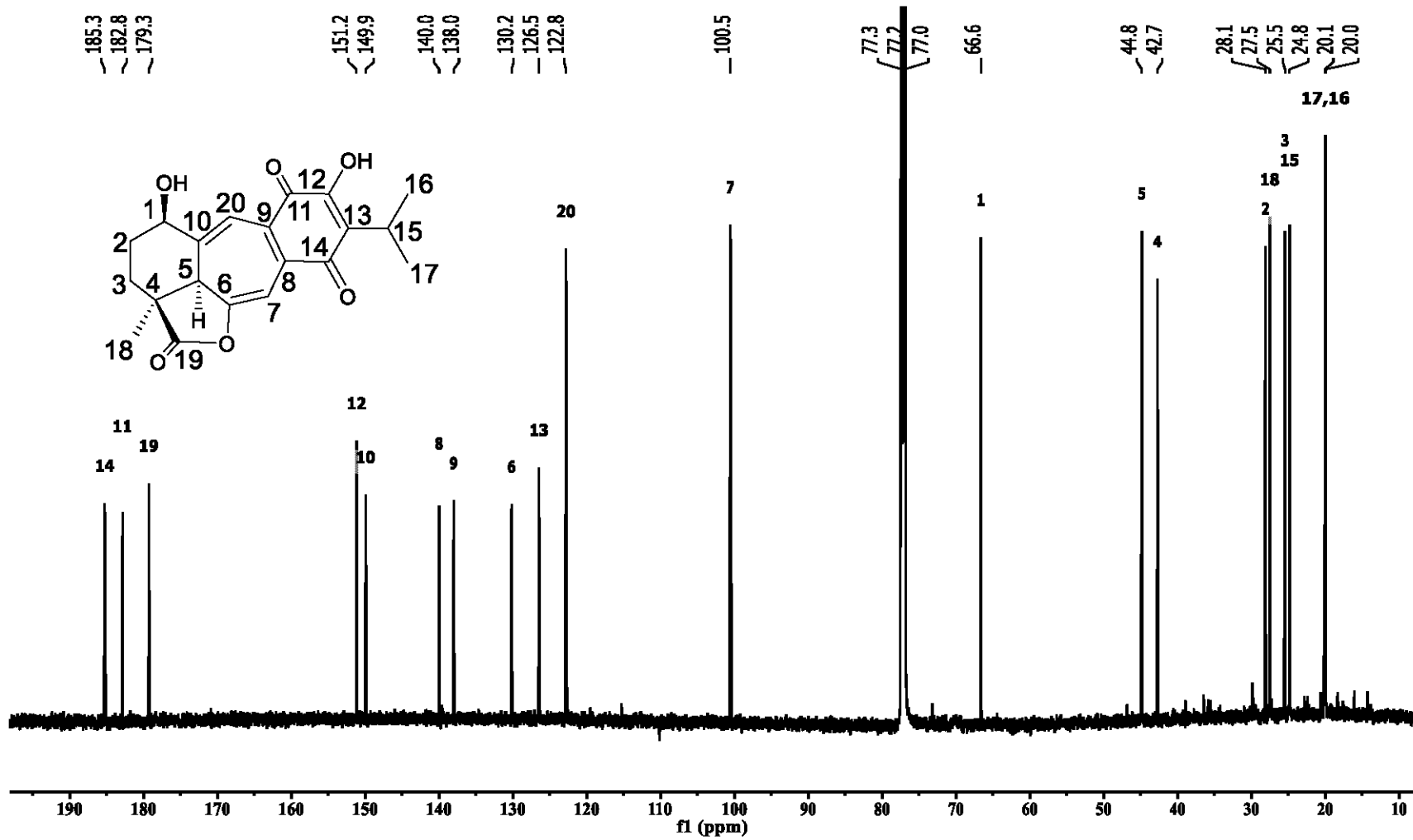
Espectro 4. HMBC del compuesto 1 (CDCl₃, 700 MHz).



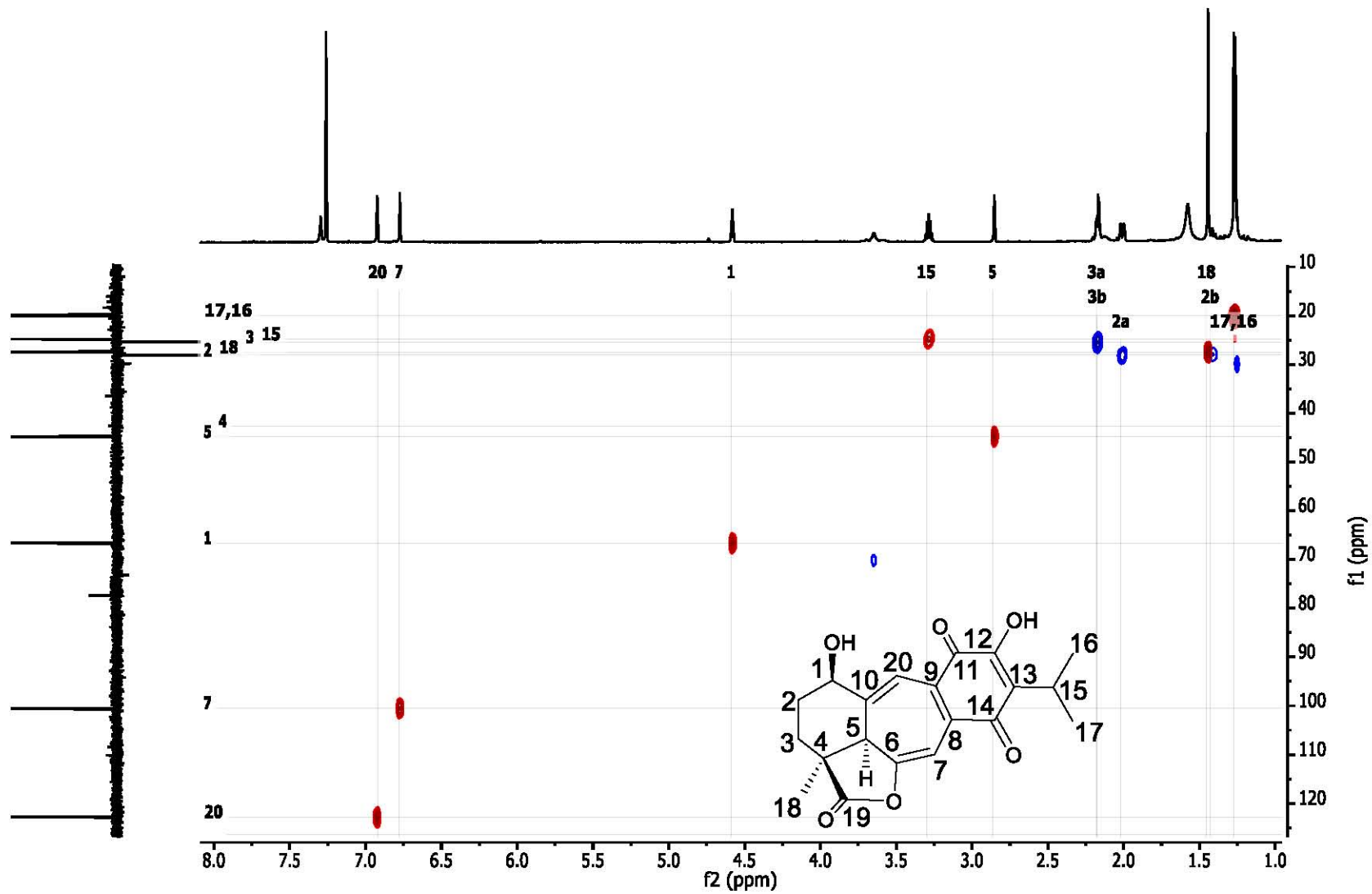
Espectro 5. NOESY del compuesto 1 (CDCl_3 , 700 MHz).



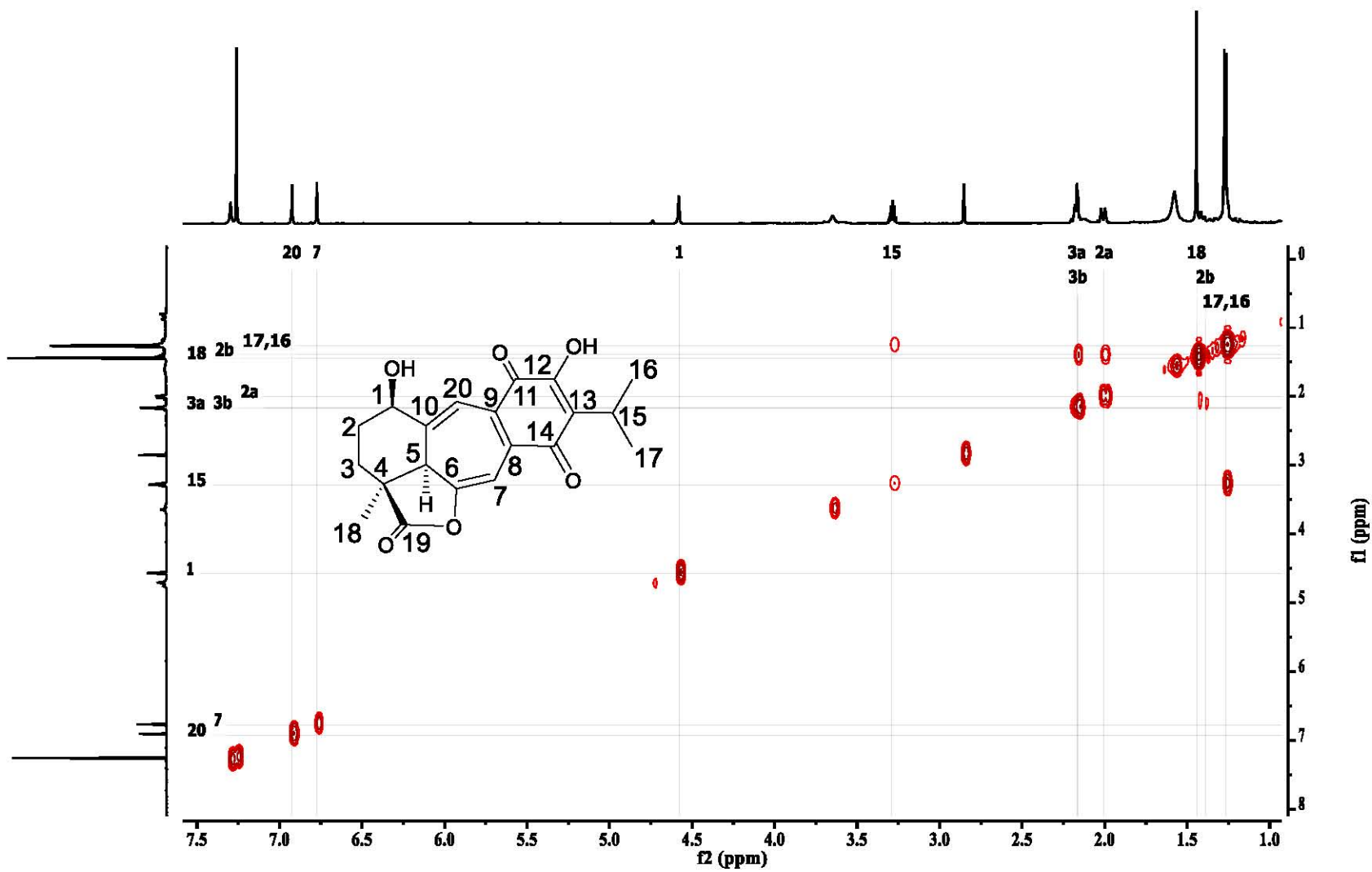
Espectro 6. RMN de ¹H del compuesto 2 (CDCl₃, 700 MHz).



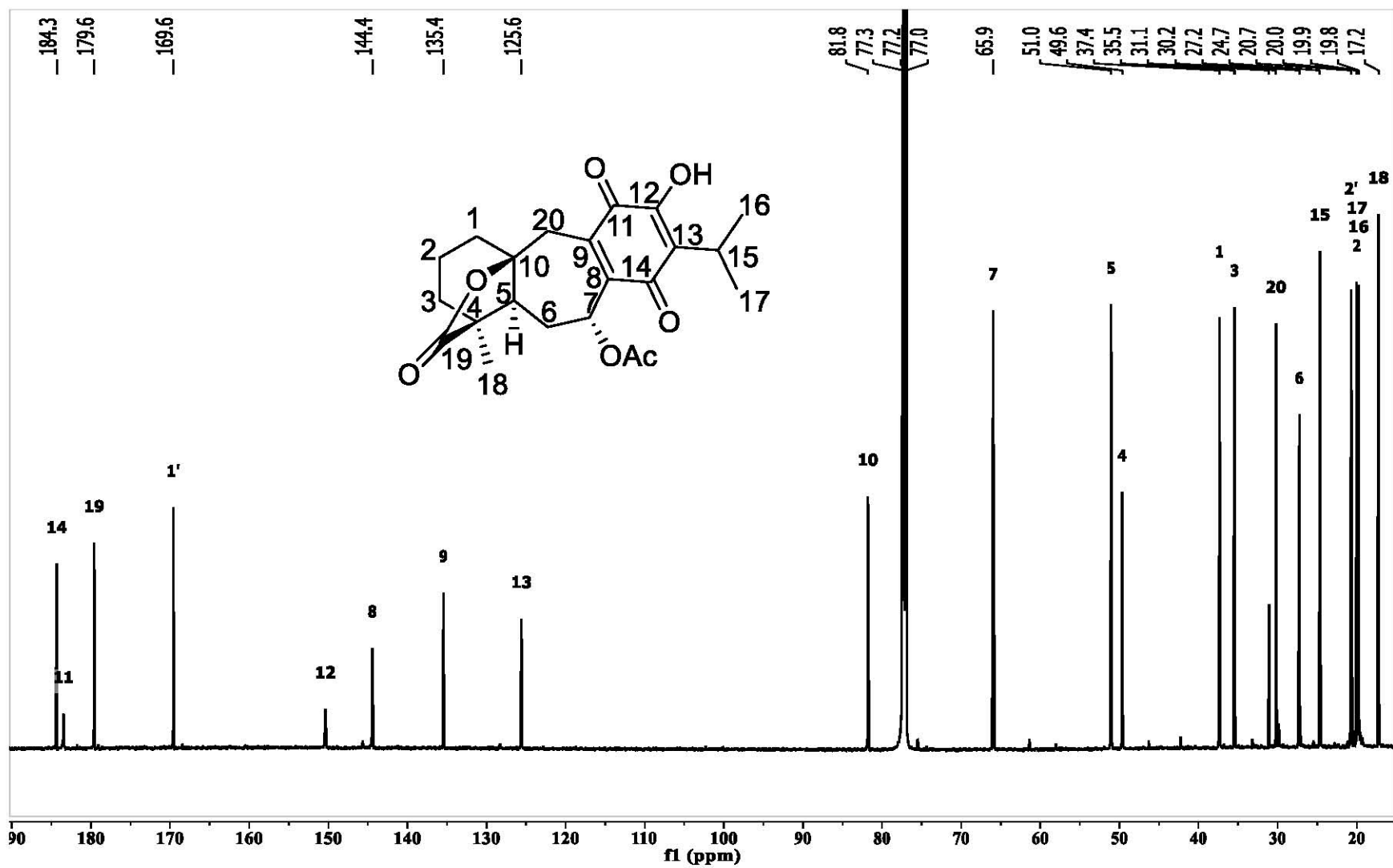
Espectro 7. RMN de ¹³C del compuesto 2 (CDCl₃, 175 MHz).



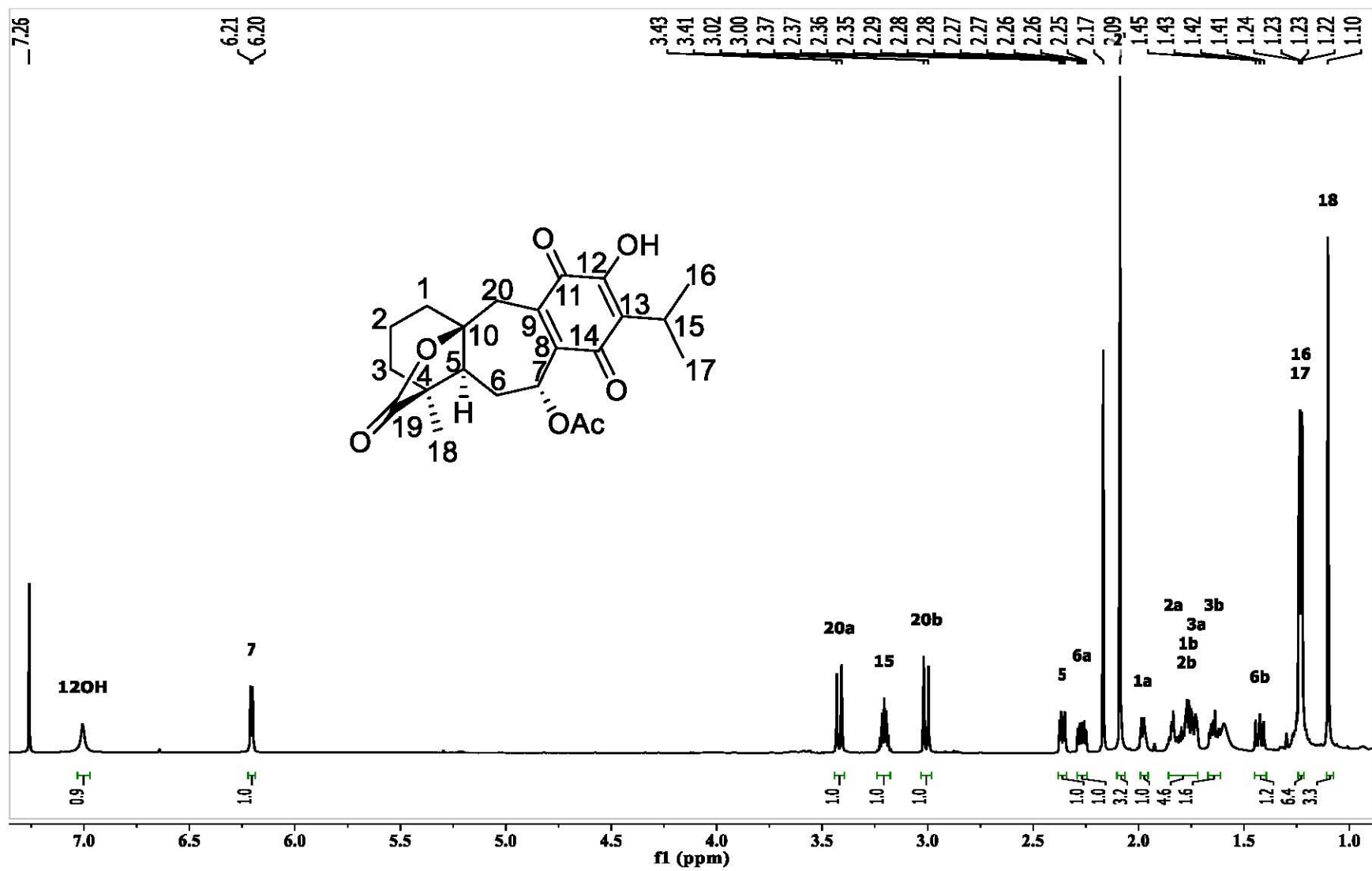
Espectro 8. HSQC del compuesto 2 (CDCl₃, 700 MHz).



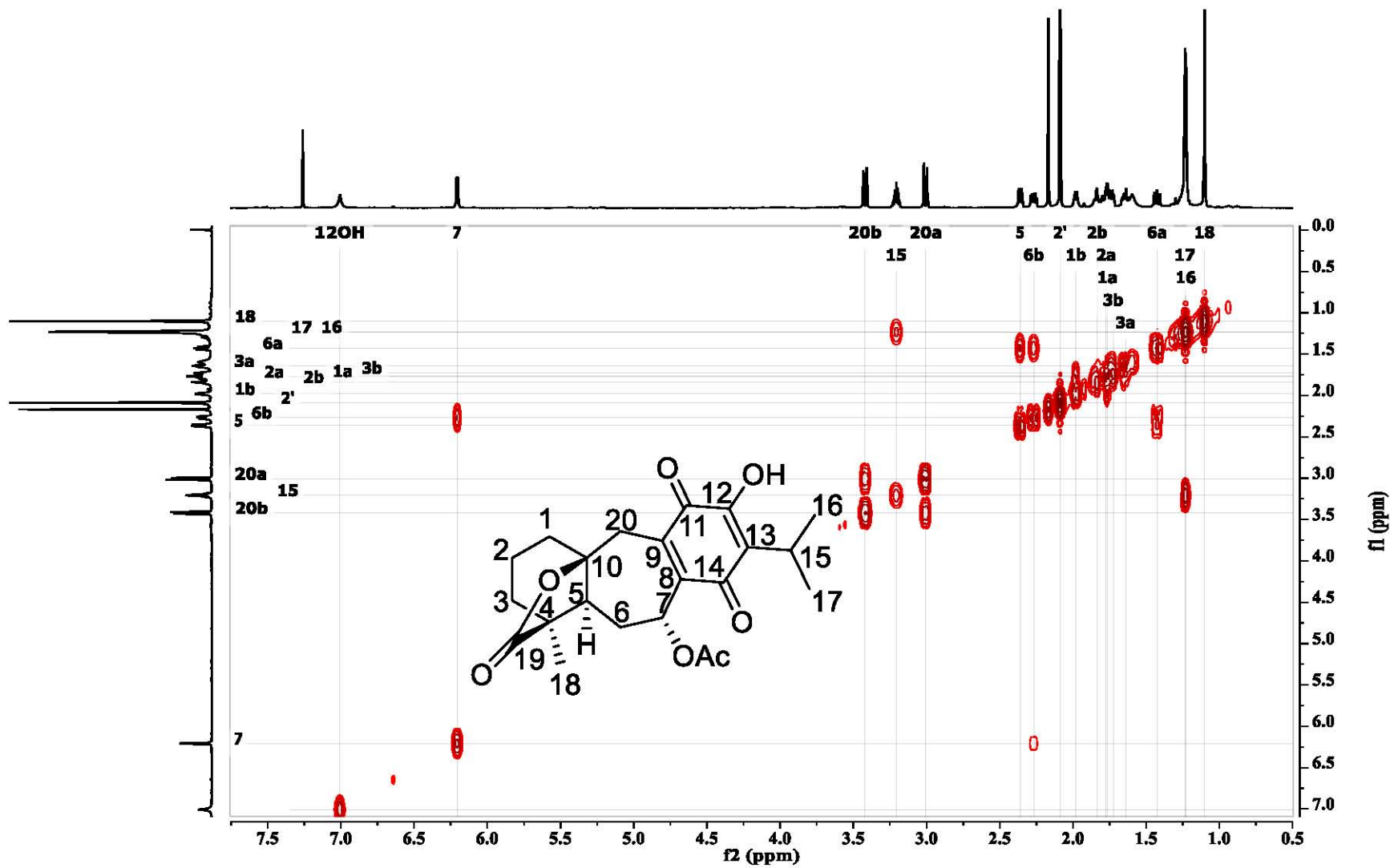
Espectro 9. COSY del compuesto **2** (CDCl₃, 700 MHz).



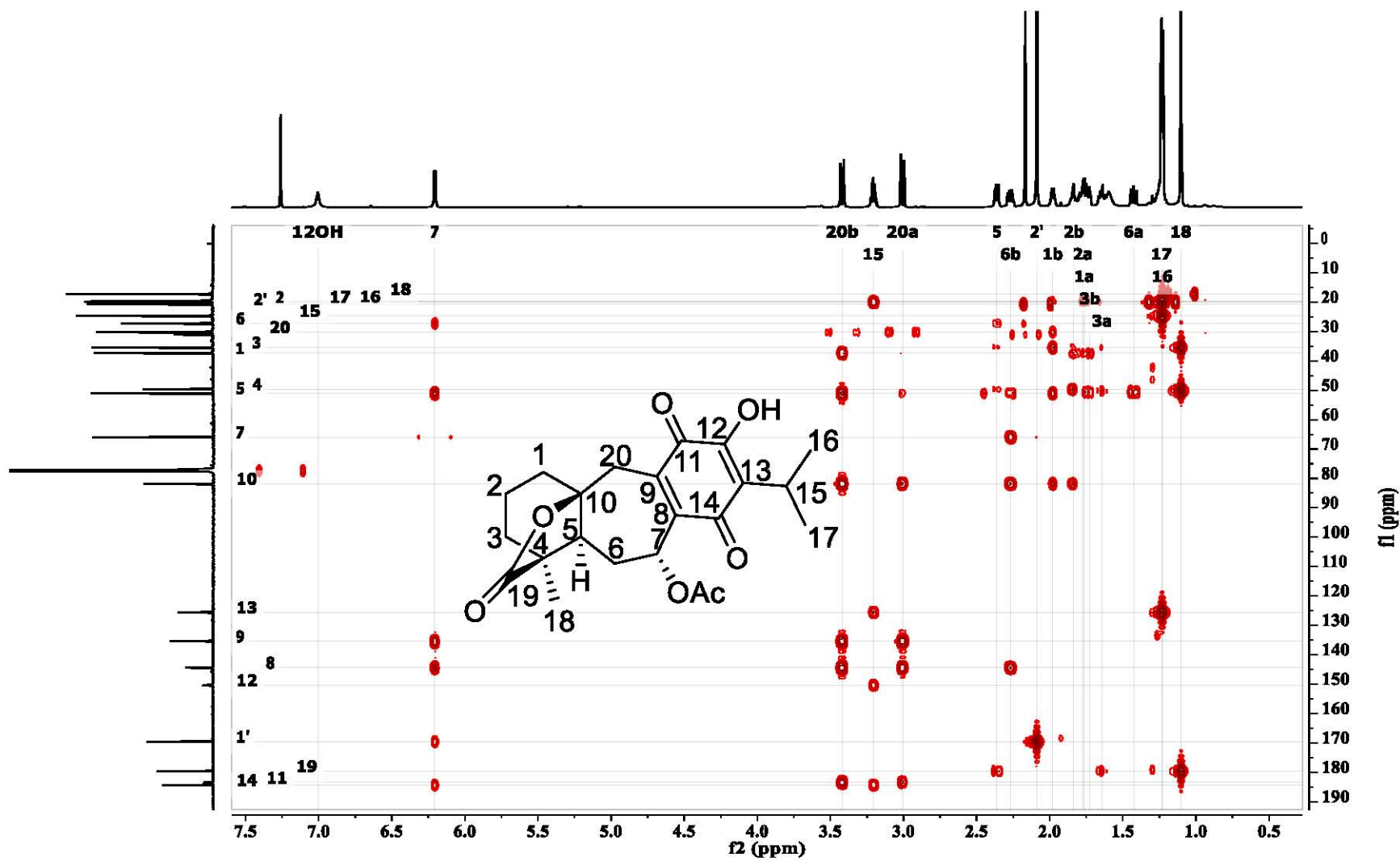
Espectro 10. RMN de ^{13}C del compuesto 3 (CDCl_3 , 175 MHz).



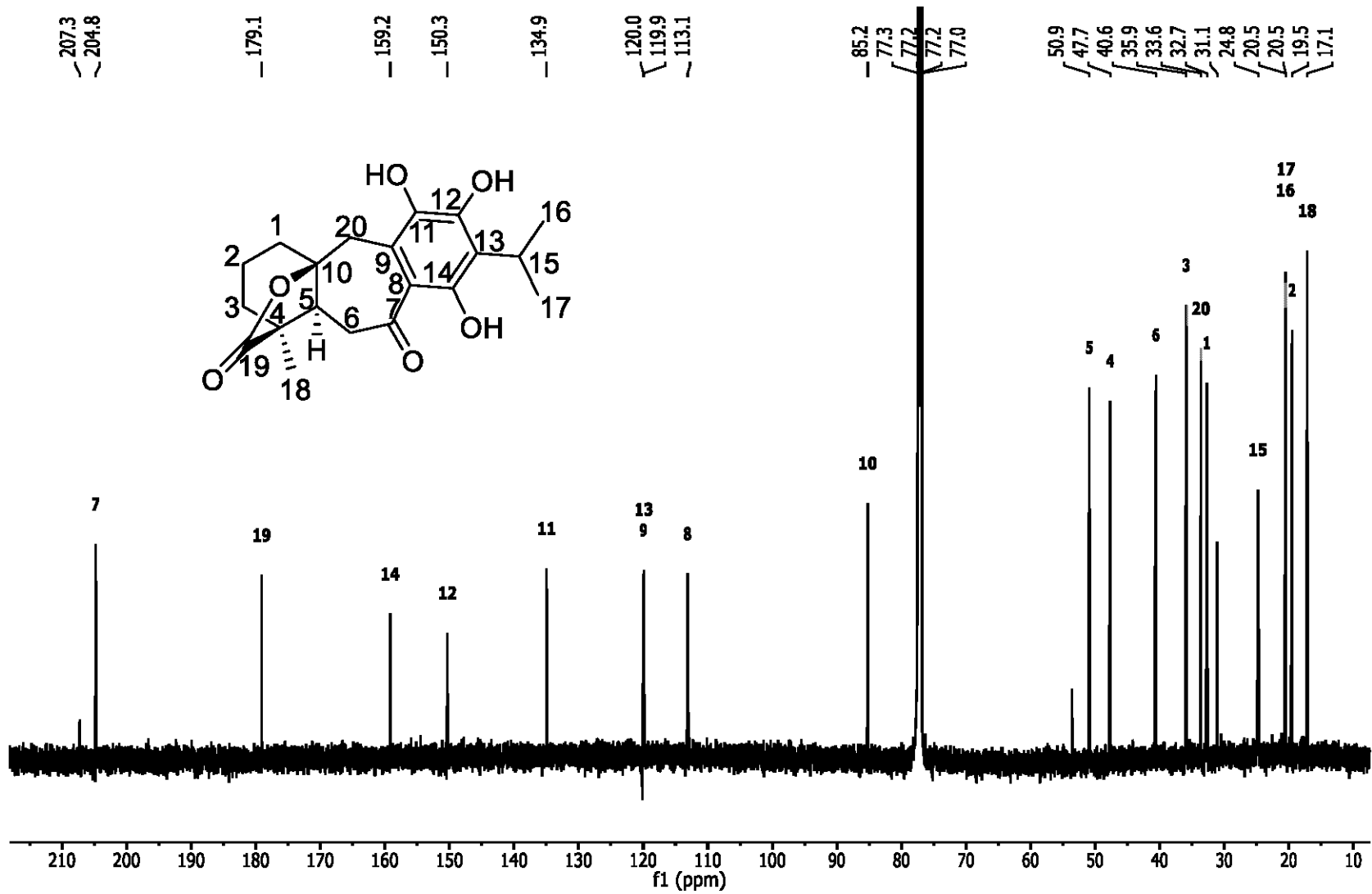
Espectro 11. RMN de ¹H del compuesto 3 (CDCl₃, 700 MHz).



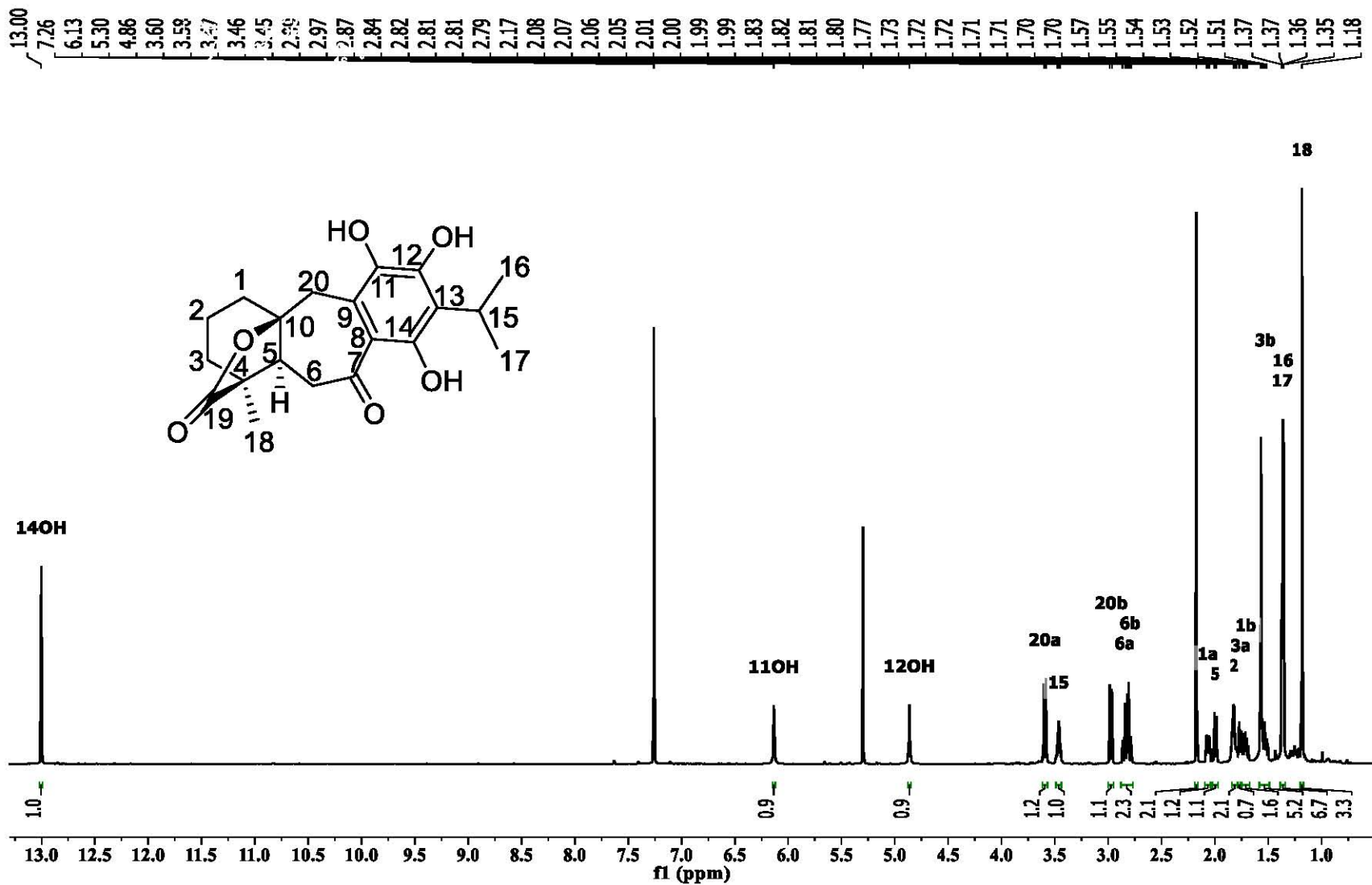
Espectro 12. COSY del compuesto 3 (CDCl₃, 700 MHz).



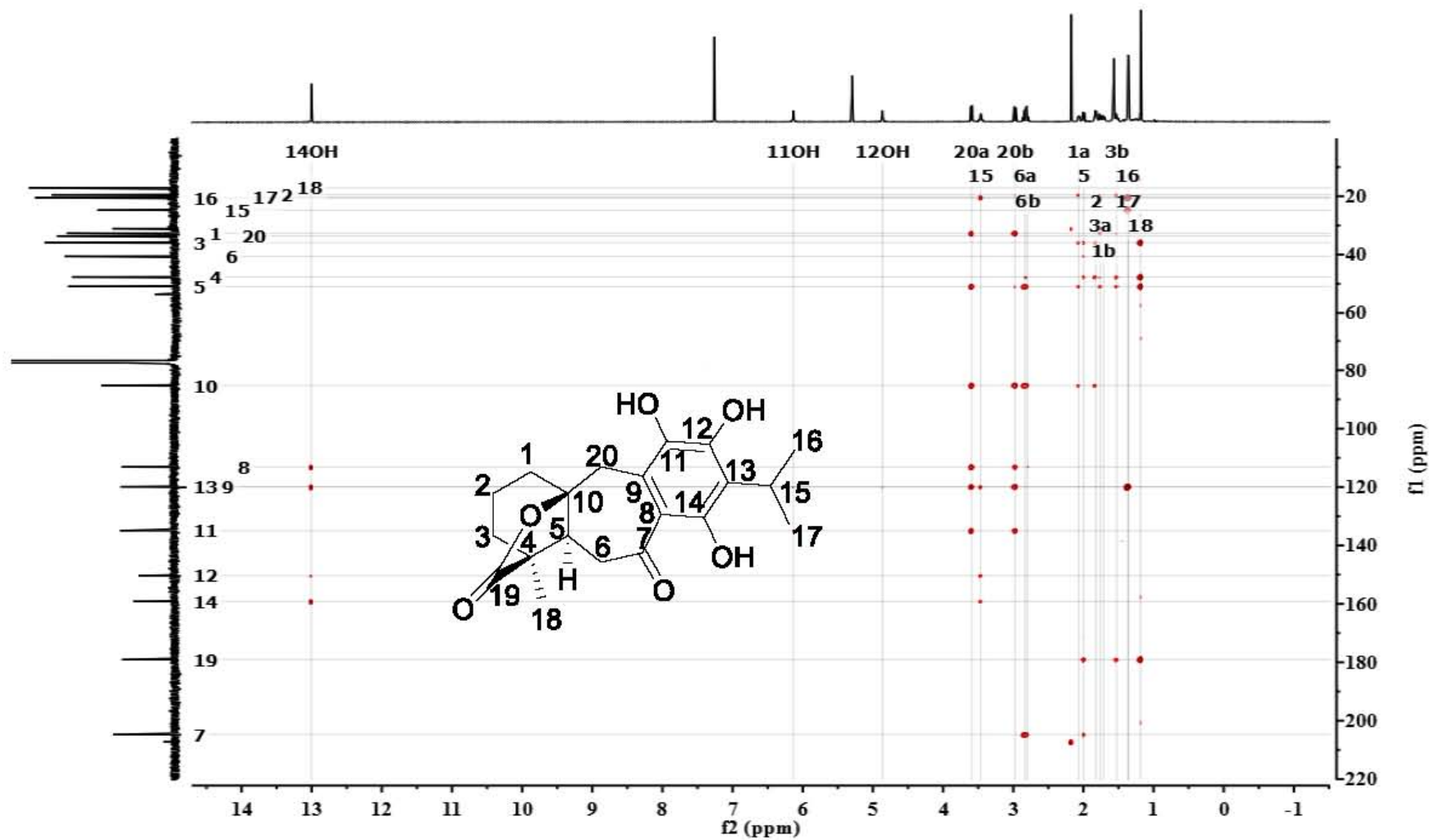
Espectro 13. HMBC del compuesto 3 (CDCl₃, 700 MHz).



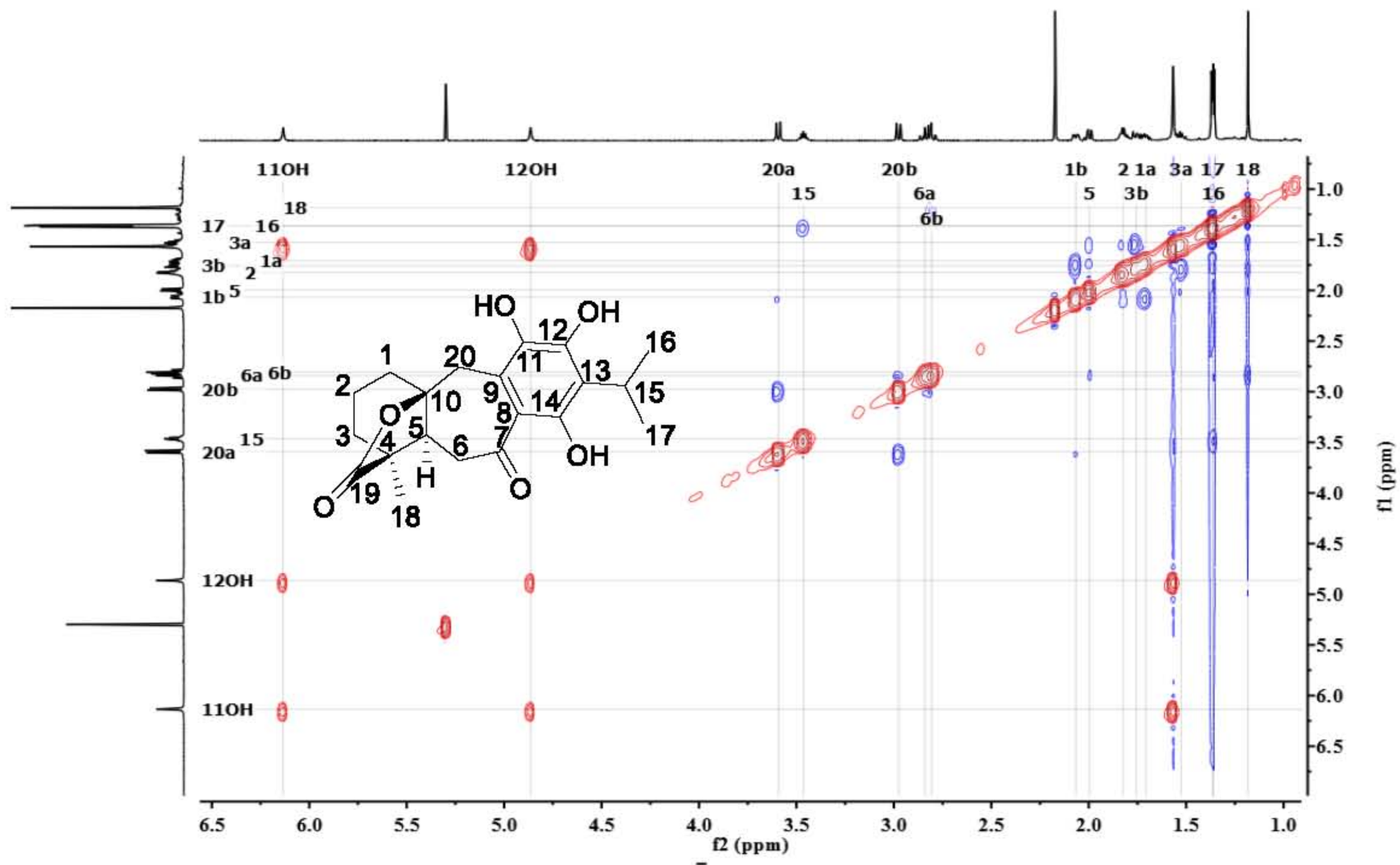
Espectro 14. RMN de ¹³C del compuesto 4 (CDCl₃, 175 MHz).



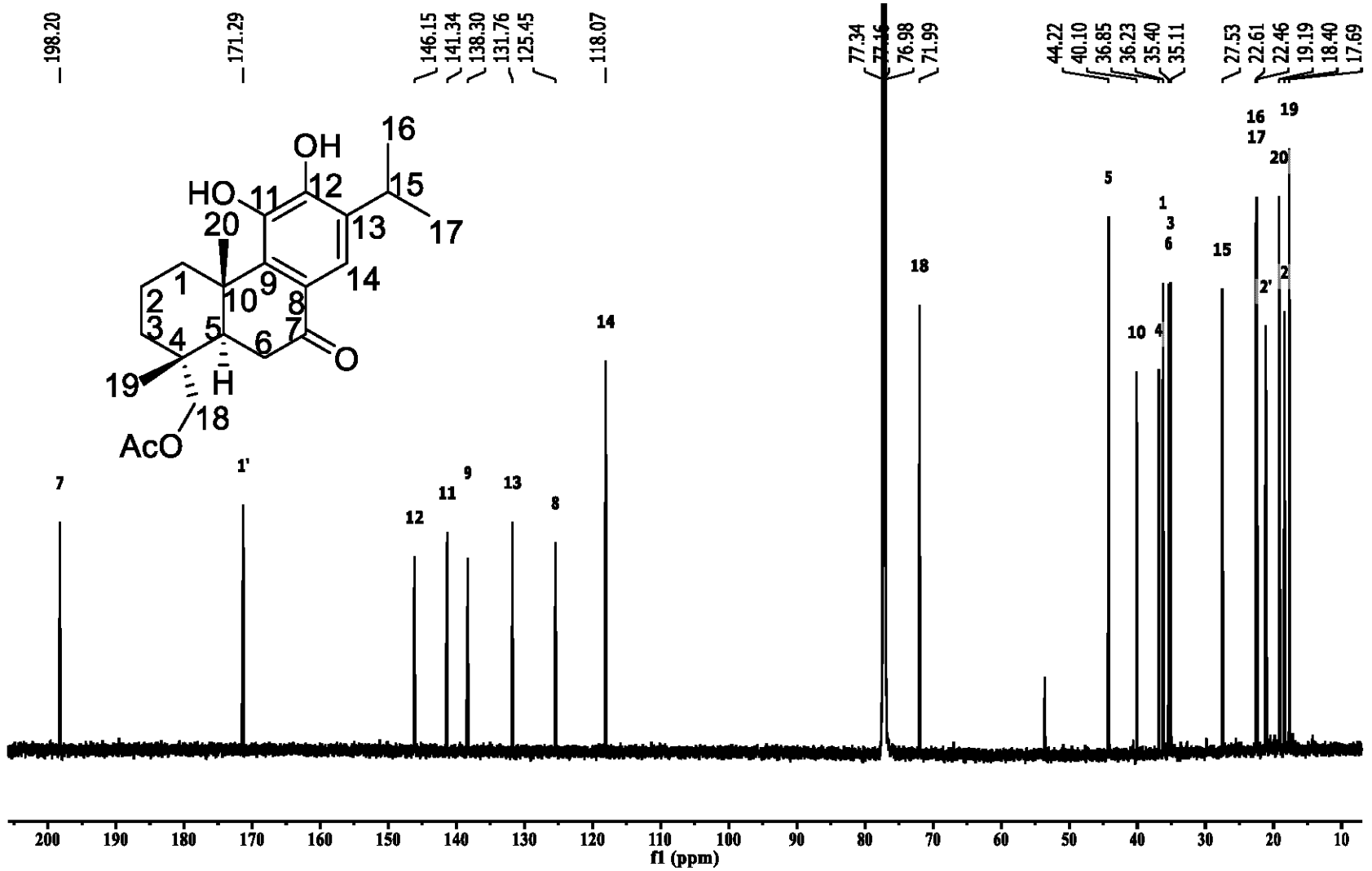
Espectro 15. RMN de ^1H del compuesto 4 (CDCl_3 , 700 MHz).



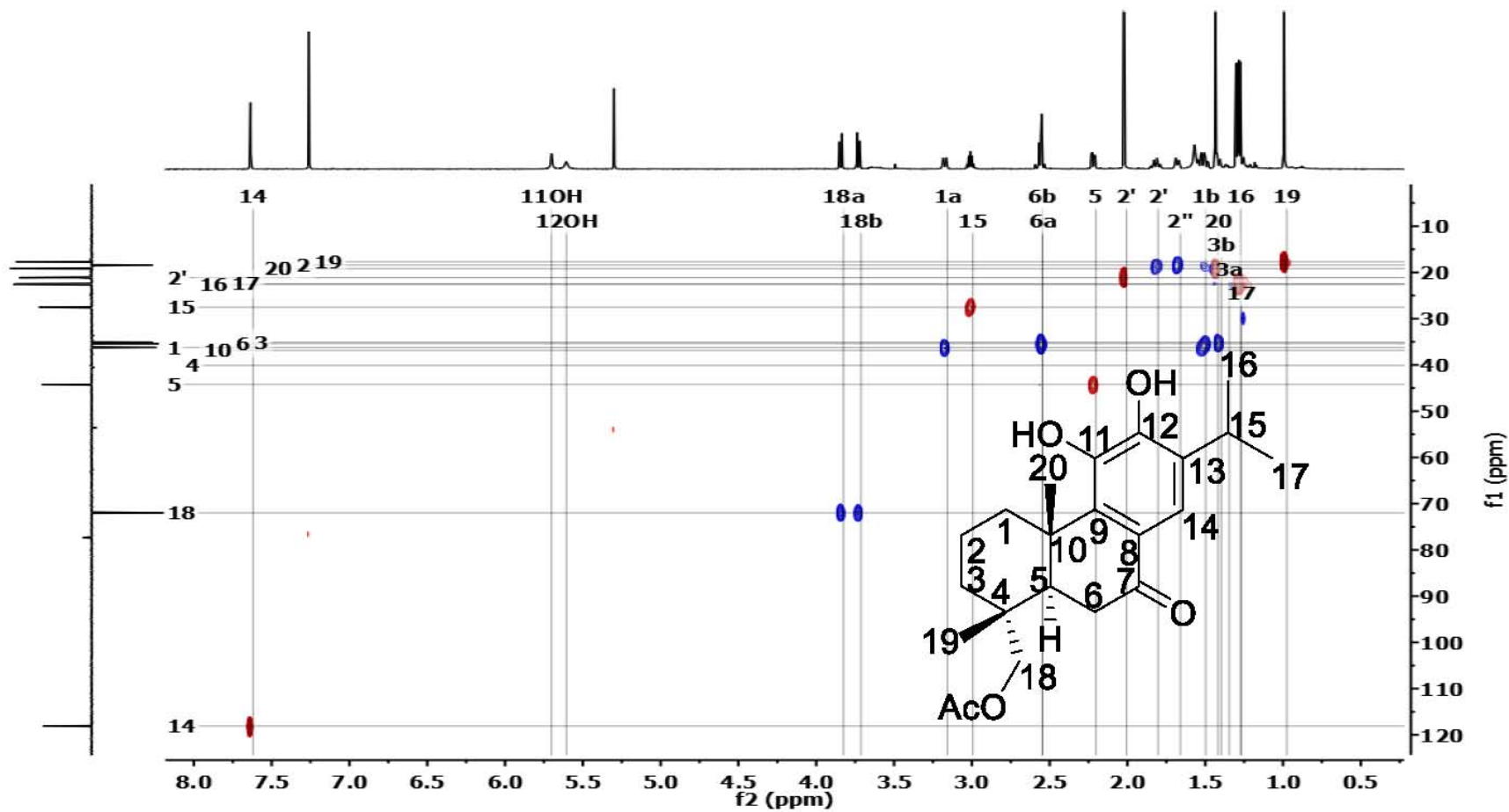
Espectro 16. HMBC del compuesto 4 (CDCl₃, 700 MHz).



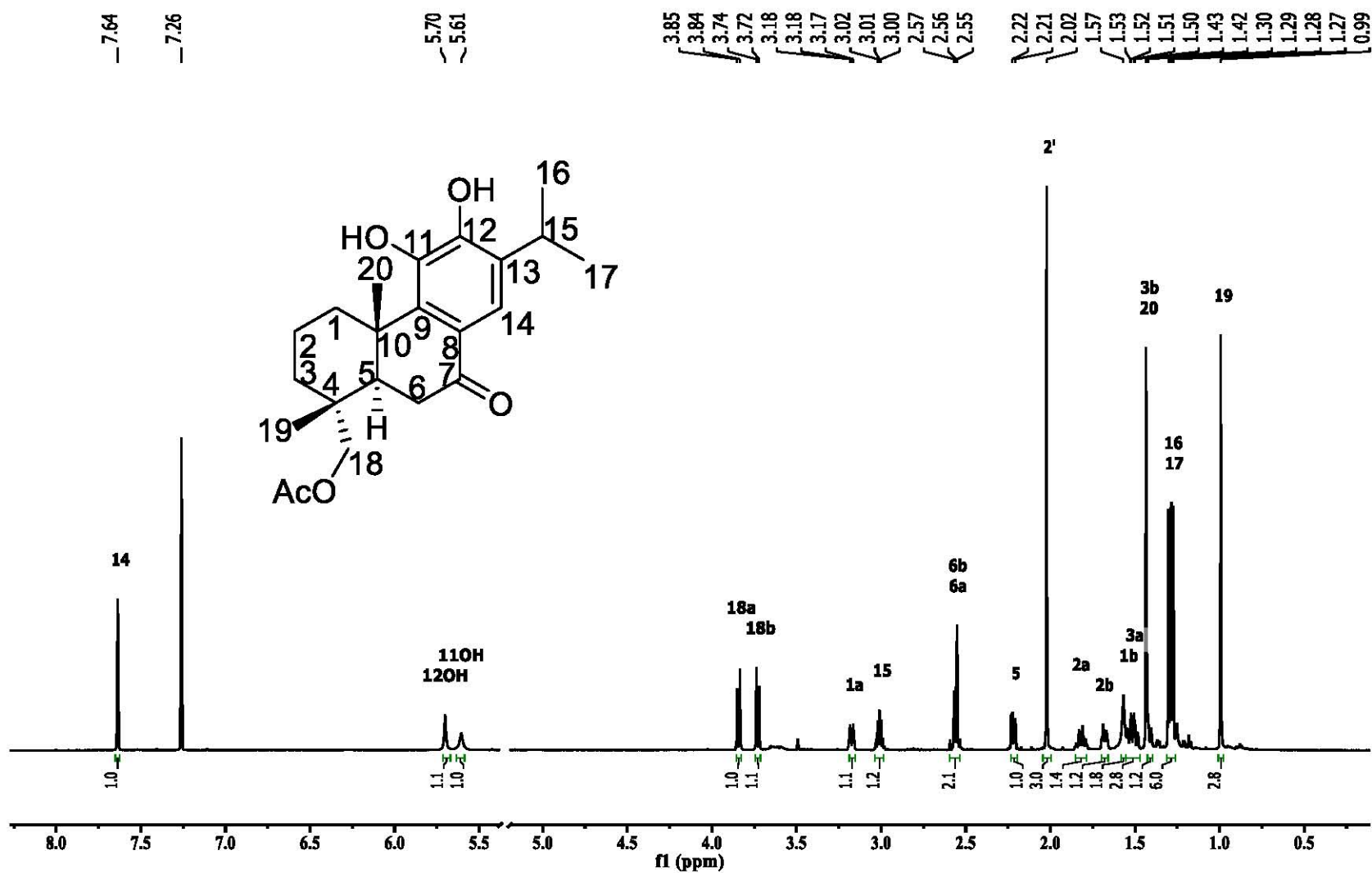
Espectro 17. NOESY del compuesto 4 (CDCl₃, 700 MHz).



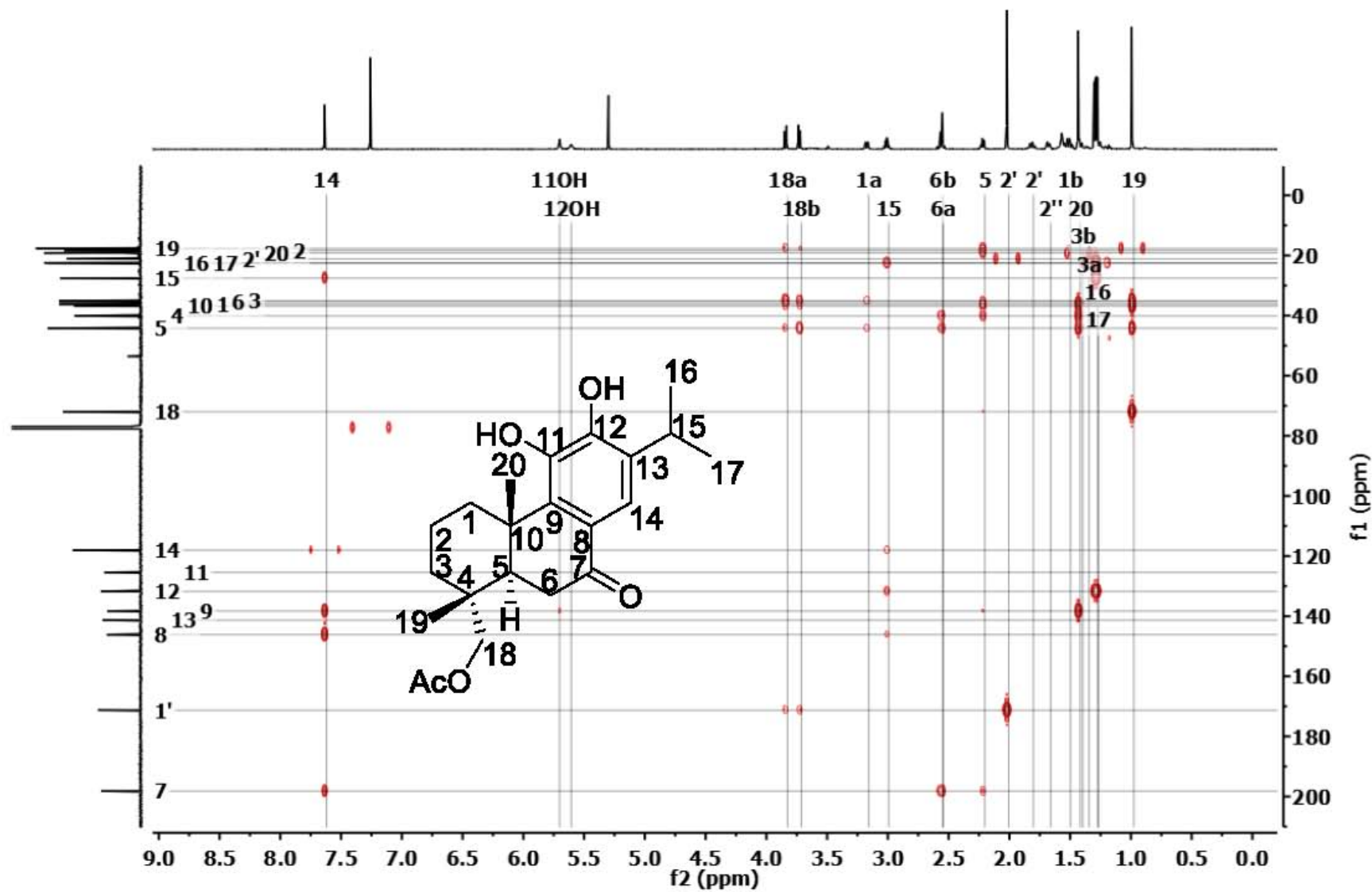
Espectro 18. RMN de ^{13}C del compuesto 5 (CDCl_3 , 175 MHz).



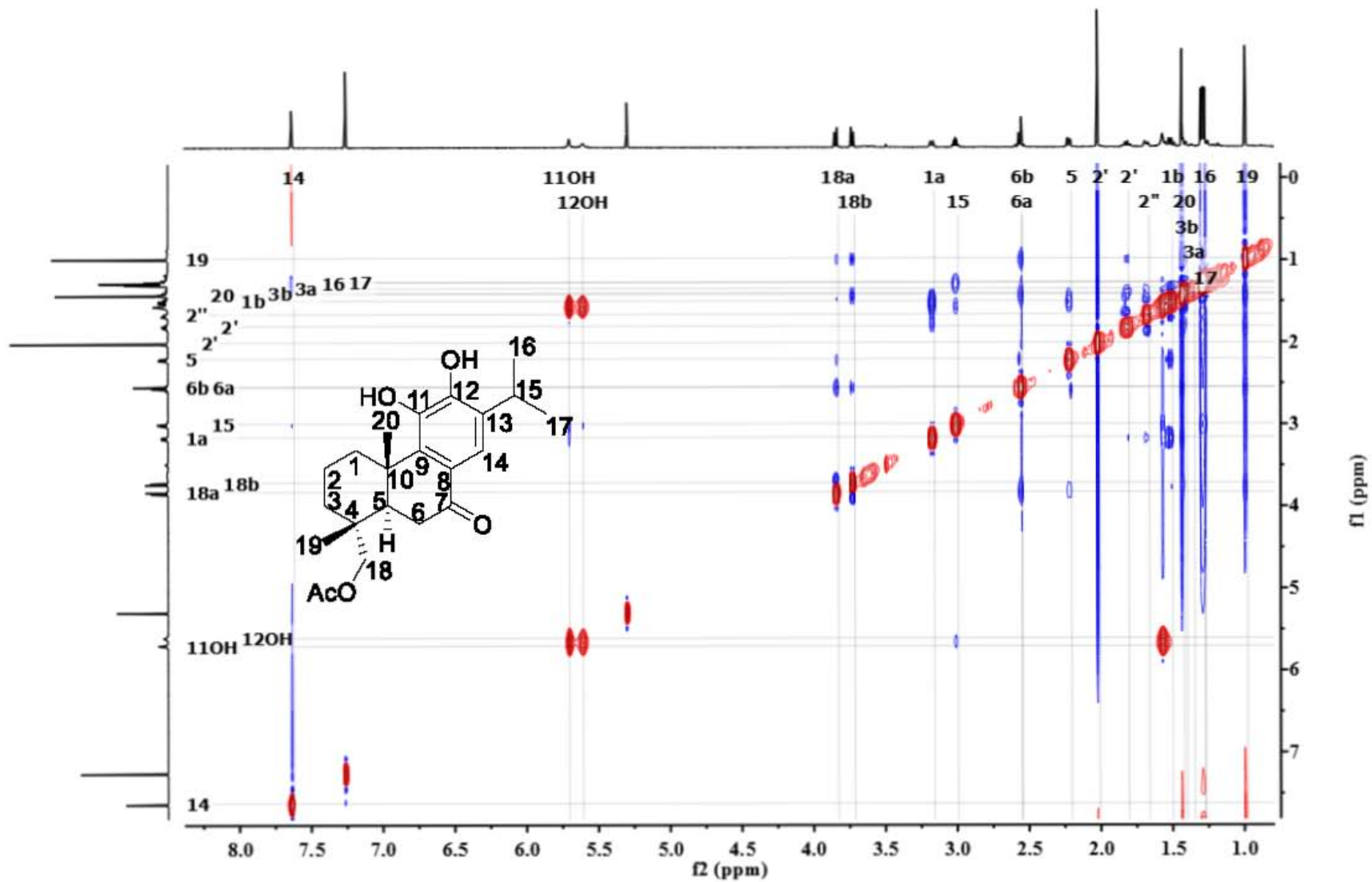
Espectro 19. HSQC del compuesto 5 (CDCl₃, 700 MHz).



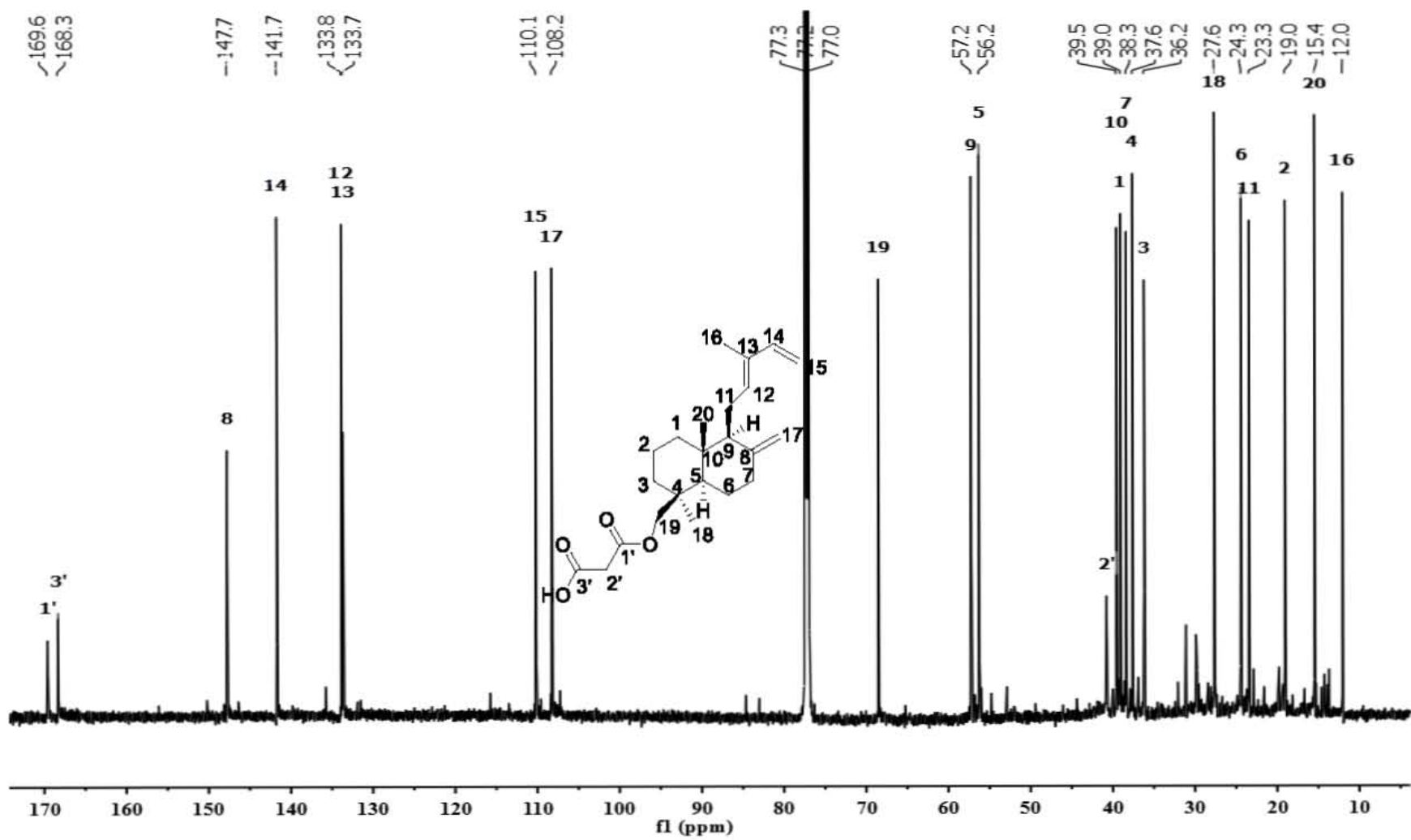
Espectro 20. RMN de ¹H del compuesto 5 (CDCl₃, 700 MHz).



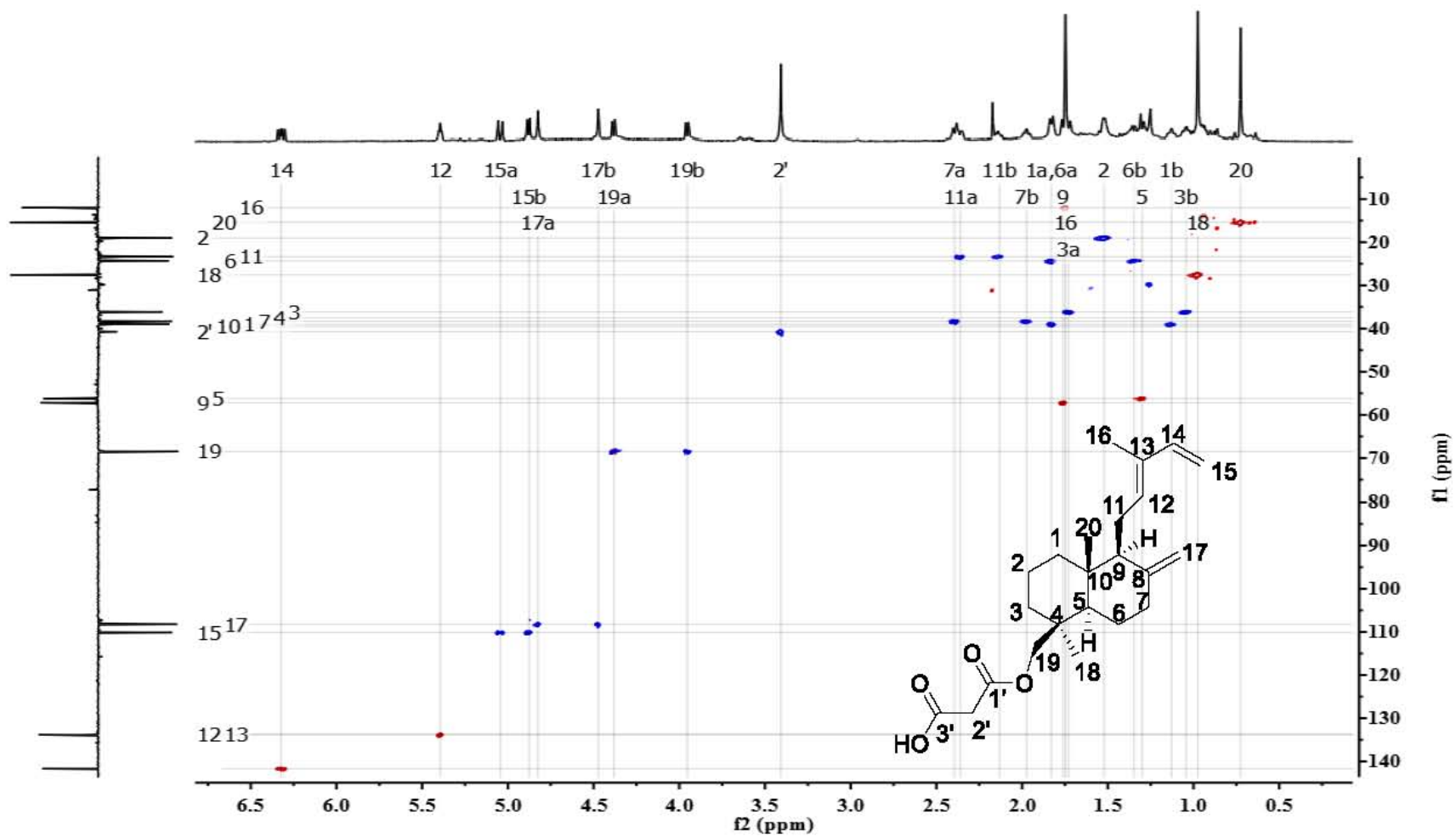
Espectro 21. HMBC del compuesto 5 (CDCl₃, 700 MHz).



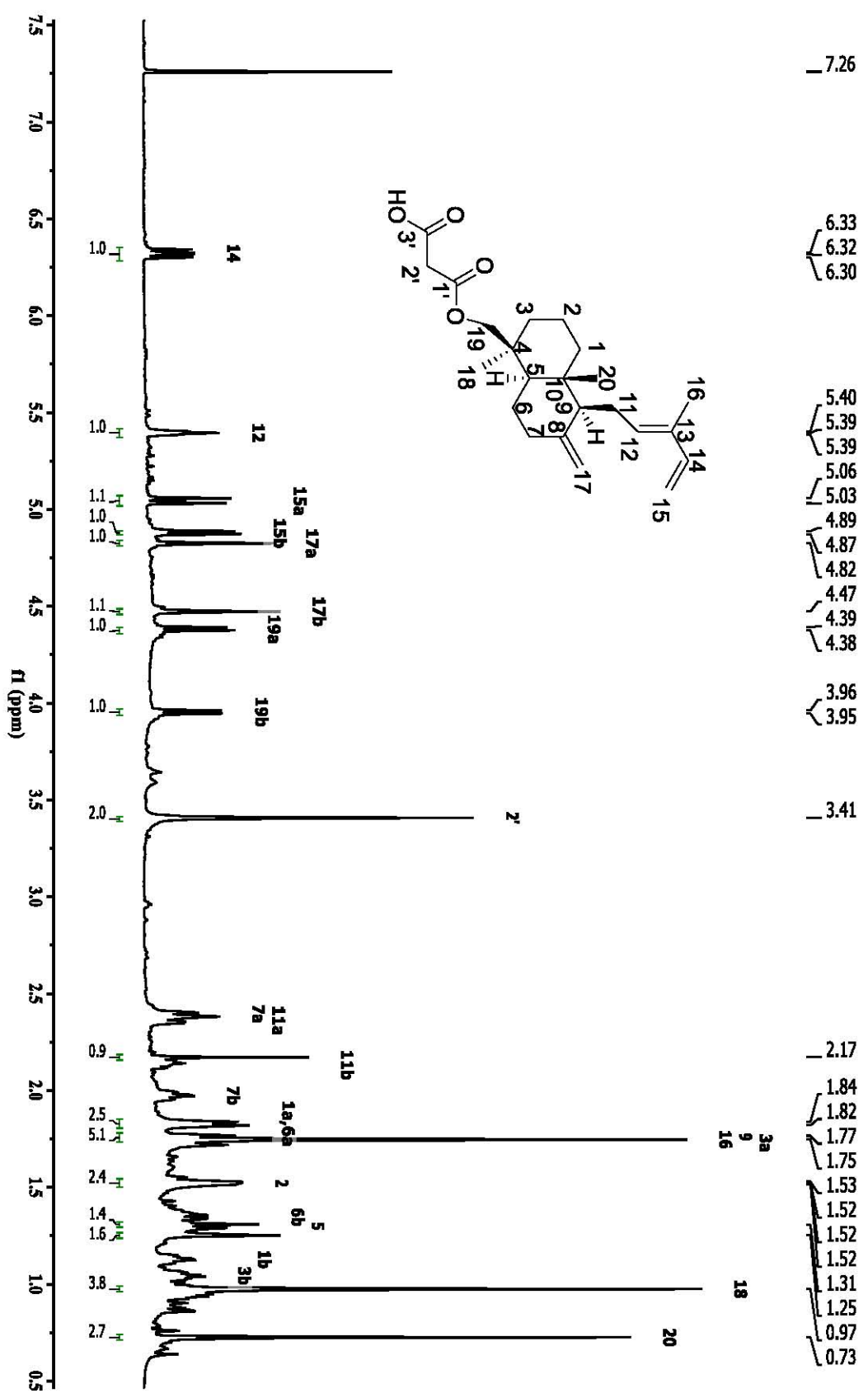
Espectro 22. NOESY del compuesto **5** (CDCl₃, 700 MHz).



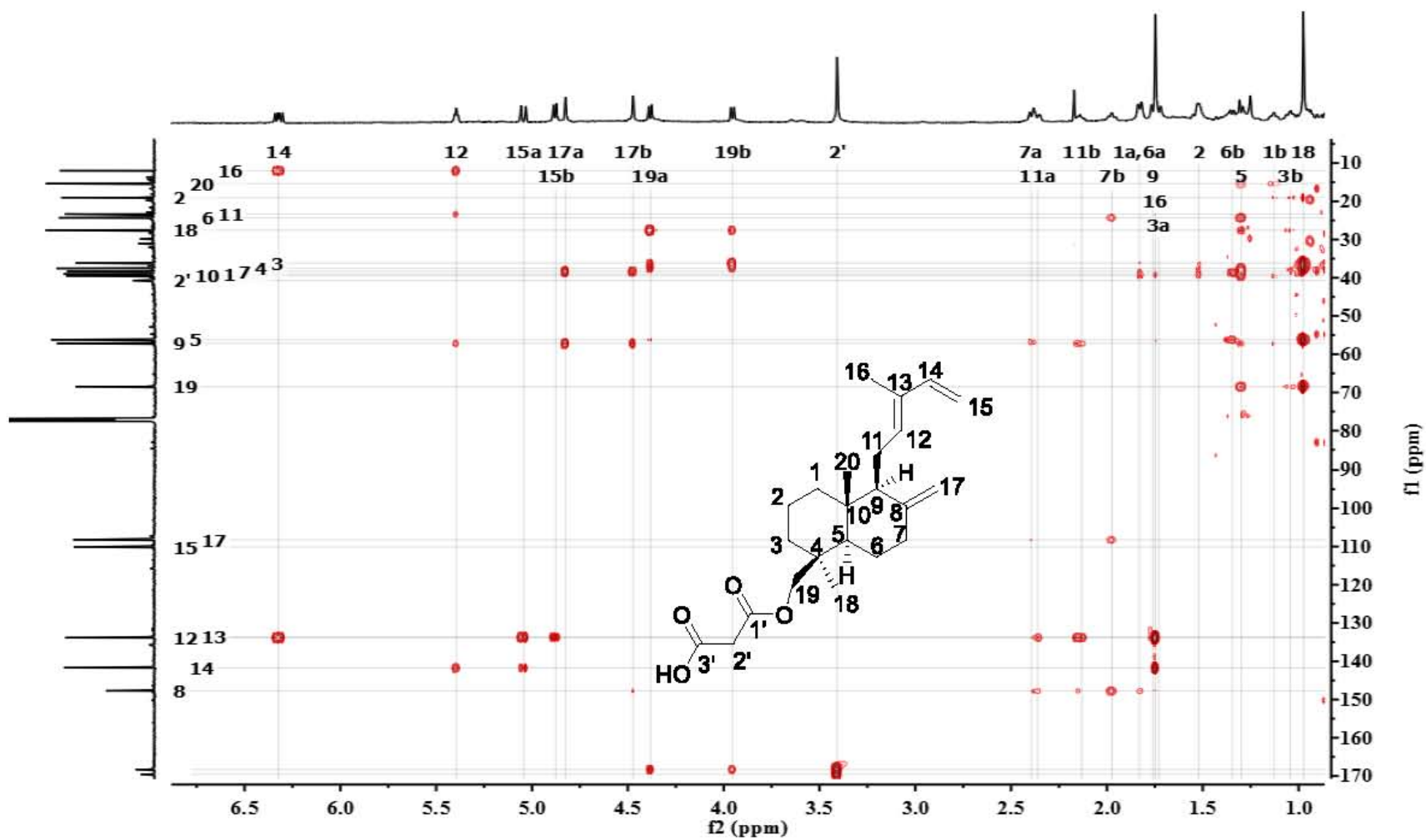
Espectro 23. RMN de ^{13}C del compuesto **19** (CDCl_3 , 175 MHz).



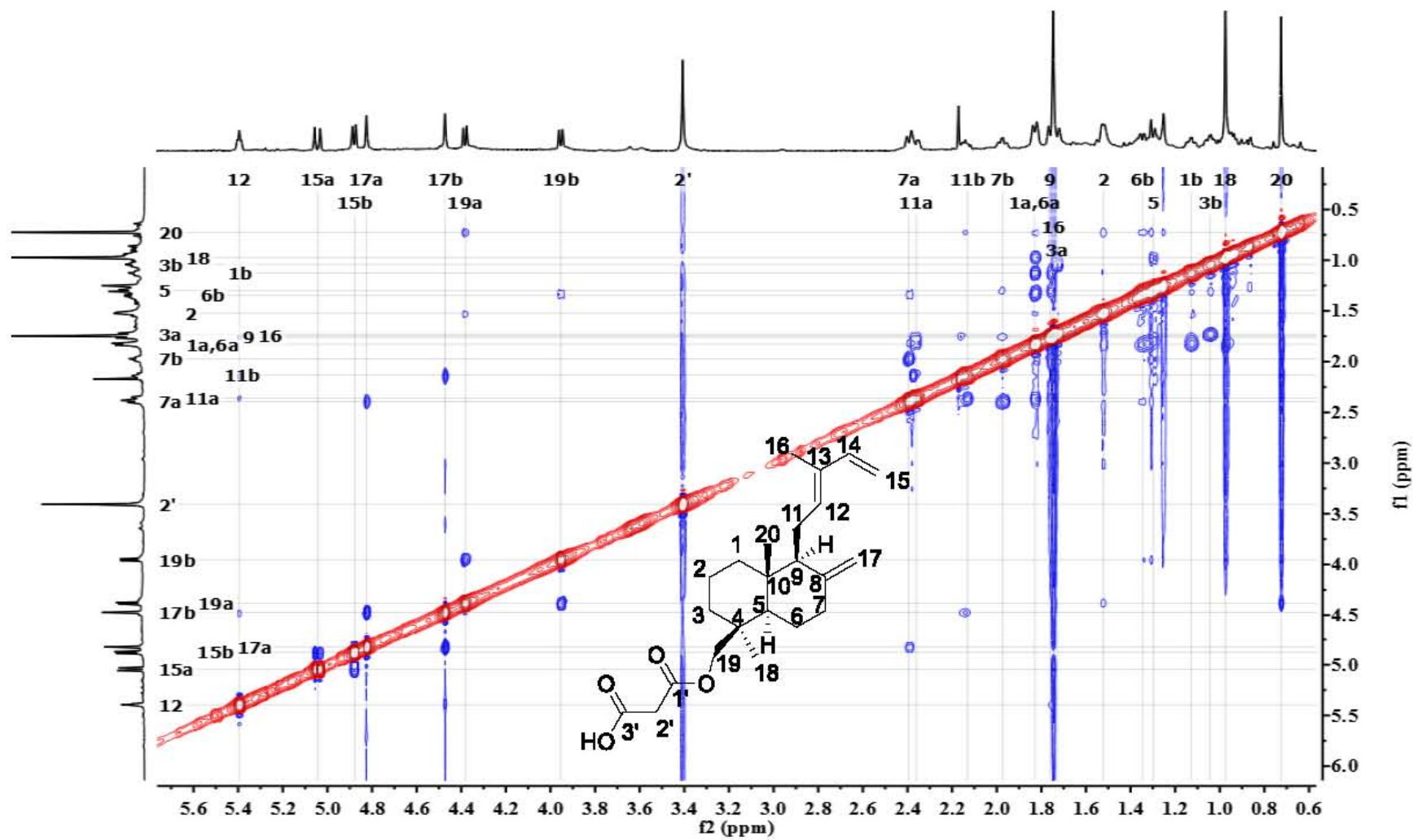
Espectro 24. HSQC del compuesto **19** (CDCl₃, 700 MHz).



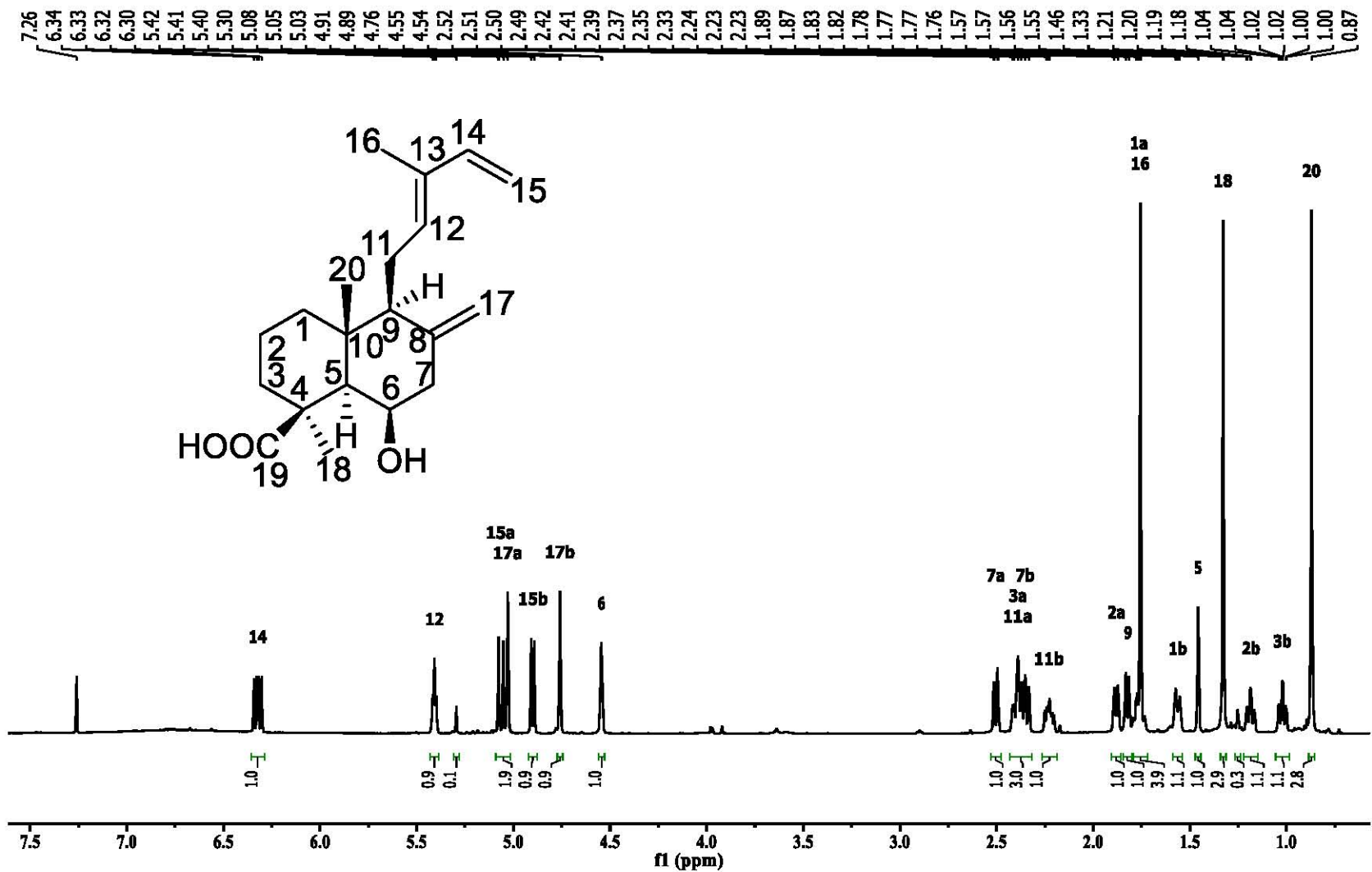
Espectro 25. RMN de ^1H del compuesto 19 (CDCl_3 , 700 MHz).



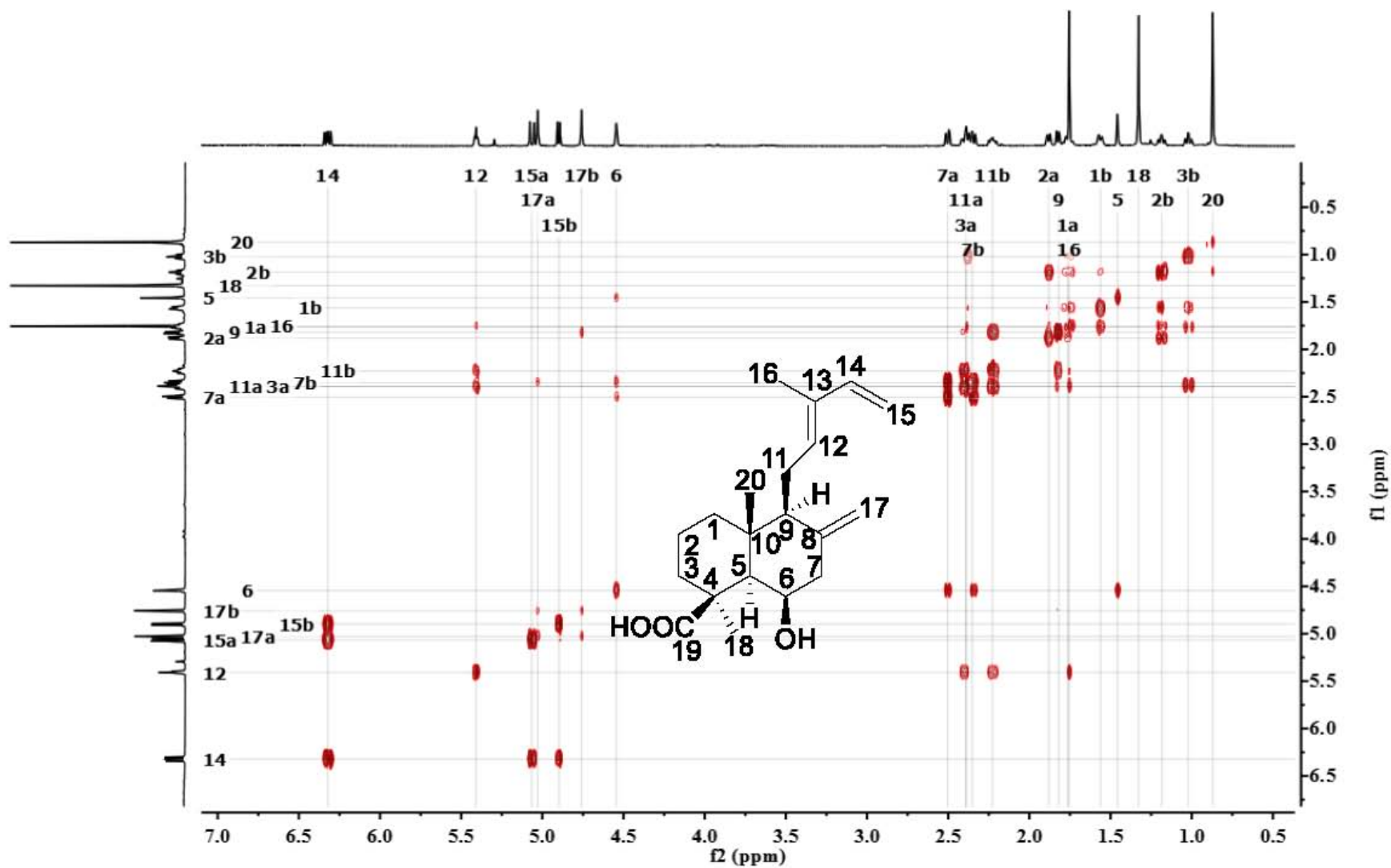
Espectro 26. HMBC del compuesto **19** (CDCl₃, 700 MHz).



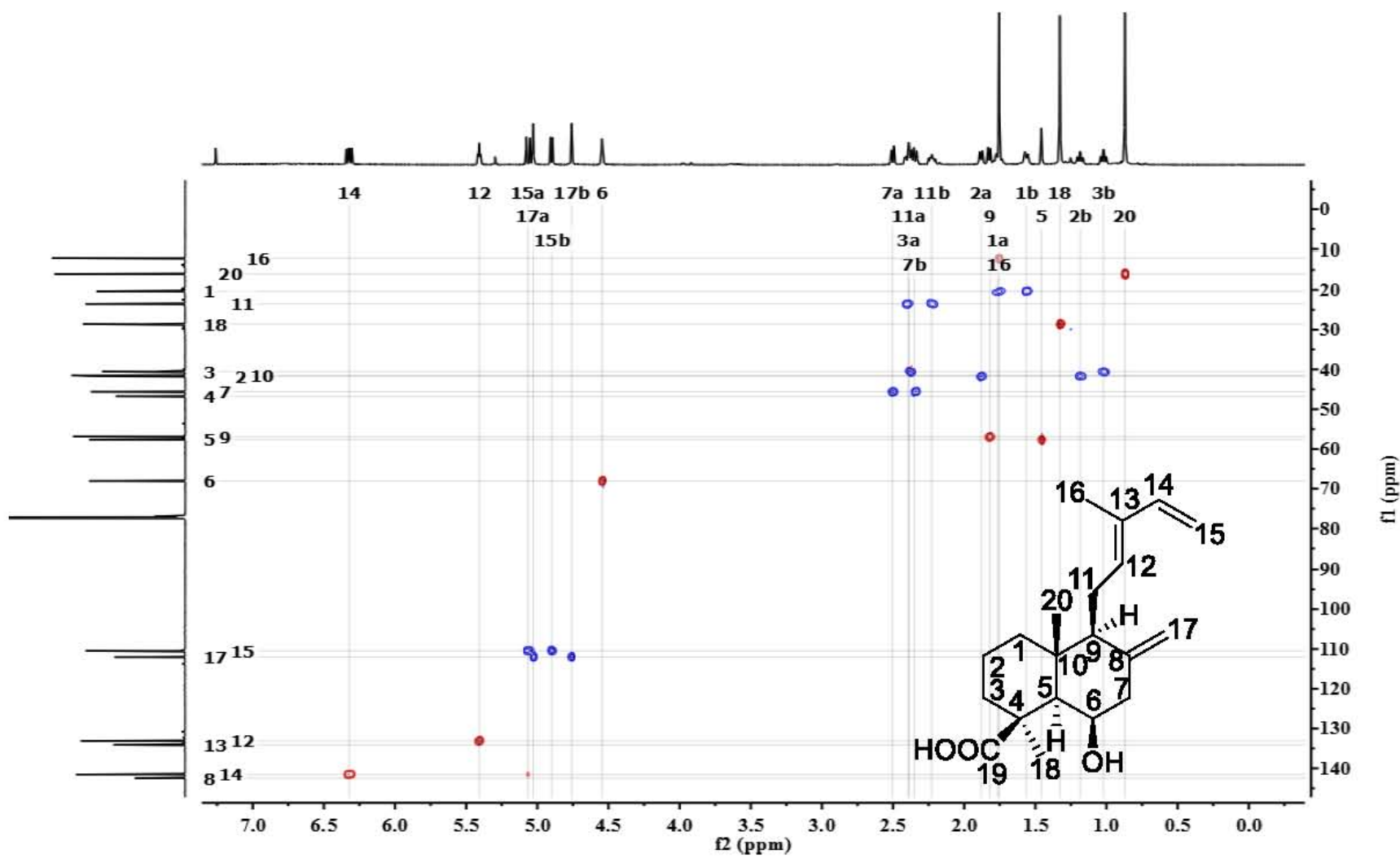
Espectro 27. NOESY del compuesto **19** (CDCl₃, 700 MHz).



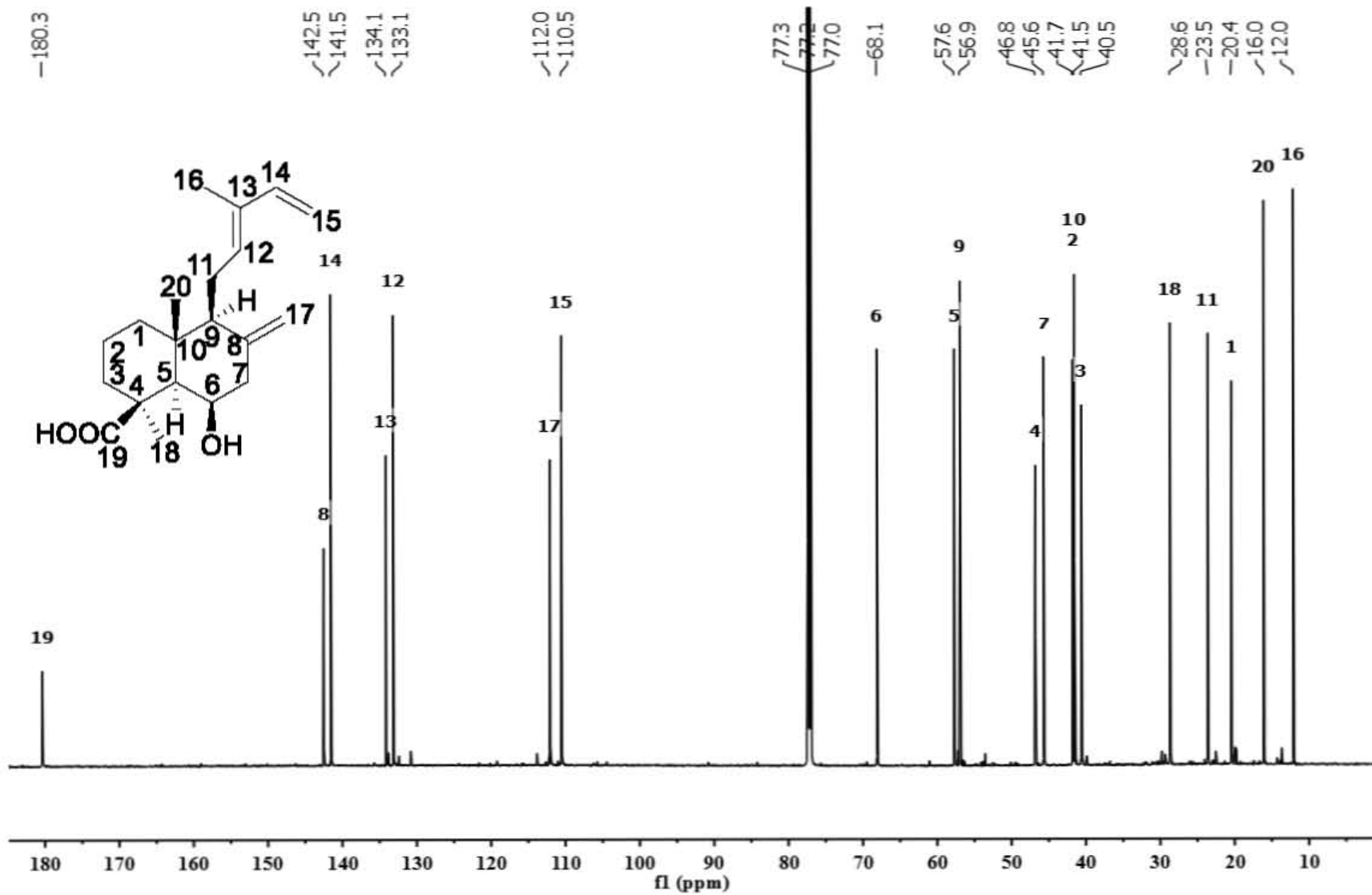
Espectro 28. RMN de ^1H del compuesto 22 (CDCl_3 , 700 MHz).



Espectro 29. COSY del compuesto **22** (CDCl₃, 700 MHz).



Espectro 30. HSQC del compuesto **22** (CDCl₃, 700 MHz).





Espectro 31. RMN de ^{13}C del compuesto **22** (CDCl_3 , 175 MHz).

IX.- PUBLICACIONES

Article

Structure, Absolute Configuration, and Antiproliferative Activity of Abietane and Icetexane Diterpenoids from *Salvia ballotiflora*

Baldomero Esquivel ^{1,*}, Celia Bustos-Brito ¹ , Mariano Sánchez-Castellanos ², Antonio Nieto-Camacho ¹, Teresa Ramírez-Apan ¹, Pedro Joseph-Nathan ³  and Leovigildo Quijano ^{1,*}

¹ Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Mexico City 04510, Mexico; bustosbritocelia@comunidad.unam.mx (C.B.-B.); anieto@unam.mx (A.N.-C.); mtrapan@unam.mx (T.R.-A.)

² Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior, Ciudad Universitaria, Mexico City 04510, Mexico; msanchezcastellanos@gmail.com

³ Departamento de Química, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Apartado 14-740, Mexico City 07000, Mexico; pjoseph@nathan.cinvestav.mx

* Correspondence: baldo@unam.mx (B.E.); quijano@unam.mx (L.Q.); Tel.: +52-55-5622-4411 (L.Q.)

Received: 31 August 2017; Accepted: 29 September 2017; Published: 18 October 2017

Abstract: From the aerial parts of *Salvia ballotiflora*, eleven diterpenoids were isolated; among them, four icetexanes and one abietane (1–5) are reported for the first time. Their structures were established by spectroscopic means, mainly ¹H- and ¹³C-NMR, including 1D and 2D homo- and hetero-nuclear experiments. Most of the isolated diterpenoids were tested for their antiproliferative, anti-inflammatory, and radical scavenging activities using the sulforhodamine B assay on six cancer cell lines, the TPA-induced ear edema test in mice, and the reduction of the DPPH assay, respectively. Some diterpenoids showed anti-proliferative activity, these being icetexanes **6** and **3**, which were the most active with IC₅₀ (μM) = 0.27 ± 0.08 and 1.40 ± 0.03, respectively, for U251 (human glioblastoma) and IC₅₀ (μM) = 0.046 ± 0.05 and 0.82 ± 0.06 for SKLU-1 (human lung adenocarcinoma), when compared with adriamycin (IC₅₀ (μM) = 0.08 ± 0.003 and 0.05 ± 0.003, as the positive control), respectively. Compounds **3** and **10** showed significant reduction of the induced ear edema of 37.4 ± 2.8 and 25.4 ± 3.0% (at 1.0 μmol/ear), respectively. Compound **4** was the sole active diterpenoid in the antioxidant assay (IC₅₀ = 98. 4 ± 3.3), using α-tocopherol as the positive control (IC₅₀ (μM) = 31.7 ± 1.04). The diterpenoid profile found is of chemotaxonomic relevance and reinforces the evolutionary link of *S. ballotiflora* with other members of the section Tomentellae.

Keywords: *Salvia ballotiflora*; icetexane diterpenoids; abietane diterpenoids; antiproliferative activity; anti-inflammatory activity; radical scavenger capacity; VCD analyses

1. Introduction

The genus *Salvia* L. is the largest of the Lamiaceae plants family, with over 1000 species widespread throughout the world [1]. Several species have been used as medicinal plants since ancient times, such as *Salvia officinalis*, *S. miltiorrhiza* and *S. sclarea*, which are relevant medicinal herbs in the folk medicine of several countries [2]. Flavonoids, sesquiterpenoids, sesterterpenoids, and triterpenoids are common phytochemical constituents of the genus, although the most diversified and representative secondary metabolites are diterpenoids. Labdane, pimarane, kaurane, totarane, clerodane, and abietane diterpenoids have been described for the genus [3–9]. In addition, several rearranged pimarane, abietane, and clerodane diterpenoids have been isolated

from *Salvia* species [9–11]. Interesting biological activities such as cytotoxic, antiprotozoal, antioxidant, anti-inflammatory, insect anti-feeding, and psychotropic activities have also been documented for some of the diterpenoids isolated from these plants [2,12].

With more than 300 species, Mexico is one of the most key areas of diversification of the genus [13]. Phytochemical analyses of Mexican *Salviae* led to the isolation of several diterpenoids, many of them with rearranged skeletons mainly of abietane and clerodane origin [9]. Icetexane (9(10→20)-*abeo*-abietane) diterpenoids, one class of rearranged abietanes, have been isolated from several species of other families, although most of the examples came from Lamiaceae [14]. The term icetexane derives from icetexone (8), the first 9(10→20)-*abeo*-abietane isolated from *Salvia ballotiflora* Benth. (section Tomentellae), together with the abietane diterpenoid conacytone (10), and the claimed *ortho*-quinone tautomer of icetexone named romulogarzone [15]. Previous work on several populations of *Salvia ballotiflora* indicated that this species produced an interesting array of icetexane and abietane diterpenoids. Several members of this type of diterpenoids have been targeted for synthetic work due to their structural features and the biological activity exhibited by some icetexanes [16–20] as anti-proliferative activity, in vitro, against some human cancer cell lines [9,11,21]. On this issue, while the aqueous-methanolic extract of *S. ballotiflora* displayed cytotoxicity to Vero cells [22], the icetexane derivatives isolated from the chloroform extract of the same species showed cytotoxic activity, with 19-deoxyicetexone [23] being the most active compound against the HeLa cervical cancer cell line [21]. In turn, 19-deoxyicetexone showed anti-diarrheal activity in a rodent model [24], the essential oil of the aerial parts of the plant exhibited insecticide activity against *Spodoptera frugiperda* Walker (Lepidoptera, Noctuidae) [25], and the chloroform extract of the aerial parts showed insecticide and insectistatic activities against the same insect [26].

In continuation of our studies on Mexican *Salvia* spp. in search of antiproliferative diterpenoids [11], we analyzed a population of *S. ballotiflora* collected from the municipality of Linares, State of Nuevo Leon (Mexico). Aside from the previously known anastomosine (6) [27], 7,20-dihydroanastomosine (7) [23], icetexone (8) [15], the icetexane diterpenoid 9, isolated from *S. candicans* [28], conacytone (10) [15], and 7 α -acetoxy-19-hydroxyroyleanone (11) [29], we isolated four new icetexanes, 1–4, and a new abietane, 5. The structure and absolute configuration of the new compounds were established mainly by spectroscopic means and, when possible, by single crystal X-ray diffraction analysis and vibrational circular dichroism (VCD). Diterpenoids 3, 4, 6–8 and 10 were tested for antiproliferative activity, in addition to anti-inflammatory and antioxidant activities. While 3, 4, 6–8 showed interesting antiproliferative activity in the sulforhodamine B assay [30], 3 and 10 showed significant reduction of edema in the 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced ear edema test in mice [31], and 4 was the sole active diterpenoid in the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) antioxidant assay [32] (IC₅₀ 98.4 ± 3.3 μ M).

2. Results and Discussion

2.1. Characterization

The aerial parts of *Salvia ballotiflora* afforded, after extensive chromatographic purification, eleven diterpenoids: the icetexanes 1–4, 6–9, and the abietanes 5, 10, 11 (Figure 1). While icetexanes 1, 2, 7 and 9 are related to anastomosine (6), metabolites 3 and 4 are considered as icetexone (8) derivatives. Diterpenoids 6–11 are known natural products and have been identified by spectroscopic methods, mainly high field (700 MHz) NMR, and comparisons with the literature; icetexone (8) and conacytone (10) were described originally as constituents of the aerial parts of *S. ballotiflora* [15], as well as of other *Salvia* spp. [28,33]; anastomosine (6) was from *S. anastomosans* [27]; 7,20-dihydroanastomosine (7) was from *S. ballotiflora* [23]; compound 9 was from *S. candicans* [28]; and 7 α -acetoxy-19-hydroxyroyleanone (11) was from *S. regla* [29]. The complete assignments of the NMR data of 6, 7, 9, and 11 are included in this paper, since some discrepancies have been found among the literature assignments. It is noteworthy that although icetexone (8), the first 9(10→20)-*abeo*-abietane diterpenoid, and conacytone

(10) were originally isolated from *S. ballotiflora* [15] 41 years ago, and have since then been obtained from several *Salvia* spp., they lacked complete ^1H - and ^{13}C -NMR assignments, and absolute configuration determinations which were recently accomplished by single crystal X-ray and VCD determinations [34]. Compounds 1–5 are new diterpenoids whose structures were established based on the following considerations.

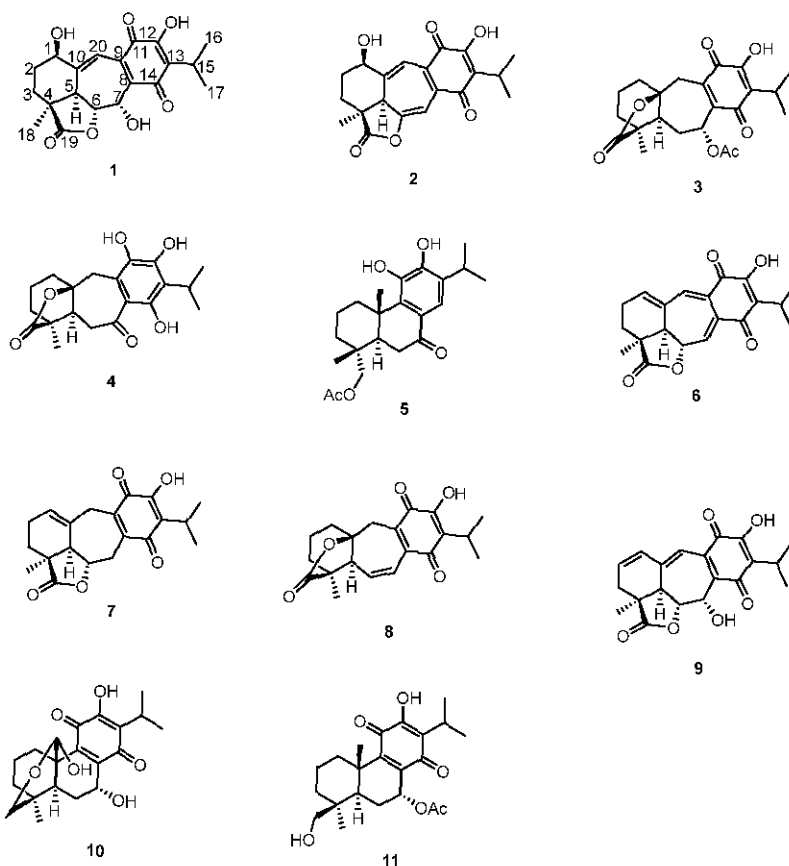


Figure 1. Chemical structures of 1–11.

Compound 1 was isolated as a yellow oil which showed IR bands due to hydroxyl groups (3597 and 3412 cm^{-1}) and a lactone (1778 cm^{-1}). The UV spectrum showed bands at 213, 243, and 332 nm, indicating the presence of an *ortho*-hydroxy-*p*-benzoquinone moiety [15,28]. In the ^1H -NMR spectrum of 1 (Table 1) characteristic signals of an isopropyl group bonded to a quinone system were observed at δ_{H} 3.25 (sept, $J = 7.1$ Hz), and δ_{H} 1.26 (6H, d, $J = 7.1$ Hz). These signals were ascribed to H-15 and the C-16/C-17 methyl groups, respectively. The presence of an isopropyl group at the C-13 position is a common feature in all diterpenoids isolated from this population of *S. ballotiflora*. The ^{13}C -NMR of 1 (Table 1) is consistent with the presence of the *ortho*-hydroxy-*p*-benzoquinone system and the isopropyl group, since the expected signals for these moieties were observed at δ_{C} 132.2 (C-8), 137.7 (C-9), 150.3 (C-12), 126.8 (C-13), 187.3 (C-21), 24.7 (C-15), 19.9 (C-16), and 20.0 (C-17). A signal at δ_{C} 179.8 was ascribed to the carbonyl of a γ -lactone as in anastomosine (6) [27]. The hydrogen atom at the lactone closure, i.e., H-6, was observed at δ_{H} 4.29 as a double doublet ($J = 10.3$ and 2.3 Hz), the large value indicated a *pseudo-axial* orientation for H-6. In the COSY spectrum, H-6 correlated to a doublet at δ_{H} 3.41 ($J = 10.2$) that has been ascribed to H-5, and also with a broad singlet at δ_{H} 5.53 (H-7) assigned to the geminal hydrogen atom of a hydroxyl group, which must be attached to C-7. The adjacent quinone ring influences the chemical shift of H-7, thus explaining the lower chemical shift of H-7 in comparison to H-6, which is geminal to the lactone moiety. The H-7 signal collapsed to a doublet ($J = 2.2$ Hz) upon the addition of D_2O . The coupling constant observed for H-7 was consistent with an α -orientation for

the hydroxy group, as observed in other icetexanes and abietanes with an oxygenated function at C-7 isolated from *Salvia* spp. [29].

Table 1. NMR data (^1H 700 MHz, ^{13}C 175 MHz, CDCl_3) of **1** and **2**.

1				2				
Position	δ_{C}	Type	δ_{H} (J in Hz)	HMBC	δ_{C}	Type	δ_{H} (J in Hz)	HMBC
1	68.2	CH	4.73, brt (7.7)	3, 5, 10, 20	66.6	CH	4.57, t (2.9)	3, 5, 20
2a	29.0	CH ₂	2.49, ddt (13.3, 10.5, 8.4)	3, 4, 10	28.1	CH ₂	2.01, dq (14.7, 3.5)	1, 4, 10
2b			1.69, dtd (13.4, 8.2, 2.4)				1.41, dddd (14.7, 11.9, 5.6, 2.8)	3
3a	26.8	CH ₂	1.81, m	1, 2, 4, 5, 18	25.5	CH ₂	2.18, m	1, 2, 4, 19
3b							2.16, m	1, 2, 4, 19
4	44.4	C			42.7	C		
5	44.1	CH	3.41, d (10.2)	3, 4, 6, 7, 10, 18, 20	44.8	CH	2.85, brs	1, 4, 10, 9, 18, 19, 20
6	79.9	CH	4.29, dd (10.3, 2.3)	5, 7, 10	130.2	C		
7	65.0	CH	5.53, brs	6, 8, 9	100.5	CH	6.77, d (1.1)	5, 6, 9, 4
8	132.2	C			140.0	C		
9	137.7	C			149.9	C		
10	153.1	C			138.0	C		
11	184.3	C			182.8	C		
12	150.3	C			151.2	C		
13	126.8	C			126.5	C		
14	187.3	C			185.3	C		
15	24.7	CH	3.25, hept (7.1)	12, 13, 14, 16, 17	24.8	CH	3.28, hept (7.1)	12, 13, 14, 16, 17
16, 17	19.9, 20.0	2CH ₃	1.26, d (7.1)	13, 15	20.0, 20.1	2CH ₃	1.27, 1.26, d (7.1)	13, 15
18	22.7	CH ₃	1.47, s	3, 4, 5, 19	27.5	CH ₃	1.44, s	3, 4, 5, 19
19	179.8	C			179.3	C		
20	112.3	CH	7.07, t (2.5)	1, 5, 6, 9, 11	122.8	CH	6.91, d (1.82)	1, 5, 8, 9, 11
1-OH			1.97, brs					
7-OH			3.11, d (4.33)					
12-OH			7.14, brs	12, 13, 11				

Other relevant signals observed in the ^1H -NMR spectrum of **1** were a broad triplet at δ_{H} 4.73 ($J = 7.7$ Hz), which was ascribed to a H-1 geminal to an additional hydroxy group, and a triplet at δ_{H} 7.07 ($J = 2.5$ Hz). While the chemical shift of the former suggested that it must be an allylic methyne supporting an oxygenated function, the second must be a vinylic one adjacent to the quinone ring to explain the observed chemical shifts. These facts led us to locate these hydrogen atoms at C-1 and C-20, respectively, as depicted in **1**. A double resonance experiment confirmed the above assumption, since by irradiation at δ_{H} 4.73 (1H, brt, $J = 7.7$ Hz, H-1), two multiplet signals of a methylene group at δ_{H} 1.70 and 2.49 (δ_{C} 29.0) collapsed, thus these signals were ascribed to the C-2 methylene hydrogen atoms. The ^{13}C -NMR spectrum was consistent with the previous discussion, since the signals for C-1 and C-7 were observed at δ_{C} 68.2 and 65.0, respectively. A non-protonated carbon observed at δ_{C} 153.1 and a methine at δ_{C} 112.3 were assigned to C-10 and C-20, respectively. The HMBC spectrum supports the previous assignments, since H-1 showed correlation cross peaks with C-10, C-20, and C-5. In addition, H-20 correlated with C-1, C-5, C-6, C-9, and C-11, while H-6 showed cross peaks with C-5, C-7, and C-10; and H-7 correlated with C-6, C-8, and C-9. Other relevant HMBC correlations that confirmed the structure of **1** are shown in Table 1 and Figure 2. A three hydrogen atoms signal at δ_{H} 1.47 was also observed in the ^1H -NMR spectrum of **1** and was ascribed to the C-18 methyl group. The relative stereochemistry of **1** was established with the aid of the coupling constants and

the NOESY spectrum (Figure 2), which showed a correlation between H-6 and H-7, both β -oriented. Meanwhile H-5, which must be *anti*-periplanar to H-6, showed a nOe with methyl hydrogen atoms at C-4, which in turn correlated with H-1, thus indicating that H-5, Me-18, and H-1 had the same orientation. The large coupling constant value of H-1 indicated an *axial* orientation, thus the hydroxy group attached to C-1 must be β -*equatorial* oriented. Compound **1** is related to anastomosine (**6**), and is a novel icetexane derivative that we named ballotiquinone (**1**).

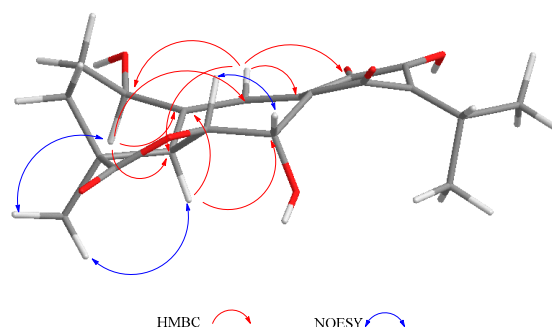


Figure 2. Selected correlations for compound **1**.

The mass spectrum of **2** indicated a molecular formula of $C_{20}H_{20}O_6$ and a high degree of unsaturation. The 1H - and ^{13}C -NMR spectra indicated it was a 6,7-anhydro derivative of ballotiquinone (**1**). In the ^{13}C -NMR spectrum of **2** (Table 1), the signals for an *ortho*-hydroxy-*p*-benzoquinone and an isopropyl group were observed at δ_C 140.0 (C-8), 149.9 (C-9), 182.8 (C-11), 151.2 (C-12), 126.5 (C-13), 185.3 (C-14), 24.8 (C-15), 20.0 and 20.1 (C-16 and C-17). A singlet at δ_C 179.3 was ascribed to the carbonyl of a γ -lactone like that found in anastomosine (**6**) and ballotiquinone (**1**); however, the hydrogen atom at the ring closure of this lactone (C-6) was not observed in the 1H -NMR spectrum of **2**. This fact, in addition to the presence of two additional signals for sp^2 carbons in the ^{13}C -NMR of **2** (Table 1) at δ_C 130.2 and 100.5 in comparison with those observed in **1**, indicated the presence of a C-6 = C-7 double bond. The 1H -NMR spectrum showed one hydrogen atom doublet at δ_H 6.77 ($J = 1.1$), which was ascribed to H-7 since in the HSQC spectrum it correlated with a signal at δ_C 100.5 (C-7), and in the HMBC spectrum with a signal at δ_C 130.2 (C-6). In agreement with the previous consideration, in the IR spectrum of **2**, the band for the C-19 carbonyl shifted to 1811 cm^{-1} in agreement with an enol- γ -lactone [35]. In the 1H -NMR, a broad singlet and a doublet at δ_H 2.85 and 6.91 ($J = 1.8\text{ Hz}$), respectively, were ascribed to H-5 and H-20, since H-5 showed a correlation with H-20 and with the signal assigned to H-7 in the COSY spectrum. The B-ring of compound **2** is therefore a cycloheptatriene system, where one double bond is also part of the *ortho*-hydroxy-*p*-benzoquinone, thus explaining the UV absorptions observed at 213, 243, and 332 nm in agreement with the high degree of insaturation deduced from the mass spectrum. Other relevant signals in the 1H -NMR spectrum of **2** were due to the hydrogen atoms of the C-18 methyl group at δ_H 1.44, and a triplet at δ_H 4.57 ($J = 2.9\text{ Hz}$) ascribed to the geminal hydrogen atom of an allylic hydroxyl moiety at C-1, as in compound **1**. Inspection of a Dreiding model and molecular mechanics (MM2) calculations of compound **2** indicated that the A-ring could adopt two distorted chair conformations due to the presence of the C-6 = C-7 double bond. In the more stable conformation, H-1 is α -*equatorial*, forming a dihedral angle of approximately 60 degrees with the hydrogen atoms of the methylene at C-2, thus accounting for the coupling constant values observed, and in consequence forming a β -orientation for the hydroxy group. The relative stereochemistry of **2** was established with the aid of the coupling constants and the NOESY spectrum (Figure 3) that showed a correlation between H-5 and the α -methyl at C-4, thus indicating that they were on the same side of the molecule. In agreement with the proposed α -*equatorial* orientation for H-1, the NOESY spectrum correlation cross peaks were observed with H-20 and both C-2 methylene hydrogen atoms (δ_H 2.01 and 1.41). Compound **2** could originate from ballotiquinone (**1**) by the loss of a water molecule from the C-6:C-7 positions, and was named 6,7-anhydroballotiquinone. Compounds **1**

and **2** are new icetexane derivatives closely related to anastomosine (**6**), 7,20-dihydroanastomosine to anastomosine (**6**), 7,20-dihydroanastomosine (**7**), and compound **9**, which co-exist in this population of *S. ballotiiflora*. The yet unnamed icetexane **9**, known from *S. ballotiiflora*. The yet unnamed icetexane **9**, known from *S. candidans*, turned out to be known from *S. candidans* turned out to be 1,2-anhydroballotiquinone.

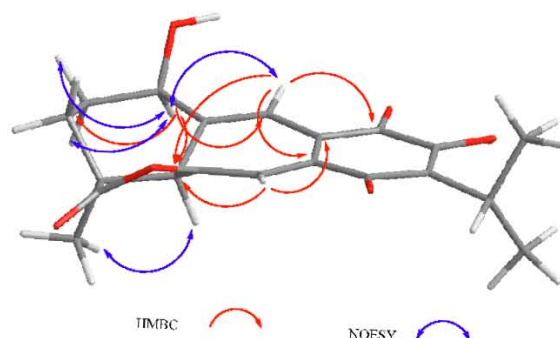


Figure 3. Selected correlations for compound **2**.

Compound **3** was isolated as a yellow powder. The HR-DART-MS indicated a $C_{22}H_{26}O_7$ molecular formula. Its IR spectrum showed bands due to hydroxyl (3414 cm^{-1}), saturated γ -lactone (1771 cm^{-1}), ester carbonyl (1744 cm^{-1}), and quinone carbonyl groups (1646 cm^{-1}). The ^{13}C -NMR spectrum displayed signals for 12 carbons, accounting for four methyl groups, four olefinic carbons, according to the HSQC experiment. Signals for the typical isopropyl-*ortho*-hydroxy-*p*-benzoquinone were observed, as in **1** and **2**, as well as signals for an acetate group at δ_C 169.6, and 20.7 (Table 2). Other relevant signals in the spectrum were observed at δ_C 179.6 (C), 81.8 (C), 17.2 (CH₃), and 30.2 (CH₂). The former was ascribed to the carbonyl of a γ -lactone with a high degree of ring strain, 30.2 was assigned to the C-20 methylene group, characteristic of an icetexone-type derivative, while the signals at δ_C 179.6, 81.8, and 17.2 were assigned to C-19, C-10, and C-18, respectively. The ^1H -NMR spectrum of **3** (Table 2) confirmed the above conclusions since an AB system at δ_H 3.43 and 3.01 ($J = 15.7\text{ Hz}$), ascribed to the hydrogen atoms at C-20, and a singlet at δ_H 1.11, assigned to the hydrogen atoms of the C-18 methyl group, were observed. A singlet at δ_H 2.09 due to the presence of an acetate group, whose geminal hydrogen atoms were observed at δ_H 1.43 and 1.43 (COSY $J = 15.7\text{ Hz}$) ascribed to the hydrogen atoms at C-20, and a singlet at δ_H 1.11, assigned to the hydrogen atoms of the C-18 methyl group, were observed. A singlet at δ_H 2.27 (H-5) which was coupled to its geminal hydrogen atom observed at δ_H 1.43 (1H, brdd, $J = 15.0, 12.0\text{ Hz}$, H-6 β). In turn, the methylene hydrogen atoms were coupled to a doublet at δ_H 2.37 (1H, $J = 12.0, 5.4\text{ Hz}$, H-3). Since the acetoxy geminal hydrogen atom was shown to be coupled only to one hydrogen atom of the methylene group (δ_H 2.27), we can infer that it must form a 90-degree dihedral angle with the other methyl hydrogen atom at δ_H 1.43 (1H, 7.2, 5.5 Hz, H-6 α) which was coupled to its geminal hydrogen atom at δ_H 1.43 (1H, 7.2, 5.5 Hz, H-6 α) and which was coupled to its geminal hydrogen atom at δ_H 1.43 (1H, 7.2, 5.5 Hz, H-6 α). The chemical shift of the acetoxy geminal hydrogen atoms were coupled to a doublet at δ_H 2.37 (1H, $J = 12.0, 5.4\text{ Hz}$, H-5). Since the acetoxy geminal hydrogen atom was shown to be coupled only to one hydrogen atom of the methylene group (δ_H 2.27), we can infer that it must form a 90-degree dihedral angle with the other methyl hydrogen atom at δ_H 1.43, thus accounting for the observed multiplicity of H-7. The chemical shift of the acetoxy geminal hydrogen atom and the correlations observed in the COSY spectrum led us to locate the ester group at C-7 with an α -pseudoequatorial orientation, and to assign the signals at δ_H 2.27 and 1.43 to H-6 α and H-6 β , respectively, and therefore the signal at δ_H 2.37 to H-5, which must be α -axially oriented. Inspection of the Drieding molecular model and MM2 calculations confirmed the spatial relation of H-7 with the H-6 β , which formed a 90-degree dihedral angle in the most stable conformation. In the ^{13}C -NMR spectrum of **3**, the signal for C-7 was observed at δ_C 65.9, and the methylene carbon at δ_H 27.2 was ascribed to C-6. The HMBC spectrum of **3** supported the previous assignments, since correlation cross peaks were observed between H-7 and the signal ascribed to the acetate carbonyl, as well as with C-5, C-6, C-8, C-9 and C-14 (Table 2 and Figure 3). In addition, H-5 showed correlations with C-3, C-4, C-6 and C-19. While both hydrogen atoms at the C-6 position showed correlation cross peaks with C-10 and C-5, the

Table 2. NMR data (^1H 700 MHz, ^{13}C 175 MHz, CDCl_3) of **3**.

3									
Position	δ_{C}	Type	δ_{H} (J in Hz)	HMBC	Position	δ_{C}	Type	δ_{H} (J in Hz)	HMBC
1a	37.4	CH ₂	1.98, dd (12.6, 4.9)	3, 5, 10, 20	11	183.5	C		
1b			1.77, d (12.0, 5.4)	3, 5	12	150.4	C		
2a	20.0	CH ₂	1.84, m	3, 4, 10	13	125.6	C		
2b			1.65, m	3, 4	14	184.3	C		
3a	35.5	CH ₂	1.73, m	1, 5	15	24.7	CH	3.21, hept (7.0)	12, 13, 14, 16, 17
3b			1.66, dd (12.9, 6.1)	5	16, 17	19.9, 19.8	2CH ₃	1.24, 1.27, d (7.0)	13, 15
4	49.6	C			18	17.2	CH ₃	1.11, s	3, 4, 19
5	51.0	CH	2.37, dd (12.0, 5.4)	3, 4, 6, 19	19	179.6	C		
6a	27.2	CH ₂	2.27, ddd (15.0, 7.2, 5.5)	5, 7, 8, 10	20a	30.2	CH ₂	3.43, d (15.7)	1, 5, 8, 9, 10, 11
6b			1.43, brdd (15.0, 12.0)	5, 10, 8	20b			3.01, d (15.7)	5, 8, 9, 10, 11
7	65.9	CH ₂	6.21, d (7.0)	1', 5, 6, 8, 9, 14	1'	169.6	C		
8	144.4	C			2'	20.7	CH ₃	2.09, s	1'
9	135.4	C			11-OH				
10	81.8	C			12-OH			7.01, brs	12, 13, 11

Table 3. Confidence level data for the IR and VCD spectra of **3**, **6**, and **7**.

Compound	<i>anH</i> ^a	<i>S</i> _{IR} ^b	<i>S</i> _E ^c	<i>S</i> _{-E} ^d	<i>ESI</i> ^e	<i>C</i> ^f (%)
3	0.973	95.6	79.7	13.1	66.6	100
6	0.975	82.4	87.0	4.2	82.8	100
7	0.974	93.2	84.7	10.9	73.8	100

^a Anharmonicity factor; ^b IR spectral similarity; ^c VCD spectral similarity for the correct enantiomer; ^d VCD spectral similarity for the incorrect enantiomer; ^e Enantiomer similarity index, calculated as $S_{\text{E}} - S_{\text{-E}}$; and ^f Confidence level for the stereochemical assignment.

Table 4. Relative energies and conformational populations of **3**, **6**, and **7**.

Conformer	$\Delta E_{\text{MMFF94}}^a$	%MMFF94 ^b	ΔE_{OPT}^c	%OPT	$\Delta G_{\text{B3PW91}}^d$	%B3PW91
3a	0.88	16.3	0.00	36.9	0.00	50.8
3b	0.00	72.6	0.08	32.0	0.34	28.4
3c	1.22	9.3	0.37	19.6	0.67	16.5
3d	2.37	1.3	0.84	9.1	1.46	4.3
6a	0.87	18.8	0.00	56.2	0.00	69.2
6b	0.00	81.2	0.15	43.8	0.48	30.8
7a	0.81	20.1	0.00	58.4	0.00	65.5
7b	0.00	79.9	0.20	41.6	0.06	34.5

^a Molecular mechanics energy relative to 33.25, 44.21 and 64.23 kcal/mol for **3**, **6** and **7**, respectively; ^b Molecular mechanics population in percent; ^c Energy of the optimized structures; data are relative to $-866,097.07$ kcal/mol for **3**, $-721,603.93$ kcal/mol for **6**, and $-722,370.35$ kcal/mol for **7**; ^d Free energy relative to $-7,865,847.05$ kcal/mol for **3**, $-721,405.65$ kcal/mol for **6**, and $-722,157.46$ kcal/mol for **7**.

Compound **4** was obtained as a yellow powder and its molecular formula was established as $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_6$ by HR-DART-MS. In the ^{13}C -NMR spectrum of **4** (Table 5) a signal at δ_{C} 204.7 was observed, indicating the presence of a conjugated ketone carbonyl. Aside from the signals for the γ -lactone (δ_{C} 179.1), the methyl group (δ_{C} 17.4), and the γ -lactone closure i.e., C-10 at δ_{C} 85.2, the characteristics of an icetexone-type derivative were also observed. In addition, the spectrum showed six non-protonated sp^2 carbon signals at δ_{C} 113.1, 120.0, 134.9, 150.3, 119.9 and 159.2, indicating that **4**, instead of the *ortho*-hydroxy-*p*-benzoquinone, possessed a fully substituted aromatic ring, where one of the substituents was an isopropyl group. In the IR spectrum of **4**, several bands due to hydroxyl groups were observed at 3602, 3564 and 3514 cm^{-1} , suggesting that the other substituents of the aromatic ring were hydroxy groups. Other relevant bands were those observed at 1771 and 1612 cm^{-1} , which were ascribed to the γ -lactone carbonyl and the conjugated ketone deduced from the ^{13}C -NMR data.

Table 5. NMR data (^1H 700 MHz, ^{13}C 175 MHz, CDCl_3) of **4**.

4					
Position	δ_{C}	Type	δ_{H} (J in Hz)	HMBC	
1a	35.9	CH ₂	2.07, dd (13.4, 5.6)	1, 2, 4, 5, 18	
1b			1.71, ddd (13.4, 10.8, 7.6)	1, 2, 4, 5, 19	
2a	19.5	CH ₂	1.82, m	1, 3, 4	
2b					
3a	32.7	CH ₂	1.76, m	2, 3, 5, 20	
3b			1.53, ddd (12.8, 12.6, 7.6)	2, 5	
4	47.7	C			
5	50.9	CH	2.00, dd (12.0, 2.0)	1, 3, 4, 6, 7, 19	
6a	40.6	CH ₂	2.84, dd (17.4, 12.0)	4, 5, 7, 10	
6b			2.80, dd (17.4, 2.0)	4, 5, 7, 8, 10	
7	204.8	C			
8	113.1	C			
9	120.0	C			
10	85.2	C			
11	134.9	C			
12	150.3	C			
13	119.9	C			
14	159.2	C			
15	24.8	CH	3.46, hept (7.0)	12, 13, 14, 16, 17	
16, 17	20.47, 20.51	CH ₃	1.37, 1.36, d (7.0)	13, 15	
18	17.1	CH ₃	1.18, s	3, 4, 5, 19	
19	179.1	CH ₃			
20a	33.6	CH ₂	3.59, d (13.9)	1, 5, 8, 9, 10, 11	
20b			2.95, d (13.9)	1, 8, 9, 10, 11	
1'					
2'					
11-OH			6.13, s	9, 11, 12, 13	
12-OH			4.86, s	9, 11, 12, 13	
14-OH			13.00, s	8, 9, 12, 13, 14, 7	

In the $^1\text{H-NMR}$ spectrum of **4**, the signals for an AB system at δ_{H} 3.59 and 2.95 ($J = 13.9$ Hz) were assigned to the C-20 methylene group hydrogen atoms characteristic of this type of icetexane diterpenoid [28]. An ABX system at δ_{H} 2.84 (1H, dd, $J = 17.4, 12.0$ Hz), 2.80 (1H, dd, $J = 17.4, 2.0$ Hz), and 2.00 (1H, dd, $J = 12.0, 2.0$ Hz) was also observed. The magnitude of the geminal coupling constant of the AB methylene signals at δ_{H} 2.84 and 2.80 ($J = 17.4$ Hz) indicated its vicinity to a carbonyl group and was therefore ascribed to C-6, which in turn meant that C-7 must be a carbonyl group. The presence of a singlet at δ_{H} 13.0 corresponded to a hydrogen bonded hydroxy group ($-\text{C}14\text{-O-H-O}=\text{C}7$), confirming the above assumption. The signal at δ_{H} 2.00 (1H, dd, $J = 12.0, 2.0$ Hz) was attributed to H-5, which must be α -axially oriented. The HMBC spectrum of **4** agreed with the previous discussion, since the expected correlation cross peaks were observed (Table 5). The relative stereochemistry of **4** was established with the aid of coupling constant values and was based on the nOe observed in the NOESY spectrum (Figure 6). This is the first isolation of **4** as a natural product, although its derived diacetyl and triacetyl analogues have been isolated from *S. candidans* [28]. Compound **4** is also an icetexone-type derivative and is therefore named 6,7,11,14-tetrahydro-7-oxo-icetexone.

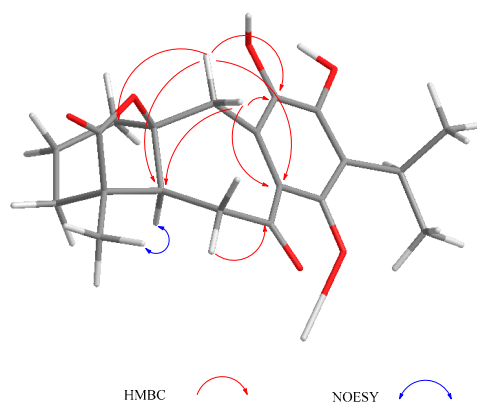


Figure 6. Selected correlations for compound **4**.

Compound **5** was also isolated as a yellow powder. Its IR spectrum exhibited bands at 3599 and 3534 cm^{-1} for hydroxy groups, as well as at 1730 and 1672 cm^{-1} for an ester and a conjugated ketone carbonyl group, respectively. The HR-DART-MS established the molecular formula $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_5$ for this product. The $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of **5** (Table 6) confirmed the presence of 22 carbons grouped, according to the HSQC spectrum, into five methyl groups, five methylene moieties, three methines (including an aromatic one), and nine non-protonated carbons (two sp^3 , two carbonyl groups, and five aromatic signals). The $^1\text{H-NMR}$ spectrum showed the presence of only one aromatic hydrogen atom singlet at δ 7.64, which correlated with the carbon signal at δ_{C} 118.1, indicating that ring C was a penta-substituted aromatic ring, one of the substituents being an isopropyl group. The chemical shifts of the non-protonated aromatic carbon atoms (δ_{C} 125.4, 138.3, 141.3, 146.2, and 131.8), suggested the presence of two hydroxyl groups as substituents, very likely at C-11 and 12, as in **4**. Two carbonyl signals at δ_{C} 198.2 and 171.3 were assigned to a conjugated ketone and an ester, respectively, as indicated by the IR spectrum. The carbon chemical shift of the ketone carbonyl group at δ_{C} 198.1 was similar to that reported for 10-hydroxysugiol (demethylcryptojaponol), an abietane diterpenoid originally isolated from *S. phlomoides* Asso [39] and other plant sources [40]. The ester group was identified as an acetate, since in the $^1\text{H-NMR}$ spectrum of **5**, a three-hydrogen atoms singlet was observed at δ_{H} 2.02, and located at C-18. Accordingly, the AB signals at δ_{H} 3.73 and 3.84 ($J = 11.3$ Hz)—ascribed to geminal hydrogen atoms of the acetoxy group (Table 6)—showed correlation cross peaks with the carbonyl signal at δ_{C} 171.1 in the HMBC spectrum. Other relevant signals in the $^1\text{H-NMR}$ spectrum of **5** (Table 6) were those due to the isopropyl group attached to the aromatic ring and two methyl groups at δ_{H} 1.43 and 0.99, which were ascribed to the C-20 and C-19 methyl hydrogen atoms, respectively. A double doublet at δ_{H} 2.22 (1H, $J = 11.9, 5.5$ Hz) was ascribed to H-5, which must

be α -axially oriented, as are all diterpenoids isolated from this population of *S. ballotiflora*. The relative stereochemistry of **5** was established based on the coupling constant values observed in the $^1\text{H-NMR}$ (Table 6) and the NOESY spectra (Figure 7). The C-18 methylene moiety supporting the acetoxy group, must be α -equatorial oriented since an nOe was observed between H₂-18 and H-5, H-6 α and the C-19 methyl hydrogen atoms, which in turn showed intense correlation cross peaks with the C-20 methyl group, H-2 β , and H-6 β . Furthermore, the C-20 methyl hydrogen atoms showed nOe with H-2 β , H-6 β , and H-1 β . Thus, it follows that **5** is a new abietane derivative named 18-acetoxy-11-hydroxysugiol.

Table 6. NMR data (^1H 700 MHz, ^{13}C 175 MHz, CDCl_3) of **5**.

5				
Position	δ_{C}	Type	δ_{H} (J in Hz)	HMBC
1a	36.2	CH ₂	3.17, dd (13.2, 2.8)	1, 3, 5
1b			1.55, dd (13.6, 3.7)	2, 20
2a	18.4	CH ₂	1.82, dddd (17.3, 13.7, 8.7, 3.7)	4, 10
2b			1.68, ddt (14.2, 7.2, 3.6)	4, 10
3a	35.1	CH ₂	1.50, td (13.6, 3.7)	19
3b			1.41, dt (14.0, 2.7)	1, 5
4	36.9	C		
5	44.2	CH	2.22, dd (11.9, 5.5)	1, 7, 10, 18, 19
6a	35.4	CH ₂	2.58, d (17.0)	4, 5, 8, 10
6b			2.55, d (17.0)	4, 5, 8, 10
7	198.2	C		
8	125.4	C		
9	138.3	C		
10	40.1	C		
11	141.3	C		
12	146.2	C		
13	131.8	C		
14	118.1	CH	7.64, s	
15	27.5	CH	3.01, hept (6.9)	12, 13, 14, 16, 17
16, 17	22.5, 22.6	CH ₃	1.30, 1.28, d (6.86)	13, 15
18	17.7	CH ₃	0.99, s	3, 4, 5, 19
19a	72.0	C	3.84, d (11.3)	3, 5, 18, 1'
19b			3.73, d (11.3)	3, 5, 18, 14
20a	19.2	CH ₃	1.43, s	1, 5, 9, 10
20b				
11-OH			5.70, s	11
12-OH			5.61, s	11, 12
1'	171.3	C		
2'	21.1	CH ₃	2.02, s	1', 19

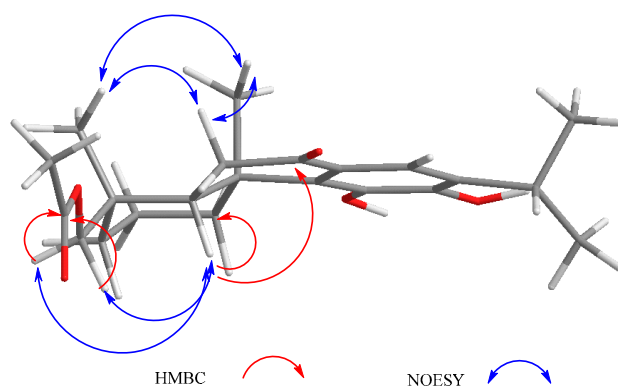


Figure 7. Selected correlations for compound **5**.

Anastomosine (**6**), an icetexane diterpenoid isolated from *S. anastomosans* [27], is also known from *S. candicans* [28] and from a population of *S. ballotiflora* collected from a different geographical region of Mexico [23]. Analysis of the ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC, and NOESY NMR spectra measured for the present work led to the complete and unambiguous assignment of all hydrogen and carbon atoms. Several discrepancies with the previous ^{13}C -NMR data were found, and therefore all data are included in the experimental section. Through our research, crystals suitable for X-ray diffraction analysis were obtained, and therefore in the first instance, the structure was verified by this independent methodology, which also allowed us to determine the molecular absolute configuration.

A crystal of **6** was mounted on a glass fiber for data collection using graphite monochromated Cu $K\alpha$ radiation at room temperature in the $\omega/2\theta$ scan mode. The orange crystal measuring $0.34 \times 0.26 \times 0.15$ mm, $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{O}_5$, $M = 340.36$ turned out to be orthorhombic, space group $P2_12_12_1$, $Z = 4$, $\rho = 1.361$ mg/mm 3 . A total of 40,440 reflections were collected, which, after data reduction, left 3178 observed reflections. The structure was solved by direct methods using the SHELXS-97 program included in the WinGX v1.70.01 crystallographic software package. For structural refinement, the non-hydrogen atoms were treated anisotropically, and the hydrogen atoms, included in the structure factor calculations, were refined isotropically. The final R indices were $R_1 = 3.9\%$ and $wR_2 = 10.3\%$, and a PLUTO plot of the molecular structure is shown in Figure 8. The absolute configuration followed from the use of the Olex2 v1.1.5 software [41], which allowed us to calculate the Flack (x) [42] and Hooft (y) parameters [43,44]. These parameters were $x = 0.1(2)$ and $y = 0.09(5)$, while for the inverted structure they were $x = 0.9(2)$ and $y = 0.91(5)$.

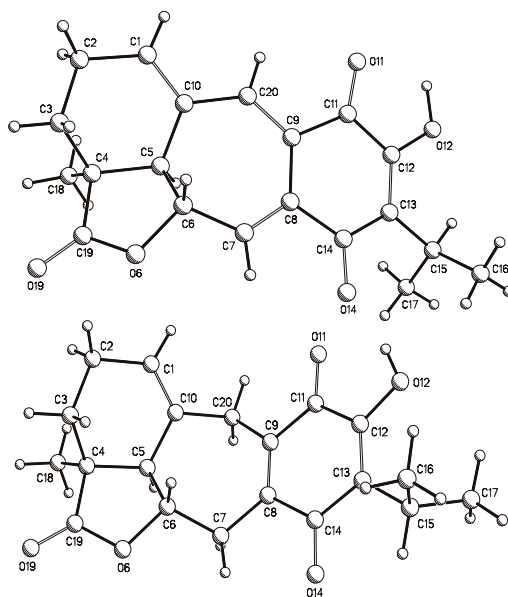


Figure 8. PLUTO plots of the single crystal X-ray diffraction structures of anastomosine (**6**, top) and of 7,20-dihydroanastomosine (**7**, bottom).

Independently, the absolute configuration was determined by VCD. In this case, the central portion of Figure 5 compares the experimental and DFT B3PW91/DGDZVP calculated IR and VCD spectra of **6**. The comparison parameters, determined using the CompareVOA software [38], are shown in Table 6, where it can be observed that the determination was accomplished with 100% confidence. In turn, the thermochemical parameters associated with the VCD calculations of those conformers contributing to the final calculations are summarized in Table 4.

The presence of anastomosine (**6**) in *S. anastomosans*, *S. candicans*, and *S. ballotiflora* is important from a chemotaxonomic point of view, since these three species are classified in section Tomentellae. Phylogenetic analyses of some New World salvias of subgenus Calospahce have indicated the existence of different clades inside section Tomentellae and reinforce the evolutionary proximity between

S. candicans and *S. ballotiflora* [45]. This conclusion is also supported by the presence of diterpenoids **9** and **4** in both species. The inclusion of *S. anastomosans* in section Tomentellae is also supported by the presence of the anastomosine-type diterpenoids **1**, **2**, **7** and **9** in *S. ballotiflora*. Unfortunately, no gene sequence data is available for *S. anastomosans* to reinforce the evolutionary proximity indicated by the diterpenoid content.

Compound **7** (7,20-dihydroanastomosine), was previously isolated from a different population of *S. ballotiflora* [23]; however, the absolute configuration of this icetexane diterpenoid has not been established, and as in the case of anastomosine (**6**), we found some mistakes in the reported ^{13}C -NMR spectrum. The assignment, based on high field (700 MHz) NMR analysis in this work, is included in the experimental section.

Crystallization of **7** also afforded suitable crystals for X-ray diffraction analysis. A yellow crystal measuring $0.25 \times 0.16 \times 0.09$ mm, $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_5$, $M = 342.38$ turned out to be monoclinic, space group $P2_1$, $a = 10.1571(6)$ Å, $b = 7.7387(4)$ Å, $c = 10.6394(6)$ Å, $\beta = 95.401(3)$ deg, $V = 832.57(8)$ Å³, $Z = 2$, $\rho = 1.366$ mg/mm³. This allowed the collection of a total of 7988 reflections, which, after data reduction, left 2552 observed reflections. The structure was solved, as in the previous case, to afford final R indices $R_1 = 3.1\%$ and $wR_2 = 7.1\%$, and again the absolute configuration followed from the Flack (x) and Hooft (y) parameters, which were $x = 0.07(18)$ and $y = 0.13(9)$, and for the inverted structure were $x = 0.90(17)$ and $y = 0.87(9)$. A PLUTO plot of the molecular structure is shown in Figure 8.

Independently, the absolute configuration of **7** was also determined by VCD. This molecule was also quite rigid, similar to **6**. Thus, the sole bond for conformational freedom is that holding the isopropyl group, which generated the two conformers used for the final spectra comparison process. The comparison parameters shown in Table 6 were determined as per the previous cases, and allowed us to secure the absolute configuration in agreement with the drawn molecular formula. In turn, the thermochemical parameters are also summarized in Table 3.

The complete NMR assignments of the abietane 7α -acetoxy-19-hydroxyroyleanone (**11**), previously isolated from *S. regla* [29], are included in the experimental section since, as in the case of **6** and **7**, some discrepancies with earlier assignments were found.

Since icetexanes **3**, **6**, **7**, and **8**, as well as abietane **10**, were isolated in this work from *S. ballotiflora* and showed an α -axially oriented H-5, we assumed (based on biogenetic grounds) that the diterpenoids **1**, **2**, **4**, **5** and **11** possessed the same absolute configuration at C-5.

2.2. Biological Activity

2.2.1. Antiproliferative Activity

Some abietane diterpenoids from *Salvia* species have been shown to possess cytotoxic activity comprising several biochemical targets [46,47]. The same biological activity was also recently described for icetexane-derivatives isolated from *Premna* and *Amentotaxus* species [48–50]. Furthermore, 19-deoxyisoicetexone isolated from *S. ballotiflora* exhibited similar activity when compared to cisplatin on HeLa cells with IC_{50} (μM) = 9.36 [21]. These facts prompted us to assay diterpenoids **3**, **4**, **6–8** and **10** for antiproliferative activity using six human cancer cell lines (U251, PC-3, K562, HCT-15, MCF-7, and SKLU-1), and a primary culture of healthy gingival human fibroblasts (FGH) at 1.0 or 50.0 μM (when cytotoxicity at 50.0 μM results were too high). Adriamycin at 0.5 μM was used as the positive control. The results are summarized in Figure S48. While anastomosine (**6**) was shown to be very toxic to U251 and SKLU-1 cell lines at 1.0 μM and moderately toxic to MCF-7 and FGH, 7,20-dihydroanastomosine (**7**) exhibited only a moderate toxicity to K562 and MCF-7 at 50.0 μM , being non-toxic to FGH. Overall, the antiproliferative activity determined for **7** was lower than that observed for **6**. Icetexone (**8**) exhibited significant antiproliferative activity against K562 and MCF-7 at 50 μM , but lacked of toxicity to FGH, and was only moderately active against all other tested cancer cell lines. Furthermore, 7α -acetoxy-6,7-dihydroicetexone (**3**) was shown to be non-toxic to MCF-7 and FGH, and moderately active against U-251 and SKLU-1. The aromatic diterpenoid **4** proved to be very toxic

to the complete panel, while conacytone (**10**) exhibited no toxicity in this assay. Based on the above primary screening results, the IC_{50} (μM) was obtained for **3**, **6**, **7** and **8** (Table 7). Anastomosine (**6**) and 7α -acetoxy-6,7-dihydroicetexone (**3**) were the most active molecules in the sulforhodamine B assay, with IC_{50} (μM) = 0.27 ± 0.08 and 1.4 ± 0.03 , respectively, for U251 (human glioblastoma) and IC_{50} (μM) = 0.46 ± 0.05 and 0.82 ± 0.06 for SKLU-1 (human lung adenocarcinoma). The IC_{50} values indicated that **3** and **6** approach adriamycin in potency; however, the calculated selectivity index [51] using COS-7 as a normal cell line indicated low selectivity. The IC_{50} (μM) obtained for icetexanes **7** (K562 = 31.2 ± 1.1 , MCF-7 = 33.24 ± 1.2) and **8** (K562 = 17.0 ± 1.4 , MCF-7 = 28.7 ± 1.6) were too high, with respect to adriamycin (K562 = 0.20 ± 0.02 , MCF-7 = 0.23 ± 0.02), to be considered for further experimentation. Although there were no obvious structure-activity relationships to establish with these results, **3** and **6** deserve further studies aiming to obtain a better understanding of their antiproliferative activity.

Table 7. IC_{50} (μM) values of antiproliferative activity for compounds **3**, **6**, **7**, and **8**.

Compound	IC_{50} (μM) (SI)				
	U251	SKLU-1	COS-7	K562	MCF-7
3	1.4 ± 0.03 (1.2)	0.82 ± 0.06 (2.0)	1.62 ± 0.1	Nd	Nd
6	0.27 ± 0.08 (2.3)	0.46 ± 0.05 (1.3)	0.61 ± 0.007	Nd	Nd
7	Nd	Nd	Nd	31.2 ± 1.1	33.24 ± 1.2
8	Nd	Nd	Nd	17.0 ± 1.4	28.7 ± 1.6
Adriamycin	0.08 ± 0.003 (3.1)	0.05 ± 0.003 (5.0)	0.25 ± 0.009	0.20 ± 0.02	0.23 ± 0.02

Results represent the mean \pm SD of at least three different experiments; Nd = Not determined; U251 = human glioblastoma; SKLU-1 = human lung adenocarcinoma; K562 = human chronic myelogenous leukemia; MCF-7 = human mammary adenocarcinoma; COS-7 normal monkey kidney; SI = selectivity index calculated as the quotient of IC_{50} of COS-7/ IC_{50} of cancer cell lines. For compounds **3** and **6**, IC_{50} was determined at four concentrations in a range of 1.0 to 0.18 μM ; 75.0 to 12.5 μM for **7**, and 50.0 to 6.25 μM for **8**.

2.2.2. TPA-Induced Edema Model

Since labadane, abietane, and clerodane diterpenes have been shown to exhibit significant anti-inflammatory activity [50,52,53], compounds **3**, **6**, **7** and **10** were evaluated on the TPA model of induced acute inflammation [31]. In a primary screening at 1 mg ear⁻¹ (Table 8), compounds **6** and **7** were non-active, whereas **3** ($37.4 \pm 2.8\%$) and **10** ($25.4 \pm 3.0\%$) displayed significant reduction of edema when compared with the control group. Nevertheless, compounds **3** and **10** were less active than indomethacine ($78.8 \pm 7.7\%$) and celecoxib ($54.3 \pm 10.3\%$), which were used as reference compounds. The inhibition of the edema exerted by indomethacine was approximately 2-fold and 3-fold higher than compound **3** and **10** respectively. On the other hand, celecoxib was 1.5-fold higher than compound **3** and 2-fold higher than compound **10**.

Table 8. Inhibitory effect of compounds **3**, **6**, **7** and **10** on TPA-induced inflammation in a mouse model.

Compound	Edema (mg)	Inhibition of Edema (%)
Control (TPA)	15.77 ± 0.78	
3	9.87 ± 0.44 **	37.42 ± 2.77 **
6	15.97 ± 0.61	NA
7	15.50 ± 0.76	NA
10	11.77 ± 0.47 **	25.37 ± 2.98 **
Indometacin	2.88 ± 0.73 **	78.76 ± 7.68 **
Celecoxib	6.94 ± 1.56 *	54.34 ± 10.28

Effects on ear edema of female mice CD-1; Doses (1.0 μmol ear⁻¹); each value represents the mean of three–seven animals \pm SEM; The results were analyzed with the Dunnett test; The values at $p < 0.05$ (*) and $p < 0.01$ (**) were considered as significant differences with respect to the control group. NA = Non-active.

2.2.3. Scavenging Activity on Free Radical 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH)

Diterpenoids **3**, **4**, **6–8**, and **10** were tested for their radical scavenger activity using the DPPH test [32]. Since compounds **3**, **6–8** and **10** showed a low inhibitory effect at 100 μM (6.1, 8.2, 6.6, 3.7, and 4.8% respectively), IC_{50} was not determined. Compound **4** was the sole active diterpenoid at 100 μM (64.5%), exhibiting a $\text{IC}_{50} = 98.4 \pm 3.5 \mu\text{M}$; however, compound **4** was approximately three and 10 times less active than α -tocopherol ($\text{IC}_{50} = 31.7 \pm 1.0 \mu\text{M}$) and quercetin ($\text{IC}_{50} = 10.9 \pm 0.5 \mu\text{M}$), respectively (Figure 9). It has been shown that the molecules with *ortho* dihydroxyl groups exhibit strong antioxidant activity. The antioxidant effect of carnosic acid [54], ferruginol [55], and their derivatives has been shown, and, like compound **4**, these compounds are aromatic abietane-type diterpenes.

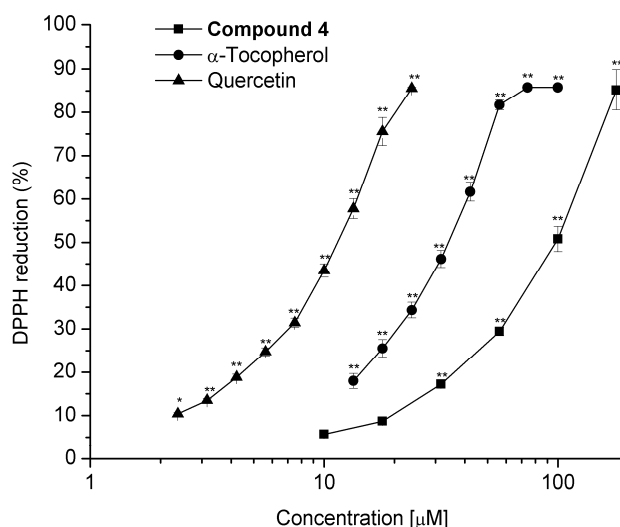


Figure 9. Dose-response curve for determining the IC_{50} value for scavenging activity on free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) of compound **4** compared with standards α -tocopherol and quercetin. Values represent the mean of at least three independent experiments \pm SEM, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ indicate significant differences when compared with the control group (two-way ANOVA followed by the Dunnett post-test).

3. Materials and Methods

3.1. General Experimental Procedures

The melting points (uncorrected) were determined on a Fisher-Jhons apparatus (Fisher Scientific Company, Pittsburgh, PA, USA). The optical rotations were measured on a Perkin-Elmer 323 polarimeter (Perkin Elmer Inc., London, UK). The UV spectra were recorded on a Shimadzu UV 160U spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). VCD data were acquired on a BioTools dualPEM ChiralIR FT-VCD spectrophotometer (Jupiter, FL, USA). The IR spectra were obtained on a Bruker Tensor 27 spectrometer (Bruker, Ettlingen, Germany); 1D and 2D NMR experiments were performed on a Bruker Advance III HD spectrometer (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA) at 700 MHz for ^1H and 175 MHz for ^{13}C . Chemical shifts were referred to CDCl_3 ($\delta_{\text{H}} = 7.26$, $\delta_{\text{C}} = 77.16$). The HR-DART-MS data were acquired on a Jeol, AccuTOF JMS-T100LC mass spectrometer (Jeol Ltd., Tokyo, Japan); silica gel 230–400 mesh (Macherey-Nagel, Macherey Nagel, Düren, Germany), Sephadex LH-20 (Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden), and octadecyl-functionalized silica gel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were used for column chromatography. The X-ray data were collected on an Agilent Xcalibur Atlas Gemini diffractometer (Agilent Technologies, Oxfordshire, UK).

3.2. Plant Material

Salvia ballotiflora was collected from the Municipality of Linares, State of Nuevo León, Mexico in June 2016. Latitude = 24.811642°, longitude = −99.585642°, 390 m above sea level. Plant material was identified by Dr. Martha Martínez-Gordillo, and a voucher specimen (FCME 161792) was deposited at the Herbarium (FCME) of the Faculty of Science, UNAM. *Salvia ballotiflora* Benth [56] is the current accepted name of this plant, previously called *S. bellotaeflora* [57] and *S. ballotaeflora* Benth [15].

3.3. Extraction, Isolation, and Characterization

The dried and powdered aerial parts of *S. ballotiflora* (800 g) were extracted exhaustively by percolation in sequence with petrol and CH₂Cl₂. The CH₂Cl₂ extract was concentrated to yield 10 g of residue. The crude extract was subjected to CC on silica gel using gradient elution with petrol:EtOAc (100:0–0:100) to obtain 101 eluates, 250 mL each, which were combined in 12 major fractions (A–L) by thin layer chromatography (TLC) evaluation. Compounds 7,20-dihydroanastomosine (7) (50 mg) and icetexone (8) (18 mg) crystallized from fractions A and B, respectively. Fraction C (450 mg) was purified by CC on silica gel, eluting with petrol:EtOAc (2:1) as the mobile phase, to yield anastomosine (6) (125 mg) and conacytone (10) (320 mg). Fraction D (350 mg) was subjected to CC on silica gel using gradient elution with CH₂Cl₂:acetone (100:0–0:100) to obtain 48 eluates, 100 mL each, which were combined in five major fractions (DA–DE) by TLC evaluation. Fraction DE (35 mg) was purified by TLC on silica gel, eluting with CH₂Cl₂:acetone (19:1) as the mobile phase to give 3 (11 mg). Fraction E (56 mg) was subjected to TLC using EtOAc:petrol:MeOH:H₂O (60:33:5:2) as the mobile phase to give 2 (2.4 mg). Fraction F (500 mg) was subjected to successive CC and TLC to give 4 (7.3 mg), 5 (6.4 mg), and 11 (8.2 mg). Fraction I (2.10 g) was rechromatographed, eluting with petrol:EtOAc (100:0–0:100) to obtain 68 eluates, 150 mL each, which were combined in eight major fractions (IA–IH). Fraction IE was subjected to TLC on octadecylsilane, using MeOH:H₂O (2:1) to yield 9 (3.2 mg). Fraction K (25 mg) was subjected to TLC using EtOAc:petrol:MeOH:H₂O (60:33:5:2) as the mobile phase to give 1 (3.0 mg).

Ballotiquinone (1). Yellow oil; $[\alpha]_D^{25} +108.8$ (c 0.0017, CHCl₃); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 206 (2.93), 237 (2.88), 325 (2.54) nm; IR (CDCl₃) ν_{\max} 3597, 3412, 2931, 2875, 1778, 1654, 1621, 1583, 1458, 1380 cm^{−1}; ¹H- and ¹³C-NMR, see Table 1; HR-DART-MS m/z [M − H₂O]⁺ 357.13138 (calculated for C₂₀H₂₁O₆, 357.13381).

6,7-Anhydroballotiquinone (2). Yellow oil; $[\alpha]_D^{25} +265.5$ (c 0.0022, CHCl₃); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 213 (4.16), 243 (4.07), 332 (3.77) nm; IR (CDCl₃) ν_{\max} 3601, 3396, 2930, 2875, 1811, 1639, 1621, 1458, 1364 cm^{−1}; ¹H- and ¹³C-NMR, see Table 1; HR-DART-MS m/z [M]⁺ 357.13265 (calculated for C₂₀H₂₁O₆, 357.13381).

7 α -Acetoxy-6,7-dihydroicetexone (3). Yellow powder; m.p. 110–115 °C; $[\alpha]_D^{25} -41.11$ (c 0.0018, CHCl₃); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 205 (4.10), 275 (3.93) nm; IR (CDCl₃) ν_{\max} 3412, 2941, 2879, 1770, 1645, 1373 cm^{−1}; ¹H- and ¹³C-NMR, see Table 2; HR-DART-MS m/z [M]⁺ 403.17557 (calculated for C₂₂H₂₇O₇, 403.17568).

6,7,11,14-Tetrahydro-7-oxoicetexone (4). Yellow powder; m.p. 130–135 °C; $[\alpha]_D^{25} -72.0$ (c 0.0015, CHCl₃); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 206 (2.90), 295 (2.60), 355 (2.33), 421 (1.67) nm; IR (CDCl₃) ν_{\max} 3602, 3564, 3514, 2930, 2960, 2877, 1771, 1612, 1450, 1352 cm^{−1}; ¹H- and ¹³C-NMR, see Table 5; HR-DART-MS m/z [M]⁺ 361.16436 (calculated for C₂₀H₂₅O₆, 361.16511).

18-Acetoxy-11-hydroxysugiol (5). Yellow powder; m.p. 90–95 °C; $[\alpha]_D^{25} +25.2$ (c 0.0015, CHCl₃); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 213 (4.01), 235 (3.85), 289 (3.73), 421 (1.67) nm; IR (KBr) ν_{\max} 3599, 3534, 3514, 2932, 2873, 1730, 1672, 1612, 1468, 1369 cm^{−1}; ¹H- and ¹³C-NMR, see Table 6; HR-DART-MS m/z [M]⁺ 375.21725 (calculated for C₂₂H₃₁O₅, 375.21715).

Anastomosine (6). Orange crystals; m.p. 220–224 °C; $[\alpha]_D^{25} +119.1$ (c 0.0021, CHCl₃); ¹H-NMR (CDCl₃, 700 MHz) δ 7.76 (1H, s, 12-OH), 7.755 (1H, s, H-20), 7.51 (1H, d, $J = 2.8$, H-7), 6.66 (1H, brd, $J = 5.6$, H-1),

4.75 (1H, dd, $J = 10.5, 2.8$, H-6), 3.37 (1H, hept, $J = 6.7$, H-15), 2.59 (1H, brd, $J = 10.3$, H-5), 2.50 (1H, m, H-2a), 2.48 (1H, m, H-2b), 1.84 (1H, dd, $J = 12.9, 3.8$, H-3a), 1.52 (1H, td, $J = 12.6, 5.5$, H-3b), 1.34 (3H, s, CH₃-18), 1.26, 1.27 (3H, d, $J = 6.7$, CH₃-16, 17); ¹³C-NMR (CDCl₃, 175 MHz) δ 183.0 (C, C-14), 181.5 (C, C-11), 180.0 (C, C-19), 155.2 (C, C-12), 143.3 (CH, C-1), 141.7 (CH, C-20), 140.5 (CH, C-7), 133.7 (C, C-10), 132.0 (C, C-13), 129.1 (C, C-8), 124.2 (C, C-9), 78.7 (CH, C-6), 47.7 (CH, C-5), 41.6 (C, C-4), 25.4 (CH, C-15), 25.0 (CH₂, C-3), 23.1 (CH₂, C-2), 21.3 (CH₃, C-18), 19.7, 19.5 (CH₃, C-16, C-17); (HR-DART-MS m/z [M]⁺ 341.13955 (calculated for C₂₀H₂₁O₅, 341.13890).

7,20-Dihydroanastomosine (7). Yellow crystals; m.p. 223–227 °C (reported, 217–220 °C); ¹H-NMR data were identical to those published [23]. ¹³C-NMR (CDCl₃, 175 MHz) δ 185.3 (C, C-14), 183.4 (C, C-11), 180.3 (C, C-19), 150.2 (C, C-12), 142.5 (C, C-9), 139.8 (C, C-8), 128.3 (C, C-10), 125.7 (C, C-13), 123.9 (CH, C-1), 78.6 (CH, C-6), 57.6 (CH, C-5), 42.0 (C, C-4), 33.2 (CH₂, C-20), 31.0 (CH₂, C-7), 24.9 (CH, C-15), 24.6 (CH₂, C-3), 21.5 (CH₂, C-2), 20.3 (CH₃, C-18), 20.02, 19.99 (CH₃, C-16, C-17); HR-DART-MS m/z [M]⁺ 343.15359 (calculated for C₂₀H₂₃O₅, 343.15455).

1,2-Anhydroballotiquinone (9). Orange powder; m.p. 95–98 °C; $[\alpha]_D^{25} +665$ (c 0.001, CDCl₃); UV (MeOH), and ¹H-NMR data were essentially the same as reported [28]; ¹³C-NMR (CDCl₃, 175 MHz) δ 188.2 (C, C-14), 184.1 (C, C-11), 179.2 (C, C-19), 150.3 (C, C-12), 140.1 (C, C-10), 139.0 (C, C-9), 132.6 (C, C-8), 131.4 (CH, C-2), 128.4 (CH, C-1), 127.5 (C, C-13), 117.4 (CH, C-20), 81.0 (CH, C-6), 74.5 (CH, C-7), 44.9 (CH, C-5), 40.3 (C, C-4), 30.8 (CH₂, C-3), 24.7 (CH, C-15), 23.4 (CH₃, C-18), 20.0, 19.9 (CH₃, C-16, C-17); HR-DART-MS m/z [M]⁺ 357.13261 (calculated for C₂₀H₂₁O₆, 357.13381).

7 α -Acetoxy-19-hydroxyroyleanone (11). Yellow powder; m.p. 277–282 °C; $[\alpha]_D^{25} +0.9$ (c 0.0011, MeOH); ¹H-NMR (CDCl₃, 700 MHz) δ 7.13 (1H, s, 12-OH), 5.91 (1H, brd, $J = 2.1$, H-7), 3.71 (1H, d, $J = 10.9$, H-20a), 3.57 (1H, d, $J = 10.9$, H-20b), 3.15 (1H, hept, $J = 7.0$, H-15), 2.75 (1H, d, $J = 13.1$, H-1a), 2.07 (1H, brd, $J = 14.8$, H-6a), 2.04 (3H, s, H₂'), 1.79 (1H, brd, $J = 13.7$, H-3a), 1.73 (1H, m, H-2a), 1.69 (1H, m, H-6b), 1.62 (1H, d, $J = 13.4$, H-5), 1.58 (1H, m, H-2b), 1.26, (1H, m, H-1b), 1.25 (3H, s, CH₃-20), 1.22, 1.18 (3H, d, $J = 7.0$, CH₃-16, 17), 1.01 (1H, td, $J = 13.5, 3.8$, H-3b), 0.97 (3H, s, CH₃-18); ¹³C-NMR (CDCl₃, 175 MHz) δ 185.5 (C, C-14), 183.8 (C, C-11), 169.5 (C, C-1'), 150.9 (C, C-12), 149.8 (C, C-9), 139.5 (C, C-8), 124.9 (C, C-13), 66.0 (CH₂, C-19), 64.6 (CH, C-7), 46.7 (CH, C-5), 39.0 (C, C-10), 38.3 (C, C-4), 36.1 (CH₂, C-1), 35.5 (CH₂, C-3), 27.0 (CH₃, C-18), 25.3 (CH₂, C-6), 24.3 (CH, C-15), 21.3 (CH₃-C-2'), 19.8, 19.9 (CH₃, C-16, C-17), 18.9 (CH₃, C-20), 18.7 (CH₂, C-2); (HR-DART-MS m/z [M]⁺ 391.21198 (calculated for C₂₁H₂₂O₆, 391.21209).

3.4. Single Crystal X-ray Diffraction Analysis

Crystals of anastomosine (6) and of 7,20-dihydroanastomosine (7) were mounted on glass fibers for data collection using Cu K α graphite monochromated radiation ($\lambda = 1.54184$ Å) at 293(2) K in the $\omega/2\theta$ scan mode. In the case of 6, an orange crystal measuring $0.34 \times 0.26 \times 0.15$ mm, C₂₀H₂₀O₅, $M = 340.36$ turned out to be orthorhombic, space group $P2_12_12_1$, $a = 7.558(2)$ Å, $b = 10.421(3)$ Å, $c = 21.093(5)$ Å, $V = 1661.4(7)$ Å³, $Z = 4$, $\rho = 1.361$ mg/mm³, $\mu = 0.802$ mm⁻¹, total reflections 40,440, unique reflections 3341 ($R_{\text{int}} 0.046$), observed reflections 3178. In the case of 7, a yellow crystal measuring $0.25 \times 0.16 \times 0.09$ mm, C₂₀H₂₂O₅, $M = 342.38$ turned out to be monoclinic, space group $P2_1$, $a = 10.1571(6)$ Å, $b = 7.7387(4)$ Å, $c = 10.6394(6)$ Å, $\beta = 95.401(3)$ deg, $V = 832.57(8)$ Å³, $Z = 2$, $\rho = 1.366$ mg/mm³, $\mu = 0.801$ mm⁻¹, total reflections 7988, unique reflections 2708 ($R_{\text{int}} 0.032$), observed reflections 2552. Each structure was solved by direct methods using the SHELXS-97 program included in the WinGX v1.70.01 crystallographic software package. For structural refinement, the non-hydrogen atoms were treated anisotropically, and the hydrogen atoms, included in the structure factor calculations, were refined isotropically. The final R indices for 6 were ($I > 2\sigma(I)$) $R_1 = 3.9\%$ and $wR_2 = 10.3\%$, largest difference peak and hole, 0.307 and -0.195 e.Å³, and those for 7 were ($I > 2\sigma(I)$) $R_1 = 3.1\%$ and $wR_2 = 7.1\%$, largest difference peak and hole, 0.164 and -0.161 e.Å³. The Olex2 v1.1.5 software [41] allowed the calculation of the Flack (x) [42] and Hooft (y) parameters [43,44]. In the case of 6, these parameters were $x = 0.1(2)$ and $y = 0.09(5)$, and for the inverted structure

were $x = 0.9(2)$ and $y = 0.91(5)$; while for **7** they were $x = 0.07(18)$ and $y = 0.13(9)$, and again for the inverted structure were $x = 0.90(17)$ and $y = 0.87(9)$. Crystallographic data (excluding structure factors) were deposited at the Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC) under the reference numbers CCDC 1570292 and CCDC 1570293 for **6** and **7**, respectively, and copies of the data can be obtained free of charge upon application to the CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 IEZ, UK. Fax: +44-(0)1223-336033 or e-mail: deposit@ccdc.cam.ac.uk. The CCDC deposition numbers and PLUTO representations of both X-ray structures are shown in Figure 8.

3.5. VCD Measurements

Samples of 7.2 mg of **3**, of 7.5 mg of **6**, and of 3.8 mg of **7**, dissolved in 150 μL of 100% atom-D CDCl_3 , were placed in cells with BaF_2 windows and a path length of 0.1 mm for data acquisition at a resolution of 4 cm^{-1} over 6 h. A baseline correction was performed by subtracting the spectrum of the solvent acquired under identical instrumental conditions. The stability of the samples was monitored in each case by 300 MHz $^1\text{H-NMR}$ measurements performed immediately before and after the VCD determinations.

3.6. Vibrational Circular Dichroism Calculations

Molecular models of **3**, **6** and **7** were constructed in the Spartan 04 software followed by molecular mechanics searching all conformers contained in an initial 10 kcal/mol range. This provided 27, four, and seven conformers for **3**, **6** and **7**, respectively. Those conformers within the first 5 kcal/mol, over the most stable conformer, were selected for DFT geometry optimization using the B3PW91/DGDZVP level of theory. This procedure provided nine conformers for **3**, and two conformers each for **6** and **7**, representing 99.9% of the conformational population. The six conformers of **3** as well as the two conformers each for **6** and **7** showed energy values in a 3 kcal/mol interval, which represented more than 99.8% of the conformational population, and were submitted to calculate the vibrational frequencies, dipole transition moment, and rotational strengths. Table 3 shows the free energy values and conformational populations calculated using the $\Delta G = -RT \ln K$ equation for the most stable conformers. The final IR and VCD Boltzman weighted spectra were computed, considering the matrix element value as a Lorentzian band with a half-width of 6 cm^{-1} for the conformers shown in Table 3.

Table 3 shows the confidence level data for the comparison of the experimental and calculated spectra (Figure 5). Values greater than 82% for the IR spectra were obtained, while the enantiomer similarity index (S_E) for the VCD spectra was 89 for **3**, and higher than 84 for **6** and **7**. These values were obtained with a 100% confidence level.

3.7. Cytotoxicity Assay

The natural products were screened in vitro against the following human cancer cell lines: human mammary adenocarcinoma (MCF-7), human chronic myelogenous leukemia (K562), human glioblastoma (U251), human lung adenocarcinoma (SKLU-1), human colon cancer (HCT-15), human prostate cancer (PC-3), healthy gingival human fibroblasts (FGH), and normal monkey kidney cell lines, which were supplied by the National Cancer Institute (NCI, USA) and American Type Culture Collection (ATTC). The human tumor cytotoxicity was determined using the protein-binding dye sulforhodamine B (SRB) in a microculture assay to measure cell growth, as described in the protocol established by the NCI [30]. The cell lines were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 10,000 units/mL penicillin G sodium, 10,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin sulfate, and 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ amphotericin B (Gibco), and 1% non-essential amino acids (Gibco). They were maintained at $37\text{ }^\circ\text{C}$ in a humidified atmosphere with 5% CO_2 . The viability of the cells used in the experiments exceeded 95%, as determined with trypan blue.

Cytotoxicity after treatment of the tumors cells and normal cells with the test compounds were determined using the protein-binding dye sulforhodamine B (SRB) in a microculture assay to measure cell growth [30]. The cells were removed from the tissue culture flasks by treatment with trypsin,

and diluted with fresh media. Of these cell suspensions, 100 μL containing 5000–10,000 cells per well were pipetted into 96-well microtiter plates (Costar) and the material was incubated at 37 °C for 24 h in a 5% CO_2 atmosphere. Subsequently, 100 μL of a solution of the compound obtained by diluting the stocks were added to each well. The cultures were exposed to the compound for 48 h. After the incubation period, cells were fixed to the plastic substratum by the addition of 50 μL of cold 50% aqueous trichloroacetic acid. The plates were incubated at 4 °C for 1 h, washed with tap water, and air-dried. The trichloroacetic-acid-fixed cells were stained by the addition of 0.4% SRB. The free SRB solution was then removed by washing with 1% aqueous acetic-acid. The plates were air-dried, and the bound dye was dissolved by the addition of 10 mM unbuffered Tris base (100 μL). The plates were placed on a shaker for 10 min, and the absorption was determined at 515 nm using an ELISA plate reader (Bio-Tex Instruments).

3.8. TPA-Induced Edema Model

Male CD-1 mice weighing 25–30 g were maintained under standard laboratory conditions in the animal house (temperature 24 ± 2 °C) in a 12/12 h light/dark cycle, fed a laboratory diet and water ad libitum, following the Mexican official norm NOM-062-Z00-1999.

The TPA-induced ear edema assay in mice was performed as reported in reference [31]. A solution of TPA (2.5 μg) in ethanol (10 μL) was applied topically to both faces (5 μL each ear) of the right ear of the mice, 10 min after solutions of the test substances in their respective solvents were applied (10 μL each face). The left ear received ethanol (10 μL) first, followed by 20 μL of the respective solvent. The mice were killed with CO_2 four hours later. A 7-mm diameter plug was removed from each ear. The swelling was assessed as the difference in weight between the left and the right ear. Control animals received the correspondent solvent in each case. Edema inhibition (EI %) was calculated by the equation $\text{EI \%} = 100 - (\text{B} \times 100/\text{A})$, where A is the edema induced by TPA alone and B is the edema induced by TPA plus the sample. Indomethacin and celecoxib were used as reference compounds.

3.9. Scavenging Activity on Free Radical 2,2-Diphenyl-1-Picrylhydrazyl (DPPH)

Free radical scavenging activity was measured using an adapted method of Mellors and Tappel [32]. The test was carried out in 96-well microplates. A 50- μL aliquot of the solution of the test compound was mixed with 150 μL of an ethanol solution of DPPH (final concentration 100 μM). The mixture was incubated at 37 °C for 30 min, and the absorbance was then measured at 515 nm using a BioTek microplate reader SYNERGY HT. The percent inhibition was determined by comparison with a 100- μM DPPH ethanol blank solution.

4. Conclusions

From the leaves of *Salvia ballotiflora* Benth, eleven diterpenoids were isolated and identified by spectroscopic means. Among them, four icetexanes (1–4) and one abietane (5) were reported for the first time. The absolute configuration of compounds 3, 6 and 7 was determined by X-ray diffraction analysis and VCD. The complete and unambiguous assignments of the ^1H - and ^{13}C -NMR data of the previously reported diterpenes 6, 7 and 11 were included in this paper, since some discrepancies with the original data were found. Some of the isolated diterpenoids were tested for antiproliferative, anti-inflammatory, and radical scavenging activities using standard protocols. Compounds 3 and 6 showed the highest anti-proliferative activity of the assessed compounds when evaluated using the sulforhodamine B assay with IC_{50} (μM) = 0.27 ± 0.08 and 1.4 ± 0.03 , respectively, for U251 (human glioblastoma) and IC_{50} (μM) = 0.46 ± 0.05 and 0.82 ± 0.06 for SKLU-1 (human lung adenocarcinoma). Although the IC_{50} values indicated that 3 and 6 approached adriamycin in potency, the selectivity indexes (SI) calculated for them indicated low selectivity. On the other hand, compounds 3 and 10 displayed a significant difference against the control group in the primary screening using the TPA-induced edema model. Compound 4 was the only antioxidant compound in the DPPH model with IC_{50} (μM) = 98.4 ± 3.5 μM .

The diterpenoid content found in *Salvia ballotiflora* reported in this work is important from a chemotaxonomic point of view, since it reinforces the evolutionary proximity between *S. anastomosans*, *S. candicans*, and *S. ballotiflora* established by phylogenetic analysis—given that they share several compounds with abietane and icetexane frameworks—and supports the inclusion of the three species in section Tomentellae.

Supplementary Materials: Supplementary Materials are available online. Figures S1–S35, RMN ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC, HMBC, NOESY, HR-DART-MS for compounds 1–5, Figures S36–S47 RMN ^1H , ^{13}C , HSQC for compounds 6, 7, 9, and 11.

Acknowledgments: The authors acknowledge H. Rios, I. Chávez, B. Quiroz, E. Huerta, A. Peña, R. Patiño, L. Velasco, C. García, and J. Pérez for collecting NMR, UV, IR, and MS data. The authors are indebted to Martha Martínez-Gordillo (Herbarium of the Faculty of Sciences of UNAM) for plant identification and to Alejandro Hernández-Herrera for plant collection. This study made use of UNAM's NMR lab: LURMN at IQ-UNAM, which is funded by CONACYT Mexico (Project: 0224747), and Posgrado en Ciencias Químicas, UNAM.

Author Contributions: Baldomero Esquivel, Celia Bustos-Brito and Leovigildo Quijano, participated in the isolation and structure elucidation, preparation and revision of the manuscript. Pedro Joseph-Nathan participated in the collection, and analyses of X ray data and revision of the manuscript. Pedro Joseph-Nathan and Mariano Sanchez-Castellanos participated in the VCD calculations and data interpretation. Teresa Ramirez-Apan participated in the performance of cytotoxicity assays. Antonio Nieto-Camacho participated in the performance of TPA-induced edema model and DPPH tests. All co-authors participated equally and substantially to the paper.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Wu, Y.B.; Ni, Z.Y.; Shi, Q.W.; Dong, M.; Kiyota, H.; Gu, Y.C.; Cong, B. Constituents from *Salvia* species and their biological activities. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 5967–6026. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Jassbi, A.R.; Zare, S.; Firuzi, O.; Xiao, J. Bioactive phytochemicals from shoots and roots of *Salvia* species. *Phytochem. Rev.* **2016**, *15*, 829–867. [[CrossRef](#)]
3. Rodriguez-Hahn, L.; Esquivel, B.; Sanchez, A.A.; Sanchez, C.; Cardenas, J.; Ramamoorthy, T.P. New diterpenes from Mexican *Salvia* species. *Rev. Latinoam. Quim.* **1987**, *18*, 104–109.
4. Rodriguez-Hahn, L.; Esquivel, B.; Sanchez, A.A.; Sanchez, C.; Cardenas, J.; Ramamoorthy, T.P. Abietane diterpenes from Mexican *Salvia* species. *Rev. Latinoam. Quim.* **1989**, *20*, 105–110.
5. Rodriguez-Hahn, L.; Esquivel, B.; Cardenas, J. New diterpenoid skeletons of clerodanic origin from Mexican *Salvia* species. *Trends Org. Chem.* **1992**, *3*, 99–111.
6. Rodriguez-Hahn, L.; Esquivel, B.; Cardenas, J. Clerodane diterpenes in Labiatae. In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*; Herz, W., Kirby, G.W., Moore, R.E., Steglich, W., Tamm, C., Eds.; Springer: Vienna, Austria, 1994; Volume 63, pp. 107–196.
7. Rodriguez-Hahn, L.; Esquivel, B.; Cardenas, J. Neo-clerodane diterpenoids from American *Salvia* species. In *Recent Advances in Phytochemistry*; Arnason, J.T., Mata, R., Romeo, J.T., Eds.; Springer: Boston, MA, USA, 1995; pp. 311–332.
8. Esquivel, B.; Calderon, J.S.; Sanchez, A.A.; Ramamoorthy, T.P.; Flores, E.A.; Dominguez, R.M. Recent advances in phytochemistry and biological activity of Mexican Labiatae. *Rev. Latinoam. Quim.* **1996**, *24*, 44–64.
9. Esquivel, B. Rearranged clerodane and abietane derived diterpenoids from American *Salvia* species. *Nat. Prod. Commun.* **2008**, *3*, 989–1002.
10. Esquivel, B.; Calderón, J.S.; Arano, M.G.; Hernández, P.M.; Sánchez, A.A. Diterpenoids from the roots of Mexican *Salvia* species. Phytogeographical and evolutionary significance. *Rev. Latinoam. Quim.* **2005**, *33*, 82–89.
11. Esquivel, B.; Sánchez, A.A.; Vergara, F.; Matus, W.; Hernandez-Ortega, S.; Ramírez-Apan, M.T. Abietane diterpenoids from the roots of some Mexican *Salvia* species (Labiatae). Chemical diversity, phytogeographical significance and cytotoxic activity. *Chem. Biodivers.* **2005**, *2*, 738–747. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Riley, A.P.; Groer, C.E.; Young, D.; Edwald, A.W.; Kivell, B.M.; Prinszano, T.E. Synthesis and κ -Opioid receptor activity of furan-substituted Salvinorin A analogues. *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 10464–10475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Bedolla-García, B.J.; Zamudio, S. Four new species of *Salvia* (Lamiaceae) from central Mexico. *Phytotaxa* **2017**, *217*, 35–52. [[CrossRef](#)]
14. Simmons, E.M.; Sarpong, R. Structure, biosynthetic relationships and chemical synthesis of the icetexane diterpenoids. *Nat. Prod. Rep.* **2009**, *26*, 1195–1217. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

15. Domínguez, X.A.; González, F.H.; Aragón, R.; Gutiérrez, M.; Marroquín, J.S.; Watson, W. Mexican medicinal plants XXIX three new diterpene quinones from *Salvia Ballotaeflora*. *Planta Med.* **1976**, *30*, 237–241. [[CrossRef](#)]
16. Majetich, G.; Grove, J.L. Total Synthesis of (+)-19-Deoxycicetexone, (–)-Icetexone, and (+)-5-Epi-icetexone. *Org. Lett.* **2009**, *11*, 2904–2907. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Cortez, F.; Lapointe, D.; Hamlin, A.M.; Simmons, E.M. Synthetic studies on the icetexones: Enantioselective formal syntheses of icetexone and epi-icetexone. *Tetrahedron* **2013**, *69*, 5665–5676. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Carita, A.; Burtoloso, A.C.B. An epoxide ring-opening approach for a short and stereoselective synthesis of icetexane diterpenoids. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 686–688. [[CrossRef](#)]
19. Thommen, C.; Neuburger, M.; Gademann, K. Collective syntheses of icetexane Natural Products based on biogenetic hypotheses. *Chem. Eur. J.* **2017**, *23*, 120–127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Simmons, E.M.; Sarpong, R. Ga(III)-Catalyzed cycloisomerization strategy for the synthesis of icetexane diterpenoids: Total synthesis of (±)-Salviasperanol. *Org. Lett.* **2006**, *8*, 2883–2886. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Campos-Xolalpa, N.; Alonso-Castro, A.J.; Sánchez-Mendoza, E.; Zavala-Sánchez, M.A.; Pérez-Gutiérrez, S. Cytotoxic activity of the chloroform extract and four diterpenes isolated from *Salvia ballotiflora*. *Braz. J. Pharmacogn.* **2017**, *27*, 302–305. [[CrossRef](#)]
22. Silva-Mares, D.; Torres-Lopez, E.; Rivas-Estilla, A.M.; Cordero-Perez, P.; Waksman-Minsky, N.; Rivas-Galindo, V.M. Plants from northeast Mexico with anti-HSV activity. *Nat. Prod. Commun.* **2013**, *8*, 297–298. [[PubMed](#)]
23. Esquivel, B.; Calderón, J.S.; Flores, E.; Sánchez, A.-A.; Rivera, R.R. Abietane and icetexane diterpenoids from *Salvia ballotaeflora* and *Salvia axillaris*. *Phytochemistry* **1997**, *46*, 531–534. [[CrossRef](#)]
24. Pérez-Gutiérrez, S.; Zaval-Mendoza, D.; Hernández-Munive, A.; Mendoza-Martínez, A.; Pérez-González, C.; Sánchez-Mendoza, E. Antidiarrheal activity of 19-Deoxycicetexone isolated from *Salvia ballotiflora* Benth in mice and rats. *Molecules* **2013**, *18*, 8895–8905. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Cárdenas-Ortega, N.C.; González-Chávez, M.M.; Figueroa-Brito, R.; Flores-Macías, A.; Romo-Asunción, D.; Martínez-González, D.E.; Pérez-Moreno, V.; Ramos-López, M. Composition of the essential oil of *Salvia ballotiflora* (Lamiaceae) and its insecticidal activity. *Molecules* **2015**, *20*, 8048–8059. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. León-Herrera, L.R.; Ramos-López, M.A.; Mondragón-Olguín, V.M.; Romero-Gómez, S.; Campos Guillen, J.; Lucas-Deecke, G. Chloroformic extract of *Salvia ballotiflora*, an alternative for integrated management of corn armyworm *Spodoptera frugiperda* J.E. Smith, 1797 (Lepidoptera: Noctuidae). *Entomol. Mex.* **2016**, *3*, 401–406.
27. Sánchez, C.; Cárdenas, J.; Rodríguez-Hahn, A.; Ramamoorthy, T.P. Abietane diterpenoids of *Salvia anastomosans*. *Phytochemistry* **1989**, *28*, 1681–1684. [[CrossRef](#)]
28. Cárdenas, J.; Rodríguez-Hahn, L. Abietane and icetexane diterpenoids from *Salvia candicans*. *Phytochemistry* **1995**, *38*, 199–204. [[CrossRef](#)]
29. Hernández, M.; Esquivel, B.; Cárdenas, J.; Rodríguez-Hahn, L.; Ramamoorthy, T.P. Diterpenoid abietane quinones isolated from *Salvia regla*. *Phytochemistry* **1987**, *26*, 3297–3299. [[CrossRef](#)]
30. Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; et al. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, *83*, 757–766. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Carlson, R.P.; O'Neill-Davis, L.; Chang, J.; Lewis, A.J. Modulation of mouse ear edema by cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors and other pharmacologic agents. *Agent Actions* **1985**, *17*, 197–204. [[CrossRef](#)]
32. Mellors, A.; Tappel, A.L. The inhibition of mitochondrial peroxidation by ubiquinone and ubiquinol. *J. Biol. Chem.* **1966**, *241*, 4353–4356. [[PubMed](#)]
33. Esquivel, B.; Calderon, J.S.; Flores, E.; Chavez, C.; Juarez, M. Abietane and icetexane diterpenoids from *Salvia pubescens*. *Nat. Prod. Lett.* **1997**, *10*, 87–93. [[CrossRef](#)]
34. Esquivel, B.; Burgueño-Tapia, E.; Bustos-Brito, C.; Pérez-Hernández, N.; Quijano, L.; Joseph-Nathan, P. Absolute configuration of the diterpenoids icetexone and conacytone from *Salvia ballotaeflora*. *Chirality* **2017**, under review.
35. Jones, R.N.; Angell, C.L.; Ito, T.; Smith, R.J.D. The carbonyl stretching bands in the infrared spectra of unsaturated lactones. *Can. J. Chem.* **1959**, *37*, 2007–2022. [[CrossRef](#)]
36. Joseph-Nathan, P.; Gordillo-Román, B. Vibrational circular dichroism absolute configuration determination of natural products. In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*; Kinghorn, A.D., Falk, H., Kobayashi, J., Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2015; Volume 100, pp. 311–451, ISBN 978-3-319-05275-5.
37. Tapia, E.; Joseph-Nathan, P. Vibrational circular dichroism: Recent advances for the assignment of the absolute configuration of natural products. *Nat. Prod. Commun.* **2015**, *10*, 1785–1795.


38. Debie, E.; De Gussem, E.; Dukor, R.K.; Herrebout, W.; Nafie, L.A.; Bultinck, P. A confidence level algorithm for the determination of absolute configuration using vibrational circular dichroism or Raman optical activity. *ChemPhysChem* **2011**, *12*, 1542–1549. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Hueso-Rodríguez, J.A.; Jimeno, M.L.; Rodríguez, B.; Savona, G.; Bruno, M. Abietane diterpenoids from the root of *Salvia phlomoides*. *Phytochemistry* **1983**, *22*, 2005–2009. [[CrossRef](#)]
40. Horvath, T.; Linden, A.; Yoshizaki, F.; Eugster, C.H.; Rüedi, P. Abietanes and a Novel 20-Norabietanoid from *Plectranthus cyaneus*. *Helv. Chim. Acta* **2004**, *87*, 2346–2353. [[CrossRef](#)]
41. Dolomanov, O.; Bourhis, L.J.; Gildea, R.J.; Howard, J.A.K.; Puschmann, H. OLEX2: A complete structure solution, refinement and analysis program. *J. Appl. Crystallogr.* **2009**, *42*, 339–341. [[CrossRef](#)]
42. Parsons, S.; Flack, H.D.; Wagner, T. Use of intensity quotients and differences in absolute structure refinement. *Acta Crystallogr.* **2013**, *B69*, 249–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Hooft, R.W.W.; Straver, L.H.; Spek, A.L. Using the t-distribution to improve the absolute structure assignment with likelihood calculations. *J. Appl. Crystallogr.* **2010**, *43*, 665–668. [[CrossRef](#)]
44. Hooft, R.W.W.; Straver, L.H.; Spek, A.L. Determination of absolute structure using Bayesian statistics on Bijvoet differences. *J. Appl. Crystallogr.* **2008**, *41*, 96–103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Jens, A.A.; Walker, J.B.; Kim, S.-C. Phylogeny of new world *Salvia* subgenus Calosphace (Lamiaceae) based on cpDNA (psb A-trn H) and nrDNA (ITS) sequence data. *J. Plant Res.* **2013**, *123*, 483–496. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Akaberi, M.; Mehri, S.; Iranshahi, M. Multiple pro-apoptotic targets of abietane diterpenoids from *Salvia* species. *Fitoterapia* **2015**, *100*, 118–132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Guerrero, I.C.; Andrés, L.S.; León, L.G.; Machín, R.P.; Padrón, J.M.; Luis, J.G.; Delgadillo, J. Abietane diterpenoids from *Salvia pachyphylla* and *S. cleveandii* with cytotoxic activity against human cancer cell lines. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 1803–1805. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Suresh, G.; Suresh Babu, K.; Rama Subba Rao, V.; Suri Appa Rao, M.; Lakshma Nayak, V.; Ramakrishna, S. Novel cytotoxic icetexane diterpenes from *Premna latifolia* Roxb. *Tetrahedron Lett.* **2011**, *52*, 1273–1276. [[CrossRef](#)]
49. Naidu, V.G.M.; Hymavathi, A.; Suresh Babu, K.; Bhavana, D.; Anudeep, K.; Chenna, K.R.S.; Madhusudana, K.; Vishnu, V.M.V.P.S.; Prasad, K.; Madhusudana, R.J.; et al. Antioxidant, hepatoprotective and cytotoxic effects of icetexanes isolated from stem-bark of *Premna tomentosa*. *Phytomedicine* **2014**, *21*, 497–505. [[CrossRef](#)]
50. Hui-Ling, C.; Kai-Wei, L.; Kim-Hong, G.; Jih-Pyang, W.; Shen-Jeu, W.; Chun-Nan, L. New diterpenoids and cytotoxic and anti-inflammatory diterpenoids from *Amentotaxus formosana*. *Fitoterapia* **2011**, *82*, 219–224. [[CrossRef](#)]
51. Badisa, R.B.; Mina, D.A.; Latinwo, L.M.; Soliman, K.F.A. Selective Anticancer Activity of Neurotoxin 1-Methyl-4-Phenylpyridinium on Non-Small Cell Lung Adenocarcinoma A549 Cells. *Anticancer Res.* **2014**, *34*, 5447–5452. [[PubMed](#)]
52. Gonzalez, M.A. Aromatic abietane diterpenoids: Their biological activity and synthesis. *Nat. Prod. Rep.* **2015**, *32*, 684–704. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Salae, A.-W.; Rodjun, A.; Karalai, C.; Ponglimanont, C.; Chantrapromma, S.; Kanjana-Opas, A.; Tewtrakul, S.; Fun, H.-K. Potential anti-inflammatory diterpenes from *Premna obtusifolia*. *Tetrahedron* **2012**, *68*, 819–829. [[CrossRef](#)]
54. Escuder, B.; Torres, R.; Lissi, E.; Labbé, C.; Faine, F. Antioxidant capacity of abietanes from *Sphacele Salviae*. *Nat. Prod. Lett.* **2002**, *16*, 277–281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Saijo, H.; Kofujita, H.; Takahashi, K.; Ashitani, T. Antioxidant activity and mechanism of the abietane-type diterpene ferrugiol. *Nat. Prod. Res.* **2015**, *29*, 1739–1743. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Martínez-Gordillo, M.; Fragoso-Martínez, I.; García-Peña, M.R.; Montiel, O. Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo. *Rev. Mex. Biodivers.* **2013**, *84*, 30–86. [[CrossRef](#)]
57. Domínguez, X.A.; González, H. Extractives from *Salvia bellotaeflora*. *Phytochemistry* **1972**, *11*, 2641. [[CrossRef](#)]

Sample Availability: Conacytone (**10**) is available from the authors.



© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Absolute configuration of the diterpenoids icetexone and conacytone from *Salvia ballotaeflora*

Baldomero Esquivel¹ | Eleuterio Burgueño-Tapia² | Celia Bustos-Brito¹ |
Nury Pérez-Hernández³ | Leovigildo Quijano¹ | Pedro Joseph-Nathan⁴ 

¹Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Mexico City, Mexico

²Departamento de Química Orgánica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, Mexico

³Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía, Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, Mexico

⁴Departamento de Química, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Mexico City, Mexico

Correspondence

Pedro Joseph-Nathan, Departamento de Química, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Apartado 14-740, Mexico City 07000, Mexico.
Email: pjoseph@nathan.cinvestav.mx

Abstract

Detailed literature inspections regarding the diterpenoids icetexone (**1**) and conacytone (**3**) reveal that the absolute configuration (AC) of these natural occurring compounds is not rigorously proven, despite they were originally isolated in 1976. This task is now completed by single-crystal X-ray diffraction Flack and Hooft parameters determination after processing data collected with Cu $K\alpha$ graphite monochromated radiation. The AC of both compounds is further determined by vibrational circular dichroism measurements performed on icetexone acetate (**2**) and conacytone triacetate (**4**) since the solubility of **1** and **3** is limited. Comparison of the substituent chemical shifts (SCS) induced by acetylation of **1** and **3** to afford **2** and **4**, respectively, reveals that in the case of icetexone, all six SCS values of the quinone ring are in excellent agreement with the expected values, while in the case of conacytone, three agree and three do not agree due to the presence of additional acetates near the quinone ring. Density functional theory calculations performed on 3-hydroxythymoquinone (**6**) and its tautomer 4-hydroxy-1,2-quinone **7**, on 6-hydroxythymoquinone (**8**) and its tautomer *ortho*-quinone **9**, and on icetexone (**1**) and the claimed natural occurring *ortho*-quinone tautomer romulogarzone (**5**) indicate that 2-hydroxy-1,4-quinones are more stable, by some 11–14 kcal/mol, than their 4-hydroxy-1,2-quinone tautomers, and therefore, romulogarzone (**5**) is inexistent.

KEYWORDS

absolute configuration, Flack parameters, Hooft parameters, hydroxy-*p*-benzoquinones, single-crystal X-ray diffraction, substituent chemical shift parameters, vibrational circular dichroism

1 | INTRODUCTION

Common triterpenoids and sitosterol,¹ as well as icetexone (**1**) and conacytone (**3**), were isolated² from *Salvia ballotaeflora* over 40 years ago. They took their names in recognition to ICETEX, a Colombian student-ship agency,¹ and to CONACYT, the National Science and Technology Council of Mexico, respectively. The

structure and relative stereochemistry of **1** followed from single-crystal X-ray diffraction analyses, whose data³ allowed to refine the structure to $R = 3.7\%$. Another paper⁴ further describes a third compound, romulogarzone, which is postulated as the *ortho*-quinone **5** without rigorous structure proof either by X-ray analysis or by chemical correlation of **1** and **5** through a common leucotriacetate derivative, if as a prerequisite **1**

and **5** would show depression in a mixed melting point determination. The structure of **3** also followed⁵ from X-ray data, while for **5**, no further isolation report is available since then. Ictetexone (**1**)²⁻⁴ appeared also in *Salvia anastomosans*,⁶ *Salvia candicans*,⁷ and *Salvia pubescens*.⁸

An approach to the absolute configuration of icetexone (**1**) followed from an asymmetric total synthesis.⁹ The structure was verified by single-crystal X-ray diffraction analysis for which the unit cell parameters agree with those published³ in 1976, thereby establishing the identity of **1** from both natural and synthetic origins, although the original X-ray paper³ seems to be overlooked for such a comparison.⁹ It is clear from the asymmetric synthesis that icetexone is properly represented as shown in **1**, but it might be inferred that the natural occurring diterpenoid would be the enantiomer since for synthetic **1** $[\alpha]_{\text{D}} -70$, in chloroform, is reported,⁹ while for the natural sample $[\alpha]_{\text{D}} +33.3$, also in chloroform, is given.^{2,4}

In another paper¹⁰ on the enantioselective formal synthesis of icetexone, the authors indicate that “X-ray crystallographic analysis enabled a determination of the absolute configuration of **1**” in the 1976 X-ray paper.³ This affirmation is incorrect since at those times, the only way to determine an absolute configuration by single-crystal X-ray diffraction (XRD) analysis was by anomalous dispersion caused by the presence of a heavy atom, like a bromine atom, in the studied molecule.

In turn, conacytone (**3**) was also isolated from *S pubescens*,¹¹ *S anastomosans*,⁶ *S candicans*,⁷ and from another collection of *S ballotaeflora*.¹²

In summary, the absolute configuration of natural occurring icetexone (**1**) and conacytone (**3**) is not rigorously proven, and their NMR data remain to be assigned. Therefore, in the present paper, we describe a full account regarding the three terpenoids **1**, **3**, and **5** originally reported²⁻⁵ in 1976.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | General

Melting points were determined on a Fisher-Jhons apparatus and are uncorrected. Optical rotations were measured on a Perkin-Elmer (Boston, MA) 341 polarimeter. Nuclear magnetic resonance (NMR) measurements were performed on Varian (Palo Alto, CA) Mercury 300 spectrometers. Chemical shifts were referred to tetramethylsilane (TMS). Infrared (IR) and vibrational circular dichroism (VCD) spectra were measured using a BioTools (Jupiter, FL) dual PEM ChiralIR FT-VCD spectrophotometer. Single-crystal X-ray diffraction

measurements (XRD) were performed on an Agilent (Santa Clara, CA) Xcalibur Atlas Gemini diffractometer.

2.2 | Compounds

Samples of icetexone (**1**) and conacytone (**3**) were available from previous studies,^{8,12} while icetexone acetate (**2**) and conacytone triacetate (**4**) were obtained by acetylation of the natural products using standard reaction conditions.

2.2.1 | Ictetexone (1)

Orange-red prisms, mp 260-264 °C dec. $[\alpha]_{589} -94.1$, $[\alpha]_{578} -95.0$ (*c* 0.56, CHCl₃). ¹H NMR δ 7.11 (1H, s, OH), 6.86 (1H, dd, *J* = 12.3, 2.0 Hz, H-7), 6.43 (1H, dd, *J* = 12.3, 5.0 Hz, H-6), 3.22 (1H, hept, *J* = 7.0 Hz, H-15), 3.16 (1H, d, *J* = 13.9 Hz, H-20), 2.79 (1H, d, *J* = 13.9 Hz, H-20'), 2.55 (1H, dd, *J* = 5.0, 2.0 Hz, H-5), 2.01 (1H, m, H-1), 1.81 (3H, m, H-1', H-2, H-2'), 1.77 (1H, m, H-3), 1.62 (1H, m, H-3'), 1.26 (3H, s, H-18), 1.24 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H-17), 1.23 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H-16). ¹³C NMR δ 185.6 (C-14), 182.8 (C-11), 178.8 (C-19), 150.8 (C-12), 140.5 (C-8), 138.7 (C-6), 133.6 (C-9), 125.4 (C-7), 125.1 (C-13), 92.3 (C-10), 57.7 (C-5), 47.7 (C-4), 35.9 (C-3), 35.6 (C-1), 32.7 (C-20), 24.4 (C-15), 19.9 (C-16), 19.8 (C-17), 19.5 (C-2), 18.2 (C-18).

2.2.2 | Ictetexone acetate (2)

Yellow needles, mp 159-162 °C. $[\alpha]_{589} -211.3$, $[\alpha]_{578} -222.5$, $[\alpha]_{546} -255.5$ (*c* 0.53, CHCl₃). ¹H NMR δ 6.78 (1H, dd, *J* = 12.1, 2.2 Hz, H-7), 6.47 (1H, dd, *J* = 12.1, 4.7 Hz, H-6), 3.17 (1H, hept, *J* = 7.0 Hz, H-15), 2.97 (1H, d, *J* = 13.6 Hz, H-20), 2.91 (1H, d, *J* = 13.6 Hz, H-20'), 2.48 (1H, dd, *J* = 4.7, 2.2 Hz, H-5), 2.36 (3H, s, Ac), 1.96 (1H, m, H-1), 1.78 (2H, m, H-2, H-2'), 1.77 (2H, m, H-1', H-3), 1.58 (1H, m, H-3'), 1.27 (3H, s, H-18), 1.24 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H-17), 1.22 (3H, d, *J* = 7.0 Hz, H-16). ¹³C NMR δ 185.4 (C-14), 179.2 (C-11), 178.7 (C-19), 168.2 (Ac C=O), 148.9 (C-12), 140.5 (C-13), 139.9 (C-8), 138.3 (C-6), 137.0 (C-9), 125.4 (C-7), 94.5 (C-10), 56.9 (C-5), 47.3 (C-4), 35.9 (C-3), 34.9 (C-1), 33.3 (C-20), 25.5 (C-15), 20.4 (Ac Me), 20.4 (C-16), 20.3 (C-17), 19.4 (C-2), 17.9 (C-18).

2.2.3 | Conacytone (3)

Yellow prisms, mp 217-219 °C dec. $[\alpha]_{589} -37.0$, $[\alpha]_{578} -52.3$, $[\alpha]_{546} -124.4$ (*c* 1.0, CHCl₃). ¹H NMR see Table 1. ¹³C NMR δ 188.8 (C-14), 183.9 (C-11), 151.0 (C-12), 145.1 (C-8), 142.5 (C-9), 124.7 (C-13), 95.3 (C-20), 66.2 (C-19), 62.2 (C-7), 41.6 (C-10), 40.0 (C-5), 39.9 (C-3), 34.9

TABLE 1 Accurate ^1H NMR data of conacytone (**2**) obtained from very high-resolution 300 MHz measurements and PERCH iterations

Atom	^1H	Mult	J
1 α	1.312	ddd	$^2J_{1\alpha,1\beta} = -13.11$, $^3J_{1\alpha,2\alpha} = 6.10$, $^3J_{1\alpha,2\beta} = 13.72$
1 β	2.558	ddd	$^2J_{1\alpha,1\beta} = -13.11$, $^3J_{1\beta,2\alpha} = 1.29$, $^3J_{1\beta,2\beta} = 5.89$
2 α	1.599	dddd	$^3J_{1\alpha,2\alpha} = 6.10$, $^3J_{1\beta,2\alpha} = 1.29$, $^2J_{2\alpha,2\beta} = -13.52$, $^3J_{2\alpha,3\alpha} = 6.85$, $^3J_{2\alpha,3\beta} = 0.73$
2 β	2.432	dddd	$^3J_{1\alpha,2\beta} = 13.72$, $^3J_{1\beta,2\beta} = 5.89$, $^2J_{2\alpha,2\beta} = -13.52$, $^3J_{2\beta,3\alpha} = 13.68$, $^3J_{2\beta,3\beta} = 6.28$
3 α	1.469	dddd	$^3J_{2\alpha,3\alpha} = 6.85$, $^3J_{2\beta,3\alpha} = 13.68$, $^2J_{3\alpha,3\beta} = -13.12$, $^4J_{3\alpha,19R} = 2.66$
3 β	1.754	dddd	$^3J_{2\alpha,3\beta} = 0.73$, $^3J_{2\beta,3\beta} = 6.28$, $^2J_{3\alpha,3\beta} = -13.12$
5	1.725	ddd	$^3J_{5,6\alpha} = 2.96$, $^3J_{5,6\beta} = 14.19$, $^4J_{5,19S} = 1.43$
6 α	1.880	ddd	$^3J_{5,6\alpha} = 2.96$, $^2J_{6\alpha,6\beta} = -13.65$, $^3J_{6\alpha,7} = 1.64$
6 β	2.300	ddd	$^3J_{5,6\beta} = 14.19$, $^2J_{6\alpha,6\beta} = -13.65$, $^3J_{6\beta,7} = 4.59$
7	4.836	ddd	$^3J_{6\alpha,7} = 1.64$, $^3J_{6\beta,7} = 4.59$, $^3J_{7,\text{OH}} = 2.54$
OH-7	2.220	d	$^3J_{7,\text{OH}} = 2.54$
OH-12	7.190	s	-
15	3.192	qq	$^3J_{15,16} = 7.08$, $^3J_{15,17} = 7.08$
16	1.240	d	$^3J_{15,16} = 7.08$
17	1.235	d	$^3J_{15,17} = 7.08$
18	0.826	s	-
19R	3.877	dd	$^4J_{3\alpha,19R} = 2.66$, $^2J_{19R,19S} = -11.24$
19S	3.349	dd	$^4J_{5,19S} = 1.43$, $^2J_{19R,19S} = -11.24$,
20	5.601	d	$^3J_{20,\text{OH}} = 2.05$
OH-20	2.858	d	$^3J_{20,\text{OH}} = 2.05$

(C-1), 32.5 (C-4), 26.2 (C-6), 24.1 (C-15), 23.6 (C-18), 21.1 (C-2), 19.9 (C-16), 19.8 (C-17).

2.2.4 | Conacytone triacetate (**4**)

Oil. $[\alpha]_{589} +59.4$, $[\alpha]_{578} +59.3$, $[\alpha]_{546} +53.2$, (c 0.91, CHCl_3). ^1H NMR δ 6.58 (1H, s, H-20), 6.09 (1H, dd, $J = 4.3$, 1.9 Hz, H-7), 3.68 (1H, dd, $J = 11.3$, 2.5 Hz, H-19), 3.45 (1H, dd, $J = 11.3$, 1.3 Hz, H-19'), 3.13 (1H, hept, $J = 7.1$ Hz, H-15), 2.55 (1H, br-dd, $J = 13.0$, 6.1 Hz, H-1), 2.43 (1H, qd, $J = 13.0$, 6.3 Hz, H-2), 2.33 (3H, s, Ac-12), 2.24 (1H, td, $J = 14.4$, 4.3 Hz, H-6), 2.07 (3H, s, Ac-7). 1.93 (1H, ddd, $J = 14.4$, 2.8, 1.9 Hz, H-6'), 1.89 (3H, s, Ac-20), 1.78 (1H, br-ddd, $J = 13.2$, 6.1, 1.3 Hz, H-3), 1.65 (1H, dd, 14.4, 2.8, H-5), 1.63 (1H, m, H-2'), 1.46 (1H, tdd, $J = 13.2$, 6.3, 2.5 Hz, H-3), 1.43 (1H, td, $J = 13.1$, 6.0 Hz, H-1'), 1.21 (3H, $J = 7.1$, H-16), 1.20 (3H, $J = 7.1$, H-16), 0.78 (3H, s, H-18). ^{13}C NMR δ 185.1 (C-14), 180.2 (C-11), 169.6 (Ac 7 C=O), 168.9 (Ac 20 C=O), 168.2 (Ac 12 C=O), 149.2 (C-12), 146.5 (C-8), 139.9 (C-9), 139.8 (C-13), 94.3 (C-20), 67.3 (C-19), 62.8 (C-7), 41.2 (C-10), 40.4 (C-5), 39.9 (C-3), 34.8 (C-1), 32.2 (C-4), 25.2 (C-15), 25.1 (C-6), 23.5 (C-18), 21.1 (2C, Ac 7 and 20 Me), 20.9 (C-2), 20.4 (Ac 12 Me) 20.3 (C-16), 20.2 (C-17).

2.3 | Single-crystal X-ray diffraction analysis

Crystals of icetexone (**1**) and conacytone (**3**) were mounted on glass fibers for data collection using Cu $K\alpha$ graphite monochromated radiation ($\lambda = 1.54184 \text{ \AA}$) at 293(2) K in the $\omega/2\theta$ scan mode. In the case of **1**, an orange-red crystal measuring $0.15 \times 0.10 \times 0.08 \text{ mm}$, $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_5$, $M = 342.38$ turned out to be orthorhombic, space group $P2_12_12_1$, $a = 7.7453(3) \text{ \AA}$, $b = 10.3664(3) \text{ \AA}$, $c = 21.0064(7) \text{ \AA}$, $V = 1686.6(1) \text{ \AA}^3$, $Z = 4$, $\rho = 1.348 \text{ mg/mm}^3$, $\mu = 0.790 \text{ mm}^{-1}$, total reflections 17 373, unique reflections 2904 ($R_{\text{int}} 0.044$), observed reflections 2436. In the case of **3**, a yellow crystal measuring $0.41 \times 0.37 \times 0.51 \text{ mm}$, $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{O}_6$, $M = 362.41$ also turned out to be orthorhombic, space group $P2_12_12_1$, $a = 10.956(1) \text{ \AA}$, $b = 12.635(1) \text{ \AA}$, $c = 13.602(2) \text{ \AA}$, $V = 1882.9(4) \text{ \AA}^3$, $Z = 4$, $\rho = 1.278 \text{ mg/mm}^3$, $\mu = 0.773 \text{ mm}^{-1}$, total reflections 13 780, unique reflections 3208 ($R_{\text{int}} 0.038$), observed reflections 2599. Either structure was solved by direct methods using the SHELXS-97 program included in the WinGX v1.70.01 crystallographic software package.¹³ For the structural refinement, the non-hydrogen atoms were treated anisotropically, and the hydrogen atoms, included in the structure factor calculations, were refined isotropically. The final R indices for **1** were $[I > 2\sigma(I)]$

$R_1 = 3.3\%$ and $wR_2 = 6.8\%$, largest difference peak and hole, 0.129 and $-0.110 \text{ e.}\text{\AA}^3$, and those for **3** were $[I > 2\sigma(I)] R_1 = 3.4\%$ and $wR_2 = 7.0\%$, largest difference peak and hole, 0.131 and $-0.116 \text{ e.}\text{\AA}^3$. The Olex2 v1.1.5 software¹⁴ allowed calculating the Flack¹⁵ (x) and Hooft (y) parameters.^{16,17} In the case of **1**, these parameters were $x = 0.04(19)$ and $y = 0.12(9)$, which for the inverted structure were $x = 0.95(19)$ and $y = 0.88(9)$, while for **3**, they were $x = 0.00(18)$ and $y = 0.05(9)$, which again for the inverted structure were $x = 0.99(18)$ and $y = 0.94(9)$. Crystallographic data (excluding structure factors) have been deposited at the Cambridge Crystallographic Data Centre, from where copies of the data can be obtained free of charge on application to the CCDC, Cambridge, UK. The CCDC deposition numbers are 1562319 and 1562343 for **1** and **3**, respectively, and PLUTO representations of both X-ray structures are shown in Figure 1.

2.4 | VCD measurements

Samples of 3.4 mg of **2** and 5.5 mg of **4** dissolved in $100 \mu\text{l}$ of 100% atom-D CDCl_3 were placed in a cell with BaF_2 windows and a path length of 0.1 mm for data acquisition at a resolution of 4 cm^{-1} over 5 h . A baseline correction was performed by subtracting the spectrum of the solvent acquired under identical conditions. The samples stability

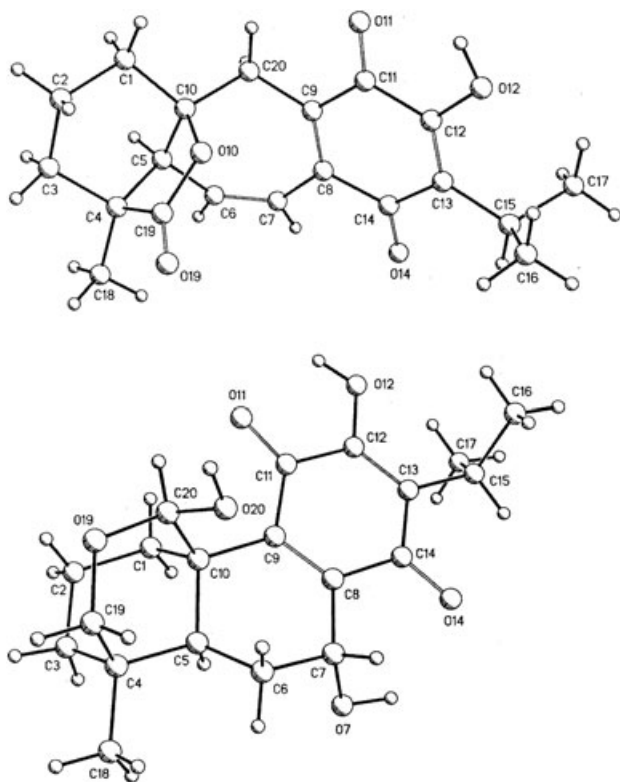


FIGURE 1 PLUTO X-ray structure plots of icetexone (**1**, top) and conacytone (**3**, bottom)

was monitored in either case by ^1H NMR analysis immediately before and after the VCD measurements.

2.5 | Computational methods

The molecular models of **2** and **4** were built with the Spartan 08 (Wavefunction, Inc, Irvine, CA) software, and their initial conformational searches were carried out using the Monte Carlo protocol and molecular mechanic force field (MMFF94) calculations in an energy windows of 10 kcal/mol . In the case of **2**, starting from B-ring bowl- and dome-shaped conformers, this procedure provided four structures in each case, while for **4**, it gave 12 conformers in a 6.92 kcal/mol energy gap. Single-point DFT calculations of all conformers were done using the B3LYP functional and the 6-31G(d) basis set implemented in the same software package, which retained the eight conformers for **2** in a 2.70 kcal/mol energy range and provided six conformers for **4** in a 1.82 kcal/mol interval, the next conformer being 4.18 kcal/mol over the global minimum. Further conformational optimizations were performed using the Gaussian 03 (Gaussian, Inc, Wallingford, CT) software to provide the thermochemical parameters summarized in Table 2. For calculating final vibrational normal modes and rotational strengths, using DFT at the B3LYP/DGDZVP level of theory, the value of ΔG was estimated for each conformer and used as a criterion for weighting the IR and VCD spectra for **2** and **4**. Finally, eight conformers for **2** and four for **4** were found within 0.75 and 1.16 kcal/mol energy gaps, respectively. The band shapes were generated with Lorentzian functions and a bandwidth of 6 cm^{-1} . Calculated and experimental spectra were compared using the CompareVOA (BioTools, Jupiter, FL) software,¹⁸ the pertinent parameters being shown in Table 3. The final graphical comparison of experimental and calculated IR and VCD spectra, shown in Figures 2 and 3 for **2** and **4**, respectively, was prepared using eight and four conformers. The four minimum energy conformers for icetexone acetate (**2**) and conacytone triacetate (**4**) are shown in Figure 4.

For the tautomers equilibria calculations of **1** versus **5**, of **6** versus **7**, and of **8** versus **9**, the molecular models were also constructed in the Spartan 08 suite, followed by Monte Carlo MMFF94 calculations, to provide two relevant conformers for the *para*-quinones **1**, **6**, and **8**, while for the *ortho*-quinones **5**, **7**, and **9**, four conformers were provided. In all cases, single-point calculations using DFT at the B3LYP/DGDZVP level of theory were performed using the Spartan 08 software, followed by further conformational optimization using the Gaussian 03 software to provide the thermochemical parameters given in Table 4. In order to calculate vibrational normal modes, DFT calculations at the same level of theory provided

TABLE 2 Thermochemical parameters for quinones **2** and **4**

Compound	$\Delta E_{\text{MMFF}}^{\text{a}}$	% ^b	$\Delta E_{6-31\text{G(d)}}^{\text{c}}$	% ^b	$\Delta E_{\text{DGDZVP}}^{\text{d}}$	% ^b	$\Delta G_{\text{DGDZVP}}^{\text{e}}$	% ^f
2a	0.00	49.1	0.00	69.3	0.00	36.5	0.00	30.1
2b	0.66	16.1	1.06	11.6	0.56	14.2	0.38	16.0
2c	0.97	9.6	1.29	7.9	0.47	16.5	0.40	15.4
2d	0.79	12.9	1.62	4.5	0.75	10.2	0.61	10.7
2e	1.38	4.8	2.70	0.7	1.26	4.4	0.75	8.4
2f	1.67	2.9	2.35	1.3	0.94	7.5	0.82	7.6
2g	1.56	3.5	1.65	4.2	0.92	7.7	0.88	6.8
2h	2.18	1.1	2.94	0.5	1.48	3.0	1.06	5.0
4a	0.00	77.7	0.10	31.7	0.00	47.8	0.00	45.9
4b	0.86	18.2	1.10	5.9	0.21	33.6	0.11	38.1
4c	2.01	2.6	1.52	2.9	-	-	-	-
4d	2.88	0.7	0.00	37.5	0.93	10.0	0.93	9.6
4e	2.89	0.6	1.82	1.7	1.01	8.6	1.16	6.4
4f	3.66	0.2	1.37	20.3	-	-	-	-

^aRelative to **2a** (67.25 kcal/mol) and **4a** (26.7 kcal/mol).

^bCalculated using $\Delta E \cong -RT \ln K$.

^cRelative to **2a** (-818 355.28 kcal/mol) and **4d** (-1 058 648.06 kcal/mol).

^dRelative to **2a** (-818 457.32 kcal/mol) and **4a** (-1 058 788.93 kcal/mol).

^eRelative to **2a** (-818 225.61 kcal/mol) and **4a** (-1 058 485.16 kcal/mol).

^fCalculated using $\Delta G = -RT \ln K$.

TABLE 3 Confidence level data for the IR and VCD spectra comparison of **2** and **4**

Compound	anH^{a}	S_{IR}^{b}	S_{E}^{c}	S_{-E}^{d}	ESI^{e}	C^{f}
2	0.984	98.1	76.8	14.8	62.0	100
4	0.989	86.7	71.3	16.8	54.5	100

^aAnharmonicity factor.

^bIR spectral similarity in percentage.

^cVCD spectral similarity for the correct enantiomer in percentage.

^dVCD spectral similarity for the opposite enantiomer in percentage.

^eEnantiomer similarity index, calculated as the $S_{\text{E}} - S_{-E}$ difference.

^fConfidence level for the absolute configuration determination in percentage.

the free energy values that allowed comparing the tautomer pairs **1/5**, **6/7**, and **8/9**.

3 | RESULTS AND DISCUSSION

The reported ambiguities for solid icetexone (**1**), as orange-red crystals,³ as orange crystals,² or as yellow crystals,⁴ opened the possibility that **1** might show polymorphs, as we recently found for an isoflavone.¹⁹ Thus, careful evaluation of the behavior of **1** revealed that slow crystallization from chloroform, or from chloroform-acetone solutions, provided orange-red prisms, while fast

evaporation of these solutions provided orange powder. In neither case, after many other manipulation trials, could we obtain yellow crystals of **1**. Another point in need of clarification is the mp behavior of **1**, which in the 1976 papers^{2,4} is reported as 226-227 °C, while in the asymmetric synthesis paper,⁹ it is reported as 247-253 °C. In our hands, orange-red prisms of **1**, upon heating to around 230 °C, show a solid state transition to an orange solid which at around 257 °C start to darken and melt at 260-264 °C to leave a dark brown liquid. In turn, the reported optical activity data of **1** are also confusing, since the original 1976 paper² states $[\alpha]_{\text{D}} +33.3$ (*c* 1.0, CHCl₃), while the asymmetric synthesis paper indicates $[\alpha]_{\text{D}} -70$ (*c* 0.65, CHCl₃), thereby opening the possibility that the synthesized sample of icetexone would be the enantiomer of the natural product. In our hands, the optical activity value of natural **1** was $[\alpha]_{\text{D}} -94.1$ (*c* 0.56, CHCl₃). In the case of icetexone acetate (**2**), the original paper⁴ provides no optical activity data and indicates mp 248-250 °C, which seems quite peculiar since for natural product **1**, it indicates mp 226-227 °C. In our hands, acetate **2** showed mp 159-162 °C and a strong $[\alpha]_{589}$ value of -211.3.

Since crystals of icetexone (**1**) have been diffracted twice,^{3,9} a secure way to know that the absolute configuration of this diterpenoid was by determining the crystal structure again, but this time using graphite

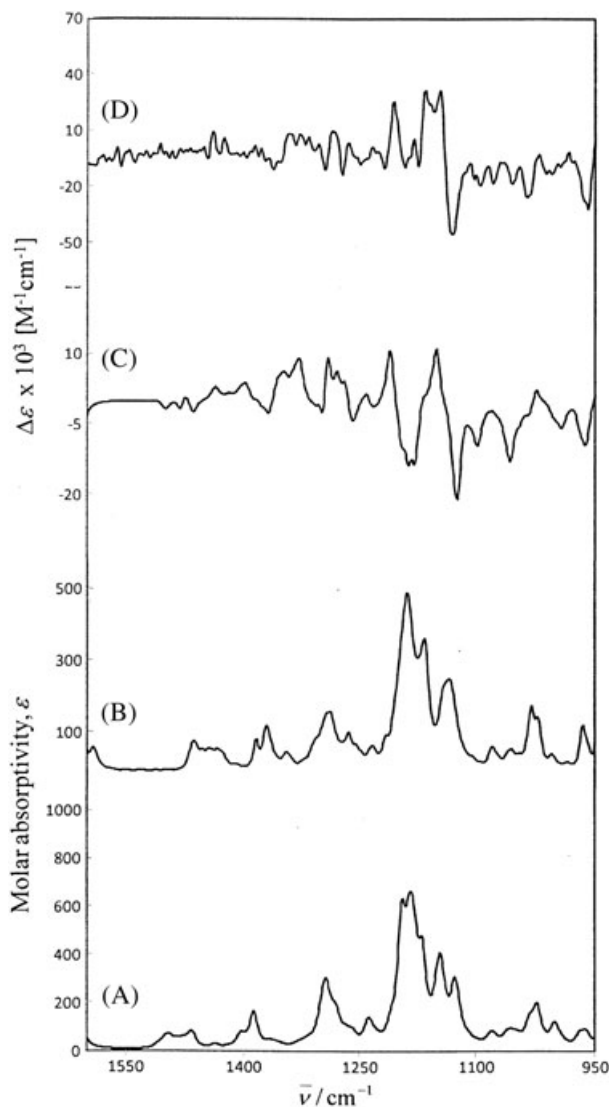


FIGURE 2 Comparison of the experimental (B) IR and (D) VCD spectra of icetexone acetate (**2**) with the DFT B3LYP/DGDZVP calculated (A) IR and (C) VCD spectra for (4*S*,5*S*,10*S*)-**2**

monochromated Cu $K\alpha$ radiation which allows to calculate Flack and Hooft parameters, thereby providing conclusive absolute configuration evidence. Thus, a crystal of **1** was diffracted giving cell parameters in agreement with those reported.^{3,9} The molecular structure could nicely be refined to $R = 3.3\%$, and the Flack¹⁵ $x = 0.04(19)$ and Hooft^{16,17} $y = 0.12(9)$ parameters gave the absolute configuration depicted in **1**. A PLUTO representation of the molecule is given in Figure 1, and as a complementary absolute configuration X-ray test, the Flack and Hooft parameters for the enantiomer were $x = 0.95(19)$ and $y = 0.88(9)$.

In the case of conacytone (**3**), there is also a mp inconsistency in the 1976 papers, since in one case,² mp = 240 °C is reported, while in another case,⁴ the range 210–212 is given. Our measurements indicate that it shows

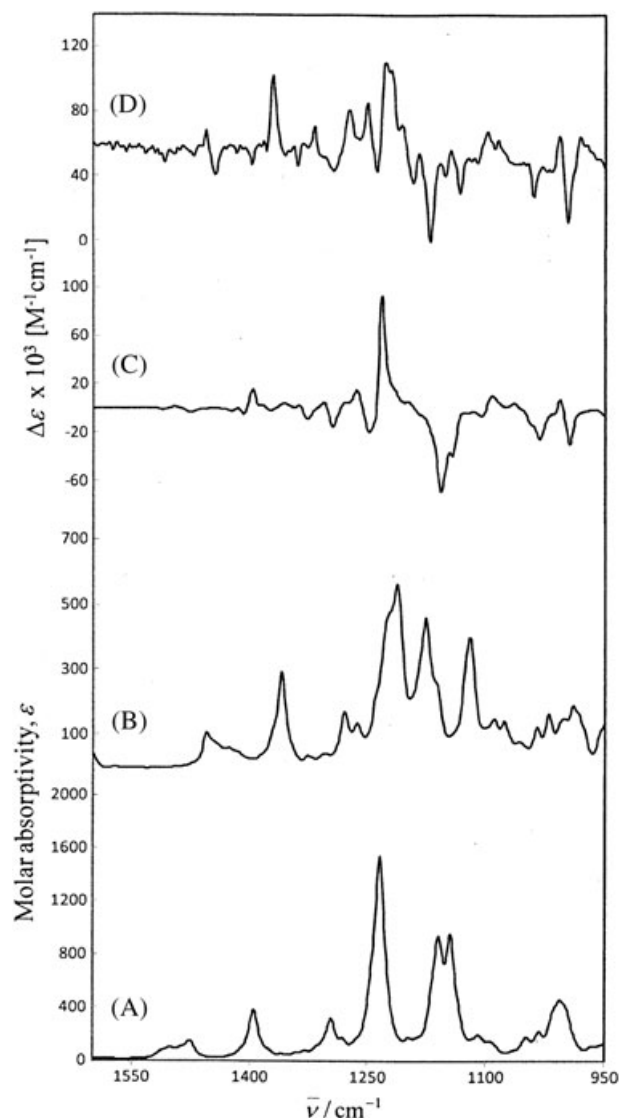


FIGURE 3 Comparison of the experimental (B) IR and (D) VCD spectra of conacytone triacetate (**4**) with the DFT B3LYP/DGDZVP calculated (A) IR and (C) VCD spectra for (4*S*,5*S*,7*R*,10*R*,20*S*)-**4**

mp 217–219 °C. Compound **3** is a less studied molecule, for which, in addition to the original 1976 papers,^{2,4,5} only isolation reports are available in the literature.^{6,7,11,12} An X-ray diffracted crystal also provided cell parameters in agreement with those reported,⁵ the solid state structure was refined to $R = 3.4\%$, and the Flack $x = 0.00(18)$ and Hooft $y = 0.05(9)$ parameters for the correct enantiomer, whose PLUTO plot is shown in Figure 1, provided the absolute configuration. Complementary to the absolute configuration determination, the parameters for the inverted structure were $x = 0.99(18)$ and $y = 0.94(9)$.

In order to gain independent evidence for the absolute configuration of icetexone (**1**) and conacytone (**3**), we selected vibrational circular dichroism (VCD) as the methodology of choice, which has been used extensively for the study of diterpenoids.^{20,21} For this purpose, there

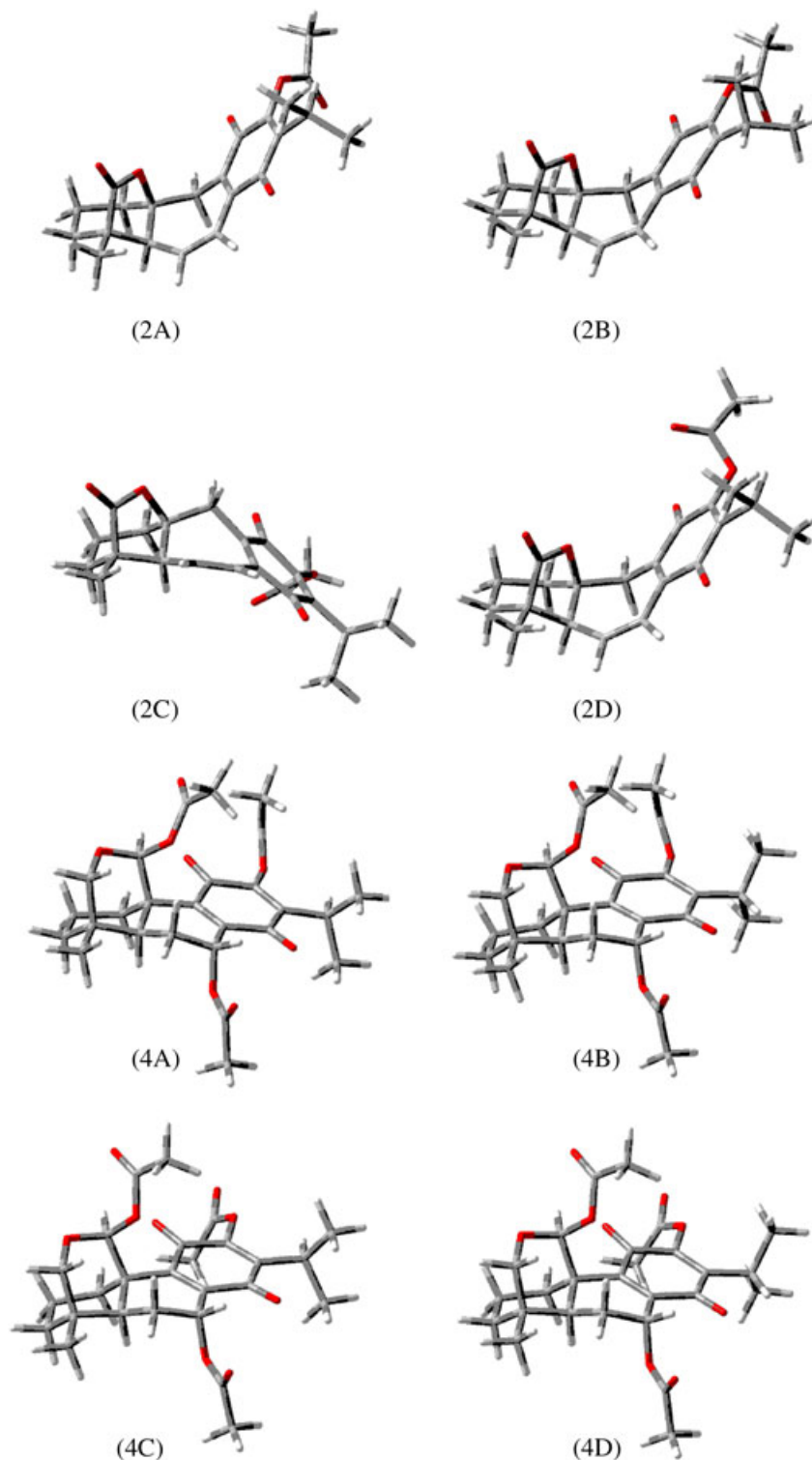


FIGURE 4 Minimum energy conformers of icetexone acetate (**2**) and of conacytone triacetate (**4**)

were a couple difficulties to overcome, which are the low solubility of either natural product in chloroform, a solvent extensively used in such studies, and the presence of two secondary non-hydrogen bonded hydroxy groups in **3** which could be prone for intermolecular associations in solution, thereby complicating the comparison task of the experimental VCD spectra with those obtained by density functional theory (DFT) calculations.^{22,23}

Therefore, the VCD studies were performed using icetexone acetate (**2**) and conacytone triacetate (**4**), both obtained after routine acetylation of the two natural products.

Assembly of a solid Dreiding stereomodel from Büchi (Flawil, Switzerland) revealed that for icetexone acetate (**2**), the seven-member ring can adopt either a bowl or a dome shape, and that the conformational interconversion

TABLE 4 Thermochemical parameters for quinones **1** and **5-9**

Compound	$\Delta E_{\text{MMFF}}^{\text{a}}$	% ^b	$\Delta E_{6-31\text{G(d)}}^{\text{c}}$	% ^b	$\Delta E_{\text{DGDZVP}}^{\text{d}}$	% ^b	$\Delta G_{\text{DGDZVP}}^{\text{e}}$	% ^f
1a	0.72	22.8	0.01	49.4	0.00	56.6	0.00	70.7
1b	0.00	77.2	0.00	50.6	1.16	43.4	0.52	29.3
5a	1.33	7.3	0.00	55.8	0.00	56.3	0.00	61.2
5b	1.74	3.6	0.18	41.1	0.17	42.3	0.29	37.4
5c	0.00	68.3	1.96	0.2	2.49	0.8	2.52	0.9
5d	0.70	20.8	2.38	0.1	2.70	0.6	2.76	0.5
6a	0.76	21.7	0.00	56.8	0.00	56.8	0.00	61.6
6b	0.00	78.3	0.16	43.2	0.16	43.2	0.28	38.4
7a	0.00	51.2	0.00	62.3	0.00	59.3	0.00	48.6
7b	0.45	23.7	0.36	34.0	0.27	37.7	0.02	47.0
7c	0.57	19.5	1.99	2.2	2.09	1.7	1.80	2.3
7d	1.31	5.6	2.22	1.5	2.26	1.3	1.84	2.1
8a	0.00	56.5	0.00	65.5	0.00	71.7	0.00	75.2
8b	0.16	43.5	0.38	34.5	0.55	28.2	0.66	24.8
9a	0.00	51.7	0.00	58.1	0.00	82.8	0.00	88.0
9b	0.19	37.5	0.25	38.0	1.02	14.9	1.61	5.9
9c	1.25	6.3	1.90	2.4	2.32	1.6	1.92	3.5
9d	1.45	4.5	2.13	1.6	2.85	0.7	2.07	2.6

^aRelative to **1b** (72.97 kcal/mol), **5c** (85.64 kcal/mol), **6b** (19.26 kcal/mol), **7a** (41.56 kcal/mol), **8a** (18.70 kcal/mol), and **9a** (40.43 kcal/mol).

^bCalculated using $\Delta E \cong -RT \ln K$.

^cRelative to **1b** (-722 568.44 kcal/mol), **5a** (-722 552.30 kcal/mol), **6a** (-385 257.39 kcal/mol), **7a** (-385 245.64 kcal/mol), **8a** (-385 257.93 kcal/mol), and **9a** (-385 246.26 kcal/mol).

^dRelative to **1a** (-722 658.13 kcal/mol), **5a** (-722 643.58 kcal/mol), **6a** (-385 308.14 kcal/mol), **7a** (385 296.01 kcal/mol), **8a** (-385 308.33 kcal/mol), and **9a** (-385 297.16 kcal/mol).

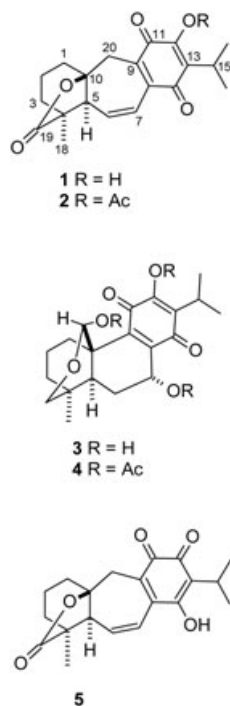
^eRelative to **1a** (-722 445.90 kcal/mol), **5a** (-722 432.24 kcal/mol), **6a** (-385 205.46 kcal/mol), **7a** (-385 193.98 kcal/mol), **8a** (-385 206.58 kcal/mol), and **9a** (-385 195.43 kcal/mol).

^fCalculated using $\Delta G = -RT \ln K$.

energy barrier seems to be relatively high. Therefore, bowl- and dome-shaped molecular structures for **2** and a single molecular structure of **4** were built in the Spartan 08 software followed by molecular mechanics force field search using the Monte Carlo methodology to provide four conformers for each shape of **2**, while for **4**, there were 12 conformers in a 6.92 kcal/mol energy gap. All conformers were submitted to single-point optimization using DFT at the B3LYP/6-31G(d) level of theory using the same software, from where the eight conformers of **2** were retained in a 2.94 kcal/mol gap, and six conformers in an energy gap of 1.82 kcal/mol correspond to **4**. These conformers were further optimized at the B3LYP/DGDZVP level of theory using the Gaussian 03 suit as indicated in Section 2. The final conformational optimization, IR and VCD calculations at the same level of theory were also performed using the Gaussian 03 software, the pertinent thermochemical parameters being summarized in Table 2. These thermochemical parameters are given in kcal/mol rather than in Hartrees since

mol is one of the seven basic units of science, which is defined from the exact numerical value of the Avogadro constant. Although the Gaussian 03 software provides these values in Hartrees, they were converted to kcal/mol using the factor 1 Hartree = 627.51 kcal/mol. Comparison of the calculated and experimental spectra, using the CompareVOA software,¹⁸ showed excellent agreement. The comparison parameters are summarized in Table 3, while the IR and VCD spectra are contrasted in Figure 2 for **2**, and in Figure 3 for **4**. It follows that the absolute configuration of icetexone acetate (**2**) and conacytone triacetate (**4**), and therefore of the diterpenes **1** and **3** are those drawn in Scheme 1.

The formulas of icetexone (**1**) and conacytone (**3**) reveal quite peculiar diterpenoids with the C-ring containing a hydroxyquinone chromophore and the A-ring supporting a fourth ring which is a heterocycle. Therefore, these molecules deserve detailed as possible ¹H and ¹³C NMR assignments. In particular, icetexone (**1**) possesses four methylene groups of which only the hydrogen atoms



SCHEME 1 Formulas of diterpenes originally reported from *Salvia ballotaeflora* and their acetates **2** and **4**

at C-20 appear as an amenable AB system, while the remaining three methylene groups at C-1, C-2, and C-3 of the A-ring should be coupled due to their vicinity. Thus, the one-dimensional (1D) ^1H and ^{13}C NMR spectra of **1** in combination with two-dimensional (2D) gHSQC and gHMBC measurements provided the data summarized in Section 2 in which all carbon atoms are ascribed individually together with the assessment of all hydrogen chemical shifts. However, determination of all homonuclear hydrogen coupling constants is precluded in the case of the A-ring atoms by the fact that three of them (H-1, H-2, and H-2') are completely overlapped, resonating at δ 1.81, and a fourth signal (H-3) appears quite close, at δ 1.77, providing a chemical shift difference of only 0.04 ppm, which at 300 MHz corresponds to 12 Hz, a value of similar magnitude than $^2J_{\text{gem}}$ or $^3J_{\text{trans}}$ in a conformational rigid cyclohexane.

In turn, conacytone (**3**) possesses the three A-ring methylenes and two further methylene arrangements, one at the heterocycle and the other one at the B-ring. A similar 1D and 2D NMR measurement procedure was applied for the signal assignment, thus providing all ^1H and ^{13}C chemical shift values, as well as some coupling constants. Since visual inspection of the ^1H spectrum reveals a higher dispersion of multiplets than in the case of **1**, and in order to assign the coupling constants of **3**, the raw ^1H NMR data were used as the starting point to achieve a complete and detailed assignment using the iterative full spin analysis integrated in the PERCH

(PERCH Solutions, Ltd., Kuopio, Finland) v.2011.1 NMR software,²⁴ a methodology we have successfully used for the complete spectra assignment of some natural products^{25,26} The method is based on the iterative minimization of the differences found between the simulated and the experimental spectra to determine the total ^1H NMR data for the studied molecule. Therefore, the 300 MHz free induction decay of **3** was edited in the preparation (PAC) module of the software, while the molecular structure of the minimum energy conformer was imported into the molecular modelling software (MMS) module, also of the PERCH shell. In addition, all chemical shift values and the directly observed coupling constants were introduced in the parameter table. These data allowed undertaking iteration processes until a convergence between the experimental and calculated spectra reached a RMS of 0.080%. All ^1H chemical shifts and coupling constants are summarized in Table 1, although it should be noted that in this case, the software was unable to distinguish the *pro-R* and *pro-S* methyl signals of the isopropyl residue, probably due to the very small chemical shift difference of only 0.005 ppm and a free rotation about the C-13/C-15 single bond. Of relevance to observe are a couple of four bonds long-range coupling constants one owing to each hydrogen atom at C-19, H-19_{*pro-R*} being coupled to H-3 α , and H-19_{*pro-S*} to H-5. Of relevance to note is also that $^2J_{\text{gem}}$ of the methylene hydrogen atoms at C-1, C-2, C-3, and C-6 is -13.3 ± 0.4 Hz, while $^2J_{\text{gem}}$ of the heterocyclic C-19 methylene atoms is -11.2 Hz due to the electronegativity of the directly attached oxygen atom. Due to the fact that PERCH calculations afford chemical shifts with six and coupling constants with four decimal places, and since the experimental 300 MHz spectrum was acquired with a magnet homogeneity better than 0.14 Hz, the chemical shifts and coupling constant values with three and two digits after a decimal point, respectively, given in Table 1, constitute a proper description, as has previously^{27,28} been done. A detailed comparison of the individual multiplets of the experimental and calculated ^1H NMR spectra of **3** is shown in Figure 5.

Once the complete assignment of the NMR data of conacytone is at hand, and thanks to a reviewer observation, it follows that the data agree with those of an oily molecule named turbinatone,²⁹ which was isolated from *Eupatorium turbinatum*, to which structure **3** was assigned independently. In addition, **3** was also detected recently³⁰ in *Salvia corrugata*.

The ^{13}C NMR substituent chemical shift (SCS) parameters for quinones, which we determined a long time ago²⁹ using monoterpenes and monocyclic sesquiterpenes, were evaluated in the present study which constitutes an opportunity to test these parameters for diterpenes in which the quinone ring is fused to another

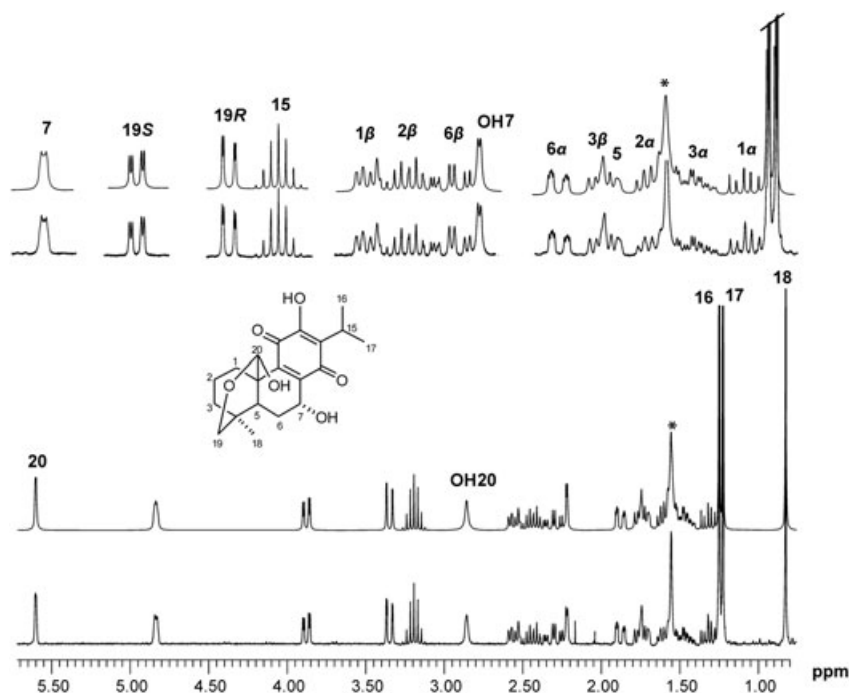


FIGURE 5 Comparison of the PERCH calculated (top) and the experimental (bottom) 300 MHz ^1H NMR spectra of conacytone (**3**). The labeled peak (*) is due to moisture

carbocycle. Table 5 shows the literature values for chloroform solutions, which differ from those for DMSO solutions,³¹ together with the chemical shift changes induced for the **1** to **2** and the **3** to **4** transformations. It can be seen that in the case of icetexone (**1**) and its acetate **2**, the SCS values agree excellently, the same being true for C-11, C-12, and C-13 on going from conacytone (**3**) to its triacetate **4**, while for C-8, C-9, and C-14, there is a lack in agreement. This seems to be due to the presence of the C-7 and C-20 acetates as can be observed in the minimum energy conformers of **4** shown in Figure 4.

Close inspection of the formulas of icetexone (**1**) and romulogarzone (**5**) reveals that these molecules are tautomers, an unprecedented situation for their coexistence as natural products, which generates a case that must be proven rigorously to ascertain if such a coexistence is feasible. Since there is no way to do experimentation

with a substance we have been unable to isolate over the years, to which formula **5** was proposed,⁴ we resorted to theoretical studies. Given our over one-half a century experience with the natural occurring sesquiterpene benzoquinone perezone,³²⁻³⁷ which possesses a 2-hydroxy-1,4-benzoquinone chromophore as in **1**, we consider the existence of the 4-hydroxy-1,2-benzoquinone tautomer **5** as energetically extremely disfavored, among other reasons, since the hydrogen bonding in a 2-hydroxy-1,4-benzoquinone significantly favors this atom arrangement.

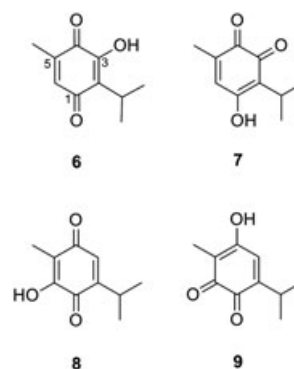
In order to test this hypothesis in a preliminary way, without investing significant computer times for keto/enol tautomerism, we initially resorted to calculate small monoterpenoid quinones with which we are familiar,³¹ and therefore selected (Scheme 2) 3-hydroxythymoquinone (**6**) and 6-hydroxythymoquinone

TABLE 5 Acetylation-induced ^{13}C NMR substituent chemical shift parameters^a

Effect at	Literature ^b	1 and 2	3 and 4
Adjacent CO	-3.5 ± 0.2	-3.6	-3.7
Remote CO	-0.6 ± 0.1	-0.2	-3.7
ipso	-1.9 ± 0.1	-1.9	-1.8
ortho	$+15.6 \pm 0.3$	+15.4	+15.1
meta	$+3.0 \pm 0.7$	+3.4	-2.6
para	-1.7 ± 1.1	-0.6	+1.4

^aFor CDCl_3 solutions.

^bFrom Burgueño-Tapia and Joseph-Nathan.³¹



SCHEME 2 Formulas of 3- (**6**) and 6-hydroxythymoquinone (**8**) and their tautomers **7** and **9**

(8) in order to compare their free energies with those of their 4-hydroxy-1,2-benzoquinones **7** and **9** tautomers, respectively, since these are C₁₀H₁₂O₃ molecules containing only 96 electrons. Inspection of Table 4 reveals that both **6** and **8** provide two energetically relevant conformers due to rotation of the isopropyl group, while each **7** and **9** provide four relevant conformers due to rotation of both the isopropyl group and the hydroxy group, since in the *ortho*-quinones, the latter is no longer hydrogen bonded to a carbonyl group. Thus, determination of the free energy of the most stable conformer of **6-9** using DFT calculations at the B3LYP/DGDZVP level of theory revealed that for these monoterpenoids, the values were -385205.46, -385193.98, -385206.58, and -385195.43 for **6**, **7**, **8**, and **9**, respectively, from where it follows the difference between 2-hydroxy-1,4-thymoquinones and their 4-hydroxy-1,2-quinone tautomers lies in the order of 11 kcal/mol. In fact, $\Delta G_7 - \Delta G_6 = 11.5$ kcal/mol, and $\Delta G_9 - \Delta G_8 = 11.2$ kcal/mol. Although this energy difference is in the order of the barrier for the interconversion of cyclohexane, it is a very high value for keto/enol tautomerism where only electrons and a hydrogen atom are relocated. Encouraged by these results, we calculated the free energies of the most stable conformers of icetexone (**1**) and romulogarzone (**5**), which were -722445.90 and -722432.24, respectively (Table 4) providing $\Delta G_5 - \Delta G_1 = 13.7$ kcal/mol. Therefore, according to the $\Delta G = -RT \ln K$ equation, solved for two tautomer molecules in equilibrium, the relative abundance of **5:1** would be around one part of **5** per one hundred billion (1×10^{11}) parts of **1**. Although this extremely low abundance of **5** is not violating the Avogadro constant, for practical purposes, it allows to declare, 41 years after its launch, that romulogarzone (**5**) is inexistent.

4 | CONCLUSION

Although icetexone (**1**) and conacytone (**3**) were originally isolated in 1976, no detailed assigned NMR characterization of either very peculiar diterpenoid is available nor has the absolute configuration of these molecules been established rigorously. Therefore, we determined all ¹³C and ¹H NMR chemical shifts of **1-4** and were able to also determine all hydrogen homonuclear coupling constants of conacytone (**3**). We also determined the crystal X-ray structure of **1** and **3**, whose Flack and Hooft parameters provided the absolute configuration, which was further tested by comparison of experimental VCD spectra of the derived acetates **2** and **4** with those obtained by DFT calculations at the B3LYP/DGDZVP level of theory. The known SCS values for hydroxy-*p*-benzoquinones were contrasted with the chemical shift differences induced

upon acetylation of icetexone (**1**) and conacytone (**3**). It follows that for **1**, all SCS values are in excellent agreement, while for **3**, those of C-11, C-12, and C-13 agree very well, while for the remaining three quinone ring carbons, there is no agreement due to the introduction of additional acetyl groups at C-7 and C-20. Finally, DFT calculations at the B3LYP/DGDZVP level of theory provide conclusive evidence that romulogarzone (**5**), the third diterpenoid claimed to occur in nature together with icetexone (**1**) and conacytone (**3**), cannot exist since tautomer **1** is more stable than **5** by 13.7 kcal/mol, which is a huge energy amount for keto/enol tautomerism.

ORCID

Pedro Joseph-Nathan  <http://orcid.org/0000-0003-3347-3990>

REFERENCES

- Domínguez XA, González H. Extractives from *Salvia bellotaeflora*. *Phytochemistry*. 1972;11:2641-2641.
- Watson WH, Taira Z, Domínguez XA, González H, Gutiérrez M, Aragón R. Isolation and structure of two diterpene quinones from *Salvia ballotaeflora* Benth (Labiatae). *Tetrahedron Lett*. 1976;2501-2502.
- Taira Z, Watson WH, Domínguez XA. Structure of icetexone, a diterpene quinone from *Salvia ballotaeflorae*. *J Chem Soc Perkin Trans*. 1976;2:1728-1730.
- Domínguez XA, González H, Aragón FR, Gutiérrez M, Marroquín JS, Watson W. Mexican medicinal plants XXIX. Three new diterpene quinones from *Salvia ballotaeflora*. *Planta Med*. 1976;30:237-241.
- Taira Z, Watson WH. The structure of conacytone, C₂₀H₂₆O₆, a diterpene quinone from *Salvia ballotaeflorae*. *Acta Crystallogr*. 1976;B32:2149-2152.
- Sánchez C, Cárdenas J, Rodríguez-Hahn L, Ramamoorthy TP. Abietane diterpenoids of *Salvia anastomosans*. *Phytochemistry*. 1989;28:1681-1684.
- Cárdenas J, Rodríguez-Hahn L. Abietane and icetexane diterpenoids from *Salvia candicans*. *Phytochemistry*. 1995;38:199-204.
- Esquivel B, Calderón JS, Flores E, Chávez C, Juárez M. Abietane and icetexane diterpenoids from *Salvia pubescens*. *Nat Prod Lett*. 1997;10:87-93.
- Majetich G, Grove JL. Total synthesis of (+)-19-deoxyicetexone, (-)-icetexone, and (+)-5-*epi*-icetexone. *Org Lett*. 2009;11:2904-2907.
- Cortez FJ, Lapointe D, Hamlin AM, Simmons EM, Sarpong R. Synthetic studies on the icetexones: enantioselective formal syntheses of icetexone and *epi*-icetexone. *Tetrahedron*. 2013;69:5665-5676.

11. Galicia MA, Esquivel B, Sánchez AA, Cárdenas J, Ramamoorthy TP, Rodríguez-Hahn L. Abietane diterpenoids from *Salvia pubescens*. *Phytochemistry*. 1988;27:217-219.
12. Esquivel B, Calderón JS, Flores E, Sánchez AA, Rivera RR. Abietane and icetexane diterpenoids from *Salvia ballotaeflora* and *Salvia axillaris*. *Phytochemistry*. 1997;46:531-534.
13. Farrugia LJ. WinGX suite for small-molecule single-crystal crystallography. *J Appl Cryst*. 1999;32:837-838.
14. Dolomanov O, Bourhis LJ, Gildea RJ, Howard JAK, Puschmann H. OLEX2: a complete structure solution, refinement and analysis program. *J Appl Cryst*. 2009;42:339-341.
15. Parsons S, Flack HD, Wagner T. Use of intensity quotients and differences in absolute structure refinement. *Acta Crystallogr*. 2013;B69:249-259.
16. Hooft RWW, Straver LH, Spek AL. Using the t-distribution to improve the absolute structure assignment with likelihood calculations. *J Appl Cryst*. 2010;43:665-668.
17. Hooft RWW, Straver LH, Spek AL. Determination of absolute structure using Bayesian statistics on Bijvoet differences. *J Appl Cryst*. 2008;41:96-103.
18. Debie E, De Gussem E, Dukor RK, Herrebout W, Nafie LA, Bultinck P. A confidence level algorithm for the determination of absolute configuration using vibrational circular dichroism or Raman optical activity. *Chemphyschem, Special Issue: Jacobus van't Hoff*. 2011;12:1542-1549.
19. Ortega AR, Toscano RA, Hernández-Barragán A, Alvarez-Cisneros C, Joseph-Nathan P. Structure elucidation of a new iso-flavone by exclusive use of ^1H NMR measurements. *Magn Reson Chem*. 2015;53:860-865.
20. Joseph-Nathan P, Gordillo-Román B. Vibrational circular dichroism absolute configuration determination of natural products. In: Kinghorn AD, Falk H, Kobayashi J, eds. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Vol.100 Switzerland: Springer International Publishing; 2015:311-451.
21. Burgueño-Tapia E, Joseph-Nathan P. Vibrational circular dichroism: recent advances for the assignment of the absolute configuration of natural products. *Nat Prod Commun*. 2015;10:1785-1795. 2017;12:641-651
22. Burgueño-Tapia E, Joseph-Nathan P. Absolute configuration of eremophilanoids by vibrational circular dichroism. *Phytochemistry*. 2008;69:2251-2256.
23. Burgueño-Tapia E, Sánchez-Castellanos M, Joseph-Nathan P. Optimization of the considered number of conformers for the absolute configuration determination of catechin and epicatechin peracetates by VCD. *Nat Prod Commun*. 2017;12:683-686.
24. Laatikainen R, Tiainen M, Korhonen S-P, Niemitz M. Computerized analysis of high-resolution solution-state spectra. In: Harris RK, Wasylishen RE, eds. *Encyclopedia of Magnetic Resonance*. Chichester: Wiley; 2012:677-688.
25. Molina-Salinas GM, Rivas-Galindo VM, Said-Fernández S, et al. Stereochemical analysis of leubethanol, an anti-TB-active serrulatane from *Leucophyllum frutescens*. *J Nat Prod*. 2011;74:1842-1850.
26. Villanueva-Cañongo C, Pérez-Hernández N, Hernández-Carlos B, Cedillo-Portugal E, Joseph-Nathan P, Burgueño-Tapia E. Complete ^1H NMR assignments of pyrrolizidine alkaloids and a new eudesmanoid from *Senecio polypodioides*. *Magn Reson Chem*. 2014;52:251-257.
27. Becerra-Martínez E, Ramírez-Gualito KE, Pérez-Hernández N, Joseph-Nathan P. Total ^1H NMR assignment of 3β -acetoxypregna-5,16-dien-20-one. *Steroids*. 2015;104:208-213.
28. Ortega AR, Ortiz-Pastrana N, Quijano L, Becerra-Martínez E, Olmedo-Aguirre JO, Joseph-Nathan P. Structure and absolute configuration of hydroxy-bis-dihydrofarinosin from *Encelia farinosa*. *Magn Reson Chem*. 2017;55:530-539.
29. Jakupovic J, Ellmauerer E, Bohlmann F, Whitemori A, Gage D. Diterpenes from *Eupatorium turbinatum*. *Phytochemistry*. 1986;25:2677-2678.
30. Bisio A, Fraternali D, Schito AM, et al. Establishment and analysis of *in vitro* biomass from *Salvia corrugata* Vahl. and evaluation of antimicrobial activity. *Phytochemistry*. 2016;122:276-285.
31. Burgueño-Tapia E, Joseph-Nathan P. ^{13}C NMR substituent chemical shifts in hydroxy-*p*-benzoquinones. *Magn Reson Chem*. 2000;38:390-393.
32. Walls F, Salmón M, Padilla J, Joseph-Nathan P, Romo J. La estructura de la perezona. *Bol Inst Quím Univ Nal Autón Méx*. 1965;17:3-15.
33. Joseph-Nathan P, Reyes J, González MP. Contribution to the chemistry of perezona. *Tetrahedron*. 1968;24:4007-4013.
34. Joseph-Nathan P, Martínez E, Rojas M, Santillan RL. The solid state versus the solution structure of 6-hydroxyperezona. *J Nat Prod*. 1987;50:860-865.
35. Joseph-Nathan P, Santillan RL. The chemistry of perezona and its consequences. In: Atta-ur-Rahman, ed. *Studies in Natural Products Chemistry*. Vol.5 Amsterdam: Elsevier; 1989:763-813.
36. Burgueño-Tapia E, Cerda-García-Rojas CM, Joseph-Nathan P. Conformational analysis of perezona and dihydroperezona using vibrational circular dichroism. *Phytochemistry*. 2012;74:190-195.
37. Zepeda LG, Burgueño-Tapia E, Pérez-Hernández N, Cuevas G, Joseph-Nathan P. NMR-based conformational analysis of perezona and analogues. *Magn Reson Chem*. 2013;51:245-250.

How to cite this article: Esquivel B, Burgueño-Tapia E, Bustos-Brito C, Pérez-Hernández N, Quijano L, Joseph-Nathan P. Absolute configuration of the diterpenoids icetexone and conacytone from *Salvia ballotaeflora*. *Chirality*. 2017;1–12. <https://doi.org/10.1002/chir.22781>