



Universidad del Mar

Campus Puerto Escondido

Estudio químico y evaluación *in vitro* de la actividad antibacteriana y citotóxica de los extractos de *Salvia setulosa* Fernald (Familia: Lamiaceae)

TESIS

Que para obtener el Título Profesional
de Licenciada en Biología

Presenta

Tania Elisalda Reyes Bautista

Directora

Dra. Mónica Alicia Calderón Oropeza

Co-Directora

Dra. Mayra Herrera Martínez

Puerto Escondido, Oaxaca 2024

Con todo mi amor y cariño,

dedico esta tesis:

A mi familia, fuente inagotable de apoyo e inspiración. Su amor y aliento han sido mi faro durante este viaje académico. Gracias por siempre creer en mí.

Papá (Benito Reyes)

Mamá (Rosalia Bautista)

Hermanos (Edgar, Lando, Juli)

Abuelita (Alejandra) que siempre está al pendiente de cada paso que doy.

A mis abuelitos (Soledad^f y Adolfo⁺) que desde el cielo sé lo orgullosos que están de que esté culminando esta etapa.

A mi persona especial: Carlitos, tu presencia ha sido un sólido respaldo en cada paso que he dado.

A Dios, porque sin su soporte día a día, esto no hubiera sido posible.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mis más sinceros agradecimientos a aquellas personas que han estado presentes durante estos años. A mi familia, quienes han sido mi mayor apoyo y fuente constante de inspiración a lo largo de este camino académico. A mi querida madre y padre, su inquebrantable respaldo y sus palabras de aliento constante me han dado la fuerza para enfrentar los desafíos y perseverar en este camino. A mis hermanos, su compañía y comprensión han sido un faro de luz en los momentos difíciles. A mis amados abuelos, su sabiduría, amor incondicional y sus bendiciones han sido un impulso invaluable en mi búsqueda del conocimiento. A todos ustedes, mi gratitud eterna por estar siempre presentes, motivándome y brindándome el amor y el apoyo que necesito para alcanzar mis metas.

A la familia Méndez Luna, por abrirme las puertas de su hogar y hacerme parte de su familia, por brindarme su apoyo y compañía siempre que lo necesité. A Lalito, por apoyarme en todo momento, por creer en mi potencial y por todo el cariño que me ha brindado durante este tiempo.

A los chicos del GIM-DEPROTÉ Ale, Viri, Gis, Libni, Yoali, Lore, Citla por hacer mi estancia más amena, apoyarme con nuevas técnicas y brindarme su amistad. A la Dra. Carolina Calderón, agradezco su compañía, sabiduría, amistad y consejos. Expreso mi gratitud a mis compañeros de universidad, especialmente a Eli, Yahrad, Pablo, Richard, Ramón, Lalo y Josfret cuya amistad ha sido un gran apoyo a lo largo de los desafíos que hemos enfrentado. Gracias por su compañerismo, amistad, y por formar parte importante de mi experiencia universitaria.

A mis revisores, la Dra. Mayra Herrera Martínez, Dra. Mónica Alicia Calderón Oropeza, el Dr. Julio Adolfo Acosta Calderón, Dr. Juan Manuel Villa Hernández y Dr. Luis David Maldonado Bonilla, su tiempo, dedicación, sus comentarios y observaciones fueron fundamentales para mejorar la calidad de esta investigación. Agradezco sinceramente su paciencia, profesionalismo y compromiso con mi desarrollo académico.

A mi directora de tesis, la Dra. Mónica Alicia Calderón Oropeza, por su orientación, apoyo y confianza a lo largo de este proceso. Por la oportunidad de trabajar con salvias y conocer un campo lleno de aplicaciones. Agradezco su paciencia, claridad y disposición para compartir su conocimiento y experiencia conmigo. Su liderazgo, dedicación y confianza en mi trabajo han sido fundamentales para mi crecimiento académico y personal. Gracias por ser más que una directora de tesis, por ser una mentora y una fuente constante de inspiración. Su influencia se extenderá a lo largo de mi carrera y vida, trascendiendo el ámbito de esta tesis.

A mi Co-Directora, la Dra. Mayra Herrera Martínez, su dedicación, orientación y compromiso con este proyecto han sido fundamentales para su éxito. Agradezco profundamente su experiencia, perspectiva y sabiduría, que han enriquecido cada etapa de nuestra investigación, por permitirme formar parte de su grupo de investigación GIM-DEPROTÉ, de donde me llevo una gran experiencia al trabajar con nuevas líneas de investigación. Su apoyo incondicional y su capacidad para motivarme han sido un verdadero regalo.

A los profesores de la carrera de Biología, mi más profundo agradecimiento por cada enseñanza, consejo y orientación brindada durante mi trayectoria académica. Así como a la Lic. Claudia Contreras Esquinca jefa de biblioteca, por cada palabra de ánimo y motivación desde el primer día. Su apoyo incondicional ha sido fuente de inspiración constante.

A la Dra. Rosa Elva Norma del Río Torres, por recibir y procesar las muestras en el IIQB-UMSNH, por la adquisición de espectros de RMN. A la Dra. Brenda Bedolla del INECOL unidad Pátzcuaro, por la determinación taxonómica de los ejemplares botánicos. A la Universidad del Mar, por permitirme hacer uso de sus instalaciones para llevar a cabo mi formación académica y el desarrollo de esta tesis. Así mismo, a la Universidad de la Cañada (UNCA) por abrirme las puertas de su institución al permitirme trabajar en sus laboratorios de investigación, a la Dra. Mayra y al Dr. Armando, por permitirme llevar a cabo cada experimento con líneas celulares y cepas bacterianas, por facilitarme material y reactivos.

Este trabajo se desarrolló en la Universidad del Mar gracias al financiamiento del proyecto 2IG2204 y en la Universidad de la Cañada gracias al Proyecto Ciencia Básica CONACYT No CB-2017-2018-A1-S-55142.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS.....	xi
RESUMEN.....	xii
ABSTRACT.....	xiv
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Diversidad de plantas en México.....	3
2.2 Familia Lamiaceae.....	3
2.3 Plantas del género <i>Salvia</i>	5
2.3.1 <i>Salvia setulosa</i> Fernald.....	6
2.3.2 Compuestos químicos en salvias.....	8
2.3.2.1 Terpenos de <i>Salvia</i>	8
2.3.2.1.1 Diterpenos, triterpenos y esteroides en <i>Salvia</i>	9
2.3.2.2 Polifenoles: ácidos fenólicos y flavonoides.....	10
2.3.3 Bioactividad de los compuestos de <i>Salvia</i>	13
2.3.3.1 Actividad antibacteriana de <i>Salvia</i>	13
2.3.3.2 Actividad citotóxica de <i>Salvia</i>	14
2.4 Patologías de importancia en salud pública.....	15
2.4.1 Infecciones bacterianas.....	16
2.4.1.1 Microorganismos de importancia médica.....	16
2.4.1.2 Resistencia a antibióticos.....	17
2.4.2 Cáncer.....	18

2.4.2.1	Cáncer cervicouterino	19
2.4.2.2	Línea celular HeLa (ATCC CCL-2)	20
2.4.2.3	Índice de selectividad	22
2.4.2.4	Línea celular HaCaT	22
III.	JUSTIFICACIÓN	24
IV.	HIPÓTESIS	25
V.	OBJETIVOS	25
5.1	Objetivo general.....	25
5.2	Objetivos específicos.....	25
VI.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	26
6.1	Recolección de ejemplares	26
6.2	Obtención de extractos de <i>Salvia setulosa</i>	27
6.3	Aislamiento de metabolitos secundarios	28
6.4	Elucidación estructural de metabolitos mayoritarios.....	30
6.5	Ensayos biológicos	31
6.5.1	Preparación de las soluciones madre (SM)	31
6.5.2	Actividad antibacteriana	31
6.5.2.1	Microorganismos de prueba	31
6.5.2.2	Método de microdilución en caldo	32
6.5.2.3	Preparación del inóculo	32
6.5.2.4	Determinación de la actividad antibacteriana.....	33
6.5.2.5	Obtención de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB).....	34

6.5.3	Actividad citotóxica	34
6.5.3.1	Cultivo de líneas celulares	34
6.5.3.2	Evaluación de los extractos, fracciones y compuestos	35
6.5.3.3	Ensayo de viabilidad celular con cristal violeta	35
6.5.3.4	Obtención de la Concentración Inhibitoria Media	36
6.5.3.5	Índice de Selectividad.....	36
6.6	Análisis Estadístico	37
VII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
7.1	Obtención de extractos y rendimiento	38
7.2	Aislamiento de compuestos	39
7.3	Actividad antibacteriana	46
7.4	Actividad citotóxica.....	51
7.4.1	Índice de selectividad (IS).....	61
VIII.	CONCLUSIONES	63
IX.	PERSPECTIVAS.....	64
X.	PRODUCTOS GENERADOS.....	65
IX.	REFERENCIAS	66
VIII.	ANEXOS.....	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Géneros representativos de la familia Lamiaceae en la flora mexicana.....	4
Figura 2. Parte aérea de <i>S. setulosa</i> Fernald.	7
Figura 3. Distribución de <i>S. setulosa</i> Fernald en la República Mexicana.....	8
Figura 4. Estructura base de los diterpenos de <i>Salvia</i>	9
Figura 5. Estructura base de los triterpenos de <i>Salvia</i>	10
Figura 6. Estructuras representativas de flavonoides y ácidos fenólicos de <i>Salvia</i>	11
Figura 7. Incidencia de cáncer en mujeres a nivel mundial.	19
Figura 8. Línea celular HeLa ATCC CCL-2.	21
Figura 9. Línea celular HaCaT.....	23
Figura 10. Ubicación del sitio de colecta en San José del Pacífico, Oaxaca.	26
Figura 11. Prensado, secado y montaje de los ejemplares de <i>S. setulosa</i>	27
Figura 12. Proceso de separación de los extractos.....	29
Figura 13. Proceso de preparación de los tratamientos.	33
Figura 14. Espectro de RMN de ¹ H de SsH de <i>S. setulosa</i> en CDCl ₃ a 400 MHz.	39
Figura 15. Fraccionamiento del extracto hexánico.	40
Figura 16. Espectro de RMN de ¹ H del estigmasterol (16) y β-sitosterol (17) en CDCl ₃ a 400 MHz.	41
Figura 17. Espectro de RMN de ¹ H de SsA de <i>S. setulosa</i> en CDCl ₃ a 400 MHz.	42
Figura 18. Fraccionamiento del extracto acetónico.....	43
Figura 19. Espectro de RMN de ¹ H del ácido oleanólico (18) y ácido ursólico (19) en DMSO a 400 MHz.	45
Figura 20. Concentración Mínima Bactericida de SsH y SsH 15-19 frente a <i>S. aureus</i> ..	48

Figura 21. Porcentaje de viabilidad celular del extracto hexánico en células HeLa.	52
Figura 22. Porcentaje de viabilidad celular del extracto acetónico en células HeLa.....	53
Figura 23. Porcentaje de viabilidad celular de SsAF7E (4) en células HeLa.	54
Figura 24. Porcentaje de viabilidad celular de SsAF7E (6) en células HeLa.	55
Figura 25. Porcentaje de viabilidad celular de SaA 15-22;4-54 en células HeLa.	56
Figura 26. Porcentaje de viabilidad celular de SsH 63-74 en células HeLa.	57
Figura 27. Porcentaje de viabilidad celular de SsH 15-19 en células HeLa.	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Bioactividad de algunas especies del género <i>Salvia</i>	14
Tabla 2. Proporciones de disolventes para el fraccionamiento de extractos.....	28
Tabla 3. Proporción de disolventes para la purificación de compuestos.	30
Tabla 4. Características de ATCC de las cepas empleadas en los ensayos antibacterianos.....	32
Tabla 5. Rendimiento de los extractos crudos de <i>Salvia setulosa</i>	38
Tabla 6. Concentración Mínima Inhibitoria del extracto hexánico y SsH 15-19 frente a dos cepas bacterianas.	47
Tabla 7. Actividad antibacteriana de diferentes especies de <i>Salvia</i>	49
Tabla 8. Actividad citotóxica de algunas especies de <i>Salvia</i>	60
Tabla 9. Criterios de clasificación de bioactividad con relación al IC ₅₀	61
Tabla 10. Índice de selectividad de los extractos, fracciones y compuestos.	61

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y ACRÓNIMOS

°C	Grados Celsius
δ	Desplazamiento químico
µg	Microgramos
µL	Microlitros
ATCC	Colección Americana de Cultivos de Referencia
CCA	Cromatografía en Columna Abierta
CCF	Cromatografía en Capa Fina
CV	Cristal Violeta
d	Señal doble
dd	Señal doble de dobles
DMEM	Medio de Eagle Modificado de Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
HaCaT	Queratinocitos humanos
HeLa	Células de adenocarcinoma cervical
Hz	Hertz
IC ₅₀	Concentración inhibitoria media
IS	Índice de Selectividad
J	Constante de acoplamiento
m	Señal múltiple
mg	Miligramos
msnm	Metros sobre el nivel del mar
MHz	MegaHertz
mL	Mililitros
MS	Metabolitos Secundarios
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il] -2,5-difenil tetrazolio
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
s	Señal simple
SFB	Suero Fetal Bovino
SsA	<i>Salvia setulosa</i> , Acetónico
SsH	<i>Salvia setulosa</i> , Hexánico
t	Señal triple
TMS	Tetrametilsilano
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
VPH	Virus del Papiloma Humano
WHO	World Health Organization

RESUMEN

Las infecciones bacterianas y el cáncer representan graves problemas de salud en términos de mortalidad. Por ello, el estudio químico de las plantas contribuye a la identificación de compuestos con potencial terapéutico contra estos padecimientos. En este sentido, el género *Salvia* es reconocido por sus propiedades bioactivas. Así el objetivo de esta investigación fue realizar el estudio químico y la evaluación de la actividad antibacteriana y citotóxica de los extractos de *S. setulosa*, una especie endémica de México que únicamente cuenta con estudios taxonómicos. Para eso, se recolectó la especie y la parte aérea del material vegetal se secó (858.2 g) y maceró para obtener los extractos hexánico (SsH, rendimiento del 0.69 %), acetónico (SsA, 2.10 %) y metanólico (SsM, 3.35 %). Posteriormente, los extractos hexánico y acetónico se fraccionaron por cromatografía en columna abierta para aislar sus compuestos mayoritarios. En los ensayos de bioactividad, los extractos y compuestos se probaron frente a cuatro cepas bacterianas para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y dos líneas celulares para definir la Concentración Media Inhibitoria (IC₅₀). El estudio químico de *S. setulosa* mostró la presencia del compuesto SsH 15-19; la mezcla de los ácidos oleanólico y ursólico y la mezcla de estigmasterol y β -sitosterol. El extracto SsH fue efectivo contra las cepas de *Staphylococcus aureus* y *S. aureus* resistente a meticilina, CMI, 500 y 1000 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Aislado de este extracto, el compuesto SsH 15-19, tuvo mayor efectividad (CMI, 62.5 $\mu\text{g/mL}$) sobre ambas cepas. En cuanto a los ensayos de citotoxicidad, se observa una tendencia similar, donde el compuesto SsH 15-19 (IC₅₀, 26.3 $\mu\text{g/mL}$) fue más activo que el extracto SsH (IC₅₀, 69.5 $\mu\text{g/mL}$) y a su vez, éste fue más efectivo que el extracto SsA (IC₅₀, 241.0 $\mu\text{g/mL}$) sobre células de cáncer cervicouterino (HeLa). Estos resultados sugieren que SsH 15-19 podría ser el compuesto bioactivo de SsH. Sin embargo, el índice de selectividad (IS) calculado con relación a la IC₅₀ obtenida en queratinocitos humanos (HaCaT), nos indica que SsH 15-19 (IS,1.1) no es selectivo contra HeLa, a diferencia de los extractos SsA (IS,1.6) y SsH (IS,1.3). Con lo anterior se muestra el potencial de estudio y bioactividad de SsH 15-19 y SsH. Esta es la primera vez que se reportan los compuestos presentes en *S. setulosa*, lo

cual contribuye al conocimiento quimiotaxonómico del género. Así mismo, se demuestra que esta planta es candidata potencial para la identificación de compuestos con actividad antibacteriana y citotóxica, lo que abre nuevas perspectivas en la búsqueda de fármacos contra infecciones bacterianas y cáncer.

Palabras clave: *Salvia*, fitoquímica, bioactividad, infecciones bacterianas, cáncer.

ABSTRACT

Bacterial infections and cancer represent serious health problems in terms of mortality. Therefore, the chemical study of plants contributes to the identification of compounds with therapeutic potential against these pathologies. About that, the genus *Salvia* is recognized for its bioactive properties. Thus, the aim of this work was to perform the chemical study and evaluation of the antibacterial and cytotoxic activities of *S. setulosa* extracts, an endemic species from Mexico with only taxonomic studies. For that, the aerial part of *S. setulosa* was collected, dried (858.2 g) and macerated to obtain hexanic (SsH, 0.69 % yield), acetonic (SsA, 2.10 %) and methanolic (SsM, 3.35 %) extracts. Then, the hexane and acetone extracts were fractionated by open column chromatography to isolate their majority compounds. In the bioactivity assays, the extracts and compounds were tested against four bacterial strains to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and two cell lines to define the Half-Maximal Inhibitory Concentration (IC_{50}). The chemical study of *S. setulosa* showed the presence of the SsH 15-19 compound; oleanolic and ursolic acids; stigmasterol and β -sitosterol. The SsH extract was effective against *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *S. aureus*, MIC 500 and 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively. The compound isolated from SsH, SsH 15-19, had higher effectiveness (MIC, 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on both strains. Regarding cytotoxicity assays, a similar trend was observed, where the compound SsH 15-19 (IC_{50} , 26.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was more active than the SsH extract (IC_{50} , 69.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and last one was more effective than the SsA extract (IC_{50} , 241.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) on cervical cancer cells (HeLa). These results suggest SsH 15-19 could be the bioactive compound in SsH. Nevertheless, the selectivity index (SI) considering the IC_{50} obtained on human keratinocytes (HaCaT), showed that SsH 15-19 (SI, 1.1) is not selective against HeLa, unlike SsA (SI, 1.6) and SsH (SI, 1.3). With the above, the potential study and the bioactivity of SsH 15-19 and SsH is shown. This is the first time where the compounds present in *S. setulosa* are reported, that contributes to the chemotaxonomic knowledge of this plant. Likewise, it shows that this species is a potential candidate for the identification of compounds with antibacterial and cytotoxic