
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:
QUÍMICA MEDICINAL

**“Evaluación de la actividad citotóxica de compuestos aislados de *Salvia
ballotiflora* Benth (Lamiaceae).”**

IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

PRESENTA

NIMSI CAMPOS XOLALPA
2142800406

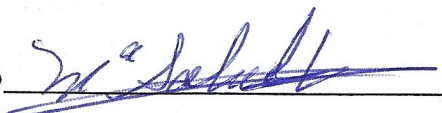
COMITÉ TUTORIAL

Tutor: Dra. Ma. Salud Pérez Gutiérrez
Asesor: Dr. Ernesto Sánchez Mendoza
Asesor: Dr. Ángel Josabad Alonso Castro

ABRIL; 2016

Evaluación de la actividad citotóxica de tres compuestos aislados de *Salvia
ballotiflora* Benth (Lamiaceae)."

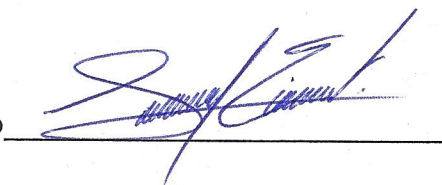
Tutora: Dra. Salud Pérez Gutiérrez

Vo.Bo 

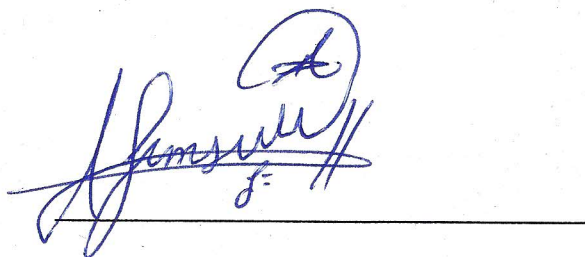
Asesor: Dr. Ángel Josabad Alonso
Castro

Vo.Bo 

Asesor: Dr. Ernesto Sánchez Mendoza

Vo.Bo 

Alumna: Nimsi Campos Xolalpa
2142800406



"Evaluación de la actividad citotóxica de compuestos aislados de *Salvia ballotiflora* Benth (Lamiaceae)."

Miembros del jurado

Presidente: Dr. Francisco Alarcón Aguilar



Vocal: Dr. David Osvaldo Salinas Sánchez



Secretario: Dra. Ma. Salud Pérez Gutiérrez



RESUMEN

Desde hace varias décadas diversos grupos de investigación han enfocado sus esfuerzos a la búsqueda de compuestos de origen natural, sintético o semi-sintético con actividad citotóxica. Las plantas del género *Salvia* han contribuido como fuente de compuestos con actividad citotóxica. *Salvia ballotiflora* es una especie que pertenece a la familia Lamiaceae. De esta planta se obtuvo el extracto metanólico y clorofórmico lavado con hexano (ECL y EML). De cada extracto se determinó la actividad citotóxica en la línea celular cancerosa HeLa (cáncer cervicouterino), por viabilidad con el método de MTT y por regresión lineal se calculó la CI_{50} . Para EML su CI_{50} fue de 33.06 $\mu\text{g/mL}$ y para ECL su CI_{50} fue de 23.79 $\mu\text{g/mL}$. De acuerdo con los resultados obtenidos el ECL presentó la mejor actividad citotóxica y se continuó trabajando en este extracto del cual se aislaron cuatro diterpenos icetexanos: 19-deoxiicetexona (DEOX), Icetexona (C18), 19-deoxiisocetexona (DIC), 7,20-dihidroanastomocina (DAM). También se aisló una mezcla de triterpenos de: ácido oleanólico y ursólico. Las estructuras moleculares se corroboraron por métodos espectroscópicos de RMN ^1H y ^{13}C e IR. Para DEOX y C18, se obtuvieron sus estructuras por difracción de Rayos X. Se evaluó la actividad citotóxica de los diterpenos, en cuatro líneas celulares de tipo cancerígenas: HeLa, MFC7 (cáncer de mama), CT26 (cáncer de colon murino) y A549 (cáncer de pulmón). Se encontró que DIC presentó actividad citotóxica en la línea celular HeLa ya que su CI_{50} fue de 9.36 μM , sin embargo en las otras líneas celulares las CI_{50} ($CI_{50} \text{ A549} = 14.95 \mu\text{M}$ $CI_{50} \text{ ACT26} = 18.05 \mu\text{M}$ $CI_{50} \text{ MCF7} = 43.49 \mu\text{M}$) fueron menores a las tratadas con DEOX, C18 y DAM. Se determinó la CI_{50} de células de tipo macrófagos (J774A.1), el cual fue de 25.77 μM . Se calculó el índice terapéutico el cual fue de 2.7, indicando que se necesita 2.7 veces más de concentración para que se presente citotoxicidad en el 50% de la población de células sanas. Se determinó caspasa 3 en HeLa tratadas con DIC. La caspasa 3 fue expresada en mínimas cantidades (18%) con respecto a las tratadas con CDDP. Sin embargo durante la evaluación citotóxica se observó la morfología de la célula tratada con DIC y se observó la presencia de cuerpos apoptóticos. Por lo tanto es de gran importancia la búsqueda del mecanismo por el cual actúa DIC en las células HeLa.

Agradecimientos Institucionales

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología
(Conacyt), por el apoyo a esta investigación.

Número de beca 612692

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco:

Departamento de Sistemas Biológicos

Laboratorio de Biología Molecular

Laboratorio de síntesis orgánica y productos naturales

Universidad de Guanajuato

División de Ciencias Naturales y exactas

Laboratorio de Farmacología de Productos Naturales

Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Centro de Química, ICUAP.

Laboratorio de difracción de Rayos X.

Agradecimientos

A mi mamá y a mi papá que siempre me han impulsado y apoyado en todas mis decisiones y caminos que he tomado durante mi vida, sin su apoyo no hubiésemos logrado este nuevo triunfo.

A mis hermanos por su apoyo y cariño.

A la Dra. Salud Pérez por el apoyo, tiempo, paciencia y dedicación para que saliera adelante esta investigación.

A los Doctores Ángel Josabad A. C., Ramón J. M. y Ernesto Sánchez, por ayudarme a seguir en este camino y brindarme su apoyo tanto en lo académico como en lo personal. Y como decíamos: "hartas gracias". Gracias por ser mis Amigos.

A la Señorita "Mu" (Abigail H. Munive) por todo el apoyo en el laboratorio. Por estar en las buenas y malas.

A Manuel A. Barrón por apoyarme y alentarme a seguir haciendo lo que me gusta.

A Javier Ammurabi por todo el apoyo incondicional y consejos brindados.

A todos mis amigos que siempre me brindaron su apoyo: Julia F., Cesar, Beth, Nancy, Chucho, Javier (Puebla), Samuel, Aza, Joñito.

Índice

	Pag.
1.- INTRODUCCIÓN.....	1
2.- MARCO TEÓRICO.....	2
2.1.- GENERALIDADES DEL CÁNCER.....	2
2.2.- EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER.....	3
2.3.- CAUSAS DEL CÁNCER.....	3
2.4.- TRATAMIENTO DEL CÁNCER.....	4
2.4.1.- Cirugía.....	4
2.4.2.- Radioterapia.....	5
2.4.3.- Quimioterapia.....	5
2.5.-MUERTE CELULAR.....	8
2.6.- LAS PLANTAS COMO TRATAMIENTO DEL CÁNCER.....	9
2.7.-SALVIAS EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER.....	10
2.8.- <i>SALVIA BALLOTIFLORA</i> BENTH.....	11
3.- HIPÓTESIS.....	14
4.- OBJETIVOS.....	14
4.1.- Objetivo general.....	14
4.2.- Objetivos específicos.....	14
5.-MATERIAL Y MÉTODOS.....	15
5.1.-Extracción e identificación de los diterpenos de <i>S. ballotiflora</i>	
5.1.1.- Recolecta de la planta <i>Salvia ballotiflora</i>	15
5.1.2.- Elaboración del extracto de <i>Salvia ballotiflora</i>	15
5.1.3.- Extracción y aislamiento de los tres diterpenos por cromatografía en columna abierta.....	15
5.1.4.-Identificación de los compuestos extraídos de <i>S.</i> <i>ballotiflora</i>	16
5.2.- Cultivo celular.....	17
5.3.- Evaluación de viabilidad.....	17

5.4.- Determinación de caspasa 3 por medio de un ensayo colorimétrico.....	18
5.4.1.- Preparación de los extractos celulares.....	18
5.4.2.- Evaluación de la presencia de caspasa 3.....	19
6.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
6.1.- Estudio fitoquímico del extracto clorofórmico de <i>Salvia ballotiflora</i> Benth (Lamiáceae).....	21
6.2.- Espectroscopia de IR y RMN de ¹ H y ¹³ C.....	23
6.2.1.- Espectroscopía de Infrarrojo de las moléculas DEOX, C18, DIC, DAM y Mezcla de triterpenos.....	23
6.2.2.- Espectroscopia de RMN de ¹ H y ¹³ C de las moléculas DEOX, C18, DIC y DAM.....	25
6.2.3.-Difracción de rayos X de las moléculas DEOX, C18 y DAM.....	32
6.3.- Evaluación de la actividad citotóxica por el ensayo de viabilidad de los extractos lavados con hexano y de los diterpenos en líneas celulares cancerígenas: HeLa, MCF7, CT26 y A549.....	34
6.4.- EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE CASPASA 3 PARA ACTIVAR APOPTOSIS.....	41
7.- CONCLUSIÓN.....	44
8.- REFERENCIAS.....	45
9.- ANEXOS.....	46

Índice de Tablas

	Pag.
Tabla 1.- Fármacos antineoplásicos.....	6 y 7
Tabla 2.- Grupos de estudio de los diferentes extractos celulares.....	20
Tabla 3.- Rendimientos de extracto y compuestos obtenidos de <i>S. ballotiflora</i>	21
Tabla 4.- Características de los compuestos extraídos de <i>S. ballotiflora</i>	22
Tabla 5.- Espectroscopia de Infrarrojo, señales características de los diterpenos aislados de <i>S. ballotiflora</i>	23
Tabla 6.- Desplazamiento químicos de RMN de ¹ H y ¹³ C de 19-deoxiicetexona.....	25
Tabla 7.- Desplazamientos químicos de RMN de ¹ H y ¹³ C de la icetexona....	29
Tabla 8.- Desplazamientos químicos de RMN de ¹ H y ¹³ C de la 19-deoxiisoicetexona.....	30
Tabla 9.- Desplazamientos químicos de RMN de ¹ H y ¹³ C de la 7,20-dihidronastomocina.....	31
Tabla 10.- Cl ₅₀ de los diterpenos evaluados en la línea celular J774A.1 (macrófagos).....	36
Tabla 11.- Cl ₅₀ de cada diterpeno extraído de <i>S. ballotiflora</i>	39

Índice de Figuras

	Pag.
Fig. 1. Panorama internacional de casos de cáncer del año 2000 al 2020.....	3
Fig. 2.- <i>Salvia ballotiflora</i> (<i>Lamiaceae</i>) <i>Benth</i> , flor y hojas.....	11
Fig. 3.- Estructuras de diterpenos extraídos de <i>S. ballotiflora</i> : a) Icetexona (C18), b) 19-deoxiicetexona (DEOX), c) 19-deoxiisoicetexona (DIC) y d) 7,20-dihidroanastomocina (DAM).....	12
Fig. 4.- Espectro de Infrarrojo de la mezcla de dos triterpenos (ácido Oleanólico y ursólico).....	24
Fig. 5.-Espectro de RMN de H ¹ de 19-deoxiicetexona.....	27
Fig. 6.- Espectro de RMN de C ¹³ de 19-deoxiicetexona.....	28
Fig. 7.- Estructura obtenida por difracción de Rayos X de las moléculas 19-deoxiicetexona e icetexona.....	33
Fig. 8.- Actividad citotóxica de los extractos metanólico y clorofórmico lavados con hexano.....	34
Fig. 9.- Viabilidad en línea celular J774A.1 (macrófagos de murino) de los diterpenos extraídos de <i>S. ballotiflora</i>	35
Fig.10. Viabilidad en línea celular A549 (cáncer de pulmón) de los diterpenos extraídos de <i>S. ballotiflora</i>	36
Fig. 101.- Viabilidad en línea celular CT26 (cáncer de colon murino) de los diterpenos extraídos de <i>S. ballotiflora</i>	37
Fig. 11.- Viabilidad en línea celular HeLa (cáncer cervicouterino) de los diterpenos extraídos de <i>S. ballotiflora</i>	38

Fig. 12.- Viabilidad en línea celular MCF 7 (cáncer de mama) de los diterpenos extraídos de <i>S. ballotiflora</i>.....	38
Fig. 13. Caspasa 3 presente en células HeLa tratadas con DIC.....	41
Fig. 14. Células HeLa a 10X, con los diferentes tratamientos: a) Vehículo, b) Necrosadas, c) CDDP y d) DIC.....	42

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad provocada por células que carecen de regulación en su proliferación, muerte y angiogénesis (OMS, 2014). Los tratamientos utilizados en primera estancia, se basan en la quimioterapia, en la cual se administran fármacos con actividad citotóxica. El Instituto Nacional de Cáncer de los Estados Unidos (CNI) define como citotóxico a las sustancias que eliminan células cancerosas. Estas sustancias pueden impedir que las células cancerosas proliferen, así como también ayudan a disminuir el tamaño de los tumores (CNI, 2016).

Los productos naturales han demostrado ser muy útiles en el desarrollo de fármacos utilizados contra el cáncer. Se ha mostrado que hasta el 2006 el 47% de un total de 155 fármacos con actividad citotóxica usados en quimioterapia son productos naturales o derivados semisintéticos (Pan, L., *et al.*, 2013). De los principales compuestos derivados de plantas se encuentran: alcaloides de la vinca, lignanos de epidofilotoxina, diterpenos taxanos y alcaloides derivados de quinolina y capototecina, estos compuestos se utilizan hoy en día en el tratamiento del cáncer (Shoeb, M., 2006).

El CNI, fue una de las primeras organizaciones encargada de los estudios sobre las plantas que presentaban actividad citotóxica y antitumoral, ya que realizó la compilación de 174000 plantas las cuales fueron evaluadas en líneas celulares de tipo cancerígenas y modelos animales. Con base en estos estudios se establecieron los parámetros de concentración inhibitoria del 50% de la población tratada (CI₅₀) para determinar si un compuesto se puede considerar citotóxico (Cragg, G. M. & Newmann, D. J. 2005).

Las plantas del género *Salvia* han contribuido como fuente de compuestos con actividad citotóxica, se ha encontrado que el diterpeno tanshinona IIA, aislado de *Salvia miltiorrhiza* (Bunge), induce apoptosis en células cancerosas humanas de colon. En otro estudio de seis especies de *Salvia*: *S. lanigera* (Poir.), *S. menthaefolia* (Schreb.), *S. spinosa* (Moench), *S. sclarea* (Linneo), *S. dominica* (Linneo), *S.*

palestina (Benth), se encontró que ejercieron actividad citotóxica en líneas celulares humanas de distintos tipos de cáncer (Fiore, *et al.*, 2006; Fiore,, *et al.*, 2012) Lo anterior sugiere que plantas del género *Salvia* pueden ser una fuente de compuestos citotóxicos.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. GENERALIDADES DEL CÁNCER

A nivel mundial los principales tipos de cáncer con mayor incidencia son pulmonar, hepático, gástrico, colorectal, mamario y de esófago. Los principales tratamientos utilizados para esta enfermedad son cirugía, radioterapia y quimioterapia (OMS, 2014).

Es importante mencionar que el potencial canceroso en una célula es debido a: las señales de crecimiento excesivamente activas, evasión de apoptosis, pérdida de la capacidad de respuesta a las señales de regulación de crecimiento, liberación de sustancias al medio extracelular para la vascularización de tejidos, invasión de tejidos u órganos y crecimiento replicativo ilimitado (Loraine, S. & Mendoza, J., 2010).

El cáncer también es conocido como neoplasia o tumor, se puede presentar como benigna o maligna. Las neoplasias benignas son aquellas enfermedades en donde existe alteración en las células de los tejidos pero no tienen la capacidad de extenderse a otras partes del cuerpo. Las neoplasias malignas son todas las enfermedades que se caracterizan por multiplicarse sin control e invadir los tejidos cercanos. Éstas se pueden diseminar a otras partes del cuerpo por torrente sanguíneo o a través del sistema linfático, esta propagación se conoce como metástasis (León A., *et al.*, 2011).

2.2. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER

En 2012 a nivel mundial se han estimado 14 millones de casos nuevos por año y 8.2 millones de muertes relacionadas con el cáncer (Stewart, B. & Wild, C., 2015). Las tasas de cáncer podrían aumentar en un 50% en 2020 (León, A. G., *et al.*, 2011).



Fig. 1. Panorama internacional de casos de cáncer del año 2000 al 2020.

En la Figura 1 se muestra el panorama internacional de los casos de cáncer del año 2000 al 2020, donde se puede observar como el cáncer de pulmón, mama, colon, estómago, hígado y cuello uterino presentan mayores incidencias, pronosticando que para 2020 habrán el doble de casos en cada tipo de cáncer debido a los factores de riesgo que provocan esta enfermedad. La OMS calcula que 7.6 millones de personas murieron por cáncer en 2005 y se ha pronosticado que para el 2020 habrá 10.3 millones de muertes en todo el mundo debido al cáncer (León, A., *et al.*, 2011).

2.3. CAUSAS DEL CÁNCER

Existen diversas causas que desencadenan el cáncer como son agentes físicos, químicos, ambientales y biológicos. Estos agentes también son llamados sustancias cancerígenas o mutagénicas, las cuales provocan alteraciones en el material

genético de las células y dan lugar a la formación de cáncer en organismos (Medina, E. & Martínez, R. 2009).

Dentro de los factores de riesgo que desencadenan el cáncer se encuentra el alcoholismo, tabaco, dieta, edad, microorganismos infecciosos, hormonas, inflamación crónica, inmunosupresión, luz solar, obesidad, radiación y sustancias tóxicas en el ambiente. El consumo excesivo de alcohol provoca cáncer de boca, garganta, esófago, laringe, hígado y seno. En algunos casos cuando el consumo de alcohol es acompañado por el consumo de cigarro, el riesgo de presentar cáncer de pulmón es mayor (Moreno, M., & José, M., 2003). La dieta es otro factor de riesgo en la aparición del cáncer, debido a que esta enfermedad es asociada a dietas ricas en nitratos, sal, alimentos ahumados, vinagre como conservador, en el bajo consumo de antioxidantes (frutas y verduras), alto consumo en grasas, aguas contaminadas con nitritos, nitratos y nitrosamina. La presencia de microorganismos infecciosos como bacterias, virus y parásitos en organismos sanos, llegan a causar cáncer, ya que estos organismos pueden llegar a alterar el ciclo de las células del organismo afectados (CNI, 2015).

2.4.- TRATAMIENTO DEL CÁNCER

Las personas que padecen cáncer reciben diferentes tipos de tratamientos como son cirugía, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia, terapia dirigida, terapia hormonal y trasplante de células madre. Estos tratamientos pueden ser aplicados de manera individual o combinada, dependiendo del tipo de cáncer y de qué tan avanzada se encuentre esta enfermedad (Longo, D. L. K., Dennis, L., & Jameson, J. L., 2012).

2.4.1. Cirugía

Las personas que padecen de cáncer pueden llegar a presentar la formación de tumores sólidos contenidos en un sitio. Los tumores formados, dependiendo de lo avanzado que se encuentre, pueden ser eliminados por cirugía. La cirugía es un

tratamiento local en el que se extirpa o reduce el tamaño del tumor de un lugar específico del cuerpo (Medina, E. A. & Martínez, R., 2009).

2.4.2. Radioterapia

Utiliza energía ionizante que tiene la finalidad de destruir las células cancerosas y reducir el tamaño de los tumores. La radioterapia lesiona o destruye las células, dañando su material genético e imposibilita su crecimiento y división. El objetivo principal de este tipo de tratamiento es destruir el mayor número de células cancerosas y limitar el daño que sufre el tejido sano circundante (CNI, 2016). La radiación actúa de forma directa en el ADN y por la formación de radicales libres de forma indirecta. Siendo las fases más sensibles a la radiación dentro del ciclo celular, G2 y M.

2.4.3. Quimioterapia

En quimioterapia se utilizan fármacos con actividad citotóxica, la cual, de acuerdo con el Instituto Nacional de Cáncer de Estados Unidos, se puede definir como la capacidad de ciertas sustancias para eliminar células, como las cancerosas. Estos compuestos impiden que las células cancerosas proliferen y ayudan a que se disminuya el tamaño de un tumor.

La quimioterapia puede ser administrada antes de una cirugía para reducir el tamaño del tumor. En este tratamiento se utilizan diversos fármacos, los cuales pueden ser agentes alquilantes, antimetabolitos, agentes biológicos y derivados de productos naturales (Díaz, E. & García, C., 2000). Existen diferentes tipos de quimioterapias dependiendo del tratamiento que sea utilizado. (Rubin, P., *et al.*, 2003) como son:

- Quimioterapia primaria definitiva: curativa en las leucemias, linfomas y en la enfermedad de Hodgkin.
- Quimioterapia adyuvante: se utilizan fármacos sistémicos después de que la cirugía o irradiación hayan controlado el tumor primario.

- Quimioterapia neoadyuvante: se utilizan fármacos como tratamiento inicial en tumores localizados (terapia alternativa local). Tiene la finalidad de reducir el tamaño del tumor y controlar la metástasis.
- Quimioterapia de inducción: se aplica cuando hay tumores avanzados y no existe tratamiento alternativo eficaz.
- Quimioterapia concurrente (radiosensibilizante o radioprotectora): está asociada a la radioterapia, ya que ayuda a incrementar la sensibilidad del tumor, su principal objetivo es preservar órganos, se aplica principalmente en el tratamiento del cáncer anal, esofágico, de células pequeñas de pulmón y de cabeza y cuello para incrementar la eficacia de la radioterapia.

Existen varios tipos de fármacos utilizados en quimioterapia, cada uno tiene acción específica dentro de la célula. En la tabla 1 se presentan algunos agentes citotóxicos utilizados para el tratamiento del cáncer (Medina, E. & Martínez, R., 2009).

Tabla 1.-. Fármacos antineoplásicos

Clase y tipo	Fármaco	Acción
Agentes alquilantes		
Mostaza Nitrogenada	Clorambucilo Ciclofosfamida Estramustina Ifosfamida Mecloretamina Melfalán	Forman enlaces covalentes entre sus grupos alquilo y moléculas nucleofílicas del DNA dañándolo para que la célula no se reproduzca. Pueden reaccionar con grupos fosfatos y alquilar bases del RNA. Estos compuestos ejercen su acción en todas las fases del ciclo celular y se usan para tratar diferentes tipos de cáncer, como de leucemia, linfoma de Hodkin, mieloma múltiple, sarcoma, pulmón, seno, ovarios.
Derivados de etilenimina	Tiotepa	
Alquil sulfonato	Busulfán	
Nitrosurea	Carmustina Lomustina Semustina Estreptozocina	
Triazeno	Dacarbazina	
Sal de metal	Carboplatino Cisplatino Oxaliplatino	

Continuación de Tabla 1.- Fármacos antineoplásicos

Clase y tipo	Fármaco	Acción
Antimetabolitos		
Antagonistas de Ácido fólnico	Metotrexato Raltitrexed Trimetrexato	<p>Interfieren con la biodisponibilidad normal de los precursores de los nucleótidos de purina o pirimidina que se requieren para síntesis del DNA. Son específicos de la fase S del ciclo celular.</p> <p>Inhiben directamente enzimas necesarias para síntesis de DNA.</p> <p>Incorporan compuestos en el DNA.</p> <p>Inhiben la dihidrofolato reductasa.</p> <p>Bloquea la producción de N metiltetrahidrofolato reducido necesario para síntesis de ácido timidílico y síntesis de purinas.</p>
Análogo de pirimidina	Capecitabina Citarabina Floxuridina 5-Fluorouracilo Gemcitabina	
Inhibidores de ribonucleótido reductasa	Hidroxiurea	
Análogos de purinas	Mercaptopurina Tioguanina Pentostatina Clabribina Fludarabina	
Clase y tipo	Fármaco	Acción
Productos Naturales		
Alcaloides de la vinca	Vinblastina Vincristina Vindesina Vinorelbina	Actúa al inhibir la polimerización de los microtúbulos
Antimicrotubulos	Docetaxel Paclitaxel	Actúan al impedir la despolimerización de los microtúbulos.
Inhibidores de Topoisomerasa I	Irinotecán Topotecán	Impiden que se "desenrolle ADN".
Inhibidores de Topoisomerasa II	Etopósido Tenipósido	Inhiben la topoisomerasa II impidiendo de forma irreversible la ruptura de la doble cadena de DNA, deteniéndose el ciclo celular en el final de la fase S y G2
Antibióticos antitumorales	Bleomicina Dactinomicina Doxorrubicina Daunorrubicin Mitomicina Epirrubicina Idarrubicina Plicarricina Mitoxantrona	Estrés oxidativo sobre el DNA y formación de radicales libres
Enzimas	Asparginasa	La asparaginasa hidroliza la L-asparagina en ácido aspártico y amonio. Lleva deficiencia celular de la L-asparagina que sirve de base para producir proteínas En su ausencia existe la inhibición de DNA y RNA

2.5. MUERTE CELULAR

La apoptosis es un proceso fundamental y esencial para el desarrollo y mantenimiento de la homeostasis de los tejidos adultos. Su objetivo es eliminar las células superfluas, dañadas, infectadas o transformadas. Durante la apoptosis los acontecimientos pueden ocurrir de manera ordenada. Las diferentes fases que se llevan a cabo son:

Fase efectora: se caracteriza por el aumento en el contenido de Ca^{2+} intracelular, el cual origina la activación de ciertas enzimas (endonucleasas y proteasas-caspasas), junto con cambios en el citoesqueleto produciendo alteraciones en el tamaño y forma celular.

Fase degradativa: en esta fase se degradan las proteínas y los ácidos nucleicos, así como también se presentan cambios en la membrana celular. Los cuerpos apoptóticos son fagocitados por los macrófagos, lo que impide la salida del contenido celular y la inflamación. En esta fase las endonucleasas se encargan de fragmentar el ADN, las caspasas degradan las proteínas, se producen marcados cambios en el citoesqueleto y se condensa la cromatina.

Fase de eliminación: los macrófagos fagocitan los cuerpos apoptóticos, atraídos por la fosfatidilserina presente en la superficie de las células apoptóticas. Existen dos razones por las que las células mueren por apoptosis: por la eliminación de células en exceso y por la eliminación de células que representan un peligro para la integridad del organismo como es el caso de las células infectadas con virus, las células del sistema inmune: lupus eritematosus, células con ADN lesionado, células que han sufrido agresión tóxica y células cancerosas (Boticario, C., & Cascales M., 2012).

2.6. LAS PLANTAS COMO TRATAMIENTO DEL CÁNCER

En los últimos 50 años los productos naturales han demostrado ser muy útiles en el descubrimiento y desarrollo de fármacos contra el cáncer, en especial los derivados de plantas y microorganismos (Pan, L., *et al.*, 2013).

Gracias a los estudios realizados por el NCI, se establecieron los parámetros para determinar si un extracto o molécula extraída de plantas presenta actividad citotóxica. Esta consiste en la propiedad de un compuesto o extracto de evitar la proliferación, crecimiento y diseminación celular. Se considera que un extracto de planta presentará actividad citotóxica si la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) es menor o igual a 30 µg/mL y en el caso de las moléculas extraídas de plantas la CI₅₀ debe ser menor o igual a 4 µg/mL (Suffness, M., & Pezzuto, J. M., 1990). La gran mayoría de los compuestos o extractos de plantas endémicas de México han sido evaluados utilizando líneas celulares de cáncer y en ocasiones se han utilizado cultivos primarios derivados de tumores humanos o animales (Alonso, A., 2011).

Uno de los fármacos quimioterapéuticos extraídos de plantas y muy utilizado actualmente, es el diterpeno paclitaxel (Taxol®), obtenido de la corteza del tejo del Pacífico, *Taxus brevifolia* Nutt (taxaceae). La estructura del paclitaxel fue elucidada en 1971 y fue introducida en el mercado en 1990. Este fármaco es activo en contra de cáncer de ovario, de mama y pulmón (Shoeb, M., 2006). Otros ejemplos de fármacos utilizados en el tratamiento del cáncer que han sido extraídos de plantas son: ácido betulínico triterpenoide pentacíclico, extraído de *Ziziphus mauritiana* Lam(Rhamnaceae), combretastatina A-1 y A-4 extraído de *Combretum caffrum* Kuntze (Combretaceae), curcumina es un diarilheptanoide fenólico, aislado de las raíces de *Curcuma longa* L (Zingiberaceae), alcohol perílico monoterpeneoide, se encuentra en aceites esenciales de plantas como lavanda (*Lavandula x intermedia*; Lamiaceae) y las cerezas (*Prunus avium* (L.) L Rosaceae), Protopanaxadiol y protopanaxatriol son dos triterpenoides de tipo dammarano tetracíclico obtenidos por la hidrólisis de ciertas saponinas obtenidas de ginseng asiático (*Panax ginseng*

C. A. Mey. Araliaceae) y en notoginsegng (*Panax pseudoginseng*), tanshinona I y IIA y la criptotanshinona son tres diterpenos derivados de quinona, aislada a partir de los rizomas de *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Lamiceae), es conocida como “Tanshen” en la medicina tradicional China (Pan, L., *et al.*, 2013).

Hoy en día existen otras moléculas y extractos de plantas que presentan actividad citotóxica o antitumoral, que todavía se encuentran en las primeras fases de desarrollo para su uso en el tratamiento del cáncer en humanos.

2.7. SALVIAS EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

Las plantas del género *Salvia* son una fuente importante de varios compuestos como ácidos fenólicos, monoterpenos, diterpenos, triterpenos (Li, M.H., *et al.* 2013). En 1996 se extrajeron e identificaron algunos diterpenos de la raíz de cinco especies de *Salvia* (*S. argentea*, *S. aerea*, *S. constanea*, *S. trijuga* y *S. yunnanensis*) (Yang, M., *et al.*, 1996). En otro estudio, Esquivel y col. Aislaron e identificaron, de las partes aéreas de *Salvia ballotiflora*, tres diterpenos icetexanos (Esquivel, B., *et al.* 1997).

Las plantas del género *Salvia* han contribuido como fuente de compuestos con actividad citotóxica, es el caso del diterpeno tanshinona IIA, aislado de *Salvia miltiorrhiza*, que es utilizado en la medicina tradicional China y se ha encontrado que induce apoptosis en células cancerosas humanas de colon (Su, C., 2008). En otro estudio se mostró que el extracto metanólico de las hojas y tallos de *Salvia menthifolia* inhibe el crecimiento de las células de glioblastoma por inducción de apoptosis (Fiore, G., *et al.*, 2012).

También se ha reportado que el extracto metanólico de *Salvia officinalis* (partes aéreas de la planta) presenta actividad anti-angiogénica *in vivo*. Esta actividad a su vez se asoció con la inhibición de la migración celular endotelial, por lo tanto, la inhibición de metástasis (Keshavarz, M., *et al.* 2011).

2.8. *SALVIA BALLOTIFLORA* BENTH

Salvia ballotiflora (Lamiaceae) es conocida en la medicina tradicional mexicana como mejorana (Nowick, E., 2014). La planta es un arbusto aromático multi-ramificado, sus hojas presentan márgenes dentados y tiene vellosidades en la parte superior e inferior de la planta. Las flores de *S. ballotiflora* son de color azul-púrpura y crecen en racimos alargados (Herbario San Isidro SLP., 2016), es un matorral el cual crece de 1.5 a 2 m (figura 2). Los indígenas de México la utilizaban para aliviar los síntomas de post-parto (Biblioteca de la medicina tradicional UNAM., 2016). Esta planta se encuentra principalmente distribuida en la zona sur de E.U. y norte de México.



Fig. 2.- *Salvia ballotiflora* (Lamiaceae) Benth, flor y hojas.

De esta planta se han realizado cuatro estudios científicos. El primero lo llevó a cabo Taira Z. & Watson W. en 1976 donde extrajeron el diterpeno icetexona (Fig.3a) y lo identificaron por difracción de rayos X. El segundo estudio (Esquivel, B., *et al.*1997) donde extrajeron de las partes aéreas de la planta, tres diterpenos icetexanos: 19-deoxiicetexona, 19-deoxiisoicetexona y 7,20-dihidroanastomosina, cuyas estructuras (Fig. 3b, c, d) fueron elucidadas por espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13 y protón (RMN ^{13}C y ^1H), e Infrarrojo. En el tercer

estudio realizado (Pérez S. y col., 2013) se aisló la 19-deoxiicetexona (Fig. 3b), se corroboró su estructura por difracción de rayos X y se encontró que este compuesto presentó actividad antidiarreica. El último estudio encontrado sobre esta planta fue realizado por Cárdenas N. y col. en 2015, se obtuvieron aceites esenciales de las partes aéreas de la planta, presentando actividad insecticida.

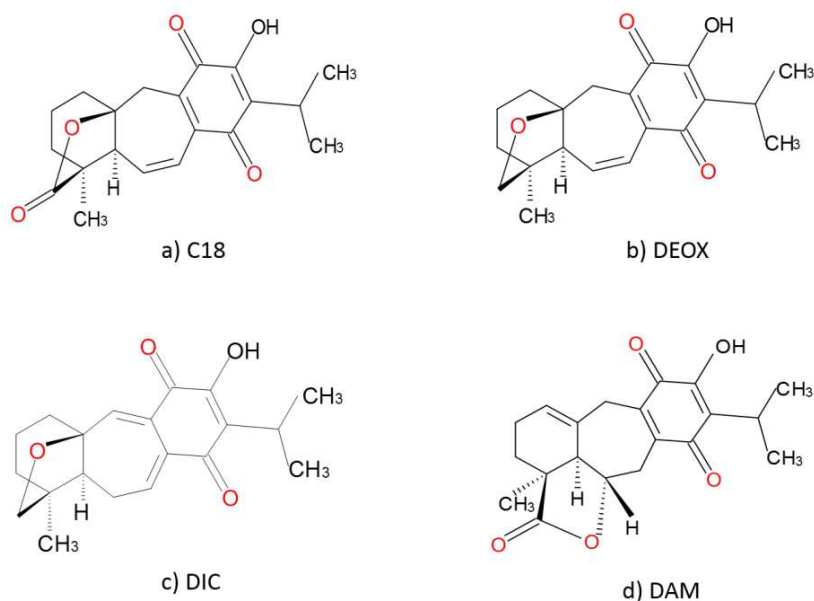


Fig. 3.- Estructuras de diterpenos extraídos de *S. ballotiflora*: a) Ictetexona (C18), b) 19-deoxiicetexona (DEOX), c) 19-deoxiisocetexona (DIC) y d) 7,20-dihidroanastomocina (DAM).

El desarrollo y descubrimiento de nuevas moléculas que puedan ser candidatas para el tratamiento del cáncer es de gran importancia debido a que durante el tratamiento de esta enfermedad se requiere el uso de compuestos que sean citotóxicos en células cancerosas y no causen daño o reacciones adversas al organismo que lo padece. Con base en los estudios reportados, una fuente para la obtención de estos compuestos, son las plantas del género *Salvia* así como también los compuestos extraídos de ellas. Por ello es importante evaluar los diterpenos extraídos de *Salvia ballotiflora* ya que podrían ser candidatos potenciales para el tratamiento del cáncer, así como también pueden presentar la característica de ser más potentes y menos tóxicos. De acuerdo a lo mencionado anteriormente, en el presente estudio se aislaron e identificaron, por métodos espectroscópicos, los

diterpenos: Icetexona (C18), 19-deoxiicetexona (DEOX), 19-deoxiisoicetexona (DIC) y 7,20-dihidroanastomosina (DAM) de *S. ballotiflora*, para que posteriormente se evaluará su actividad citotóxica y la presencia de caspasa 3 como marcador de apoptosis.

3. HIPÓTESIS

Los terpenos aislados de diferentes plantas del género *Salvia* presentan actividad citotóxica en líneas celulares de cáncer. Por lo tanto los diterpenos 19-deoxiicetexona, Icetexona, 19-deoxiisoicetexona y 7,20-dihidroanastomocina aislados de *Salvia ballotiflora* presentarán actividad citotóxica en las línea celulares HeLa (cáncer cérvicouterino), MCF7 (cáncer de mama), CT26 (cáncer de colón murino) y A549 (cáncer de pulmón).

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Aislar, caracterizar y determinar la actividad citotóxica de los diterpenos de *Salvia ballotiflora* Benth.

4.2. Objetivos específicos

- Aislar los diterpenos 19-deoxiicetexona, 19-deoxiisoicetexona y 7,20-dihidroanastomocina de *S. ballotiflora*.
- Caracterizar la estructura de los tres diterpenos por métodos espectroscópicos.
- Determinar la actividad citotóxica de los diterpenos en 4 líneas celulares cancerígenas: HeLa, MCF7, CT26 y A549.
- Determinar si la vía de muerte celular es por presencia de caspasa 3 en la línea celular más susceptible a la actividad citotóxica de los diterpenos.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Extracción e identificación de los diterpenos de *S. ballotiflora*

5.1.1. Colecta de *Salvia ballotiflora*.

Salvia ballotiflora fue colectada en el municipio Guadalcazar en el estado de San Luis Potosí, México en noviembre del 2014. Se realizó la poda ecológica de las partes aéreas de la planta (flores, hojas y tallos), y fue identificada por el taxónomo José García Pérez. Un espécimen (SLPM43014) se depositó en el herbario Isidro Palacios de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

5.1.2. Elaboración del extracto de *Salvia ballotiflora*.

Las partes aéreas de *Salvia ballotiflora* se dejaron secar a temperatura ambiente a la sombra, posteriormente fue molida. En dos matraces balón se agregó la planta molida y a cada uno se le agregó cloroformo y metanol. Ambos matraces se calentaron a temperatura de ebullición durante 4 horas. Al finalizar el tiempo se filtró el cloroformo y el metanol al vacío y el disolvente se eliminó a presión reducida. El rendimiento obtenido del extracto en relación a la planta molida fue de 5.07% para el clorofórmico y de 13.4 % para el metanólico. Los extractos obtenidos se lavaron con hexano, para eliminar las grasas presentes, se eliminó el disolvente a presión reducida y se obtuvo un rendimiento de 1.82% para el extracto clorofórmico y 6.6% para el extracto metanólico lavado con hexano.

5.1.3. Extracción y aislamiento de los tres diterpenos por cromatografía en columna abierta.

El extracto clorofórmico se sometió a una separación por cromatografía en columna abierta empacada con sílica gel 60 (fase estacionaria), se usó hexano como fase móvil y se incrementó la polaridad con acetato de etilo. Se obtuvieron 39 fracciones

las cuales se fueron monitoreando con cromatografía en placa fina. En las fracciones donde se precipitaron sólidos se eliminó el disolvente y los sólidos fueron lavados con hexano, que después fue eliminado. Los sólidos se disolvieron con cloroformo, ya disueltos se filtraron para eliminar cualquier residuo presente y se dejó evaporar el cloroformo para cristalizar los sólidos. Los diterpenos se obtuvieron en las fracciones con las siguientes proporciones de hexano-acetato de etilo: 19-deoxicetexona en 90:10, 7,20-dihidroanastomosina 85:15%, Icetexona en 85:15%, 80:20% y 19-deoxiisocetexona 80:20%. También se obtuvo una mezcla de ácido ursólico y ácido oleanólico, en las fracciones de hexano-acetato de etilo 70:30, 65:35, 60:40 y 50:50%.

5.1.4. Identificación de los compuestos extraídos de *Salvia ballotiflora*

Los diterpenos obtenidos se identificaron por métodos espectroscópicos como Resonancia Magnética Nuclear (RMN), Infrarrojo (IR) y Ultravioleta (Uv-Vis). A los sólidos que cristalizaron se les determinó la difracción de rayos X, los datos cristalográficos se obtuvieron de un difractómetro Oxford Gemini- Atlas con radiación Cu K α ($\lambda=1.54184\text{\AA}$) a temperatura de 298 K. Para la obtención de la espectroscopia de RMN se utilizó un equipo marca Agilent DD2 de 600MHz, se obtuvieron los espectros de carbono trece (C^{13}) y protón (H^1) a una temperatura de 299K, las muestras se disolvieron en cloroformo deuterado ($CDCl_3$). Para la obtención de los espectros de IR se utilizó un espectrofotómetro con ATR integrado, marca Perkin Elmer Paragon 1000 IR. En la obtención de la absorbancia de cada muestra se usó un espectrofotómetro Shimadzu modelo de doble haz UV-Vis-1800. Las muestras se disolvieron en cloroformo grado analítico. A cada uno de los compuestos se les determinó punto de fusión, y solubilidad, también se le describió su aspecto físico.

5.2. Cultivo celular

Las líneas celulares cancerígenas de tipo HeLa (cáncer cérvico-uterino), MCF 7 (cáncer de mama) y A549 (cáncer de pulmón) y CT26 (cáncer de colon murino) se referenciaron de la American Type Culture Collection (ATCC).

Las células se sembraron en Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino y antibióticos (100 unidades/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomicina) y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂.

5.3. Evaluación de Viabilidad

Se decantó el medio DMEM de las cajas de cultivo donde se encontraban las células crecidas, posteriormente se enjuagaron con 1 mL de buffer de sales de fosfato (PBS) y se les agregó 1 mL de una solución de tripsina 0.05% y EDTA 10 mM, y se dejó por 5 minutos a 37°C y 5% de CO₂, después, se les adicionó medio (500 µL DMEM) a las células y se resuspendieron para depositarlas en tubos Ependorff y centrifugar a 4000 rpm por 5 minutos. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y el paquete celular fue resuspendido en 1 mL de medio DMEM. Se contaron las células en una cámara de Neubauer para resembrarlas en cajas de 96 pozos (cada pozo contenía 5000 células) y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 24 horas para permitir su adherencia. Después se formaron los diferentes grupos de estudio:

- Grupo control (células sin tratamiento, sólo vehículo).
- Grupo control positivo (células tratadas con cisplatino (CDDP)).
- Grupo de prueba (células tratadas con los extractos clorofórmico y metanólico lavados, a concentraciones de 12.5 µg/mL a 200 µg/mL y diterpenos DEOX, DIC, DAM, y C18 a concentraciones de 1 a 100 µM).

Las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 48 horas.

Posteriormente se agregaron 10 µL por pozo de una solución de MTT (Bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2, 5-difeniltetrazol) (5 mg/ml) y las células se incubaron por

3 horas para medir la formación de cristales de formazán. Enseguida, el sobrenadante se eliminó y se añadieron 100 μ L de DMSO para solubilizar los cristales de formazán a temperatura ambiente. Terminado el procedimiento se determinó la densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm (Mosmann, T., 1983) El porcentaje de viabilidad se obtuvo de la siguiente manera

$$\% \text{ de Viabilidad} = \frac{\text{DO células tratadas}}{\text{DO células control}} \times 100$$

La citotoxicidad (% inhibición de crecimiento celular) se calculó obteniendo la diferencia de 100 menos la diferencia del % de viabilidad.

$$\% \text{ inhibición de crecimiento celular} = 100 - \% \text{ de viabilidad}$$

Cada ensayo se realizó seis veces. Con los valores obtenidos se calculó, mediante un análisis de regresión lineal, la concentración necesaria para inhibir el crecimiento del 50% de la población celular CI_{50} .

5.4. Determinación de caspasa 3 por medio de un ensayo colorimétrico.

Para la determinación de la presencia de caspasa 3, se utilizó el kit de CaspACE™ Assay System, Colorimetric, de la marca Promega, siguiendo el protocolo G7220 proporcionado por el proveedor.

5.4.1. Preparación de los extractos celulares

En cajas de 48 pozos se sembraron 8×10^4 células por pozo y se incubaron por 24 horas a 37°C y 5% de CO_2 . Después se cambió el medio de cultivo por medio nuevo. Posteriormente se adicionaron los siguientes tratamientos en cada pozo:

- **Control:** células sin tratamiento (vehículo).
- **Inductor de apoptosis:** células tratadas con inductor de apoptosis (CDDP (3.2 μ M)).
- **Compuesto a evaluar:** células tratadas con el compuesto de prueba.

-
- **Inhibidor de apoptosis:** células tratadas con inhibidor de apoptosis (reactivo del Kit de caspasa promega: Z-VAD-FMK (50 μ M). El inhibidor se agregó al mismo tiempo con el inductor de apoptosis CDDP (3.2 μ M).

Las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ por 48 horas con los tratamientos. Terminado el tiempo de incubación, se retiró el medio de cultivo y las células de cada grupo fueron extraídas con una solución de tripsina 0.05% y EDTA 10 mM; la solución se centrifugó por 450 xg por 10 minutos a 4°C. El paquete celular resultante se resuspendió en 200 μ L de buffer para lisis celular proporcionado por el kit Caspace Promega. Y se centrifugó a 15000 xg por 20 min a 4°C y el sobrenadante colectado se utilizó como extracto celular a evaluar. Los extractos celulares se almacenaron a -70°C.

5.4.2. Evaluación de la presencia de caspasa 3

Se descongelaron los extractos celulares y cada uno se resuspendió en buffer para ensayo de caspas proporcionado por el kit Caspace Promega. En cajas de 96 pozos se adicionó a cada pozo el volumen equivalente a 25 μ g de proteína de los extractos celulares (con ayuda de la elaboración de curva de albúmina). Los grupos de estudio se formaron como se muestra en la Tabla 2.

En cada pozo se adicionaron 2 μ L de sustrato específico de caspasa 3 (DEVD-pNA, 10mM) incluido en el Kit de Caspasa de promega. El sustrato DEVD está marcado con el cromóforo pNA. Cuando en la muestra existe presencia de caspasa 3, ésta escinde el cromóforo pNA del sustrato DEVD y se produce un color amarillo. La coloración amarilla producida por la escisión es proporcional a la presencia de caspasa 3 activa presente en la muestra. La placa se incubó a 37°C por 4 horas, terminado el tiempo, las placas se leyeron a una absorbancia de 405 nm. Con las absorbancias obtenidas, se calculó el porcentaje de caspasa 3 presente en la muestra.

Tabla 2.- Grupos de estudio de los diferentes extractos celulares

Reactivos \ Controles	Blanco	Control Negativo	Control de Apoptosis inducida	Control de Apoptosis inhibida	Control de Apoptosis de prueba	Control de Apoptosis de prueba con inhibidor
Buffer del ensayo de caspasa	32 µL	32 µL	32 µL	32 µL	32 µL	32 µL
DMSO	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
DTT, 100 mM	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL	10 µL
Extracto de células sin tratamiento (vehículo)	-----	X µL	-----			
Extracto de células con inducción de apoptosis (CDDP)	-----	-----	X µL	-----	-----	-----
Extracto de células con inhibidor de apoptosis (CDDP + Inhibidor de Caspasa 3)	-----	-----	-----	X µL	-----	-----
Extracto de células con diterpeno 19-deoxiisocetexona (DIC)	-----	-----	-----	-----	X µL	-----
Extracto de células con diterpeno 19-deoxiisocetexona (DIC) + Inhibidor de Caspasa.	-----	-----	-----	-----	-----	X µL
Agua desionizada para volumen final	98 µL	98 µL	98 µL	98 µL	98 µL	98 µL

6.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1.- Estudio fitoquímico del extracto clorofórmico de *Salvia ballotiflora* Benth.

Del extracto clorofórmico de *S. ballotiflora* se obtuvieron cuatro diterpenos: 19-deoxiicetexona (DEOX), Icetexona (C18), 19-deoxiisocetexona (DIC) 7, 20-dihidroanastomocina (DAM) y una mezcla de dos triterpenos: ácido ursólico y ácido oleanólico. En la tabla 3 se muestran los rendimientos obtenidos.

Tabla 3.- Rendimientos de extracto y compuestos obtenidos de *S. ballotiflora*

Compuestos obtenidos de <i>S. ballotiflora</i>	Cantidad	Rendimiento %	Polaridad: Hexano-Acetato de Etilo
Planta seca y molida	528 g	-----	-----
Extracto clorofórmico	26.8 g	5.07%	
Extracto lavado con hexano (ECL)	9.6 g	1.82 %	
19-deoxiisocetexona (DEOX)	22.5 mg	0.00426 %	90:10
7, 20-dihidroanastomocina (DAM)	10.8 mg	0.00204%	85:15
Icetexona (C18)	4.7 mg	0.00089%	80:20
19-deoxiisocetexona (DIC)	13.5 mg	0.0026%	80:20
Mezcla de ácido ursólico y ácido oleanólico	79 mg	0.0149 %	70:30 65:35 60:40 50:50

El extracto clorofórmico se lavó con hexano y fue separado por cromatografía en columna donde se utilizó hexano-Acetato de etilo, aumentado la polaridad. A diferencia de la metodología de Esquivel y col., quién utilizó acetona para la obtención del extracto y para su separación por cromatografía en columna,

ocuparon una mezcla de petróleo-acetato de etilo, aumentando la polaridad. Durante la extracción de los compuestos se logró establecer una metodología de separación cromatográfica en la cual los diterpenos se obtuvieron constantemente en las polaridades indicadas en la Tabla 3, sin embargo los rendimientos fueron bajos en comparación a los reportados (Esquivel, B., *et al.*, 1997).

Se determinaron las características fisicoquímicas de los compuestos obtenidos, DEOX, DIC, DAM, C18 y mezcla de triterpenos: ácido ursólico y oleanólico a los cuales se les determinó punto de fusión, solubilidad, aspecto físico y se midió su absorbancia en un espectrofotómetro (Tabla 4). En el anexo 1 se muestran las imágenes de cada uno de los compuestos obtenidos de *S. ballotiflora*.

Tabla 4.-Características de los compuestos extraídos de *S. ballotiflora*.

Características	19-deoxiicetexona (DEOX)	7, 20-dihidroanastomosina (DAM)	Icetexona (C18)	19-deoxiisocetexona (DIC)	Mezcla de ácido oleanólico y ursólico
Fórmula condensada	C ₂₀ H ₂₄ O ₄	C ₂₀ H ₂₂ O ₄	C ₂₀ H ₂₄ O ₄	C ₂₀ H ₂₄ O ₄	C ₃₀ H ₄₈ O ₃ C ₃₀ H ₄₈ O ₃
Aspecto físico	Sólido cristalino anaranjado	Sólido cristalino amarillo	Sólido cristalino anaranjado	Sólido amorfo amarillo	Sólido amorfo blanco
Solubilidad	Cloroformo	Cloroformo	Ligeramente en cloroformo	cloroformo	DMSO
Punto de fusión	203-205°C	210 - 214°C	210-214°C	208 – 210°C	221 – 220°C
Absorbancia por UV	324 y 447 nm	271 – 408 nm	317 y 437	273 y 410 nm	-----

Se encontró que C18 no era totalmente soluble en cloroformo ya que se necesitó calentar el disolvente para poderlo solubilizar. En cuanto a su puntos de fusión existe una variación en lo reportado por Esquivel y col., ya que ellos encontraron que el p.f. para DEOX era de 220-230°C, y en este estudio se encontró que fue de 203-205°C, cabe destacar que el punto de fusión se probó con el sólido cristalino al que se le realizó difracción de rayos X por lo tanto el dato obtenido es fiable.

6.2. Espectroscopia de IR y RMN de ^1H y ^{13}C

Para la identificación de compuestos extraídos de plantas u otras fuentes naturales o sintéticas es importante que se utilicen métodos espectroscópicos que ayuden a la identificación y caracterización de estos (Görög, S. & Szántay, C., 2010). En el presente estudio se realizó la caracterización y corroboración de las moléculas de cada uno de los compuestos extraídos de *S. ballotiflora*, obteniendo los espectros de IR para ver la presencia de los grupos funcionales, posteriormente se obtuvieron los espectros de RMN ^1H y ^{13}C para la identificación de estructural hidrogeno y carbono. Para difracción de Rayos X se realizó en compuesto cristalinos.

6.2.1. Espectroscopia de IR de las moléculas DEOX, C18, DIC, DAM y mezcla de triterpenos.

En la Tabla 5 se muestran las señales obtenidas de los espectros de IR, correspondientes para cada diterpeno extraído de *S. ballotiflora*, así como los datos ya reportados por Esquivel y col. en 1997. De acuerdo con los resultados obtenidos se logró rectificar la presencia de los grupos funcionales marcados por la literatura comparados con los obtenidos en el presente estudio.

Tabla 5.- Espectroscopia de Infrarrojo, señales características de los diterpenos aislados de *S. ballotiflora*.

Grupos funcionales	DEOX cm^{-1}		DIC cm^{-1}		DAM cm^{-1}		C18 cm^{-1}	
	Exp.	Rep.	Exp.	Rep.	Exp.	Rep.	Exp.	Rep.
Experimental / Reportado								
-OH	3347.57	3348	3140.05	3446	3355.96	3410	3350.17	-----
C=O	1746.72	1649	1672.70	1694	1769.51	1770	1728.86	-----
	1627.58	1640	1633.42			1639	1625.80	
C=C	1595.83	1601	1609.51	1600	1623.91	1640 1608	1595.26	-----
C-O	1249.70	-----	1214.05	-----	1214.20	-----	1250	-----

En el apartado de anexos (anexos 2 a 5) del presente trabajo se muestran los espectros obtenidos de los diterpenos aislados de *S. ballotiflora*, en los cuales se

observó las señales correspondientes a los estiramientos que se presentan en los grupos hidroxilo (-OH) que se encuentran en el intervalo de 3500-3200 cm^{-1} , De igual forma se identificaron las bandas correspondientes a los carbonilo de quinona (C=O), en el intervalo de 1650-1750 cm^{-1} ; también se observó una vibración de estiramiento en C-O, localizado entre 1000-1200 cm^{-1} . Otra banda característica para estos diterpenos son las referentes a los estiramientos de los dobles enlaces C=C, que se observan en el intervalo 1600-1670 cm^{-1} .

Cabe mencionar que también se obtuvo el espectro de IR de la mezcla de triterpenos (Figura 4), en el cual se muestran las señales correspondientes a carbonilos de ácidos (C=O) en 1688.11 cm^{-1} ., así como la señal correspondiente al estiramiento del hidroxilo con una señal en 3347.04 cm^{-1} , otra banda característica para estos triterpenos son las referentes a los estiramientos de los dobles enlaces C=C, que se observan en 1453 cm^{-1} , y los estiramientos en C-O en 1025.10 cm^{-1} .

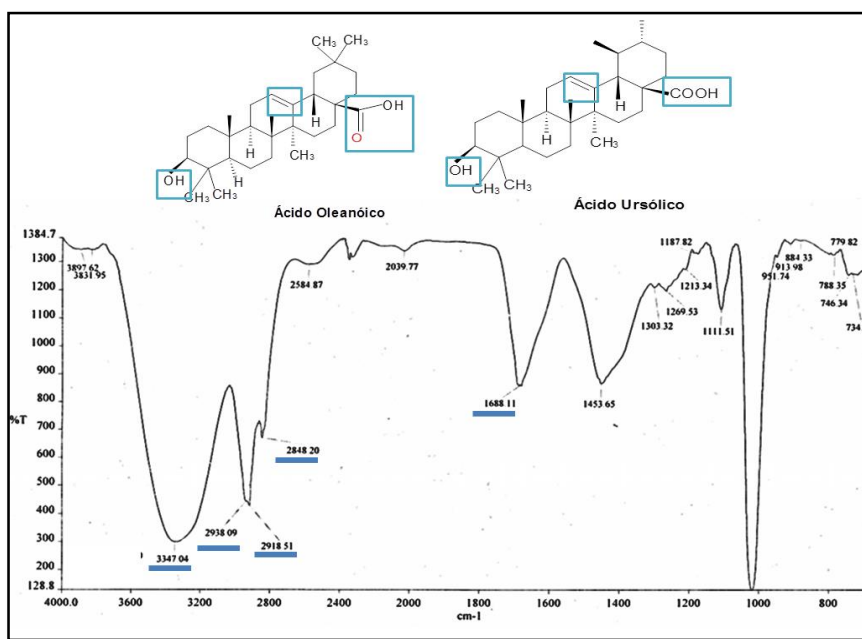


Fig. 4.- Espectro de Infrarrojo de la mezcla de dos triterpenos (ácido Oleanólico y ursólico)

6.2.2. Espectroscopia de RMN de ^1H y ^{13}C de las moléculas

DEOX, C18, DIC y DAM

A continuación se muestran los desplazamientos químicos (δ) de RMN de ^1H y ^{13}C para cada uno de los diterpenos extraídos de *S. ballortiflora*. En la figura 5 y 6 se muestra el espectro de RMN de ^1H y ^{13}C de la DEOX, para DIC, C18 y DAM los espectros se muestran en los anexos 6 a 13 del presente trabajo.

Para DEOX se presentaron los siguientes desplazamientos químicos.

Tabla 6.- Desplazamiento químicos de RMN de ^1H y ^{13}C de 19-deoxiicetexona.

Desplazamientos químicos de protón δ ppm DEOX		Desplazamientos químicos de carbono δ ppm DEOX		
Posición	δ ppm	Posición	δ ppm	
1	1.70	1	39.88	CH ₂
1	1.76	2	20.19	CH ₂
2	1.68	3	39.19	CH ₂
2	1.89	4	43.90	CH
3	1.50	5	59.30	CH
3	1.57	6	141.82	CH
5	2.31	7	124.13	CH
6	6.51	8	135.63	C
7	6.81	9	139.95	C
15	3.22	10	92.91	CH
16	1.24	11	183.31	C=O
17	1.23	12	150.75	C-OH
18	1.04	13	124.48	C
19 R	3.70	14	186.54	C=O
19 S	3.50	15	24.30	CH
20 α	2.59	16	19.92	CH ₃
20 β	2.99	17	19.88	CH ₃
OH	7.26	18	20.03	CH ₃
		19	77.72	CH ₂
		20	33.23	CH

De acuerdo al espectro de ^1H RMN de la molécula DEOX, los desplazamientos químicos (δ) característicos de la molécula (Tabla 6) son 2.31 ppm correspondiente al protón de la posición 5, el cual se acopla con el protón de la posición 6, por lo que se presenta la señal de un doblete. También se distinguen las señales características de protones de alqueno, que se encuentran en la posición 6 y 7 (δ 6.51 ppm y 6.81 ppm). Las señales correspondientes al isopropilo de las posiciones 15, 16 y 17 se muestra, en la posición 15, un septuplete a un δ de 3.22 ppm y los

metilos que se encuentran en la posición 16 y 17 presentan un δ de 1.24 y 1.23 ppm, respectivamente. En la misma zona del espectro se ve el metilo de la posición 18, en donde se muestra un singulete con δ de 1.04 ppm. Otra señal en la que se indica la presencia del protón correspondiente al hidroxilo es el singulete en δ de 7.26 ppm. Las señales en 3.70 ppm y 3.50 ppm corresponden a los protones de la posición 19R y 19S, y en el caso de la posición 20 se muestran los δ para 20 α y 20 β , donde se presentan las señales correspondientes a δ de 2.59 y 2.99 ppm respectivamente.

En el espectro de RMN ^{13}C se observaron 20 señales. Los δ de 183.25 ppm y 186.47 ppm correspondientes a los 2 carbonos de las posiciones 11 y 14 correspondientes a carbonilo (C=O). También muestra la presencia del carbono unido al grupo hidroxilo con un δ de 150.75 ppm.

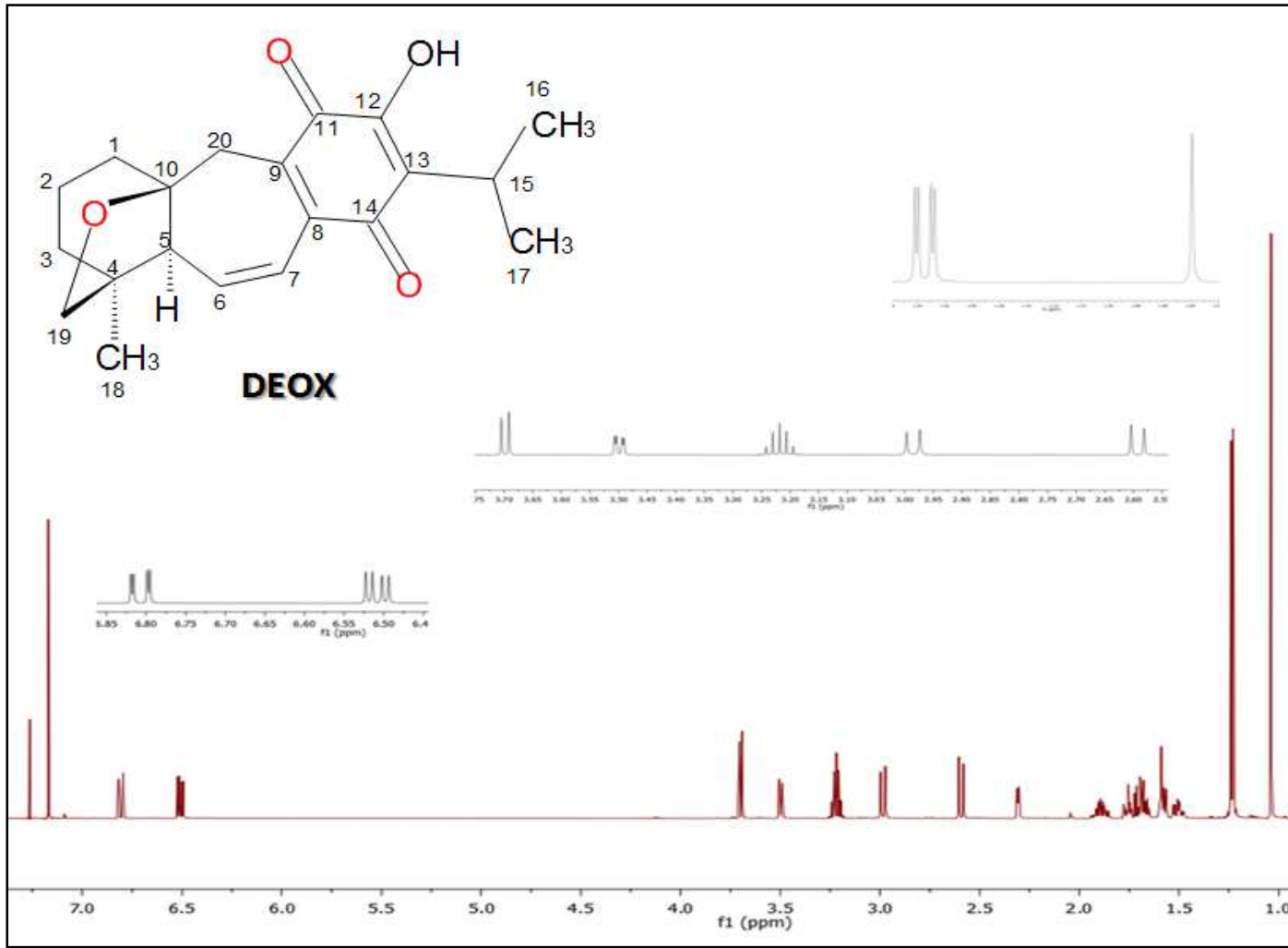


Fig. 5.-Espectro de RMN de H^1 de 19-deoxiicetexona.

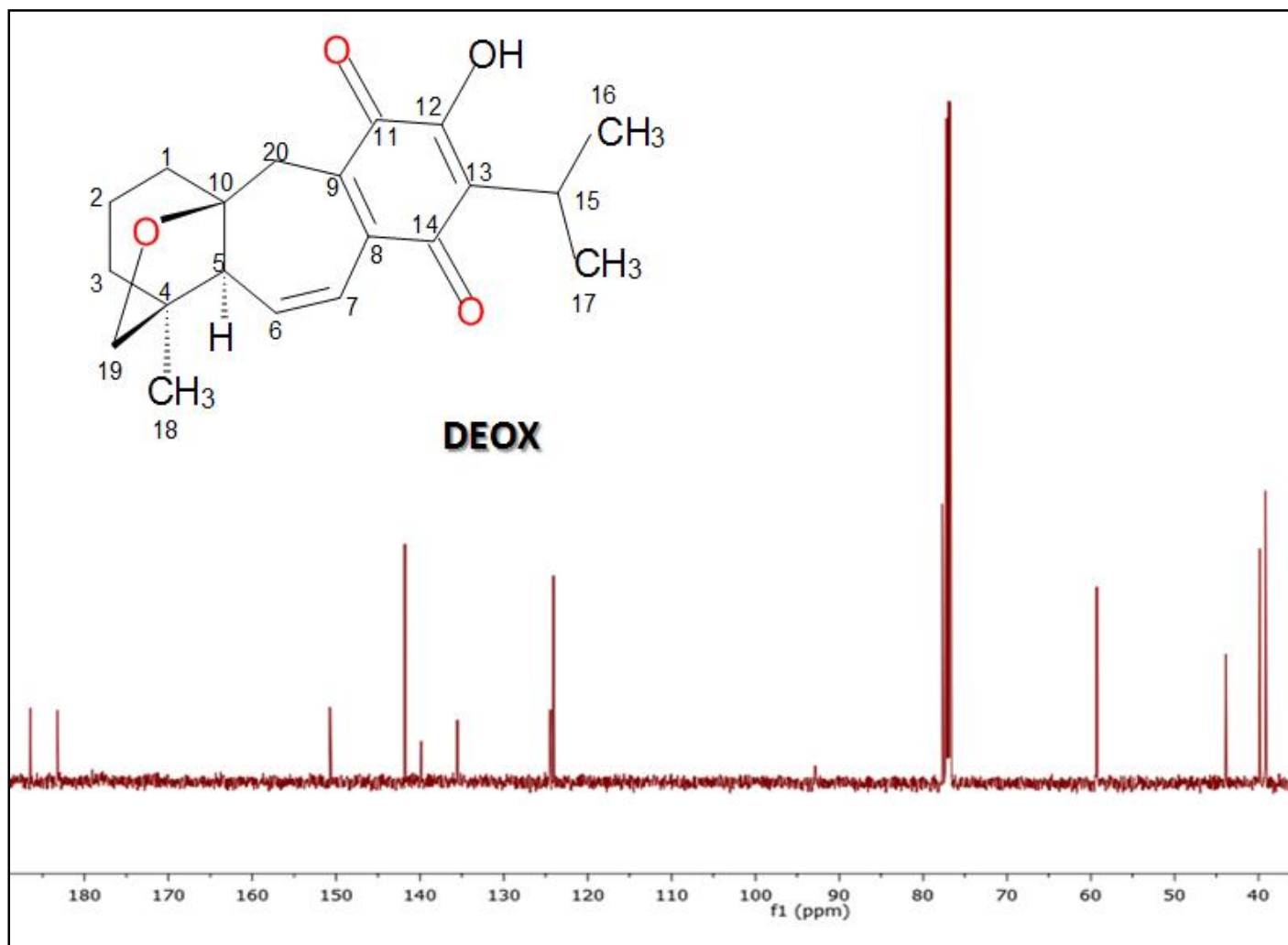


Fig. 6.- Espectro de RMN de C¹³ de 19-deoxiacetona.

Para el diterpeno icetexona se obtuvieron los espectros de RMN ^1H y ^{13}C (ANEXOS 8 y 9), los desplazamientos químicos correspondientes a la molécula se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7.- Desplazamientos químicos de RMN de ^1H y ^{13}C de la icetexona.

Desplazamientos químicos de protón δ ppm C18		Desplazamientos químicos de carbono δ ppm C18		
Posición	δ ppm	Posición	δ ppm	
1	1.79	1	35.57	CH ₂
1	2.01	2	19.48	CH ₂
2	1.77	3	35.97	CH ₂
2	1.85	4	47.67	CH
3	1.60	5	57.68	CH
3	1.78	6	138.84	CH
5	2.56	7	125.36	CH
6	6.43	8	133.62	C
7	6.86	9	140.53	C
15	3.22	10	92.15	CH
16	1.24	11	182.80	C=O
17	1.23	12	150.78	C-OH
18	1.26	13	125.13	C
20 α	2.80	14	185.63	C=O
20 β	3.17	15	24.39	CH
OH	7.14	16	19.88	CH ₃
		17	18.85	CH ₃
		18	18.20	CH ₃
		19	178.74	C=O
		20	32.69	CH

De acuerdo con el espectro de RMN ^1H de C18, se observan los δ correspondientes a protones de alquenos de la posición 6 y 7 en 6.43 ppm y 6.83 ppm respectivamente. Para los protones del isopropilo se muestra un septuplete ($\delta = 3.22$ ppm) para el protón de la posición 15 el cual se acopla con los dos metilos vecinos de las posiciones 16 ($\delta = 1.25$ ppm) y 17 ($\delta = 1.23$ ppm). Los desplazamientos correspondientes a los protones α y β del metileno de la posición 20, se encuentran a δ de 2.80 ppm y 3.17 ppm respectivamente. Otra señal característica de la molécula es el singulete del protón de hidroxilo, a $\delta = 7.14$ ppm.

En el espectro de RMN ^{13}C , se observan los 20 δ correspondientes a los carbonos de la molécula. Se muestra los δ correspondientes a los carbonilos de las posiciones 11, 14 y 19 (182.80, 185.63 y 178.74 ppm).

En la Tabla 8 se muestran los δ correspondientes a DIC, los espectros de RMN ^1H y ^{13}C se presentan en el apartado de anexos 10 y 11 del presente trabajo.

Tabla 8.- Desplazamientos químicos de RMN de ^1H y ^{13}C de la 19-deoxiisocetexona.

Desplazamientos químicos de protón δ ppm DIC		Desplazamientos químicos de carbono δ ppm DIC		
Posición	δ ppm	Posición	δ ppm	
1	1.26	1	38.09	CH ₂
1	1.87	2	20.03	CH ₂
2	1.70	3	38.88	CH ₂
2	1.89	4	46.19	CH
3	1.38	5	55.12	CH
3	1.57	6	25.24	CH
5	1.55	7	143.83	CH
6 α	1.86	8	125.96	C
6 β	2.62	9	131.99	C
7	7.40	10	85.95	CH
15	3.35	11	182.56	C=O
16	1.23	12	154.66	C-OH
17	1.24	13	131.88	C
18	1.11	14	184.54	C=O
19 α	3.51	15	24.94	CH
19 β	3.77	16	19.34	CH ₃
20	7.26	17	19.40	CH ₃
OH	7.59	18	19.52	CH ₃
		19	73.73	CH ₂
		20	145.02	CH

Para los espectros de RMN ^1H de DIC, se presentaron las señales correspondientes a los hidrógenos α y β de la posición 6 con δ de 1.86 ppm y 2.62 ppm, respectivamente. Otras de las señales características de esta molécula son las de los protones correspondientes a alquenos de la posición 7 y 20, a δ de 7.40ppm y de 7.26 ppm. Debido a que este diterpeno es isomero de DEOX, nuevamente se presentan un septuplete a δ de 3.35 ppm correspondiente a los protones del isopropilo, y para los protones de metilo de la posición 16 el desplazamiento es de 1.23 ppm y para el protón

de la posición 17 es de 1.24 ppm, así como también se presentó la señal correspondiente al metilo de la posición 18 con un δ de 1.09 ppm. De igual manera se presentó el singulete con un δ de 7.59 ppm correspondiente al protón de hidroxilo.

En cuanto a las señales correspondientes a carbono se muestran los 20 carbonos correspondientes a DIC. También se muestran los δ (182.56 ppm y 184.54 ppm) correspondientes a los carbonos de carbonilo de las posiciones 11 y 14. También se muestra la presencia del carbono correspondiente a la posición 12 el cual está unido a un hidroxilo (-OH) en δ de 154.66 ppm.

En la Tabla 9 se muestran los δ de los espectros de ^1H y ^{13}C de RMN de DAM.

Tabla 9.- Desplazamientos químicos de RMN de ^1H y ^{13}C de la 7,20-dihidronastomocina

Desplazamientos químicos de protón δ ppm DAM		Desplazamientos químicos de carbono δ ppm DAM		
Posición	δ ppm	Posición	δ ppm	
1	5.69	1	123.72	CH ₂
5	2.38	2	21.30	CH ₂
6	3.82	3	24.42	CH ₂
7 α	2.48	4	41.77	CH
7 β	4.15	5	57.37	CH
15	3.23	6	78.46	CH
16	1.22	7	30.72	CH
17	1.23	8	139.69	C
18	1.27	9	142.32	C
20 α	2.76	10	125.52	CH
20 β	4.09	11	183.27	C=O
OH	7.09	12	149.99	C-OH
		13	128.08	C
		14	185.14	C=O
		15	24.73	CH
		16	19.81	CH ₃
		17	19.84	CH ₃
		18	20.12	CH ₃
		19	180.26	CH ₂
		20	33.0	CH

De la molécula de DAM se obtuvieron los δ correspondientes a los protones de alqueno de la posición 1, con δ de 5.69 ppm. Se mostraron también los δ correspondientes a los protones de las posiciones 7(H α y H β) y 20(H α y H β) de CH₂, se presentaron las señales para 7H α un δ de 2.48 ppm y para 7H β un δ de 4.15 ppm. De igual forma se

observaron para $^{20}\text{H}\alpha$ un δ de 2.76 ppm y para $^{20}\text{H}\beta$ un δ de 4.09 ppm. Otro grupo característico de esta molécula que se logró observar fueron los protones del isopropilo, la señal característica del protón de la posición 15 en donde se ve un septuplete a un δ de 3.23 ppm y un doblete para cada metilo de la posición 16 ($\delta=1.22$) y 17 ($\delta=1.23$), de igual forma se presentó la señal correspondiente al metilo de la posición 18 con un δ de 1.27 ppm. También se mostró un singulete en δ de 7.09 correspondiente al grupo hidroxilo.

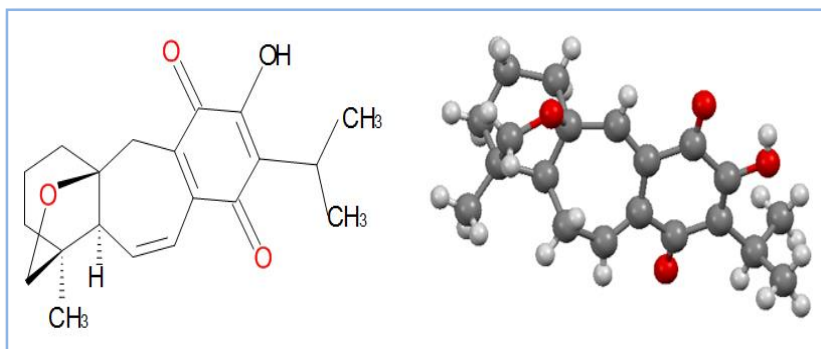
De acuerdo al análisis de los espectros, se logró realizar la asignación completa de las cuatro moléculas con ayuda de los experimentos de COSY, HMBC y HSQC, obtenido en RMN. En comparación con Esquivel y col. que sólo obtuvieron los espectros de protón y carbono trece.

6.2.3.-Difracción de rayos X de C18 y DEOX

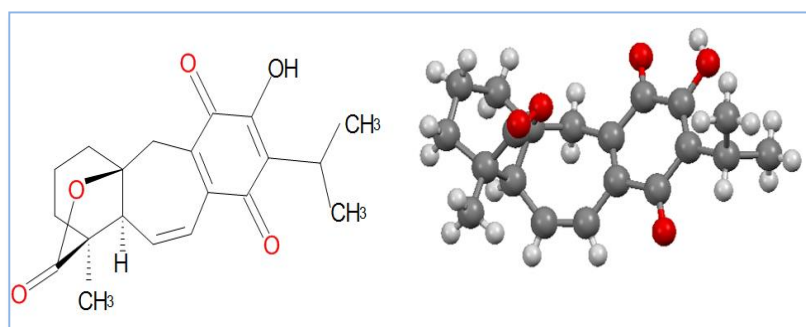
La difracción de rayos X proporcionó los siguientes datos de los cristales DEOX y C18 (Figura 7). En el apartado de ANEXOS 14 y 15 del presente trabajo se muestra el análisis completo de las moléculas.

DEOX: Fórmula condensada $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_4$, $T=293(2)\text{ K}$, $\text{Cu K}\alpha\lambda=1.54184\text{ \AA}$, Sistema Ortorrómico cristalino, grupo espacial $\text{P}2_12_12_1$, dimensiones de la unidad de celda: $a=7.7141(1)\text{ \AA}$, $b=10,5176(2)\text{ \AA}$ y $c=20,7343(3)\text{ \AA}$, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$, $V=1682,25(5)\text{ \AA}^3$, $Z=4$, $D_x=1.297\text{ mg m}^{-3}$, $\mu=0.72\text{ mm}^{-1}$ y $F(000) = 704$. Reflexiones acumuladas: 12117; reflexiones independientes: 3443 en un $\theta_{\text{max}} = 77.1^\circ$ y $\theta_{\text{min}} = 4,3^\circ$ ($-6 \leq h \leq 9$, $-13 \leq k \leq 13$, $-26 \leq l \leq 25$). Índices final R (todos los datos), $R1 = 0,045$ y $wR2 = 0.121$.

C18: Fórmula condensada $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_5$, $T=293(2)\text{ K}$, $\text{Cu K}\alpha\lambda=1.54184\text{ \AA}$, Sistema Ortorrómico cristalino, grupo espacial $\text{P}2_12_12_1$, dimensiones de la unidad de celda: $a=7.7397(2)\text{ \AA}$, $b=10,3811(4)\text{ \AA}$ y $c=21.0299(9)\text{ \AA}$, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$, $V=1682,25(5)\text{ \AA}^3$, $Z=4$, $D_x=1.346\text{ mg m}^{-3}$, $\mu=0.789\text{ mm}^{-1}$ y $F(000) = 728$. Reflexiones acumuladas: 32803; reflexiones independientes: 3430 en un $\theta_{\text{max}} = 77.1^\circ$ y $\theta_{\text{min}} = 4,3^\circ$ ($9 \leq h \leq 9$, $12 \leq k \leq 12$, $26 \leq l \leq 26$). Índices final R (todos los datos), $R1 = 0,0419$ y $wR2 = 0.0811$.



a) DEOX



b) C18

Fig. 7.- Estructura obtenida por difracción de Rayos X de las moléculas 19-deoxicetexona e icetexona.

Con respecto a DIC, no se realizó difracción de rayos X debido a que no cristalizó, sin embargo se logró verificar su estructura con ayuda de los espectros de RMN e IR.

De acuerdo con la espectroscopia de infrarrojo y de RMN se consiguió determinar y diferenciar las moléculas de cada uno de los compuestos aislados de *Salvia ballotiflora*. Sin embargo con los resultados de la difracción de rayos X de C18 y DEOX se confirmó la identidad de estas moléculas.

Ya que se determinó y corroboró las estructuras de los diterpenos, se continuó con la evaluación de la actividad citotóxica en las diferentes líneas celulares cancerígenas.

6.3.- Evaluación de la actividad citotóxica por el método de MTT de ECL, EML, DEOX, DIC, DAM y C18 en líneas celulares cancerígenas: HeLa, MCF7, CT26 y A549.

Se evaluó la actividad citotóxica de los extractos metanólico y clorofórmico lavados con hexano (EML y ECL) de *S. ballotiflora* en la línea celular HeLa con la finalidad de determinar cuál de los extractos presenta mejor actividad citotóxica y continuar con su estudio. En la Figura 8 se muestra el porcentaje de viabilidad celular de HeLa tratada con diferentes concentraciones de EML y ECL.

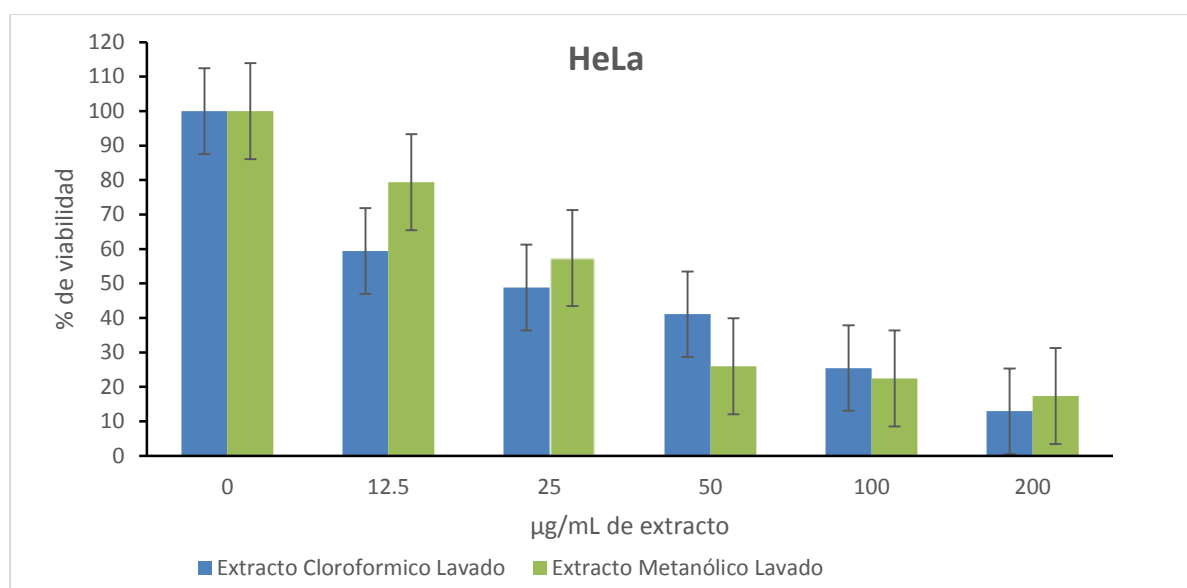


Fig. 8.- Actividad citotóxica de los extractos metanólico y clorofórmico lavados con hexano.

En la gráfica se muestra que a concentraciones de 12.5 µg/mL, 25 µg/mL y 200 µg/mL de ECL la viabilidad celular fue de 59.42%, 48.82% y 12.94% por lo que fue menor en comparación con el EML el cual presentó 79.40%, 57.37% y 17.32% de viabilidad respectivamente.

También se determinó la CI_{50} de cada extracto la cual fue de 23.79 µg/mL para el ECL y de 33.06 µg/mL para el EML. Con base en los parámetros establecidos por el CNI sobre las CI_{50} para compuestos puros y extractos (Suffness, M., & Pezzuto, J. M., 1990). El ECL presentó la mejor actividad citotóxica ya que su CI_{50} calculada fue menor a 30 µg/mL por lo que se continuó trabajando con ECL, obteniendo de este extracto

los diterpenos DEOX, C18, DIC y DAM. Sin embargo no se realizó la evaluación de los triterpenos extraídos (ac. ursólico y ac. oleanólico) debido a que existen varios reportes de estos compuestos en donde indican su buena actividad citotóxica, como es el estudio realizado por Yan, S. y col. en 2010, donde encontraron que estos triterpenos inducen apoptosis en líneas celulares cancerígenas humanas como son: HepG2, Hep3B, Huh7 y HA22T, comparadas con una línea celular no cancerosa L-02 y concluyen que son agentes anticancerígenos potentes para causar apoptosis en las líneas celulares utilizadas sin dañar las células no cancerígenas. (Yan, S. *et al.*, 2010)

Los diterpenos identificados fueron evaluados en diferentes líneas celulares, en primera estancia se evaluó la viabilidad en células J774 A.1 (macrófagos de murino) y posteriormente en líneas celulares de tipo cancerígenas. También se calculó su IC₅₀ para cada compuesto y para cisplatino fármaco con actividad citotóxica conocida. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

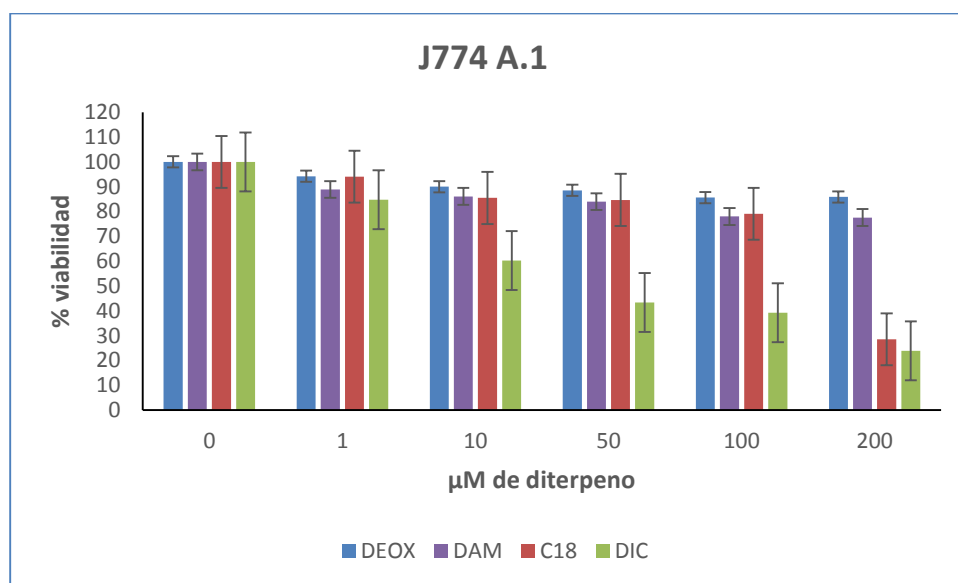


Fig. 9.- Viabilidad en línea celular J774A.1 (macrófagos de murino) de los diterpenos extraídos de *S. ballotiflora*.

Tabla 10. CI_{50} de los diterpenos evaluados en la línea celular J774A.1 (macrófagos).

Tratamiento	CI_{50}
DEOX	>500 μ M
DIC	25.77 \pm 6.75 μ M
	8.81 μ g/mL
DAM	>500 μ M
C18	141.78 \pm 4.69 μ M
	48.48 μ g/mL
CDDP	1821.57 μ M
	548.292 μ g/mL

Como se muestra en la Figura 9 la viabilidad de las células tratadas es mayor en DEOX, DAM que en DIC y C18 ya que presentaron una menor viabilidad. En la Tabla 10 se muestran las CI_{50} de cada uno de los diterpenos y de cisplatino (CDDP) fármaco con actividad citotóxica ya conocida.

En las Figuras 10 a la 13 se muestra el porcentaje de viabilidad de cada una de las líneas celulares tratadas con cada una de las moléculas extraídas de *S. ballotiflora*.

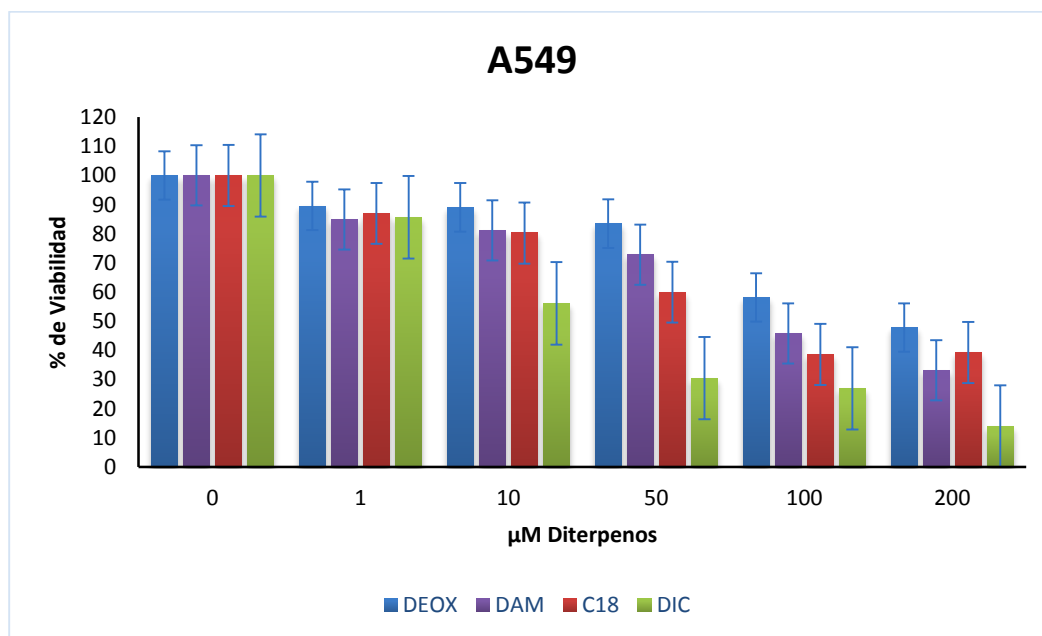


Fig.10. Viabilidad en línea celular A549 (cáncer de pulmón) de los diterpenos extraídos de *S. ballotiflora*.

En la Figura 10 se muestra la viabilidad de A549 tratada con los 4 diterpenos, se puede observar que las células tratadas con DIC son las que presentaron menor viabilidad, en comparación con DEOX seguidas de DAM y C18. Para cada compuesto se calculó su CI_{50} , siendo DIC el que presentó la menor CI_{50} (14.95 $\mu\text{M}/\text{mL}$) con respecto a los demás compuestos.

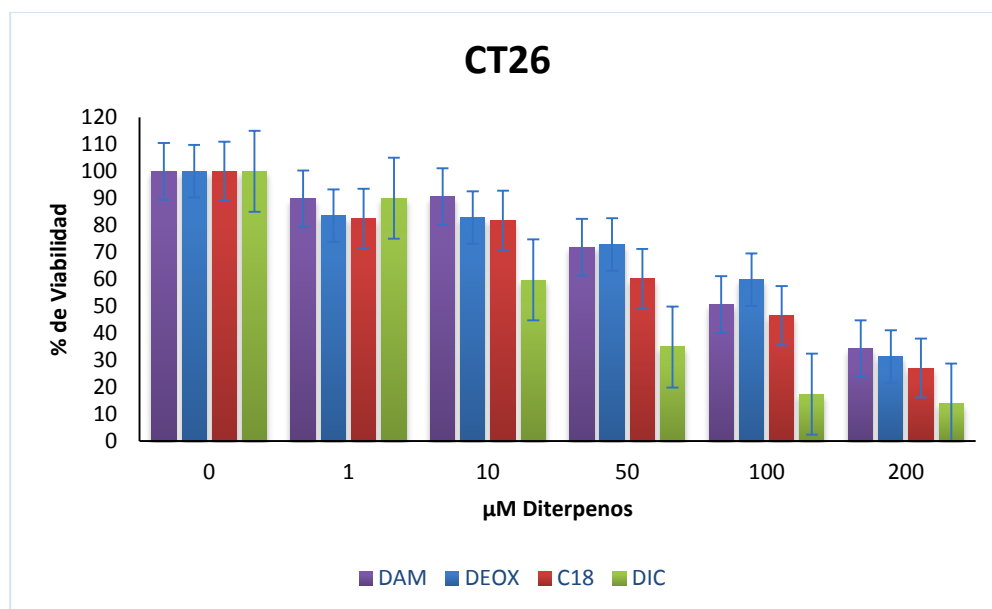


Fig. 101.- Viabilidad en línea celular CT26 (cáncer de colon murino) de los diterpenos extraídos de *S. ballotiflora*.

La evaluación de viabilidad en la línea celular CT26 con los diterpenos (Figura 11), se muestra que el compuesto DIC es el que indujo menor viabilidad con respecto a los demás compuestos, así como también su CI_{50} (18.05 μM) fue la más baja con respecto a los demás compuestos.

En la Figura 12 se muestra la viabilidad en las células HeLa tratadas con los diterpenos extraídos, donde se puede apreciar nuevamente que DIC inhibe el crecimiento celular con respecto a los demás compuestos, de igual forma al obtener las IC_{50} de cada compuesto, DIC fue la menor (43.49 μM).

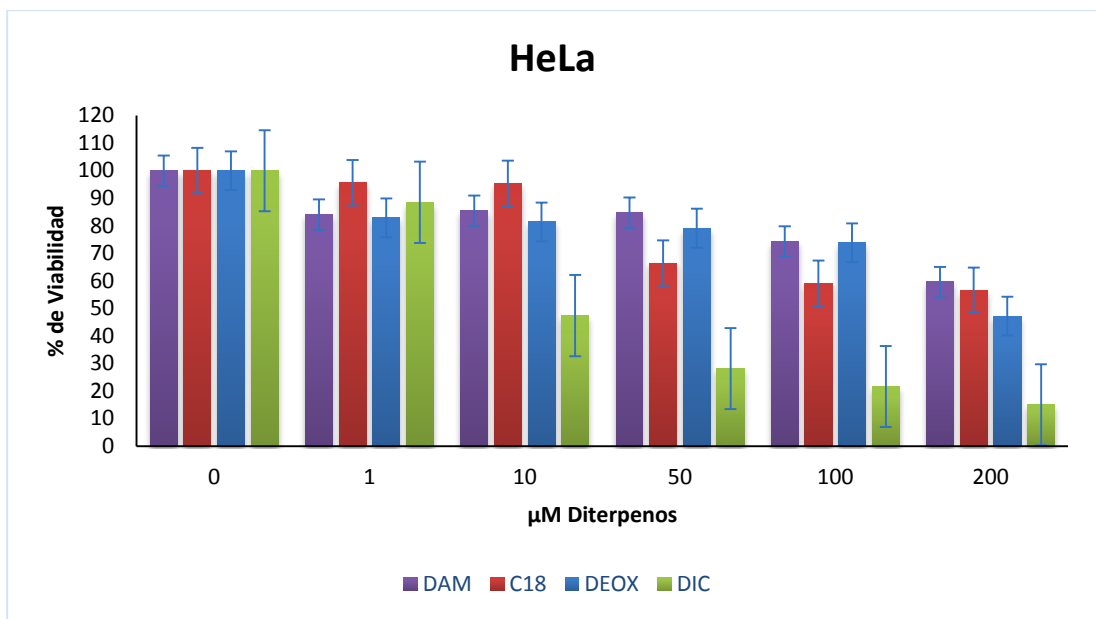


Fig. 11.- Viabilidad en línea celular HeLa (cáncer cervicouterino) de los diterpenos extraídos de *S. ballotiflora*.

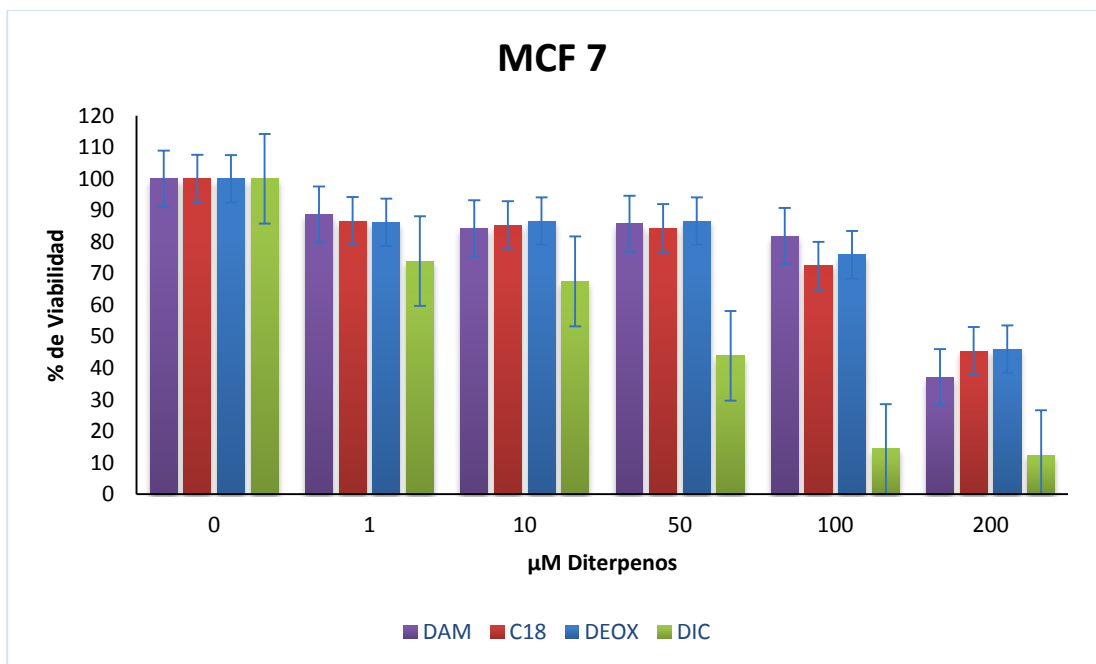


Fig. 12.- Viabilidad en línea celular MCF 7 (cáncer de mama) de los diterpenos extraídos de *S. ballotiflora*.

En la evaluación de viabilidad de la línea celular MCF-7 (Figura 12), se observó nuevamente a DIC como el compuesto que presentó mayor inhibición del crecimiento

celular en comparación con los demás compuestos, ya que reduce la viabilidad celular a partir de la concentración de 50 μM . Se calculó su CI_{50} (43.49 μM) la cual fue la menor en comparación de las de DEOX, DAM y C18.

De acuerdo con los porcentajes de viabilidad de las líneas celulares tratadas (Figuras 10 a 13), DIC presentó mayor porcentajes de inhibición de crecimiento celular en las líneas de tipo cancerígenas.

Con los datos obtenidos se realizó una curva de concentración - respuesta (Anexo 16) y con ella se determinó la CI_{50} de DEOX, DIC, C18 y DAM en las líneas celulares de tipo cancerígenas A549, CT26, HeLa y MCF7, también se realizó en células no cancerígenas J774A.1. En la Tabla 11 se muestran las CI_{50} obtenidas para cada compuesto en las líneas celulares.

Tabla 11.- CI_{50} de cada diterpeno extraído de *S. ballotiflora*

LÍNEA CELULAR	CI_{50} DE TRATAMIENTOS μM $\mu\text{g/mL}$			
	DEOX	DIC	DAM	C18
A549 Pulmón	176.20 \pm 9.3	14.95 \pm 2.9	107.21 \pm 4.6	74.63 \pm 7.3
	60	5.11	36.66	25.52
CT26 Colon	132.43 \pm 2.3	18.05 \pm 2.5	114.41 \pm 7.4	85.39 \pm 6.54
	45.29	6.17	39.13	29.203
HeLa Cérvico-uterino	202.66 \pm 2.6	9.36 \pm 1.9	280.77 \pm 1.3	377.62 \pm 2.45
	69.30	3.201	96.02	129.15
MCF 7 Mama	199.60 \pm 1.3	43.49 \pm 3.6	177.07 \pm 6.1	190.90 \pm 4.07
	68.26	14.87	60.56	62.29
J774A.1 Macrófagos	≥ 5000	25.77 \pm 5.2	≥ 5000	141.78
	≥ 1000	8.81	≥ 1000	48.48

En la Tabla 11 muestra que DIC presenta mayor potencia comparado con los demás diterpenos (CI_{50} de 3.201 $\mu\text{g/mL}$). De acuerdo con el parámetro establecido por el CNI, DIC se puede clasificar como una molécula con actividad citotóxica. Por lo tanto, se

continuó con la evaluación de presencia de caspasa 3 como indicador de apoptosis en las células tratadas con DIC.

Los resultados de citotoxicidad obtenidos con los diterpenos de *S. ballotiflora* son similares a los obtenidos con los diterpenos thashinona IIA y cryptotashinona, obtenidos de *S. miltiorrhiza*, a los cuales se les atribuyó su actividad apoptótica (Jung, J., 2013).

Sin embargo cabe destacar que existen estudios de compuestos y extractos obtenidos de plantas que se les ha evaluado la actividad citotóxica y han presentado CI_{50} mayores a los parámetros establecido por el CNI (extractos $\leq 30 \mu\text{g/mL}$ y compuestos puros $\leq 4 \mu\text{g/mL}$) (Suffness, M., & Pezzuto, J. M., 1990). En el Estudio De Oliveira, P. y col. en 2015 realizaron el estudio del diterpeno Manool aislado de *Salvia officinalis* Linneo, en donde evaluaron la actividad citotóxica de este diterpeno en diferentes líneas celulares de tipo cancerígenas. Dos de las líneas utilizadas fue HeLa en la cual presentó una CI_{50} de $6.7 \pm 1.1 \mu\text{g/mL}$ y MCF-7 donde su CI_{50} fue de $17.7 \pm 0.8 \mu\text{g/mL}$ (De Oliveira, P., *et al.*, 2015). De acuerdo con los parámetros establecido por el CNI, no se consideraría un compuesto citotóxico; sin embargo, en ese estudio se concluye que si los es.

Otro estudio en donde las CI_{50} son mayores a las establecidas por CNI muestra que seis diterpenos labdanos extraídos de *Salvia reuterana* Boiss tienen actividad citotóxica, menor y mayor, en HeLa a CI_{50} de 16.60 ± 0.49 y $59.41 \pm 1.33 \mu\text{g/mL}$ y para MCF-7 la CI_{50} fueron de $32.65 \pm 1.15 \mu\text{g/mL}$ y $62.07 \pm 2.01 \mu\text{g/mL}$ (Farimani, M. & Miran, M., 2014). Con base en esta información, se podría confirmar la actividad citotóxica, no sólo de DIC en HeLa, también sería en las otras líneas celulares evaluadas. De igual forma, los compuestos DEOX, C18 y DAM se categorizarían como compuestos con actividad citotóxica.

Es importante mencionar que con los resultados obtenidos de la evaluación de citotoxicidad, en las cuatro líneas celulares de tipo cancerígenas y en la no cancerígena (macrófagos J774 A.1), se calculó el índice terapéutico, el cual fue de 2.7,

es decir, que se necesita casi tres veces la Cl_{50} de DIC, para dañar células no cancerosas.

6.4. EVALUACIÓN DE LA PRESENCIA DE CASPASA 3 PARA ACTIVAR APOPTOSIS

Se utilizó un Kit de **CaspACE™ Assay System, Colorimetric Promega** para determinar la presencia de caspasa 3. La apoptosis es un tipo de muerte celular que ayuda a mantener la homeostasis en los organismos vivos; esta es regulada por un grupo de genes. En este tipo de muerte la célula empaqueta el contenido citoplasmático, formando pequeños cuerpos apoptóticos, evitando la liberación del contenido intracelular y la inflamación. La caspasa 3 juega un rol importante en este proceso ya que funciona como una caspasa efectora y por ella se lleva a cabo la activación de apoptosis (Porter, A., & Janicke, R., 1999).

Para este ensayo fue utilizada la Cl_{50} de CDDP y de DIC en HeLa. La Figura 14, presenta al CDDP como 100% de referencia en caspasa 3 y se comparó con DIC, del cual sólo se obtuvo el 18% de caspasa 3.

En la Figura 15 se muestran las imágenes de células HeLa no tratadas y tratadas con CDDP y DIC. En ellas se logró observar la morfología celular.

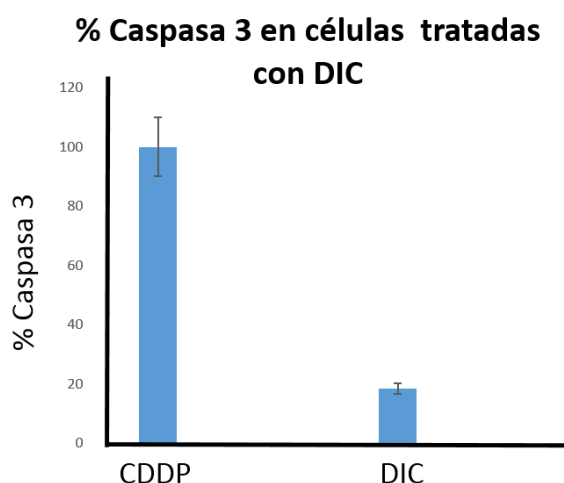


Fig. 13. Caspasa 3 presente en células HeLa tratadas con DIC.

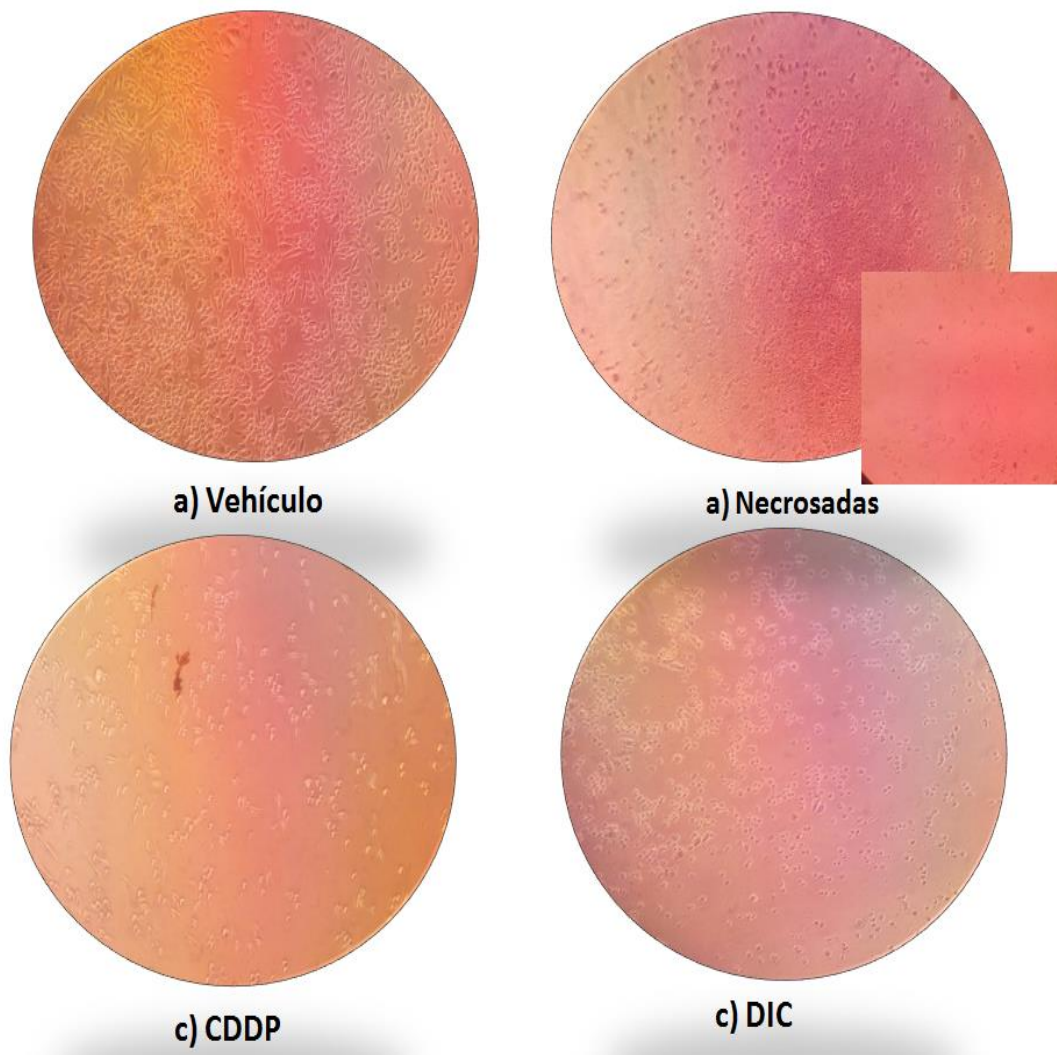


Fig. 14. Células HeLa a 10X, con los diferentes tratamientos: a) Vehículo, b) Necrosadas, c) CDDP y d) DIC.

En la Figura 16 se observa la diferencia entre células necrosadas, células en apoptosis y células en crecimiento. En el grupo de células control (sin tratamiento) se logró ver la morfología fibroblástica y una mayor confluencia de células. A diferencia del grupo de células tratadas con CDDP donde se observaron los cuerpos celulares circulares, en la superficie se presentó una menor cantidad de células. También se compró con el grupo de células tratadas con DIC en las cuales se logró observar una disminución en la confluencia celular, espacios en la superficie de crecimiento. Todos estos grupos se compararon con los un grupo de células con necrosis, en las cuales se observó el

medio de cultivo ligeramente turbio y la morfología de la célula se deforma, debido a que la membrana se encuentra rota y el material intracelular se observó en el medio de cultivo.

Con base en los resultados obtenidos se considera necesario establecer otros ensayos del tipo molecular para determinar el mecanismo de activación de DIC en células de tipo cancerosas, ya que a pesar de que el porcentaje de caspasa 3 es de 18%, la morfología de la célula indica que la muerte celular es por apoptosis y no por necrosis.

También es recomendable evaluar la actividad antitumoral para determinar en un organismo vivo el efecto farmacológico en un organismo más complejo.

7. CONCLUSIONES

Se aislaron e identificaron los diterpenos 19-deoxiisoicetexona, 19-deoxiicetexona, 7,20-dihidroanastomocine y la icetexona, así como también se aisló una mezcla de ácido ursólico y ácido oleanólico.

Con base en los parámetros establecidos por CNI, DIC presentó actividad citotóxica en HeLa, con una CI_{50} de 3.201 $\mu\text{g/mL}$.

La vía de muerte celular no es por activación de caspasa 3. Sin embargo de acuerdo con la morfología de las células tratadas con DIC, la activación de apoptosis fue evidente.

8. PRESPECTIVAS

Se sugiere realizar diferentes técnicas moleculares para encontrar el mecanismo de acción del diterpeno DIC.

Se recomienda evaluar la actividad antitumoral del compuesto DIC.

Se recomienda estandarizar el extracto clorofórmico para evaluar su mecanismo de acción en células cancerígenas.

9. REFERENCIAS

Aguirre, M.L., Sotelo, J. 2008. Tumores cerebrales. Tomo I. Ed. Médica Panamericana. pp. 69.

Alonso, A. J., Villarreal, M. L., Salazar-Olivo, L. A., Gomez, M., Dominguez, F., & Garcia, A. 2011. Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(3)945-972.

Biblioteca digital de la Medicina Tradicional Mexicana. UNAM. http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/flora2.php?l=4&t=Salvia%20ballotiflora%20Benth&po=popoloca&id=6178&clave_region=21 (última consulta 12 de abril del 2016)

Boticario, C., Cascales, M. 2012 .Innovaciones en cáncer. Universidad Nacional de educación a distancia. pp. 50-61.

Cárdenas, N. C., González, M. M., Figueroa, R., Flores, A., Romo, D., Martínez, D. E., Pérez, V., Ramos-López, M. A. 2015. Composition of the essential oil of *Salvia ballotiflora* (Lamiaceae) and its insecticidal activity. *Molecules*, 20(5), 8048-8059.

Cragg, G. M. Newman, D.J. 2005. Plants as a source of anti-cancer agents. *Journal of Ethnopharmacology*. 100(1), 72-79.

Díaz, E., García, J. 2000. Oncología Clínica Básica. España. Ediciones ARÁN: 171-192.

De Oliveira, P. F., Munari, C. C., Nicolella, H. D., Veneziani, R. C. S., & Tavares, D. C. (2015). Manool, a *Salvia officinalis* diterpene, induces selective cytotoxicity in cancer cells. *Cytotechnology*, 1-5.

Espinosa, D., Ocegueda, S., Aguilar, C., Liorente, J., Vázquez, B. 2008. El conocimiento biogeográfico de las especies y su regionalización natural. *Capital Natural de México*. Vol. 1, 22-65.

Esquivel, B., Calderón, J., Flores, E., Sanchez, A. A., Rivera, R.R. 1997. Abietane and icetexane diterpenoids from *Salvia ballotiflora* and *Salvia axillaris*. *Phytochemistry*, 46(3). 531-534.

Esquivel, B., Sanchez, A.A., Vergara, F., Matus, W., Hernandez, S., Ramirez, M.T. 2005. Abietane diterpenoids from the roots of some Mexican *Salvia* species (Labiatae): chemical diversity, phytogeographical significance, and cytotoxic activity. *Chemistry and biodiversity*. 2(6)738-747.

Farimani, M. M., & Miran, M. 2014. Labdane diterpenoids from *Salvia reuterana*. *Phytochemistry*, 108, 264-269.

Fiore, G., Massarelli, P., Sajeve, M., Franchi, G. G. 2012. Anti-tumor activity of the methanolic extracts of *Salvia menthifolia*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 22(2). 381-387.

Fiore, G., Nencini, C., Cavallo, F., Capasso, A., Bader, A., Giorgi, G., Micheli, L. 2006. In vitro antiproliferative effect of six *Salvia* species on human tumor cell lines. *Phytotherapy Research*. 20(8). 701-703.

Herbario San Isidro Palacios. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. <http://slpm.uaslp.mx/DetalleEjemplar.aspx?id=KkBQRuj3wVo=> (última consulta 12 de abril del 2016).

Instituto Nacional de Cáncer (CNI)

<http://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario?cdrid=4402>. (Última consulta 16 de abril del 2016)

Instituto Nacional de Cáncer (CNI).

<http://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos/radioterapia/hoja-informativa-radioterapia#g1>. (Última consulta 12 de abril del 2016).

Instituto Nacional del Cáncer (NIH).

<http://www.cancer.gov/espanol/cancer/causas-prevencion/riesgo> (Última consulta 12 de abril del 2016).

Instituto Nacional del Cáncer (NIH).

<http://www.cancer.gov/espanol/cancer/tratamiento/tipos> (Última consulta 12 de abril del 2016).

Jiménez L.F., Merchant H., Vázquez, J.M. 2003. Biología celular y molecular. Ed. Pearson Educación. México. pp. 595.

Jung, J. H., Kwon, T. R., Jeong, S. J., Kim, E. O., Sohn, E. J., Yun, M., & Kim, S. H. 2013. Apoptosis induced by tanshinone IIA and cryptotanshinone is mediated by distinct JAK/STAT3/5 and SHP1/2 signaling in chronic myeloid leukemia K562 cells. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/805639>

Keshavarz, M., Bidmeshkipour, A., Mostafaie, A., Mansouri, K., Mohammadi, H. R. 2011. Anti-tumor activity of *Salvia officinalis* is due to its anti-angiogenic, anti-migratory and anti-proliferative effects. *Cell Journal*. 12(4). 477

León, A. G., Herrera, T. M., Salazar, S. E., Sánchez, D. M., Alcalá, O. R., & Barrón, L. E. 2011. Perfil epidemiológico de los tumores malignos en México. SINAIS/SINAVE/DGE/SALUD.

Li, M.H., Li, Q.Q., Liu, Y. Z., Cui, Z.H., Zhang, N., Huang, L.Q., Xiao, P.G. 2013. Pharmacophylogenetic study on plants of genus *Salvia* L. from china. *Chinese Herbal Medicines*, 5(3)164-181.

Loraine, S., & Mendoza, J.A. 2010. Las plantas medicinales en la lucha contra el cáncer, relevancia para México. *Rev. Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 41(4), 18-27.

Medina, E. A., Martínez, R. 2009. Fundamentos de Oncología. México. UNAM; Consejo Mexicano de oncología CMO. www.medigraphic.org.mx última consulta Abril 2016.

Mi, P., Pezzuto, J.M., Farnsworth, N.R., Wani, M.C., Kinghorn, A.D., Swanson, S.M. 2009. Use of the in vivo hollow fiber assay is natural products anticancer drug discovery. *Journal of Natural Products*. 72(3)573-580.

Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological Methods*. 65(1-2)55-63.

Nowick, E. 2014. Historical Common Names of Great Plains Plants, with Scientific Names Index: Volume II: Scientific Names Index. 2,374.

Organización Mundial de la Salud (OMS).

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/> (Última consulta 12 de abril del 2016).

Organización Mundial de la Salud (OMS).

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/> (Última consulta 12 de abril del 2016).

Organización Mundial de la Salud (OMS). <http://www.who.int/topics/cancer/es/> (Última consulta 12 de abril del 2016).

Pan L., Chai, H-B., Kinghorn, A. D. 2013. Discovery of new anticancer agents from higher plants. *Frontiers in Bioscience. Scholar Edition*. 4, 142-156.

Porter, A. G., & Jänicke, R. U. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 6(2), 99-104.

Rubin Philip., Williams Jaqueline P., Sigurdson Elin R., Ridge John A., Ginsberg Robert M. 2003. *Oncología clínica: Enfoque multidisciplinario para médicos y estudiantes*. Editorial Elsevier Science. 8. ed. España. ISBN 84-8174-627-4

Shoeb, M. 2006. Anticancer agents from medicinal plants. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 1(2)35-41.

Su, C.C., Chen, G. W., Chan, M.H. 2008. Growth inhibition and apoptosis induction by tanshione IIA in human colon adenocarcinoma cells. *Planta Medica*. 74(11) 1357-1362.

Yang, M. H., Blunden, G., Xu, Y. X., Nagy, G., Mathe, I. 1996. Diterpenoids from *Salvia* species. *Pharmacy and pharmacology Communications*, 2(1)69-71.

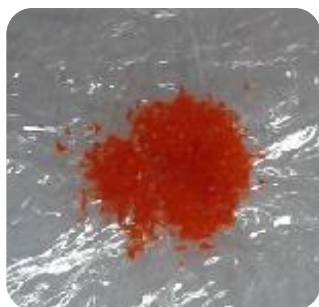
Yan, S. L., Huang, C. Y., Wu, S. T., & Yin, M. C. 2010. Oleanolic acid and ursolic acid induce apoptosis in four human liver cancer cell lines. *Toxicology in Vitro*, 24(3), 842-848.

ANEXOS

10. ANEXOS

10.1 ANEXO 1.- Sólidos obtenidos de *Salvia ballotiflora*.

DEOX



DIC



C18



DAM

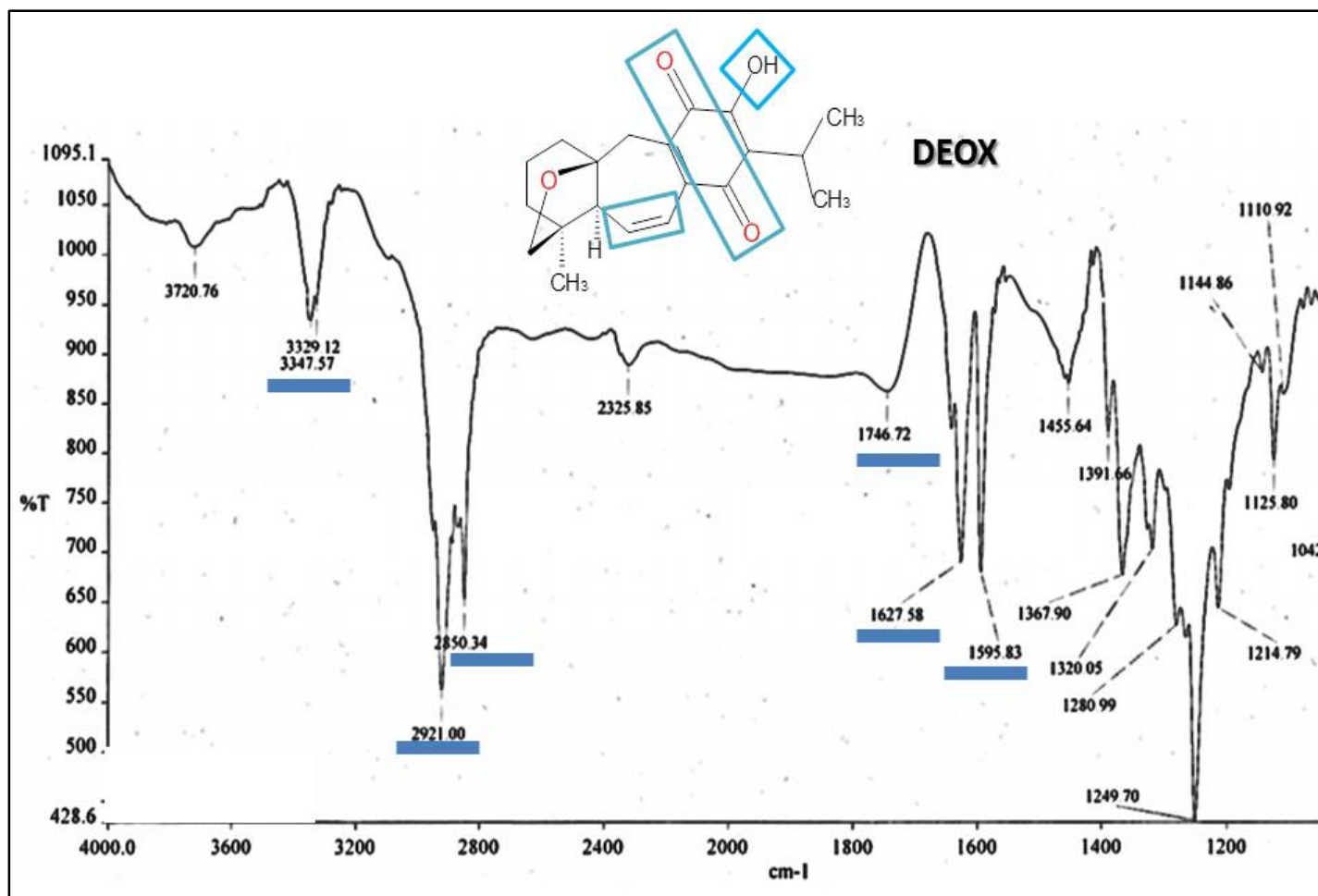


Mezcla de triterpenos



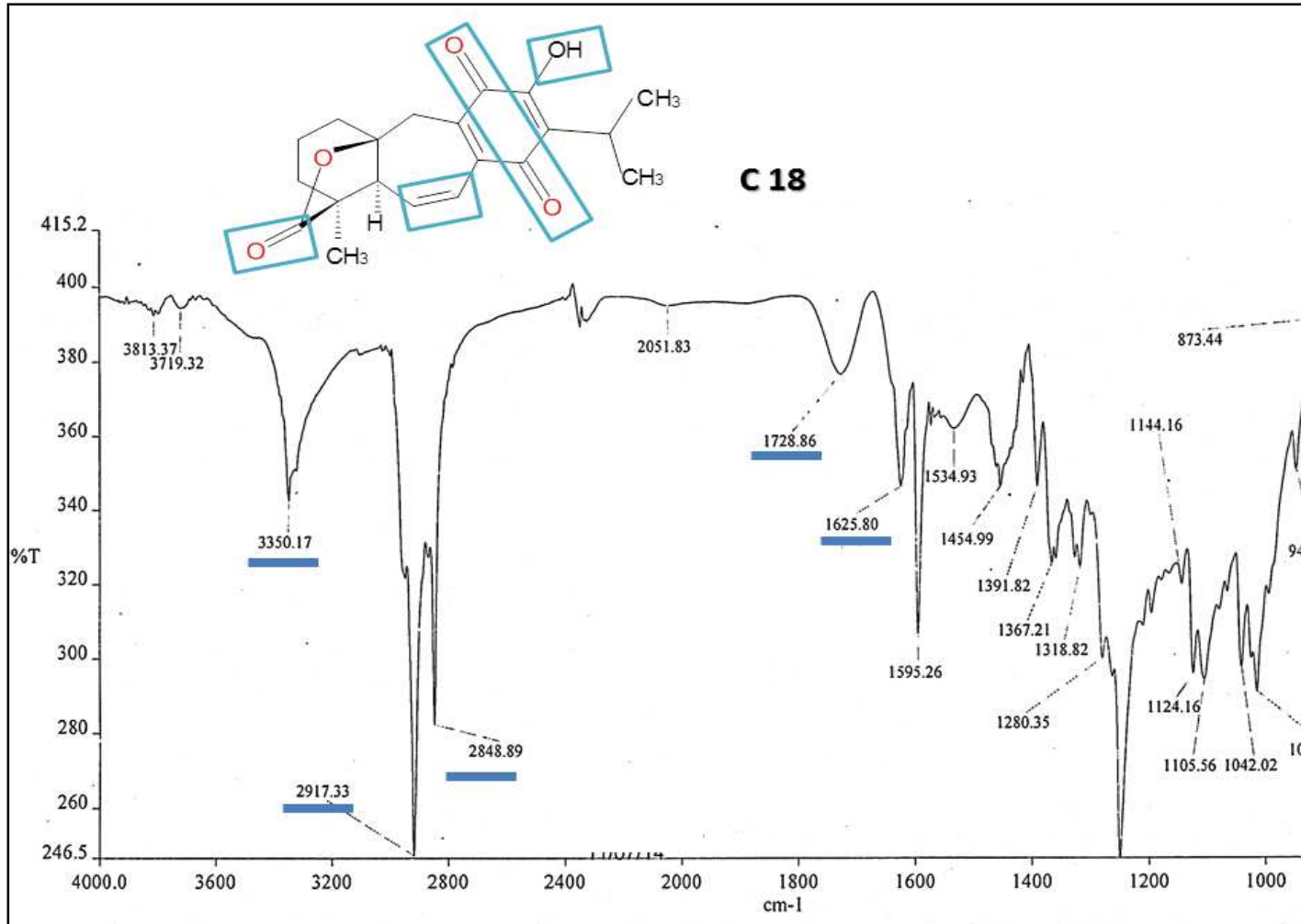
ANEXOS

10.2 ANEXO 2.- Espectro de infrarrojo de 19-deoxiicetexona (DEOX).



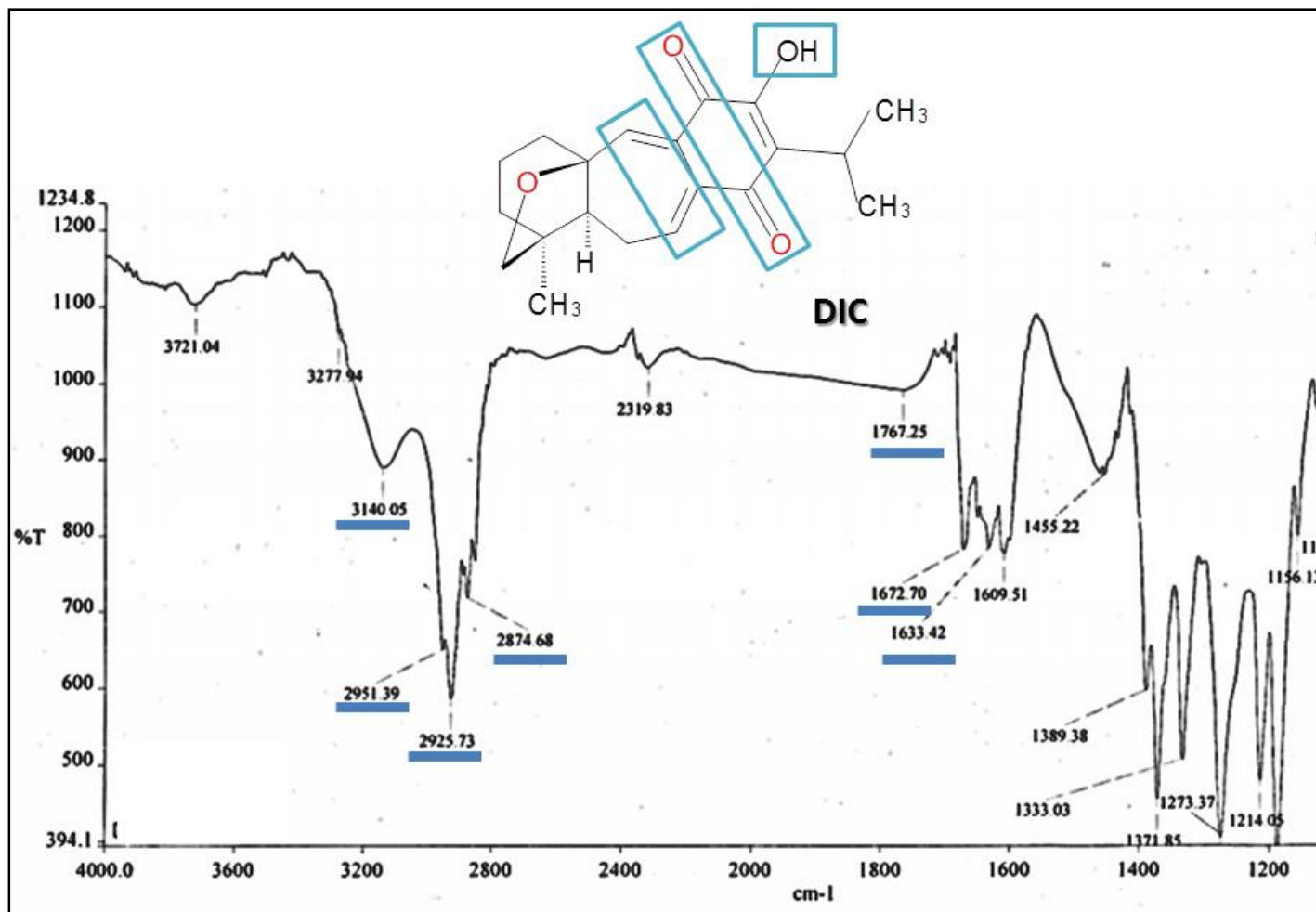
ANEXOS

10.3 ANEXO 3.- Espectro de infrarrojo de Icetexona (C18).



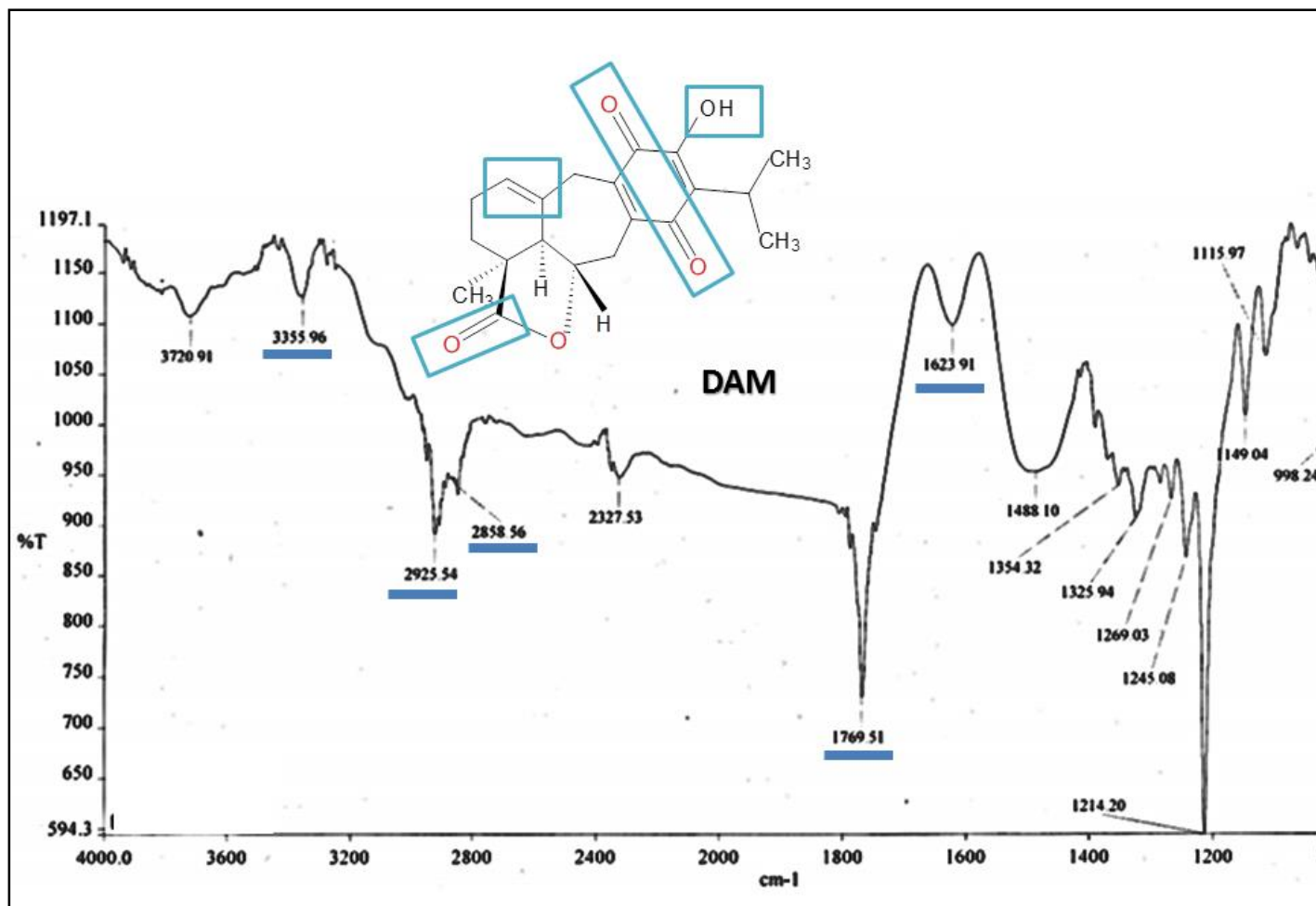
ANEXOS

10.4 ANEXO 4.- Espectro de infrarrojo de 19-deoxiisocetexona (DIC).



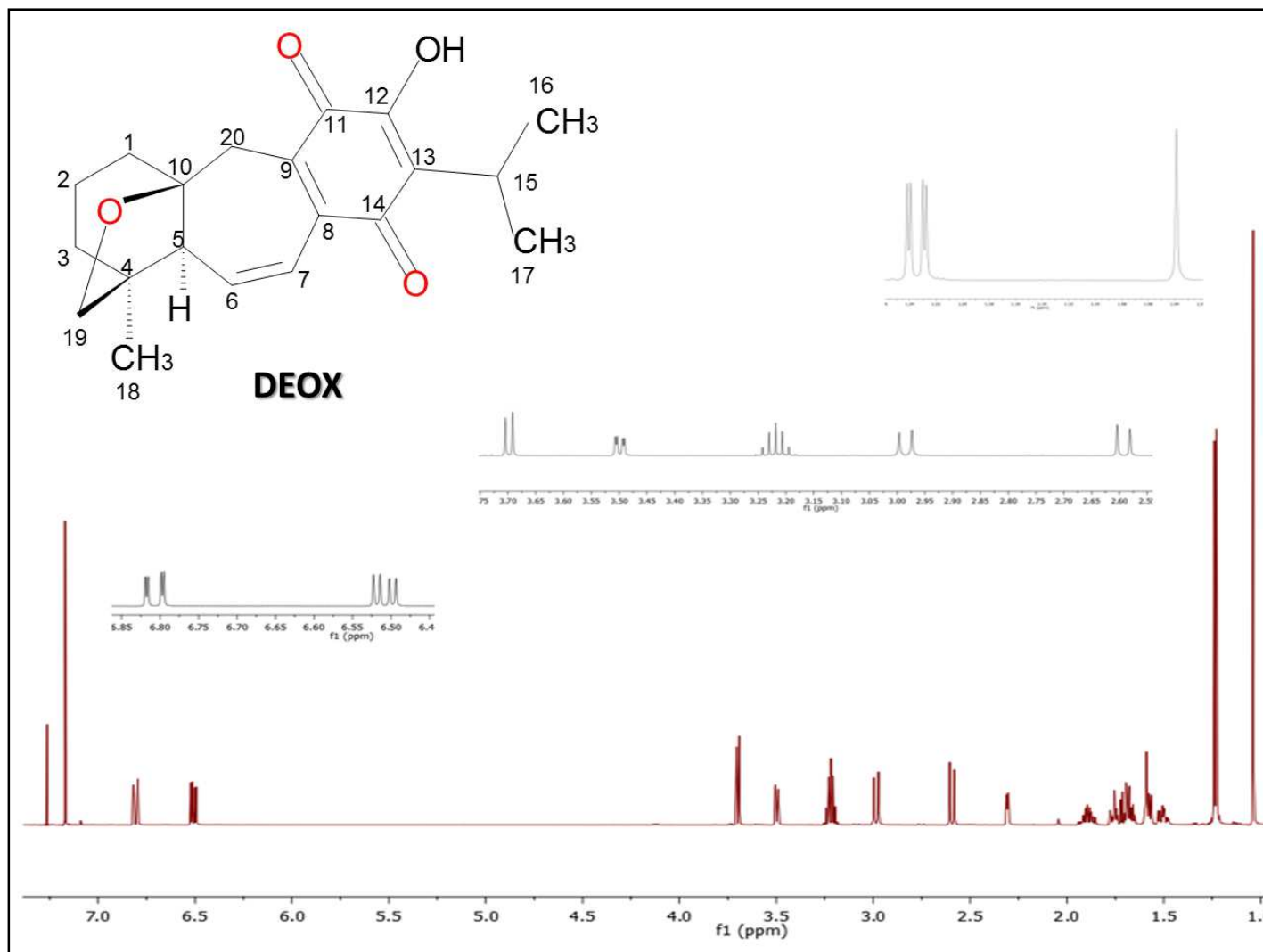
ANEXOS

10.5 ANEXO 5.- Espectro de infrarrojo de 7, 20 -dihidroanastomocina (DAM).



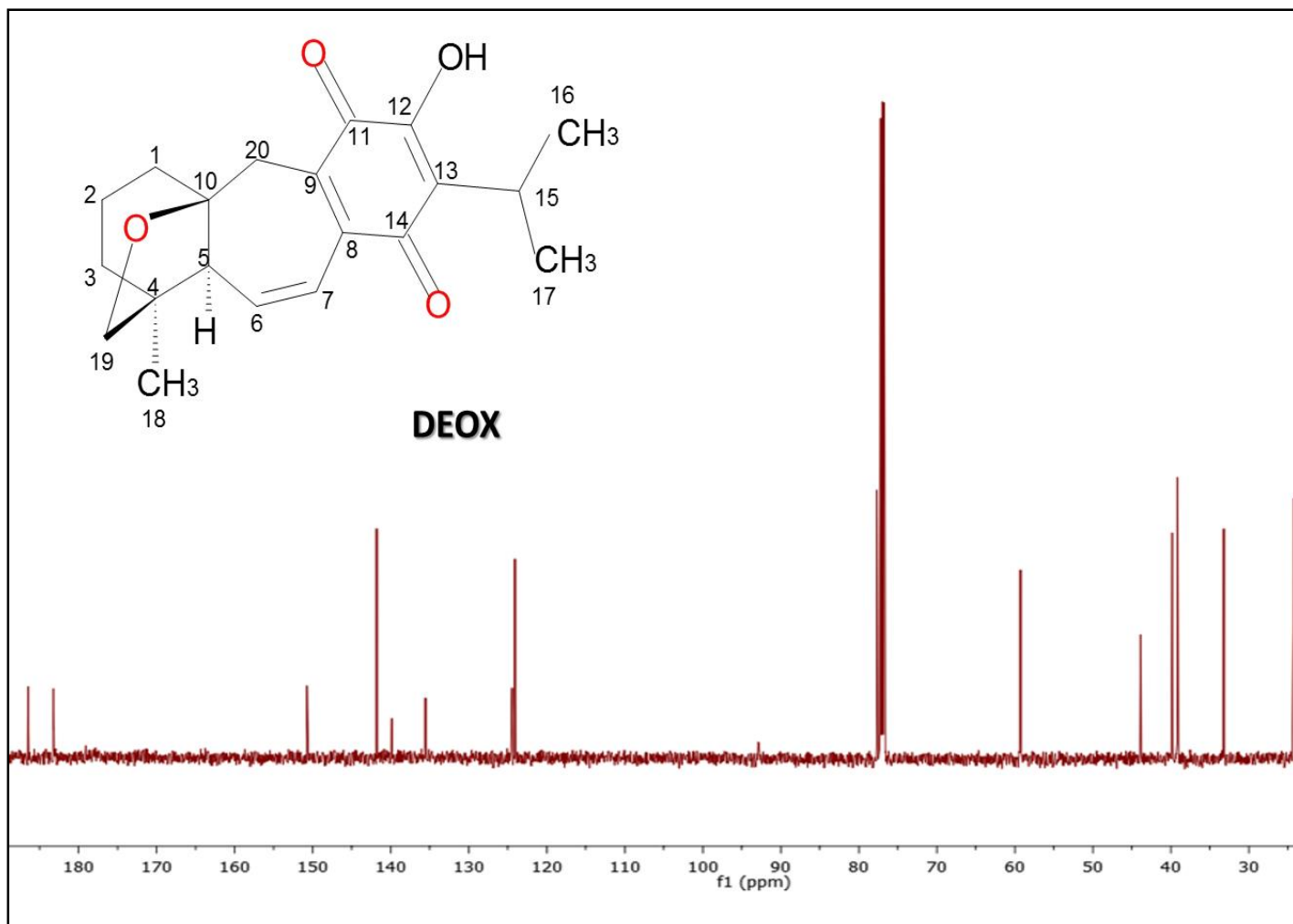
ANEXOS

10.6 ANEXO 6.- Espectro de RMN ¹H de 19-deoxiicetexona (DEOX).



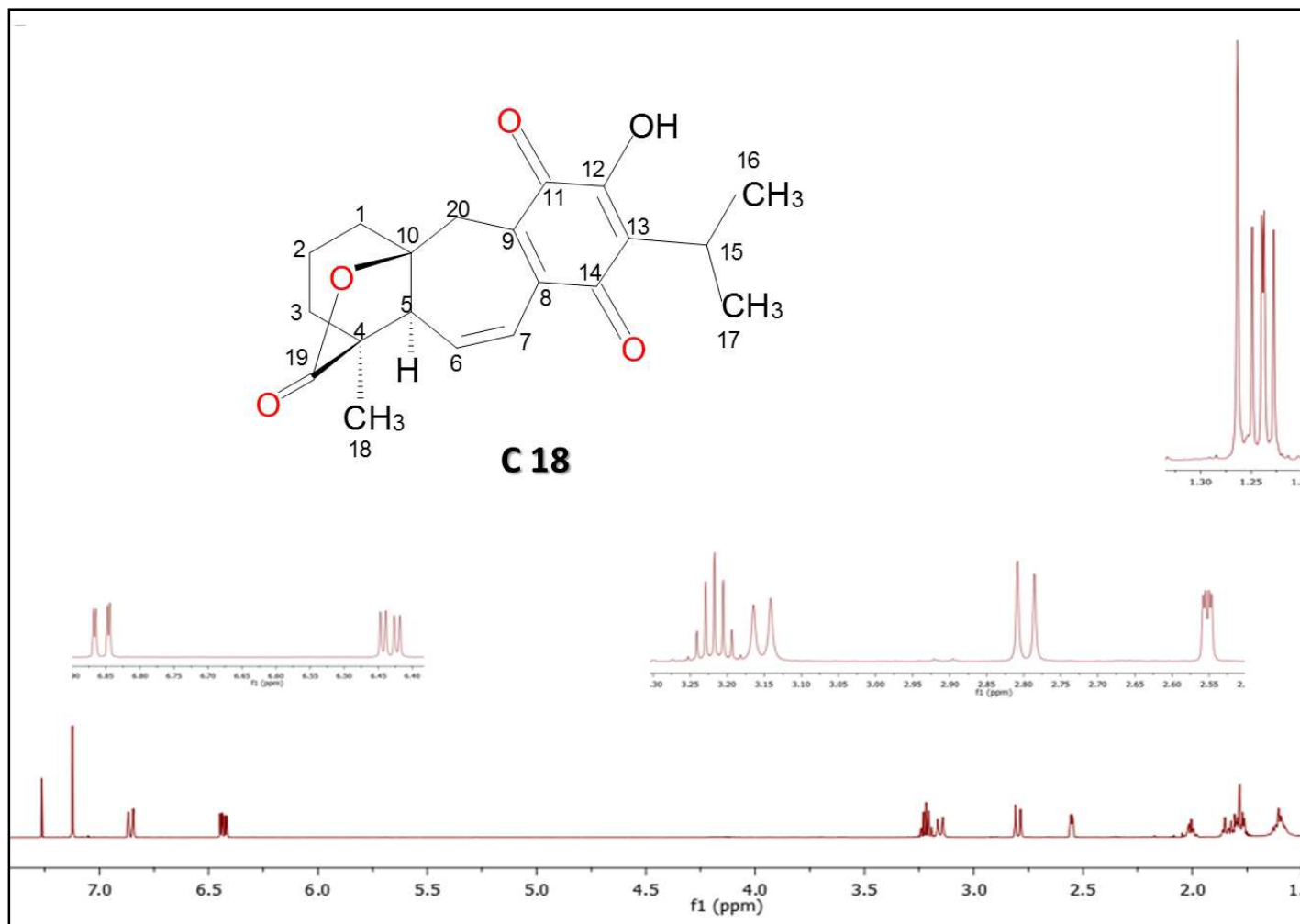
ANEXOS

10.7 ANEXO 7.- Espectro de RMN ¹³C de 19-deoxiicetexona (DEOX).



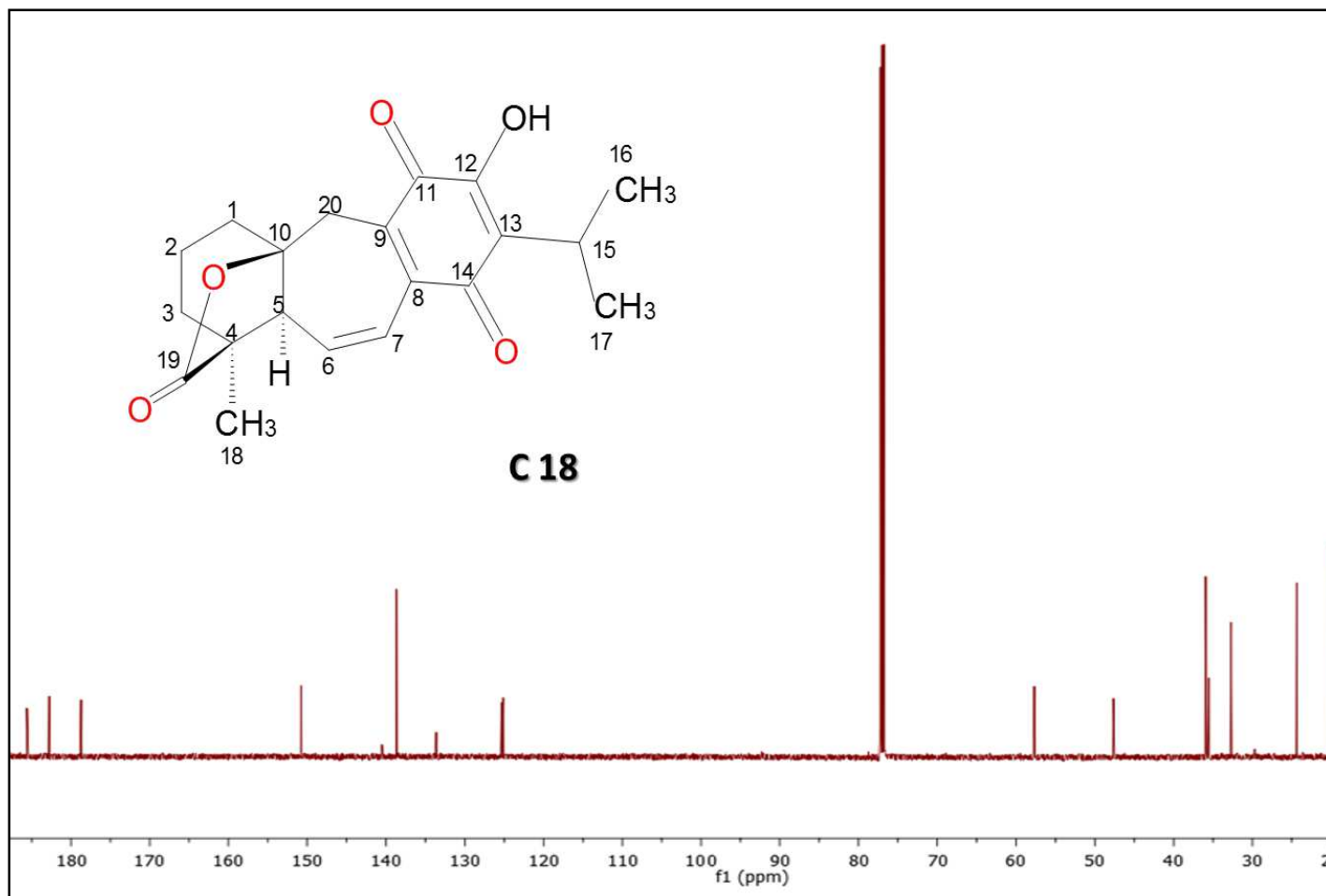
ANEXOS

10.8 ANEXO 8.- Espectro de RMN ¹H de Icetexona (C18).



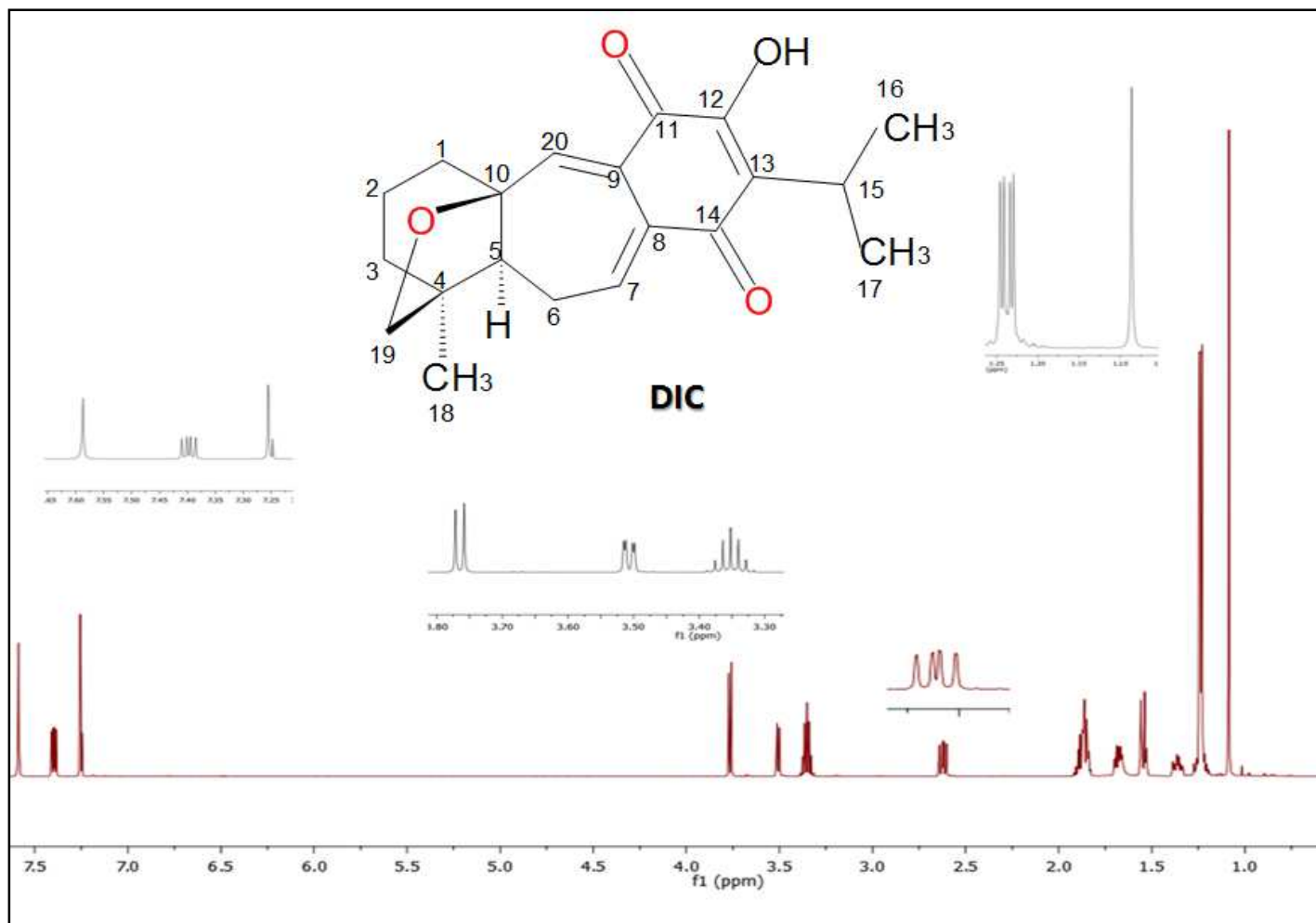
ANEXOS

10.9 ANEXO 9.- Espectro de RMN ¹³C de Icetexona (C18).



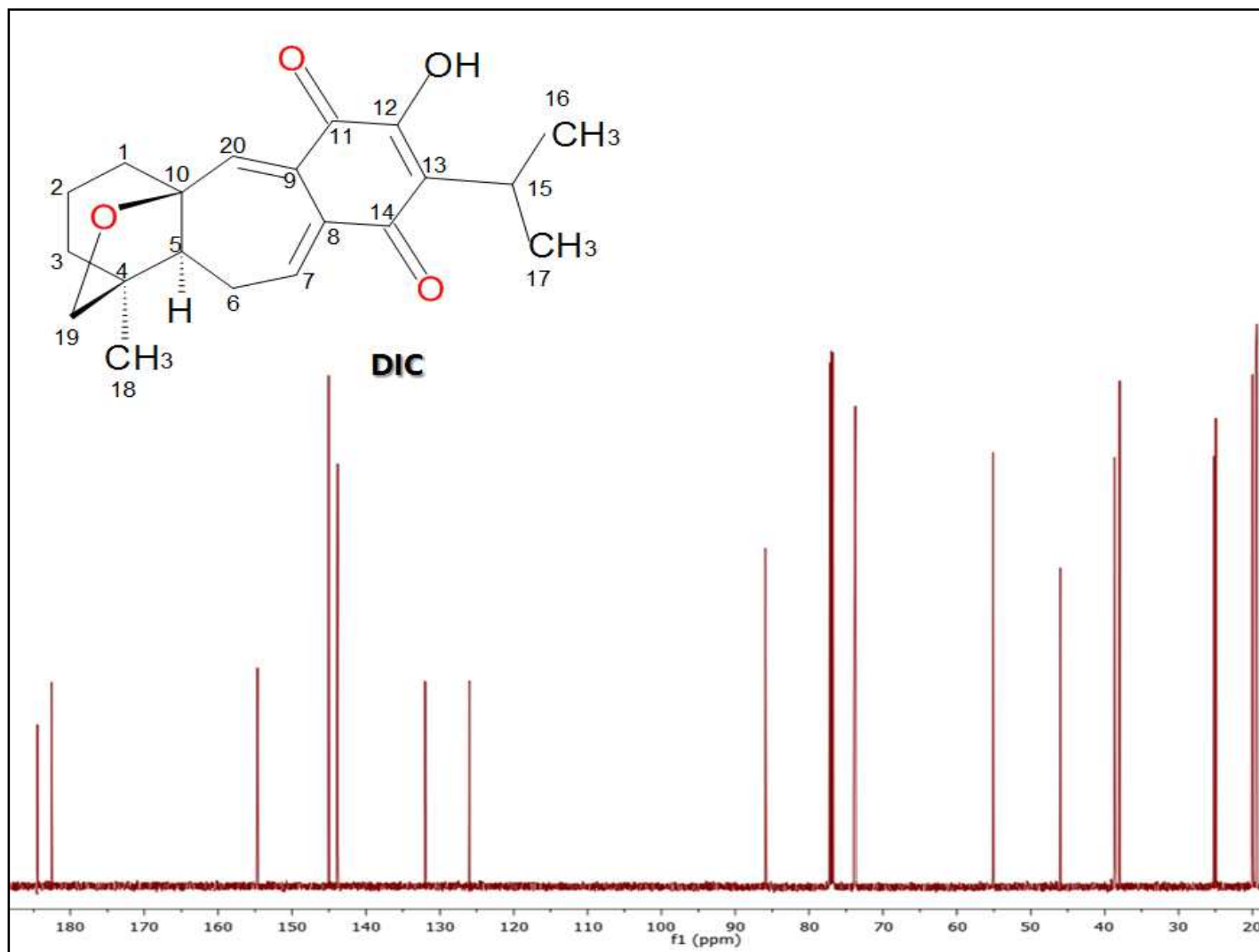
ANEXOS

10.10 ANEXO 10.- Espectro de RMN ¹H de Ictexona (DIC).



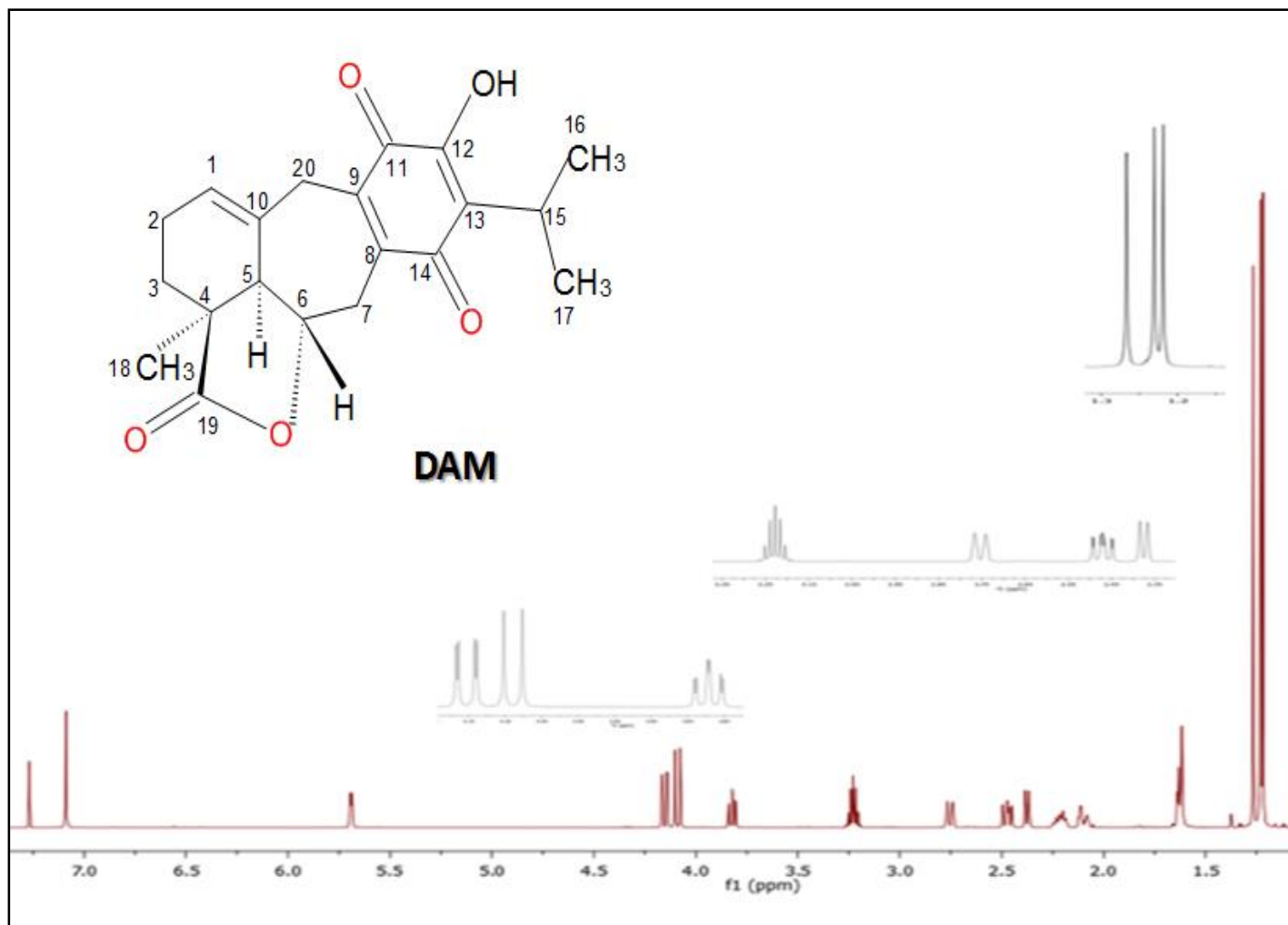
ANEXOS

10.11 ANEXO 11.- Espectro de RMN ^{13}C de Icetexona (DIC).



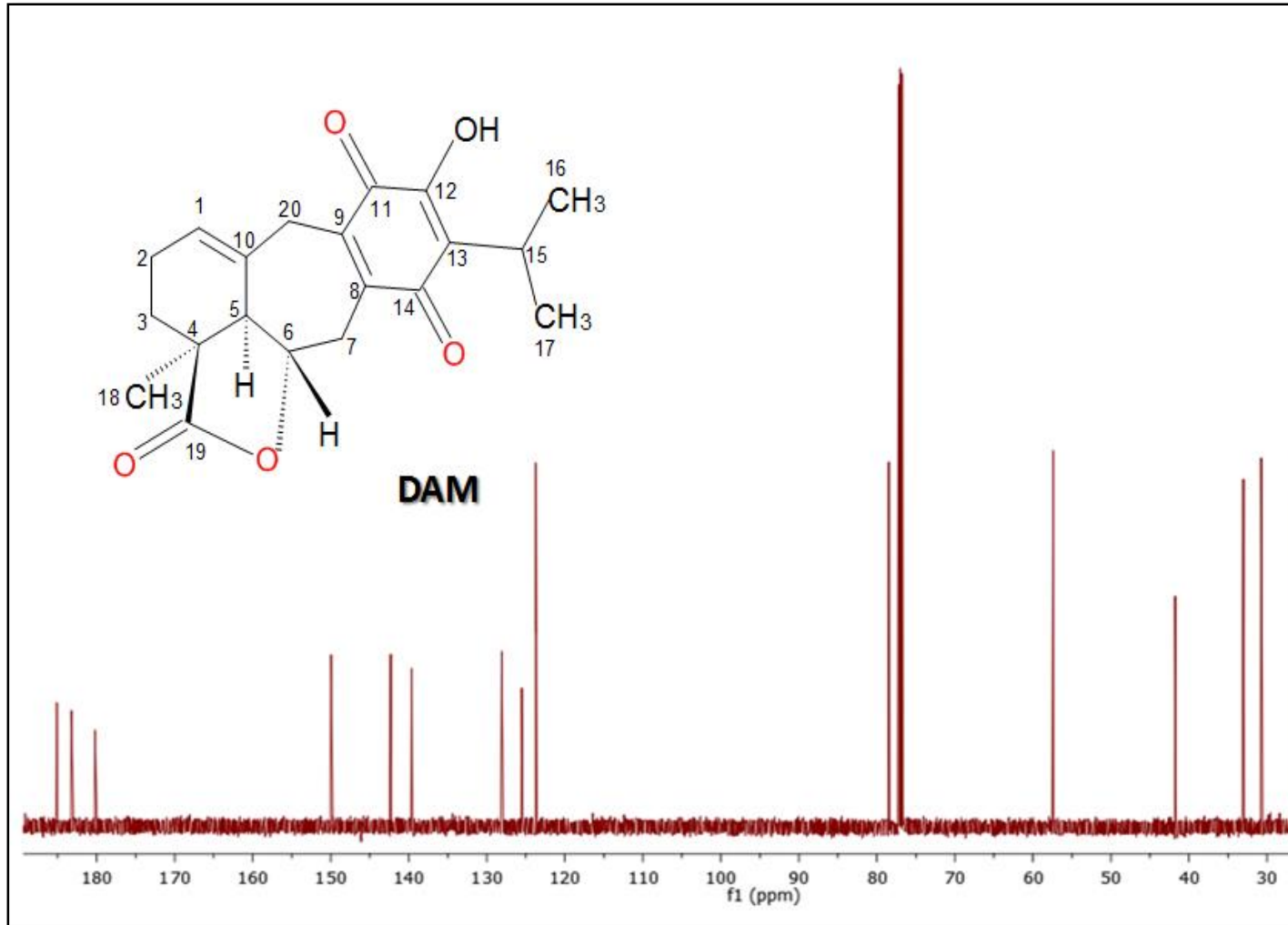
ANEXOS

10.12 ANEXO 12.- Espectro de RMN ^1H de 7,20-dihidroanastomocina (DAM).



ANEXOS

10.13 ANEXO 13.- Espectro de RMN ¹³C de 7,20-dihidroanastomocina (DAM).



ANEXOS

10.14 ANEXO 14.- DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE 19-DEOXIICETEXONA (DEOX)

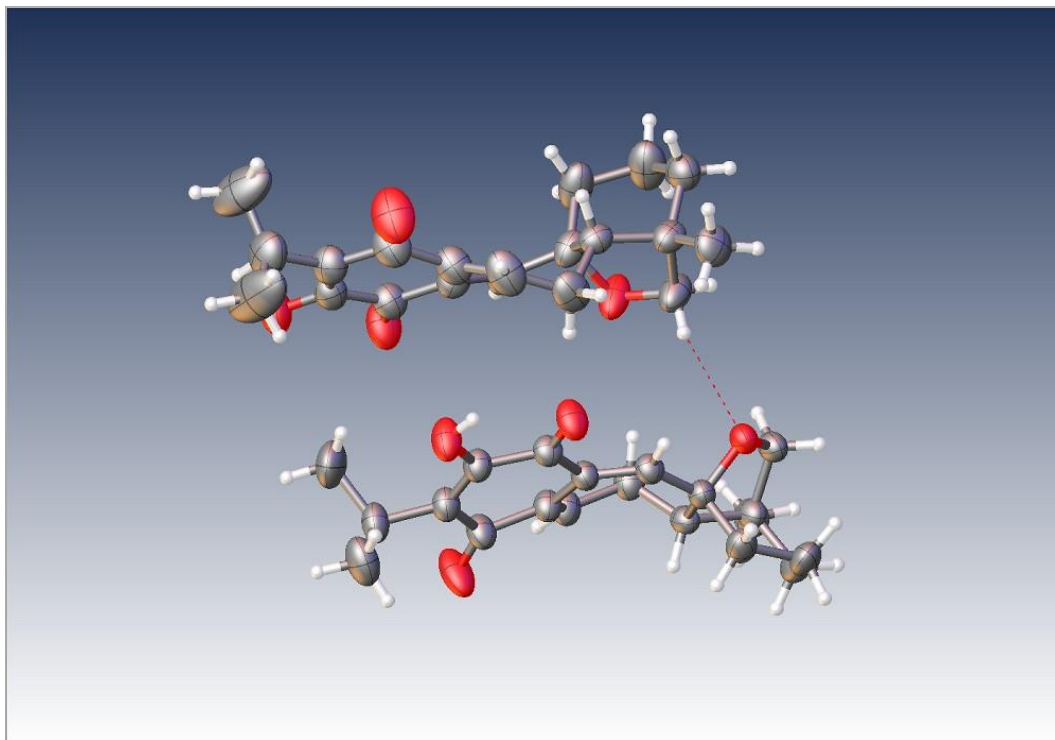


Table 1 Crystal data and structure refinement for DEOX.

Identification code	SABA_Cu
Empirical formula	C ₂₀ H ₂₄ O ₄
Formula weight	328.39
Temperature/K	293(2)
Crystal system	orthorhombic
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
a/Å	8.14479(9)
b/Å	11.08288(11)
c/Å	39.2178(4)
α /°	90
β /°	90
γ /°	90
Volume/Å ³	3540.10(6)
Z	8
$\rho_{\text{calc}}/\text{cm}^3$	1.232

ANEXOS

Identification code	SABA_Cu
Empirical formula	C ₂₀ H ₂₄ O ₄
μ/mm^{-1}	0.685
F(000)	1408.0
Crystal size/mm ³	0.5433 × 0.4796 × 0.357
Radiation	CuK α ($\lambda = 1.54184$)
2 Θ range for data collection/°	8.29 to 148.992
Index ranges	-10 ≤ h ≤ 10, -13 ≤ k ≤ 13, -49 ≤ l ≤ 49
Reflections collected	73150
Independent reflections	7201 [R _{int} = 0.0299, R _{sigma} = 0.0126]
Data/restraints/parameters	7201/0/442
Goodness-of-fit on F ²	1.037
Final R indexes	[I >= 2 σ (I)] R ₁ = 0.0436, wR ₂ = 0.1208
Final R indexes [all data]	R ₁ = 0.0449, wR ₂
Flack parameter	0.0(2)

Table 2 Fractional Atomic Coordinates ($\times 10^4$) and Equivalent Isotropic Displacement Parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for SABA_Cu. U _{eq} is defined as 1/3 of of the trace of the orthogonalised U _{ij} tensor.				
Atom	x	y	z	U(eq)
O2	2411(3)	3123.5(18)	1107.8(5)	62.1(5)
O1	3804(2)	1030.4(17)	1244.0(5)	59.4(5)
O3	6045(3)	3595(2)	198.2(6)	84.1(8)
O4	8740(2)	-1169.8(15)	1014.9(4)	45.9(4)
C19	1621(5)	4390(3)	424.2(11)	83.4(10)
C18	3380(4)	4622(2)	546.1(7)	56.2(6)
C20	3481(7)	5597(3)	816.6(11)	93.7(13)
C3	4224(3)	3470(2)	657.1(6)	46.4(5)
C2	3706(3)	2789(2)	923.0(6)	45.0(5)
C1	4460(3)	1616(2)	1019.7(5)	42.7(5)
C6	5962(3)	1213.5(19)	835.0(5)	40.0(4)
C5	6712(3)	2079(2)	598.9(6)	44.6(5)
C4	5670(3)	3086(2)	460.9(6)	51.2(6)
C7	6467(3)	81(2)	898.6(6)	42.3(5)
C8	7787(3)	-664(2)	733.0(5)	42.9(5)

ANEXOS

Table 2 Fractional Atomic Coordinates ($\times 10^4$) and Equivalent Isotropic Displacement Parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for SABA_Cu. U_{eq} is defined as 1/3 of the trace of the orthogonalised U_{ij} tensor.

Atom	x	y	z	U(eq)
O2	2411(3)	3123.5(18)	1107.8(5)	62.1(5)
O1	3804(2)	1030.4(17)	1244.0(5)	59.4(5)
O3	6045(3)	3595(2)	198.2(6)	84.1(8)
O4	8740(2)	-1169.8(15)	1014.9(4)	45.9(4)
C19	1621(5)	4390(3)	424.2(11)	83.4(10)
C18	3380(4)	4622(2)	546.1(7)	56.2(6)
C20	3481(7)	5597(3)	816.6(11)	93.7(13)
C3	4224(3)	3470(2)	657.1(6)	46.4(5)
C2	3706(3)	2789(2)	923.0(6)	45.0(5)
C1	4460(3)	1616(2)	1019.7(5)	42.7(5)
C6	5962(3)	1213.5(19)	835.0(5)	40.0(4)
C5	6712(3)	2079(2)	598.9(6)	44.6(5)
C4	5670(3)	3086(2)	460.9(6)	51.2(6)
C7	6467(3)	81(2)	898.6(6)	42.3(5)
C8	7787(3)	-664(2)	733.0(5)	42.9(5)
C11	9089(3)	-59(2)	509.1(5)	43.7(5)
C12	9550(3)	1200(2)	635.1(6)	48.3(5)
C13	8300(3)	2091(2)	515.4(6)	48.9(5)
C16	6983(4)	-1709(2)	536.3(7)	57.6(6)
C15	8287(5)	-2665(3)	446.3(8)	68.0(8)
C14	9857(4)	-2108(3)	310.7(7)	64.1(8)
C10	10456(3)	-1029(2)	524.7(6)	50.1(6)
C9	10406(3)	-1348(2)	905.0(6)	50.0(5)
C17	12149(4)	-621(3)	408.0(7)	65.7(8)
O6	6602(3)	7667(2)	1421.9(7)	74.7(6)
O5	8960(3)	6096(2)	1309.1(6)	76.9(7)
O7	4163(3)	4930(3)	2170.1(8)	97.4(9)
O8	10490(3)	1993.5(17)	1571.7(5)	69.8(6)
C39	2374(7)	7036(7)	1721.2(18)	166(3)
C38	3919(5)	7260(4)	1869.9(12)	84.8(10)
C40	4176(6)	7922(6)	2175.2(16)	139(3)
C23	5252(3)	6351(3)	1790.2(8)	61.8(7)
C22	6508(4)	6599(3)	1576.7(7)	57.6(6)
C21	7877(3)	5752(3)	1500.3(7)	55.6(6)
C26	7875(3)	4541(2)	1666.7(7)	51.8(6)

ANEXOS

Table 2 Fractional Atomic Coordinates ($\times 10^4$) and Equivalent Isotropic Displacement Parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for SABA_Cu. U_{eq} is defined as 1/3 of the trace of the orthogonalised U_{ij} tensor				
C25	6339(3)	4188(3)	1833.7(8)	59.0(7)
C24	5179(3)	5149(3)	1949.4(9)	66.0(7)
C27	9272(3)	3902(2)	1657.4(7)	54.1(6)
C28	9745(3)	2764(2)	1833.5(7)	49.3(5)
C31	8418(3)	1947(2)	1983.5(6)	46.2(5)
C32	6843(4)	1974(3)	1767.4(9)	66.5(8)
C33	5858(3)	3039(3)	1863.6(9)	70.4(8)
C36	11023(4)	3040(3)	2106.4(11)	75.4(9)
C35	11834(4)	1876(3)	2234.1(12)	86.5(11)
C34	10588(4)	863(3)	2297.9(8)	65.1(7)
C30	9366(3)	743(2)	2005.2(6)	51.0(6)
C29	10222(5)	751(3)	1660.6(7)	66.3(8)
C37	8309(5)	-379(3)	2053.0(9)	72.0(8)

Table 3 Anisotropic Displacement Parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for SABA_Cu. The Anisotropic displacement factor exponent takes the form:

$$-2\pi^2[h^2a^2U_{11}+2hka*b*U_{12}+...].$$

Atom	U_{11}	U_{22}	U_{33}	U_{23}	U_{13}	U_{12}
O2	63.5 (11)	50.6 (10)	72.3 (12)	15.1 (9)	30.2 (10)	14.5 (9)
O1	58.1 (10)	55.2 (10)	64.8 (10)	20.8 (9)	21.5 (9)	9.9 (8)
O3	87.4 (16)	86.0 (16)	78.9 (14)	45.3 (12)	36.4 (12)	34.5 (13)
O4	51.0 (9)	43.7 (8)	42.9 (7)	2.9 (6)	-2.8 (7)	9.3 (7)
C19	72 (2)	67.3 (19)	111 (3)	23.2 (19)	-9.6 (19)	14.0 (17)
C18	58.6 (15)	41.2 (12)	68.7 (15)	12.6 (11)	11.7 (12)	10.3 (11)
C20	128 (4)	44.1 (16)	109 (3)	-0.1 (17)	-3 (3)	13.6 (19)
C3	46.4 (12)	40.0 (11)	52.8 (11)	5.0 (9)	5.4 (10)	4.6 (10)
C2	43.1 (11)	42.7 (11)	49.4 (11)	2.8 (9)	7.6 (9)	5.0 (9)
C1	43.0 (11)	42.5 (11)	42.7 (10)	5.3 (9)	5.9 (9)	-1.0 (9)
C6	41.3 (11)	39 (1)	39.7 (9)	3.7 (8)	1.6 (8)	3.3 (9)
C5	49.9 (12)	40.1 (11)	43.9 (11)	4.2 (9)	9.6 (9)	4.8 (10)
C4	54.9 (13)	47.5 (12)	51.2 (12)	12.5 (10)	10.6 (10)	7.7 (11)
C7	43.4 (11)	41.0 (11)	42.4 (10)	4.6 (8)	3.1 (9)	0.6 (9)
C8	48.2 (12)	38.4 (10)	42.2 (10)	-0.1 (8)	-4.9 (9)	6.7 (9)
C11	44.9 (11)	48.7 (12)	37.5 (9)	-0.3 (8)	-0.4 (9)	10.3 (10)
C12	43.5 (12)	46.9 (12)	54.4 (12)	2.8 (10)	5.8 (10)	2.7 (10)

ANEXOS

C13	52.2 (13)	40.5 (11)	54.1 (12)	6.3 (10)	11 (1)	2 (1)
C16	62.0 (15)	45.8 (13)	65.0 (14)	-7.1 (11)	-14.9 (12)	2.7 (12)
C15	88 (2)	48.2 (14)	67.4 (16)	-19.1 (12)	-17.5 (16)	12.0 (14)
C14	84 (2)	57.7 (15)	51.1 (13)	-11.0 (12)	-4.7 (13)	26.1 (15)
C10	54.1 (13)	53.0 (13)	43.0 (11)	-1.1 (10)	0 (1)	18.2 (11)
C9	53.1 (13)	53.0 (13)	44.0 (11)	0.4 (10)	-3.7 (10)	15.2 (11)
C17	57.5 (16)	76.8 (19)	62.9 (15)	3.0 (14)	9.9 (13)	25.5 (14)
O6	71.0 (14)	57.2 (12)	95.9 (16)	16.9 (11)	12.7 (13)	13.4 (10)
O5	70.0 (13)	62.8 (12)	97.8 (16)	26.6 (11)	27.0 (12)	5.8 (11)
O7	65.0 (14)	102.8 (19)	124 (2)	28.8 (17)	42.1 (15)	14.0 (14)
O8	90.4 (15)	44.7 (9)	74.3 (12)	5.7 (9)	47.3 (12)	6.1 (10)
C39	94 (3)	217 (8)	186 (6)	-95 (6)	-62 (4)	82 (4)
C38	64.0 (19)	83 (2)	107 (3)	-8 (2)	-2.9 (19)	19.8 (18)

Atom	U ₁₁	U ₂₂	U ₃₃	U ₂₃	U ₁₃	U ₁₂
C23	80 (3)	184 (6)	151 (5)	-85 (5)	-4 (3)	34 (3)
C23	45.9 (13)	65.0 (17)	74.5 (17)	0.7 (14)	-0.8 (12)	4.7 (12)
C22	53.0 (14)	55.1 (14)	64.6 (14)	4.8 (12)	-4.0 (12)	1.0 (12)
C21	50.4 (14)	55.8 (14)	60.5 (14)	6.3 (11)	1.9 (11)	-3.1 (11)
C26	48.4 (13)	50.6 (13)	56.2 (13)	2.4 (11)	8.6 (11)	-4.9 (10)
C25	41.9 (13)	66.3 (16)	68.9 (16)	12.6 (13)	3.6 (12)	-3.1 (12)
C24	40.3 (13)	76.2 (19)	81.4 (18)	12.0 (15)	8.1 (12)	-0.5 (13)
C27	53.5 (14)	46.1 (12)	62.8 (14)	-0.4 (11)	18.2 (12)	-6.2 (11)
C28	42.2 (11)	43.6 (12)	62.1 (14)	-5.9 (10)	16.3 (10)	-3.4 (9)
C31	44.0 (11)	50.7 (12)	43.8 (10)	-2.1 (9)	7.2 (9)	-5.8 (10)
C32	58.5 (16)	59.1 (16)	82.0 (19)	9.0 (14)	-12.1 (14)	-20.1 (13)
C33	38.7 (13)	76.7 (19)	96 (2)	24.3 (17)	-0.2 (13)	-10.6 (13)
C36	50.5 (15)	54.9 (15)	121 (3)	-14.8 (17)	-14.8 (16)	-1.6 (13)
C35	61.3 (18)	69 (2)	129 (3)	-1 (2)	-25 (2)	-1.9 (16)
C34	63.8 (17)	65.3 (17)	66.2 (16)	2.1 (13)	-2.4 (14)	10.7 (14)
C30	58.9 (14)	48.6 (12)	45.4 (11)	0.5 (9)	11.6 (11)	-5.7 (11)
C29	96 (2)	44.8 (13)	57.7 (14)	-0.1 (11)	28.4 (15)	0.6 (14)
C37	79 (2)	56.0 (16)	81.1 (19)	12.4 (14)	8.6 (16)	-13.9 (15)

ANEXOS

Table 4 Bond Lengths for SABA Cu.					
Atom	Atom	Length/Å	Atom	Atom	Length/Å
O2	C2	1.332 (3)	O6	C22	1.333 (4)
O1	C1	1.217 (3)	O5	C21	1.219 (3)
O3	C4	1.213 (3)	O7	C24	1.222 (4)
O4	C8	1.463 (3)	O8	C28	1.467 (3)
O4	C9	1.438 (3)	O8	C29	1.438 (3)
C19	C18	1.532 (5)	C39	C38	1.409 (6)
C18	C20	1.517 (5)	C38	C40	1.420 (6)
C18	C3	1.514 (3)	C38	C23	1.513 (4)
C3	C2	1.355 (3)	C23	C22	1.351 (4)
C3	C4	1.470 (3)	C23	C24	1.472 (5)
C2	C1	1.487 (3)	C22	C21	1.487 (4)
C1	C6	1.491 (3)	C21	C26	1.492 (4)
C6	C5	1.467 (3)	C26	C25	1.465 (4)
C6	C7	1.344 (3)	C26	C27	1.341 (4)
C5	C4	1.502 (3)	C25	C24	1.494 (4)
C5	C13	1.334 (3)	C25	C33	1.338 (5)
C7	C8	1.503 (3)	C27	C28	1.489 (4)
C8	C11	1.531 (3)	C28	C31	1.528 (3)
C8	C16	1.538 (3)	C28	C36	1.524 (4)
C11	C12	1.527 (3)	C31	C32	1.537 (4)
C11	C10	1.549 (3)	C31	C30	1.544 (4)
C12	C13	1.494 (3)	C32	C33	1.477 (5)
C16	C15	1.541 (4)	C36	C35	1.533 (5)
C15	C14	1.516 (5)	C35	C34	1.534 (5)
C14	C10	1.540 (4)	C34	C30	1.525 (4)
C10	C9	1.533 (3)	C30	C29	1.521 (3)
C10	C17	1.522 (4)	C30	C37	1.524 (4)

ANEXOS

Ato	Ato	Atom	Angle/°	Ato	Ato	Atom	Angle/°
C9	O4	C8	109.05 (17)	C29	O8	C28	108.99 (18)
C20	C18	C19	112.9 (3)	C39	C38	C40	124.9 (4)
C3	C18	C19	111.9 (2)	C39	C38	C23	116.0 (4)
C3	C18	C20	112.0 (3)	C40	C38	C23	114.4 (4)
C2	C3	C18	123.3 (2)	C22	C23	C38	122.4 (3)
C2	C3	C4	119.4 (2)	C22	C23	C24	118.5 (3)
C4	C3	C18	117.2 (2)	C24	C23	C38	119.1 (3)
O2	C2	C3	120.7 (2)	O6	C22	C23	120.4 (3)
O2	C2	C1	115.6 (2)	O6	C22	C21	115.2 (3)
C3	C2	C1	123.7 (2)	C23	C22	C21	124.4 (3)
O1	C1	C2	118.0 (2)	O5	C21	C22	118.0 (3)
O1	C1	C6	123.5 (2)	O5	C21	C26	123.4 (3)
C2	C1	C6	118.47 (18)	C22	C21	C26	118.6 (2)
C5	C6	C1	116.93 (18)	C25	C26	C21	115.9 (2)
C7	C6	C1	116.1 (2)	C27	C26	C21	117.5 (2)
C7	C6	C5	126.9 (2)	C27	C26	C25	126.6 (2)
C6	C5	C4	118.6 (2)	C26	C25	C24	119.0 (3)
C13	C5	C6	124.4 (2)	C33	C25	C26	122.9 (3)
C13	C5	C4	116.9 (2)	C33	C25	C24	117.8 (3)
O3	C4	C3	120.8 (2)	O7	C24	C23	120.5 (3)
O3	C4	C5	120.6 (2)	O7	C24	C25	120.1 (3)
C3	C4	C5	118.6 (2)	C23	C24	C25	119.4 (3)
C6	C7	C8	130.6 (2)	C26	C27	C28	130.9 (2)
O4	C8	C7	105.27 (17)	O8	C28	C27	106.0 (2)
O4	C8	C11	103.54 (18)	O8	C28	C31	102.56 (19)
O4	C8	C16	108.43 (19)	O8	C28	C36	109.0 (2)
C7	C8	C11	120.17 (19)	C27	C28	C31	119.8 (2)
C7	C8	C16	109.0 (2)	C27	C28	C36	109.4 (2)
C11	C8	C16	109.7 (2)	C36	C28	C31	109.4 (2)
C8	C11	C10	99.83 (18)	C28	C31	C32	111.5 (2)
C12	C11	C8	112.63 (18)	C28	C31	C30	100.31 (19)
C12	C11	C10	116.4 (2)	C32	C31	C30	117.7 (2)
C13	C12	C11	109.5 (2)	C33	C32	C31	109.1 (3)
C5	C13	C12	125.3 (2)	C25	C33	C32	125.4 (3)

ANEXOS

Table 5 Bond Angles for SABA_Cu

Ato	Ato	Atom	Angle/°	Ato	Ato	Atom	Angle/°
C8	C16	C15	109.8 (2)	C28	C36	C35	110.8 (3)
C14	C15	C16	112.4 (2)	C36	C35	C34	112.6 (3)
C15	C14	C10	113.1 (2)	C30	C34	C35	111.9 (3)
C14	C10	C11	106.9 (2)	C34	C30	C31	107.0 (2)
C9	C10	C11	100.32 (18)	C29	C30	C31	100.1 (2)
C9	C10	C14	110.1 (2)	C29	C30	C34	111.7 (3)
C17	C10	C11	115.6 (2)	C29	C30	C37	111.9 (2)
C17	C10	C14	110.7 (2)	C37	C30	C31	115.4 (2)
C17	C10	C9	112.6 (2)	C37	C30	C34	110.3 (2)
O4	C9	C10	106.58 (19)	O8	C29	C30	106.9 (2)

Table 6 Hydrogen Bonds for SABA_Cu.

¹1+X,+Y,+Z; ²-1+X,+Y,+Z; ³+X,1+Y,+Z

D	H	A	d(D-H)/Å	d(H-A)/Å	d(D-A)/Å	D-H-A/°
C36	H36B	O7 ¹	0.97	2.49	3.315 (4)	143.4
C29	H29B	O4	0.97	2.60	3.521 (4)	158.1
O2	H2	O1	0.83 (4)	2.17 (4)	2.637 (3)	116 (3)
O2	H2	O8 ²	0.83 (4)	1.99 (4)	2.707 (3)	144 (3)
O6	H6	O4 ³	0.88 (6)	1.97 (5)	2.691 (3)	138 (5)
O6	H6	O5	0.88 (6)	2.14 (5)	2.630 (3)	115 (4)

ANEXOS

Table 7 Torsion Angles for SABA Cu								
A	B	C	D	Angle/°	A	B	C D	Angle/°
O2	C2	C1	O1	3.6 (3)	O6	C22	C21 O5	0.6 (4)
O2	C2	C1	C6	-177.1 (2)	O6	C22	C21 C26	179.3 (3)
O1	C1	C6	C5	-173.2 (2)	O5	C21	C26 C25	-168.5 (3)
O1	C1	C6	C7	8.0 (4)	O5	C21	C26 C27	13.2 (4)
O4	C8	C11	C12	-82.6 (2)	O8	C28	C31 C32	-83.1 (3)
O4	C8	C11	C10	41.5 (2)	O8	C28	C31 C30	42.3 (2)
O4	C8	C16	C15	-50.9 (3)	O8	C28	C36 C35	-51.1 (4)
C19	C18	C3	C2	-63.2 (4)	C39	C38	C23 C22	106.9 (6)
C19	C18	C3	C4	116.4 (3)	C39	C38	C23 C24	-72.8 (6)
C18	C3	C2	O2	-1.3 (4)	C38	C23	C22 O6	-1.1 (5)
C18	C3	C2	C1	175.8 (2)	C38	C23	C22 C21	177.7 (3)
C18	C3	C4	O3	-8.5 (4)	C38	C23	C24 O7	-7.8 (5)
C18	C3	C4	C5	169.3 (2)	C38	C23	C24 C25	171.0 (3)
C20	C18	C3	C2	64.7 (4)	C40	C38	C23 C22	-96.3 (5)
C20	C18	C3	C4	-115.7 (3)	C40	C38	C23 C24	83.9 (5)
C3	C2	C1	O1	-173.6 (3)	C23	C22	C21 O5	-178.2 (3)
C3	C2	C1	C6	5.7 (4)	C23	C22	C21 C26	0.4 (4)
C2	C3	C4	O3	171.1 (3)	C22	C23	C24 O7	172.4 (3)
C2	C3	C4	C5	-11.1 (4)	C22	C23	C24 C25	-8.8 (5)
C2	C1	C6	C5	7.5 (3)	C22	C21	C26 C25	12.9 (4)
C2	C1	C6	C7	-171.3 (2)	C22	C21	C26 C27	-165.4 (3)
C1	C6	C5	C4	-21.7 (3)	C21	C26	C25 C24	-23.9 (4)
C1	C6	C5	C13	153.2 (2)	C21	C26	C25 C33	150.6 (3)
C1	C6	C7	C8	172.2 (2)	C21	C26	C27 C28	170.9 (3)
C6	C5	C4	O3	-158.1 (3)	C26	C25	C24 O7	-158.6 (3)
C6	C5	C4	C3	24.1 (4)	C26	C25	C24 C23	22.6 (4)
C6	C5	C13	C12	2.9 (4)	C26	C25	C33 C32	6.3 (5)
C6	C7	C8	O4	131.9 (3)	C26	C27	C28 O8	133.2 (3)
C6	C7	C8	C11	15.9 (4)	C26	C27	C28 C31	18.0 (4)
C6	C7	C8	C16	-111.9 (3)	C26	C27	C28 C36	-109.4 (3)
C5	C6	C7	C8	-6.5 (4)	C25	C26	C27 C28	-7.1 (5)
C4	C3	C2	O2	179.2 (2)	C24	C23	C22 O6	178.6 (3)
C4	C3	C2	C1	-3.7 (4)	C24	C23	C22 C21	-2.6 (5)
C4	C5	C13	C12	177.8 (2)	C24	C25	C33 C32	-179.2 (3)

ANEXOS

A	B	C	D	Angle/°	A	B	C	D	Angle/°
C7	C6	C5	C4	156.9 (2)	C27	C26	C25	C24	154.2 (3)
C7	C6	C5	C13	-28.2 (4)	C27	C26	C25	C33	-31.3 (5)
C7	C8	C11	C12	34.3 (3)	C27	C28	C31	C32	33.9 (3)
C7	C8	C11	C10	158.5 (2)	C27	C28	C31	C30	159.3 (2)
C7	C8	C16	C15	-165.0 (2)	C27	C28	C36	C35	-166.6 (3)
C8	O4	C9	C10	-4.7 (3)	C28	O8	C29	C30	-3.7 (4)
C8	C11	C12	C13	-81.3 (2)	C28	C31	C32	C33	-82.8 (3)
C8	C11	C10	C14	71.7 (2)	C28	C31	C30	C34	73.0 (2)
C8	C11	C10	C9	-43.1 (2)	C28	C31	C30	C29	-43.6 (3)
C8	C11	C10	C17	-164.6 (2)	C28	C31	C30	C37	-163.9 (2)

A	B	C	D	Angle/°	A	B	C	D	Angle/°
C8	C16	C15	C14	-44.6 (3)	C28	C36	C35	C34	-44.1 (5)
C11	C8	C16	C15	61.6 (3)	C31	C28	C36	C35	60.3 (4)
C11	C12	C13	C5	62.0 (3)	C31	C32	C33	C25	61.5 (4)
C11	C10	C9	O4	30.5 (3)	C31	C30	C29	O8	29.9 (3)
C12	C11	C10	C14	-166.8 (2)	C32	C31	C30	C34	-166.0 (2)
C12	C11	C10	C9	78.3 (3)	C32	C31	C30	C29	77.5 (3)
C12	C11	C10	C17	-43.1 (3)	C32	C31	C30	C37	-42.8 (3)
C13	C5	C4	O3	26.6 (4)	C33	C25	C24	O7	26.6 (5)
C13	C5	C4	C3	-151.2 (3)	C33	C25	C24	C23	-152.2 (3)
C16	C8	C11	C12	161.8 (2)	C36	C28	C31	C32	161.3 (2)
C16	C8	C11	C10	-74.1 (2)	C36	C28	C31	C30	-73.3 (2)
C16	C15	C14	C10	46.1 (3)	C36	C35	C34	C30	45.9 (4)
C15	C14	C10	C11	-61.3 (3)	C35	C34	C30	C31	-61.8 (3)
C15	C14	C10	C9	46.8 (3)	C35	C34	C30	C29	46.8 (3)
C15	C14	C10	C17	172.0 (2)	C35	C34	C30	C37	171.9 (3)
C14	C10	C9	O4	-81.9 (2)	C34	C30	C29	O8	-83.1 (3)
C10	C11	C12	C13	164.24 (19)	C30	C31	C32	C33	162.2 (2)
C9	O4	C8	C7	-150.57 (19)	C29	O8	C28	C27	-151.1 (3)
C9	O4	C8	C11	-23.6 (2)	C29	O8	C28	C31	-24.6 (3)
C9	O4	C8	C16	92.9 (2)	C29	O8	C28	C36	91.2 (3)
C17	C10	C9	O4	154.0 (2)	C37	C30	C29	O8	152.7 (3)

ANEXOS

Table 8 Hydrogen Atom Coordinates ($\text{\AA}\times 10^4$) and					
Isotropic Displacement Parameters ($\text{\AA}^2\times 10^3$) for SABA_Cu.					
Atom	x	y	z		U(eq)
H19A	1128	5139		356	125
H19B	1640	3846		234	125
H19C	994	4040		606	125
H18	3990	4923		348	67
H20A	2933	6310		737	141
H20B	2961	5319		1022	141
H20C	4611	5780		862	141
H7	5907	-305		1074	51
H11	8677	-1		275	52
H12A	9599	1205		882	58
H12B	10625	1420		548	58
H13	8657	2703		371	59
H16A	6483	-1405		329	69
H16B	6129	-2072		675	69
H15A	8538	-3135		648	82
H15B	7842	-3210		276	82
H14A	9676	-1842		78	77
H14B	10709	-2719		306	77
H9A	10735	-2180		940	60
H9B	11143	-829		1032	60
H17A	12116	-433		169	99
H17B	12469	83		534	99
H17C	12928	-1256		447	99
H39A	2515	6571		1517	249
H39B	1701	6595		1879	249
H39C	1854	7789		1667	249
H38	4278	7888		1710	102
H40A	5329	7952		2225	208
H40B	3763	8727		2148	208
H40C	3609	7534		2360	208

ANEXOS

Table 8 Hydrogen Atom Coordinates ($\text{\AA}\times 10^4$) and					
Isotropic Displacement Parameters ($\text{\AA}^2\times 10^3$) for SABA_Cu.					
Atom	x	y	z		U(eq)
H27	10082	4225		1517	65
H31	8159	2222		2215	55
H32A	7124	2014		1527	80
H32B	6213	1243		1806	80
H33	4816	2899		1952	85
H36A	10501	3451		2296	90
H36B	11855	3572		2013	90
H35A	12418	2045		2444	104
H35B	12631	1606		2067	104
H34A	11169	106		2326	78
H34B	9995	1028		2507	78
H29A	11261	325		1674	80
H29B	9542	359		1490	80
H37A	7790	-351		2273	108
H37B	7484	-406		1878	108
H37C	8986	-1086		2038	108
H2	2190 (50)	2590 (30)		1250 (9)	69 (10)
H6	7580 (70)	7730 (50)		1327 (13)	116 (17)

Experimental

Single crystals of $\text{C}_{20}\text{H}_{24}\text{O}_4$ [SABA_Cu] were []. A suitable crystal was selected and [] on a **Xcalibur, Atlas, Gemini** diffractometer. The crystal was kept at 293(2) K during data collection. Using Olex2 [1], the structure was solved with the ShelXD [2] structure solution program using Dual Space and refined with the ShelXL [3] refinement package using Least Squares minimisation.

1. Dolomanov, O.V., Bourhis, L.J., Gildea, R.J., Howard, J.A.K. & Puschmann, H. (2009), *J. Appl. Cryst.* 42, 339-341.
2. Sheldrick, G.M. (2008). *Acta Cryst.* A64, 112-122.
3. Sheldrick, G.M. (2015). *Acta Cryst.* C71, 3-8.

ANEXOS

Crystal structure determination of [SABA_Cu]

Crystal Data for C₂₀H₂₄O₄ (*M* = 328.39 g/mol): orthorhombic, space group P2₁2₁2₁ (no. 19), *a* = 8.14479(9) Å, *b* = 11.08288(11) Å, *c* = 39.2178(4) Å, *V* = 3540.10(6) Å³, *Z* = 8, *T* = 293(2) K, μ(CuKα) = 0.685 mm⁻¹, *D*_{calc} = 1.232 g/cm³, 73150 reflections measured (8.29° ≤ 2θ ≤ 148.992°), 7201 unique (*R*_{int} = 0.0299, *R*_{sigma} = 0.0126) which were used in all calculations. The final *R*₁ was 0.0436 (*I* > 2σ(*I*)) and *wR*₂ was 0.1224 (all data).

Refinement model description

Number of restraints - 0, number of constraints - unknown.

Details:

1. Twinned data

refinement Scales:

1.0(2) 0.0(2)

2. Fixed Uiso

At 1.2 times of:

All C(H) groups, All

C(H,H) groups At 1.5

times of:

All C(H,H,H) groups

3. a Ternary CH refined with riding coordinates:

C18(H18), C11(H11), C38(H38), C31(H31)

3. b Secondary CH₂ refined with riding coordinates:

C12(H12A,H12B), C16(H16A,H16B), C15(H15A,H15B), C14(H14A,H14B),
C9(H9A,H9B), C32(H32A,H32B), C36(H36A,H36B), C35(H35A,H35B),
C34(H34A,H34B), C29(H29A,H29B)

3. c Me refined with riding coordinates:

C19(H19A,H19B,H19C), C20(H20A,H20B,H20C), C17(H17A,H17B,H17C),
C39(H39A,H39B, H39C), C40(H40A,H40B,H40C), C37(H37A,H37B,H37C)

3. d Aromatic/amide H refined with riding coordinates:

C7(H7), C13(H13), C27(H27), C33(H33)

This report has been created with Olex2, compiled on 2016.02.19 svn.r3266 for OlexSys. Please [let us know](#) if there are any errors or if you would like to have additional features.

ANEXOS

10.15 ANEXO 15.- DIFRACCIÓN DE RAYOS X DE ICETEXONA (C18)

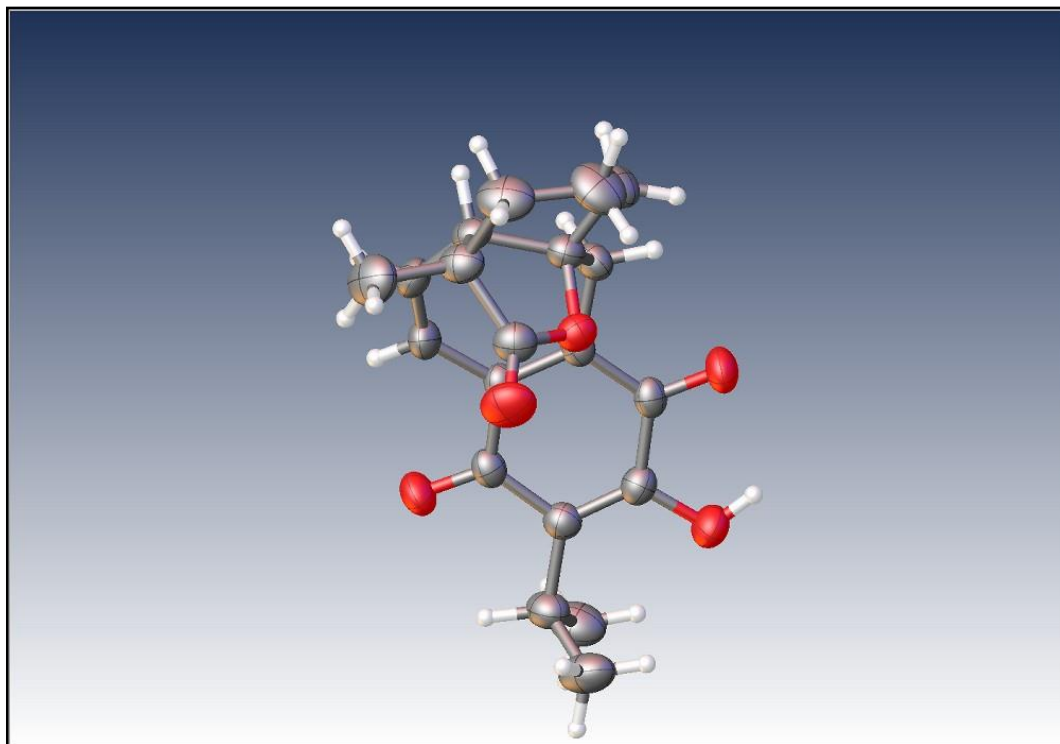


Table 1 Crystal data and structure refinement for BA-C18.

Identification code	SABA-B_2_C18
Empirical formula	C ₂₀ H ₂₂ O ₅
Formula weight	342.37
Temperature/K	293(2)
Crystal system	orthorhombic
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
a/Å	7.7397(2)
b/Å	10.3811(4)
c/Å	21.0299(9)
α /°	90
β /°	90
γ /°	90
Volume/Å ³	1689.69(11)
Z	4
$\rho_{\text{calc}}/\text{cm}^3$	1.346
μ/mm^{-1}	0.789
F(000)	728.0

ANEXOS

Crystal size/mm³	0.401 × 0.299 × 0.136
Radiation	CuK α (λ = 1.54184)
2Θ range for data collection/°	8.408 to 148.662
Index ranges	-9 ≤ h ≤ 9, -12 ≤ k ≤ 12, -26 ≤ l ≤ 26
Reflections collected	32803
Independent reflections	3430 [R _{int} = 0.0591, R _{sigma} = 0.0186]
Data/restraints/parameters	3430/0/241
Goodness-of-fit on F²	1.054
Final R indexes [I >= 2σ(I)]	R ₁ = 0.0337, wR ₂ = 0.0757
R indexes [all data]	R ₁ = 0.0419, wR ₂ = 0.0811
Flack parameter	-0.07(12)

Atom	x	y	z	U(eq)
O22	3350(2)	2914.1(15)	2137.4(8)	42.6(4)
C10	3373(3)	2682(2)	866.5(10)	34.4(5)
C1	1781(3)	2156(2)	826.7(10)	35.0(5)
O18	80(2)	441.2(17)	439.5(9)	52.0(5)
O17	6336(2)	2340.1(18)	683.2(9)	52.5(5)
C15	4869(3)	1919(2)	667.4(10)	36.0(5)
O16	6101(2)	-59.0(18)	310.9(10)	52.8(5)
C14	4625(3)	571(2)	447.3(11)	39.0(5)
C13	3054(3)	24(2)	389.9(11)	39.4(5)
C12	1541(3)	833(2)	540(1)	37.0(5)
C11	211(3)	2809(2)	1024.0(12)	42.1(5)
O24	1942(3)	1805(2)	2885.8(10)	68.5(6)
C6	3119(3)	4158(2)	1810.4(11)	39.2(5)
C7	1191(3)	4429(2)	1890.7(12)	41.9(5)
C9	-14(3)	3756(2)	1445.6(13)	44.7(6)
C8	3707(3)	4006(2)	1123.8(11)	41.1(5)
C23	2078(3)	2764(2)	2576.2(12)	47.1(6)
C5	979(4)	3976(2)	2590.8(12)	48.6(6)
C19	2753(4)	-1346(2)	168.5(14)	50.5(6)
C4	4178(4)	5169(3)	2167.5(13)	56.1(7)
C21	3364(5)	-1558(3)	-516.3(14)	67.5(8)
C2	3794(5)	5123(3)	2882.8(15)	71.8(9)
C3	1885(5)	4970(3)	3027.8(14)	67.7(8)
C20	3561(5)	-2316(3)	624.4(16)	69.0(9)
C25	-861(4)	3715(3)	2819.9(17)	70.0(9)

ANEXOS

Table 3 Anisotropic Displacement Parameters ($\text{\AA}^2 \times 10^3$) for SABA-B_2_Cu. The Anisotropic displacement factor exponent takes the form:

$$-2\pi^2[h^2a^2U_{11}+2hka*b*U_{12}+...].$$

Atom	U ₁₁	U ₂₂	U ₃₃	U ₂₃	U ₁₃	U ₁₂
O22	44.4 (9)	40.5 (8)	42.9 (9)	1.6 (7)	-2.0 (7)	4.1 (7)
C10	34 (1)	38.5 (11)	30.7 (10)	1.7 (9)	0.1 (8)	-3.6 (9)
C1	32.3 (10)	38.8 (11)	33.9 (11)	1.8 (9)	-2.9 (8)	-1.1 (9)
O18	36.8 (8)	52.7 (10)	66.3 (12)	-9.6 (9)	-2.9 (8)	-10.5 (8)
O17	30.1 (8)	59.3 (11)	67.9 (12)	-7.1 (9)	0.7 (8)	-5.9 (7)
C15	30.5 (10)	46.2 (12)	31.3 (11)	2.5 (9)	-2.6 (8)	-1.9 (9)
O16	39.6 (9)	51.7 (10)	67.2 (12)	-9.5 (9)	3.6 (8)	5.5 (8)
C14	36.4 (11)	43.6 (12)	36.9 (12)	-0.5 (10)	1.0 (9)	4.0 (9)
C13	41.7 (11)	38.6 (11)	37.9 (12)	-1.3 (9)	0.7 (10)	-0.8 (10)
C12	34.8 (11)	42.5 (12)	33.9 (11)	2.7 (9)	-2.4 (9)	-5.3 (9)
C11	30.8 (11)	44.7 (13)	50.7 (14)	-0.8 (10)	-5.6 (10)	-0.7 (10)
O24	86.2 (15)	56.5 (11)	62.8 (13)	20.8 (10)	8.4 (12)	3.9 (11)
C6	42.2 (12)	34.5 (11)	40.9 (12)	-1.1 (9)	-0.2 (10)	-2.2 (10)
C7	45.3 (12)	32.4 (11)	47.9 (13)	-0.2 (10)	4.9 (10)	6.4 (10)
C9	33.9 (11)	45.0 (13)	55.2 (15)	4.0 (11)	1.0 (11)	7.8 (10)
C8	40.4 (12)	39.1 (12)	43.9 (13)	-0.8 (10)	4.3 (10)	-6.7 (9)
C23	54.9 (14)	46.0 (13)	40.5 (13)	2.3 (11)	0.7 (11)	-0.2 (12)
C5	57.7 (15)	43.7 (13)	44.4 (14)	-2.7 (11)	10.1 (12)	2.3 (12)
C19	53.4 (15)	39.7 (13)	58.4 (16)	-6.7 (11)	6.8 (13)	-3.7 (12)
C4	57.9 (15)	53.8 (15)	56.5 (16)	-12.9 (13)	-0.6 (13)	-14.9 (13)
C21	90 (2)	55.6 (16)	57.4 (18)	-15.5 (13)	2.9 (17)	-10.3 (15)
C2	87 (2)	75 (2)	53.7 (17)	-21.1 (16)	-4.5 (16)	-20.3 (18)
C3	95 (2)	58.9 (17)	49.3 (16)	-13.6 (13)	10.1 (16)	0.6 (18)
C20	89 (2)	45.3 (15)	73 (2)	4.3 (14)	18.6 (18)	5.9 (15)
C25	66.4 (19)	74 (2)	70 (2)	1.2 (16)	29.7 (17)	5.4 (16)

ANEXOS

Table 4 Bond Lengths for SABA-B_2_Cu.

Atom	Atom	Length/Å	Atom	Atom	Length/Å
O22	C6	1.474(3)	C11	C9	1.335(4)
O22	C23	1.358(3)	O24	C23	1.194(3)
C10	C1	1.351(3)	C6	C7	1.528(3)
C10	C15	1.464(3)	C6	C8	1.522(3)
C10	C8	1.499(3)	C6	C4	1.529(3)
C1	C12	1.511(3)	C7	C9	1.495(4)
C1	C11	1.452(3)	C7	C5	1.554(4)
O18	C12	1.220(3)	C23	C5	1.519(4)
O17	C15	1.217(3)	C5	C3	1.550(4)
C15	C14	1.486(3)	C5	C25	1.527(4)
O16	C14	1.347(3)	C19	C21	1.532(4)
C14	C13	1.347(3)	C19	C20	1.525(4)
C13	C12	1.475(3)	C4	C2	1.534(4)
C13	C19	1.514(3)	C2	C3	1.518(5)

Table 5 Bond Angles for SABA

Atom	Atom	Atom	Angle/°	Atom	Atom	Atom	Angle/°
C23	O22	C6	109.24(18)	C7	C6	C4	110.1(2)
C1	C10	C15	119.0(2)	C8	C6	C7	114.6(2)
C1	C10	C8	123.4(2)	C8	C6	C4	112.2(2)
C15	C10	C8	117.57(19)	C6	C7	C5	98.8(2)
C10	C1	C12	120.3(2)	C9	C7	C6	117.0(2)
C10	C1	C11	123.8(2)	C9	C7	C5	112.7(2)
C11	C1	C12	115.84(19)	C11	C9	C7	132.8(2)
C10	C15	C14	119.88(19)	C10	C8	C6	112.73(18)
O17	C15	C10	122.4(2)	O22	C23	C5	109.0(2)
O17	C15	C14	117.7(2)	O24	C23	O22	122.0(2)
O16	C14	C15	114.57(19)	O24	C23	C5	129.0(3)
O16	C14	C13	122.8(2)	C23	C5	C7	99.9(2)
C13	C14	C15	122.6(2)	C23	C5	C3	108.1(2)
C14	C13	C12	117.3(2)	C23	C5	C25	112.5(2)
C14	C13	C19	124.2(2)	C3	C5	C7	108.2(2)
C12	C13	C19	118.5(2)	C25	C5	C7	116.8(2)
O18	C12	C1	119.1(2)	C25	C5	C3	110.6(2)
O18	C12	C13	120.6(2)	C13	C19	C21	112.1(2)
C13	C12	C1	120.31(19)	C13	C19	C20	111.3(2)
C9	C11	C1	130.0(2)	C20	C19	C21	111.7(3)
O22	C6	C7	103.18(18)	C6	C4	C2	110.9(2)
O22	C6	C8	108.37(18)	C3	C2	C4	112.9(3)
O22	C6	C4	107.9(2)	C2	C3	C5	113.1(2)

ANEXOS

Table 6 Torsion Angles for SABA-B 2 Cu.								
A	B	C	D	Angle/°	A	B	C D	Angle/°
O22	C6	C7	C9	-80.4 (2)	O24	C23	C5 C3	95.9 (3)
O22	C6	C7	C5	40.7 (2)	O24	C23	C5 C25	-26.5 (4)
O22	C6	C8	C10	32.8 (3)	C6	O22	C23 O24	176.8 (3)
O22	C6	C4	C2	-50.1 (3)	C6	O22	C23 C5	-3.7 (3)
O22	C23	C5	C7	29.5 (3)	C6	C7	C9 C11	10.0 (4)
O22	C23	C5	C3	-83.5 (3)	C6	C7	C5 C23	-41.6 (2)
O22	C23	C5	C25	154.1 (2)	C6	C7	C5 C3	71.3 (3)
C10	C1	C12	O18	-171.3 (2)	C6	C7	C5 C25	-163.1 (2)
C10	C1	C12	C13	9.2 (3)	C6	C4	C2 C3	-42.5 (4)
C10	C1	C11	C9	-24.8 (4)	C7	C6	C8 C10	-81.7 (2)
C10	C15	C14	O16	-176.4 (2)	C7	C6	C4 C2	61.8 (3)
C10	C15	C14	C13	3.5 (3)	C7	C5	C3 C2	-59.2 (3)
C1	C10	C15	O17	179.0 (2)	C9	C7	C5 C23	82.6 (2)
C1	C10	C15	C14	-2.1 (3)	C9	C7	C5 C3	-164.5 (2)
C1	C10	C8	C6	60.1 (3)	C9	C7	C5 C25	-38.9 (3)
C1	C11	C9	C7	-4.3 (5)	C8	C10	C1 C12	177.8 (2)
O17	C15	C14	O16	2.5 (3)	C8	C10	C1 C11	0.4 (4)
O17	C15	C14	C13	-177.6 (2)	C8	C10	C15 O17	-2.7 (3)
C15	C10	C1	C12	-4.0 (3)	C8	C10	C15 C14	176.1 (2)
C15	C10	C1	C11	178.5 (2)	C8	C6	C7 C9	37.2 (3)
C15	C10	C8	C6	-118.1 (2)	C8	C6	C7 C5	158.32 (19)
C15	C14	C13	C12	1.5 (3)	C8	C6	C4 C2	-169.4 (2)
C15	C14	C13	C19	-179.9 (2)	C23	O22	C6 C7	-24.4 (2)
O16	C14	C13	C12	-178.5 (2)	C23	O22	C6 C8	-146.27 (19)
O16	C14	C13	C19	0.0 (4)	C23	O22	C6 C4	92.1 (2)
C14	C13	C12	C1	-7.7 (3)	C23	C5	C3 C2	48.1 (3)
C14	C13	C12	O18	172.9 (2)	C5	C7	C9 C11	-103.5 (3)
C14	C13	C19	C21	-63.2 (4)	C19	C13	C12 C1	173.7 (2)
C14	C13	C19	C20	62.7 (3)	C19	C13	C12 O18	-5.8 (3)
C12	C1	C11	C9	157.7 (2)	C4	C6	C7 C9	164.7 (2)
C12	C13	C19	C21	115.3 (3)	C4	C6	C7 C5	-74.2 (2)
C12	C13	C19	C20	-118.7 (3)	C4	C6	C8 C10	151.8 (2)
C11	C1	C12	O18	6.3 (3)	C4	C2	C3 C5	42.4 (4)
C11	C1	C12	C13	-173.1 (2)	C25	C5	C3 C2	171.6 (3)
O24	C23	C5	C7	-151.1 (3)				

ANEXOS

**Table 7 Hydrogen Atom Coordinates
($\text{\AA}\times 10^4$) and Isotropic Displacement
Parameters ($\text{\AA}^2\times 10^3$) for SABA- B_2_Cu.**

Atom	x	y	z	U(eq)
H16	6990 (50)	420 (30)	387 (18)	79
H11	-793	2525	826	50
H9	-1145	4056	1467	54
H8A	3107	4631	862	49
H8B	4934	4187	1098	49
H4A	3905	6019	2004	67
H4B	5399	5013	2097	67
H21A	2761	-979	-795	101
H21B	3131	-2430	-640	101
H21C	4584	-1397	-543	101
H2A	4422	4410	3071	86
H2B	4209	5911	3078	86
H3A	1320	5798	2980	81
H3B	1751	4702	3467	81
H20A	4785	-2171	648	104
H20B	3347	-3174	473	104
H20C	3062	-2214	1039	104
H25A	-1492	4511	2836	105
H25B	-825	3337	3236	105
H25C	-1422	3134	2531	105
H7	950 (30)	5350 (30)	1858 (12)	46 (7)
H19	1470 (40)	-1460 (30)	163 (14)	59 (8)

Experimental

Single crystals of $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{O}_5$ [SABA-B_2_Cu] were [1]. A suitable crystal was selected and [1] on a **Xcalibur, Atlas, Gemini** diffractometer. The crystal was kept at 293(2) K during data collection. Using Olex2 [1], the structure was solved with the ShelXD [2] structure solution program using Dual Space and refined with the ShelXL [3] refinement package using Least Squares minimisation.

1. Dolomanov, O.V., Bourhis, L.J., Gildea, R.J, Howard, J.A.K. & Puschmann, H(2009), J. Appl. Cryst. 42, 339-341.
2. Sheldrick, G.M(2008). Acta Cryst. A64, 112-122.
3. Sheldrick, G.M(2015). Acta Cryst. C71, 3-8.

ANEXOS

Crystal structure determination of [SABA-B_2_Cu]

Crystal Data for $C_{20}H_{22}O_5$ ($M = 342.37$ g/mol): orthorhombic, space group $P2_12_12_1$ (no. 19), $a = 7.7397(2)$ Å, $b = 10.3811(4)$ Å, $c = 21.0299(9)$ Å, $V = 1689.69(11)$ Å³, $Z = 4$, $T = 293(2)$ K, $\mu(\text{CuK}\alpha) = 0.789$ mm⁻¹, $D_{\text{calc}} = 1.346$ g/cm³,

32803 reflections measured ($8.408^\circ \leq 2\theta \leq 148.662^\circ$), 3430 unique ($R_{\text{int}} = 0.0591$, $R_{\text{sigma}} = 0.0244$) which were used in all calculations. The final R_1 was 0.0337 ($I > 2\sigma(I)$) and wR_2 was 0.0811 (all data).

Refinement model description

Number of restraints - 0, number of constraints - unknown.

Details:

1. Fixed Uiso

At 1.2 times of:

All C(H) groups,

All C(H,H) groups

At 1.5 times of:

All C(H,H,H) groups, All O(H) groups

2. a Secondary CH2 refined with riding coordinates:

C8(H8A,H8B), C4(H4A,H4B), C2(H2A,H2B),

C3(H3A,H3B)

2. b Aromatic/amide H refined with riding coordinates: C11(H11), C9(H9)

2. c Idealised Me refined as rotating group:

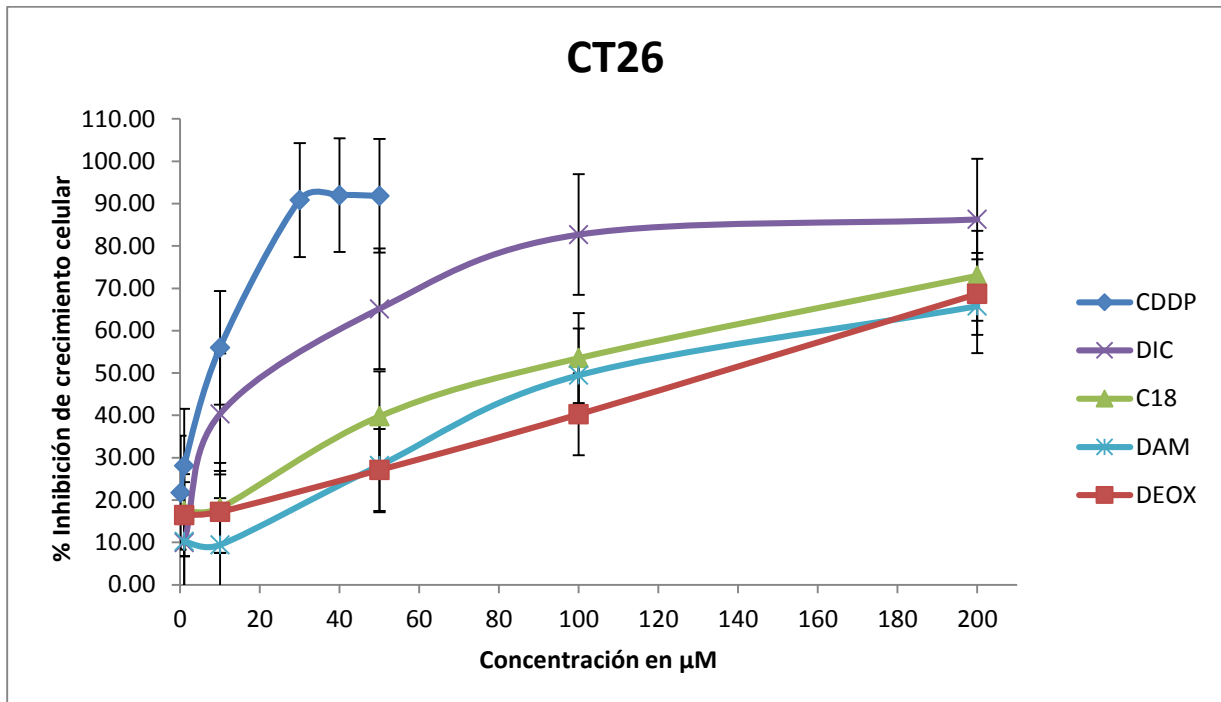
C21(H21A,H21B,H21C), C20(H20A,H20B,H20C),

C25(H25A,H25B,H25C)

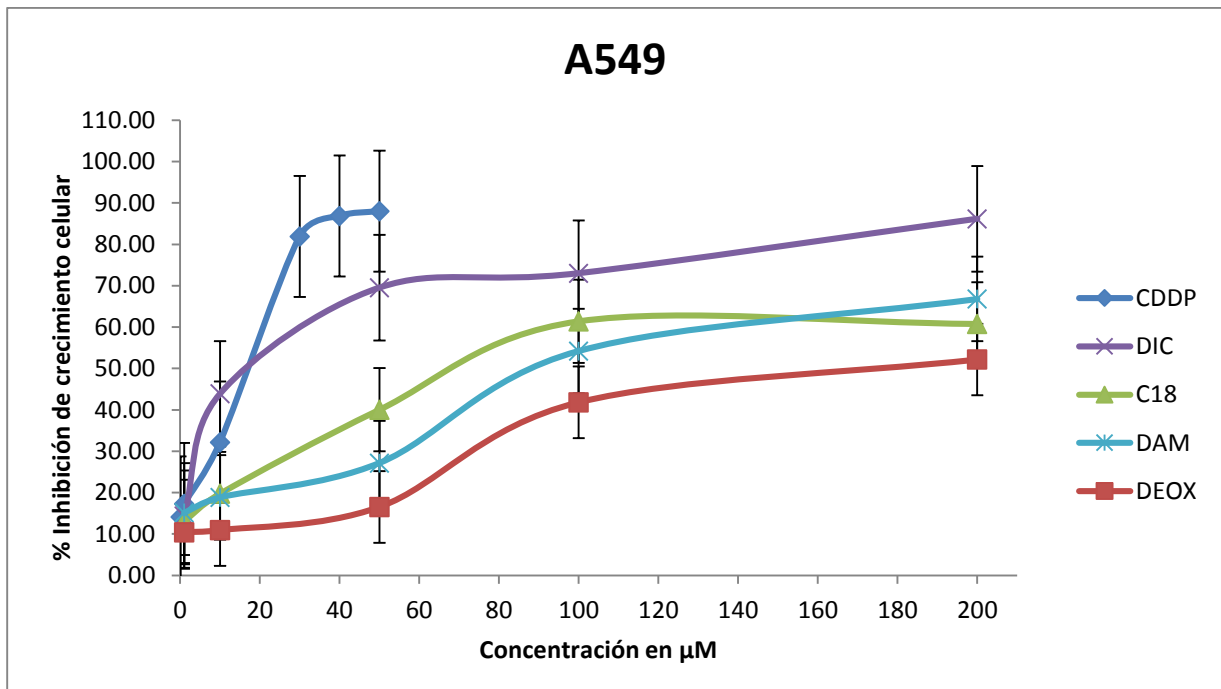
This report has been created with Olex2, compiled on 2016.02.19 svn.r3266 for OlexSys. Please [let us know](#) if there are any errors or if you would like to have additional features.

ANEXOS

10.16 ANEXO 16.- Gráficas de líneas celular tratada con los diferentes diterpenos (% de inhibición vs. concentración)

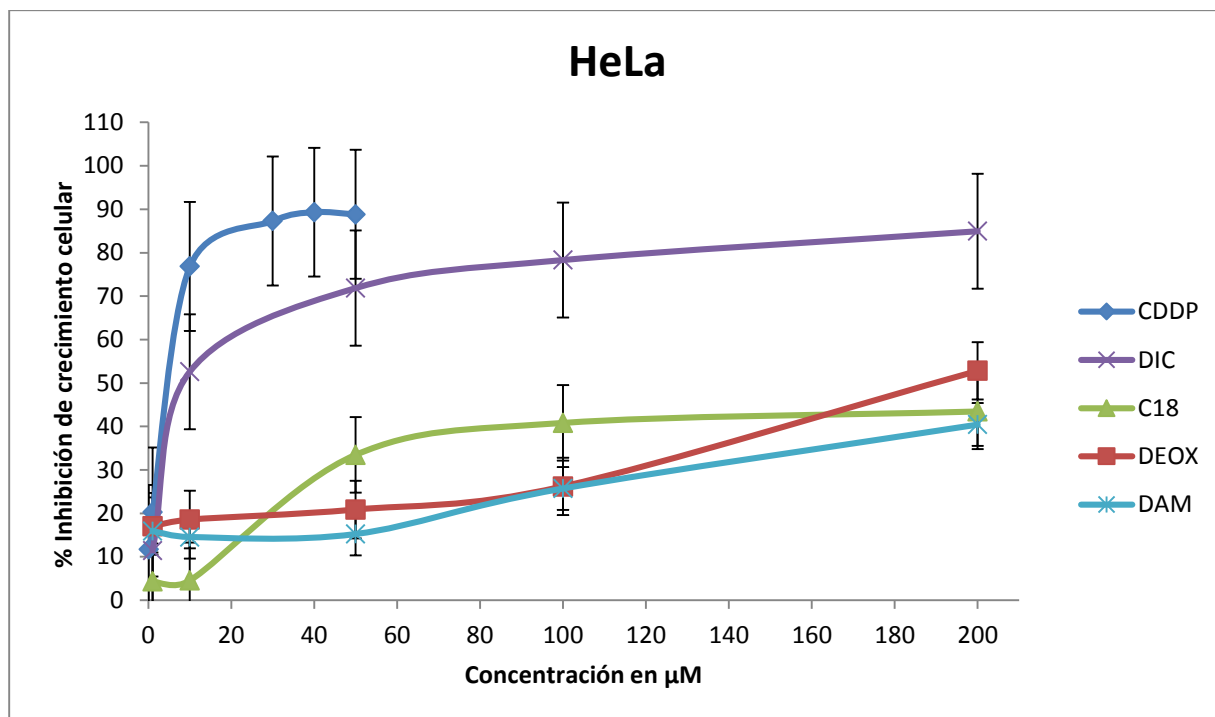


Línea celular CT26 (Cáncer de colon) tratadas con los 4 diterpenos y CDDP como control positivo.

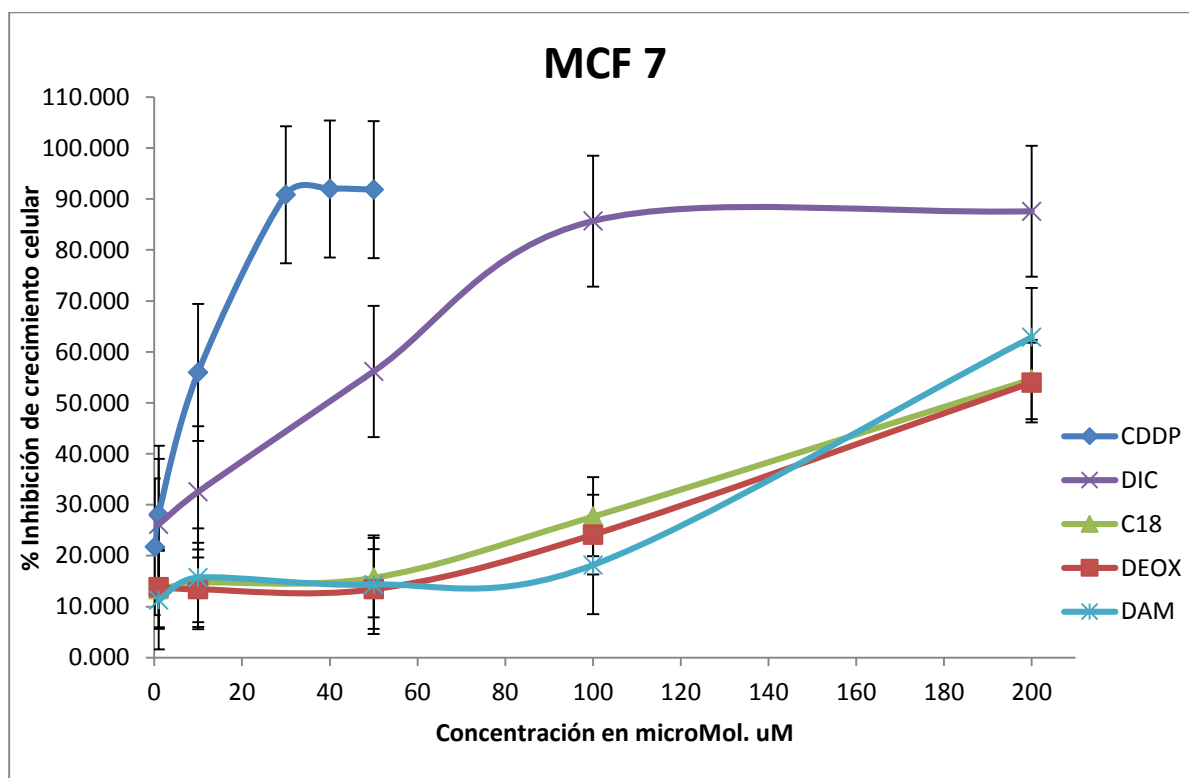


Línea celular A549 (Cáncer de pulmón) tratadas con los 4 diterpenos y CDDP como control positivo.

ANEXOS



Línea celular HeLa (Cáncer cervicouterino) tratadas con los 4 diterpenos y CDDP como control positivo.



Línea celular MCF7 (Cáncer mama) tratadas con los 4 diterpenos y CDDP como control positivo.