



**PURIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE
SALVINORINA A EN *Salvia divinorum*.**

EDGAR ESTEBAN HUÉRFANO MORENO

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
QUIMICA FARMACÉUTICA
CALI-2015**

**PURIFICACIÓN, CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE
SALVINORINA A EN *Salvia divinorum*.**

EDGAR ESTEBAN HUÉRFANO MORENO

GUILLERMO LEÓN MONTOYA PELÁEZ Ph.D
Director Programa de Química Farmacéutica

UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
QUIMICA FARMACÉUTICA
CALI-2015

Tabla de contenido

1.	Resumen Del Proyecto.....	5
2.	Introducción.....	7
3.	Descripción Del Proyecto.....	8
3.1	Planteamiento de la pregunta o problema de investigación	8
3.2	Marco teórico y estado de arte.....	10
3.2.1	Historia	10
3.2.2	Diterpenos y análisis estructural de Salvinorina A.....	12
3.2.3	Botánica de la <i>Salvia divinorum</i>	14
3.2.4	Farmacología de la <i>Salvia divinorum</i>	15
3.2.5	Ensayos clínicos	17
3.2.6	Métodos de análisis para el aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios de plantas.....	17
3.2.6.1	Cromatografía líquida en columna.....	17
3.2.6.2	Teoría de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	18
4.	Objetivos	20
4.1.1	Objetivo general.....	20
4.1.2	Objetivos específicos	20
5.	Metodología Propuesta	21
5.1	Obtención del material vegetal	21
5.2	Extracción de los componentes no volátiles de la <i>S.divinorum</i>	21
5.3	Extracción por medio de Cromatografía en columna clásica.....	22
5.4	Análisis de los Espectros de RMN	23
6.	Resultados	24
7.	<i>Discusión</i>	35
8.	Conclusiones	38
9.	Recomendaciones	39
10.	Referencias	40

Contenido de Figuras

Figura 1. Estructura de la Salvinorina A y la Salvinorina B.....	10
Figura 2. Estructura de la Salvinorina C, Salvinorina D, Salvinorina E, Salvinorina F.....	11
Figura 3. Estructura de la Divinatorina A, Divinatorina B, Divinatorina C.....	12
Figura 4. Estructura de la Salvinicina A y Salvinicina B.....	13
Figura 5. Interacciones de la Salvinorina A con los sitios del receptor opioide <i>kappa</i>	16
Figura 6. Estructura de la molécula propuesta.....	34

Contenido de Imágenes

Imagen 1. Micrografía electrónica de barrido de la <i>Salvia divinorum</i>	13
Imagen 2. Fotografía de la <i>Salvia divinorum</i>	14
Imagen 3. Cromatoplaqueta con las muestras a diferentes solventes	25
Imagen 4. Cromatoplaqueta de las fracciones obtenidas por cromatografía de columna	26
Imagen 5. Cromatoplaqueta de las fracciones que contenían acetona y metanol.	27
Imagen 6. Resultado del espectro RMN Carbono 13 (^{13}C) de la Salvinorina A.....	27
Imagen 7. Espectro RMN protónico (^1H) de la Salvinorina A.....	29
Imagen 8. Espectro RMN HSQC (^1H - ^{13}C) de la Salvinorina A.....	31
Imagen 9. Espectro RMN COSY (^1H - ^1H) de la Salvinorina A.....	32
Imagen 10. Espectro RMN HMBC (^1H - ^{13}C) de la Salvinorina A.....	33

Contenido de Tablas

Tabla 1. Diferentes concentraciones para la separación.....	23
Tablas 2. Datos de cada carbono que se expresan en el espectro de ^{13}C	28
Tablas 3. Datos de cada hidrogeno que se expresan en el espectro ^1H	30

1. RESUMEN DEL PROYECTO

La *Salvia divinorum* ha sido hasta ahora al igual que la marihuana, una de las plantas psicotrópicas de mayor interés para la comunidad científica internacional, principalmente por poseer diterpenos que demuestran efectos farmacológicos psicotropicos a muy bajas concentraciones. El principal objetivo de investigación en este proyecto fue la purificación, identificación y caracterización de la Salvinorina A presente en *Salvia divinorum* cultivada en el vivero de la Universidad. Este trabajo experimental estandarizó una metodología para su aislamiento debido a que es una sustancia de abuso que actualmente se comercializa en varias ciudades de Colombia. Se logró identificar el compuesto activo por medio de las técnicas de resonancia magnética nuclear de una y dos dimensiones (COSY, HSQC y HMBC).

Uno de los principales inconvenientes que está propuesta de investigación quiere solventar, es la generación de un estándar de trabajo que permita posteriormente implementar métodos de valoración en matrices biológicas. Estos métodos de análisis generalmente consumen grandes cantidades de estándar y los precios comerciales oscilan entre 200 y 300 dólares por miligramo (sin tener en cuenta valores de impuestos, transporte y precios de nacionalización). Se logró establecer el cultivo en el vivero a partir de esquejes por un periodo de 4 meses y el procedimiento de purificación tuvo un buen resultado debido a que los análisis permiten concluir que la molécula purificada posee el núcleo de un diterpeno neocloreano. Aunque la recolección del material vegetal no superó los 130 gramos de hojas secas, se logró purificar suficiente cantidad de muestra para el análisis espectroscópico.

Con estos resultados y observando la viabilidad del proyecto, se logra concluir que el procedimiento es óptimo para posteriores análisis y como se especificó antes, la generación de estándares es una opción de alto impacto para la continuación de la investigación de esta planta.

Palabras Claves: Resonancia Magnética Nuclear, Cromatografía líquida, *Salvia divinorum*, Salvinorina A.

1.1. ABSTRACT

Salvia divinorum has been so far as marijuana one of the greatest psychotropic plants of interest for the international scientific community, mainly it does has diterpenes that demonstrate pharmacological effects at very low concentrations. The main idea of this research project was the purification, identification and characterization of Salvinorin A from *Salvia divinorum* cultivated in the nursery of the University. This experimental work standardized a methodology for the isolation because it is a substance that has been abuse and currently marketed in several cities in Colombia. It was possible to identify the active compound by the technics of nuclear magnetic resonance in one and two dimensions (COSY, HSQC y HMBC).

One of the main issues that this research project aims to solve, it is the generation of a working standard that allows to implement valuation methods in biological matrices. These analysis methods usually consume large amounts of standard and the commercial prices are between 200 and 300 dollars per milligram (regardless taxes, transportation and nationalization rates). The cultivation grown successfully in the nursery from the cuttings for a period of four months and the purification procedure fared well because the analysis conclude that the purified molecule has the core of a neocloredane diterpene. Although the collection of plant material did not exceed 130 grams of dried leaves, it was possible to purify sufficient sample for the spectroscopic analysis.

With these results and seeing the project's viability, it is conclude that the procedure is optimal for further analysis as specified before, the generation of standards is a high impact option for further research of this plant either.

Key Words: Nuclear magnetic resonance, Chromatography, *Salvia divinorum*, Salvinorin A

2. INTRODUCCIÓN

La planta *Salvia divinorum* es originaria de Oaxaca, México en donde ha sido utilizada por generaciones como una droga que cuando se ingiere provoca un estado modificado de conciencia. Los efectos de *S. divinorum* incluye movimientos corporales incontrolados, cambios en la percepción visual y principalmente risa no controlada. Esta planta fue llevada a los EE.UU, pero solo recientemente ganó popularidad entre jóvenes, estudiantes, universitarios y es normalmente conocida como salvia en este país. En Colombia es administrada por vía inhalatoria, generalmente a partir de un extracto de hojas que permite tener las sustancias en mayor concentración.

Debido al reciente uso descontrolado como sustancia psicotrópica, su comercialización y distribución se va haciendo cada vez más común entre los colombianos y es relevante que existan grupos de investigaciones interesados en aumentar el conocimiento científico de esta planta, acerca de los mecanismos de biosíntesis de los diterpenos como marcadores quimio-taxonómicos, condiciones de crecimiento, enzimas involucradas en las rutas de síntesis, y principalmente su potencial fitoquímico.

Algunos aspectos relevantes para el entendimiento de esta planta se mostrarán más adelante acerca de su historia y como se conocieron, los componentes principales que se encuentran en ella, algunos aspectos botánicos, morfológicos y el alto potencial farmacológico reportado. La química del principio activo se describirá en la discusión pues en esto consiste la investigación. El método espectroscópico más poderoso que fue empleado para la identificación del diterpeno aislado, fue resonancia magnética nuclear multidimensional.

3. DESCRIPCIÓN DEL PROYECTO

3.1 Planteamiento de la pregunta o problema de investigación

El uso de sustancias psicoactivas es un problema que es regulado por todos los países que manejan contandando abundante de estupefacientes, sin embargo la legislación en alguno países presenta una tendencia debil para su consumo. La cocaína y la marihuana son sustancias de abuso que han venido siendo usadas por las últimas 4 décadas, las cuales son comercializadas ilegalmente en casi todo el mundo.

Colombia es un país de vocación agrícola que por condiciones geográficas facilita la producción de materiales vegetales, pero además por su ubicación puede ser empleada para transportarla a diferentes regiones del planeta.

La evolución de las sustancias de abuso han sufrido un crecimiento exponencial en los últimos 40 a 50 años, así como las drogas de síntesis tales como el popper, el extasis, el LSD, el cristal y el Tu-Si-Bi (amplio uso en lo jovenes de estratos mas altos), adquirieron gran receptividad en las generaciones más recientes debido a la presión social ejercida por los jovenes adictos y estas se convirtieron en sustancias altamente usadas a pesar del control que hacen autoridades y los padres de familia.

Salvia divinorum es una planta que a pesar de no producir alcaloides (que son los metabolitos secundarios más conocidos por sus efectos psicotrópicos) tiene la capacidad de producir unos compuestos derivados de la ruta metabólica de la deoxi-xilulosa fosfato llamados diterpenos. Está es una planta con un poder psicoticomimético fuerte y cuyo uso se está extendiendo por diferentes lugares del mundo. Muy pocos gobiernos (entre estos el gobierno colombiano) saben de su existencia y casi que en ningún país del mundo existe legislación para controlar su producción y distribución. Debido a esto, en los países de Sur América su venta no es ilegal, incluso en Colombia se está comercializando en las ciudades principales y su uso aún no ha sido reportado en la ley 30 de 1986 como restringido.

En el sur de Colombia ya se ha evidenciado que su venta es asequible para todo tipo de público. Recientemente el periódico, El País, publicó una noticia sobre como son las alucinaciones y sus efectos y en qué lugares se puede estar comercializando esta planta. Adicionalmente en este artículo también se aprecian

varios comentarios de una joven que protagonizó una experiencia donde describió los canales de distribución más frecuentes (Lopez & Lopez, 2014)

Siendo el componente principal una sustancia de abuso poco conocida para las autoridades nacionales y teniendo en cuenta que ninguno de los laboratorios que prestan servicios de análisis en el país e incluso los laboratorios del instituto nacional de medicina legal y ciencias forenses tienen establecido un método para valorar esta sustancia, se definió que el objetivo de la propuesta de investigación debe enfocarse en aislar, purificar e identificar la Salvinorina A en material vegetal que se cultivo.

Además de implementar una metodología de identificación, también se estableció que una de las razones principales por las cuales la investigación es viable, se debe a que se espera encontrar otra acción farmacológica de tipo terapéutico y no psicoactivo en el componente principal o en otro componente metabolizado por la planta. Sin embargo se encontró que para aislar e identificar esta sustancia el estándar presentaba un alto precio. Después de una revisión superficial entre las empresas de productos químicos más reconocidas en el mundo, como Sigma-Aldrich se observó que 1 mg de Salvinorina A (con una pureza del 98%) puede oscilar entre 200 y 300 dólares, lo cual podría hacerlo no solamente inviable para soportar proyectos de grado posteriores, sino además una posible fuente de producción de estándares para laboratorio de análisis.

3.2 Marco teórico y estado de arte

3.2.1 Historia

En 1962 dos etno-farmacólogos llamados Hoffman y Watson, hicieron una expedición a Oaxaca, México. Durante la investigación, recolectaron diferentes especímenes de plantas usadas por los chamanes Mazatecos. La expedición consistía en el entendimiento del uso de estas especies con respecto a la cultura histórica. Ellos tuvieron acceso a obtener el espécimen para realizar la descripción científica. (Casselmann, Nock, Wohlmuth, Weatherby, & Heinrich, 2014)

S. divinorum es una planta tradicional de la familia de la salvia que ha sido usada tradicionalmente en prácticas espirituales y etnofarmacológicas por los nativos mazatecos con la finalidad de generar experiencias alucinógenas o místicas. Esta planta también fue usada para el tratamiento de una enfermedad semi-mágica conocida como “panzón de barrego”, o “vientre hinchado” que era causado por una fuente diabólica.

La *Salvia divinorum* tiene la capacidad de producir varios diterpenos neocloreanos que se han aislado e identificado. Los primeros componentes que se aislaron fueron la salvinorina A y la salvinorina B (Ver figura 1).

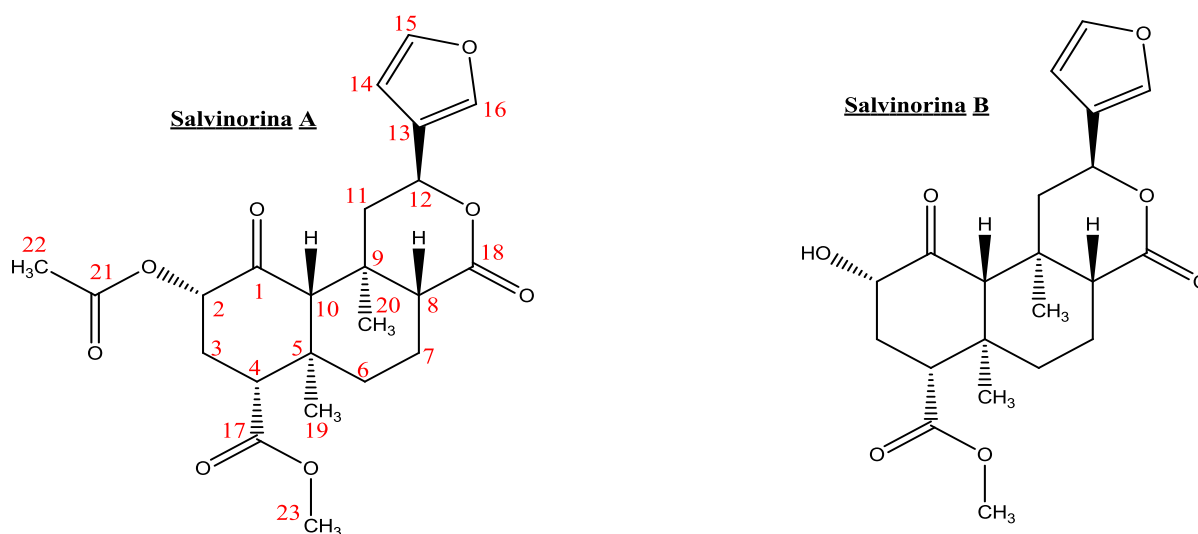


Figura 1. Estructura de la Salvinorina A y la Salvinorina B.

Posterior al aislamiento e identificación de la Salvinorina A, fueron aisladas otras salvinorinas, pero también fue demostrado que estas no presentaban una

actividad psicotrópica. Otros diterpenos neocloreanos que se aislaron de la planta fueron las salvinorinas C-F (Ver figura 2), y divinatorinas A-C (Ver figura 3). Últimos estudios realizados por investigadores en fitoquímica, identificaron salvinicin A y B casi siempre en cantidades muy pequeñas. (Ver figura 1) (Prisinzano, 2005)

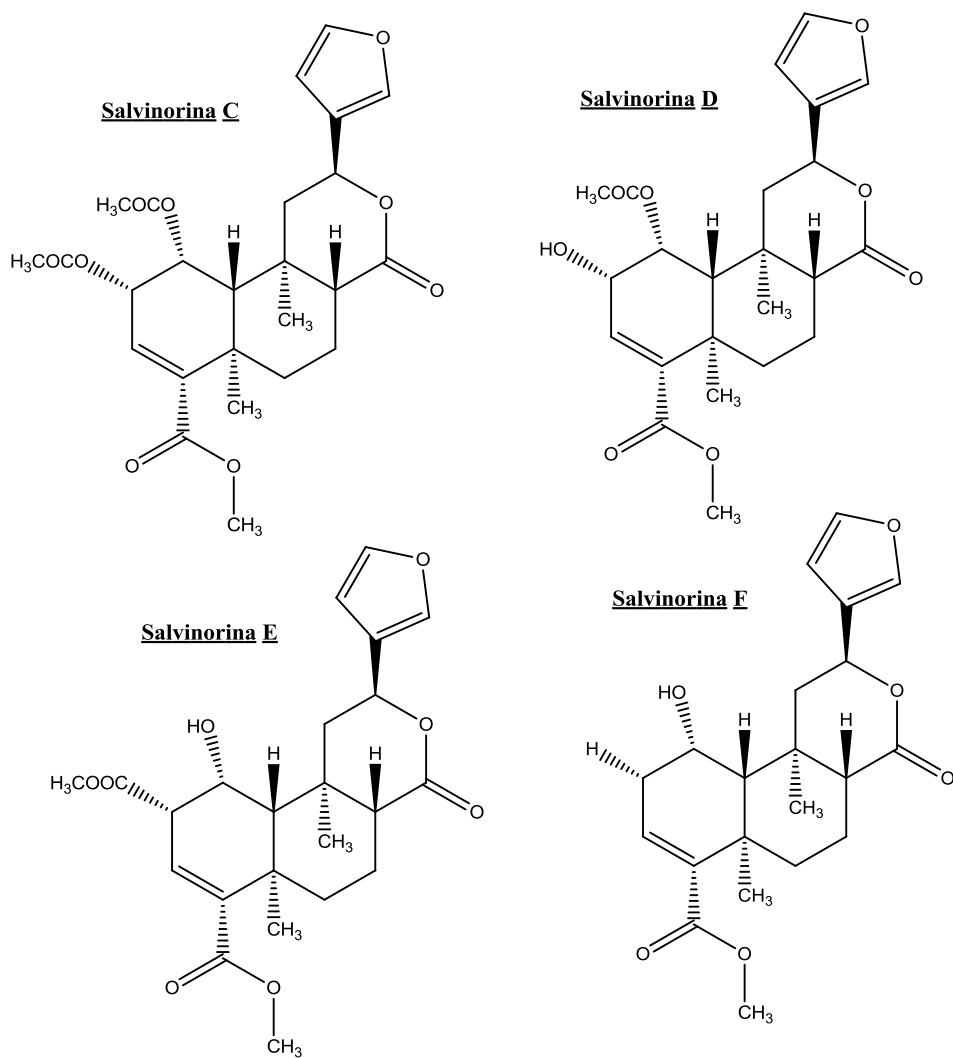


Figura 2. Estructura de la Salvinorina C, Salvinorina D, Salvinorina E, Salvinorina F.

3.2.2 Diterpenos y análisis estructural de Salvinorina A

Los terpenoides se encuentran entre los metabolitos secundarios más abundantes en las plantas. Casi todos los terpenoides son el resultado de la unión de isopentanoil pirofosfato (IPP) y dimetilalil pirofosfato (DMAPP). Se pensaba que la única ruta involucrada en la síntesis de este grupo de moléculas, era la ruta del mevalonato, sin embargo investigadores demostraron la nueva ruta involucrada deoxi-xilulosa fosfato (DOX).

Desde el punto de vista estructural, la Salvinorina A es una molécula que presenta unas características particulares, está compuesta principalmente por un núcleo terpénico que contiene 3 anillos de seis miembros. Con el fin de puntualizar aquellas características estructurales se van a mencionar los grupos funcionales de mayor relevancia. En la posición 2 (C-2) hay un grupo acetoxi, en la posición 4 (C-4) un metilester y en la posición 12 (C-12) se encuentra un anillo furanico. En la posición 17 (C-17) se encuentra un éster y en la posición 1 (C-1) una cetona (Ver figura 1).

Recientes estudios han demostrado que la Salvinorina A esta compartimentada con los tricomas glandulares localizados en el lado abacial de las hojas de la planta. Desde que los monoterpenos son producidos en los tricomas glandulares estos normalmente se derivan de la ruta DOX. (Kutrzeba, Dayan, Howell, Feng, Giner, & Zjawiony, 2007)

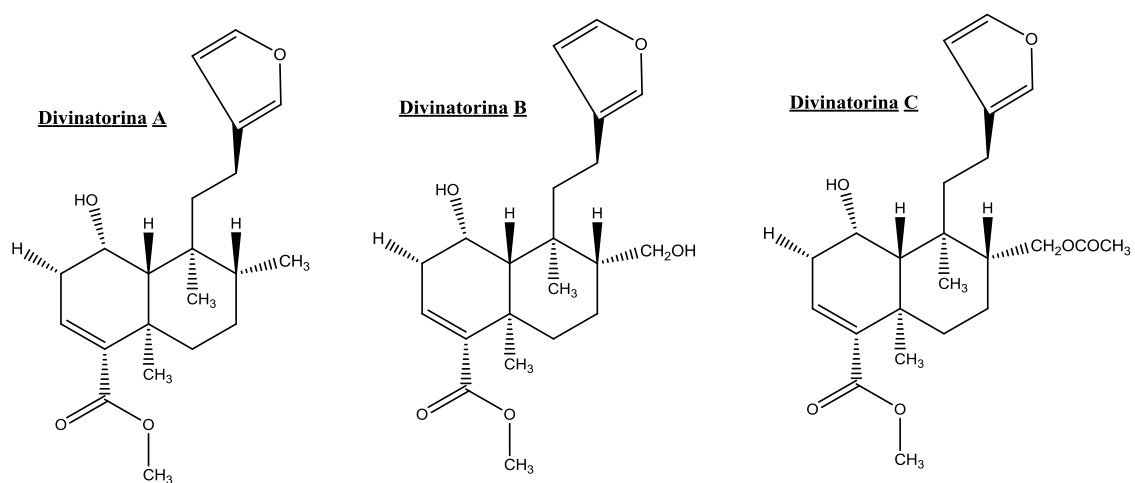


Figura 3. Estructura de la Divinatorina A, Divinatorina B, Divinatorina C.

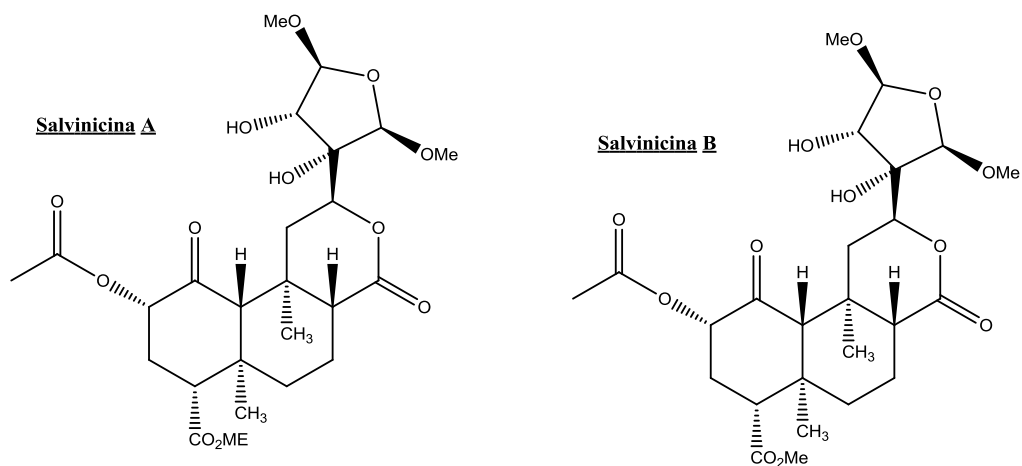


Figura 4. Estructura de la Salvinicina A y Salvinicina B.

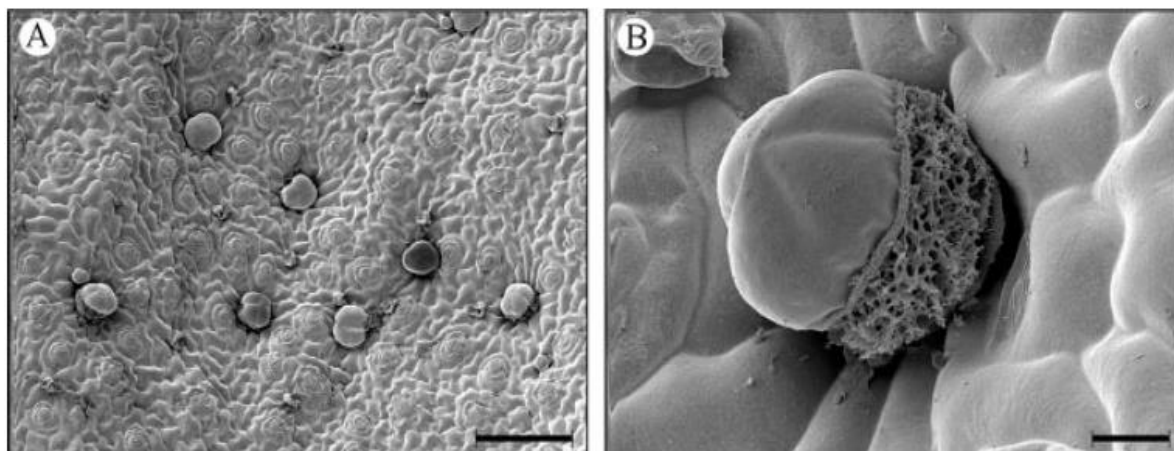


Imagen 1. Micrográficas electrónicas de barrido mostrando los tricomas de la *Salvia divinorum*. (A) un área intravenosa de la superficie abacial de la hoja con varios tricomas peltados glandulares visibles. Varios se encuentran hundidos ligeramente en la epidermis. La escala es de 100 μm . (B) un tricoma peltado glandular en la superficie abacial foliar. La cutícula se rompe, revelando la secreción resinosa rica en salvinorina que se acumula en la cavidad subcuticular. La apariencia esponjosa de la secreción sugiere que se acumula como una emulsión heterogénea. Escala de 10 μm . (Siebert, [Localization of Salvinorin A and Related Compounds in Glandular Trichomes of the Psychoactive Sage, *Salvia divinorum*, 2004](#))

3.2.3 Botánica de la *Salvia divinorum*

En el estado de Oaxaca se encuentra la sierra mazateca, la cual cuenta con un área y condiciones tropicales. El tipo de ecosistema tiene humedad alta, y una constante neblina. Se ha registrado que la *S. divinorum* se encuentra en una altitud de aproximadamente 500 a 1500 m.

La planta crece aproximadamente 1.5 m de altura, las hojas tiene una longitud de 10-25 cm, y una anchura entre 5-10 cm. Presentan una forma elíptica y el borde es en forma de serrucho. Numerosos tricomas glandulares y no-glandulares están presentes en el haz de las hojas, las flores tienen corolas blancas con calices morados. Las flores tienen una longitud de 3 o 4 cm y crecen en panículas de 20 o 30 flores (Casselman, Nock, Wohlmuth, Weatherby, & Heinrich, 2014). Algunos reportes etnográficos mencionan que la *S. divinorum* crece a partir de semillas, sin embargo no se ha observado en el estado salvaje de la planta una actividad de polinización consistente. (Reisfield, 1993)



Imagen 2. Fotografía de la *Salvia divinorum* tomada en el vivero de la Universidad Icesi.

3.2.4 Farmacología de la *Salvia divinorum*

La salvinorina A es un diterpenoide no-nitrogenado neocloreano, la cual es el compuesto mayoritario en la planta, y la que posee los efectos psicotrópicos más potentes por tener una fuerte afinidad al receptor Kappa opioide a concentraciones nano molares. Actúa en el receptor Kappa opioide como agonista selectivo, que a su vez se encuentra unido a proteínas G y también reciben el nombre de KOP_r. Producen una analgesia periférica grande aunque también pueden causar analgesia central pero su efecto es menor. Los principales efectos funcionales de estos receptores son: constricción pupilar, motilidad gastrointestinal reducida, tiene un fuerte efecto de disforia y alucinaciones (visuales, auditivas y táctiles) y produce una fuerte sedación, sin embargo no produce dependencia física. (Lee, et al., 2005)

Esta es una sustancia psicoticomimética, la cual afecta al pensamiento, la percepción y el estado de ánimo, sin producir una estimulación o depresión psicomotora significativa. Los pensamientos y las percepciones tienden a distorsionarse y a adquirir una forma onírica, en lugar de agudizarse o difuminarse simplemente, y el cambio del estado de ánimo es más complejo que una simple desviación hacia la euforia o la depresión. (H & M, 2012)

La Salvinorina A es la única estructura agonista selectivo para los receptores k-opioides, y también genera efectos farmacodinámicos como una buena eficacia y una baja tendencia a causar desensibilización en el receptor. Se ha comparado la Salvinorina A, con otras drogas de abuso, dentro de las cuales se encuentra la ketamina que ejerce también un efecto alucinógeno, sin embargo esta actúa en los receptores NMDA (*N-metil-D-aspartato*) y no presenta el mismo mecanismo de acción. (Butelman, Rus, Prizinsano, & Kreek, 2010)

Estos receptores representan el sustrato neurobiológico común que media las propiedades reforzadoras de la mayoría de las drogas de abuso así como la dependencia física, sin embargo los receptores *kappa* presentan efectos psicoticomiméticos disforicos (sensación de desorientación, miedo, ansiedad y despersonalización) y no causan una dependencia física.

El mecanismo de acción de estos receptores funciona de la siguiente manera. Tras la estimulación de estos se produce una inhibición de la actividad de la adenilciclase, con reducción de la concentración del AMPc y de la actividad de la proteinquinasa dependiente de AMPc o PKA, lo que resulta una disminución de la

fosforilación de la proteína. Se produce además una facilitación del cierre de los canales de calcio en las neuronas presinápticas, por lo que reduce la liberación de neurotransmisor, así como, la apertura de los canales de potasio (GIRK) de las neuronas presinápticas, lo que provoca una despolarización de la membrana y como consecuencia una reducción de su actividad resultando una reducción de su activación. Por tanto, son receptores que median acciones inhibitorias. La administración continua de opioides produce cambios moleculares y de la expresión génica que son los responsables de los fenómenos de tolerancia, dependencia y abstinencia. (Butelman, Rus, Prizinsano, & Kreek, 2010)

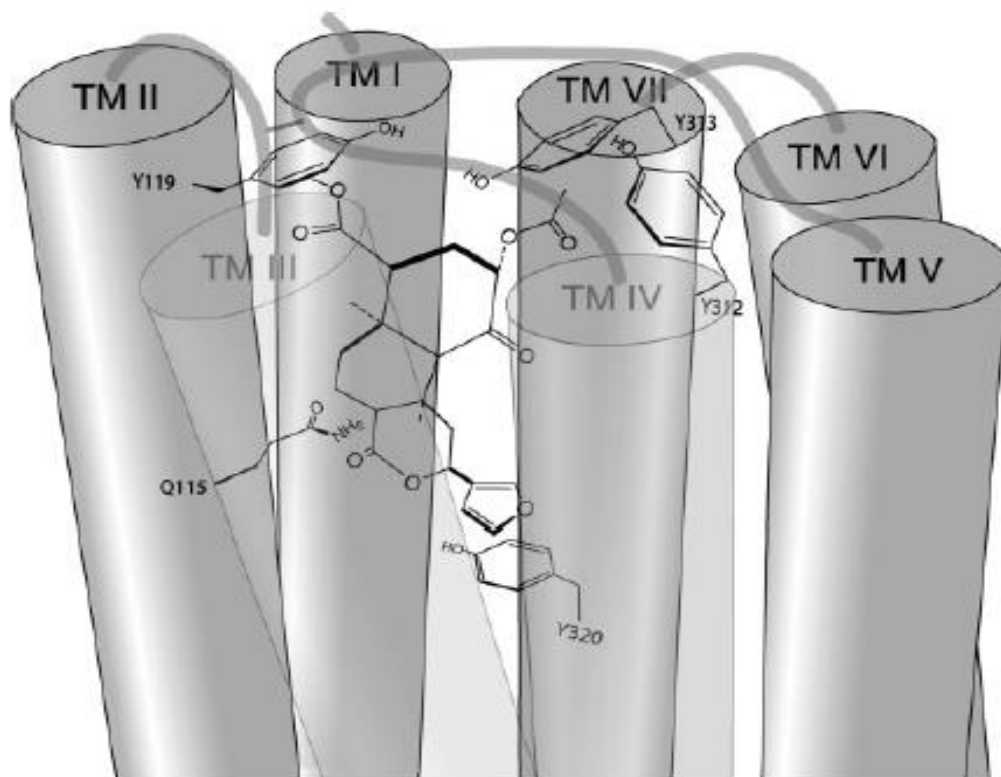


Figura 5. Interacciones de la Salvinorina A con los sitios del receptor opioide *kappa*, mediada por la técnica de docking para observar dicha interacción. (Kane B. , Nieto, McCurdy, & Ferguson, 2006)

3.2.5 Ensayos clínicos

La planta *Salvia divinorum* posee poca utilidad, se han desarrollado investigaciones con el fin de hallar nuevos horizontes de aplicación y los ensayos clínicos que se han venido realizando son pocos, sin embargo a la vez arrojan cierta información necesaria para el entendimiento de la misma. Según la página de *Clinical trials* ([Mendelson, 2013](#)), la cual presta un servicio de los institutos nacionales de salud de los estados unidos de américa, indica 3 estudios realizados de la Salvinorina A. Uno de ellos trata sobre un estudio que se realizó a personas que han tenido experiencia con la *Salvia divinorum* y se analizó la dosis tolerable sublingual de la Salvinorina A entre un rango de 100 a 400 µg. Durante el estudio la dosis iba en incremento, y se incluía un control con placebo, sin embargo los resultados no se presentaban directamente en la página y por ende no se puede concluir cual es la dosis tolerable por vía sublingual. El otro estudio consistió en evaluar las propiedades y la bioseguridad de un medicamento llamado Soline® que contiene Salvinorina A junto con otras plantas chinas llamadas Lycium, Chenpi y Dihuang, sin embargo no se especifica la familia de cada una de ellas. Los resultados de dicho estudio no se han publicado puesto que su información no ha sido verificada aun. El último estudio busca mostrar los efectos que presenta la Salvinorina A, con fin de aportar algunos datos a la alianza nacional de investigación de esquizofrenia y depresión, los resultados de dichas investigaciones tampoco han sido publicados debido a que no se han reclutado todos los participantes y el estudio tiene como objetivo terminar para agosto del 2015. ([Mendelson, 2013](#))

3.2.6 Métodos de análisis para el aislamiento y elucidación estructural de metabolitos secundarios de plantas

3.2.6.1 Cromatografía líquida en columna

La cromatografía consiste en un sistema conformado por una fase móvil y una fase estacionaria. Dependiendo de la fase móvil, se clasifica la técnica cromatografía a usar. Si es líquida se designa cromatografía líquida, si la fase es gaseosa, se denomina cromatografía de gases. Según la fase estacionaria también se clasifican dos tipos de cromatografía: la cromatografía laminar o plana y la cromatografía en columna. La cromatografía líquida laminar o plana, consiste en la fase móvil que fluye a través de una fase estacionaria dispuesta en forma laminar o plana, de allí su nombre, y el flujo ocurre por capilaridad; en la cromatografía líquida en columna, la fase estacionaria está conformada por

pequeñas partículas que rellenan un tubo o una columna. Esta columna es generalmente de vidrio borosilicato, acero u otro material inerte.

Las columnas empacadas contienen un líquido no volátil depositado en partículas finas de soporte sólido inerte. El soporte debe ser de un material resistente en partículas pequeñas de forma constante, con gran área superficial. La mayoría de los soportes son de diatomita, consistente en los esqueletos de sílice de las algas microscópicas denominadas diatomeas. El soporte no debe interactuar al mínimo con los solutos. Un ejemplo de estas sílices y que además hay actualmente unas que presentan una alta pureza, es la Sephadex LH-20 la cual se usó para aislar la molécula de esta investigación. Esta sílice se usa en cromatografía líquida y está diseñada para moléculas presentes en los productos naturales como los esteroides, terpenos, lípidos y péptidos de bajo peso molecular. La ventaja de estas sílices de alta pureza es que son útiles tanto a escala analítica e industrial debido a que su composición está basada en retículos de dextrano que han sido hidroxipropilados para producir un cromatografía media, es decir, que presentan un carácter hidrófilo y lipófilo, esto hace que tenga un carácter dual de polaridad y así pueda interactuar con solventes orgánicos y agua. (Healthcare, 2007)

Existen columnas tubulares abiertas que son mucho más estrechas y suelen ser mucho más largas que las columnas empacadas. El diseño tubular abierto proporciona mayor resolución, menor tiempo de análisis y mayor sensibilidad que las columnas empacadas, pero con él se maneja una cantidad de muestra considerable menor. El aumento de la resolución se debe a que la longitud de la columna es mayor, con lo que aumenta el número de platos teóricos por unidad de longitud (Daniel, 2001)

3.2.6.2 Teoría de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

La espectroscopía RMN ayuda a identificar la estructura primaria de un compuesto orgánico. Los núcleos que tienen una cantidad impar de protones o un número impar de neutrones tienen propiedades magnéticas como lo indica un valor de su número cuántico de espín distinto a cero. Un núcleo que gira con propiedades magnéticas genera un campo magnético, en forma parecida al campo magnético que produce un pequeño imán de barra. En ausencia de un campo magnético aplicado, los momentos magnéticos asociados con los spins nucleares tiene orientación aleatoria. Sin embargo, cuando se coloca entre polos de un imán potente, los momentos magnéticos nucleares se alinean ya sea a favor o contra el

campo aplicado. Los que se alinean con el campo están en el estado espín alfa, de menor energía; los que se alinean contra el campo están en el estado espín beta, de mayor energía porque se necesita más energía para alinear el estado espín beta.

La radiación que se usa para suministrar energía está en la región de radiofrecuencia (rf) del espectro electromagnético. Cuando los núcleos absorben radiación de radiofrecuencia invierten rápidamente su espín y al hacerlo generan señales cuya frecuencia depende de la diferencia de energías entre los estados de espín alfa y beta. El espectrómetro RMN detecta esas señales y las muestra en forma de una gráfica de frecuencia de señal contra intensidad. Se dice que los núcleos están en resonancia con la radiación de rf y de aquí el término “resonancia magnética nuclear”.

Los espectrómetros de RMN actuales funcionan con frecuencia entre el rango 60 a 900 MHz. Mientras mayor sea la frecuencia de operación del instrumento mejor será la resolución del espectro. (Yurkanis Bruice, 2008)

4. Objetivos

4.1 Objetivo general.

Identificar, purificar y caracterizar la Salvinorina A, a partir de *Salvia divinorum* cultivada en la Universidad Icesi.

4.2 Objetivos específicos.

1. Obtener el material vegetal que previamente se cultivó en los espacios destinados por la universidad Icesi.
2. Purificar la Salvinorina A presente en las hojas de *Salvia divinorum*
3. Caracterizar la Salvinorina A por medio de métodos espectroscópicos
4. Continuar la evaluación de la molécula para conocer si está presenta alguna actividad terapéutica.

5. Metodología propuesta

5.1 Obtención del material vegetal

1. Conseguir el material vegetal el cual va ser sembrado por medio de esquejes.
2. Tomar esquejes pequeños a partir de la planta madre. (corte de 2 a 8 pulgadas de largo), cortar justo por debajo de un nodo.
3. Enraizar los esquejes, cada uno en una maceta individual. Con abono especializado.
4. Cuando los esquejes tienen varias raíces 1-2 cm de largo (aproximadamente 2 semanas), resembrar en suelo adecuado húmedo para evitar que se marchiten.
5. Riego constante y con humedad relativa superior a 50%.
6. la zona de siembra debe ser con luz de sombra y la luz solar filtrada, el rango de temperatura debe ser entre 15 - 27 ° C (60 - 80 F). Cultivada puede crecer rápido hasta 2 metros en 6 meses.

5.2 Extracción de los componentes no volátiles de la *Salvia divinorum*

1. Pesar el material vegetal
2. Adicionar el material vegetal a un Beaker de 600 mL,
3. Adicionar un volumen suficiente de solvente adecuado (en polaridad creciente: Hexano, Diclorometano, Acetato de etilo, Metanol y acetona), de tal forma que cubra el material vegetal.
4. Colocar el Beaker en un baño de ultrasonido por 20 minutos, sin necesidad de control de temperatura.
5. Filtrar con papel y embudo de porcelana, de modo que el marco quede libre de solvente.
6. El material vegetal se vuelve a sonicar por otros 20 minutos. Repita la adición de solvente al material vegetal hasta que el filtrado salga translucido, esto es con el fin de obtener mayor rendimiento.
7. Rotavaporar el filtrado.
8. Concentrar el filtrado en una Beaker de 50 mL, rotular y guardar en la nevera.
9. Adicionar el siguiente solvente en polaridad y repetir nuevamente el proceso de extracción. De esta manera se obtendrán cinco fracciones de polaridad creciente.
10. Realizar una TLC, sembrando las cinco fracciones.

11. Desarrollar la placa en una cámara de vidrio, donde habrá una mezcla de los solventes con polaridad adecuada para el arrastre. El mejor eluyente es una mezcla de Hexano:Acetato de etilo (1:1).
12. Revelar la placa con el reactivo de vainillina, en una plancha de calentamiento, colocar la placa y proporcionar calor para que se pueda revelar los diterpenos de la planta.
13. Definir cuál solvente es más afín para la extracción. El color representativo que resalta a las salvinorinas es el morado-rosáceo.

5.3 Extracción por medio de cromatografía en columna clásica.

1. Tomar una columna de diámetro adecuado, colocar en su extremo inferior un poco de algodón
2. rellenar con silica con un tamaño de partícula de 0.04 – 0.063 mm.
3. Hacer vacío por el extremo fino a la vez que se vibra de forma que el soporte sólido se empaque homogéneamente.
4. Se adiciona el extracto de salvia con el mejor solvente a un balón para rotavaporar de 25 mL con silica con un tamaño de partícula de 0.04 – 0.063 mm. Rotavaporar todo el solvente
5. Añadir en torno a un centímetro y medio de cabeza seca
6. Volver a rellenar con silica apropiadamente 4 cm más de silica y en el extremo superior poner un poco de algodón.
7. Para la separación, se van a trabajar varias proporciones de la mezcla n-hexano y acetato de etilo.

Hexano (mL)	AcOEt (mL)
100	0
90	10
80	20
70	30
60	40
50	50
40	50
30	70

Tabla 1. Diferentes proporciones de solventes para la separación y purificación de Salvinorina A.

8. Concentrar el filtrado de todas las fracciones en tubos de ensayo diferentes y rotular. Realizar TLC para verificar cual es la mejor elución.
9. Almacenar en el congelador.
10. Realizar otra columna con una silica gel 60 con tamaño de partícula de 0.015 – 0.040 mm.
11. Anadir una cabeza húmeda con la mezcla almacenada.
12. Eludir con las siguientes concentraciones: Hexano: AcOEt (50:50), Hexano: AcOEt (40:60), Hexano: AcOEt (30:70).
13. Realizar TLC, y sembrar de 3 en 3 (1, 4,7, 10....)
14. Finalizar la extracción con otro arrastre por cromatografía de columna, con los siguientes solventes: Metanol, acetona y agua.

5.4 Análisis de los espectros de RMN

1. Los resultados de los experimentos de RMN (^1H , ^{13}C y COSY, HSQC, HMBC) son ejecutados por la Universidad del valle.
2. Analizar los espectros por medio del programa MestReNova

6. Resultados

Después de recolectar el material vegetal, el cual tuvo un óptimo crecimiento, se procedió a secar las hojas recolectadas, por lo tanto se siguió con la extracción de los solventes propuestos en la metodología expuesta. Luego de realizar la extracción se prosiguió con la separación como se aprecia en la IMAGEN 2. Se aprecia que las mejores bandas de la cromatografía planar fueron obtenidas con diclorometano y acetato de etilo. Se decidió continuar con el diclorometano puesto que este presentaba la banda del color característico de la Salvinorina A comparada con la literatura investigada. ([Jhon & Hiran, 2009](#))

Posteriormente, se trabajó con la columna cromatografica rellena de silica con tamaño de partícula de 0.04-0.063 mm. Por esta columna se realizaron diversos corridos a distintas concentraciones para generar una mejor extracción del compuesto de interés. Se apreció que las mejores disoluciones fueron la de hexano: acetato de etilo (4:6) y hexano: acetato de etilo (5:5). A las fracciones obtenidas anteriormente se les realizó nuevamente una separación por medio de otra columna cromatografica rellena de silica gel con tamaño de partícula de menor tamaño para aumentar la resolución del sistema (0.015-0.04 mm) con el fin de poder separar mejor el analito.

Posteriormente, se trabajó con la columna cromatografica rellena de silica con tamaño de partícula de 0.04-0.063 mm. Por esta columna se realizaron diversos corridos a distintas concentraciones para generar una mejor extracción del compuesto de interés. Se apreció que las mejores disoluciones fueron la de hexano: acetato de etilo (4:6) y hexano: acetato de etilo (5:5). A las fracciones obtenidas anteriormente se les realizó nuevamente una separación por medio de otra columna cromatografica rellena de silica gel con tamaño de partícula de menor tamaño para aumentar la resolución del sistema (0.015-0.04 mm) con el fin de poder separar mejor el analito.

6.1 Cromatografía planar

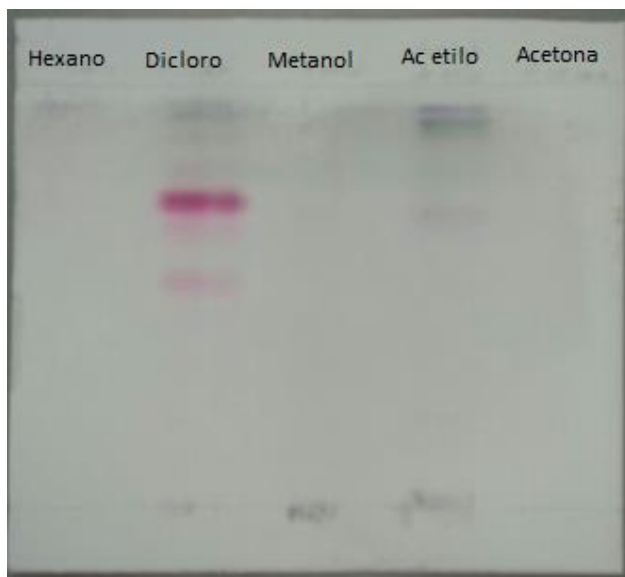


Imagen 3. Cromatoplaqueta de las muestras extraídas con Hexano, Diclorometano, metanol, acetato de etilo y acetona, usando como eluyente Hexano: Acetato de etilo (1:1).

Se recolectaron 109 tubos de ensayos y se realizó una TLC siguiendo el procedimiento descrito. Como eran muchas muestras en donde se encontraba la molécula, se mezclaron las muestras de la siguiente manera; los tubos del 11 al 18 se combinaron y esta muestra fue secada al vacío. Luego se combinaron del tubo 25 al 55 y del 56 al 79, a estas dos muestras se les realizó el mismo procedimiento de la fracción anterior y fueron nuevamente secadas al vacío. Las demás muestras no mostraron presencia de Salvinorina A por lo consiguiente no se decidieron tener en cuenta, esto fue confirmado por medio de una TLC que se realizó. Finalmente las muestras fueron rotuladas respectivamente ([Imagen 4](#)).

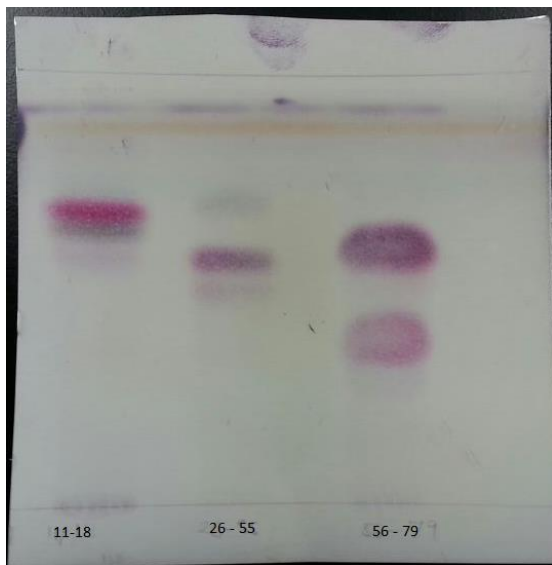


Imagen 4. Cromatoplaqueta de las fracciones obtenidas por cromatografía de columna

Dichas muestras rotuladas se solubilizaron en acetona y se mezcló el tubo (26-55) con el tubo (11 – 18) para obtener una sola fracción. A esta nueva mezcla se le adicionó una solución de hexano: acetato de etilo (6:3) para obtener una muestra más pura, está presentó un precipitado. Este precipitado se le lavo con el fin de obtener la máxima pureza del analito posible.

En conclusión para terminar la purificación se realizó otra columna con un relleno polimérico llamado *Lipophilic Sephadex LH 20* (25 -100 μm), con el fin de realizar una cromatografía de exclusión por tamaño molecular con el propósito de obtener la molécula más concentrada y pura. Dichas fracciones se eluyeron con diferentes fase móviles para finalizar el proceso de purificación, las fases móviles fueron: Agua: metanol (1:1), metanol, Agua: acetona (1:1) y acetona. Al realizar este procedimiento se observa en la [imagen 5](#), que todas las extracciones presentaban la molécula. Al final las muestras que contenían agua se liofilizaron para retirar el agua presente y obtener así una muestra concentrada con Salvinorina A. La muestra se dispuso para análisis RMN de 1 y 2 dimensiones.

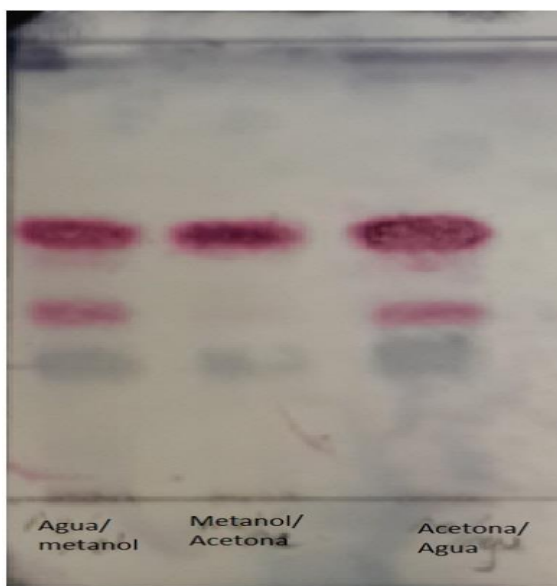


Imagen 5. Cromatoplaqa de las fracciones diluidas en acetona y metanol.

Los resultados obtenidos por medio de la técnica de RMN se mostraran a continuaci3n.

6.2 Espectros de RMN de ^{13}C

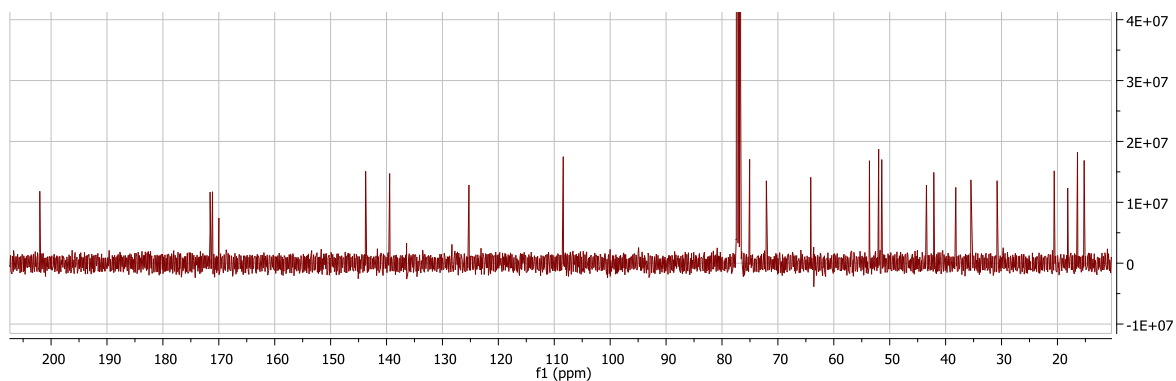


Imagen 6. Resultado del espectro RMN Carbono 13 (^{13}C) de la Salvinorina A en cloroformo.

Carbonos	Desplazamiento químico	H's	Integración	Tipo de carbono
20	15.22	1	1.00	q
19	16.41	1	1.06	q
7	18.16	1	0.72	s
22	20.57	1	1.00	q
3	30.80	1	0.84	t
9	35.48	1	0.66	p
6	38.19	1	0.99	t
5	42.12	1	0.72	p
11	43.43	1	1.07	t
8	51.42	1	0.67	s
23	51.98	1	0.98	q
4	53.62	1	0.78	s
10	64.12	1	0.78	s
12	72.06	1	0.89	s
2	75.05	1	1.11	s
14	108.39	1	0.80	s
13	125.26	1	0.42	p
16	139.44	1	0.71	s
15	143.73	1	0.86	s
21	169.99	1	0.03	p
17	171.13	1	0.43	p
18	171.56	1	0.77	p
1	202.02	1	0.49	p

Tablas 2. Datos de cada carbono que se expresan en el espectro de ^{13}C

6.3 Espectros de RMN de ^1H

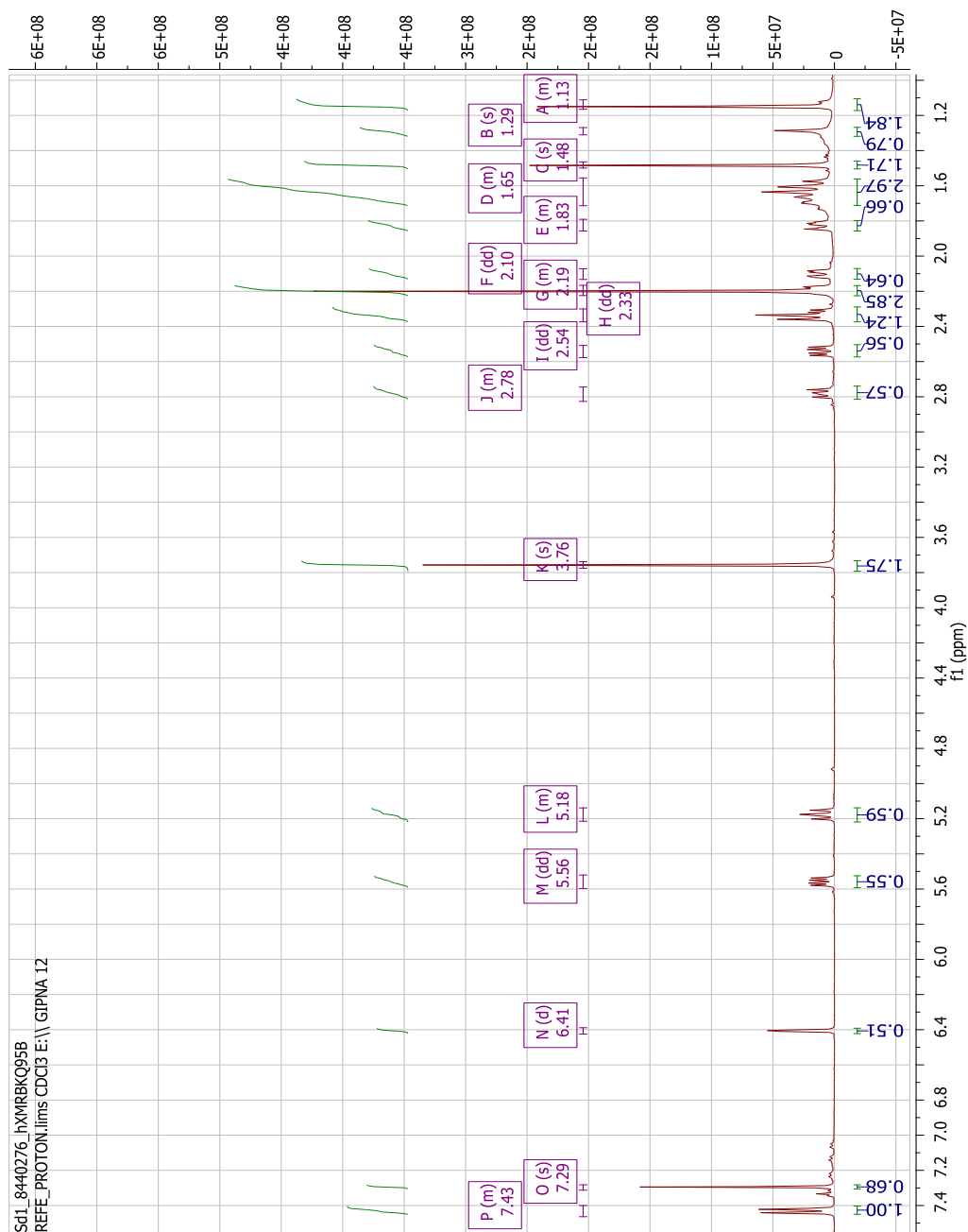


Imagen 7. Espectro RMN protónico (^1H) de la Salvinorina A, analizado por el programa MestReNova.

Protones	Desplazamiento químico	Integración	Clase	J's
16	7.43	1.00	m	
15	7.29	1.22	s	
14	6.41	0.49	m	
12 α	5.56	0.52	dd	5.16, 5.16
2 β	5.18	0.54	t	9.52
23	3.76	1.86	s	
4 β	2.78	0.53	t	8.24
11 α	2.54	0.55	dd	5.16, 5.16
3	2.33	1.18	dd	9.8, 5.32
22,10,7	2.20	3.02	s	
8	2.10	0.64	dd	2.48, 0.92
6 β	1.82	0.86	d	12.96
7 β ,6,11 β	1.62	2.81	m	11.34, 11.36, 12.76
20	1.49	2.11	s	
19	1.15	1.83	s	

Tablas 3. Datos de cada hidrogeno que se expresan en el espectro.

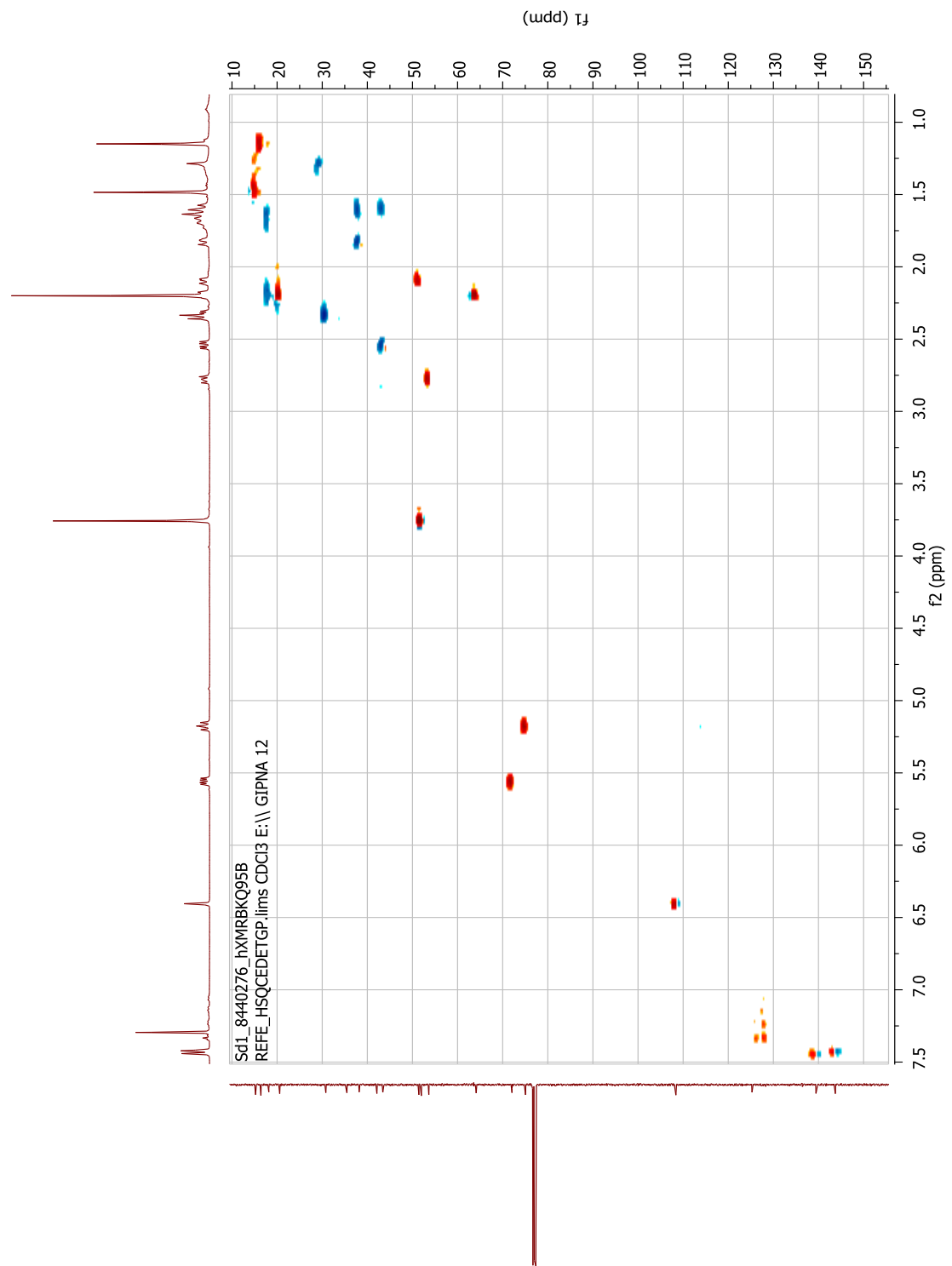


Imagen 8. Espectro RMN HSQC (^1H - ^{13}C) de la Salvinorina A, analizado por el programa MestReNova.

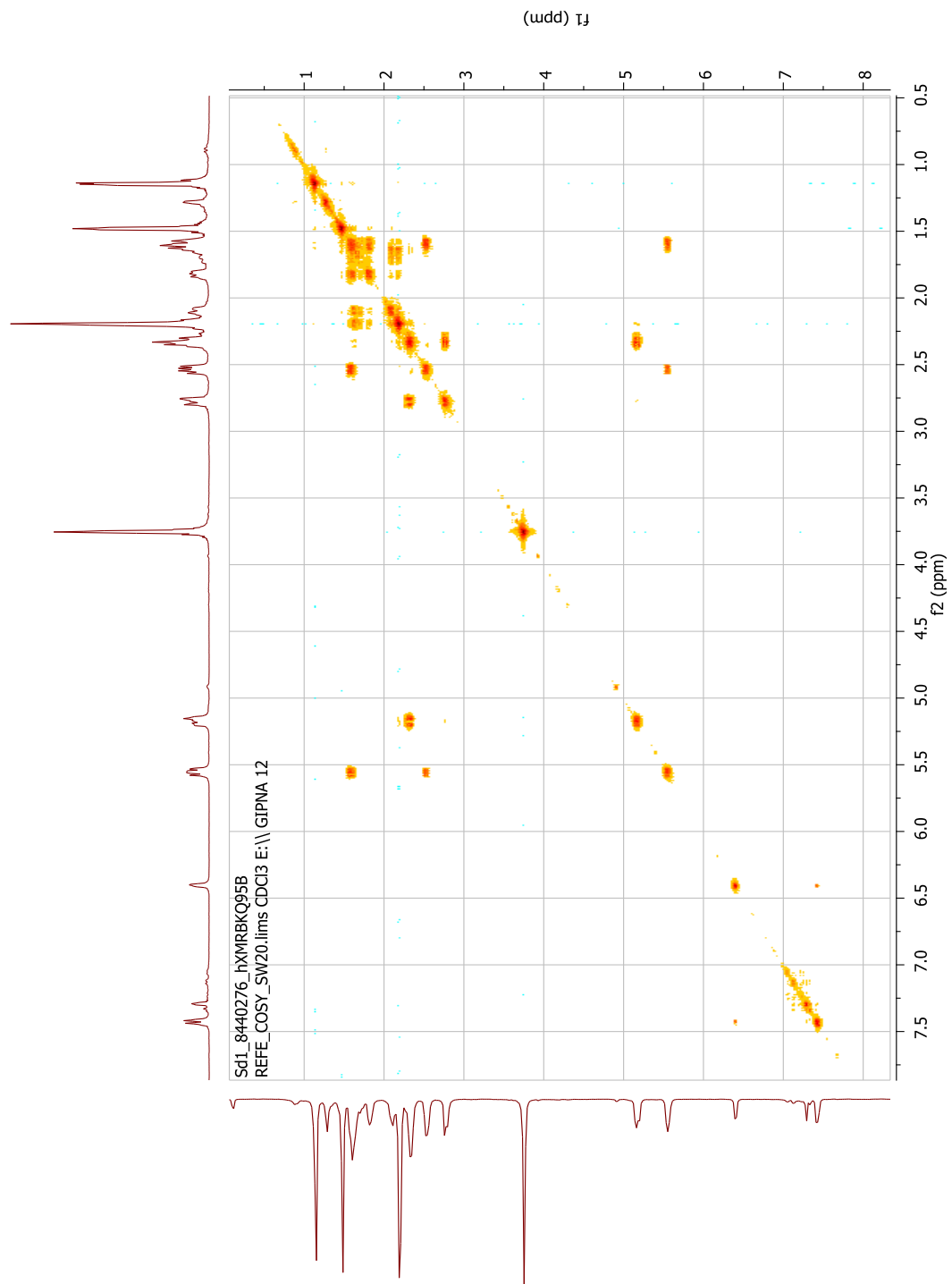


Imagen 9. Espectro RMN COSY (^1H - ^1H) de la Salvinorina A, analizado por el programa MestReNova.

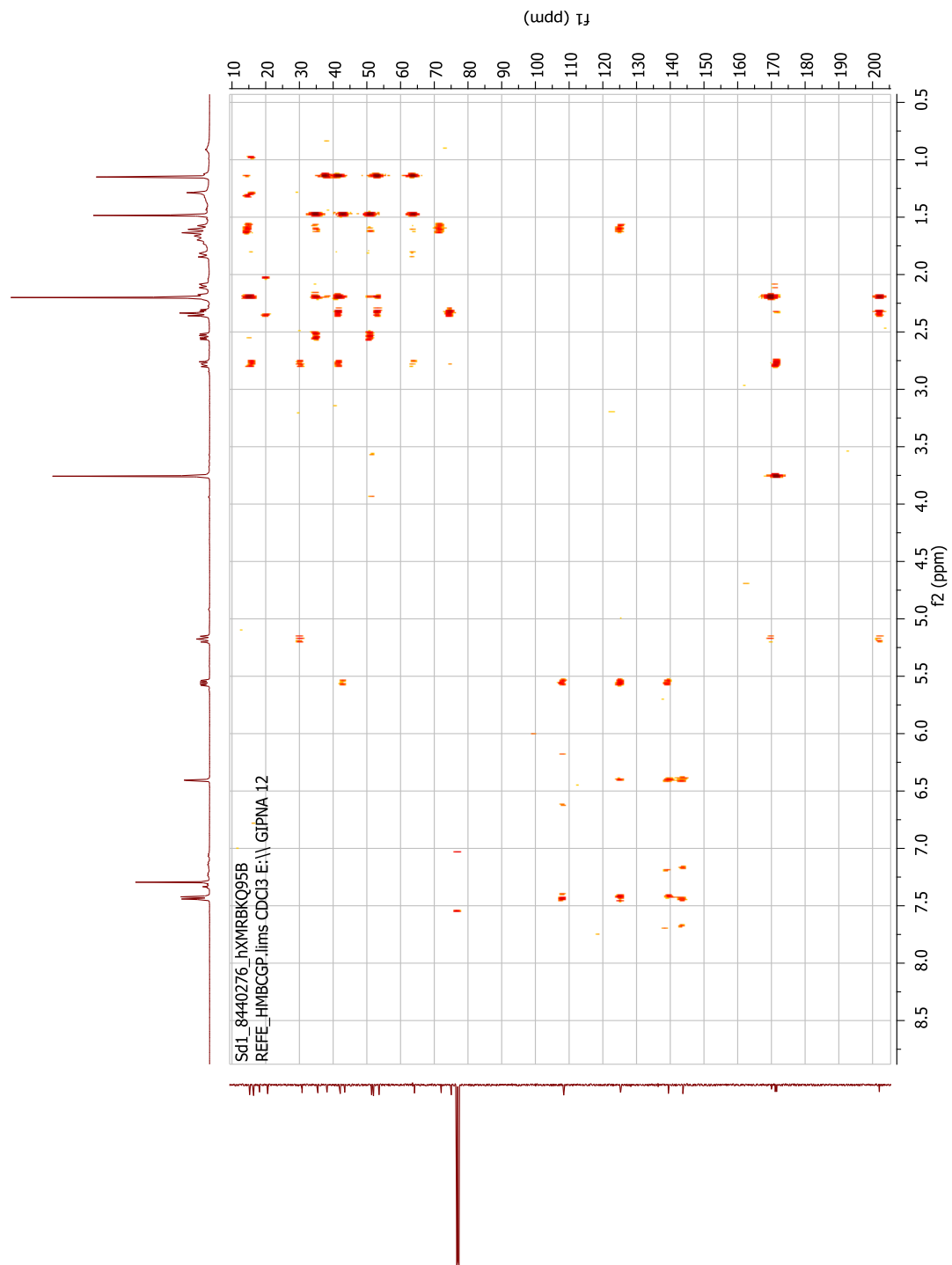


Imagen 10. Espectro RMN HMBC (^1H - ^{13}C) de la Salvinorina A, analizado por el programa MestReNova.

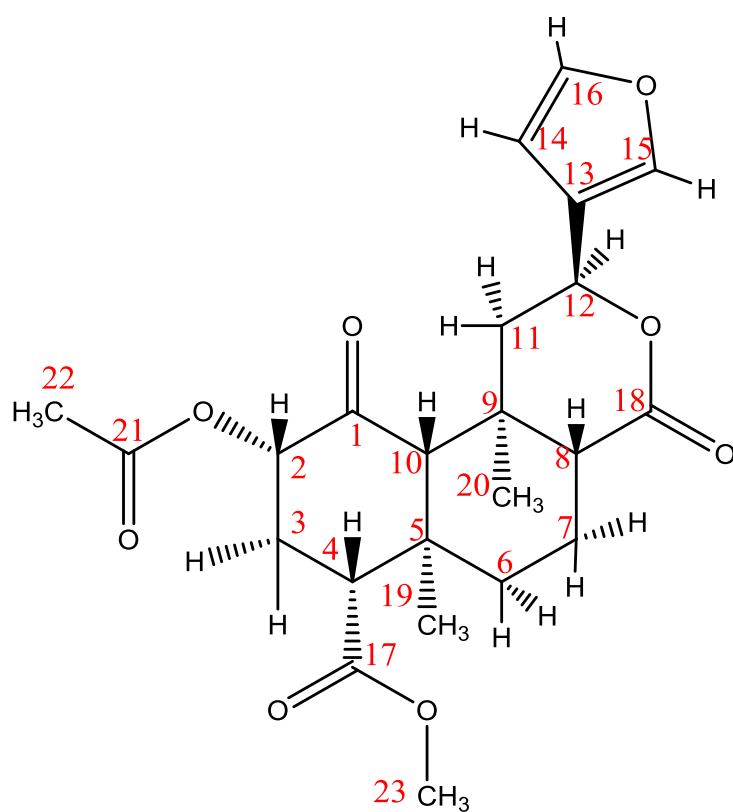


Figura 7. Estructura de la molécula propuesta mediante el análisis de los espectros de 1 y 2 dimensiones (^1H , ^{13}C , COSY, HSQC y HMBC).

7. Discusión

De acuerdo con los resultados de la universidad del valle, se analizaron para obtener la molécula propuesta (Figura 7). Los espectros de ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC y HMBC fueron analizados por medio del programa MestReNova y con ello se sacaron las conclusiones y una predicción de la molécula. Se analizaron las señales características de la Salvinorina A comparando todos los espectros. Se logra observar que existe una similitud entre C-19 y C-20 debido a que ambos indican grupos metilos, estos arrojan las señales de 16.41 y 15.22 ppm respectivamente en el espectro de carbono 13, sin embargo se asigna la señal de 15.22 ppm al carbono 20 debido a que este no está siendo afectado electronegativamente por ningún grupo a diferencia del carbono 19 que se encuentra cerca al éster carbonilo (C-17). Además estos dos grupos metilos presentaban correlación a un centro cuaternario, a dos metinos y a un metileno; uno de estos grupos metino (C-4 o C-8, con señales de 53.62 y 51.42 ppm) en ambos casos presentan un éster y un grupo metileno, mientras que el otro metino (C-10, con señal de 64.12 ppm) era común a ambos grupos metilos. Los otros dos grupos metilos C-22 y C-23 (señales de 20.57 y 51.98 ppm) se diferencian claramente debido a que el segundo presenta una señal de unión a un oxígeno, lo que diferencia este grupo metilo del otro. La asignación del metilo (C-19), fue hecha además sobre la base de una fuerte correlación observada en el espectro HMBC (Imagen 11), debido a que la señal de este metilo mostro correlación al acetiloxi (C-4), al carbono cuaternario (C-5), al metileno (C-6) y al metino (C-10). Mientras que C-20 presentaba correlación al metino (C-8), al carbono cuaternario (C-9), al metino (C-10) y al metileno (C-11).

Siguiendo con las señales del espectro ^{13}C , se analizaron 4 grupos metilenos C-3, C-6, C-7 y C-11 con sus respectivas señales de 30.80, 35.48, 18.16 y 42.12 ppm y la asignación de los protones diastereotópicos se realizó sobre la base de los valores de J que se obtuvieron mediante la evaluación del espectro ^1H . Para explicar cada señal se hizo relación también con el espectro HSQC (Imagen 9), y a su vez también se analizó el espectro HMBC (Imagen 11). Respecto al metileno C-3, se observa en el HSQC, que este tiene correlación una señal protónica las cual fue 2.33 ppm que se aprecia en la tablas 3, y para rectificar esta señal se analizó el respectivo espectro HMBC el cual nos indicó que este protón mostro correlación a la cetona (C-1), al metil éster (C-2), al acetiloxi (C-4), al carbono cuaternario (C-5) y al metilo (C-22) respectivamente. Para designar la posición de los hidrógenos

de este metileno se analizaron las constantes de acoplamiento de cada protón y se comparó con las de los protones vecinos para determinar también su posición. Los átomos axiales muestran mayores constantes de acoplamiento que los átomos ecuatoriales, esto es según la relación que presentan entre la constante de acoplamiento (J) (Pretsch, CLerc, Seibl, & Simon, 1980) y el ángulo dihedral de torsión que se presenta por RMN, esto se evalúa mediante la ecuación de Karplus (Riech, 2010). El rango de las constantes de acoplamientos vecinales de los compuestos alicíclicos saturados son: $J_{ax-ax} = 8...13$, $J_{eq-ax} = 2...6$, $J_{eq-eq} = 2...5$. (Pretsch, CLerc, Seibl, & Simon, 1980). Para mayor facilidad en el nombramiento de la posición del protón, se denomina α a la posición ecuatorial y β a la posición axial (Belsner, Buchele, Werz, & Simmet, 2003). Teniendo esto en cuenta, se asignaron las orientaciones de los protones del metileno C-3 ($J_{3\alpha} = 5.32$ y $J_{3\beta} = 9.8$). Con dichas asignaciones, también se concluyeron las orientaciones de los metino C-2 y C-4.

Siguiendo con el metileno C-6, al igual que el carbono anterior, este presenta dos señales debido a que un hidrogeno tiene orientación axial y el otro hidrogeno es de orientación ecuatorial. Para explicar la señal de 1.82 ppm de uno de estos carbonos se observa que según el espectro HMBC está correlacionado a C-5, C-8 y C-10 aunque sus señales sean débiles en este espectro, en COSY este presentaba correlación con el hidrogeno del metileno C-7 rectificando la elección de dicho carbono. El otro carbono que se encontraba a señal de 1.62 ppm, presentó las mismas correlaciones, sin embargo se rectificó su justificación por medio del espectro HSQC (Imagen 8).

Con la justificación del siguiente metileno C-7, este presentó características similares al metileno C-6, pero una de sus señales se desplegó a diferente desplazamiento. El primer protón se observaba en la señal 1.62 ppm que a su vez también había mostrado expresión de uno de los carbonos de C-6 y C-11 como se evidencia en el espectro HSQC (Imagen 8). Dicha señal mostró correlación según HMBC a C-8, C-9 y C-20. La siguiente señal del otro protón C-7 se encontró a 2.20 ppm que está a su vez estaba correlacionada con la señal del metilo C-22, sin embargo en HMBC se hallaba correlacionado a C-6, C-8, C-9 y C-20.

Finalmente el metileno C-11 que también presentó dos señales separadas, se identificó por HMBC el cual como se mencionó anteriormente a 1.62 ppm estaba correlacionado a C-9, C-12 y C-13. El otro protón presentó una señal a 2.54 ppm, donde esta señal era un doble doblete, y que según HMBC se correlacionaba a C-9, C-8 y C-20. Se asignaron las orientaciones de los protones del metileno C-11 de acuerdo sus constantes de acoplamiento halladas ($J_{11\alpha} = 5.16$ y $J_{3\beta} = 12.76$).

Con dichas asignaciones, también se concluyó la orientación del metino C-12. Todas las señales también se justificaron por medio de HSQC y presentaron coherencia entre los espectros presentados. Continuando con las señales del espectro, hay presencia de grupos éster que son: C-17 con señal de 171.13, C-18 con señal de 171.56 y C-21 con señal de 169.99.

La señal del hidrógeno del metil éster (C-2), por otra parte, mostró correlaciones confirmadas por HMBC al carbonilo de la cetona (C-1), al carbonilo de etilo (C-21), que a su vez se correlaciona al grupo de acetato de metilo (C-22) y al metileno (C-3). Adicional a esto, hubo correlación entre la señal de hidrógeno del grupo metoxilo (C-23) con el éster carbonilo (C-17), y de la señal de hidrógeno de (C-8) con el carbonilo de la lactona (C-18). Otra señal que fue crucial para la asignación la predicción de la molécula fue el hidrogeno del metino (C-12). Este hidrogeno también presento correlaciones COSY con los dos hidrógenos del metileno C-11. Correlaciones COSY útiles también se observaron entre los C-4 y el grupo metileno C-3, adicional a esto el hidrogeno del C-4 mostro correlación HMBC con carbono cuaternario (C-5), el metino (C-10), el metileno (C-3) y con el éster carbonilo (C-17).

Se observo un solapamiento de las señales del espectro protónico de la *Salvia divinorum* debido a la presencia de grupos funcionales iguales en la molécula, los cuales se presentan en una misma región, generando así señales próximas.

Luego de haber analizado y de explicar cada señal de los espectros y sus respectivas correlaciones, se pudo identificar que la molécula es parecida a la Salvinorina A, sin embargo no se logró justificar adecuadamente las señales del furano porque estas no eran lo suficientemente fuertes para mostrar sus correlaciones, aunque el proceso de purificación tuvo éxito y se logró obtener una muestra lo suficientemente pura para la caracterización de la misma, era muy poca la cantidad de muestra que se obtuvo, esto pudo afectar en los análisis de RMN y que la señal de furano no saliera tan fuerte como se esperaba. De igual modo este resultado indica que la siembra de la planta fue un éxito y que se realizó con todos los cuidados y las especificaciones expuestas en la metodología.

8. Conclusiones

- Se consiguió caracterizar correctamente una molécula presente en *Salvia divinorum*, mediante una purificación por técnicas separativas como cromatografía de columna y posterior a esto a través de técnicas de resonancia magnética nuclear de una y dos dimensiones.
- No se puede asegurar que sea la Salvinorina A puesto que la parte del furano no se puede ver clara en los espectros y faltaría obtener mayor información sobre este para asegurar que sea el furano característico de dicha molécula psicoactiva.
- Se concluye que la investigación tuvo éxito porque se logro identificar una molécula parecida al compuesto principal de *Salvia divinorum*, sin embargo se requiere seguir con la investigación para concretar la identificación exacta de la Salvinorina A.

9. Recomendaciones

- Cultivar según las especificaciones o de lo contrario esto afectara el desarrollo del metabolito secundario principal, porqué la planta puede sufrir de estrés y no producirlo en la cantidad necesaria.
- Para que el método sea reproducible, debe ser validado y estandarizado. Se deben evaluar los criterios principales exactitud, precisión, selectividad, linealidad, intervalo, límite de detección y límite de cuantificación.

10. Referencias

- Belsner, K., Buchele, B., Werz, U., & Simmet, T. (2003). Structural analysis of 3-acetyl-20(29)-lupene-24-oic acid a novel pentacyclic triterpene isolated from the gum resin of *Boswellia serrata*, by NMR spectroscopy. *Magn. Reson. Chem* , 629–632.
- Butelman, e., Rus, s., Prizinsano, t., & Kreek, m. (2010). The discriminative effects of the κ -opioid hallucinogen salvinorin A in nohuman primates:dissociation from clasicc hallucinogen effects. *Psychopharmacology* .
- Capasso, R., Borrelli, F., Cascio, M., Aviello, G., Huben, K., Zjawiony, J., et al. (2008). Inhibitory effect of salvinorin A, from *Salvia divinorum*, on ileitis-induced hypermotility:cross-talk between j-opioid and cannabinoid CB1 receptors. *British journal of pharmacology* , 681- 689.
- Casselmann, I., Nock, C., Wohlmuth, H., Weatherby, R., & Heinrich, M. (2014). From local to global- fifty years of research on *Salvia divinorum* . *Elsevier- Journal of Ethnopharmacology* , 769- 775.
- Chavkin, C., Sud, S., Jin, W., Stewart, J., Zjawiony, J., Siebert, D., et al. (2004). Salvinorin A, an Active Component of the Hallucinogenic Sage *Salvia divinorum* Is a Highly Efficacious K-Opioid Receptor Agonist: Structural and Functional Considerations. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics* , 1197- 1203.
- Daniel, H. (2001). *Analisis Quimico Cuantitativo* . Barcelona: Grupo Editorial Iberoamerica .
- Detrick, b. (23 de diciembre de 2010). *Salvia Takes a Sterring Role* . *The New York Times* , p. ST1.
- Giner, J., Kiemle, D., Kutrzeba, L., & Zjawiony, J. (2007). Unambiguous NMR spectral assignments of salvinorin A. *Magnetic resonance in chemestry* , 351-354.
- Grill, M., Neri, E., Zappettini, S., Massa, F., Bisio, A., Romussi, G., et al. (2009). Salvinorin A exerts opposite presynaptic controls on neurotransmitterexocytosis from mouse brain nerve terminals. *Elseiver- neuropharmacology* , 523-530.
- H, R., & M, D. (2012). *Rang y Dale farmacologia- septima edicion*. Barcelona: Elsevier.
- Harding, W., Schmidt, M., Tidgewell, K., Kannan, P., Holden, K., Dersch, C., et al. (2006). Synthetic studies of neoclerodane diterpenes from *Salvia divinorum*:

Selective modification of the furan ring. *Elsevier- Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* , 3170- 3174.

Healthcare, G. (1 de mayo de 2007). *gel life science*. From gel life science: http://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314716762536/litdoc18110722AB_20110830184615.pdf

Jhon, J., & Hiran, E. (2009). Analysing *Salvia divinorum* and its active ingredient salvinin A utilizing thin layer Chromatography and Gass Chromatography / mass Spectrometry. *Journal Forensic Science* , 612-616.

Kane, B., Nieto, M., McCurdy, C., & Ferguson, D. (2006). A unique binding epitope for salvinin A, a non-nitrogenous kappa opioid receptor agonist . *The FEBS Journal* , 1966-1974.

Kane, B., Nieto, M., McCurdy, C., & Ferguson, D. (2006). A unique binding epitope for salvinin A, a non-nitrogenous kappa opioid receptor agonist. *The FEBS Journal* , 1966-1974.

Kelly, B. (2011). legally tripping: A qualitative profile of *salvia divinorum* use among young adults . *Journal of psychoactive Drugs* , 46-54.

Kutrzeba, I., Dayan, f., Howell, j., Feng, j., Giner, j., & Zjawiony, j. (2007). Biosynthesis of salvinin A proceeds via the deoxyxylulose phosphate pathway. *Elsevier* , 1872-1881.

Lee, D., Ma, Z., Liu-che, L.-y., Wang, y., Chen, y., Carlezon, w., et al. (2005). New neoclerodane diterpenoids isolated from leaves of *salvia divinorum* and their binding affinities for human k opioid receptors. *Elsevier* , 5635-5639.

Lopez, m., & Lopez, s. (6 de mayo de 2014). *El Pais*. From El Pais : <http://www.elpais.com.co/elpais/colombia/noticias/salvia-divinorum-llena-colores-ciudad-blanca>

Mendelson, J. (29 de mayo de 2013). *Clinical trials* . From Clinical trials : <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01149824?term=salvia+divinorum&rank=2>

Nuñez, P. (1998). Las drogas en la historia . *Salud Uninorte* , 23-30.

Pretsch, E., CLerc, T., Seibl, J., & Simon, W. (1980). *Tablas para la eludacion estructural de compuestos organicos por metodos espectroscopicos* . madrid: Alhambra .

Prisinzano, T. E. (2005). Psychopharmacology of hallucinogenic sage *Salvia divinorum* . *Elsevier* .

- Reisfield, A. (1993). The Botany Of *Salvia divinorum* (Labiata). *SIDA* 15 , 349-366.
- Riech, J. (2010). *BIOMOLECULAR NMR SPECTROSCOPY AT TU MÜNCHEN*.
From University of Wisconsin:
http://www.nmr.ch.tum.de/home/dames/J_reich_uwisc.pdf
- Roth, B., Baner, K., Westkaemper, R., Siebert, D., Rice, K., Steinberg, S., et al. (2002). Salvinorin A: A potent naturally occurring nonnitrogenous κ opioid selective agonist. *PNAS* , 11934-11939.
- Siebert, D. (2004). Localization of Salvinorin A and Related Compounds in Glandular Trichomes of the Psychoactive Sage, *Salvia divinorum*. *Annals of Botany Company* , 763- 771.
- Siebert, D. (10 de 1 de 2013). *sagewisdom*. From sagewisdom:
<http://www.sagewisdom.org/salvgrow.html>
- Silverstein, R., Webster, F., & Kiemle, D. (2005). *Spectrometric identification of organic compounds*. New Jersey: Jhon Wiley & Sons, INC.
- Vortherms, T., & Roth, B. (2006). Slvinorin A from natural products to human therapeutics. *molecular interventions* , 259-267.
- Vortherms, V., & Roth, B. (n.d.). Salvinorin A from natural product .
- W.H. Li, J., & Vederas, j. (2009). Drug discovery and natural products: end of an era or endless frontier? *Science magazine* , 161-165.
- Wasson, G. (28 de 12 de 1962). *biodiversity heritage library*. From biodiversity heritage library:
<http://www.biodiversitylibrary.org/page/7466461#page/75/mode/1up>
- Willmore-Fordham, C., Krall, D., McCurdy, C., & Kinder, D. (2007). The hallucinogen derived from *Salvia divinorum*, salvinorin A, has κ -opioid agonist discriminative stimulus effects in rats. *Elsevier- neuropharmacology* , 481-486.
- Yurkanis Bruice, P. (2008). *Quimica Organica. Quinta Edicion*. Naucalpna de Juarez: Pearson educacion.