



Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Química Inorgánica y Analítica
Laboratorio de Radicales Libres y Antioxidantes

**Análisis de triterpenos en extractos de hoja de
Salvia hispanica L. y ensayo antiparasitario y
antiproliferativo de sus metabolitos secundarios**

Memoria para obtener el título de Química

Yaritza Andrea Acosta Araneda

Directores de Memoria:

Dra. María Carolina Zúñiga López – Dr. Claudio Olea Azar

Santiago de Chile, 2023

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de todo este largo proceso y durante toda mi vida mi familia ha sido un pilar de apoyo fundamental para sobrellevar los momentos de crisis y estrés cuando no he sabido lidiar con la enorme carga académica de la carrera o la tesis. Por esto quiero agradecer a mi padres, Solange y Miguel, por hacer de mí la persona que soy hoy en día, e inculcarme los valores del respeto, la responsabilidad, la solidaridad y la empatía, que son los valores con los que he enfrentado los desafíos de la vida. Espero que ahora puedan descansar tranquilos y que ya no tengan que hacer tantos sacrificios por la familia.

Para mi hermana espero que en su etapa universitaria pueda aplicar los mismos valores y que disfrute al máximo todos los días de universidad, que aunque a veces se pone difícil a la larga es una linda etapa en la que aprenderá a ser una adulta joven. Si en algún momento del camino te sientes agobiada puedes acudir a mi en busca de consejo o bien para tener un oído dispuesto a escuchar.

A mis tutores, la profesora María Carolina y el profesor Claudio Olea, agradecerles por darme la oportunidad de trabajar con ustedes y entrar en este hermoso laboratorio, donde he podido conocer a personas maravillosas siempre dispuestas tender ayuda. Profe Caro, gracias por estar dispuesta a escuchar cuando he tenido dudas, por corregirme cuando me he equivocado y por ir más allá de la labor docente siendo la madre de este laboratorio. Al Profe Claudio muchas gracias por haberme escuchado cuando me acerqué a usted buscando tema de tesis, usted me abrió las puertas del laboratorio e hizo posible que pudiera estar aquí con ustedes. Ambos son personas maravillosas, que siempre creen en sus alumnos y se la juegan por ellos. Espero que la labor conjunta que hacen siga así en el futuro.

También debo dar gracias a los profesores de mi comisión Profesora Verónica Arancibia y Profesor Javier Morales Valenzuela, quienes en este tiempo me han ayudado a corregir mis errores para hacer un mejor trabajo, y me han guiado cuando he tenido dificultades.

A la Gabriela y Josué, por ayudarme con los aspectos prácticos y teóricos de mi tesis, sin ustedes probablemente los experimentos no hubieran funcionado por contaminación de los cultivos de parásitos o bien ahora habría un HPLC descompuesto en el laboratorio. A Gabo, Vale, y los chicos del congreso quiero agradecerles por hacer emocionante la experiencia del congreso, sin duda son recuerdos que siempre atesoraré conmigo. Al resto de los chicos del laboratorio de Radicales Libres y Antioxidantes: Sandy, Pancho, Esteban, Mauri, Maca, José, Javiera, Sebastián, Nando y tío Marcelo, por conversar conmigo cuando he querido contacto humano y sacarme una sonrisa, se agradecen esas cosas por que no todo es hacer la tesis, también hay momentos para ser personas. A Paola Guzmán, por ayudarme con sus experimentos preliminares, cuyos resultados fueron importantes para el desarrollo de mi tesis. Y a las personas del Laboratorio de Mecanismos de Infección Parasitaria a cargo de la Doctora Ulrike Kemmerling gracias por ayudarme en la parte biológica de esta tesis.

Agradecer a Sebastián por escuchar mis quejas, quererme a pesar de mis enojos y aconsejarme durante este proceso. Tal como me dijiste un día hay que dar tiempo a todo y para hacer un trabajo perfecto hay que hacerlo con calma, porque la impaciencia y el cansancio llevan a los errores. Te extraño, espero verte pronto.

A mis amigas Maire, Karol y Cote, y a mis roommates Claudio chico, Claudio viejo y Romina, gracias por sacarme de la rutina y no dejar que me consumiera la ansiedad. Espero que tengamos muchos días más de copas, comida y chismes.

Finalmente se agradece al proyecto FONDECyT N° 1190525 por financiar los aspectos económicos de este trabajo.

ABREVIATURAS

AB: Ácido betulínico

AE: Acetato de etilo

AE-B: Extractos de hoja de *Salvia hispanica* L. de fenotipo de semillas blanca con solvente acetato de etilo.

AE-N: Extractos de hoja de *Salvia hispanica* L. de fenotipo de semillas negra con solvente acetato de etilo.

AM: Ácido madecásico

AO: Ácido oleanólico

AS: Ácido asiático

AU: Ácido ursólico

DCM: Diclorometano

DCM-B: Extractos de hoja de *Salvia hispanica* L. de fenotipo de semillas blanca con solvente diclorometano.

DCM-N: Extractos de hoja de *Salvia hispanica* L. de fenotipo de semillas negra con solvente diclorometano.

DMSO: Dimetilsulfóxido

EtOH: Etanol

EtOH-B: Extractos de hoja de *Salvia hispanica* L. de fenotipo de semillas blanca con solvente etanol.

EtOH-N: Extractos de hoja de *Salvia hispanica* L. de fenotipo de semillas negra con solvente etanol.

HEX: Hexano

HEX-B: Extractos de hoja de *Salvia hispanica* L. de fenotipo de semillas blanca con solvente hexano.

HEX-N: Extractos de hoja de *Salvia hispanica* L. de fenotipo de semillas Negra con solvente hexano.

TABLA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	16
1.1	Antecedentes <i>Salvia hispanica</i> L.	16
1.2	Estudios de las partes aéreas de la <i>Salvia hispanica</i> L.....	19
1.3	Extracción de metabolitos secundarios de matrices vegetales	20
1.4	Propiedades biológicas de los terpenos.....	22
1.5	Actividad Antiparasitaria de terpenos.	23
1.6	Métodos de identificación y cuantificación de triterpenos.....	26
1.7	Métodos de medición de capacidad antiparasitaria	26
2	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
3	HIPÓTESIS	28
4	OBJETIVOS	28
4.1	General:	28
4.2	Específicos:.....	28
5	METODOLOGÍA.....	29
5.1	Muestra	29
5.1.1	Cultivo, muestreo y secado de las hojas de las plantas de chía.....	29
5.2	Reactivos	29
5.3	Métodos	30
5.3.1	Método de extracción Secuencial	30
5.3.2	Identificación de triterpenos por cromatografía líquida de alta eficiencia con detector espectrofotométrico con arreglo de diodos (HPLC-UV- VIS-DAD)	31
5.3.2.1	Método de curva de calibración externa.....	31
5.3.2.2	Parámetros Analíticos	33
5.3.2.3	Método de adición de estándar	34
5.3.3	Evaluación de citotoxicidad (antiproliferativo).....	35
5.3.4	Evaluación de actividad tripanocida en tripomastigotes (ensayo antiparasitario)	37
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
6.1	Ensayos Preliminares.....	39

6.2	Construcción de Curva de Calibración	41
6.2.1	Parámetros Analíticos.....	47
6.3	Cuantificación de Triterpenos en Extractos de Hoja de <i>Salvia hispanica</i> L. por Método de Curva de Calibración.....	49
6.4	Cuantificación de Triterpenos en Extractos de Hoja de <i>Salvia hispanica</i> L. por Método de Adición Estándar	60
6.4.1	Adición Estándar a Extractos de Hoja de <i>Salvia hispanica</i> L. de Fenotipo de Semilla Blanca de Etanol	62
6.4.2	Adición Estándar a Extractos de Hoja de <i>Salvia hispanica</i> L. de Fenotipo de Semilla Negra de Etanol	65
6.4.3	Adición Estándar a Extractos de Hoja de <i>Salvia hispanica</i> L. de Fenotipo de Semilla Blanca de Diclorometano	67
6.4.4	Adición Estándar a Extractos de Hoja de <i>Salvia hispanica</i> L. de Fenotipo de Semilla Negra de Diclorometano	69
6.4.5	Adición Estándar a Extractos de Hoja de <i>Salvia hispanica</i> L. de Fenotipo de Semilla Blanca de Hexano	71
6.4.6	Adición Estándar a Extractos de Hoja de <i>Salvia hispanica</i> L. de Fenotipo de Semilla Negra de Hexano	73
6.4.7	Resultados Generales del Método de Adición Estándar.....	79
6.5	Comparación de la Concentración de Triterpenos en Extractos de Hoja de <i>Salvia hispanica</i> L. con Otras Matrices Vegetales	84
6.6	Ensayo Antiparasitario de los Extractos de Hoja de <i>Salvia hispanica</i> L. ...	93
6.7	Ensayo de Citotoxicidad de los Extractos de Hoja de <i>Salvia hispanica</i> L. ...	99
7	CONCLUSIONES.....	101
8	BIBLIOGRAFÍA	102
9	ANEXOS	107

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Soluciones madres de estándares de los triterpenos, llevados a su respectivo volumen final de metanol.	31
Tabla 2.	Preparación de las soluciones madres de los extractos de hoja de <i>Salvia hispanica</i> L.	32
Tabla 3.	Adición estándar a los 6 extractos de <i>Salvia hispanica</i> L.	34
Tabla 4.	Soluciones madres de los extractos de hoja de <i>Salvia hispanica</i> L. en DMSO.	35
Tabla 5.	Soluciones madres de estándares de los triterpenos, llevados a su respectivo volumen final de DMSO.	37
Tabla 6.	Parámetros analíticos de los cinco triterpenos.	48
Tabla 7.	Ecuaciones de recta de los cinco triterpenos analizados.	48
Tabla 8.	Concentración de triterpenos en mg/g de extracto de hoja de fenotipo de semilla blanca.	51
Tabla 9.	Concentración de triterpenos en mg/g de extracto de hoja de fenotipo de semilla negra.	52
Tabla 10.	Ecuaciones de la recta que se obtuvieron con el método de adición estándar para extractos de hoja de <i>Salvia hispanica</i> L.	79
Tabla 11.	Concentración de triterpenos en mg/g de extractos de hoja de <i>Salvia hispanica</i> L. que se obtuvieron con el método de adición estándar.	80
Tabla 12.	Comparación de las concentraciones obtenidas con ambos métodos para los extractos de hoja de <i>Salvia hispanica</i> L.	81
Tabla 13.	Coeficiente de reparto octanol/agua de los cinco triterpenos analizados [37, 38, 39, 40, 41].	83
Tabla 14.	Contenido de triterpenos en materiales vegetales [48, 49].	90
Tabla 15.	Concentración de triterpenos en los extractos utilizados en el ensayo antiparasitario.	97
Tabla 16.	Curva de calibración externa de ácido madecásico en concentraciones que van desde 0,5 mg/L a 80 mg/L en metanol.	107
Tabla 17.	Curva de calibración externa de ácido asiático en concentraciones que van desde 0,5 mg/L a 80 mg/L en metanol.	107
Tabla 18.	Curva de calibración externa de ácido betulínico en concentraciones que van desde 0,5 mg/L a 40 mg/L en metanol.	108
Tabla 19.	Curva de calibración externa de ácido oleanólico en concentraciones que van desde 0,5 mg/L a 80 mg/L en metanol.	108
Tabla 20.	Curva de calibración externa de ácido ursólico en concentraciones que van desde 0,5 mg/L a 80 mg/L en metanol.	109

Tabla 21.	Adición estándar ácido madecásico en el extracto EtOH-B.....	110
Tabla 22.	Adición estándar ácido asiático en el extracto EtOH-B.....	110
Tabla 23.	Adición estándar ácido madecásico en el extracto EtOH-N.....	110
Tabla 24.	Adición estándar ácido asiático en el extracto EtOH-N	111
Tabla 25.	Adición estándar ácido madecásico en el extracto DCM-B	111
Tabla 26.	Adición estándar ácido asiático en el extracto DCM-B	111
Tabla 27.	Adición estándar ácido madecásico en el extracto DCM-N	111
Tabla 28.	Adición estándar ácido asiático en el extracto DCM-N	112
Tabla 29.	Adición estándar ácido madecásico en el extracto HEX-B	112
Tabla 30.	Adición estándar ácido asiático en el extracto HEX-B	112
Tabla 31.	Adición estándar ácido madecásico en el extracto HEX-N	112
Tabla 32.	Adición estándar ácido asiático en el extracto HEX-N.....	113
Tabla 33.	Adición estándar ácido betulínico en el extracto HEX-N.....	113
Tabla 34.	Adición estándar ácido oleanólico en el extracto HEX-N.....	113
Tabla 35.	Adición estándar ácido ursólico en el extracto HEX-N.....	113
Tabla 36.	Resultados de ensayo antiparasitario a extractos de hoja de <i>Salvia hispanica</i> L. a 200 mg/L.....	114
Tabla 37.	Resultados de ensayo antiparasitario a estándares de los cinco triterpenos a dos concentraciones distintas.	114
Tabla 38.	Resultados de ensayo antiproliferativo a extractos de hoja de <i>Salvia hispanica</i> L. a 200 mg/L.....	115

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	A) Hojas de <i>Salvia hispanica</i> L. B) Parte superior de <i>Salvia hispanica</i> L. donde salen flores y semillas [4].	17
Figura 2.	A) Insecto portador y transmisor del parásito <i>Trypanosoma cruzi</i> . B) Imagen al microscopio del parásito <i>Trypanosoma cruzi</i> encontrado en sangre [27].	25
Figura 3.	Esquema de extracción secuencial con los cuatro solventes: hexano, diclorometano, acetato de etilo y etanol, para obtener los extractos de <i>Salvia hispanica</i> L.	30
Figura 4.	Estructura de ácido madecásico, ácido asiático, ácido betulínico, ácido oleanólico y ácido ursólico.	39
Figura 5.	Cromatograma de multi-estándares a 10 mg/L, medidos por HPLC-UV-VIS-DAD a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético (0,1 %), y flujo 0,8 mL/min.	42
Figura 6.	Curva de calibración externa de ácido madecásico, determinada mediante HPLC-UV-VIS-DAD a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético (0,1 %) y flujo a 0,8 mL/min.	43
Figura 7.	Curva de calibración externa de ácido asiático, determinada mediante HPLC-UV-VIS-DAD a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético (0,1 %), y flujo a 0,8 mL/min.	44
Figura 8.	Curva de calibración externa de ácido betulínico determinada mediante HPLC-UV-VIS-DAD a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético (0,1 %), y flujo a 0,8 mL/min.	45
Figura 9.	Curva de calibración externa de ácido oleanólico, determinada mediante HPLC-UV-VIS-DAD a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético (0,1 %), y flujo a 0,8 mL/min.	46
Figura 10.	Curva de calibración externa de ácido ursólico, determinada mediante HPLC-UV-VIS-DAD a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético (0,1 %), y flujo a 0,8 mL/min.	47
Figura 11.	Cromatograma del extracto HEX-B a 6.000 mg/L, medido por HPLC-UV-VIS-DAD a 201 nm. Se utilizó gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético (0,1 %) y un flujo de 0,8 mL/min.	49
Figura 12.	Cromatograma sin fortificar y cromatograma fortificado superpuestos del extracto HEX-B a 6.000 mg/L. Gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético (0,1 %); flujo de 0,8 mL/min; y los analitos fueron medidos a 201 nm.	50
Figura 13.	Curva de calibración de ácido madecásico medido por HPLC-UV-VIS-DAD a 201 nm con las áreas promedio de los extractos dentro de la recta. Se utilizó un gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1% y flujo a 0,8 mL/min.	54
Figura 14.	Curva de calibración de ácido asiático medido por HPLC-UV-VIS-DAD a 201 nm con las áreas promedio de los extractos en de la recta. Se utilizó un gradiente de	

fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1% y flujo a 0,8 mL/min. A) Panorama general de la curva de calibración; B) Acercamiento del rango 0 – 10 mg/L, para mejor apreciación de los puntos.....	55
Figura 15. Curva de calibración de ácido betulínico medido por HPLC-UV-VIS-DAD a 201 nm con las áreas promedio de los extractos en de la recta. Se utilizó un gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1% y flujo a 0,8 mL/min.	56
Figura 16. Curva de calibración de ácido oleanólico medido por HPLC-UV-VIS-DAD a 201 nm con las áreas promedio de los extractos en de la recta. Se utilizó un gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1% y flujo a 0,8 mL/min. A) Panorama general de la curvade calibración; B) Acercamiento del rango 0 – 10 mg/L, para mejor apreciación de los puntos.....	57
Figura 17. Curva de calibración de ácido ursólico medido por HPLC-UV-VIS-DAD a 201 nm con las áreas promedio de los extractos en de la recta. Se utilizó un gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1% y flujo a 0,8 mL/min. A) Panorama general de la curva de calibración; B) Acercamiento del rango 0 – 10 mg/L, para mejor apreciación de los puntos.....	58
Figura 18. Cromatograma superpuesto de adición estándar del extracto HEX-N a 6.000 mg/L, por HPLC-UV-VIS-DAD medido a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1%, a un flujo de 0,8 mL/min.....	60
Figura 19. Cromatograma superpuesto ampliado del extracto HEX-N a 6.000 mg/L (ácido madecásico y ácido asiático), por HPLC-UV-VIS-DAD medido a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1%, a un flujo de 0,8 mL/min.	61
Figura 20. Gráfico de adición estándar de ácido madecásico en el extracto EtOH-B, con adición de triterpenos de 20 a 80 mg/L, determinados por HPLC-UV-VIS-DAD medidos a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1% y a un flujo de 0,8 mL/min.....	63
Figura 21. Gráfico de adición estándar de ácido asiático en el extracto EtOH-B, con adición de triterpenos de 20 a 80 mg/L, determinados por HPLC-UV-VIS-DAD medidos a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1% y a un flujo de 0,8 mL/min.....	64
Figura 22. Gráfico de adición estándar de ácido madecásico en el extracto EtOH-N, con adición de triterpenos de 20 a 80 mg/L, determinados por HPLC-UV-VIS-DAD medidos a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1% y a un flujo de 0,8 mL/min.....	65
Figura 23. Gráfico de adición estándar de ácido asiático en el extracto EtOH-N, con adición de triterpenos de 20 a 80 mg/L, determinados por HPLC-UV-VIS-DAD medidos a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1% y a un flujo de 0,8 mL/min.....	66
Figura 24. Gráfico de adición estándar de ácido madecásico en el extracto DCM-B, con adición de triterpenos de 20 a 80 mg/L, determinados por HPLC-UV-VIS-DAD medidos a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1% y a un flujo de 0,8 mL/min.....	67

Figura 25.	Gráfico de adición estándar de ácido asiático en el extracto DCM-B, con adición de triterpenos de 20 a 80 mg/L, determinados por HPLC-UV-VIS-DAD medidos a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1% y a un flujo de 0,8 mL/min.....	68
Figura 26.	Gráfico de adición estándar de ácido madecásico en el extracto DCM-N, con adición de triterpenos de 20 a 80 mg/L, determinados por HPLC-UV-VIS-DAD medidos a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1% y a un flujo de 0,8 mL/min.....	69
Figura 27.	Gráfico de adición estándar de ácido asiático en el extracto DCM-N, con adición de triterpenos de 20 a 80 mg/L, determinados por HPLC-UV-VIS-DAD medidos a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1% y a un flujo de 0,8 mL/min.....	70
Figura 28.	Gráfico de adición estándar de ácido madecásico en el extracto HEX-B, con adición de triterpenos de 20 a 80 mg/L, determinados por HPLC-UV-VIS-DAD medidos a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1% y a un flujo de 0,8 mL/min.....	71
Figura 29.	Gráfico de adición estándar de ácido asiático en el extracto HEX-B, con adición de triterpenos de 20 a 80 mg/L, determinados por HPLC-UV-VIS-DAD medidos a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1% y a un flujo de 0,8 mL/min.....	72
Figura 30.	Cromatograma superpuesto ampliado del extracto HEX-N a 6.000 mg/L (ácido betulínico, ácido oleanólico y ácido ursólico), por HPLC-UV-VIS-DAD medido a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1%, a un flujo de 0,8 mL/min... 73	
Figura 31.	Gráfico de adición estándar de ácido madecásico en el extracto HEX-N, con adición de triterpenos de 20 a 80 mg/L, determinados por HPLC-UV-VIS-DAD medidos a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1% y a un flujo de 0,8 mL/min.....	74
Figura 32.	Gráfico de adición estándar de ácido asiático en el extracto HEX-N, con adición de triterpenos de 20 a 80 mg/L, determinados por HPLC-UV-VIS-DAD medidos a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1% y a un flujo de 0,8 mL/min.....	75
Figura 33.	Gráfico de adición estándar de ácido betulínico en el extracto HEX-N, con adición de triterpenos de 20 a 80 mg/L, determinados por HPLC-UV-VIS-DAD medidos a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1% y a un flujo de 0,8 mL/min.....	76
Figura 34.	Gráfico de adición estándar de ácido oleanólico en el extracto HEX-N, con adición de triterpenos de 20 a 80 mg/L, determinados por HPLC-UV-VIS-DAD medidos a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1% y a un flujo de 0,8 mL/min.....	77
Figura 35.	Gráfico de adición estándar de ácido ursólico en el extracto HEX-N, con adición de triterpenos de 20 a 80 mg/L, determinados por HPLC-UV-VIS-DAD medidos a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1% y a un flujo de 0,8 mL/min.....	78

Figura 36.	Concentración de ácido madecásico en los 8 extractos de hoja de <i>Salvia hispanica</i> L determinados mediante HPLC-UV-VIS-DAD a 201 nm.....	84
Figura 37.	Concentración de ácido asiático en los extractos de hoja de <i>Salvia hispanica</i> L. determinados mediante HPLC-UV-VIS-DAD a 201 nm.....	85
Figura 38.	Concentración de ácido betulínico en los extractos de hoja de <i>Salvia hispanica</i> L. determinados mediante HPLC-UV-VIS-DAD a 201 nm.....	87
Figura 39.	Concentración de ácido oleanólico en los extractos de hoja de <i>Salvia hispanica</i> L. determinados mediante HPLC-UV-VIS-DAD a 201 nm.....	89
Figura 40.	Concentración de ácido ursólico en los extractos de hoja de <i>Salvia hispanica</i> L. determinados mediante HPLC-UV-VIS-DAD a 201 nm.....	89
Figura 41.	Gráfico de capacidad antiparasitaria de los extractos de hoja de <i>Salvia hispanica</i> L. a 200 mg/L de DMSO, en un volumen de 10.000.000 parásitos/mL. Siendo CN: Control Negativo (sólo parásitos); CP: Control Positivo a 20 mg/L (Benznidazol)	93
Figura 42.	Gráfico de actividad antiparasitaria de los estándares de triterpenos a 20 y 200 mg/L de DMSO, en un volumen de 10.000.000 parásitos/mL. Siendo CN: Control Negativo (solo parásitos); CP: Control Positivo (Benznidazol); AM: Ácido madecásico; AS: Ácido asiático; AB: Ácido betulínico; AO: Ácido oleanólico; AU: Ácido ursólico.....	95
Figura 43.	Gráfico de actividad antiproliferativa de los extractos de hoja de <i>Salvia hispanica</i> L. medida a 200 mg/L.	99

RESUMEN

La *Salvia hispanica* L., comúnmente conocida como chía, es una planta originaria del sur de México que ha despertado el interés científico en los últimos años debido a las excelentes propiedades nutricionales atribuidas a su semilla, las cuales ya han sido ampliamente reportadas, sin embargo, de sus partes aéreas hay reducidos trabajos científicos.

Los terpenos son sustancias químicas naturales formadas por el reordenamiento de dos o más moléculas de isopreno con propiedades antimicrobianas, antifúngicas, antibacterianas, antiproliferativas y antivirales, entre otras. Los antecedentes demuestran que se han identificado una serie de compuestos polifenólicos, así como monoterpenos y sesquiterpenos en *Salvia hispanica* L. De acuerdo con lo anterior, uno de los propósitos de este estudio fue identificar y cuantificar cinco triterpenos: ácido madecásico, ácido asiático, ácido betulínico, ácido oleanólico y ácido ursólico en extractos secuenciales de hoja de *Salvia hispanica* L. procedentes de dos fenotipos comerciales de chía (blanca y negra), los cuales se prepararon con solventes de polaridad creciente (hexano, diclorometano, acetato de etilo y etanol), obteniéndose así 8 extractos en total. Para su determinación se utilizó cromatografía líquida de alta eficiencia, en fase reversa con detector espectrofotométrico con arreglo de diodos (DAD). Para la cuantificación de los compuestos se realizaron curvas de calibración externa en concentraciones de 0,5 – 80 mg/L, y luego se midieron los extractos de hoja de *Salvia hispanica* L. en las mismas condiciones. Se lograron determinar los cinco triterpenos en los diferentes extractos, y se obtuvo que en los extractos de hexano la concentración de triterpenos fue mayor que en los extractos de solventes más polares, siendo el orden de concentración: hexano>diclorometano>acetato de etilo>etanol. Además, se encontró que en general los extractos de hoja de semilla negra la concentración de triterpenos fue mayor que en los extractos de hoja de semilla blanca, en el caso de los extractos de hexano tuvieron un porcentaje mayor de 29% ácido madecásico, 8% ácido asiático, 28% ácido betulínico, 17% ácido oleanólico y 20% ácido ursólico, que su contraparte blanca. Por otro lado, se realizaron curvas de adición de estándar para verificar la señal de los compuestos y evidenciar el efecto matriz en la muestra.

De manera adicional se realizaron estudios antiparasitarios y antiproliferativos a los 8 extractos de chía, obteniéndose que los extractos no son citotóxicos incluso a 200 mg/L,

pero no tiene capacidad antiparasitaria, sin embargo, se hizo el estudio antiparasitario a los estándares de triterpenos a concentraciones de 20 y 200 mg/L, obteniéndose que algunos de ellos, como el ácido asiático y el ácido ursólico si tienen capacidad antiparasitaria. Por lo cual las concentraciones de estos compuestos en los extractos no fueron suficientes para presentar capacidad antiparasitaria.

SUMMARY

Salvia hispanica L., commonly known as chia, is a plant native to southern Mexico that has aroused scientific interest in recent years due to the excellent nutritional properties attributed to its seed, which have already been widely reported. However, of its aerial parts there are reduced scientific works.

Terpenes are natural chemical substances formed by the rearrangement of two or more isoprene molecules with antimicrobial, antifungal, antibacterial, antiproliferative, and antiviral properties, among others. A series of polyphenolic compounds, as well as monoterpenes and sesquiterpenes have been identified in *S. hispanica* L. Based on this information, one of the purposes of this study was to identify and quantify five triterpenes: madecassic acid, asiatic acid, betulinic acid, oleanolic acid and ursolic acid in sequential extracts of *S. hispanica* L. leaves from two commercial chia phenotypes (white and black). Extracts were prepared with solvents of increasing polarity (hexane, dichloromethane, ethyl acetate and ethanol), thus obtaining 8 extracts in total. For its determination, reverse phase high performance liquid chromatography was used, coupled with a spectrophotometric diode array detector (DAD). For the quantification, external calibration curves were performed at concentrations of 0.5 – 80 mg/L. It was possible to determine the five triterpenes in the different extracts, with the hexane extracts having the highest concentration of triterpenes than the more polar solvent extracts, the order of concentration being: hexane>dichloromethane>ethyl acetate>ethanol. In addition, in general the concentration of

triterpenes in the black phenotype extracts was higher than in the white phenotype extracts. Particularly the black hexane extracts had 29% madecassic acid, 8% asiatic acid, 28% betulinic acid, 17% oleanolic acid and 20% ursolic acid, higher amount than its white counterpart. On the other hand, standard addition curves were performed to verify the signal of the compounds and show the matrix effect in the sample.

Additionally, antiparasitic and antiproliferative studies were carried out on the 8 chia extracts, obtaining that the extracts are not cytotoxic even at 200 mg/L, but they do not have antiparasitic activity. However, the antiparasitic study was carried out with the triterpene standards at concentrations of 20 and 200 mg/L, obtaining that some of them, such as asiatic acid and ursolic acid, do have antiparasitic activity. Therefore, the concentrations of these compounds in the extracts were not sufficient to present antiparasitic activity.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes *Salvia hispánica* L.

Desde tiempos remotos el ser humano ha utilizado los metabolitos secundarios de las plantas para el tratamiento de enfermedades y dolencias, en la preparación de productos cosmetológicos, como aditivos para los productos alimenticios como saborizantes, colorantes, etc. Estos metabolitos secundarios son generados por las plantas como un mecanismo de defensa contra el ataque de insectos y patógenos; el ser humano ha usado estos compuestos bioactivos para generar alimentos nutraceuticos y medicamentos, debido a que, a diferencia de los metabolitos primarios de las plantas, la ausencia de metabolitos secundarios no es letal para las plantas. Los metabolitos secundarios se definen en palabras simples como compuestos químicos bioactivos no nutricionales de la planta que generan un efecto farmacológico o toxicológico en humanos y animales [1].

Se estima que una cuarta parte de los medicamentos que se utilizan hoy en día en la medicina moderna son producidos por numerosas especies de plantas. Uno de los ejemplos más conocidos es el taxol, el cual es el medicamento más utilizado en el tratamiento del cáncer de mama, y su compuesto activo, el paclitaxel, es un diterpeno que fue identificado y aislado por primera vez a partir de un extracto vegetal de corteza de *Taxus brevifolia* [2]. Sin embargo, se estima que a la fecha una alta cantidad de plantas (270.000 especies en total) aún no han sido investigadas sus propiedades fitoquímicas o sus actividades biológicas, y una de ellas es la *Salvia hispanica* L.

La chía (*Salvia hispanica* L.) es una hierba anual de la familia Lamiaceae que puede crecer en climas templados, tropicales y secos; es originaria de la zona centro-sur de México y el norte de Guatemala, sin embargo, en los últimos años ha logrado un gran desarrollo en países como Bolivia y Argentina. Se trata de una planta que alcanza una altura de 1-1,5 m, con hojas opuestas de 4 a 8 cm de largo, y 3 a 5 cm

de ancho. Tiene flores hermafroditas de colores púrpura o blancas que al acabar el verano dan lugar a semillas ovaladas de 2 mm de largo y 1,5 mm de ancho, de color negro o blanco grisáceo [3]. En la figura 1 se muestran las partes de la planta, tanto hojas, tallos y flores.

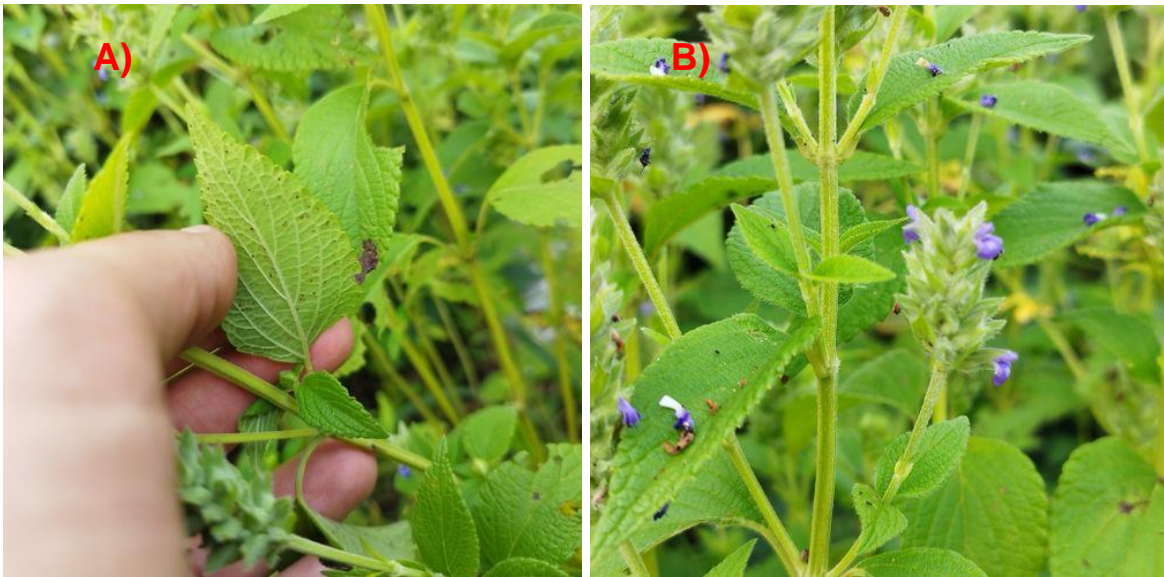


Figura 1. A) Hojas de *Salvia hispanica* L. B) Parte superior de *Salvia hispanica* L. donde salen flores y semillas [4].

Se sabe que esta planta era altamente consumida por las culturas mesoamericanas, principalmente Aztecas y Mayas, que utilizaban las semillas de chía en medicina, producción de alimentos, ritos religiosos y como moneda de intercambio entre los distintos pueblos ancestrales. Sin embargo, luego de la conquista española quedó en el olvido por su estrecha relación con los cultos religiosos indígenas. Recientemente, resurgió el interés por el cultivo de chía debido a varios estudios que han demostrado el alto valor nutritivo y nutracéutico de la semilla.

Los productos derivados de la semilla de chía como el aceite, la harina, o el mucílago (semillas de chía hidratadas) son altamente atractivos nutricionalmente ya que son ricos en proteínas (15-25% p/p), grasas (30-33% p/p) y tienen alto contenido de fibra dietética (18-30% p/p). También contienen minerales, vitaminas

y una gran cantidad de antioxidantes que incluyen tocoferoles, polifenoles y flavonoides. Otra característica relevante de la semilla de chía es que no contiene gluten [5].

La semilla de chía tiene una baja fracción de carbohidratos, el 90% corresponde a fibra y el resto es almidón. La mayor parte de la fibra es soluble en agua, llamada mucílago y tiene una extraordinaria capacidad de retención de ésta, aumentando su peso casi en 15 veces cuando se pone en medios acuosos [6].

Varios estudios tanto en animales como en humanos han demostrado que el consumo de semilla de chía produce beneficios para la salud, tales como:

- Disminución del colesterol y los triglicéridos en sangre, debido a su alto contenido en ω -3 y ω -6;
- Supresión del apetito, pérdida de peso y el control de la glucosa en sangre, debido a su baja cantidad de carbohidratos, esto debido a que cuando las semillas de chía son ingeridas se mezclan con el ácido del estómago y forman un gel que actúa como una barrera física entre los carbohidratos consumidos y las enzimas digestivas, ralentizando la digestión de los azúcares, lo que conduce a una conversión de glucosa más gradual y sostenida; y
- Regulación intestinal, debido a su alta cantidad de fibra, lo que a su vez reduce el riesgo de desarrollar enfermedades como obesidad, enfermedad coronaria, hipertensión, accidente cerebrovascular y trastornos gastrointestinales [7].

Una de las propiedades más importantes que se han investigado en torno a la semilla de chía es su capacidad antioxidante. El extracto de las semillas de chía exhibe una fuerte actividad antioxidante, debido a su contenido de ácido clorogénico, ácido cafeico y flavonoides como el kaempferol y la quercetina. Además, el aceite de chía contiene una gran cantidad de γ -tocoferol y una pequeña cantidad de δ -tocoferol, así como trazas de α -tocoferol, estos son compuestos que se sabe aportan a la reducción de radicales libres en los seres vivos [8].

1.2 Estudios de las partes aéreas de la *Salvia hispanica* L.

Si bien hay diversos estudios con respecto a las propiedades de la semilla de chía, que hoy en día es ampliamente consumida a nivel mundial. De las partes aéreas (hojas y tallo) no existen muchos estudios, y los conocimientos que se tienen de sus propiedades son más que nada de tipo ancestrales y locales. Uno de los primeros equipos de investigadores en interesarse en este tema fue Amato et. al. [9], quienes dentro de su estudio de viabilidad de cultivo de *Salvia hispanica* L. en el sur de Italia hicieron una caracterización de las hojas de la planta utilizando un método de extracción con solvente (metanol) encontrando algunos polifenoles, como flavonoides y derivados de ácido hidroxicinámico. Además, a nivel nacional Zúñiga et. al. [10] estudiaron la capacidad antioxidante de los extractos de las hojas de *Salvia hispanica* L. para dos fenotipos de semilla distintos (semilla blanca y semilla negra), encontrando que los extractos de hoja de semilla negra extraídos con etanol exhibieron una mayor capacidad antioxidante a través de ORAC-PGR y ORAC-FL, además de realizar la caracterización de los extractos usando UHPLC-HRMS (Q-Orbitrap), encontrando también compuestos de tipo hidrofílicos polifenólicos que explicarían la gran capacidad antioxidante de las hojas.

Por otra parte, en cuanto a los compuestos hidrofóbicos de la planta de *Salvia hispanica* L., Elshafie et. al. [11] realizó una hidrodestilación de las hojas, obteniendo un aceite esencial el cual al caracterizarlo encontraron más de 80 compuestos hidrofóbicos, llamados terpenos, a los cuales se les atribuyen propiedades antimicrobianas.

Los terpenos, también llamados isoprenoides son sustancias químicas naturales formadas por el reordenamiento de la cabeza a la cola de dos o más moléculas de isopreno, y son componentes importantes de los aceites esenciales. Los diferentes terpenos incluyen hemiterpenos (C₅), monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀) sesterterpenos (C₂₅), triterpenos (C₃₀) y politerpenos (>C₃₀). Por lo general, en las plantas se encuentran monoterpenos y sesquiterpenos, sin embargo, también se pueden encontrar terpenos de mayor tamaño, y no solo en

plantas, también existen en hongos, bacterias, algas, organismos marinos y algunos animales. Debido a sus propiedades fisiológicas y aromáticas, se ha establecido un amplio campo de aplicaciones para plantas y productos vegetales que contienen monoterpenos y sesquiterpenos [12].

En particular, en este estudio de Elshafie et. al. se encontró que los principales compuestos eran sesquiterpenos y monoterpenos, siendo los cariofilenos los compuestos mayoritarios, y se demostró que el aceite esencial de la hoja de chía tiene actividad antibacteriana y antifúngica contra 10 tipos de fitopatógenos y bacterias.

1.3 Extracción de metabolitos secundarios de matrices vegetales

Para aprovechar los metabolitos secundarios de las plantas es necesario extraerlos de la matriz vegetal y para ello existen diversas técnicas de extracción sólido-líquido, llamada así por el estado en que se encuentran sus componentes, donde el sólido corresponde a la parte vegetal, y el líquido corresponde al solvente. El tipo de extracción sólido líquido a utilizar dependerán del tipo de compuesto a extraer, el estado de la matriz vegetal, la parte de la planta, e incluso la cantidad de compuesto que se quiera extraer. En general con este tipo de extracción se obtienen bajos rendimientos, pero es uno de los métodos más fáciles de utilizar y optimizar.

Para la extracción sólido-líquido se pueden utilizar distintos tipos de solventes, desde los más polares como el agua o los alcoholes, hasta los solventes más apolares como hexano, benceno o tolueno, entre otros. Además, en este proceso de extracción se pueden modificar ciertos parámetros físicos de la extracción para mejorar la transferencia de masa de la matriz vegetal al solvente, lo que da origen a los distintos tipos de extracción sólido-líquido. Algunos de estos tipos de extracción son: la extracción asistida por microondas, que tal como su nombre lo indica utiliza microondas para irradiar la muestra, para causar la migración de las moléculas y aumentar la temperatura para facilitar la difusión de los compuestos de

la matriz al solvente; la extracción asistida por ultrasonido, la cual cuenta con un ultrasonido para entregar energía al medio, que provoca la generación de burbujas que aumentan la temperatura y presión del medio, dañando a las células vegetales en la pared celular, lo que facilita el traspaso de masa al solvente; la extracción por fluido supercrítico, que aprovecha las condiciones supercríticas del solvente para trabajar, es decir, opera a alta temperatura y presión; y la extracción con solvente acelerado, que trabaja en el punto de ebullición del solvente para aumentar su fluidez y mejorar la solubilidad de los compuestos, de esta forma acelerando la velocidad de transferencia de masa, provocando que la extracción se realice en tiempos más cortos, pero sin llegar al punto crítico del solvente [13]. Todas estas técnicas son buenas, pero para ser utilizadas se requiere conocer los compuestos a extraer para saber elegir el solvente a utilizar para optimizar las condiciones de la extracción.

Sin embargo, si la matriz es desconocida se puede hacer un tipo de extracción que se llama extracción secuencial o extracción seriada. La extracción secuencial consiste en dejar macerando el material vegetal con un solvente apolar hasta agotar la matriz, Para asegurarse que dicha matriz ha sido agotada se hacen placas cromatográficas, corroborando que ya no salen compuestos. Luego se recoge el sobrenadante, se rotavapora para eliminar el solvente y finalmente se obtiene la parte sólida que corresponde a los compuestos extraído con el solvente [10].

A esta misma matriz vegetal utilizada con el primer solvente, se hace el mismo procedimiento, pero con un solvente de polaridad más intermedia. Se hace el mismo proceso con distintos solventes aumenta la polaridad de cada uno de ellos, y de esta forma se obtienen distintas fracciones de extracto, cada una con compuestos distintos, los cuales se disolverán en el solvente según la afinidad de los compuestos con la polaridad del solvente, dicha afinidad depende en gran medida del coeficiente de distribución de cada compuesto. De esta forma se procura extraer la mayor cantidad de analitos de la matriz vegetal.

A los extractos obtenidos de la extracción secuencial se les pueden identificar y cuantificar sus analitos utilizando técnicas cromatográficas, y una vez

caracterizados los extractos se pueden analizar en ensayos biológicos para conocer su potencial como medicamento, como se hizo con el aceite esencial de *Salvia hispanica* L. obtenido por Elshafie et. al. [11], al cual se analizó su posible potencial como antibacteriano y antifúngico, obteniendo resultados muy prometedores.

1.4 Propiedades biológicas de los terpenos

Se ha encontrado que los terpenos como diterpenos, triterpenos, sesquiterpenos y monoterpenos tienen propiedades antifúngicas, antibacterianas, antiparasitarias, anticancerígenas, antiproliferativa, antivirales, entre otras. En cuanto a la actividad antimicrobiana se ha encontrado que terpenos de bajo volumen estructural (monoterpenos y sesquiterpenos) tiene actividad antibacteriana contra 25 cepas de bacterias siendo el terpeno de mayor rango de acción el timol, seguido de carvacrol, α -terpineol, terpinen-4-ol, eugenol, linalool, (-)-tujona, δ -3-careno, acetato de geranilo, cis y trans-citral, nerol, geraniol, mentona, β -pineno, (-)-limoneno, α -pineno, α -terpineno, borneol, (+)-sabineno, γ -terpineno, citronelal, terpinoleno, 1,8-cineol, acetato de bornilo, éter metílico de carvacrol, mirceno, β -cariofileno, α -bisabolol, α -felandreno, α -humuleno, β -ocimeno, aromadendreno y p -cymene, compuestos que fueron encontrados en aceites esenciales de distintas plantas [14]. También se ha encontrado que aceites esenciales con altos niveles de sesquiterpenos como cadineno, Z- β -farneseno, γ -muurolene, spathulenol y α -selinene tienen actividad antifúngica y antibacteriana, y que específicamente linalool, acetato de linalilo, citral y citronelal son capaces de inhibir el crecimiento de hongos como *Candida albicans* en fase G1 y Fase S del ciclo celular de los hongos [15, 16].

Esta actividad antimicrobiana no es solo de los terpenos más pequeños, sino que también de diterpenos y triterpenos. En algunos triterpenos, como el ácido asiático, se ha encontrado que tiene capacidad antibacteriana en *Escherichia coli*,

Salmonella Typhimurium, *Pseudomonas aeruginosa*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Bacillus cereus* [17].

En la última década se ha investigado el uso de terpenos como diterpenos, triterpenos, sesquiterpenos y monoterpenos como agentes anticancerígenos o antiproliferativos, a raíz de la amplia variedad de efectos adversos que tienen los actuales tratamientos contra el cáncer. El Taxol, medicamento ya mencionado anteriormente, tiene como principio activo un diterpeno, el paclitaxel, el cual fue descubierto como resultado de un programa público de Estados Unidos para descubrir nuevos agentes antitumorales a fines de la década de los 60 y principio de los 70 [2]. También se ha investigado el efecto anticancerígeno de compuestos triterpénicos, dentro de los cuales se sabe que el ácido asiático tiene efecto anticancerígeno en varios tipos de cánceres como el cáncer de mama, produciendo la muerte celular de las células cancerígenas produciendo especies reactivas de oxígeno (EROs) o disminuyendo la producción de ATP, e incluso mejorando la sensibilidad de las células resistentes a fármacos anticancerígenos [18]. Por otra parte, también se ha investigado el ácido betulínico y algunos de sus derivados, y se ha encontrado que inhiben el crecimiento de líneas celulares de cáncer humano y que aumentan la sensibilidad de los fármacos anticancerígenos como doxorubicina, cisplatino, Taxol o actinomicina D para inducir la apoptosis de las células tumorales [17, 18, 19].

1.5 Actividad Antiparasitaria de terpenos.

Otro tema importante a nivel mundial es encontrar fármacos o compuestos que sean efectivos contra ciertos parásitos que atacan tanto a humanos como a animales y para los que aún no se tiene un medicamento específico para su tratamiento. Bajo este contexto Kamaraj et. al. [22] hicieron un estudio farmacológico donde se encontró que el β -cariofileno, un sesquiterpeno, aislado de las hojas de *M. koenigii* exhibió una actividad antipalúdica prometedora contra una cepa sensible a

la cloroquina (fármaco antipalúdico) de *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium berghei*. Además, en otra investigación sintetizaron nanopartículas (NP) de plata (Ag) usando β -cariofileno como agente reductor y estabilizador, para tratamiento antipalúdico y anticancerígeno, logrando ser efectivas contra el parásito *Plasmodium falciparum* (parásito que provoca malaria), y estas NP de Ag también tienen actividad citotóxica significativa en las células de cáncer de pulmón [23].

En cuanto a terpenos de menor tamaño se ha encontrado que dos monoterpenos glucosidados de limoneno, aislados por primera vez de *Dracocephalum kotschyi*, tienen actividad antiparasitaria contra epimastigotes del parásito *Tripanosoma cruzi* a una concentración letal mínima de 3,1 μ M. Además, otros 8 terpenos ya conocidos también exhiben actividad tripanocida, siendo estos el geranial (3,1 μ M), neral (3,1 μ M), ácido oleanólico (6,2 μ M), ácido ursólico (6,2 μ M) y ácido colosólico (6,2 μ M) [24]. Los tres últimos compuestos son triterpenos.

Los triterpenos son terpenos de 30 carbonos de los que hasta la fecha se han encontrado más de 100 esqueletos carbónicos, que incluyen escualeno, lupano, ursano, oleano, etc. de los cuales se desglosan una serie de derivados triterpénicos como los ácidos madecásico, asiático, betulínico, oleanólico y ursólico [25], a los que se han investigado ampliamente sus propiedades antiparasitarias.

Por otra parte, *Tripanosoma cruzi* corresponde al parásito responsable de la enfermedad de Chagas, la cual es una enfermedad endémica de 21 países de Latinoamérica. Se estima que actualmente entre 90 y 100 millones de personas corren el riesgo de contraer la enfermedad y alrededor de 8 millones de personas ya están infectados por el parásito. Anualmente se contabilizan 56.000 casos nuevos y 12.000 muertes [26]. Se sabe que el parásito puede existir en 3 formas celulares: epimastigotes, amastigotes y tripomastigotes, de los cuales solo el último representa una forma infectiva del parásito. En la figura 2 se muestran tanto al insecto que transmite la enfermedad de chagas, así como a la forma física del parásito observado en microscopio.

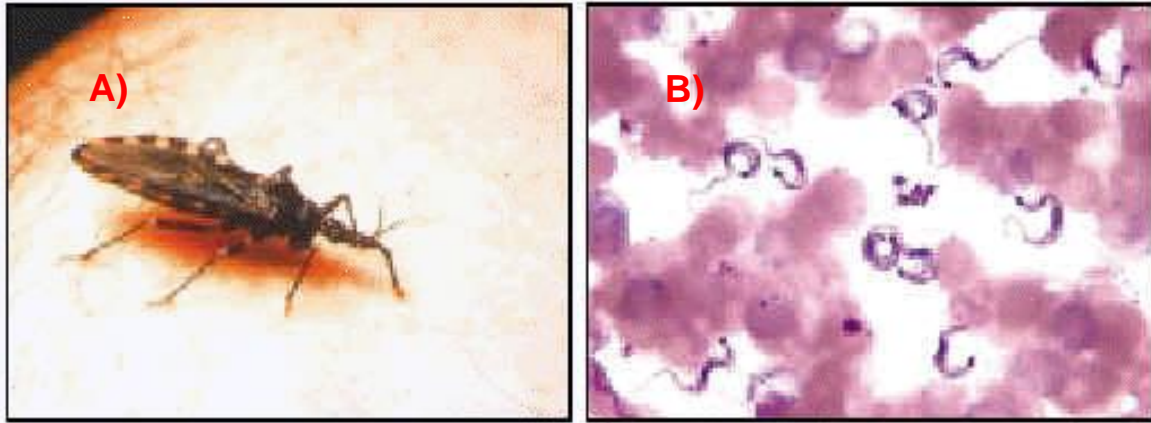


Figura 2. A) Insecto portador y transmisor del parásito *Trypanosoma cruzi*. B) Imagen al microscopio del parásito *Trypanosoma cruzi* encontrado en sangre [27].

A pesar de existir medicamentos como nifurtimox y benznidazol para el tratamiento de esta enfermedad hay casos en los que estos tratamientos fallan, por lo que es necesario encontrar nuevos compuestos que sean capaces de matar al parásito. Bajo este contexto se han hecho estudios anti-*Tripanosomas* en varios triterpenos y extractos de plantas con alta concentración de terpenos.

En el estudio de da Silva Ferreira et. al. [28] se ha demostrado que en ensayos tanto *in vitro* e *in vivo*, que tanto ácido ursólico como ácido oleanólico son compuestos antiparasitarios a *Trypanosoma cruzi*, sin embargo, ácido ursólico demostró ser más activo *in vitro* con un IC_{50} de 25,5 μM , y matando un 77% de tripomastigotes a una concentración de 128 μM . Además, se ha encontrado que ácido ursólico es más tripanocida que ácido oleanólico y que ácido betulínico, este último se ha visto que es casi inactivo frente a los parásitos en distintos extractos de plantas [29, 30].

1.6 Métodos de identificación y cuantificación de triterpenos

Existen diversas técnicas para identificar y cuantificar la presencia de triterpenos en extractos de diferentes productos vegetales, uno de ellos es la cromatografía de fase gaseosa (GC), que a grandes rasgos consiste en volatilizar la muestra y usar como fase móvil un gas inerte para llevar los analitos a través de una columna cromatográfica, la cual está acoplada a detectores tales como MS o FID para identificar cualitativa y cuantitativamente, por ejemplo, triterpenos encontrados en *Ononis spinosa* L. [31]. Otro método que es ampliamente utilizado hoy en día para la medición de triterpenos es la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) con detector acoplado, este método consiste en inyectar la muestra y que esta fluya junto con una fase móvil hasta una columna que alberga una fase estacionaria, cada compuesto es retenido en la fase estacionaria de acuerdo principalmente a su polaridad, por lo que cada compuesto presentará un tiempo de retención característico, por lo que utilizando un estándar se puede visualizar si éste se encuentra en la muestra y a la vez se puede cuantificar al realizar una curva de calibración con el estándar. Se ha realizado la identificación de triterpenos con HPLC utilizando detectores, como MS [32] y fluorescencia [33].

1.7 Métodos de medición de capacidad antiparasitaria

En literatura se puede encontrar que existen métodos muy parecidos para medir la capacidad antiparasitaria de compuestos y extractos en *Trypanosoma cruzi*. Por ejemplo, en el trabajo de Pertino et. al. [26] primero se inyectan y cultivan los parásitos en una de sus formas epimastigotes en células de hígado, luego se dejan crecer y multiplicar las células infectadas en el medio. Posteriormente se agregaron a la mezcla los derivados de triazol que sintetizaron en su estudio y se incubaron para luego agregar una solución de CPGR (rojo de clorofenol- β -D-galactopiranosido) y los resultados se leyeron a 595 nm, para finalmente calcular los valores de IC₅₀. Se utilizó benznidazol como compuesto de referencia.

En otro trabajo, en el método de Leite et. al. [34] se utilizó sangre de ratones albinos suizos, los cuales se infectaron con el parásito *T. cruzi*. Los compuestos aislados de la planta *Arrabidaea triplinervia* y sus derivados los disolvieron en DMSO, y luego los añadieron en la sangre infectada, donde se dejaron incubar y luego las examinaron al microscopio para ver la eliminación de los parásitos.

Sin embargo, el procedimiento más común para medir la capacidad antiparasitaria es el ensayo MTT (bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio), el cual se basa en la reducción de la sal de tetrazolio por acción de las deshidrogenasas mitocondriales formando un compuesto insoluble de color azul purpura, y midiendo espectrofotométricamente a 570 nm. En el trabajo de Pozo et. al. [35] se utiliza el ensayo MTT para medir la actividad tripanocida en una serie de compuestos 3-aril cumarinas por sí solos o en complejos de inclusión con β -ciclodextrinas, y en combinación con el fármaco benznidazol.

2 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como no existe una bibliografía extensa en cuanto a la caracterización, propiedades y efectos biológicos de las partes aéreas de la *Salvia hispanica* L. en esta investigación se determinará la presencia de triterpenos a través de HPLC-UV-VISIDAD en los extractos de hoja de dos fenotipos de semilla de *Salvia hispanica* L., para posteriormente realizar un ensayo biológico antiparasitario y antiproliferativo *in vitro*, para determinar si estos compuestos también presentan positivas propiedades biológicas a la salud, tal como lo hacen los monoterpenos y sesquiterpenos de acuerdo a trabajos científicos presentados.

3 HIPÓTESIS

En base a la información recopilada en literatura y a la experiencia del grupo de investigación es posible la determinación de triterpenos: ácido madecásico, ácido asiático, ácido betulínico, ácido oleanólico y ácido ursólico en los extractos de hoja de *Salvia hispánica* L., y luego estos extractos, así como los compuestos puros podrían presentar un efecto positivo en estudios antiparasitarios y antiproliferativos *in vitro*.

4 OBJETIVOS

4.1 General:

- Analizar los metabolitos secundarios de los extractos de *Salvia hispanica* L. y sus posibles efectos biológicos.

4.2 Específicos:

- Identificar y cuantificar la presencia de triterpenos en extractos de hoja de *Salvia hispanica* L., tanto para fenotipo de semilla negra como para fenotipo de semilla blanca.
- Analizar la actividad antiparasitaria de los extractos de hoja de *Salvia hispanica* L.
- Analizar la actividad antiproliferativa de los extractos de hoja de *Salvia hispanica* L.

5 METODOLOGÍA

5.1 Muestra

5.1.1 Cultivo, muestreo y secado de las hojas de las plantas de chía

Las hojas de las plantas utilizadas en este estudio fueron cultivadas por el equipo de investigación en el campo experimental INIA Intihuasi, perteneciente a la Universidad de Chile, cerca de la ciudad de La Serena (Chile). El cultivo se realizó por triplicado para dos fenotipos: semilla blanca y semilla negra. Las muestras fueron trasladadas al laboratorio y las hojas se separaron, rotularon y secaron a 35 °C en estufa hasta peso constante. Después del proceso de secado, las hojas se trituraron con un mortero y se almacenaron a temperatura ambiente en la oscuridad.

5.2 Reactivos

Reactivos sólidos: Sal de tetrazolio (MTT; 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro; Sigma aldrich), dodecilsulfato de sodio (SDS; Merck S.A), Benznidazol, Formazan (Sigma aldrich).

Triterpenos: Ácido madecásico (Sigma aldrich), Ácido asiático (Sigma aldrich), Ácido betulínico (Sigma aldrich), Ácido oleanólico (Sigma aldrich) y Ácido Ursólico (Sigma aldrich).

Reactivos líquidos: Metanol grado HPLC (Merck S.A), Agua grado HPLC (Merck S.A), Acetonitrilo grado HPLC (Merck S.A) Ácido acético (Merck S.A), Hexano (Merck S.A), Diclorometano (Merck S.A), Acetato de etilo (Merck S.A), Etanol (Merck S.A), dimetilsulfóxido (Merck S.A), Ácido clorhídrico (Merck S.A).

Reactivos biológicos: Cultivo celular RAW 264,7 (ATCC® CCL-81TM), Células Vero (ATCC® CCL-81TM), medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI; Gibco) 1640, suero fetal bovino (SFBi), penicilinaestreptomicina (Gibco).

5.3 Métodos

5.3.1 Método de extracción Secuencial

Se obtuvieron extractos de la muestra luego de sucesivas extracciones con diferentes disolventes orgánicos: hexano (HEX), diclorometano (DCM), acetato de etilo (AE) y etanol (EtOH), para los dos fenotipos de hojas de semilla Negra (N) y Blanca (B). Se obtuvieron ocho extractos de muestra diferentes; HEX-N, DCM-N, AE-N y EtOH-N para hojas de chía de fenotipo de semilla negra, y HEX-B, DCM-B, AE-B y EtOH-B para hojas de chía de fenotipo de semilla blanca.

Cada extracción con un solvente se llevó a cabo hasta agotar la matriz por completo, aproximadamente 7 días de extracción por cada solvente, tal como se resume en la figura 3. Luego de obtener todos los sobrenadantes de cada solvente, se secó a temperatura ambiente. Los extractos secuenciales se concentraron en un rotavapor a presión reducida, hasta obtener un extracto seco [10].

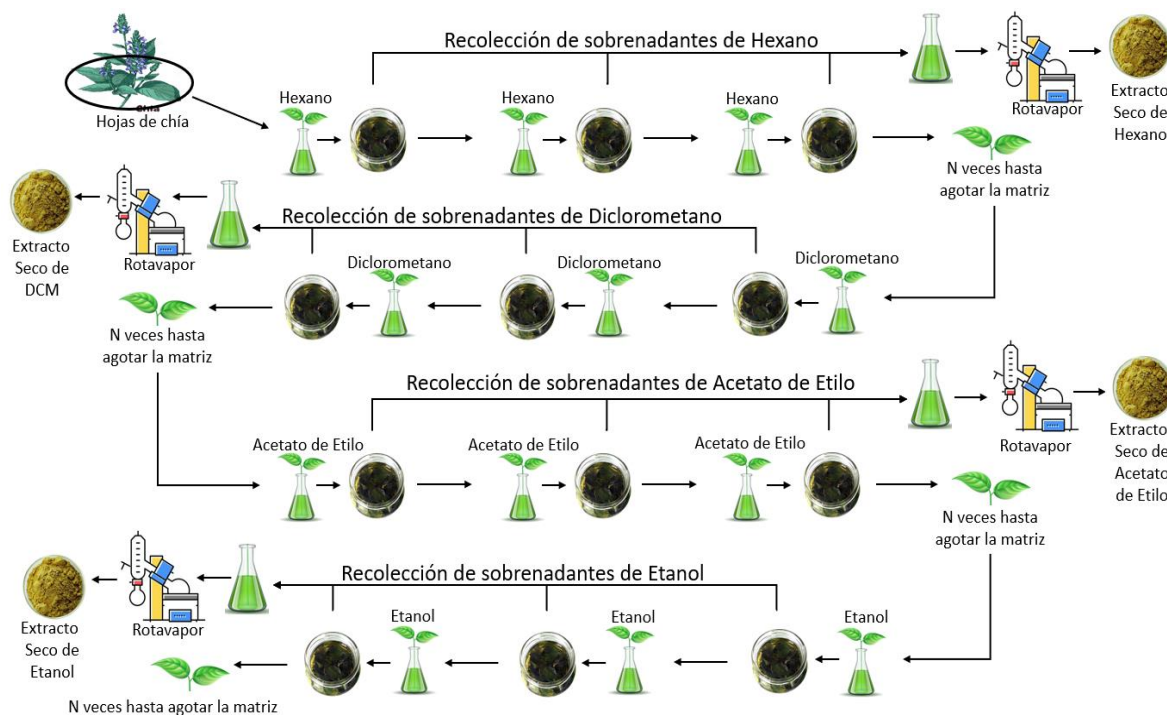


Figura 3. Esquema de extracción secuencial con los cuatro solventes: hexano, diclorometano, acetato de etilo y etanol, para obtener los extractos de *Salvia hispanica* L.

Nota importante: Los extractos de hojas de los dos fenotipos de semilla de *Salvia hispanica* L. se encuentran hechos, los cuales fueron utilizados para estudios previos, que ya están publicados. Sin embargo, en caso de faltar extracto para los ensayos biológicos, se prepararán con este mismo protocolo.

5.3.2 Identificación de triterpenos por cromatografía líquida de alta eficiencia con detector espectrofotométrico con arreglo de diodos (HPLC-UV-VIS-DAD)

5.3.2.1 Método de curva de calibración externa

El equipo utilizado para este estudio fue un HPLC Agilent Technologies 1200 acoplado a un detector espectrofotométrico con arreglo de diodos, que consta de una columna Hibar Purospher Star RP-18 (250 mm x 4,6 mm; tamaño de partícula 5 μ m). Como fase móvil se utilizó acetonitrilo/ácido acético 0,1%, con gradiente de fase móvil. Se inyectaron 20 μ L de muestra y estándares, con un flujo de 0,8 mL/min, los cromatogramas fueron registrados a 201 nm.

Se disponía de cinco estándares de triterpenos (ácido madecásico, ácido asiático, ácido betulínico, ácido oleanólico y ursólico) con los cuales se prepararon soluciones madres a 1.000 mg/L en metanol, cuyas soluciones se prepararon tal como se muestra en la tabla 1. Las soluciones madres se guardaron en eppendorf de color ámbar, y se congelaron hasta su análisis.

Tabla 1. Soluciones madres de estándares de los triterpenos, llevados a su respectivo volumen final de metanol.

Estándar	Masa de estándar (mg)	Volumen de metanol (μ L)	Concentración (mg/L)
Ác. Madecásico	1,54	1.540	1.000
Ác. Asiático	1,55	1.550	1.000

Ác. Betulínico	1,27	1.270	1.000
Ác. Oleanólico	1,21	1.210	1.000
Ác. Ursólico	1,53	1.530	1.000

Luego de haber realizado las curvas de calibración se inyectó cada uno de los extractos en las mismas condiciones que los estándares. Para ello se hicieron soluciones madres de los 8 extractos secos a 20.000 mg de extracto/L de metanol para DCM-N, DCM-B, AE-N, AE-B, EtOH-N y EtOH-B, y a 10.000 mg de extracto/L de metanol para los extractos HEX-N y HEX-B, como se muestra en la tabla 2. Las soluciones madres de los extractos fueron agitadas, ultrasonificadas y filtradas, y posteriormente almacenadas en frascos ámbar a -4 °C hasta su análisis.

Tabla 2. Preparación de las soluciones madres de los extractos de hoja de *Salvia hispanica* L.

Extracto	Masa total (mg)	Volumen total (µL)	Concentración (mg/L)
EtOH-B	113,70	5.685	20.000
EtOH-N	100,15	5.007,5	20.000
AE-B	102,50	5.125	20.000
AE-N	100,88	5.044	20.000
DCM-B	100,52	5.026	20.000
DCM-N	100,12	5.006	20.000
HEX-B	50,60	5.060	10.000
HEX-N	52,10	5.210	10.000

De acuerdo con los primeros cromatogramas registrados, estas soluciones luego fueron diluidas a 10.000 mg/L para los extractos DCM-N, DCM-B, AE-N, AE-B, EtOH-N y EtOH-B, y 6.000 mg/L para los extractos HEX-N y HEX-B. Adicionalmente se realizaron soluciones a 5.000 mg/L de DCM-N y DCM-B para medir ácido

madecásico, y soluciones de 3.000 mg/L de HEX-N y HEX-B para medir ácido ursólico.

Cada extracto fue preparado y medido en triplicado en el equipo HPLC bajo las condiciones descritas en el inicio de esta sección.

La cuantificación de los cinco analitos se realizó por medio de curvas de calibración con concentraciones entre 0,5 – 80 mg/L para cada estándar. Luego las áreas de las muestras fueron interpoladas en cada ecuación de la recta.

5.3.2.2 Parámetros Analíticos

La determinación del límite de detección y de cuantificación se realizó a través de la ecuación 1 y 2, respectivamente. Además, se midió de manera experimental el rango lineal de las curvas de calibración.

$$LD = \frac{3 * DST}{P} \quad (\text{Ecuación 1})$$

LD = Límite de detección

DST = Desviación estándar

P = Pendiente

$$LC = \frac{10 * DST}{P} \quad (\text{Ecuación 2})$$

LC = Límite de cuantificación

DST = Desviación estándar

P = Pendiente

5.3.2.3 Método de adición de estándar

Para los extractos HEX-N, HEX-B, DCM-N, DCM-B, EtOH-N y EtOH-B se realizó el método de adición estándar, bajo las mismas condiciones cromatográficas descritas en el ítem anterior (Sección 5. 3. 2. 1).

Para realizar el método de la adición, a los extractos de DCM-N, DCM-B, EtOH-N y EtOH-B de 10.000 mg/L de concentración se les adicionaron concentraciones de 20, 40, 60 y 80 mg/L de ácido madecásico y ácido asiático, en cambio para los extractos HEX-B y HEX-N se tomó una solución de 6.000 mg/L, adicionando 20, 40, 60 y 80 mg/L de los triterpenos.

De modo particular se adicionaron los cinco triterpenos a los extractos HEX-N, esto último fue para comprobar el efecto matriz de los cinco compuestos.

En la tabla 3 se muestran los volúmenes de solución de extracto, triterpenos y metanol agregado a los viales para preparar las soluciones necesarias para hacer la adición estándar de cada extracto. Los extractos EtOH-B, EtOH-N, DCM-B y DCM-N se realizan del mismo modo, con los mismos volúmenes de soluciones, con la única diferencia de que cambia la solución madre del extracto.

Tabla 3. Adición estándar a los 6 extractos de *Salvia hispanica* L.

Extracto	Concentración final de extracto (mg/L)	Concentración de triterpeno a agregar (mg/L)	Volumen total de triterpeno agregado (µL)	Volumen de metanol agregado (µL)
EtOH-B	10.000 (500 µL)	20	40	460
		40	80	420
		60	120	380
		80	160	340
HEX-B	6.000 (600 µL)	20	40	360
		40	80	320

		60	120	280
		80	160	240
HEX-N (*)	6.000 (600 µL)	20	100	300
		40	200	200
		60	300	100
		80	400	0

(*) Caso particular en el que se agregan los cinco triterpenos.

Luego los resultados fueron graficados y extrapolados para calcular la concentración de los triterpenos.

5.3.3 Evaluación de citotoxicidad (antiproliferativo)

Para los ensayos biológicos se prepararon soluciones madres de los extractos de hoja de *Salvia hispanica* L. de 30.000 mg/L en DMSO, debido a que este solvente no es tóxico para los parásitos, como se muestra en la tabla 4. Dichos extractos se guardaron en eppendorf a -4 °C. Estas soluciones fueron utilizadas tanto para la evaluación citotóxica como para la evaluación de la capacidad antiparasitaria.

Tabla 4. Soluciones madres de los extractos de hoja de *Salvia hispanica* L. en DMSO.

Extracto	Masa total (mg)	Volumen total DMSO (µL)	Concentración (mg/L)
EtOH-B	22,17	739	30.000
EtOH-N	27,41	913,7	30.000
AE-B	22,35	745	30.000
AE-N	23,76	792	30.000
DCM-B	23,73	791	30.000
DCM-N	23,45	781,7	30.000
HEX-B	23,75	791,7	30.000

HEX-N	25,21	840,3	30.000
-------	-------	-------	--------

Para evaluar la citotoxicidad en células RAW 264,7 se realizó un ensayo de la reducción de las sales de tetrazolio (MTT; 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro). Para este ensayo, se agregaron 10 µL de MTT (5 mg/mL), a cada pocillo que contenía el cultivo celular de RAW 264,7 en 100 µL de medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 suplementado al 5% de suero fetal bovino (SFBi) sin rojo fenol. Luego se agregaron las soluciones de los extractos preparadas en la tabla 4, estos se agregaron al medio de cultivo en un rango de concentración de 10-200 µM, ya que la concentración final de DMSO debe ser inferior al 0,25% v/v. Después de incubar durante 4 hrs a 37 °C, el colorante formazan insoluble en agua se disuelve mediante la adición de 100 µL de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 10% p/v en ácido clorhídrico (HCl) 0,01 M. Las placas se incubaron adicionalmente durante 12 h a 37 °C y se determinó la densidad óptica de los pocillos usando un lector de microplacas a 570 nm. En estas condiciones, la densidad óptica es directamente proporcional al número de células viables en cada pocillo, por lo que a la longitud de onda obtenida para cada solución de los pocillos se le resta la longitud de onda emitida por el blanco, que corresponde a los pocillos vacíos, y el resultado corresponde a la longitud de onda real de las soluciones. Se midieron las muestras en triplicado, pero algunos casos se hicieron los cálculos con duplicados, ya que algunos resultados diferían mucho unos de otros.

Los datos son presentados en función del % de células vivas luego del ensayo MTT, para esto la longitud de onda de la solución se divide por la longitud de onda promedio del control negativo (solo células, sin compuestos u extractos), tal como se muestra en la ecuación 3.

$$\% \text{ efecto tripanocida} = \frac{\lambda_{\text{EXT o STD}}}{\lambda_{\text{CN}}} * 100 \quad (\text{Ecuación 3})$$

$\lambda_{\text{ETX o STD}}$ = Longitud de onda de la solución con los extractos o estándares.

λ_{CN} = Longitud de onda del control negativo.

5.3.4 Evaluación de actividad tripanocida en tripomastigotes (ensayo antiparasitario)

Para el ensayo antiparasitario además de las soluciones madres de los extractos se hicieron soluciones madres de los estándares para poder observar si los compuestos puros tenían actividad tripanocida. Para ello se hicieron soluciones madres de los estándares a 30.000 mg/L en DMSO, tal como se muestra en la tabla 5, de las cuales se realizaron diluciones para medir la capacidad antiparasitaria a dos concentraciones: 20 y 200 mg/L.

Tabla 5. Soluciones madres de estándares de los triterpenos, llevados a su respectivo volumen final de DMSO.

Estándar	Masa de estándar (mg)	Volumen de DMSO (μL)	Concentración (mg/L)
Ác. Madecásico	3,97	132,3	30.000
Ác. Asiático	3,99	133	30.000
Ác. Betulínico	4,30	143,3	30.000
Ác. Oleanólico	4,01	133,7	30.000
Ác. Ursólico	4,24	141,3	30.000

Luego, para el ensayo antiparasitario se utilizaron cultivos primarios de macrófagos peritoneales de ratones chagásicos como fuente de tripomastigotes de *T. cruzi*. Las células Vero se cultivaron en medio RPMI 1640 complementado con (SFB) al 10% en aire humidificado con CO_2 al 5% a 37 °C. Luego, las células se infectaron con tripomastigotes a una multiplicidad de infección (MOI) de 3. Después de la

incubación a 37°C en aire humidificado y 5% de CO₂ durante 5-7 días el medio de cultivo se centrifuga a 2000 rpm por 5 minutos. El sedimento que contiene tripomastigote se resuspende en RPMI 1640 suplementado al 10% con SFB y penicilinaestreptomicina a una densidad final de 1x10⁷ parásitos/mL, para determinar la densidad final de parásitos se hizo un conteo de estos en cámaras de Neubauer, para saber la cantidad de RPMI a agregar. La viabilidad del tripomastigote se determinó mediante el ensayo MTT descrito anteriormente, incubando los 1x10⁷ parásitos/mL, en medio de cultivo RPMI 1640 a 37 °C durante 24 hrs con y sin los compuestos o extractos estudiados. Se utilizaron las soluciones madres que se prepararon en la tabla 4 para la primera evaluación antiparasitaria, estas soluciones fueron inyectadas con los parásitos; y se utilizaron parásitos no tratados como controles (100% de viabilidad), y benznidazol como control positivo. Luego se hizo el mismo procedimiento, pero para los estándares, cada uno a dos concentraciones tal como se indica más arriba. Al igual que el caso anterior (Sección 5.3.3) se trabajó con triplicados, pero resultados muy desiguales al resto fueron desechados.

El cálculo de los resultados se hace igual que en el ensayo citotóxico, con la diferencia de que en este caso en vez de células viables se cuenta con parásitos, por lo que los resultados quedan en función del % de efecto tripanocida, pero la ecuación para trabajar los datos es igual a la ecuación 3, solo cambia el control negativo, que en este caso corresponde a la solución de parásitos.

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Ensayos Preliminares

Se procedió a determinar las condiciones cromatográficas por HPLC-UV-VIS-DAD para separar cromatográficamente los analitos de interés: ácido madecásico, ácido asiático, ácido betulínico, ácido oleanólico y ácido ursólico, las estructuras de los cinco compuestos se muestran en la figura 4.

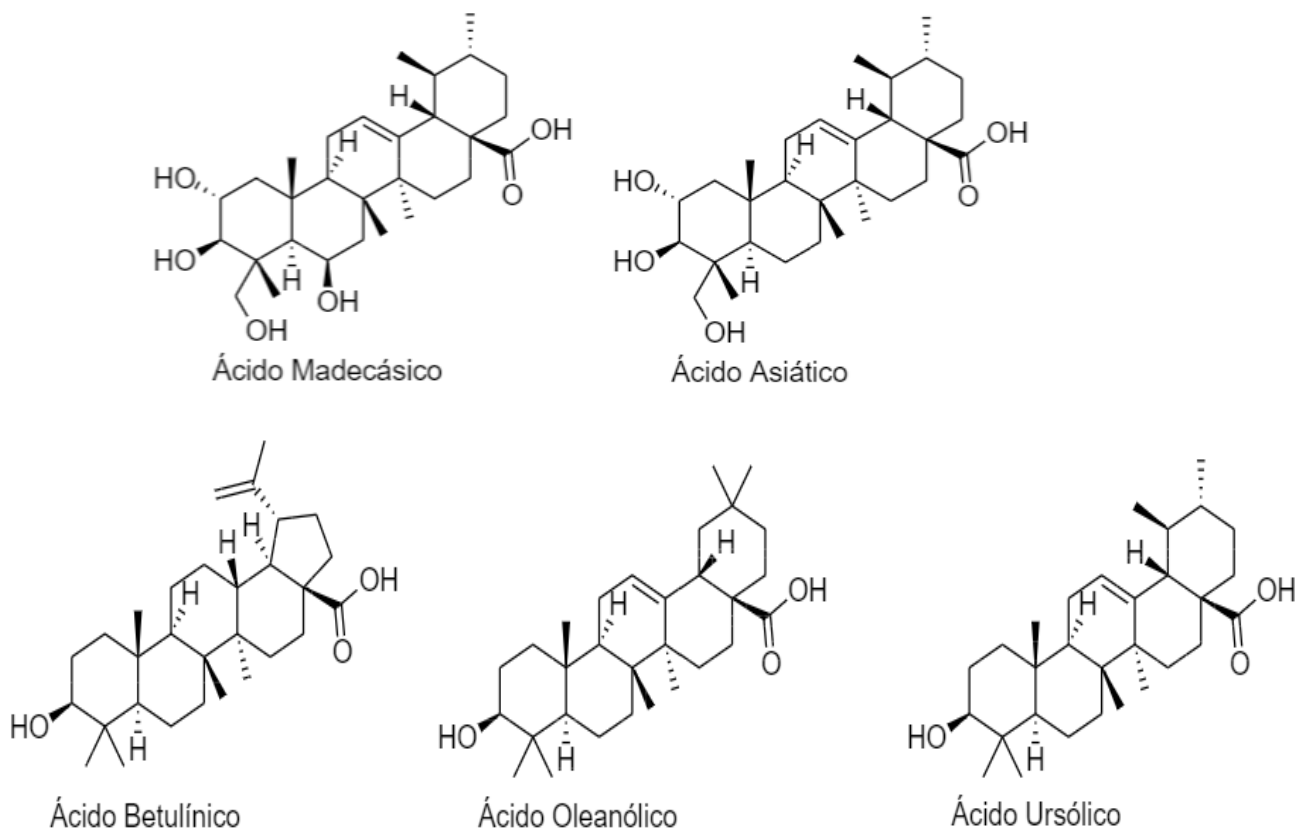


Figura 4. Estructura de ácido madecásico, ácido asiático, ácido betulínico, ácido oleanólico y ácido ursólico.

Considerando la estructura de los triterpenos como se puede observar en la Figura 4, los cinco triterpenos tienen diferencias estructurales mínimas, en especial en el caso del ácido oleanólico y el ácido ursólico, los cuales son isómeros entre sí, por lo que al seleccionar las condiciones cromatográficas se tomó como referencia la metodología utilizada por Arancibia et. al. [36], en este estudio se determinaron una serie de triterpenos, entre los que se encuentran el ácido madecásico, ácido asiático, ácido oleanólico y ácido ursólico, pero cabe destacar que para realizar la cuantificación ellos utilizaron dos tipos de fase móvil: para la determinación del ácido madecásico y el ácido asiático la fase móvil tuvo una proporción de 60:40 de acetonitrilo/ácido acético 0,1%, respectivamente, y para la determinación del ácido oleanólico y el ácido ursólico la corrida cromatográfica isocrática fue con acetonitrilo/ácido acético 0,1% en proporción de 75:25, respectivamente. Esta metodología fue utilizada como base para la identificación de los compuestos en los resultados preliminares presentados en el anteproyecto de este trabajo.

Basándonos en lo descrito anteriormente, se realizaron varias pruebas con distintas proporciones de fase móvil, donde los resultados cromatográficos que obtuvieron una mejor resolución fueron: como fase móvil una mezcla de acetonitrilo/ácido acético 0,1% a un flujo de 0,8 ml/min. Fue seleccionado este flujo, debido a que al hacer distintas pruebas se obtuvieron los mejores resultados, ya que al aumentar el flujo a 1 ml/min si bien disminuían los tiempos de retención en el cromatograma, también provocaba el solapamiento de las señales de ácido oleanólico y ácido ursólico, provocando una disminución en la resolución cromatográfica para este par de compuestos, pero a su vez al utilizar un flujo menor de 0,6 ml/min aumentaban los tiempos de la corrida cromatográfica, sin mejorar mayormente la resolución. Lo mismo ocurrió al aumentar la acidez de la fase móvil (ácido acético al 2%), se produjo el solapamiento de las señales y el aumento de los tiempos de retención de los compuestos. Los cromatogramas fueron registrados a 201 nm, tal como en el trabajo de Arancibia et. al. [36], ya que es a esta longitud de onda todos los compuestos presentan el máximo de absorbancia.

Para lograr medir los cinco triterpenos simultáneamente en una sola corrida cromatográfica, se desarrolló un gradiente de fase móvil comenzando con acetonitrilo/ácido acético 0,1% en proporción 60:40 de 0-10 min, luego la proporción de acetonitrilo/ácido acético 0,1% cambia a 70:30 de 11-14 min y finalmente cambia a 75:25 de acetonitrilo/ácido acético 0,1% de 15-60 min. Luego entre una corrida cromatográfica y otra se da un tiempo de 5 minutos para que la fase móvil vuelva a sus condiciones iniciales.

6.2 Construcción de Curva de Calibración

Luego de determinar las condiciones cromatográficas a utilizar y corroborar que los triterpenos tuvieran la mejor resolución, se procedió a realizar las curvas de calibración de los cinco estándares: ácido madecásico, ácido asiático, ácido betulínico, ácido oleanólico y ácido ursólico.

Tal como se describió en la metodología (Sección 5. 3. 2. 1), desde las soluciones madres se tomaron las alícuotas para la construcción de la curva de calibración. En primer lugar, se midieron los estándares a 10 mg/L, para corroborar su nuevo tiempo de retención y su espectro. En la figura 5 se muestra un cromatograma típico de los cinco estándares inyectados en multi-estándar, en el cual se puede apreciar que el ácido oleanólico y el ácido ursólico tiene una buena resolución, lo que indica que las condiciones cromatográficas elegidas fueron las apropiadas, obteniendo los siguientes tiempos de retención; ácido madecásico: 4,785 min; ácido asiático: 6,237 min; ácido betulínico: 26,380 min; ácido oleanólico: 29,103 min y ácido ursólico 29,755 min.

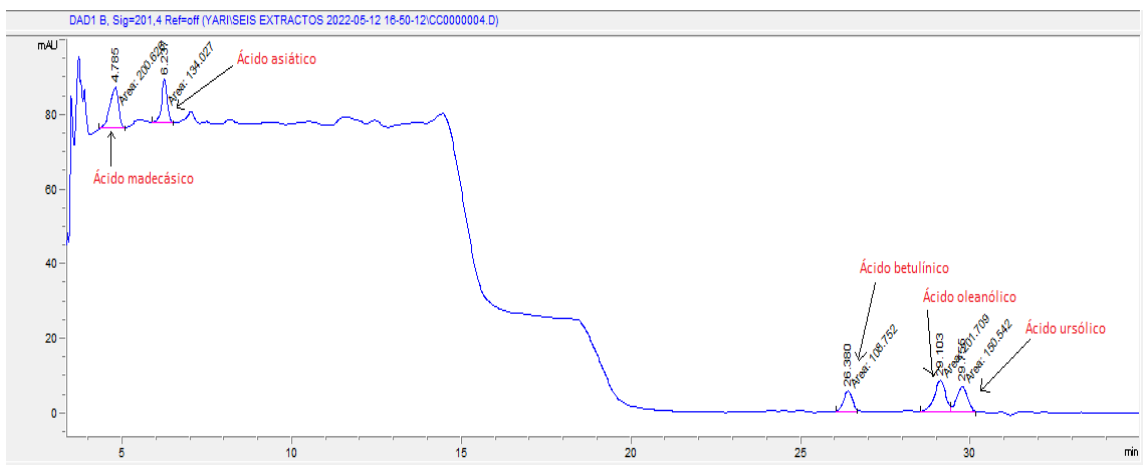


Figura 5. Cromatograma de multi-estándares a 10 mg/L, medidos por HPLC-UV-VIS-DAD a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético (0,1 %), y flujo 0,8 mL/min.

Posteriormente para la cuantificación se realizaron curvas de calibración externas multi-estándar de los triterpenos a concentraciones de 0,5, 2, 5, 10, 20, 40, 60 y 80 mg/L, tal como se muestra en las figuras 6, 7, 8, 9 y 10, graficados según los datos expuestos en las tablas 16, 17, 18, 19 y 20 del anexo 1.

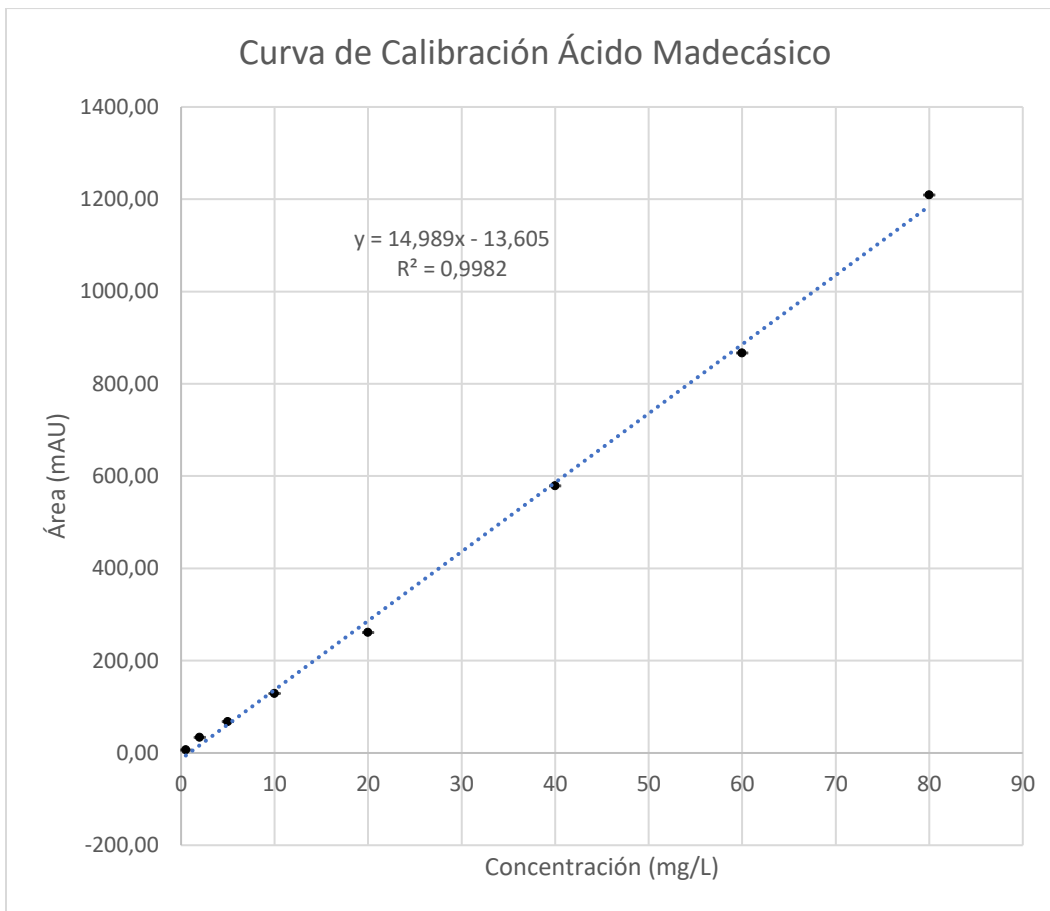


Figura 6. Curva de calibración externa de ácido madecásico, determinada mediante HPLC-UV-VIS-DAD a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético (0,1 %) y flujo a 0,8 mL/min.

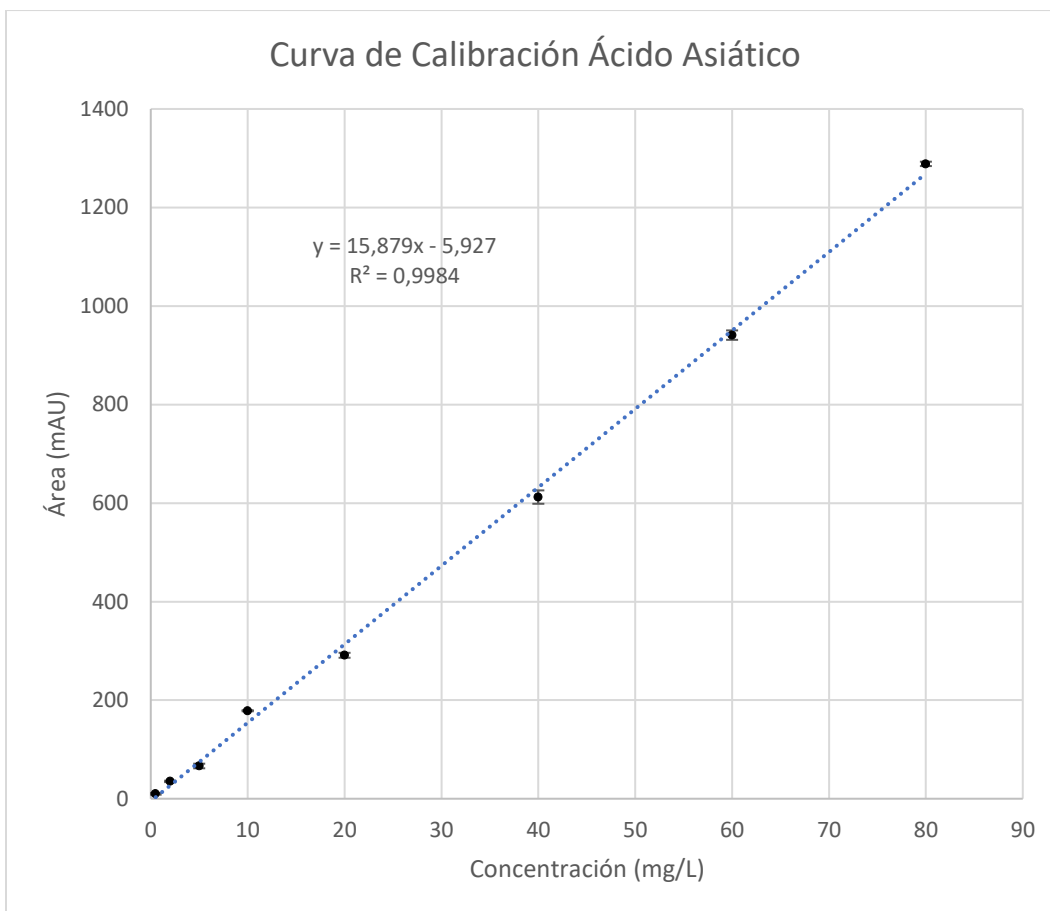


Figura 7. Curva de calibración externa de ácido asiático, determinada mediante HPLC-UV-VIS-DAD a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético (0,1 %), y flujo a 0,8 mL/min.

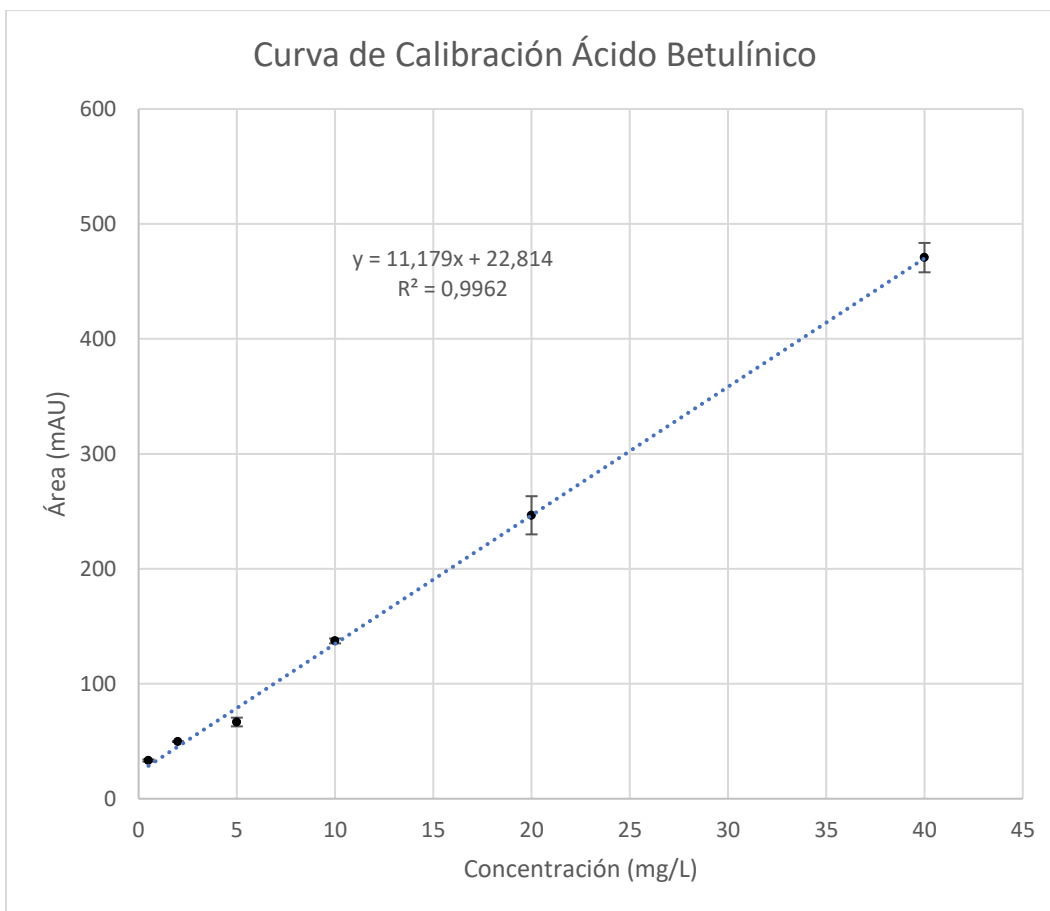


Figura 8. Curva de calibración externa de ácido betulínico determinada mediante HPLC-UV-VIS-DAD a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético (0,1 %), y flujo a 0,8 mL/min.

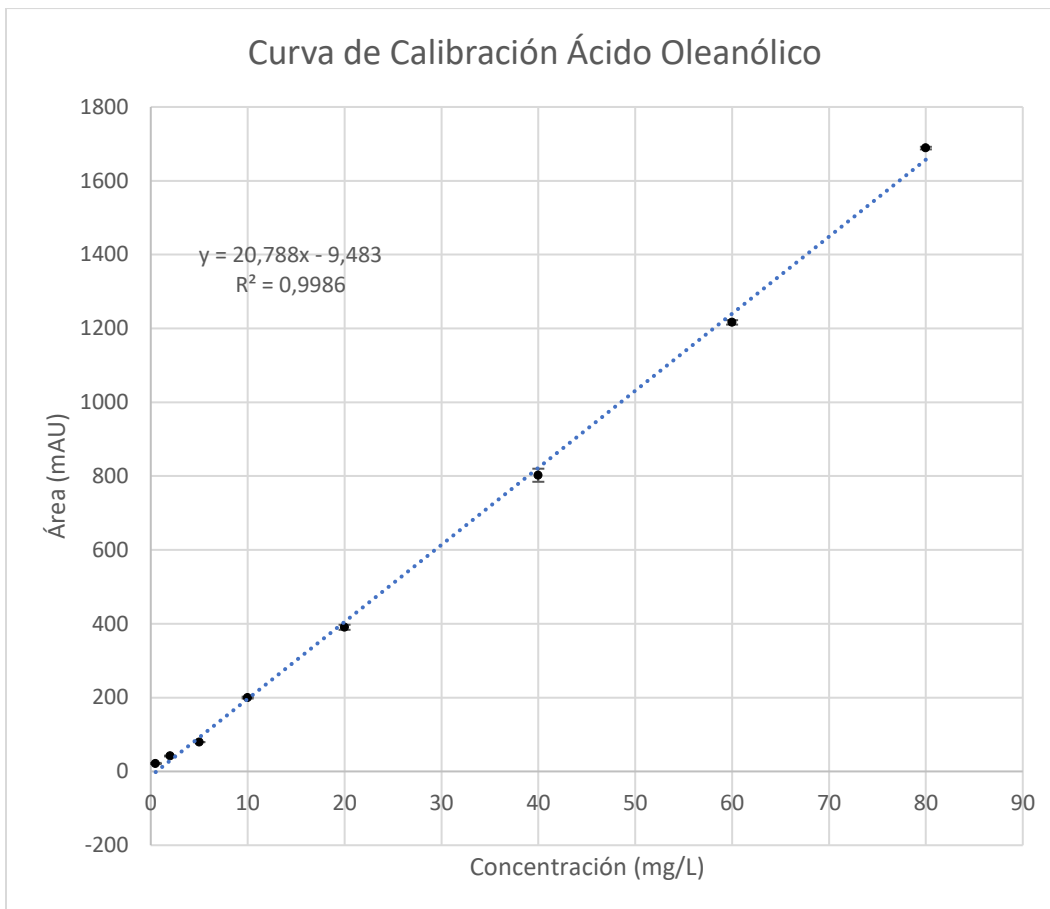


Figura 9. Curva de calibración externa de ácido oleanólico, determinada mediante HPLC-UV-VIS-DAD a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético (0,1 %), y flujo a 0,8 mL/min.

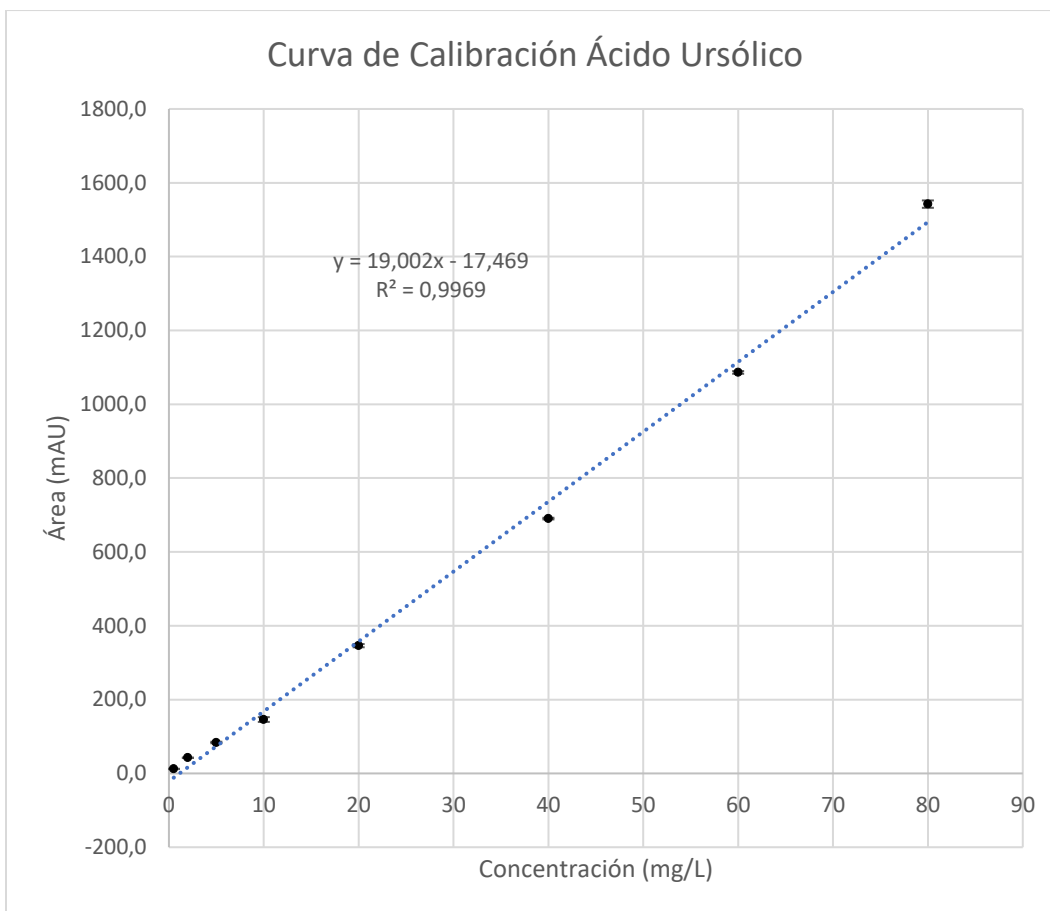


Figura 10. Curva de calibración externa de ácido ursólico, determinada mediante HPLC-UV-VIS-DAD a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético (0,1 %), y flujo a 0,8 mL/min.

6.2.1 Parámetros Analíticos

Se utilizaron las ecuaciones 1 y 2 expuestas en la Sección 5. 3. 2. 2 para determinar el límite de detección y de cuantificación de los cinco triterpenos, como se muestra en la tabla 6, y se determinó experimentalmente el rango lineal de las curvas de calibración, los cuales fueron importantes indicadores en la posterior determinación de las concentraciones de los triterpenos en los extractos, para evidenciar que dichas concentraciones están dentro del rango de concentración de las curvas de calibración externas.

Tabla 6. Parámetros analíticos de los cinco triterpenos.

Triterpeno	Rango lineal (mg/L)	Límite de detección (µg/L)	Límite de cuantificación (µg/L)
Ác. Madecásico	0,5 – 80	28	92
Ác. Asiático	0,5 – 80	26	88
Ác. Betulínico	0,5 – 40	46	154
Ác. Oleanólico	0,5 – 80	26	87
Ác. Ursólico	0,5 – 80	38	127

Además de los parámetros analíticos, se obtuvieron las ecuaciones de las rectas para cada curva de calibración, las cuales resultaron tener una buena relación lineal (R^2 entre 0,9962 – 0,9986), valores que se muestran en la tabla 7. Sin embargo, experimentalmente se pudo observar que a mayor concentración de estándar se fue perdiendo la linealidad de la curva de calibración, en especial en la curva de calibración del ácido betulínico, cuyo valor máximo del rango lineal se alcanzó a los 40 mg/L y no a los 80 mg/L como con los otros triterpenos.

Tabla 7. Ecuaciones de recta de los cinco triterpenos analizados.

Triterpeno	Ecuación de la recta	R^2
Ác. Madecásico	Área = 14,989 * C – 13,605	0,9982
Ác. Asiático	Área = 15,879 * C – 5,927	0,9984
Ác. Betulínico	Área = 11,179 * C + 22,814	0,9962
Ác. Oleanólico	Área = 20,788 * C – 9,483	0,9986
Ác. Ursólico	Área = 19,002 * C – 17,469	0,9969

6.3 Cuantificación de Triterpenos en Extractos de Hoja de *Salvia hispanica* L. por Método de Curva de Calibración

Posteriormente a la realización de las curvas de calibración externas, se inyectaron en el HPLC-UV-VIS-DAD los ocho extractos de hoja de *Salvia hispanica* L. bajo las mismas condiciones cromatográficas que los estándares. Para esto se hicieron diluciones de las soluciones madres de los extractos descritas en la tabla 2 (Sección 5. 3. 2. 1) a 10.000 mg/L para los extractos EtOH-B, EtOH-N, AE-B, AE-N, DCM-B y DCM-N, y de 6.000 mg/L para los extractos HEX-B y HEX-N.

En la Figura 11 se muestra un cromatograma característico de los extractos de hoja de *Salvia hispanica* L. que corresponde al cromatograma del extracto HEX-B, donde se puede apreciar la presencia de ácido betulínico, ácido oleanólico y ácido ursólico con buena resolución, en cambio, el ácido madecásico y ácido asiático no se pudieron apreciar con claridad las señales, debido a que tienen tiempos de retención menores y, por lo tanto, salen cerca de la señal del solvente y, conjuntamente con otras señales pertenecientes a una gran cantidad de compuestos polares característicos de los extractos.

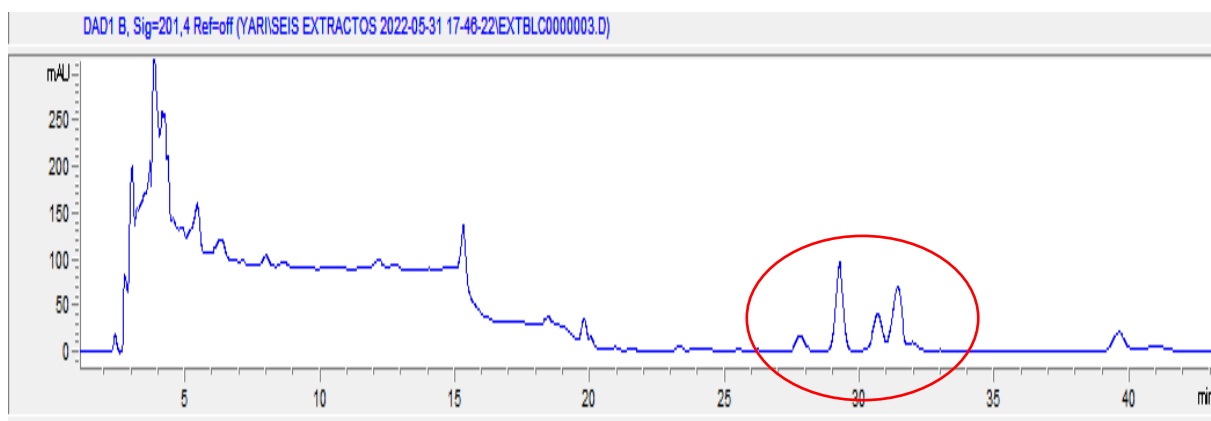


Figura 11. Cromatograma del extracto HEX-B a 6.000 mg/L, medido por HPLC-UV-VIS-DAD a 201 nm. Se utilizó gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético (0,1 %) y un flujo de 0,8 mL/min.

Debido a la dificultad en la asignación de las señales del ácido madecásico y el ácido asiático, se realizó un dopaje de los extractos con los estándares de estos compuestos, agregando cantidades conocidas de los cinco triterpenos. Esto último se realizó para identificar inequívocamente las señales cromatográficas de los cinco triterpenos. Al superponer ambos cromatogramas se pudo observar que los picos cromatográficos que aumentaron su área tal como se muestra en la figura 12.

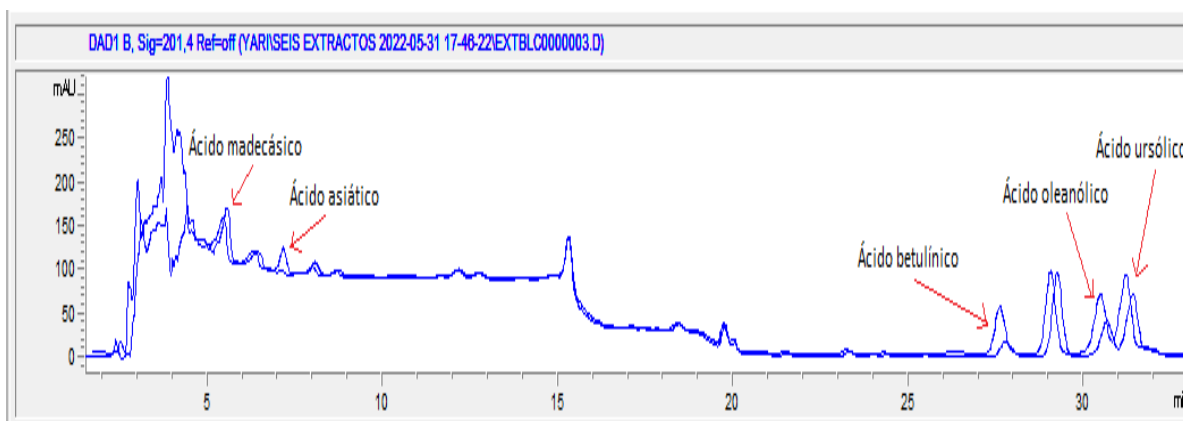


Figura 12. Cromatograma sin fortificar y cromatograma fortificado superpuestos del extracto HEX-B a 6.000 mg/L. Gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético (0,1 %); flujo de 0,8 mL/min; y los analitos fueron medidos a 201 nm.

Como se puede apreciar en la figura 12 sólo aumentaron las señales cromatográficas fortificadas con los cinco triterpenos. Sobre los 27 min de la corrida cromatográfica, la señal ubicada entre ácido betulinico y ácido oleanólico no creció, lo que indica que no se trata de ninguno de nuestros triterpenos de interés. Para verificar las señales de los triterpenos, todas las muestras se doparon con cantidades conocidas de estándar entre 20 y 80 mg/L de cada estándar. Con la fortificación de las señales y el tiempo de retención corroborados se pudieron identificar los triterpenos, y así se realizó la determinación de las concentraciones utilizando las curvas de calibración externa de cada estándar.

En algunos casos donde las áreas obtenidas se encontraron fuera de la curva de calibración se hicieron soluciones diluidas de los extractos con dichas concentraciones, para que estuvieran en el rango lineal de la curva de calibración. En las tablas 8 y 9 se muestran las concentraciones de los triterpenos por gramo de los ocho extractos secos de *Salvia hispanica* L.

Tabla 8. Concentración de triterpenos en mg/g de extracto de hoja de fenotipo de semilla blanca

	Triterpeno	Área cromatográfica (mAU)	Concentración fenotipo blanca interpolada (mg/L)	mg de compuesto en el extracto (mg/g)
EtOH	Ác. Madecásico	10,8 ± 0,4	1,63 ± 0,03	0,163 ± 0,003
	Ác. Asiático	10,3 ± 0,3	1,02 ± 0,02	0,102 ± 0,002
	Ác. Betulínico	N/D	N/D	N/D
	Ác. Oleanólico	26 ± 10	1,7 ± 0,5	0,17 ± 0,05
	Ác. Ursólico	16 ± 5	1,8 ± 0,2	0,18 ± 0,02
AE	Ác. Madecásico	744 ± 17	51 ± 1	5,1 ± 0,1
	Ác. Asiático	415 ± 9	26,5 ± 0,6	2,65 ± 0,06
	Ác. Betulínico	N/D	N/D	N/D
	Ác. Oleanólico	135 ± 2	6,97 ± 0,09	0,697 ± 0,009
	Ác. Ursólico	140 ± 6	8,3 ± 0,3	0,83 ± 0,03
DCM	Ác. Madecásico	696 ± 7 (*)	47,4 ± 0,5 (*)	9,5 ± 0,1 (*)
	Ác. Asiático	37,9 ± 0,3	2,76 ± 0,02	0,276 ± 0,002
	Ác. Betulínico	N/D	N/D	N/D
	Ác. Oleanólico	86 ± 3	4,6 ± 0,1	0,46 ± 0,01
	Ác. Ursólico	132 ± 5	7,9 ± 0,3	0,79 ± 0,03
HEX	Ác. Madecásico	794 ± 6	53,9 ± 0,4	8,98 ± 0,06
	Ác. Asiático	69 ± 2	4,7 ± 0,1	0,78 ± 0,02

	Ác. Betulínico	426 ± 3	36,0 ± 0,3	6,01 ± 0,05
	Ác. Oleanólico	1.196 ± 11	58,0 ± 0,5	9,66 ± 0,09
	Ác. Ursólico	973 ± 6 (*)	52,1 ± 0,3 (*)	17,4 ± 0,1 (*)

N/D = Compuesto no identificado con claridad, o con área muy por debajo de la curva de calibración

(*) Medidos en los extractos de menor concentración (DCM 5.000 mg/L y HEX 3.000 mg/L)

Tabla 9. Concentración de triterpenos en mg/g de extracto de hoja de fenotipo de semilla negra

	Triterpeno	Área cromatográfica (mAU)	Concentración fenotipo blanca interpolada (mg/L)	mg de compuesto en el extracto (mg/g)
EtOH	Ác. Madecásico	100 ± 1	7,55 ± 0,07	0,755 ± 0,007
	Ác. Asiático	34,1 ± 0,4	2,52 ± 0,03	0,252 ± 0,003
	Ác. Betulínico	N/D	N/D	N/D
	Ác. Oleanólico	15,5 ± 0,7	1,20 ± 0,04	0,120 ± 0,004
	Ác. Ursólico	16 ± 1	1,78 ± 0,06	0,178 ± 0,006
AE	Ác. Madecásico	867 ± 32	59 ± 2	5,9 ± 0,2
	Ác. Asiático	124 ± 3	8,2 ± 0,2	0,82 ± 0,02
	Ác. Betulínico	N/D	N/D	N/D
	Ác. Oleanólico	91 ± 4	4,8 ± 0,2	0,48 ± 0,02
	Ác. Ursólico	128 ± 5	7,6 ± 0,3	0,76 ± 0,03
DCM	Ác. Madecásico	786 ± 25 (*)	53 ± 2 (*)	10,7 ± 0,3 (*)
	Ác. Asiático	37 ± 1	2,73 ± 0,07	0,273 ± 0,007
	Ác. Betulínico	N/D	N/D	N/D
	Ác. Oleanólico	107 ± 1	5,62 ± 0,06	0,562 ± 0,006
	Ác. Ursólico	302 ± 7	16,8 ± 0,3	1,68 ± 0,03

HEX	Ác. Madecásico	1.028 ± 5	69,5 ± 0,3	11,58 ± 0,05
	Ác. Asiático	74 ± 1	5,02 ± 0,08	0,84 ± 0,01
	Ác. Betulínico	565 ± 1	48,53 ± 0,09	7,7 ± 0,1 (*)
	Ác. Oleanólico	1.404 ± 17	68,0 ± 0,8	11,3 ± 0,1
	Ác. Ursólico	1.169 ± 3 (*)	62,4 ± 0,1 (*)	20,81 ± 0,05 (*)

N/D = Compuesto no identificado con claridad, o con área muy por debajo de la curva de calibración

(*) Medidos en los extractos de menor concentración (DCM 5.000 mg/L y HEX 3.000 mg/L)

Al analizar los datos de las tablas 8 y 9 se pudo observar en primer lugar que los valores de área de ácido betulínico en los extractos EtOH-B, EtOH-N, AE-B, AE-N, DCM-B y DCM-N no estaban dentro del rango de áreas de la curva de calibración, ya que se encontraban por debajo del punto de concentración más bajo de su curva de calibración, en estos casos no se pudo concentrar más la solución debido a que al aumentar la concentración de los extractos se corría el riesgo de insolubilizar otros compuestos de los extractos, y por tanto saturar la columna del equipo cromatográfico.

En el caso del ácido ursólico en los extractos HEX-B y HEX-N se encontró que estaba por encima del punto más concentrado de la curva de calibración, por lo que tuvo que ser medido a una concentración de 3.000 mg/L, para que su concentración estuviera dentro del rango de la curva de calibración. Mismo caso ocurrió con los extractos DCM-B y DCM-N, cuya concentración de ácido madecásico también estaba por sobre el punto de mayor concentración de la curva de calibración, por lo que se hizo una solución de 5.000 mg/L para estos extractos para poder medir ácido madecásico.

Al interpolar los valores de las áreas en las curvas de calibración se da cuenta de que éstas si están dentro del rango de concentración de la curva de calibración, tal como se muestra en las figuras 13, 14, 15, 16 y 17, por lo que el método analítico utilizado logra el objetivo de cuantificar los triterpenos.

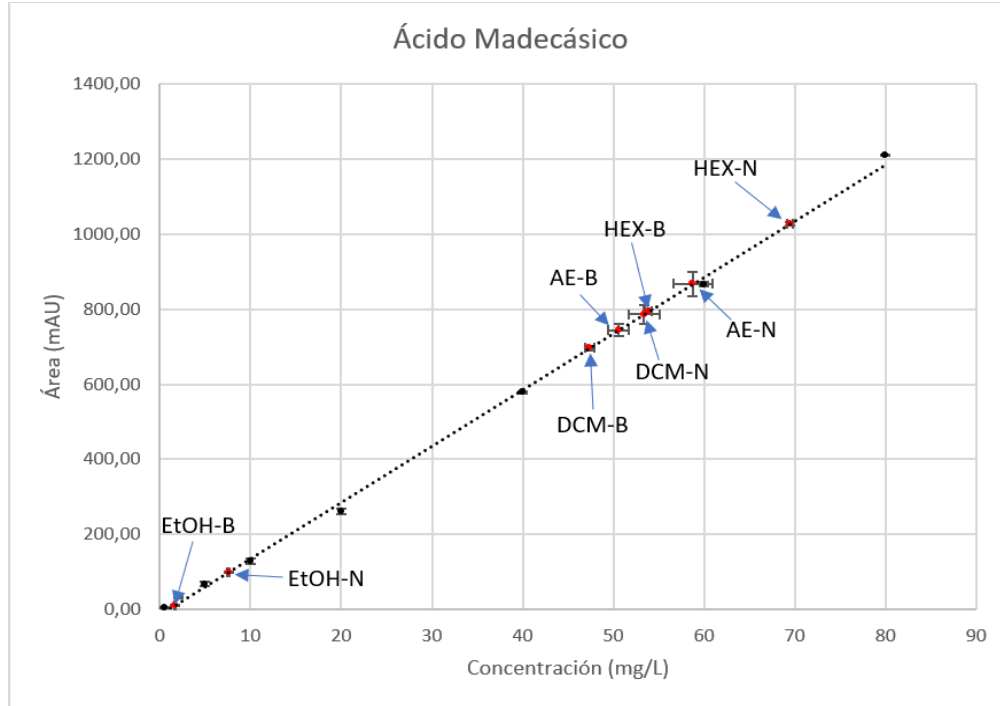


Figura 13. Curva de calibración de ácido madecásico medido por HPLC-UV-VIS-DAD a 201 nm con las áreas promedio de los extractos dentro de la recta. Se utilizó un gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1% y flujo a 0,8 mL/min.

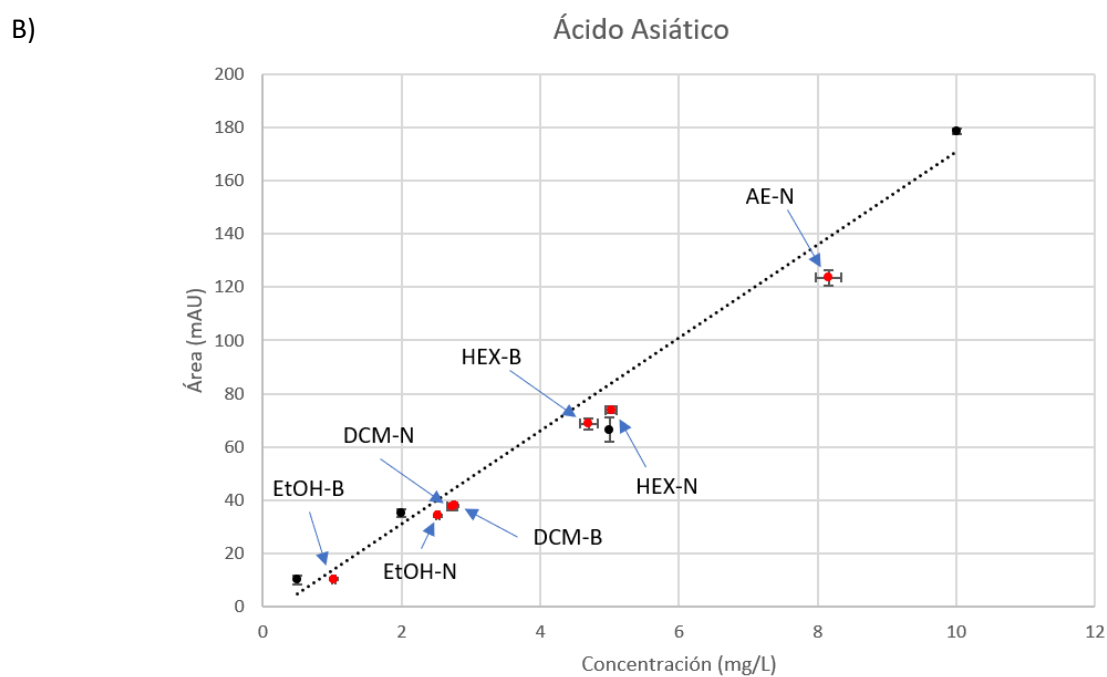
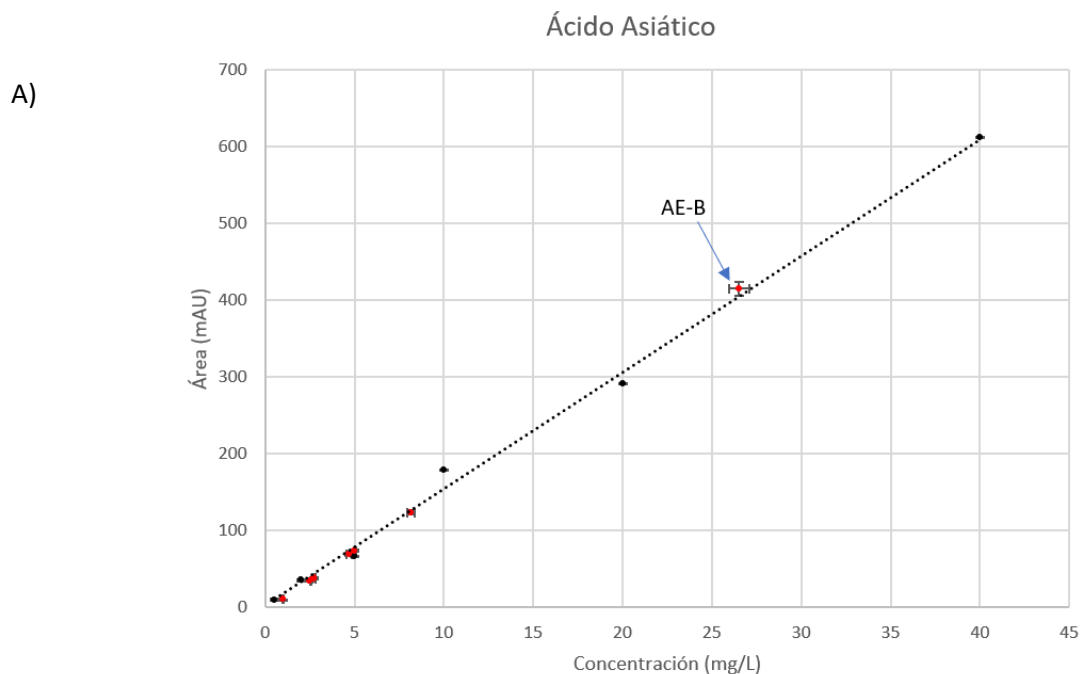


Figura 14. Curva de calibración de ácido asiático medido por HPLC-UV-VIS-DAD a 201 nm con las áreas promedio de los extractos en de la recta. Se utilizó un gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1% y flujo a 0,8 mL/min. A) Panorama general de la curva de calibración; B) Acercamiento del rango 0 – 10 mg/L, para mejor apreciación de los puntos.

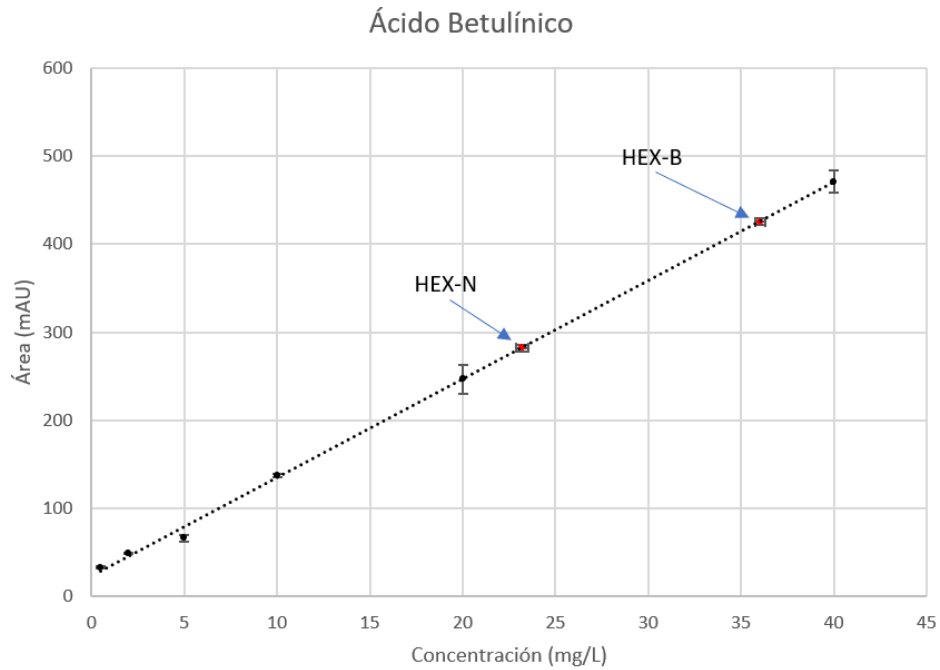
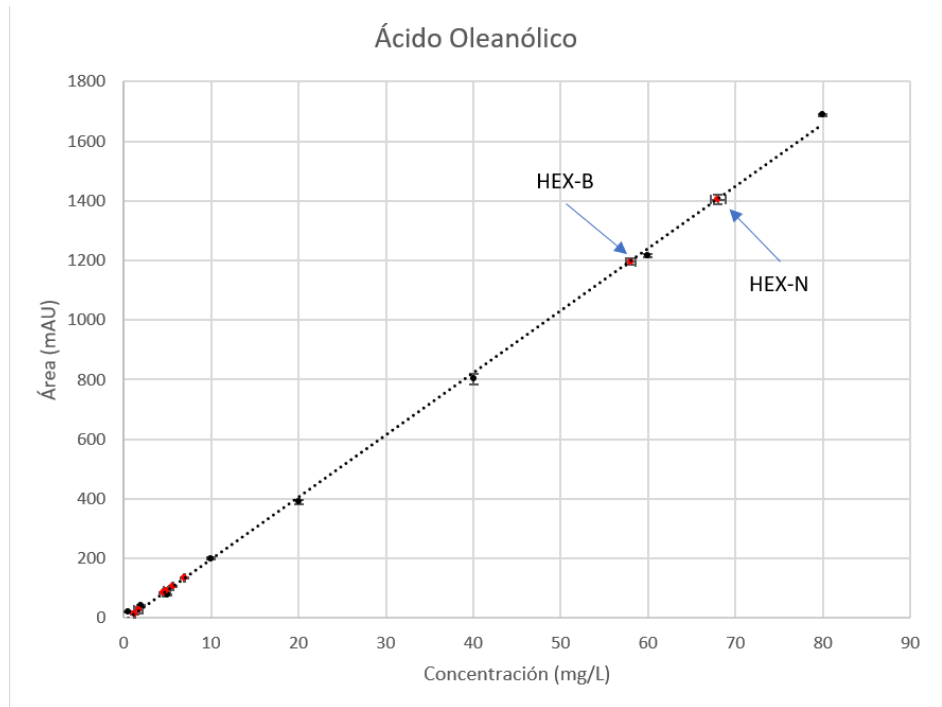


Figura 15. Curva de calibración de ácido betulínico medido por HPLC-UV-VIS-DAD a 201 nm con las áreas promedio de los extractos en de la recta. Se utilizó un gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1% y flujo a 0,8 mL/min.

A)



B)

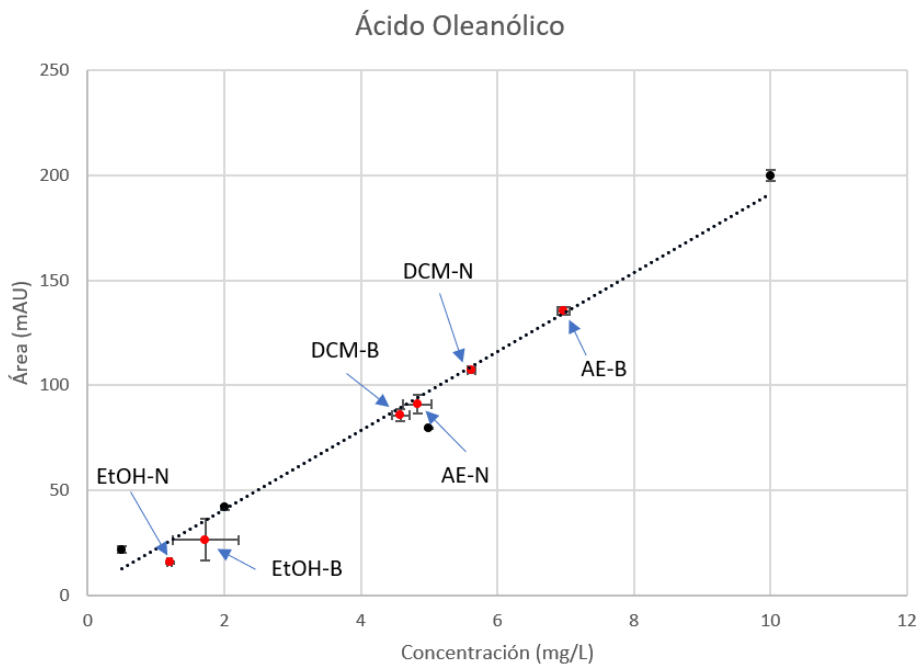
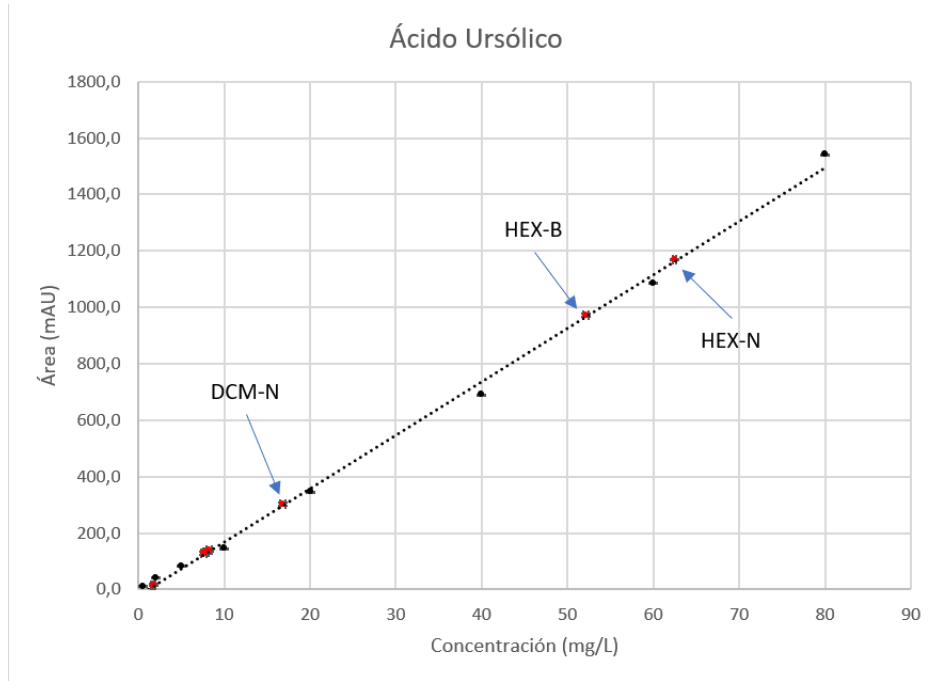


Figura 16. Curva de calibración de ácido oleanólico medido por HPLC-UV-VIS-DAD a 201 nm con las áreas promedio de los extractos en de la recta. Se utilizó un gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1% y flujo a 0,8 mL/min. A) Panorama general de la curva de calibración; B) Acercamiento del rango 0 – 10 mg/L, para mejor apreciación de los puntos.

A)



B)

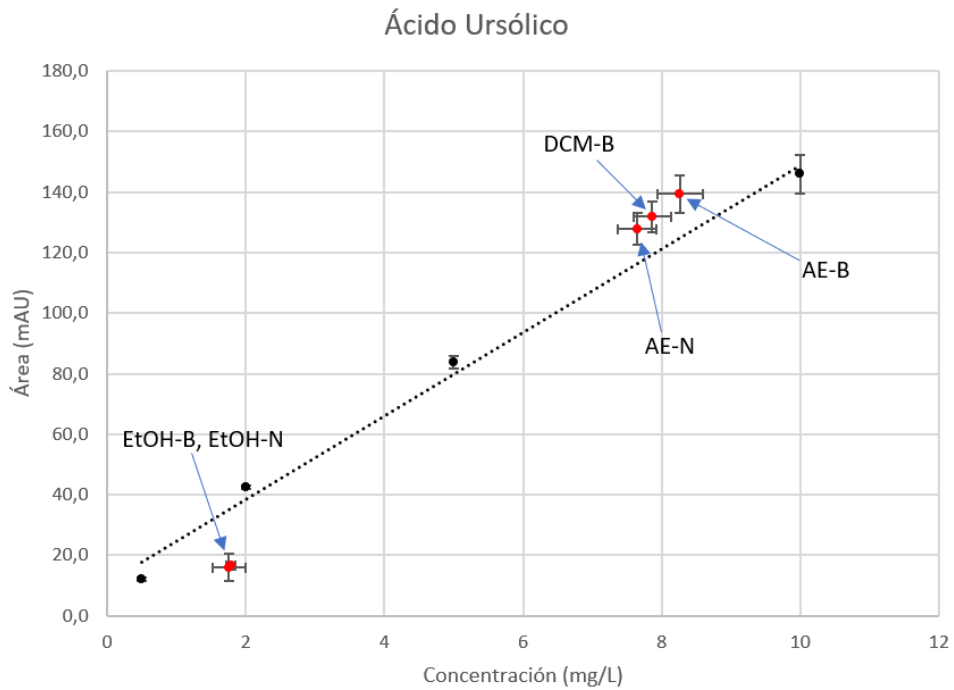


Figura 17. Curva de calibración de ácido ursólico medido por HPLC-UV-VIS-DAD a 201 nm con las áreas promedio de los extractos en de la recta. Se utilizó un gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1% y flujo a 0,8 mL/min. A) Panorama general de la curva de calibración; B) Acercamiento del rango 0 – 10 mg/L, para mejor apreciación de los puntos.

Como se dijo anteriormente tanto las señales de los ácidos madecásico como asiático fueron difíciles de identificar en el cromatograma de los extractos EtOH, DCM y HEX, por lo que de manera adicional se recurrió al método de adición de estándar para poder diferenciar las señales de interés del resto de las señales cromatográficas, así como también poder determinar si la determinación de estos compuestos en los extractos presentan efecto matriz al tener un tiempo de retención menor y salir junto con muchas otras señales cromatográficas, Por el contrario, esto no fue un problema para ácido betulínico, ácido oleanólico y ácido ursólico, debido a que tienen señales muy características hacia el final de la corrida cromatográfica. Sin embargo, como las señales si se pudieron identificar a cabalidad en los extractos AE-B y AE-N no fue necesario realizar el método de adición estándar para estos extractos en particular, ya que además se contaba con poca masa de estos extractos, y se sabe que en el método de la adición estándar es alta la cantidad de extracto que se necesita para preparar los viales necesarios para la medición.

6.4 Cuantificación de Triterpenos en Extractos de Hoja de *Salvia hispanica* L. por Método de Adición Estándar

De acuerdo con lo planteado con anterioridad, se hizo el método de la adición de estándar de los otros 6 extractos tal como se describe en la Sección 5. 3. 2. 3. Para lo cual, a los extractos se les agregó concentraciones crecientes de ácido madecásico y ácido asiático, que son nuestras señales de interés; se agregan 20, 40, 60 y 80 mg/L de cada uno de los triterpenos, en soluciones de 10.000 mg/L para los extractos EtOH y DCM, y de 6.000 mg/L para los extractos HEX, como se muestra en la figura 18.

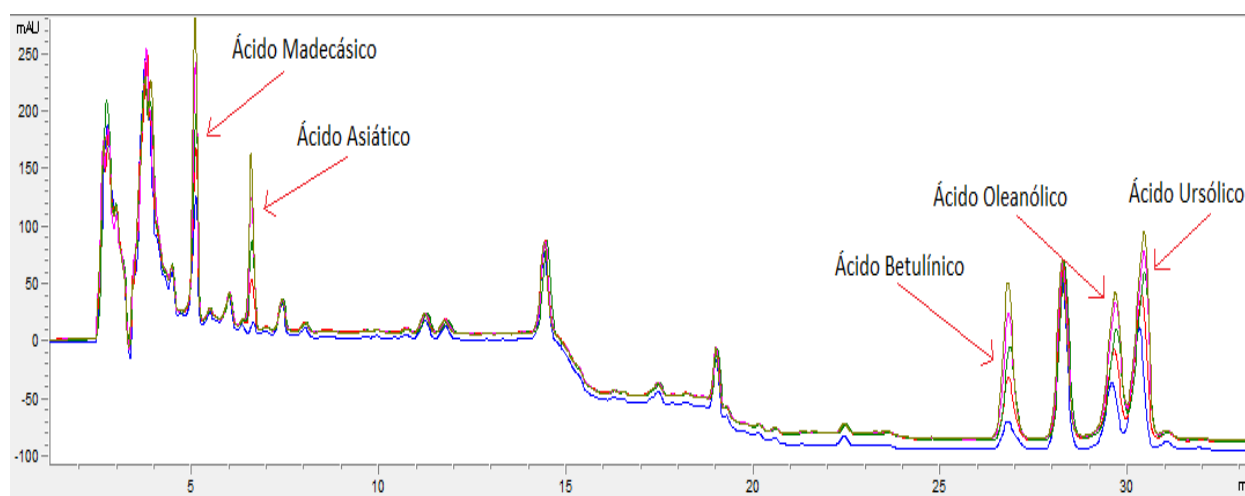


Figura 18. Cromatograma superpuesto de adición estándar del extracto HEX-N a 6.000 mg/L, por HPLC-UV-VIS-DAD medido a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1%, a un flujo de 0,8 mL/min.

Como se mencionó anteriormente solo para los extractos HEX-N, como se muestra en la figura 19, se muestran los cromatogramas de adición estándar del extracto, al cual de manera excepcional se agregaron los cinco estándares, para evidenciar el efecto matriz que se analizará más adelante en la sección 6.4.7.

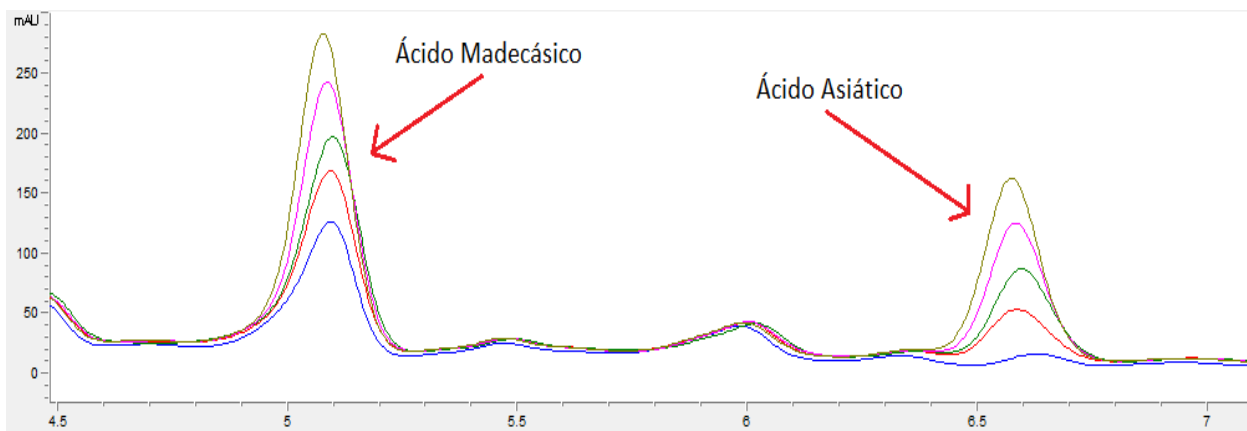


Figura 19. Cromatograma superpuesto ampliado del extracto HEX-N a 6.000 mg/L (ácido madecásico y ácido asiático), por HPLC-UV-VIS-DAD medido a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1%, a un flujo de 0,8 mL/min.

6.4.1 Adición Estándar a Extractos de Hoja de *Salvia hispanica* L. de Fenotipo de Semilla Blanca de Etanol

En la preparación de las soluciones que se utilizaron para realizar el método de la adición estándar se siguió el procedimiento descrito en la Sección 5. 3. 2. 3, agregando los volúmenes de solución, triterpenos y metanol expuesto en la tabla 3, y utilizando las soluciones madres expuestas en la tabla 2. Las soluciones del extracto EtOH-B se prepararon a 10.000 mg/L con adición de concentraciones crecientes de ácido madecásico y ácido asiático de: 20, 40, 60 y 80 mg/L. Al final se inyectaron por triplicado los 4 viales en las mismas condiciones cromatográficas utilizadas para las curvas de calibración externas. Fueron graficadas las concentraciones vs las áreas promedio para obtener las rectas de la gráfica, tal como se muestran en las figuras 20 y 21, y en las tablas 21 y 22 del Anexo 2.

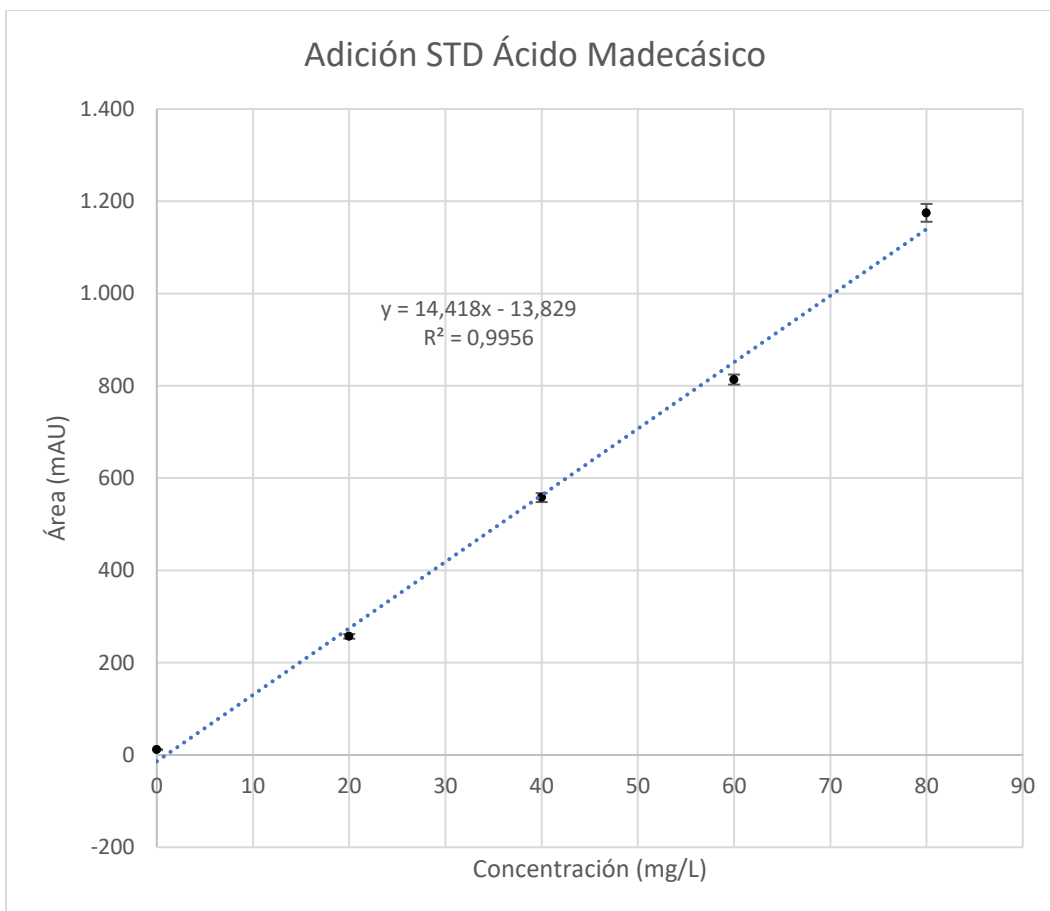


Figura 20. Gráfico de adición estándar de ácido madecásico en el extracto EtOH-B, con adición de triterpenos de 20 a 80 mg/L, determinados por HPLC-UV-VIS-DAD medidos a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1% y a un flujo de 0,8 mL/min.

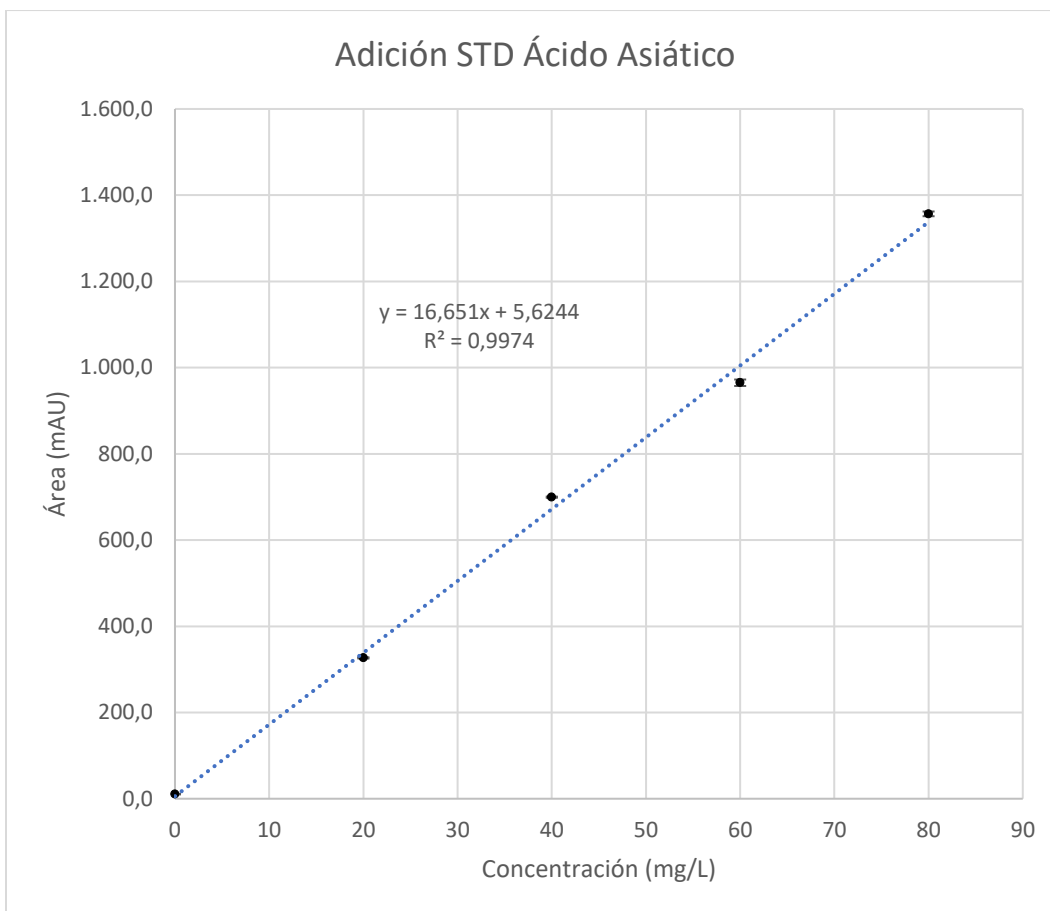


Figura 21. Gráfico de adición estándar de ácido asiático en el extracto EtOH-B, con adición de triterpenos de 20 a 80 mg/L, determinados por HPLC-UV-VIS-DAD medidos a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1% y a un flujo de 0,8 mL/min.

6.4.2 Adición Estándar a Extractos de Hoja de *Salvia hispanica* L. de Fenotipo de Semilla Negra de Etanol

El mismo procedimiento descrito anteriormente se utilizó para hacer la adición estándar del extracto EtOH-N a 10.000 mg/L con adición de: 20, 40, 60 y 80 mg/L de ácido madecásico y ácido asiático. Fueron graficadas las concentraciones vs las áreas promedio para obtener las rectas de la gráfica, tal como se muestran en las figuras 22 y 23, y en las tablas 23 y 24 del Anexo 2.

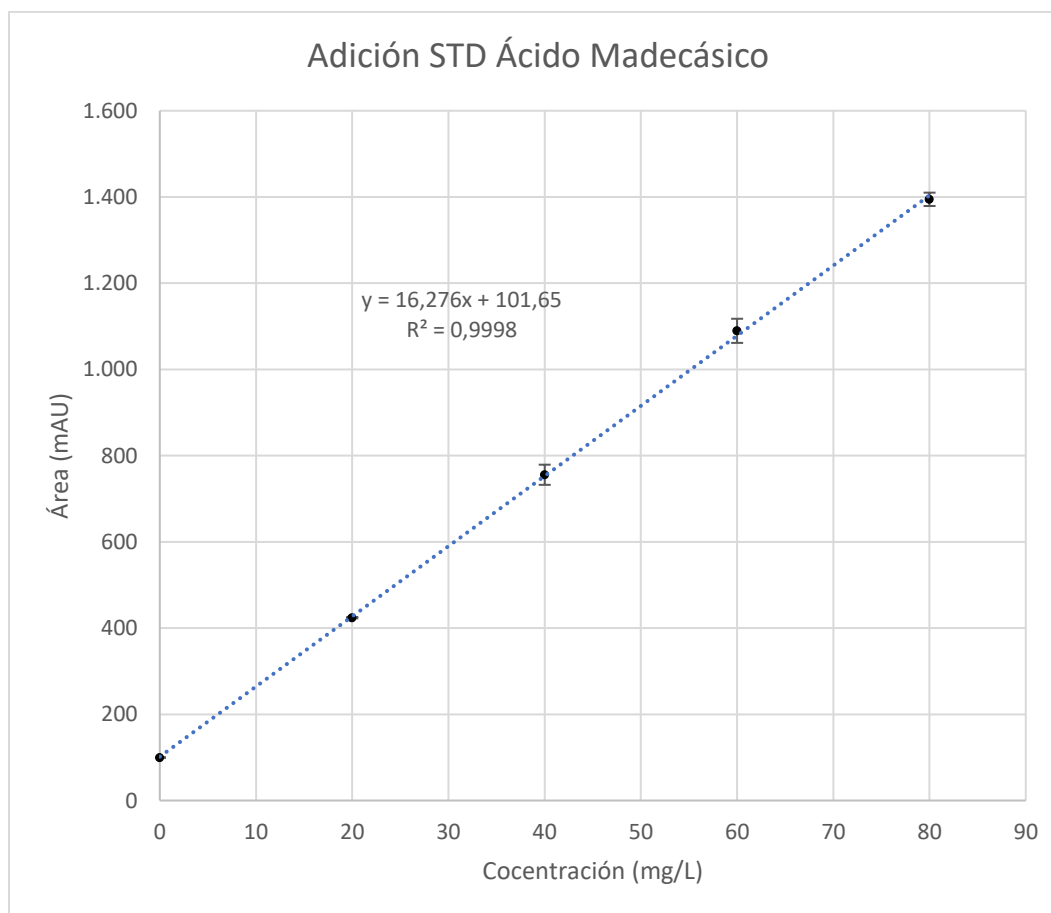


Figura 22. Gráfico de adición estándar de ácido madecásico en el extracto EtOH-N, con adición de triterpenos de 20 a 80 mg/L, determinados por HPLC-UV-VIS-DAD medidos a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1% y a un flujo de 0,8 mL/min.

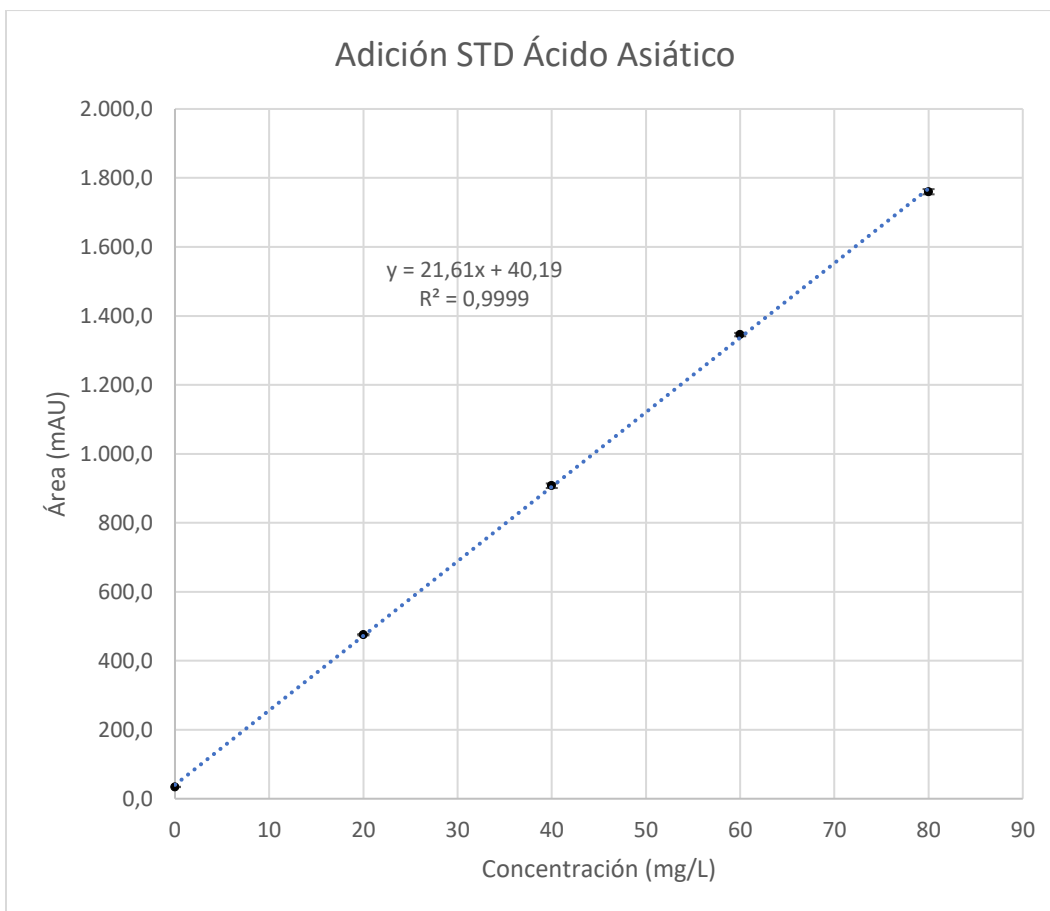


Figura 23. Gráfico de adición estándar de ácido asiático en el extracto EtOH-N, con adición de triterpenos de 20 a 80 mg/L, determinados por HPLC-UV-VIS-DAD medidos a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1% y a un flujo de 0,8 mL/min.

6.4.3 Adición Estándar a Extractos de Hoja de *Salvia hispanica* L. de Fenotipo de Semilla Blanca de Diclorometano

Al igual que las soluciones de los extractos EtOH-B y EtOH-N, se midió el extracto DCM-B usando el mismo procedimiento utilizado anteriormente para los extractos mencionados anteriormente (Sección 5.3.2.3). Fueron graficadas las concentraciones vs las áreas promedio para obtener las rectas de la gráfica, tal como se muestran en las figuras 24 y 25, y en las tablas 25 y 26 del Anexo 2.

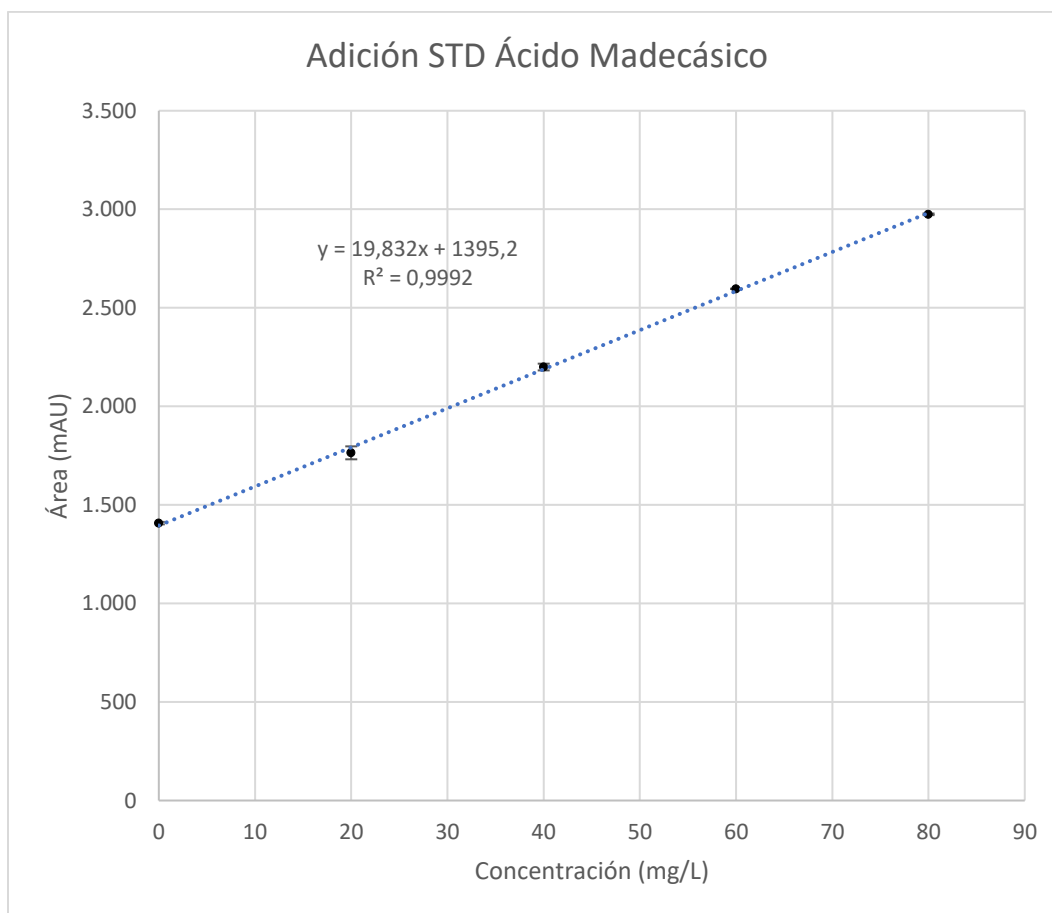


Figura 24. Gráfico de adición estándar de ácido madecásico en el extracto DCM-B, con adición de triterpenos de 20 a 80 mg/L, determinados por HPLC-UV-VIS-DAD medidos a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1% y a un flujo de 0,8 mL/min.

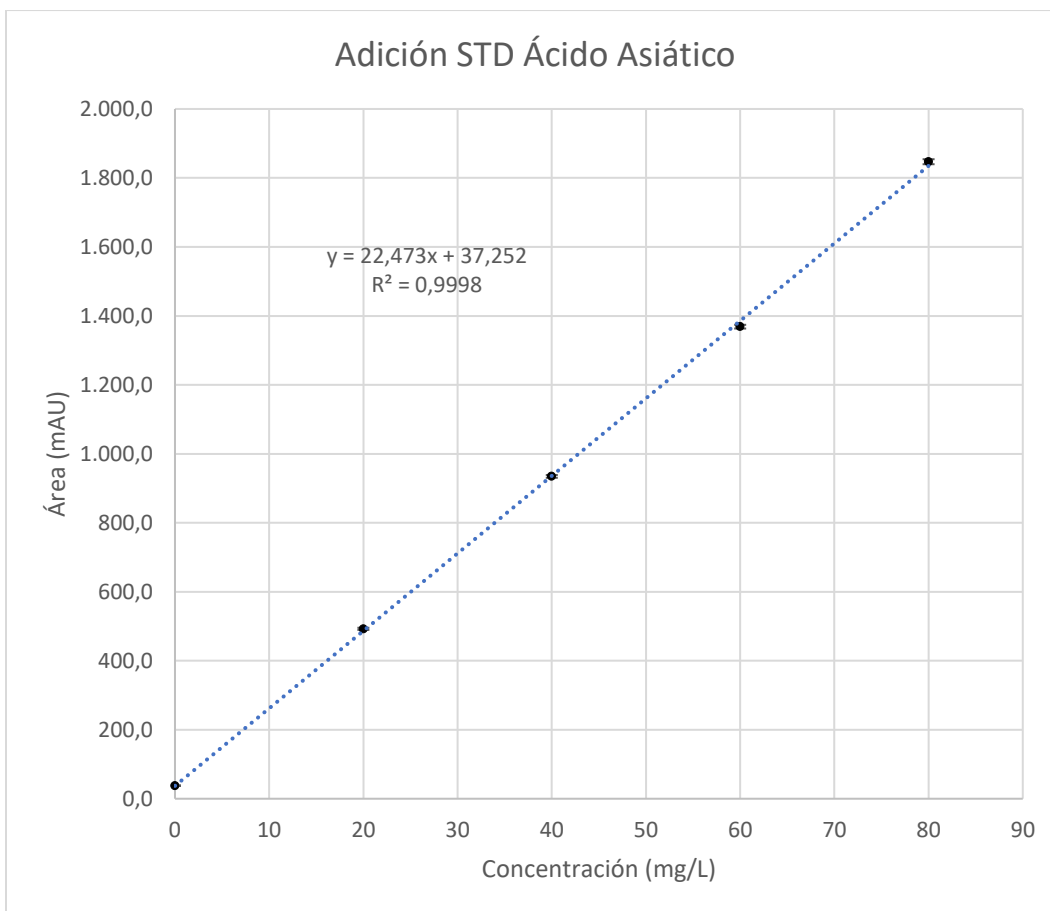


Figura 25. Gráfico de adición estándar de ácido asiático en el extracto DCM-B, con adición de triterpenos de 20 a 80 mg/L, determinados por HPLC-UV-VIS-DAD medidos a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1% y a un flujo de 0,8 mL/min.

6.4.4 Adición Estándar a Extractos de Hoja de *Salvia hispanica* L. de Fenotipo de Semilla Negra de Diclorometano

En el caso de los extractos DCM-N se hicieron soluciones a 10.000 mg/L con concentraciones crecientes de estándar de: 20, 40, 60 y 80 mg/L, obteniéndose al final 4 viales con distintas concentraciones de estándar, tal como se hizo con su contraparte blanca. Fueron graficadas las concentraciones vs las áreas promedio para obtener las rectas de la gráfica, tal como se muestras en las figuras 26 y 27, y en las tablas 27 y 28 del Anexo 2.

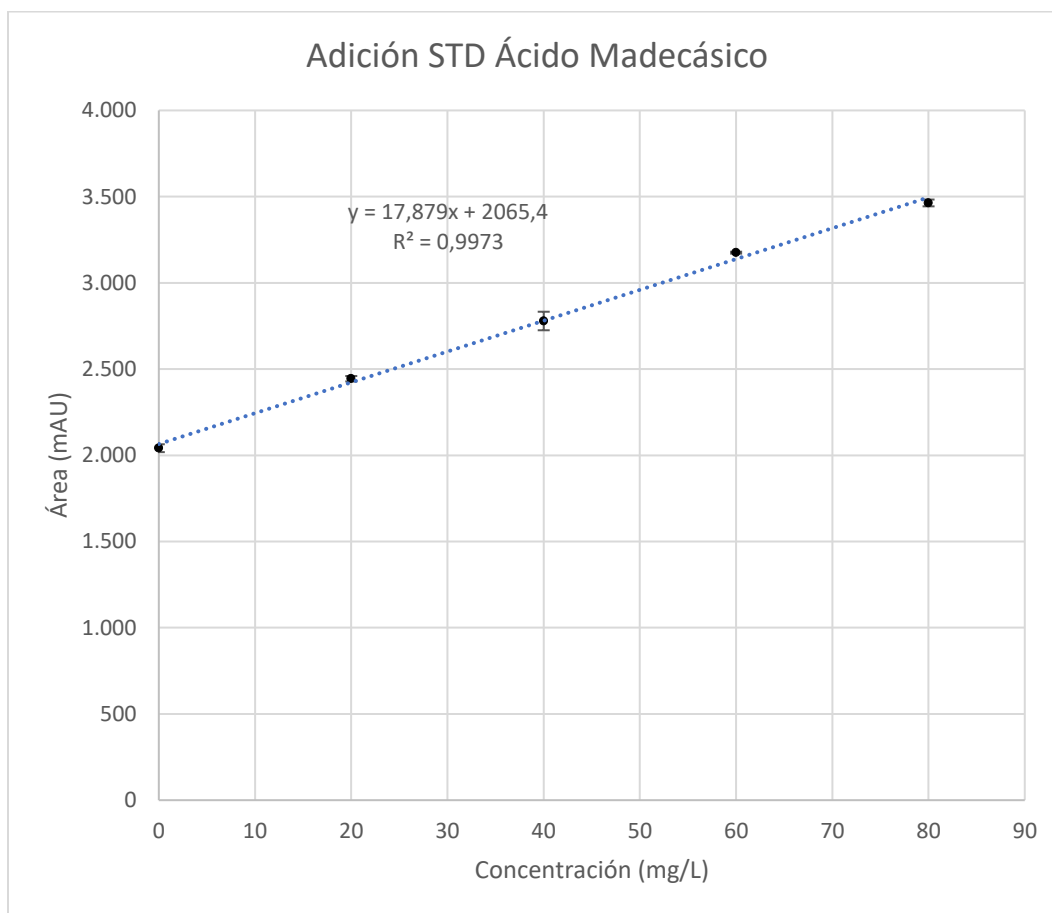


Figura 26. Gráfico de adición estándar de ácido madecásico en el extracto DCM-N, con adición de triterpenos de 20 a 80 mg/L, determinados por HPLC-UV-VIS-DAD medidos a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1% y a un flujo de 0,8 mL/min.

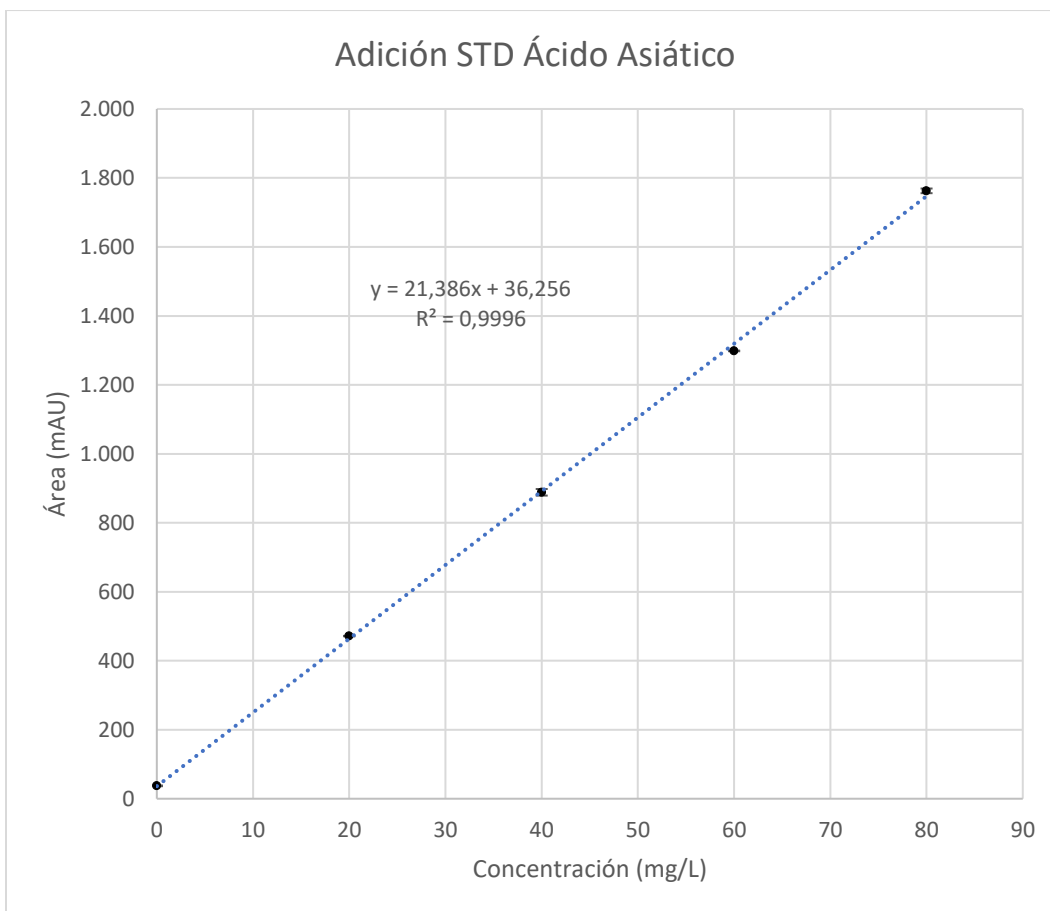


Figura 27. Gráfico de adición estándar de ácido asiático en el extracto DCM-N, con adición de triterpenos de 20 a 80 mg/L, determinados por HPLC-UV-VIS-DAD medidos a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1% y a un flujo de 0,8 mL/min.

6.4.5 Adición Estándar a Extractos de Hoja de *Salvia hispanica* L. de Fenotipo de Semilla Blanca de Hexano

El mismo procedimiento de adición estándar descrito en la metodología (Sección 5.3.2.3) y utilizado con los extractos anteriores se hizo con el extracto HEX-B. Al igual que en el inciso anterior se graficó la concentración vs el área para obtener las rectas de adición estándar, tal como se muestra en las figuras 28 y 29, y las tablas 29 y 30 del Anexo 2.

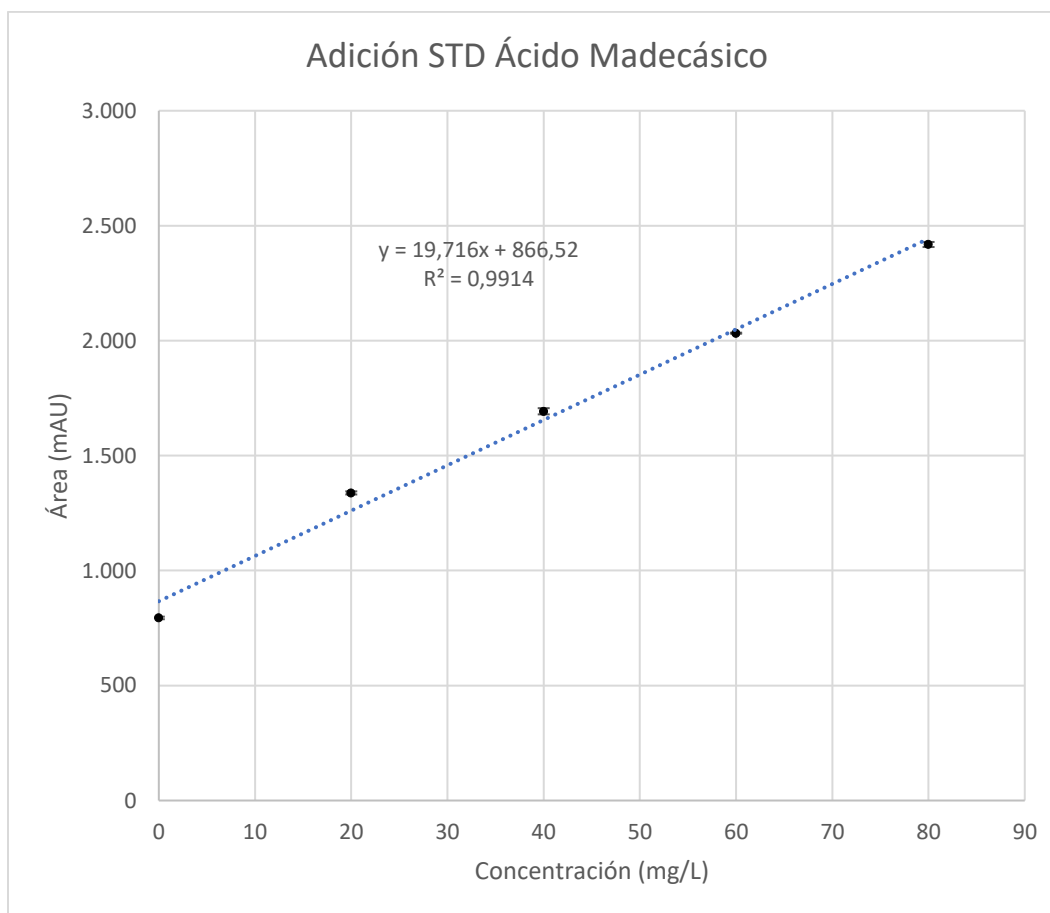


Figura 28. Gráfico de adición estándar de ácido madecásico en el extracto HEX-B, con adición de triterpenos de 20 a 80 mg/L, determinados por HPLC-UV-VIS-DAD medidos a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1% y a un flujo de 0,8 mL/min.

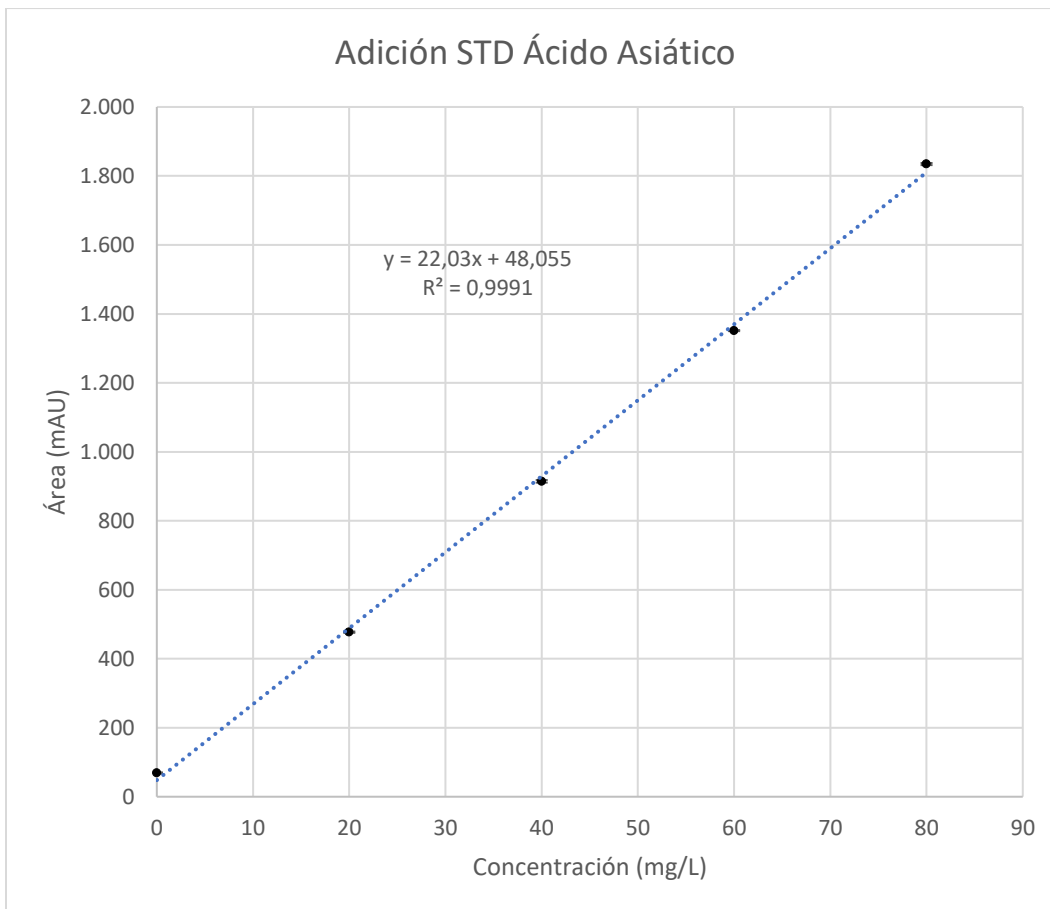


Figura 29. Gráfico de adición estándar de ácido asiático en el extracto HEX-B, con adición de triterpenos de 20 a 80 mg/L, determinados por HPLC-UV-VIS-DAD medidos a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1% y a un flujo de 0,8 mL/min.

6.4.6 Adición Estándar a Extractos de Hoja de *Salvia hispanica* L. de Fenotipo de Semilla Negra de Hexano

Tal como se mencionó al inicio del método de adición estándar, y a pesar de que ácido betulínico, ácido oleanólico y ácido ursólico se lograron identificar bien en los cromatogramas, de manera adicional se hizo la adición estándar de todos los triterpenos al extracto HEX-N a modo de observar el efecto de la matriz en la determinación, el cual afecta a la concentración interpolada a través del método de curva de calibración externa, pero no al método de adición estándar, ya que se considera este efecto de matriz dentro de los cálculos. En la figura 30 se muestra la parte ampliada del cromatograma del extracto HEX-N que muestra el aumento de las señales de ácido betulínico, ácido oleanólico y ácido ursólico.

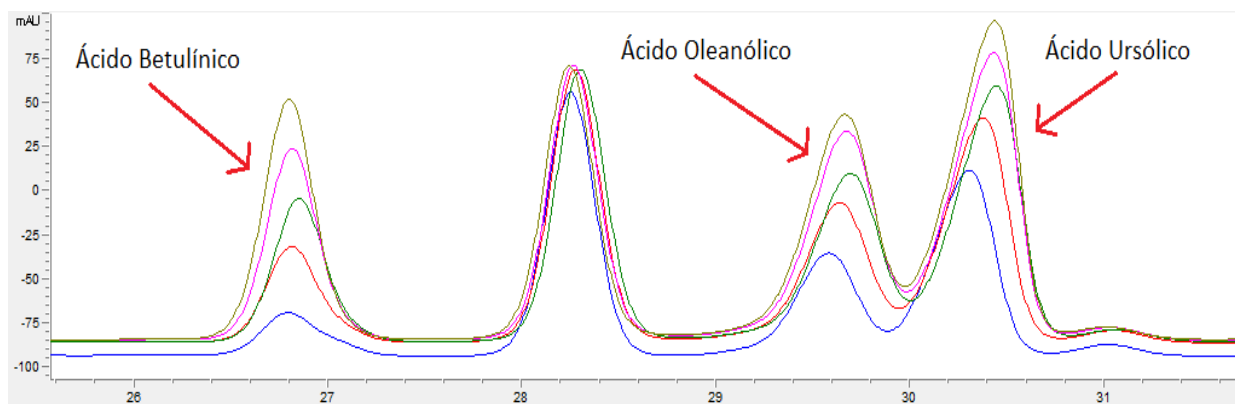


Figura 30. Cromatograma superpuesto ampliado del extracto HEX-N a 6.000 mg/L (ácido betulínico, ácido oleanólico y ácido ursólico), por HPLC-UV-VIS-DAD medido a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1%, a un flujo de 0,8 mL/min.

Con los 4 viales a distintas concentraciones de estándar, se inyectó cada vial por triplicado en el equipo cromatográfico en las mismas condiciones que la curva de calibración externa. Para obtener las rectas de adición estándar se promediaron los valores de área y se graficaron la concentración vs el área, tal como se muestra en las figuras 31, 32, 33, 34 y 35, y en las tablas 31, 32, 33, 34 y 35 del Anexo 2, y tal como se hizo con los extractos anteriores.

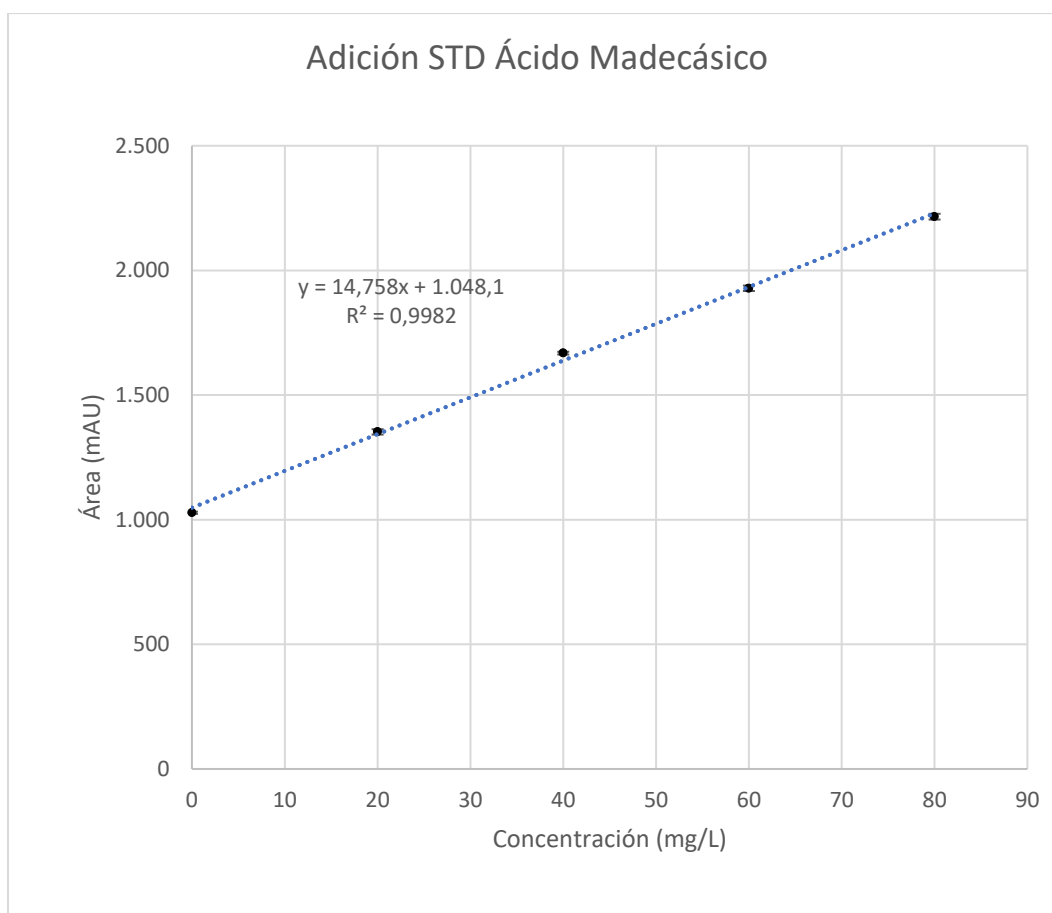


Figura 31. Gráfico de adición estándar de ácido madecásico en el extracto HEX-N, con adición de triterpenos de 20 a 80 mg/L, determinados por HPLC-UV-VIS-DAD medidos a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1% y a un flujo de 0,8 mL/min.

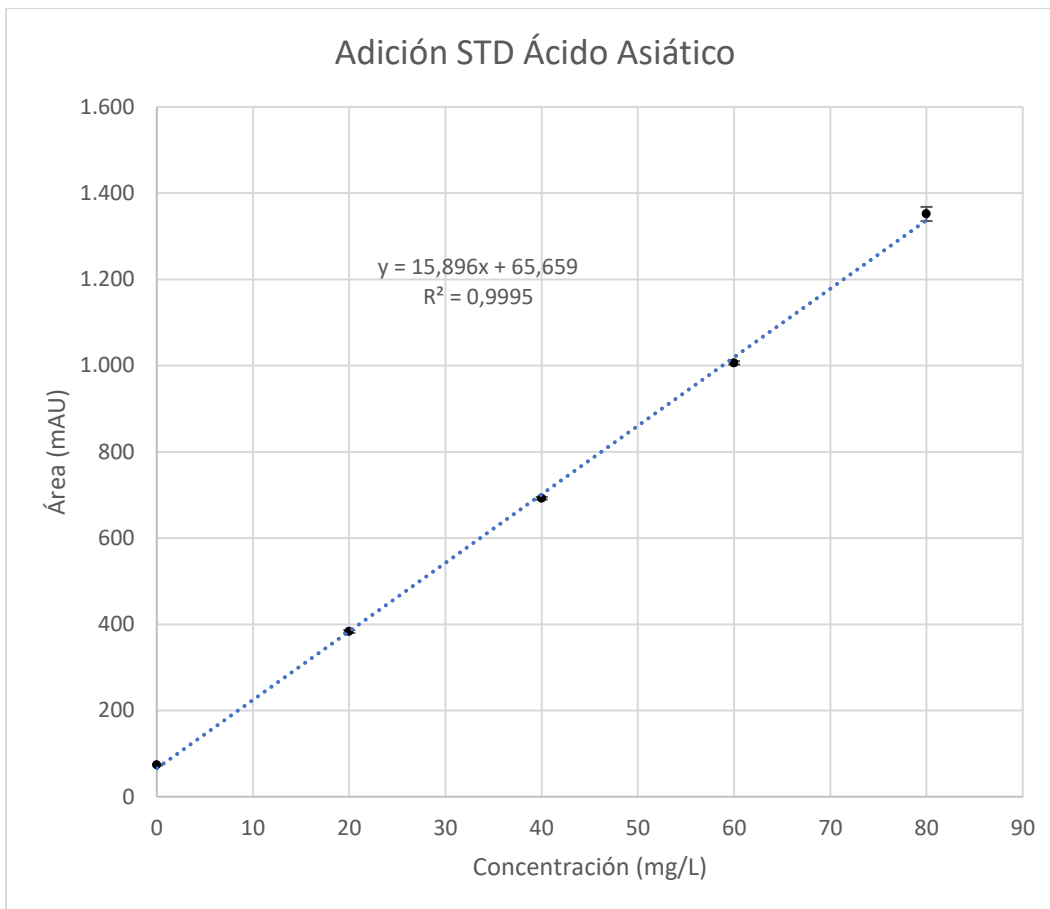


Figura 32. Gráfico de adición estándar de ácido asiático en el extracto HEX-N, con adición de triterpenos de 20 a 80 mg/L, determinados por HPLC-UV-VIS-DAD medidos a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1% y a un flujo de 0,8 mL/min.

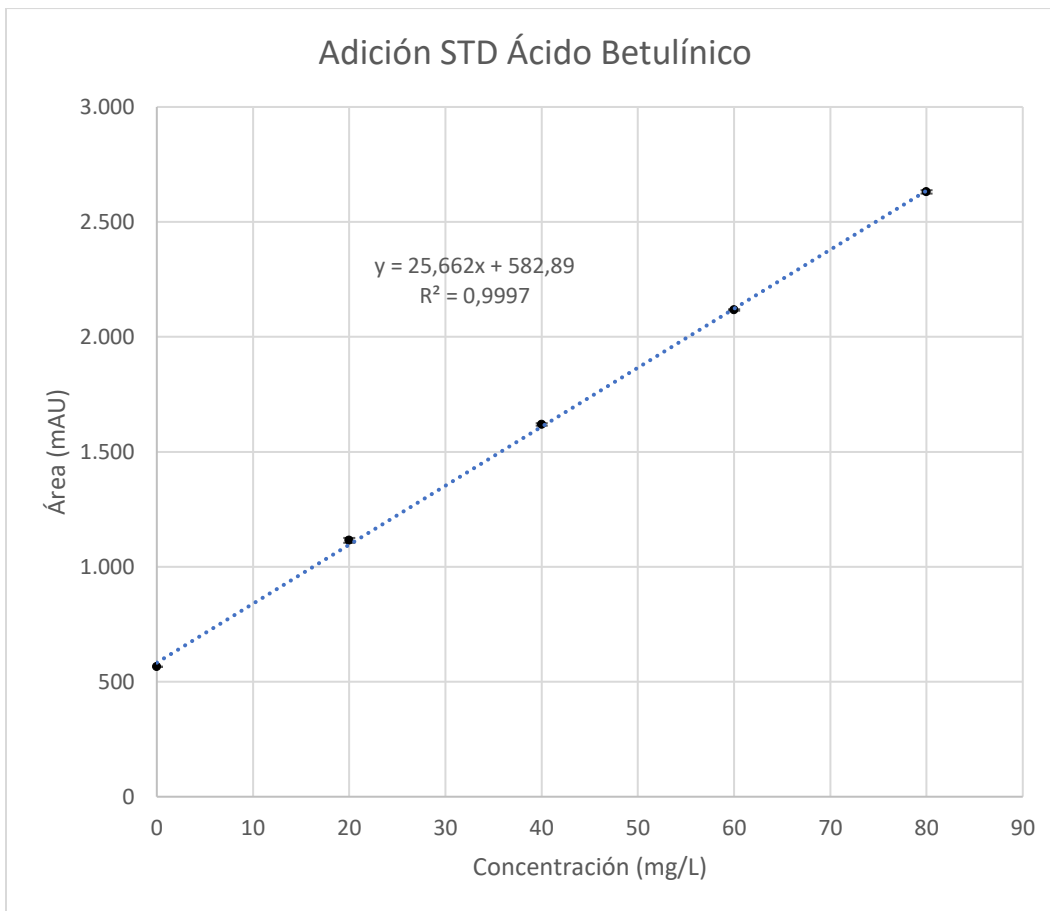


Figura 33. Gráfico de adición estándar de ácido betulínico en el extracto HEX-N, con adición de triterpenos de 20 a 80 mg/L, determinados por HPLC-UV-VIS-DAD medidos a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1% y a un flujo de 0,8 mL/min.

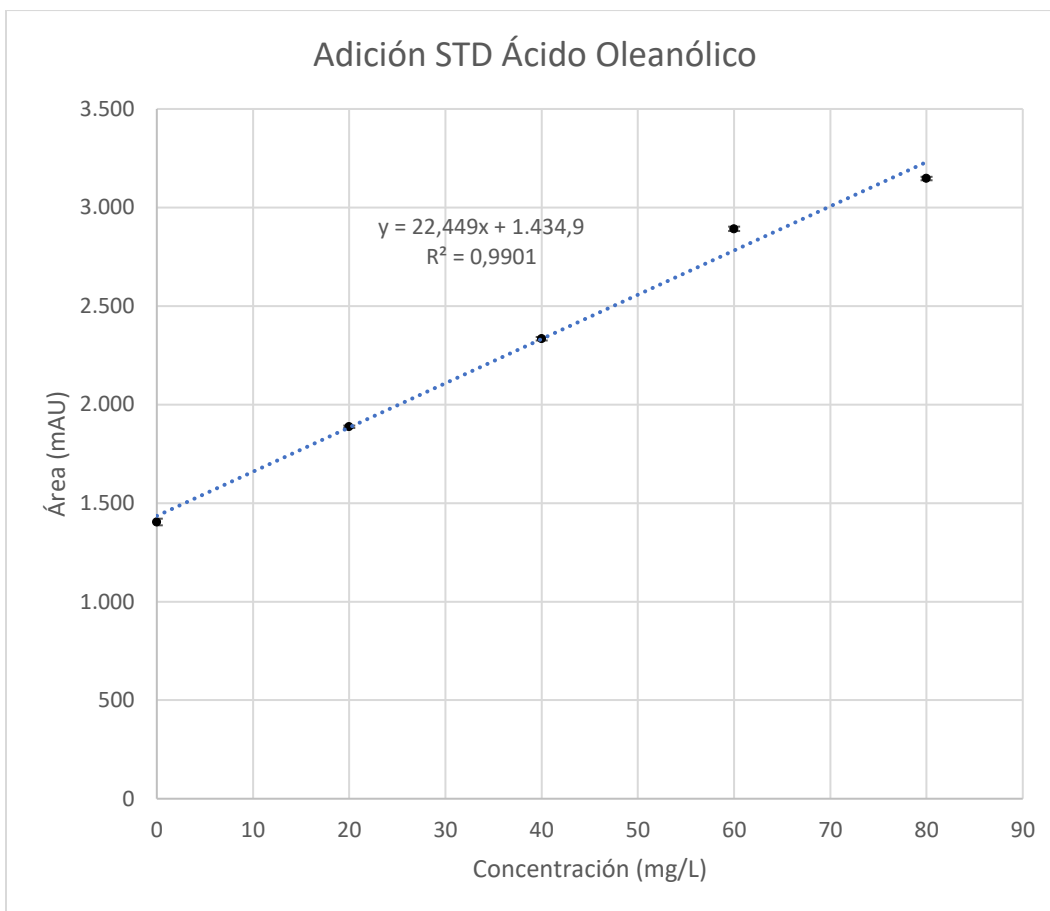


Figura 34. Gráfico de adición estándar de ácido oleanólico en el extracto HEX-N, con adición de triterpenos de 20 a 80 mg/L, determinados por HPLC-UV-VIS-DAD medidos a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1% y a un flujo de 0,8 mL/min.

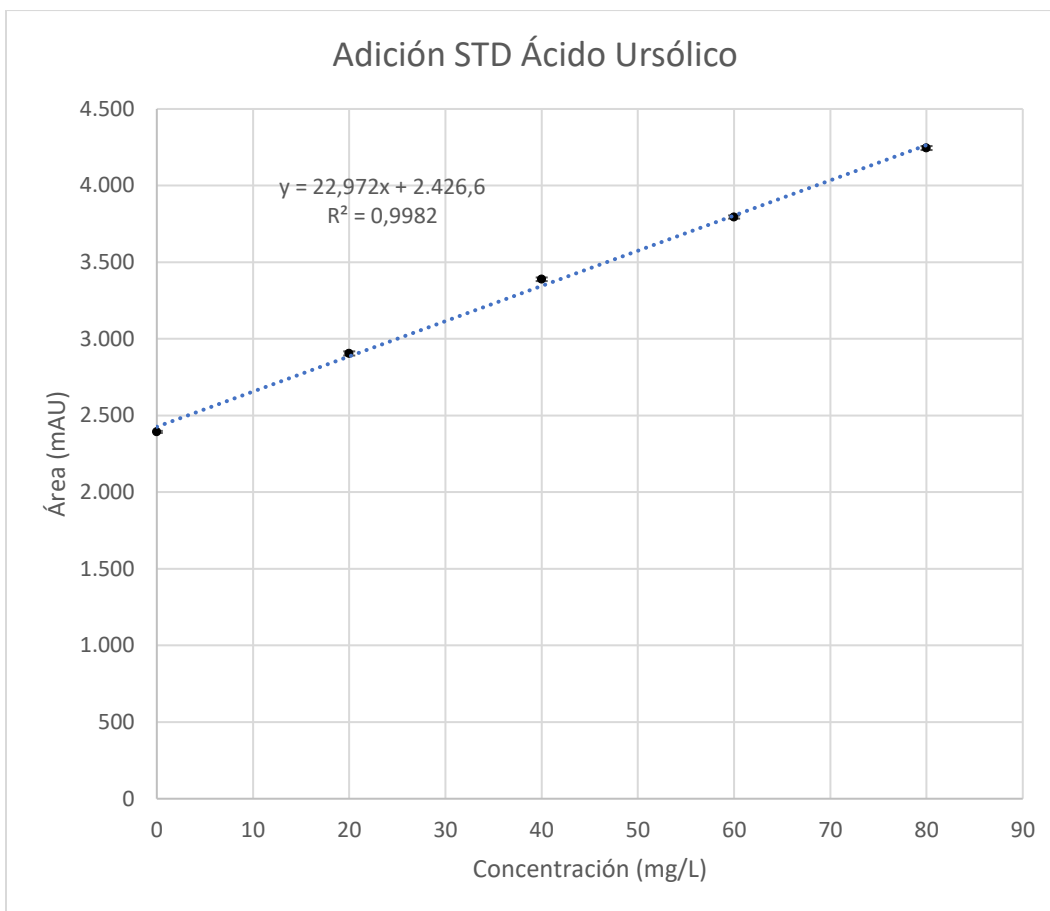


Figura 35. Gráfico de adición estándar de ácido ursólico en el extracto HEX-N, con adición de triterpenos de 20 a 80 mg/L, determinados por HPLC-UV-VIS-DAD medidos a 201 nm, con gradiente de fase móvil acetonitrilo/ác. acético 0,1% y a un flujo de 0,8 mL/min.

Finalmente se obtuvieron las ecuaciones de recta para cada triterpeno como se muestra en la tabla 10 de la Sección 6.4.7, con las que luego se pudo determinar la concentración original del triterpeno en el extracto.

6.4.7 Resultados Generales del Método de Adición Estándar

En la tabla 10 se resumen todas las ecuaciones de la recta que se obtuvieron con el método de adición estándar, para los 6 extractos analizados. Los gráficos obtenidos tuvieron una buena relación lineal, con un R^2 entre 0,9901 – 0,9999, lo que indica que el método fue adecuado para medir la concentración de triterpenos de los extractos de *Salvia hispanica* L. En un recuadro aparte se encuentran la adición estándar de los otros tres triterpenos.

Tabla 10. Ecuaciones de la recta que se obtuvieron con el método de adición estándar para extractos de hoja de *Salvia hispanica* L.

Extracto	Triterpeno	Ecuación de la recta	R^2
EtOH-B	Ác. Madecásico	Área = 14,418 * C – 13,829	0,9956
	Ác. Asiático	Área = 16,651 * C + 5,6244	0,9974
EtOH-N	Ác. Madecásico	Área = 16,276 * C + 101,65	0,9998
	Ác. Asiático	Área = 21,61 * C + 40,19	0,9999
DCM-B	Ác. Madecásico	Área = 19,832 * C + 1.395,2	0,9992
	Ác. Asiático	Área = 22,473 * C + 37,252	0,9998
DCM-N	Ác. Madecásico	Área = 17,879 * C + 2.065,4	0,9973
	Ác. Asiático	Área = 21,386 * C + 36,256	0,9996
HEX-B	Ác. Madecásico	Área = 19,716 * C + 866,52	0,9914
	Ác. Asiático	Área = 22,03 * C + 48,055	0,9991
HEX-N	Ác. Madecásico	Área = 14,758 * C + 1.048,1	0,9982
	Ác. Asiático	Área = 15,896 * C + 65,659	0,9995
HEX-N (*)	Ác. Betulínico	Área = 25,662 * C + 582,89	0,9997
	Ác. Oleanólico	Área = 22,449 * C + 1.434,9	0,9901
	Ác. Ursólico	Área = 22,972 * C + 2.426,6	0,9982

(*) Adición estándar a los triterpenos restantes (ácido betulínico, ácido oleanólico y ácido ursólico).

Las relaciones lineales resultantes son muy buenas ya que se trataba de muestras reales con una matriz muy compleja. Una vez que se obtuvieron las ecuaciones de recta se procedió a calcular la concentración de los cinco triterpenos en la inyección, tal como se muestra en la tabla 11, y posteriormente se calculó la concentración de ellos en el extracto. Se separa entre los extractos a los que se hizo adición estándar solo de ácido madecásico y ácido asiático, y la adición estándar de los otros 3 triterpenos, la cual solo se hizo en los extractos HEX-N.

Tabla 11. Concentración de triterpenos en mg/g de extractos de hoja de *Salvia hispanica* L. que se obtuvieron con el método de adición estándar.

Extracto	Triterpeno	Concentración interpolada	mg/g de extracto
EtOH-B	Ác. Madecásico	1,13 ± 0,06	0,113 ± 0,006
	Ác. Asiático	0,34 ± 0,07	0,034 ± 0,007
EtOH-N	Ác. Madecásico	6,2 ± 0,2	0,62 ± 0,02
	Ác. Asiático	1,86 ± 0,04	0,186 ± 0,004
DCM-B	Ác. Madecásico	70 ± 2	7,0 ± 0,2
	Ác. Asiático	1,66 ± 0,04	0,166 ± 0,004
DCM-N	Ác. Madecásico	116 ± 3	11,6 ± 0,3
	Ác. Asiático	1,7 ± 0,2	0,17 ± 0,02
HEX-B	Ác. Madecásico	44,0 ± 0,5	7,33 ± 0,08
	Ác. Asiático	2,23 ± 0,01	0,372 ± 0,002
HEX-N	Ác. Madecásico	71,0 ± 0,7	11,8 ± 0,1
	Ác. Asiático	4,27 ± 0,07	0,71 ± 0,01
HEX-N (*)	Ác. Betulínico	22,7 ± 0,2	3,79 ± 0,03
	Ác. Oleanólico	64 ± 1	10,7 ± 0,2
	Ác. Ursólico	105,6 ± 0,8	17,6 ± 0,1

(*) Adición estándar a los triterpenos restantes (ácido betulínico, ácido oleanólico y ácido ursólico).

Luego de obtenidas las concentraciones de los triterpenos por el método de adición estándar se procedió a comparar con los resultados obtenidos con la curva de calibración externa y se calculó el efecto matriz sobre estos compuestos en los extractos, como se muestra en la tabla 12. Tal como se puede apreciar en la tabla se divide aquellos extractos a los que solo se hizo adición estándar de ácido madecásico y ácido asiático, y en un recuadro a parte se tiene la adición estándar de los otros triterpenos (ácido betulínico, ácido oleanólico y ácido ursólico).

Tabla 12. Comparación de las concentraciones obtenidas con ambos métodos para los extractos de hoja de *Salvia hispanica* L.

Extracto	Triterpeno	Curva de Calibración externa (mg/g extracto)	Adición estándar (mg/g extracto)	Efecto matriz (%)
EtOH-B	Ác. Madecásico	0,163 ± 0,003	0,113 ± 0,006	30,7
	Ác. Asiático	0,102 ± 0,002	0,038 ± 0,003	62,7
EtOH-N	Ác. Madecásico	0,755 ± 0,007	0,62 ± 0,02	17,9
	Ác. Asiático	0,252 ± 0,003	0,186 ± 0,004	26,2
DCM-B	Ác. Madecásico	9,5 ± 0,1	7,0 ± 0,2	26,3
	Ác. Asiático	0,276 ± 0,002	0,166 ± 0,004	39,9
DCM-N	Ác. Madecásico	10,7 ± 0,3	11,6 ± 0,3	-8,4
	Ác. Asiático	0,273 ± 0,007	0,17 ± 0,02	37,7
HEX-B	Ác. Madecásico	8,98 ± 0,06	7,33 ± 0,08	18,4
	Ác. Asiático	0,78 ± 0,02	0,372 ± 0,002	52,3
HEX-N	Ác. Madecásico	11,58 ± 0,05	11,8 ± 0,1	-1,9
	Ác. Asiático	0,84 ± 0,01	0,71 ± 0,01	15,5
HEX-N (*)	Ác. Betulínico	7,7 ± 0,1	3,79 ± 0,03	50,8
	Ác. Oleanólico	11,3 ± 0,1	10,7 ± 0,2	5,3
	Ác. Ursólico	20,81 ± 0,05	17,6 ± 0,1	15,4

(*) Adición estándar a los triterpenos restantes (ácido betulínico, ácido oleanólico y ácido ursólico).

Como se puede observar en tabla 12 en la mayoría de los extractos la concentración de triterpenos obtenida con el método de adición fue menor, por lo que la diferencia entre las concentraciones obtenidas con los dos métodos corresponde al efecto ejercido por la matriz en la curva de calibración externa, esto debido a que en la curva de calibración externa solo se tenían los triterpenos con el solvente, sin embargo, en la muestra real se tienen una serie de compuestos que interfirieron con los resultados obtenidos. Al tratarse de una matriz muy compleja es normal que el porcentaje del efecto matriz fuera muy alto, en especial en aquellos triterpenos con concentraciones muy bajas con es el caso del ácido asiático, cuyos porcentajes de efecto matriz estuvieron en el rango de 15,5 – 62,7%. Otro caso para destacar fue para el ácido betulínico en el extracto HEX-N, cuyo efecto matriz fue de 50,9%, el porcentaje más alto entre los triterpenos de este extracto, sin embargo, como la mayoría de los extractos tienen una concentración muy baja de ácido betulínico, al punto de que están por debajo del límite de cuantificación de la curva de calibración externa, se decidió no hacer la adición estándar al resto de los extractos para este compuesto en particular. Por otro lado, tanto ácido oleanólico como ácido ursólico tienen muy poco efecto matriz, siendo de 5,3 y 15,4, respectivamente. Sin embargo, a pesar de tener una buena resolución en los cromatogramas obtenidos para estos compuestos en los extractos, de igual forma existe efecto matriz por ser muestras reales, independiente de la resolución cromatográfica.

De acuerdo con los resultados obtenidos por el método de adición estándar por cada triterpeno se pudo observar que ácido madecásico se encontró en mayor concentración en los extractos DCM-N y HEX-N, siendo en el extracto HEX-N el que presentó la mayor concentración. En cambio, ácido asiático se encontró en mayor cantidad en los extractos AE, y aproximadamente tres veces más en el extracto AE-B que en el extracto AE-N.

Por otro lado, al hacer la comparación entre los otros tres triterpenos restantes (ácido betulínico, ácido oleanólico y ácido ursólico) por el método de curva de calibración externa se pudo observar que estos tres triterpenos estuvieron en mayor

concentración en los extractos HEX, y de estos los que mostraron mayor concentración de los tres compuestos fue el extracto HEX-N, además, solo en los extractos HEX se pudo determinar la concentración de ácido betulínico. Por último, cabe destacar que específicamente el ácido ursólico en los extractos HEX-N es el que presentó la mayor concentración obtenida de todos los triterpenos, siendo esta de $20,81 \pm 0,05$ mg/gramo de extracto seco, esto se debe en gran medida a que estos triterpenos son compuestos de tipo apolares, tal como se puede observar en la tabla 13, donde se muestran los logaritmos de coeficientes de distribución de los compuestos, y se puede observar que en base a esto tenderán a extraerse más triterpenos con solventes apolares. En el caso del ácido madecásico y el ácido asiático, son compuestos de polaridad intermedia, por lo que tenderán a extraerse más con solventes que también tengan polaridad intermedia como diclorometano o acetato de etilo. En cambio, en un solvente muy polar como el etanol, se extrajo muy poca concentración de triterpenos.

Tabla 13. Coeficiente de reparto octanol/agua de los cinco triterpenos analizados [37, 38, 39, 40, 41].

Compuesto	Log K _{ow}
Ácido madecásico	4,4
Ácido asiático	5,7
Ácido betulínico	8,2
Ácido oleanólico	7,5
Ácido ursólico	7,3

6.5 Comparación de la Concentración de Triterpenos en Extractos de Hoja de *Salvia hispanica* L. con Otras Matrices Vegetales

Conocida la concentración de los triterpenos en todos los extractos, se graficaron estos resultados para comparar las concentraciones en los distintos extractos y en ambos fenotipos de planta tal como se muestra en las figuras de 36, 37, 38, 39 y 40.

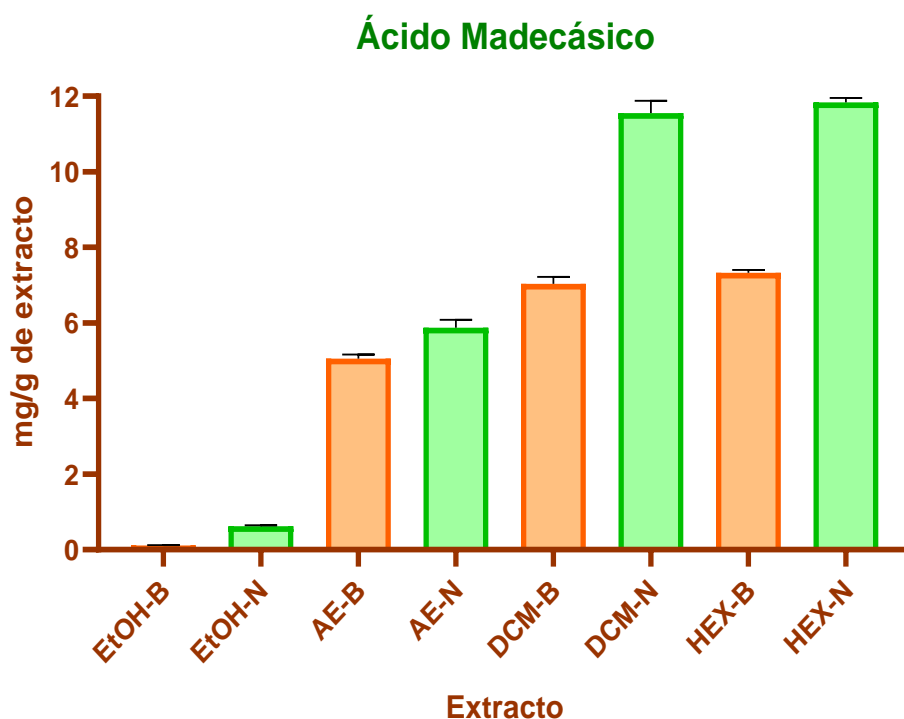


Figura 36. Concentración de ácido madecásico en los 8 extractos de hoja de *Salvia hispanica* L determinados mediante HPLC-UV-VIS-DAD a 201 nm.

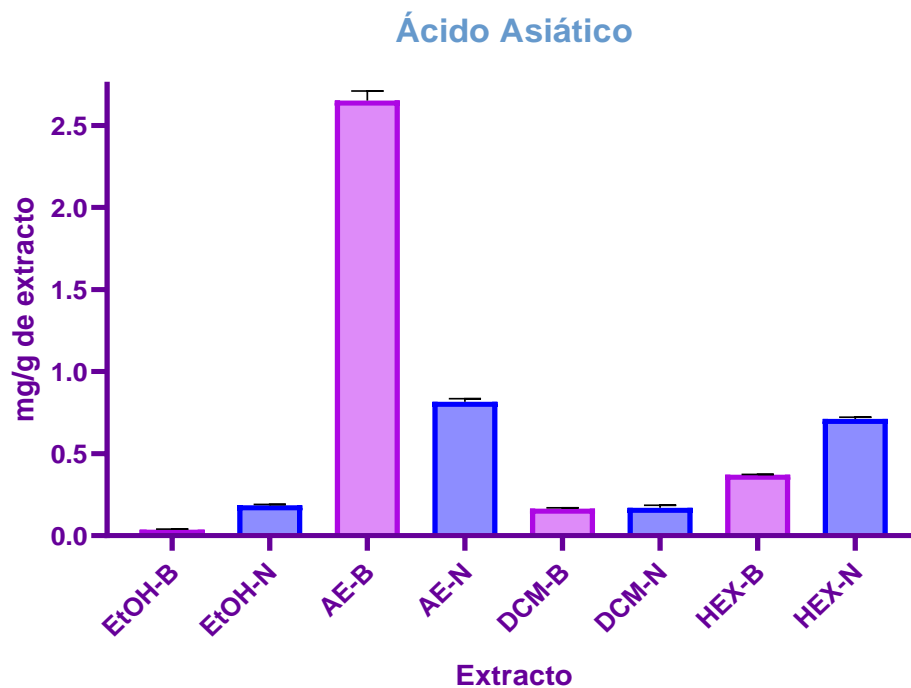


Figura 37. Concentración de ácido asiático en los extractos de hoja de *Salvia hispanica* L. determinados mediante HPLC-UV-VIS-DAD a 201 nm.

En la figura 36 se puede observar que la concentración de ácido madecásico fue ligeramente mayor en los extractos de hoja de fenotipo de semilla negra que en los extractos de fenotipo de semilla blanca, como se puede apreciar en los extractos EtOH-N, AE-N, DCM-N y HEX-N. Mientras que en la figura 37 se puede ver que esta tendencia continua para el ácido asiático, pero fue menos notoria y tiene una gran excepción, ya que el extracto AE-B fue el que tuvo la mayor concentración de ácido asiático entre todos los extractos.

Si se comparan los resultados obtenidos con lo reportado para otras matrices vegetales, se puede dar cuenta de la importancia de las concentraciones obtenidas, ya que como se dijo anteriormente, estos triterpenos tienen un gran potencial biológico beneficioso para los seres vivos, por lo que encontrar nuevas fuentes vegetales para extraer estos biocompuestos es muy importante.

La *Centella asiatica*, comúnmente llamada pegaga o gotu kola, es una planta originaria de India, pero que también crece espontáneamente en regiones

subtropicales de China, Malasia, Australia, América, Sudáfrica y Madagascar, y ha sido utilizada en la medicina tradicional asiática para el tratamiento de enfermedades como asma, úlceras, lupus y lepra, entre otros. Además, se ha registrado que tiene propiedades antidepresivas, antioxidativas, antibacterianas, antifúngicas y anticancerígenas, entre otras, cuyos atributos se ha especulado que se debe a su alto contenido triterpénico. Dentro de su perfil bioquímico cuenta con un gran porcentaje de ácido asiático y ácido madecásico, por lo que numerosos trabajos han optimizado la separación y cuantificación de estos compuestos [42, 43, 44, 45]. Las concentraciones más altas de ácido madecásico y ácido asiático obtenidas en este trabajo para la *Salvia hispanica* L. corresponden a $11,8 \pm 0,1$ mg/g de extracto seco en los extractos HEX-N, y $2,65 \pm 0,06$ mg/g de extracto seco en los extractos AE-B, respectivamente. En el trabajo de Hashim et. al. [43] se determinó el contenido de triterpenos en extractos de hoja *centella asiatica* a través del método HPLC-PAD, obteniendo concentraciones mucho mayores para ácido madecásico y ácido asiático que en este trabajo, específicamente obtuvieron 550 mg/g de extracto seco para cada uno de estos triterpenos, siendo más de 46 veces mayor que la cantidad de ácido madecásico encontrada en los extractos HEX-N, y más de 207 veces mayor que la concentración de ácido asiático encontrada en los extractos AE-B de este trabajo.

Sin embargo, Wang et. al. [45] realizaron por primera vez la cuantificación simultánea de ácido asiático y ácido madecásico. En este trabajo los resultados que obtuvieron para ácido madecásico y ácido asiático estaban en el rango de $1,75 \pm 0,06$ mg/g y $1,66 \pm 0,07$ mg/g, respectivamente para la especie comercial de *C. asiatica* Shaanxi, esto equivale a que la concentración de ácido madecásico fue más de 6 veces menor que la nuestra, y la concentración de ácido asiático fue 1,5 veces menor que la encontrada en nuestros extractos; por otro lado, en el mismo trabajo se encontró que la *C. asiatica* Yunnan tenía $3,67 \pm 0,09$ mg/g y $3,53 \pm 0,11$ mg/g de ácido madecásico y ácido asiático, respectivamente. En este caso la concentración de ácido madecásico fue más de 3 veces menor que la encontrada en nuestros extractos, pero la concentración de ácido asiático fue 1,3 veces mayor que la concentración de ácido asiático encontrada en los extractos de hoja de chía.

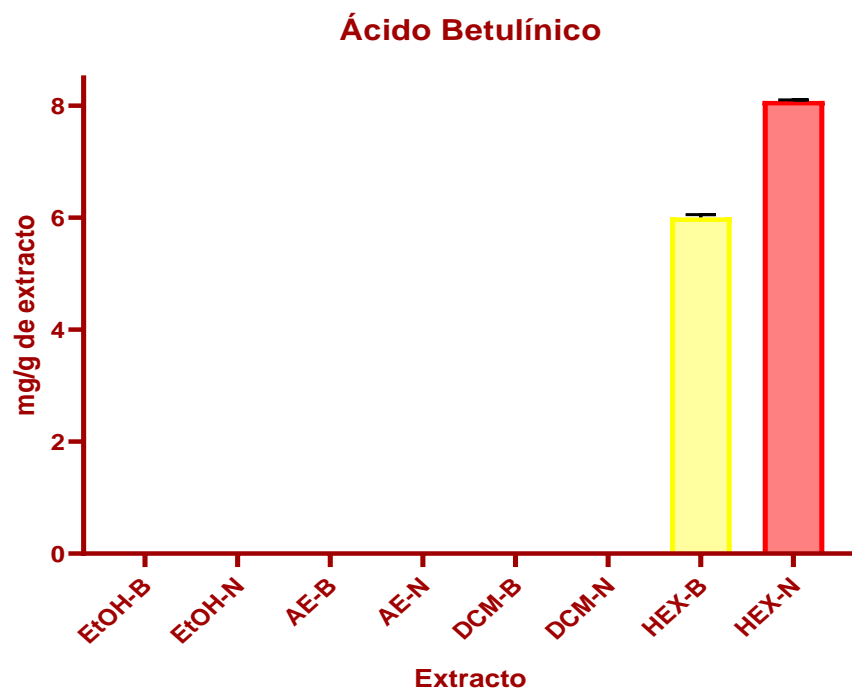


Figura 38. Concentración de ácido betulínico en los extractos de hoja de *Salvia hispanica* L. determinados mediante HPLC-UV-VIS-DAD a 201 nm.

En cuanto al ácido betulínico, en este trabajo la mayor concentración obtenida fue en el extracto HEX-N, tal como se puede ver en la figura 38, que corresponde a $7,7 \pm 0,1$ mg/g, seguido de su contraparte el extracto HEX-B con $6,01 \pm 0,05$ mg/g. Sin embargo, se puede apreciar que, en los extractos con los otros solventes, estos compuestos están por debajo del límite de detección.

En literatura se ha encontrado que la mayor concentración de ácido betulínico se encuentra en la corteza de las plantas, como en la *Betula pendula* o en la *Doliocarpus schottianus*, esta última fue investigada en el trabajo de Oliveira et. al [46], ya que es una planta mayormente encontrada en el bosque atlántico de Brasil y es utilizada en la medicina folclórica de la zona para el tratamiento de la diabetes mellitus, la hipertensión y enfermedades oculares. En el trabajo se realizaron extractos con acetato de etilo encontrándose concentración de ácido betulínico en distintas partes de la planta; en la corteza $20,6 \pm 1,0$ mg/g, en la madera $0,53 \pm 0,03$ mg/g, en cambio en los extractos de las hojas se encontró una concentración de

0,16 ± 0,01 mg/g, siendo 48 veces menos que las concentraciones encontradas en los extractos de hexano para ambos fenotipos (HEX-N y HEX-B).

Por otra parte, en el trabajo de Kontogianni et. al. [47] se realizó la caracterización fitoquímica de extractos de *Rosmarinus officinalis* y *Salvia officinalis* usando el método HPLC-DAD-ESI-MS. Se sabe que ambas plantas pertenecen a la familia de las Lamiaceae al igual que la *Salvia hispanica* L., y ambas son plantas ampliamente conocidas ya que sus hojas se utilizan en infusiones populares y se hacen aceites esenciales de ellas. Ambas plantas son ricas en di- y triterpenos, ácido fenólicos y flavonoides, siendo el ácido carnosico, carnosol y el ácido rosmarínico. Para hacer el estudio de sus partes aéreas se hizo una extracción con acetato de etilo obteniendo una concentración de ácido betulínico en extractos de *Rosmarinus officinalis* de 34,8 ± 6,7 mg/g de extracto seco, la cual fue una concentración 4,5 veces más que la obtenida en este trabajo, sin embargo, en los extractos de *Salvia officinalis* no se logró detectar la presencia de ácido betulínico, a diferencia de este trabajo donde en los extractos HEX-B y HEX-N si se pudo determinar la concentración de ácido betulínico.

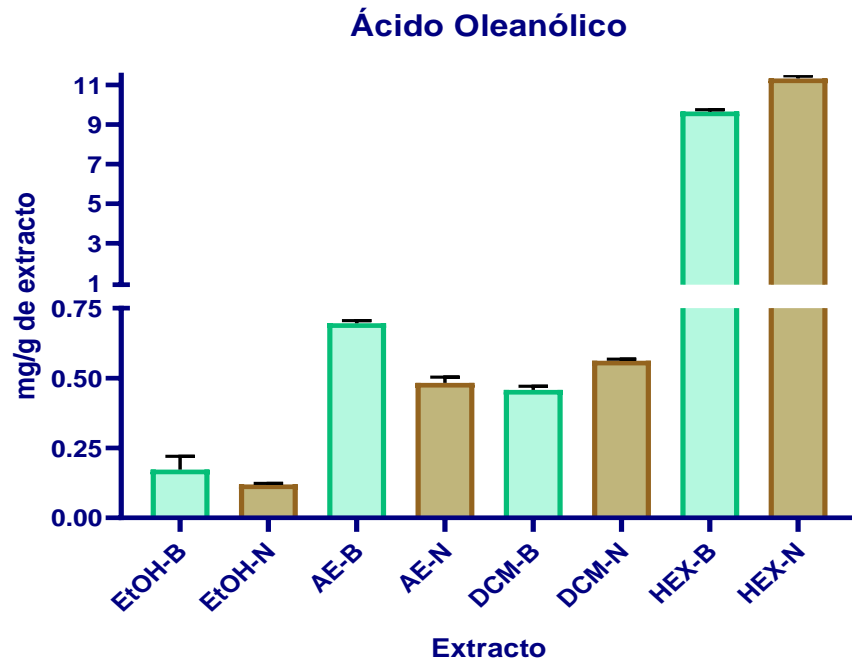


Figura 39. Concentración de ácido oleanólico en los extractos de hoja de *Salvia hispanica* L. determinados mediante HPLC-UV-VIS-DAD a 201 nm

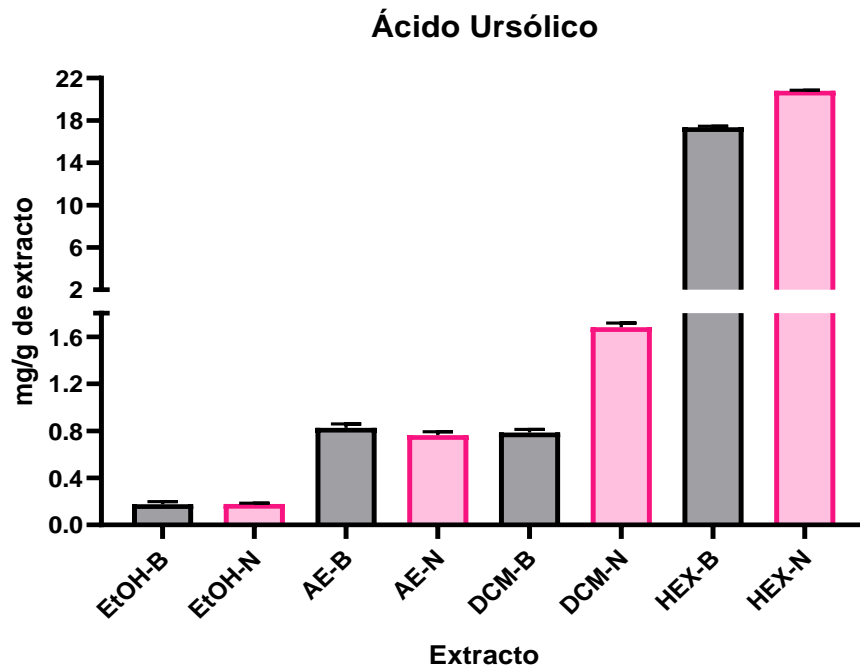


Figura 40. Concentración de ácido ursólico en los extractos de hoja de *Salvia hispanica* L. determinados mediante HPLC-UV-VIS-DAD a 201 nm

En las figuras 39 y 40 los gráficos se dividieron en dos segmentos para poder apreciar en la misma gráfica las diferentes concentraciones a pesar de las diferencias que presentan los extractos con hexano.

En general, se ha reportado que estos compuestos se encuentran ampliamente en cascaras de frutas, hojas y en la corteza de los tallos de las plantas, en especial en las que pertenecen a la familia de las Lamiaceae, se suelen encontrar juntos y en altas concentraciones con respecto a otros triterpenos. Existen múltiples trabajos que caracterizan fitoquímicamente una amplia variedad de frutas y plantas, en las que se pueden encontrar ácido oleanólico y ácido ursólico, como es del estudio reportado por Jager et. al. [48] en el cual se determina el contenido de triterpenos de 39 plantas y materiales vegetales a través de cromatografía gaseosa con detector FID, y el trabajo de análisis de contenido de triterpenos de Caligiani et. al. [49] que mediante el uso de GC-MS analiza 38 extractos de plantas comerciales que son vendidos como ingredientes para suplementos dietéticos. En la tabla 14 se resumen algunos de los resultados obtenidos en ambos trabajos.

Tabla 14. Contenido de triterpenos en materiales vegetales [48, 49]

Nombre científico	Nombre común	Parte de la planta	Concentración ácida oleanólico (mg/g)	Concentración ácido ursólico (mg/g)
<i>Arctostaphylos uva-ursi</i>	Bearberry	Hojas	2,7	12,4
<i>Coffea arabica</i>	Café	Hojas	Det	18,0
<i>Eucalyptus</i>	Eucalipto	Hojas	3,1	11,7
<i>Lavandula angustifolia</i>	Lavanda	Hojas	4,5	15,9

<i>Lavandula angustifolia</i>	Lavanda	Flores	4,0	10,5
<i>Malus domestica</i>	Manzana	Pulpa	1,6	8,0
<i>Melissa officinalis</i>	Toronjil	Hojas	3,7	12,7
<i>Olea europeae</i>	Oliva	Hojas	31,0	1,8
<i>Olea europeae</i>	Oliva	Corteza	9,8	Det
<i>Origanum vulgare</i>	Orégano	Hojas	Det	2,8
<i>Rosmarinus officinalis</i>	Romero	Hojas	12,3	29,5
<i>Salvia officinalis</i>	Sage	Hojas	6,7	18,0
<i>Arctostaphylos uva-ursi</i>	Bearberry	Fruta	0,488	1,034
<i>Crataegus monogyna</i>	Majuelo	Flores	2,339	4,165
<i>Lagerstroemia speciosa</i>	Orgullo de la India	Hojas	0,824	2,108
<i>Vaccinium vitis-idaea</i>	Arándano rojo	Fruto	2,147	6,763
<i>Vaccinium vitis-idaea</i>	Arándano rojo	Hojas	1,386	3,048

Det = Compuesto detectado, pero no cuantificado.

Como se observa en la tabla 14, en general, en las plantas suele haber mayor contenido de ácido ursólico que de ácido oleanólico, con algunas excepciones como lo es el caso de la *Olea europea* tanto en hojas como en la corteza se detecta la presencia de ácido ursólico, pero no es cuantificable.

De las figuras 39 y 40 se desprende que la concentración más alta de ácido oleanólico y ácido ursólico se encontró en los extractos HEX-N siendo de $11,3 \pm 0,1$ mg/g para ácido oleanólico y de $20,81 \pm 0,05$ mg/g para ácido ursólico, casi el doble que la concentración de ácido oleanólico. Siendo estas concentraciones más altas que la mayoría de los materiales vegetales expuestos en la tabla 14, como el arándano rojo o la lavanda, la única excepción fue el contenido triterpénico de *Rosmarinum officinalis*, que tiene concentraciones de 12,3 mg/g para ácido oleanólico y 29,5 mg/g para ácido ursólico, siendo en el caso del ácido oleanólico el mismo rango de concentración, y en el caso del ácido ursólico apenas es 1,4 veces mayor que la concentración encontrada en los extractos de *Salvia hispanica* L.

Por lo cual, los extractos estudiados están dentro de los rangos de concentración de los cinco triterpenos de interés, en comparación con otras especies vegetales, siendo los extractos estudiados prometedores en la actividad biológica.

6.6 Ensayo Antiparasitario de los Extractos de Hoja de *Salvia hispanica* L.

Luego de que fue determinada la concentración de triterpenos en los extractos de hoja de *Salvia hispanica* L. tanto por curva de calibración externa como por el método de adición estándar, se procedió a determinar la actividad tripanocida de dichos extractos, para ello se realizó el ensayo antiparasitario descrito en la Sección 5.3.4, a una concentración de 200 mg/L de extracto, tomada de las soluciones madres de la tabla 4 (sección 5.3.3). Tal como se describió en la metodología, se midió la absorbancia de las soluciones con parásito a 570 nm, para luego utilizar la ecuación 3 para obtener los datos que fueron graficados. Los datos obtenidos se encuentran en la tabla 36 del anexo 3.

Los resultados se graficaron en función del % de capacidad tripanocida los extractos de hoja de *Salvia hispanica* L, como se muestra en la figura 41.

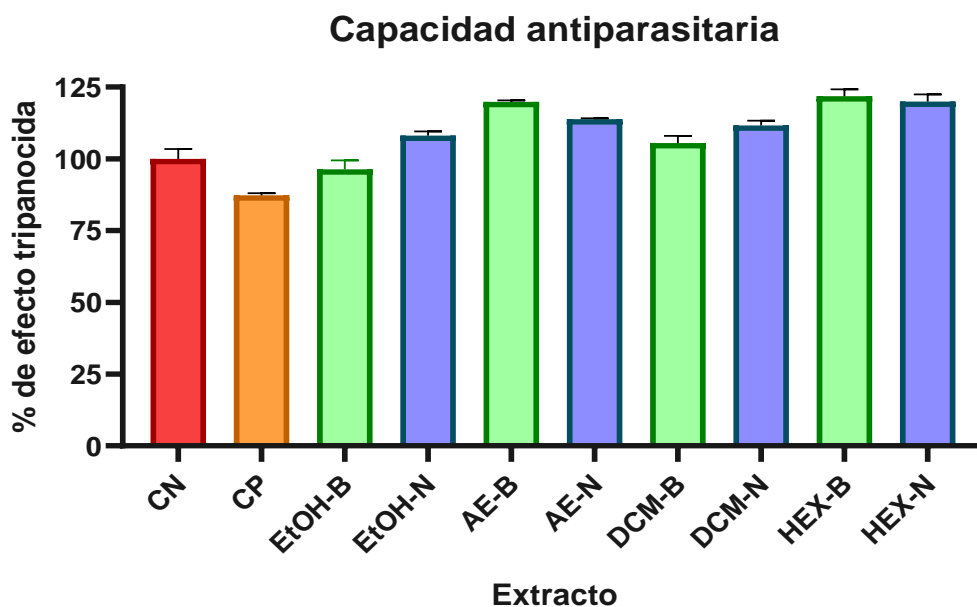


Figura 41. Gráfico de capacidad antiparasitaria de los extractos de hoja de *Salvia hispanica* L. a 200 mg/L de DMSO, en un volumen de 10.000.000 parásitos/mL. Siendo CN: Control Negativo (sólo parásitos); CP: Control Positivo a 20 mg/L (Benznidazol)

En el ensayo antiparasitario de los extractos de hoja de *Salvia hispanica* L. se puede observar en la figura 41, que los extractos no tuvieron una actividad antiparasitaria superior, comparada con el control positivo correspondiente a benznidazol, actual medicamento comercializado para el tratamiento de la enfermedad de chagas. En algunos casos incluso se obtuvo un valor mayor al 100% (que corresponde a la cantidad de parásitos vivos), estos resultados pueden tener relación a que los extractos no eran completamente solubles en el solvente DMSO, por lo que se tuvo que filtrar la solución y algunas partículas sólidas en suspensión pudiesen alterar la absorbancia y con esto sobre expresar el resultado obtenido.

A pesar de este resultado, de la investigación bibliográfica realizada en un inicio se sabía que los triterpenos contenidos en los extractos de *Salvia hispánica* L. como ácido betulínico, ácido oleanólico y ácido ursólico si tienen actividad tripanocida. Por ejemplo, en el trabajo de Saeidnia et. al. [24] de demostró que el ácido ursólico y el ácido oleanólico tenían actividad tripanocida a una concentración de 6,2 μ M. También en el trabajo de Silva Ferreira et. al. [28] se encontró que en ensayos *in vitro* el ácido ursólico mata un 77% de tripomastigotes a 128 μ M, y en general, en varios trabajos científicos antiparasitarios de otras matrices vegetales se ha encontrado que el ácido ursólico, siendo el compuesto mayoritario en el extracto vegetal, tiene actividad antiparasitaria, como ocurre en los extractos metanólicos de hoja de *Rosmarinus officinalis* [29], o en extractos de *Miconia fallax* DC [30], entre otros. Sin embargo, en el presente trabajo el único extracto que demostró tener un mínimo de capacidad antiparasitaria fue el extracto EtOH-B, y como el extracto demostró tener poca concentración de triterpenos, no se puede asociar este resultado con los compuestos analizados.

Como no se obtuvo el resultado esperado con los extractos se procedió a medir la actividad antiparasitaria de los estándares de triterpenos, para esto se realizó el mismo procedimiento que con los extractos, de esta forma se determinó si por si solos estos compuestos tenían actividad antiparasitaria. Para esto se midió la actividad antiparasitaria a dos concentraciones 20 y 200 mg/L para cada triterpeno, haciendo diluciones de las soluciones madres de los triterpenos expuestos en la

tabla 5 de la metodología (Sección 5. 3. 4) Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 37 del anexo 3. En la figura 42 se muestra la actividad antiparasitaria de los triterpenos a 20 y 200 mg/L en función del % de efecto tripanocida versus los estándares.

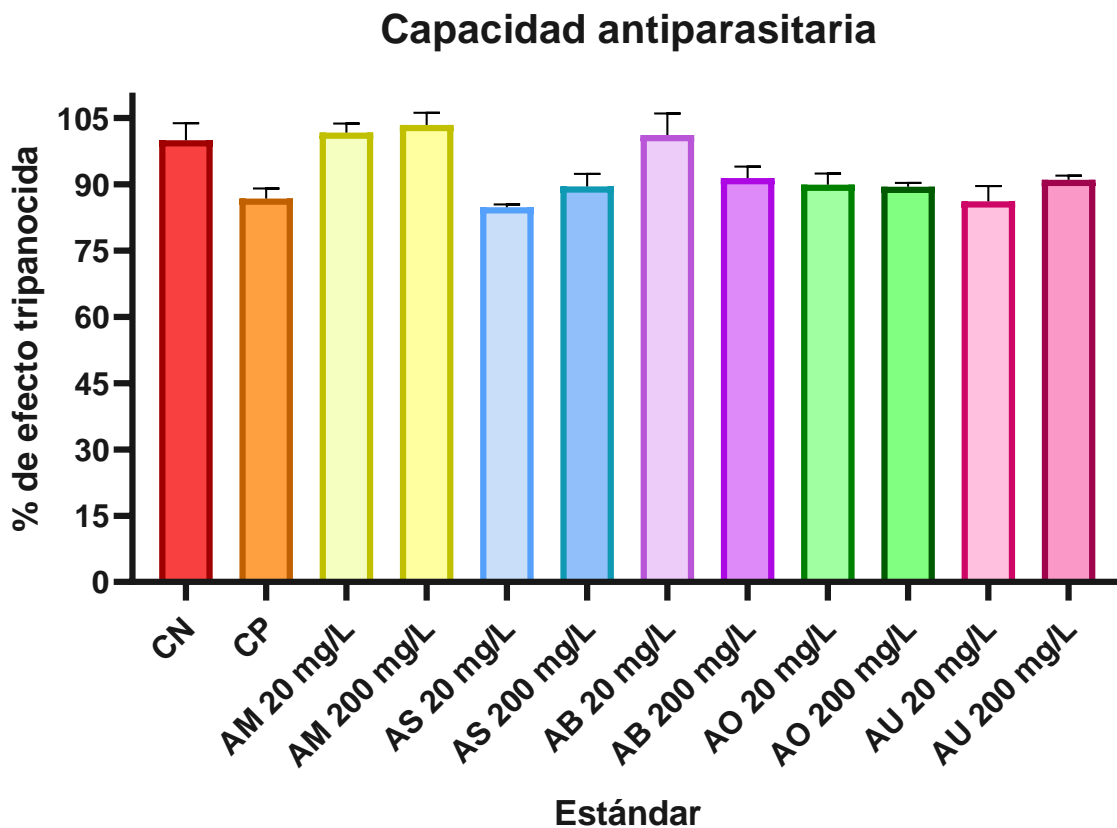


Figura 42. Gráfico de actividad antiparasitaria de los estándares de triterpenos a 20 y 200 mg/L de DMSO, en un volumen de 10.000.000 parásitos/mL. Siendo CN: Control Negativo (solo parásitos); CP: Control Positivo (Benznidazol); AM: Ácido madecásico; AS: Ácido asiático; AB: Ácido betulínico; AO: Ácido oleanólico; AU: Ácido ursólico.

Al medir la capacidad antiparasitaria de los estándares por sí solos se puede apreciar en la figura 42 que varios de ellos si actúan como antiparasitarios al mismo nivel que el benznidazol, que es un compuesto que se usa actualmente para tratar los tripomastigotes, por ejemplo, el ácido asiático mostró actividad en sus dos concentraciones medidas, lo cual era un resultado inesperado debido a que no se tiene evidenciado en literatura que sea un compuesto antiparasitario. Por otra parte, el ácido betulínico solo mostró actividad antiparasitaria a concentración alta, y el ácido oleanólico y el ácido ursólico, al igual que el ácido asiático, mostró actividad antiparasitaria en sus concentraciones medidas, lo cual era un resultado predecible por los datos reportados en literatura que demuestran su potencial antiparasitario, sin embargo, en literatura se suele encontrar que el ácido ursólico tiene mayor efecto antiparasitario que el ácido oleanólico, lo cual en este trabajo no ocurrió así, ambos tienen casi el mismo % de efecto tripanocida, incluso siendo el ácido oleanólico un poco más efectivo que el ácido ursólico. De los cinco triterpenos analizados en este trabajo fue el que tuvo la mejor capacidad tripanocida a una concentración de 20 mg/L, siendo esta aproximadamente del $84,8 \pm 0,6$ %, mejor que el 87 ± 2 % del benznidazol.

La diferencia entre la actividad antiparasitaria observada en los extractos y en los estándares se debió que la concentración de triterpenos en los extractos a 200 mg/L fue mucho menor a la concentración de los estándares testeados individualmente, ya que se sabe que en los extractos la concentración de triterpenos es del orden de los mg/g de extracto, por lo que en los 200 mg/L de extractos en realidad están las concentraciones de triterpenos que se encuentran en la tabla 15, las cuales fueron calculadas en base a las concentraciones de triterpenos medidas por la curva de calibración externa.

Tabla 15. Concentración de triterpenos en los extractos utilizados en el ensayo antiparasitario.

Extracto	Triterpeno	Concentración de triterpeno en 200 mg/L de extracto (mg/L)
EtOH-B	Ác. madecásico	0,0325 ± 0,0005
	Ác. asiático	0,0204 ± 0,0004
	Ác. betulínico	N/D
	Ác. oleanólico	0,03 ± 0,01
	Ác. ursólico	0,035 ± 0,005
EtOH-N	Ác. madecásico	0,151 ± 0,001
	Ác. asiático	0,0505 ± 0,0005
	Ác. betulínico	N/D
	Ác. oleanólico	0,0240 ± 0,0007
	Ác. ursólico	0,036 ± 0,001
AE-B	Ác. madecásico	1,01 ± 0,02
	Ác. asiático	0,53 ± 0,01
	Ác. betulínico	N/D
	Ác. oleanólico	0,139 ± 0,002
	Ác. ursólico	0,165 ± 0,007
AE-N	Ác. madecásico	1,18 ± 0,04
	Ác. asiático	0,163 ± 0,004
	Ác. betulínico	N/D
	Ác. oleanólico	0,097 ± 0,004
	Ác. ursólico	0,153 ± 0,006
DCM-B	Ác. madecásico	1,89 ± 0,02
	Ác. asiático	0,0552 ± 0,0004
	Ác. betulínico	N/D
	Ác. oleanólico	0,092 ± 0,003
	Ác. ursólico	0,157 ± 0,005
DCM-N	Ác. madecásico	2,13 ± 0,07

	Ác. asiático	0,055 ± 0,001
	Ác. betulínico	N/D
	Ác. oleanólico	0,112 ± 0,001
	Ác. ursólico	0,336 ± 0,007
HEX-B	Ác. madecásico	1,80 ± 0,01
	Ác. asiático	0,157 ± 0,004
	Ác. betulínico	1,20 ± 0,01
	Ác. oleanólico	1,93 ± 0,02
	Ác. ursólico	3,52 ± 0,09
HEX-N	Ác. madecásico	2,32 ± 0,01
	Ác. asiático	0,167 ± 0,003
	Ác. betulínico	1,618 ± 0,003
	Ác. oleanólico	2,27 ± 0,03
	Ác. ursólico	4,16 ± 0,01

N/D: Compuesto por debajo del límite de detección.

Como se puede observar en la tabla 15, las concentraciones de triterpenos se encuentran entre los $0,0204 \pm 0,0004$ mg/L (ácido asiático en el extracto EtOH-B), hasta los $4,16 \pm 0,01$ mg/L (ácido ursólico en el extracto HEX-N), por lo que la concentración es demasiado menor como para tener un gran impacto en el resultado de la actividad antiparasitaria, a pesar de que se sabe que estos compuestos puros tienen actividad antiparasitaria.

6.7 Ensayo de Citotoxicidad de los Extractos de Hoja de *Salvia hispanica* L.

Paralelamente al ensayo antiparasitario de los extractos de hoja de *Salvia hispanica* L., se determinó la citotoxicidad de los ocho extractos, para lograr esto se utilizó el mismo ensayo de MTT descrito en la Sección 5. 3. 3, pero con la diferencia de que se evaluó la cantidad de células VERO que quedaron vivas después de 4 horas de agregados los extractos.

Se utilizaron las mismas soluciones madres hechas para el ensayo antiparasitario (sección 5. 3. 4), pero se midió solo a 200 mg/L, la cual es una concentración lo suficientemente alta para determinar si a dicha concentración los extractos provocan la antiproliferación de las células. Los datos obtenidos se encuentran en la tabla 38 del anexo 3. Se graficaron en función del % de células vivas que quedaron en las soluciones de extractos de hoja de *Salvia hispanica* L. luego de pasadas las 4 horas del ensayo MTT, como se muestra en la figura 43.

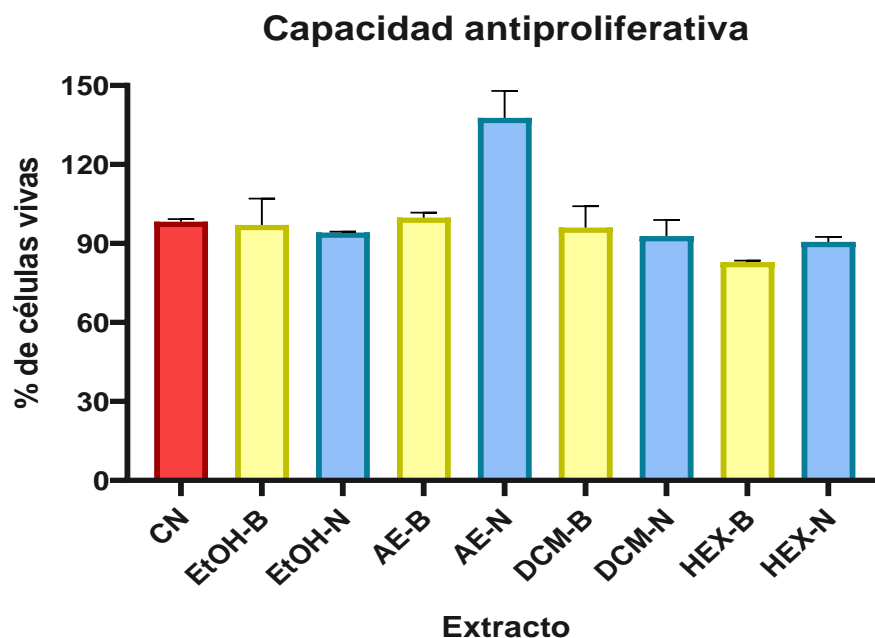


Figura 43. Gráfico de actividad antiproliferativa de los extractos de hoja de *Salvia hispanica* L. medida a 200 mg/L.

Por lo que se puede observar en la figura 43 los extractos de hoja de *Salvia hispanica* L. la concentración medida (200 mg/L) se presentó una baja citotoxicidad a las células VERO, y de estos los que tienen la mayor citotoxicidad fueron los extractos HEX-B y HEX-N, siendo esta de $82,9 \pm 0,6 \%$ y $91 \pm 2 \%$, respectivamente. Se podría inferir que como estos extractos tuvieron la mayor concentración de triterpenos la citotoxicidad se debe a ellos, pero de ser así el extracto más tóxico sería el extracto HEX-N y no el extracto HEX-B, pero por ser matrices muy complejas, deben existir otros compuestos que contribuyen con la citotoxicidad. A pesar de ello se podría confirmar que los extractos no son tóxicos, importante resultado si se quisiera realizar otros ensayos biológicos en futuras investigaciones. Otro caso muy destacable es el del compuesto AE-N el cual tuvo un porcentaje de células vivas mayor a la inicial, lo cual no es preocupante debido a que las células son organismos vivos que se multiplican, por lo que incluso se tendería a pensar que este extracto puede contener algún compuesto que estimule la multiplicación de las células.

El hecho de que los extractos tengan una baja citotoxicidad es una buena característica de los extractos, ya que esto indica que los compuestos contenidos en dichos extractos no matan a las células VERO, por lo que podrían eventualmente usarse para ensayos biológicos *in vivo* de capacidad antifúngica, antibacteriana e incluso antiparasitaria para otros parásitos, ya que para que un extracto sea considerado para la fabricación de fármacos debe actuar matando al hongo, bacteria o parásito infectivo, pero no afectar a las células sanas del cuerpo. Por lo que, a pesar de que los extractos de *Salvia hispanica* L. no mostraron capacidad antiparasitaria para tripomastogotes de *T. cruzi*, se podría explorar a futuro otras aplicaciones biológicas.

7 CONCLUSIONES

La metodología propuesta por la técnica de HPLC-UV-VIS-DAD fue adecuada para la identificación y cuantificación de los cinco triterpenos simultáneamente (ácido madecásico, ácido asiático, ácido betulínico, ácido oleanólico y ácido ursólico) en los extractos de hoja de *Salvia hispanica* L.

Hasta ahora se logró identificar y cuantificar los cinco triterpenos a través de dos métodos distintos: curva de calibración externa y adición de estándar. Ambos métodos fueron efectivos para su cuantificación, donde el método de adición estándar minimiza el efecto matriz de los resultados.

Además, se realizaron ensayos antiparasitarios y citotóxicos, en los extractos de hoja de *Salvia hispanica* L., sin embargo, el ensayo antiparasitario fue efectivo para los estándares y no para los extractos.

En cambio, los resultados de citotoxicidad fueron alentadores para realizar futuras investigaciones en otros ensayos biológicos a los extractos de *Salvia hispanica* L.

8 BIBLIOGRAFÍA

- [1] V. T. Šaponjac, J. Čanadanović-Brunet, G. Četković, and S. Djilas, "Detection of Bioactive Compounds in Plants and Food Products BT - Emerging and Traditional Technologies for Safe, Healthy and Quality Food," V. Nedović, P. Raspor, J. Lević, V. Tumbas Šaponjac, and G. v Barbosa-Cánovas, Eds. Cham: Springer International Publishing, 2016, pp. 81–109. doi: 10.1007/978-3-319-24040-4_6.
- [2] J. J. Centelles and S. Imperial, "Paclitaxel. Descubrimiento, propiedades y uso clínico," *Offarm*, vol. 29, no. 4, pp. 68–75, 2010, [Online]. Available: <https://www.elsevier.es/revista-offarm-4-articulo-paclitaxel-descubrimiento-propiedades-uso-clinico-X0212047X10540737>
- [3] C. Palma-Rojas, C. Gonzalez, B. Carrasco, H. Silva, and H. Silva-Robledo, "Genetic, cytological and molecular characterization of chia (*Salvia hispanica* L.) provenances," *Biochem Syst Ecol*, vol. 73, pp. 16–21, 2017, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bse.2017.05.003>.
- [4] Colaboradores de iNaturalist, "Observaciones de grado de investigación de iNaturalist. iNaturalist.org. Conjunto de datos de ocurrencia <https://doi.org/10.15468/ab3s5x> accedido a través de GBIF.org el 2023-01-15.," *iNaturalist*, Oct. 26, 2022.
- [5] L. M. Julio, J. C. Ruiz-Ruiz, M. C. Tomás, and M. R. Segura-Campos, "Chia (*Salvia hispanica*) protein fractions: characterization and emulsifying properties," *Journal of Food Measurement and Characterization*, vol. 13, no. 4, pp. 3318–3328, 2019, doi: 10.1007/s11694-019-00254-w.
- [6] M. R. Segura-Campos, L. A. Chel-Guerrero, and D. A. Betancur-Ancona, "Salvia hispanica: Nutritional and Functional Potential BT - Functional Properties of Traditional Foods," K. Kristbergsson and S. Ötles, Eds. Boston, MA: Springer US, 2016, pp. 115–118. doi: 10.1007/978-1-4899-7662-8_8.
- [7] M. del C. Beltrán-Orozco, A. Martínez-Olguín, and M. del C. Robles-Ramírez, "Changes in the nutritional composition and antioxidant capacity of chia seeds (*Salvia hispanica* L.) during germination process," *Food Sci Biotechnol*, vol. 29, no. 6, pp. 751–757, 2020, doi: 10.1007/s10068-019-00726-1.
- [8] S. S. Fernandes, C. Prentice, and M. de las M. Salas-Mellado, "Chia Seed (*Salvia hispanica*)," in *Oilseeds: Health Attributes and Food Applications*, B. Tanwar and A. Goyal, Eds. Singapore: Springer Singapore, 2021, pp. 285–303. doi: 10.1007/978-981-15-4194-0_11.
- [9] M. Amato *et al.*, "Nutritional quality of seeds and leaf metabolites of Chia (*Salvia hispanica* L.) from Southern Italy," *European Food Research and Technology*, vol. 241, no. 5, pp. 615–625, 2015, doi: 10.1007/s00217-015-2488-9.

- [10] M. C. Zúñiga-López, G. Maturana, G. Campmajó, J. Saurina, and O. Núñez, "Determination of bioactive compounds in sequential extracts of chia leaf (*Salvia hispanica* L.) using uhplc-hrms (q-orbitrap) and a global evaluation of antioxidant in vitro capacity," *Antioxidants*, vol. 10, no. 7, 2021, doi: 10.3390/antiox10071151.
- [11] H. S. Elshafie, L. Aliberti, M. Amato, V. de Feo, and I. Camele, "Chemical composition and antimicrobial activity of chia (*Salvia hispanica* L.) essential oil," *European Food Research and Technology*, vol. 244, no. 9, pp. 1675–1682, 2018, doi: 10.1007/s00217-018-3080-x.
- [12] R. Chizzola, "Regular Monoterpenes and Sesquiterpenes (Essential Oils)," in *Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes*, K. G. Ramawat and J.-M. Mérillon, Eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013, pp. 2973–3008. doi: 10.1007/978-3-642-22144-6_130.
- [13] F. Priego-Capote, "6 - Solid-liquid extraction techniques," in *Analytical Sample Preparation With Nano- and Other High-Performance Materials*, R. Lucena and S. Cárdenas, Eds. Elsevier, 2021, pp. 111–130. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-822139-6.00002-X>.
- [14] H. J. D. Dorman and S. G. Deans, "Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils," *J Appl Microbiol*, vol. 88, no. 2, pp. 308–316, Feb. 2000, doi: 10.1046/j.1365-2672.2000.00969.x.
- [15] A. R. Koroch, H. Rodolfo Juliani, and J. A. Zygodlo, "Bioactivity of Essential Oils and Their Components BT - Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability," R. G. Berger, Ed. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007, pp. 87–115. doi: 10.1007/978-3-540-49339-6_5.
- [16] G. B. Zore, A. D. Thakre, S. Jadhav, and S. M. Karuppaiyil, "Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle," *Phytomedicine*, vol. 18, no. 13, pp. 1181–1190, 2011, doi: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.03.008>.
- [17] W. Liu, T.-C. Liu, and M. Mong, "Antibacterial effects and action modes of asiatic acid," *Biomedicine (Taipei)*, vol. 5, no. 3, p. 16, 2015, doi: 10.7603/s40681-015-0016-7.
- [18] Z. Zhu *et al.*, "Anticancer effects of asiatic acid against doxorubicin-resistant breast cancer cells via an AMPK-dependent pathway in vitro," *Phytomedicine*, vol. 92, p. 153737, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153737>.
- [19] S. Fulda and K. M. Debatin, "Sensitization for anticancer drug-induced apoptosis by betulinic acid," *Neoplasia*, vol. 7, no. 2, pp. 162–170, 2005, doi: 10.1593/neo.04442.
- [20] S. Yang *et al.*, "Design, synthesis and biological evaluation of novel betulinic acid derivatives," *Chem Cent J*, vol. 6, no. 1, p. 141, 2012, doi: 10.1186/1752-153X-6-141.
- [21] P. Yu *et al.*, "Synthesis and Antitumor Activity of C-3(R) Hydroxy Modified Betulinic Acid Derivatives," *Chem Nat Compd*, vol. 55, no. 6, pp. 1080–1084, 2019, doi: 10.1007/s10600-019-02899-x.
- [22] C. Kamaraj *et al.*, "Bioassay-guided isolation and characterization of active antiplasmodial compounds from *Murraya koenigii* extracts against *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium*

- berghei," *Parasitol Res*, vol. 113, no. 5, pp. 1657–1672, 2014, doi: 10.1007/s00436-014-3810-3.
- [23] C. Kamaraj *et al.*, "Ag Nanoparticles Synthesized Using β -Caryophyllene Isolated from *Murraya koenigii*: Antimalarial (*Plasmodium falciparum* 3D7) and Anticancer Activity (A549 and HeLa Cell Lines)," *J Clust Sci*, vol. 28, no. 3, pp. 1667–1684, 2017, doi: 10.1007/s10876-017-1180-6.
- [24] S. Saeidnia, R. G. Ohari, N. U. Chiyama, M. I. To, G. H. Onda, and O. Box, "Two New Monoterpene Glycosides and Trypanocidal Terpenoids from *Dracocephalum kotschyi*," vol. 52, no. October, pp. 1249–1250, 2004.
- [25] J. Deng, J. Xiao, and H. Yang, "Dietary Triterpenoids," in *Handbook of Dietary Phytochemicals*, J. Xiao, S. D. Sarker, and Y. Asakawa, Eds. Singapore: Springer Singapore, 2021, pp. 423–475. doi: 10.1007/978-981-15-4148-3_15.
- [26] M. Pertino, C. Vega, M. Rolón, C. Coronel, A. Rojas de Arias, and G. Schmeda-Hirschmann, "Antiprotozoal Activity of Triazole Derivatives of Dehydroabiatic Acid and Oleanolic Acid," *Molecules*, vol. 22, no. 3, p. 369, Feb. 2017, doi: 10.3390/molecules22030369.
- [27] Á. Pereira and M. Pérez, "Tripanosomosis. Enfermedad de Chagas y enfermedad del sueño," *Offarm*, vol. 22, no. 2, pp. 104–111, 2003, [Online]. Available: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-tripanosomosis-enfermedad-chagas-enfermedad-del-13043203>
- [28] S. Ferreira, V. R. Esperandim, M. Paula, A. Toldo, J. Saraiva, and W. R. Cunha, "Trypanocidal activity and acute toxicity assessment of triterpene acids," pp. 985–989, 2010, doi: 10.1007/s00436-010-1740-2.
- [29] F. Abe *et al.*, "Ursolic acid as a trypanocidal constituent in rosemary.," *Biol Pharm Bull*, vol. 25, no. 11, pp. 1485–1487, Nov. 2002, doi: 10.1248/bpb.25.1485.
- [30] W. R. Cunha, C. Martins, D. da Silva Ferreira, A. E. M. Crotti, N. P. Lopes, and S. Albuquerque, "In vitro trypanocidal activity of triterpenes from *miconia* species.," *Planta medica*, vol. 69, no. 5. Germany, pp. 470–472, May 2003. doi: 10.1055/s-2003-39719.
- [31] Á. E. Daruházi *et al.*, "GC-MS Identification and GC-FID Quantitation of Terpenoids in *Ononidis spinosae* Radix," *Chromatographia*, vol. 68, no. 1, pp. 71–76, 2008, doi: 10.1365/s10337-008-0679-2.
- [32] M. Yang *et al.*, "Analysis of triterpenoids in *Ganoderma lucidum* using liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry," *J Am Soc Mass Spectrom*, vol. 18, no. 5, pp. 927–939, 2007, doi: 10.1016/j.jasms.2007.01.012.
- [33] Y. Wang, Y. Suo, Y. Sun, and J. You, "Determination of Triterpene Acids from 37 Different Varieties of Raspberry using Pre-column Derivatization and HPLC Fluorescence Detection," *Chromatographia*, vol. 79, no. 21, pp. 1515–1525, 2016, doi: 10.1007/s10337-016-3174-1.
- [34] J. P. v. Leite, A. B. Oliveira, J. A. Lombardi, J. D. S. Filho, and E. Chiari, "Trypanocidal activity of triterpenes from *Arrabidaea triplinervia* and derivatives," *Biol Pharm Bull*, vol. 29, no. 11, pp. 2307–2309, 2006, doi: 10.1248/bpb.29.2307.

- [35] J. Pozo Martínez, "Evaluación de la Actividad Tripanocida de la Serie 3-Aril Cumarinas y sus Complejos de Inclusión con β -ciclodextrina en Combinación con Benznidazol," Universidad de Chile, 2022. [Online]. Available: <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/185415>
- [36] J. Arancibia-Radich *et al.*, "Comparative study of anti-inflammatory activity and qualitative-quantitative composition of triterpenoids from ten genotypes of *Ugni molinae*," *Bol Latinoam Caribe Plantas Med Aromat*, vol. 15, no. 5, pp. 274–287, 2016.
- [37] National Center for Biotechnology Information, "PubChem Compound Summary for CID 73412, Madecassic acid," *PubChem*, 2004.
- [38] National Center for Biotechnology Information, "PubChem Compound Summary for CID 119034, Asiatic acid," *PubChem*, 2004.
- [39] National Center for Biotechnology Information, "PubChem Compound Summary for CID 64971, Betulinic acid," *PubChem*, 2004.
- [40] National Center for Biotechnology Information, "PubChem Compound Summary for CID 10494, Oleanolic acid," *PubChem*, 2004.
- [41] National Center for Biotechnology Information, "PubChem Compound Summary for CID 64945, Ursolic acid," *PubChem*, 2004.
- [42] B. Günther and H. Wagner, "Quantitative determination of triterpenes in extracts and phytopreparations of *Centella asiatica* (L.) Urban," *Phytomedicine*, vol. 3, no. 1, pp. 59–65, 1996, doi: 10.1016/S0944-7113(96)80011-0.
- [43] P. Hashim, H. Sidek, M. H. M. Helan, A. Sabery, U. D. Palanisamy, and M. Ilham, "Triterpene composition and bioactivities of *centella asiatica*," *Molecules*, vol. 16, no. 2, pp. 1310–1322, 2011, doi: 10.3390/molecules16021310.
- [44] M. H. Rafamantanana *et al.*, "An improved HPLC-UV method for the simultaneous quantification of triterpenic glycosides and aglycones in leaves of *Centella asiatica* (L.) Urb (APIACEAE)," *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, vol. 877, no. 23, pp. 2396–2402, 2009, doi: 10.1016/j.jchromb.2009.03.018.
- [45] C. Wang, Y. Zhao, R. Yang, and H. Liu, "Simultaneous analysis of five triterpenes in *Centella asiatica* by high performance liquid chromatography with cyclodextrins as the mobile phase additives," *Sci Rep*, no. 1, pp. 1–8, 2020, doi: 10.1038/s41598-020-75554-z.
- [46] B. H. de Oliveira, C. A. M. Santos, and A. P. D. M. Espíndola, "Determination of the triterpenoid, betulinic acid, in *Doliocarpus schottianus* by HPLC," *Phytochemical Analysis*, vol. 13, no. 2, pp. 95–98, 2002, doi: 10.1002/pca.628.
- [47] V. G. Kontogianni *et al.*, "Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity," *Food Chem*, vol. 136, no. 1, pp. 120–129, 2013, doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.091>.

- [48] S. Jäger, H. Trojan, T. Kopp, M. N. Laszczyk, and A. Scheffler, "Pentacyclic Triterpene Distribution in Various Plants – Rich Sources for a New Group of Multi-potent Plant Extracts," pp. 2016–2031, 2016, doi: 10.3390/molecules14062016.
- [49] A. Caligiani, G. Malavasi, G. Palla, A. Marseglia, M. Tognolini, and R. Bruni, "A simple GC-MS method for the screening of betulinic, corosolic, maslinic, oleanolic and ursolic acid contents in commercial botanicals used as food supplement ingredients," *Food Chem*, vol. 136, no. 2, pp. 735–741, 2013, doi: 10.1016/j.foodchem.2012.08.011.

9 ANEXOS

Anexo 1. Tablas de las curvas de calibración externa de los cinco triterpenos

Tabla 16. Curva de calibración externa de ácido madecásico en concentraciones que van desde 0,5 mg/L a 80 mg/L en metanol.

Concentración (mg/L)	Tiempo de retención (min)	Área (mAU)
0,5	5,0	6,36 ± 0,04
2	4,9	34 ± 3
5	4,9	68 ± 7
10	4,8	129 ± 6
20	4,8	261 ± 8
40	4,8	579 ± 4
60	4,8	867 ± 6
80	4,8	1.209 ± 1

Tabla 17. Curva de calibración externa de ácido asiático en concentraciones que van desde 0,5 mg/L a 80 mg/L en metanol.

Concentración (mg/L)	Tiempo de retención (min)	Área (mAU)
0,5	6,6	10 ± 2
2	6,4	35 ± 1
5	6,4	66 ± 5
10	6,2	179 ± 1
20	6,2	291 ± 5
40	6,2	612 ± 14

60	6,2	941 ± 10
80	6,2	1.289 ± 4

Tabla 18. Curva de calibración externa de ácido betulínico en concentraciones que van desde 0,5 mg/L a 40 mg/L en metanol.

Concentración (mg/L)	Tiempo de retención (min)	Área (mAU)
0,5	26,6	33 ± 1
2	26,5	49,7 ± 0,1
5	26,5	67 ± 4
10	26,4	137 ± 2
20	26,3	247 ± 17
40	26,3	471 ± 13

Tabla 19. Curva de calibración externa de ácido oleanólico en concentraciones que van desde 0,5 mg/L a 80 mg/L en metanol.

Concentración (mg/L)	Tiempo de retención (min)	Área (mAU)
0,5	29,4	22 ± 2
2	29,2	42 ± 1
5	29,2	79,4 ± 0,2
10	29,1	200 ± 2
20	29,1	390 ± 7
40	29,1	802 ± 18
60	29,1	1.216 ± 6
80	29,2	1.689 ± 3

Tabla 20. Curva de calibración externa de ácido ursólico en concentraciones que van desde 0,5 mg/L a 80 mg/L en metanol.

Concentración (mg/L)	Tiempo de retención (min)	Área (mAU)
0,5	30,0	12,2 ± 0,6
2	29,8	42,4 ± 0,6
5	29,8	84 ± 2
10	29,7	146 ± 6
20	29,7	346 ± 4
40	29,7	690 ± 2
60	29,8	1.086 ± 4
80	29,9	1.542 ± 10

Anexo 2. Tablas de la adición estándar a extractos de hoja de *Salvia hispanica* L.

Tabla 21. Adición estándar ácido madecásico en el extracto EtOH-B

Ácido Madecásico	
Concentración (mg/L)	Área (mAU)
0	11 ± 1
20	257 ± 5
40	558 ± 10
60	814 ± 11
80	1.175 ± 19

Tabla 22. Adición estándar ácido asiático en el extracto EtOH-B

Ácido Asiático	
Concentración (mg/L)	Área (mAU)
0	10,7 ± 0,7
20	327 ± 1
40	699 ± 1
60	965 ± 7
80	1.357 ± 5

Tabla 23. Adición estándar ácido madecásico en el extracto EtOH-N

Ácido Madecásico	
Concentración (mg/L)	Área (mAU)
0	100 ± 1
20	424 ± 2
40	756 ± 23
60	1.089 ± 28
80	1.395 ± 16

Tabla 24. Adición estándar ácido asiático en el extracto EtOH-N

Ácido Asiático	
Concentración (mg/L)	Área (mAU)
0	34,1 ± 0,4
20	476 ± 2
40	908 ± 7
60	1.346 ± 5
80	1.760 ± 8

Tabla 25. Adición estándar ácido madecásico en el extracto DCM-B

Ácido Madecásico	
Concentración (mg/L)	Área (mAU)
0	1.407 ± 6
20	1.764 ± 33
40	2.200 ± 17
60	2.596,5 ± 0,3
80	2.975 ± 4

Tabla 26. Adición estándar ácido asiático en el extracto DCM-B

Ácido Asiático	
Concentración (mg/L)	Área (mAU)
0	37,9 ± 0,3
20	493 ± 3
40	935 ± 4
60	1.369 ± 5
80	1.847 ± 7

Tabla 27. Adición estándar ácido madecásico en el extracto DCM-N

Ácido Madecásico	
Concentración (mg/L)	Área (mAU)
0	2.041 ± 23
20	2.444 ± 16
40	2.779 ± 54
60	3.175 ± 6
80	3.464 ± 20

Tabla 28. Adición estándar ácido asiático en el extracto DCM-N

Ácido Asiático	
Concentración (mg/L)	Área (mAU)
0	37 ± 1
20	471,5 ± 0,7
40	889 ± 10
60	1.298,4 ± 0,9
80	1.763 ± 7

Tabla 29. Adición estándar ácido madecásico en el extracto HEX-B

Ácido Madecásico	
Concentración (mg/L)	Área (mAU)
0	794 ± 6
20	1.338 ± 7
40	1.693 ± 13
60	2.033 ± 2
80	2.418 ± 11

Tabla 30. Adición estándar ácido asiático en el extracto HEX-B

Ácido Asiático	
Concentración (mg/L)	Área (mAU)
0	69 ± 2
20	477 ± 2
40	915 ± 4
60	1.352 ± 1
80	1.834 ± 3

Tabla 31. Adición estándar ácido madecásico en el extracto HEX-N

Ácido Madecásico	
Concentración (mg/L)	Área (mAU)
0	1.028 ± 5
20	1.352 ± 11
40	1.668 ± 6
60	1.928 ± 11
80	2.216 ± 12

Tabla 32. Adición estándar ácido asiático en el extracto HEX-N

Ácido Asiático	
Concentración (mg/L)	Área (mAU)
0	74 ± 1
20	383 ± 3
40	692 ± 3
60	1.006 ± 4
80	1.352 ± 16

Tabla 33. Adición estándar ácido betulínico en el extracto HEX-N

Ácido Betulínico	
Concentración (mg/L)	Área (mAU)
0	565 ± 1
20	1.115 ± 11
40	1.619 ± 5
60	2.117 ± 3
80	2.631 ± 7

Tabla 34. Adición estándar ácido oleanólico en el extracto HEX-N

Ácido Oleanólico	
Concentración (mg/L)	Área (mAU)
0	1.404 ± 17
20	1.887 ± 6
40	2.334 ± 9
60	2.892 ± 11
80	3.147 ± 9

Tabla 35. Adición estándar ácido ursólico en el extracto HEX-N

Ácido Ursólico	
Concentración (mg/L)	Área (mAU)
0	2.393 ± 7
20	2.905 ± 14
40	3.389 ± 12
60	3.795 ± 11
80	4.245 ± 13

Anexo 3. Tablas de resultados obtenidos en ensayos biológicos.

Tabla 36. Resultados de ensayo antiparasitario a extractos de hoja de *Salvia hispanica* L. a 200 mg/L.

Compuesto	% Tripanosida	% Tripanosida	% Tripanosida	% Promedio
Control Negativo	102	98	-	100 ± 3
Control Positivo	86,3	87,6	87,8	87,1 ± 0,8
EtOH-B	95	94	100	97 ± 3
EtOH-N	109	107	-	108 ± 1
AE-B	120,3	119,5	-	119,9 ± 0,5
AE-N	113,7	114,0	-	113,8 ± 0,3
DCM-B	104	107	-	105 ± 3
DCM-N	113	110	-	112 ± 2
HEX-B	120	124	-	122 ± 2
HEX-N	119	118	123	121 ± 3

Tabla 37. Resultados de ensayo antiparasitario a estándares de los cinco triterpenos a dos concentraciones distintas.

Compuesto	Concentración (mg/L)	% Tripanosida	% Tripanosida	% Tripanosida	% Promedio
Control Negativo	-	101	103	96	100 ± 4
Control Positivo	20	89	86	85	87 ± 2
Ác. madecásico	20	101	104	100	102 ± 2
	200	85,5	84,3	84,7	84,8 ± 0,6

Ác, Asiático	20	105	103	96	101 ± 5
	200	91	92	87	90 ± 3
Ác. Betulínico	20	89	87	82	86 ± 3
	200	105	102	-	103 ± 3
Ác. Oleanólico	20	87	93	89	90 ± 3
	200	92	94	89	91 ± 3
Ác. Ursólico	20	88,8	90,1	-	89,4 ± 0,9
	200	91,8	91,3	90,1	91,1 ± 0,9

Tabla 38. Resultados de ensayo antiproliferativo a extractos de hoja de *Salvia hispanica* L. a 200 mg/L.

Compuesto	% células vivas	% células vivas	% células vivas	% Promedio
Control Negativo	97	99	99	98 ± 1
EtOH-B	96	108	88	97 ± 10
EtOH-N	93,9	94,4	-	94,2 ± 0,4
AE-B	101	99	-	100 ± 2
AE-N	145	131	-	138 ± 10
DCM-B	104	88	96	96 ± 8
DCM-N	99	92	87	93 ± 6
HEX-B	83,4	82,5	-	82,9 ± 0,6
HEX-N	91	92	88	91 ± 2