



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DEL ESTADO DE HIDALGO**

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN QUÍMICA

Estudio químico de *Stevia tomentosa*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN QUÍMICA

P R E S E N T A:

Q. F. B. ALEJANDRO VALDEZ CALDERÓN

ASESOR:

DR. J. JESÚS MARTÍN TORRES VALENCIA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
Área Académica de Química

Mtro. Julio César Leines Medécigo
Director de Administración Escolar de la
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
P r e s e n t e

Estimado Maestro:

Por este conducto le comunico que el jurado asignado al pasante de la Maestría en Química **Alejandro Valdez Calderón**, quien presenta el trabajo de titulación "**Estudio químico de *Stevia tomentosa***", después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del Jurado:

PRESIDENTE: Dr. José Roberto Villagómez Ibarra

SECRETARIO: Dr. Luis Gerardo Zepeda Vallejo

VOCAL: Dr. J. Jesús Martín Torres Valencia

SUPLENTE: Dra. Myriam Meléndez Rodríguez

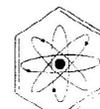
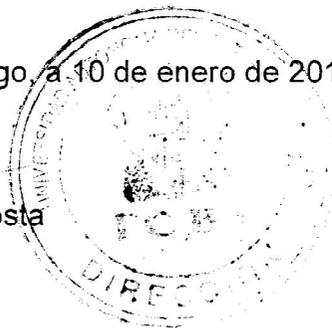
Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

A t e n t a m e n t e

"Amor, Orden y Progreso"

Mineral de la Reforma, Hidalgo, a 10 de enero de 2011.


M. en C. Octavio Castillo Acosta
Director del ICBI



AGRADECIMIENTOS.

A Dios por darme la oportunidad de seguir en este camino a veces tan difícil pero mayormente maravilloso como lo es la vida misma.

A mis Padres María de Lourdes y Manuel por todo el amor que me han demostrado siempre y su apoyo incondicional en todas las decisiones de mi vida. Son mi mas grande ejemplo de superación y sobre todo para tratar de ser mejor persona cada día.

A mis hermanos Manuel y Jorge que también son grandes amigos les agradezco el apoyo que me han mostrado siempre y por enseñarme que la honestidad y el trabajo diario es la forma de salir adelante.

A mis sobrinos Brenda Paola y Jorge Alejandro por el simple hecho de estar en mi vida y hacerme sentir un amor tan especial que me hace tratar de ser mejor cada día y darles el mejor ejemplo como persona.

A mi cuñada Martha, mis abuelos y mi familia en general que me han demostrado su solidaridad y cariño siempre.

A mis amigos que se han convertido en mis hermanos: Lluvia, Odeth, Ernesto Lennin, Ramón, Mario, Eric Rodrigo y Eric Mark por compartir momentos alegres pero sobre todo momentos difíciles.

A mis amigos del CIQ Laura Adriana, Rosa María, Rosa Inés, Gabriela, René, Arian, Mario, Luis e Ismael por su apoyo académico y por los gratos momentos que he pasado gracias a ustedes.

A mis profesores y compañeros en general del CIQ por sus valiosas enseñanzas y apoyo académico que me brindaron.

A los Doctores Myriam Meléndez Rodríguez, Luis Gerardo Zepeda Vallejo y José Roberto Villagómez Ibarra por ser parte de mi comité tutorial a lo largo de la Maestría y por tomarse el tiempo de revisar el trabajo de tesis.

A CONACYT por el apoyo económico brindado para la realización del posgrado, a través del número de becario: 225808

A los Doctores Luisa Urania Román Marín y Juan Diego Hernández Hernández, de los cuales siempre recordaré la ocasión en que me invitaron a su laboratorio de investigación y que marcó el rumbo de mi vida. Nunca olvidaré sus enseñanzas tanto académicas como de vida.

Especial agradecimiento al Doctor J. Jesús Martín Torres Valencia primeramente por aceptarme en su grupo de trabajo y por ser un excelente director del proyecto desarrollado. Ha sido un gran ejemplo como investigador y he aprendido mucho de usted en el aspecto académico. Pero sobre todo agradezco la amistad y el apoyo brindado siempre y el ejemplo que ha sido para conducirme de la mejor manera en todos los aspectos de la vida.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, bajo la dirección del Dr. J. Jesús Martín Torres Valencia (CIQ-UAEH), con una beca del proyecto apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) “Estudio químico biodirigido de especies medicinales del estado de Hidalgo para la obtención de principios activos anticancerosos y antiinflamatorios” (ref. U2-80555).

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

$[\alpha]_D$	Rotación específica
°C	Grados Celsius
AcOEt	Acetato de etilo
Ang	Angelato
ATP	Trifosfato de adenosina
<i>c</i>	Concentración
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
cm	Centímetro
CoA	Coenzima A
COSY	Correlation Spectroscopy
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
Esq.	Esquema
etc	Etcetera
EtOH	Etanol
FDA	Food and Drug Association
fig.	Figura
g	Gramo
Glc	Glucosa
h	Hora
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz
IR	Infrarrojo
<i>J</i>	Constante de acoplamiento

L	Litro
m	Metro
Me	Metilo
MeBu	Metilbutirato
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
MHz	Megahertz
mL	Mililitro
mm	Milímetro
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide
No.	Número
p.f.	Punto de fusión
pH	Potencial de hidrógeno
ppm	Partes por millón
R _f	Factor de retención
RMN	Resonancia magnética nuclear
S.	<i>Stevia</i>
SAM	S-adenosylmethionine
TMS	Tetrametilsilano
UDP	Uridine diphosphate
ν_{\max}	Longitud de onda máxima

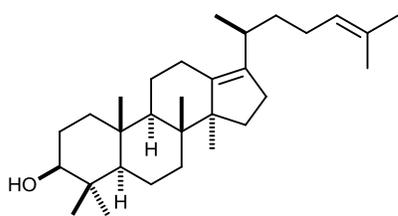
ÍNDICE

	Página
Resumen	1
1. Introducción	2
1.1. Productos naturales	2
1.1.1. Historia	2
1.1.2. Metabolitos primarios y secundarios	7
1.1.2.1. Terpenos	8
1.1.2.2. Flavonoides	10
2. Antecedentes.	12
2.1 Género <i>Stevia</i>	12
2.2 Composición química del género <i>Stevia</i>	15
3. Objetivo	25
4. Justificación	26
5. Resultados y Discusión	27
5.1 Colecta, identificación de la especie y obtención de extractos	27
5.2. Estudio químico de <i>Stevia tomentosa</i>	28
5.2.1. Estudio químico de la raíz de <i>Stevia tomentosa</i>	28
5.2.1.1 Separación cromatográfica del extracto hexánico	28

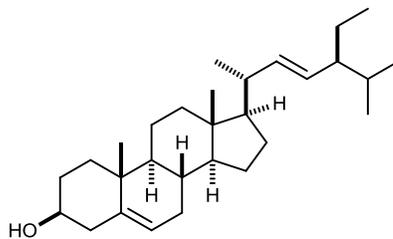
5.2.1.1.1 Biosíntesis del (20S) dammara-13(17), 24-dienol (1)	34
5.2.1.2 Separación cromatográfica del extracto metanólico	36
5.2.1.2.1 Biosíntesis del estigmasterol (2)	41
5.2.2. Estudio químico de la parte aérea de <i>Stevia tomentosa</i>	43
5.2.2.1. Separación cromatográfica del extracto metanólico	43
5.2.2.1.1 Biosíntesis del acetato de lupeol (3)	47
5.2.2.1.2 Biosíntesis del óxido de β -cariofileno (4)	55
5.2.2.1.3 Biosíntesis del crisosplenol C (5)	67
5.2.2.1.4. Biosíntesis de la isoquercitrina (6)	73
5.2.2.2. Separación cromatográfica del extracto clorofórmico	74
5.2.2.2.1 Biosíntesis de la guayanólida A (7)	86
6. Conclusiones	99
7. Parte Experimental	102
7.1. Generalidades	102
7.2. Desarrollo experimental	103
8. Referencias	110

RESUMEN

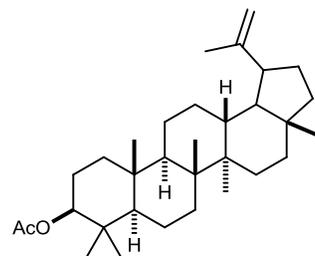
La separación cromatográfica de los extractos de hexano y MeOH de las raíces de *Stevia tomentosa* condujo a la obtención de los compuestos (20S)-dammara-13(17),24-dienol (**1**) y estigmasterol (**2**). La separación cromatográfica de los extractos de CHCl₃ y MeOH de la parte aérea permitió el aislamiento de los compuestos acetato de lupeol (**3**), óxido de β-cariofileno (**4**), crisosplenol C (**5**), isoquercitrina (**6**), guayanólida A (**7**) y 5,6-dihidroxi-3,7,3',4'-tetrametoxiflavona (**8**). Los compuestos **1**, **5** y **8** se describen por primera vez en el género *Stevia*, mientras que el compuesto **7** representa un producto natural nuevo.



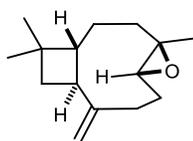
1



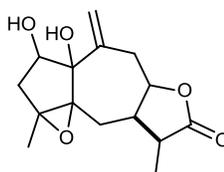
2



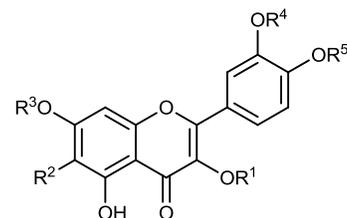
3



4



7



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
5	Me	OH	Me	Me	H
6	Glc	H	H	H	H
8	Me	OH	Me	Me	Me

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Productos naturales

1.1.1. Historia

Las plantas siempre han sido fuente de alimento, vestido, material de construcción, energía y medicina para el género humano; es por lo tanto natural que el hombre desde épocas primitivas comenzara a identificarlas y seleccionarlas de acuerdo con sus necesidades, haciendo énfasis en aquellas que afectan la salud ya sea en forma positiva o negativa.

La medicina tradicional o herbolaria se refiere al uso de plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades y ha tenido gran relevancia a lo largo de la historia del hombre. La utilización de la flora a nivel comercial y terapéutico ha estado estrechamente relacionada con el desarrollo de las culturas.



Los chinos han dejado testimonio escrito desde hace más de 4000 años del uso como antimalárico de la droga Ch'ang Shang (raíces de *Dichroa febrifuga*). El uso de la planta venenosa conocida como cicuta (*Conium maculatum*) para imponer la pena de muerte se encuentra perfectamente documentada en escritos griegos de hace más de 2000 años.

En América, mucho antes de la llegada de los europeos, ya se tenía un amplio conocimiento del empleo de plantas desde los puntos de vista artesanal, alimenticio y medicinal. Se conocía el procedimiento para obtener el hule del árbol llamado *Castilla elástica*, con el que se elaboraban numerosos objetos, entre ellos las pelotas utilizadas en el juego ritual tan extendido entre los pueblos mesoamericanos.

Los principios activos contenidos en plantas curativas conocidas desde la antigüedad comenzaron a ser aislados y purificados. En 1805 Serturmer obtiene el primer metabolito secundario al aislar la morfina (**9**) del opio, y en 1820 Pelletier y Caventou aislaron la quinina (**10**) y la cinchonina (**11**) de la corteza de quina.



Cabezuelas del opio

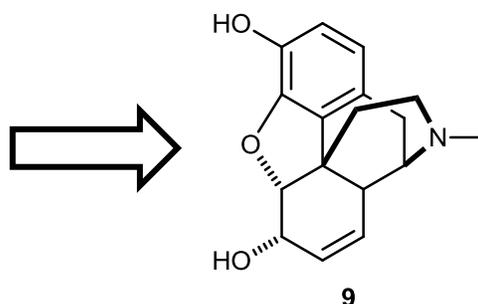


Figura 1.1. Primer metabolito secundario aislado.

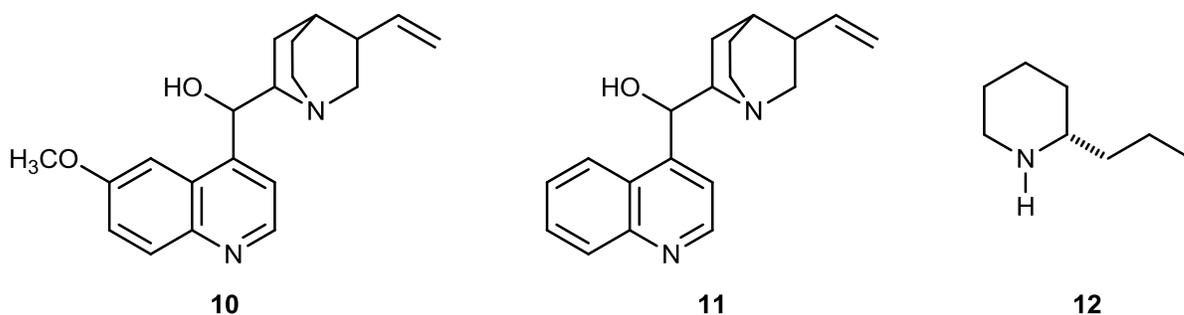
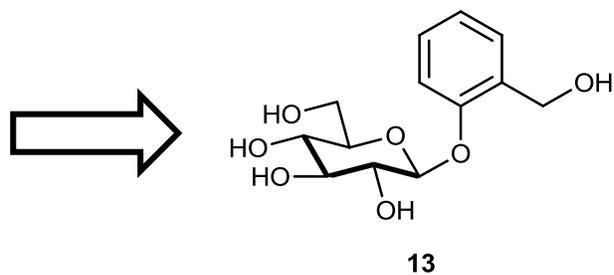


Figura 1.2. Alcaloides aislados de la corteza de quina y de la cicuta.

Por esas épocas otros principios activos fueron aislados, en 1827 Giesecke obtuvo el principal alcaloide tóxico de la cicuta, la coniina (**12**) cuya fórmula fue establecida en 1842 como $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{N}$ por el químico mexicano Vicente Ortigosa; pasaron 39 años hasta que el químico Hofmann estableciera su estructura como 2-propilpiperidina ($\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}$), difiriendo solo en un átomo de hidrógeno con respecto a la fórmula de Ortigosa. En 1829 Leroux aisló la salicina (**13**) del sauce, de donde más tarde se obtuvo la aspirina (Romo de Vivar, 2006).



Sauce blanco

Figura 1.3. Salicina (**13**) aislada del sauce blanco y precursor de la aspirina.

Las investigaciones químicas continuaron y los conocimientos se perfeccionaron. Los investigadores no se conformaban con el análisis que indicara los tipos de átomos que tenía la molécula, ni siquiera cuántos de ellos contenía, era necesaria saber en que forma se encontraban ordenados y unidos en la molécula, es decir, determinar su estructura. Esto se lograba con gran lentitud, como en el caso de la determinación estructural de la quinina (**10**), cuya estructura completa quedó confirmada después de 100 años. Los químicos iban adquiriendo mayor destreza en el aislamiento y purificación de sustancias naturales (Romo de Vivar, 2006).

Los estudios químicos y biológicos sobre especies empleadas en medicina tradicional han permitido contar con sustancias promisorias para el tratamiento de varias enfermedades, como las crónico-degenerativas, entre las cuales se encuentran la diabetes, el cáncer y la inflamación, así como las causadas por parásitos, bacterias y virus. Se acepta que, aproximadamente el 60% de los fármacos comerciales conocidos tuvo su origen en la estructura y actividad biológica de un producto natural. Por tal razón la investigación sobre productos naturales sigue en vigencia y representa una de las principales fuentes de principios activos líderes para el tratamiento de diversos padecimientos. En Estados Unidos, algunos compuestos derivados de plantas se han utilizado como fármacos anticancerígenos, entre los que se encuentran: el taxotere (Docetaxel) (**14**), topotecan (Hycamtin) (**15**) y irinotecan (Camptosar) (**16**) los cuales están aprobados por la FDA desde 1996 (Dholwani et al., 2008).

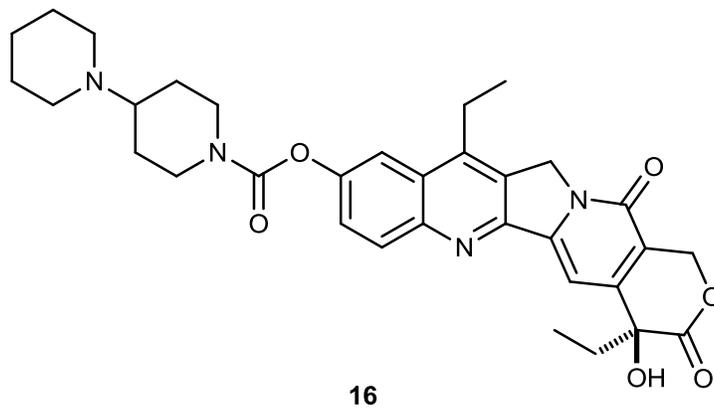
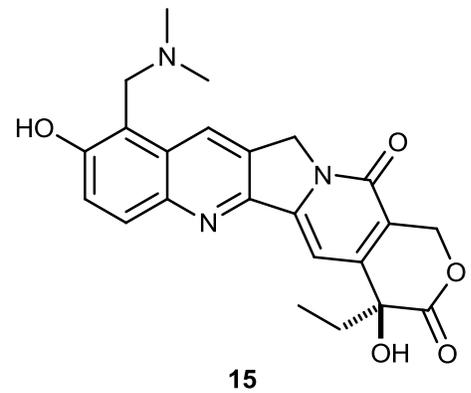
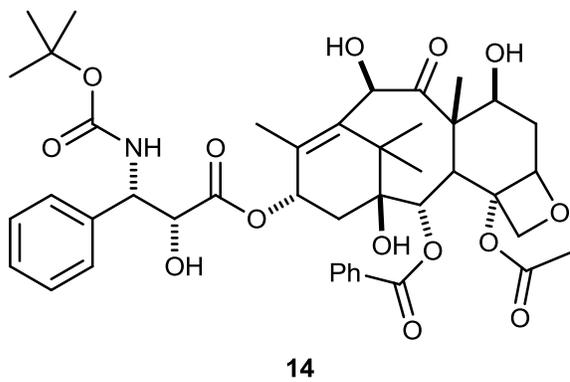


Figura 1.4. Ejemplos de fármacos anticancerígenos derivados de productos naturales aprobados por la FDA.

1.1.2. Metabolitos primarios y secundarios

Un producto natural es todo compuesto de origen orgánico e inorgánico, que se halle en la naturaleza y que pueda ser procesado por el hombre. Generalmente en el área de química orgánica se consideran como productos naturales a aquellos provenientes principalmente de plantas, hongos, algas y animales, los cuales llevan a cabo dos tipos de metabolismo, el primario y el secundario. En el metabolismo primario los organismos sintetizan y convierten sustancias para sobrevivir a partir de compuestos simples como el CO_2 , H_2O , N_2 y algunos metales, que son transformados en polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos, los cuales son considerados los bloques de la materia viva. Este tipo de metabolismo lo llevan a cabo todos los organismos vivos. Otro proceso que se lleva a cabo en los organismos, dando diferentes productos de acuerdo al tipo de especie, es el llamado metabolismo secundario. Los productos formados por este metabolismo se conocen como productos naturales y como ejemplo se pueden mencionar a los terpenos, los alcaloides y los pigmentos. Aunque estos metabolitos no parecen ser esenciales para la existencia del organismo, juegan un rol importante en la supervivencia o prevalencia de unas especies sobre otras, ya que se piensa que son utilizados para defensa, como atrayentes sexuales, marcadores territoriales, etc.

1.1.2.1. Terpenos

Los terpenos forman una gran y diversa familia de productos naturales derivados de unidades de isopreno C_5 . Estructuras típicas contienen esqueletos de carbono representados por $(C_5)_n$ y se clasifican como hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterterpenos, triterpenos y tetraterpenos. De acuerdo a su estructura los terpenos son generalmente liposolubles. Se localizan en el citoplasma de las células de las plantas. Algunos terpenos tienen la propiedad de funcionar como agentes de protección y defensa contra fitopatógenos e influyen en interacciones entre plantas y animales (polinización, feromonas).

Los terpenos han mostrado actividad antiviral, antimicrobial, antiinflamatoria, antifúngica y citotóxica. Algunos diterpenos glicosidados han presentado actividad anticancerígena, contra la malaria y la tuberculosis (Dewick, 2009). Las lactonas sesquiterpénicas son compuestos con actividad biológica importante, entre ellas la antitumoral, antileucémica, citotóxica y antimicrobiana. Pueden ser responsables de alergias en la piel del ser humano y también pueden actuar como insecticidas.

Su actividad biológica depende de varias características estructurales como su lipofilidad y de poseer un doble enlace exocíclico conjugado al grupo carbonilo de las lactonas, el tipo de lactona, la presencia de un grupo funcional como epóxido, hidroxilo ó clorohidrina y la estereoquímica.

Así, lactonas como la cumanina (**17**) y la partenólida (**18**), por mencionar algunas, han presentado actividad antiinflamatoria (Lastra et al., 2004) (Miglietta et al., 2004) (Zhang et al., 2004).

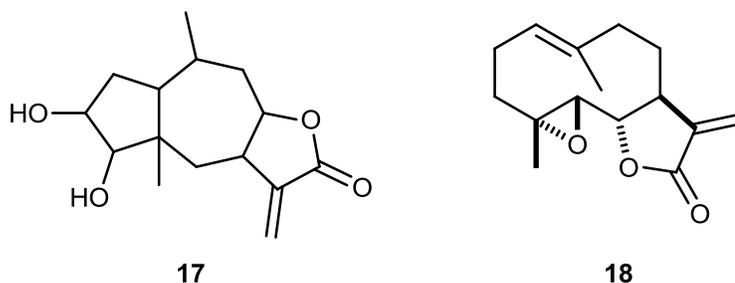


Figura 1.5. Lactonas sesquiterpénicas con actividad antiinflamatoria.

1.1.2.2. Flavonoides

Los flavonoides son compuestos ampliamente distribuidos en la naturaleza y pueden encontrarse tanto en forma libre (geninas) como combinados con azúcares mediante uniones O- y C-heterosídicas. La mayoría de ellos están constituidos por un núcleo bencénico unido a una γ -pirona, incluyendo además en distintas posiciones, C-1, C-2 o C-3, un segundo anillo bencénico dando lugar a los neoflavonoides, flavonoides propiamente dichos o a los isoflavonoides, respectivamente (Waksmundzka et al., 2008).

Los flavonoides tienen un importante rol en la fisiología de las plantas además de tener diversas funciones como la de ser antioxidantes, inhibidores enzimáticos, como pigmentos y en algunos casos precursores de ciertas sustancias tóxicas. En mamíferos, exhiben una extraordinaria selección de actividades farmacológicas como antiinflamatoria, antioxidante, inmunomoduladora, hepatoprotectora, antibiótica, antiviral, oestrogénica, antitumoral citotóxica, antifúngica, antiespasmolítica y analgésica, entre otras (Harborne et al., 1975; 2000).

Estudios quimiopreventivos han demostrado que el mecanismo de acción de los flavonoides en la prevención del cáncer se asocia con la captura de radicales libres, la regulación en genes de expresión de proliferación de células (oncogénesis) y genes supresores de tumores, la inducción del ciclo celular y la apoptosis, la modulación de la actividad enzimática en detoxificación, oxidación y reducción (Lin et al., 2006). Flavonoides tales como fasciculiferina (**19**) y cricina (**20**) se han asociado con actividad anticancerosa (Raj Kapoor et al., 2002) (Harborne et al., 2001), y la tricina (**21**) se utiliza en la actualidad como antileucémico (Dholwani et al., 2008).

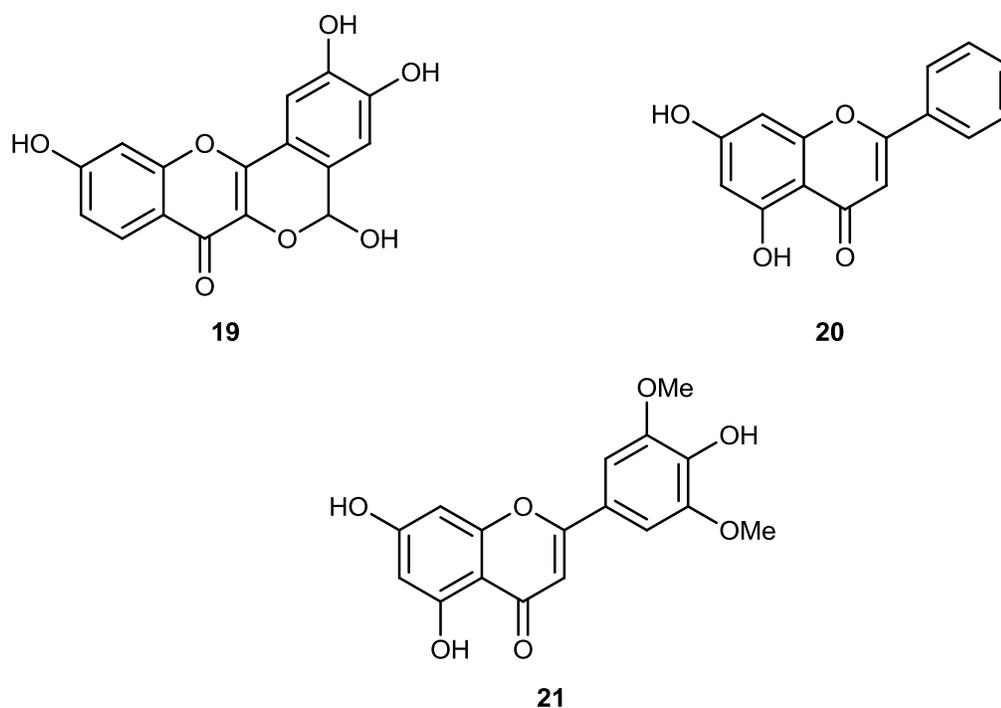


Figura 1.6. Flavonoides con actividad anticancerígena.

2. ANTECEDENTES

2.1. Género *Stevia*



El género *Stevia* perteneciente a la tribu Eupatoriae, familia Asteraceae, se extiende desde el suroeste de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina, a través de México, América Central, los Andes y las tierras altas de Brasil en ecosistemas localizados entre 1000 y 2000 m sobre el nivel del mar. Se estima que el número de especies dentro del género es de 300, de las cuales más

de 80 se encuentran en Norte América, y de estas, 70 especies son nativas de México (Cerde García-Rojas y Pereda Miranda, 2002).

Se han llevado a cabo estudios fitoquímicos en aproximadamente 70 especies de plantas de *Stevia*. En la tabla 2.1 se muestra una relación de algunas de las plantas de este género investigadas en México, así como la parte de la especie estudiada.

Tabla 2.1. Especies mexicanas del género *Stevia* que se han estudiado en México (Hernández et al., 1998).

Espece	Parte estudiada
<i>S. aff. tomentosum</i>	Aérea
<i>S. berlandieri</i> A. Gray	Aérea
<i>S. chamaedrys</i>	Aérea
<i>S. eupatoria</i> (Spreng.) Willd	Aérea
<i>S. hyssopifolia</i> var. <i>hyssopifolia</i>	Aérea
<i>S. isomeca</i> Gashoff	Aérea
<i>S. lemmonia</i> A. Gray	Aérea, raíces
<i>S. lucida</i>	Aérea, raíces
<i>S. microchaeta</i>	Aérea
<i>S. monardaefolia</i> H. B. K.	Aérea
<i>S. nepetifolia</i> H. B. K.	Aérea
<i>S. organoides</i> H. B. K.	Aérea, raíces
<i>S. ovata</i> Will	Aérea, raíces
<i>S. phlebophyla</i>	Aérea
<i>S. pilosa</i> Lag.	Aérea
<i>S. polycephala</i>	Aérea, raíces
<i>S. salicifolia</i> Cav.	Aérea, raíces
<i>S. salicifolia</i> Cav. var. <i>salicifolia</i>	Aérea
<i>S. salicifolia</i> Cav. var. <i>typica</i>	Aérea
<i>S. serrata</i> Cav.	Aérea
<i>S. subpubescens</i> Lag.	Aérea, raíces
<i>S. subpubescens</i> Lag. var. <i>intermedia</i>	Raíces
<i>S. viscida</i> H. B. K.	Raíces
<i>S. tomentosa</i> H. B. K.	Aérea

En el estado de Hidalgo las condiciones climáticas y fisiográficas tan diversas de la Sierra de Pachuca propician la existencia de un considerable número de hábitats, lo cual ha favorecido al establecimiento de distintas comunidades vegetales entre las cuales se encuentran 21 especies de *Stevia*: *S. eupatoria*, *S. hirsuta* DC. var *hirsuta*, *S. iltisiana*, *S. jorullensis*, *S. latifolia*, *S. lucida*, *S. micrantha* aff *monardifolia*, *S. monardifolia*, *S. nepetifolia*, *S. ovata*, *S. ovata* var. *ovata*, *S. pilosa*, *S. porphyrea*, *S. purpusii*, *S. rhombifolia* var. *typica*, *S. salicifolia*, *S. salicifolia* var. *salicifolia*, *S. serrata*, *S. tephra* y *S. tomentosa* (Barrios, 1996) (Villavicencio, 1995). De las 21 especies encontradas en el estado de Hidalgo, únicamente se han descrito estudios fitoquímicos de 10 especies (Hernández et al., 1998).



Stevia jorullensis



Stevia salicifolia



Stevia serrata



Stevia ovata

Figura 2.1. Plantas del género *Stevia* que se encuentran en el estado de Hidalgo.

2.2. Composición química del género *Stevia*

Se han llevado a cabo estudios fitoquímicos en aproximadamente 70 especies de *Stevias*, revelando la presencia de terpenos y flavonoides como los constituyentes típicos de la parte aérea, mientras que en las raíces se encuentran principalmente terpenos. Frecuentemente, los terpenos que se encuentran corresponden a lactonas sesquiterpénicas con estructuras derivadas del germacrano como **22** y del guayano como **23**, aunque también se han encontrado un número considerable de derivados de longipineno como **24** y diterpenos tipo labdano, *ent*-labdano como **25** y derivados del *ent*-kaureno, en adición de triterpenos tales como **26** y **27** (Cerdeja García-Rojas y Pereda Miranda, 2002) (Fig. 2.2).

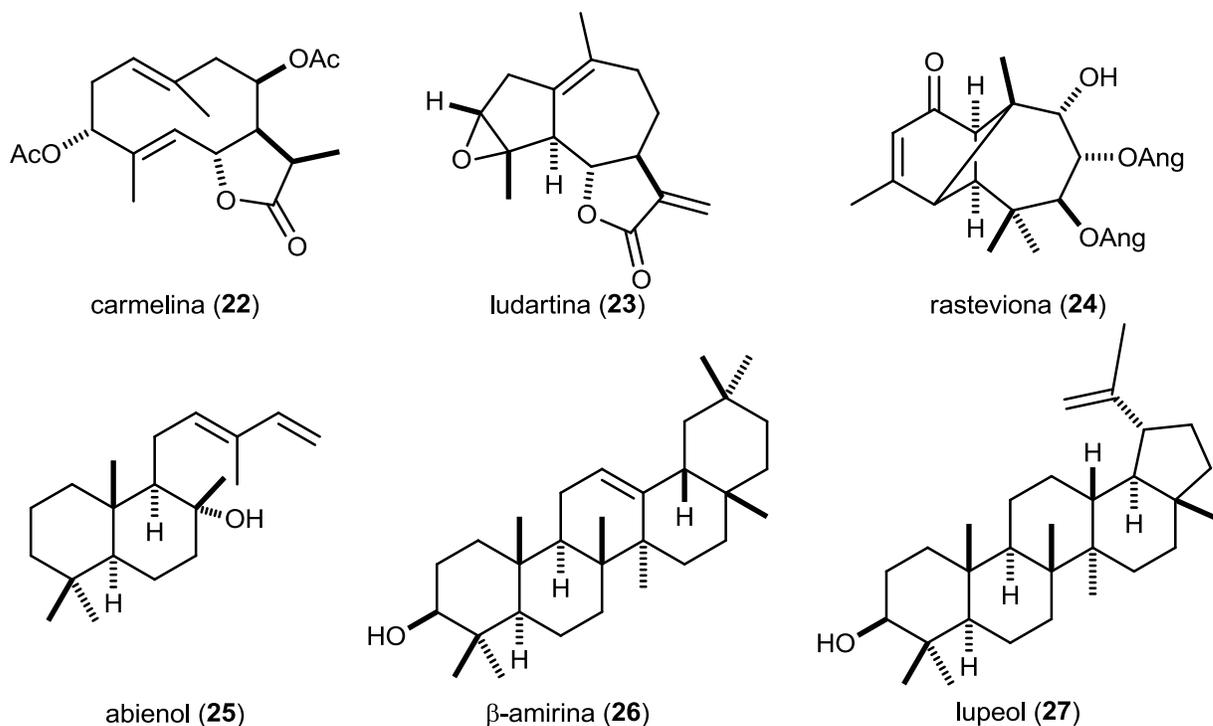


Figura 2.2. Ejemplos de terpenos encontrados en *Stevias*.

Tal vez el compuesto más importante en *Stevia* es el diterpeno derivado del *ent*-kaureno conocido como esteviósido (**28**) (Fig. 2.3), debido a que es un producto comercial con poder edulcorante que supera unas 300 veces a la sacarosa, y que se usa para personas diabéticas o como azúcar dietético. El esteviósido se obtiene de *Stevia rebaudiana* Bertoni (Fig. 2.3), una especie endémica de Paraguay, pero que en la actualidad se cultiva en los países asiáticos con fines comerciales para obtener el edulcorante.



Cultivo

Hoja

Flor

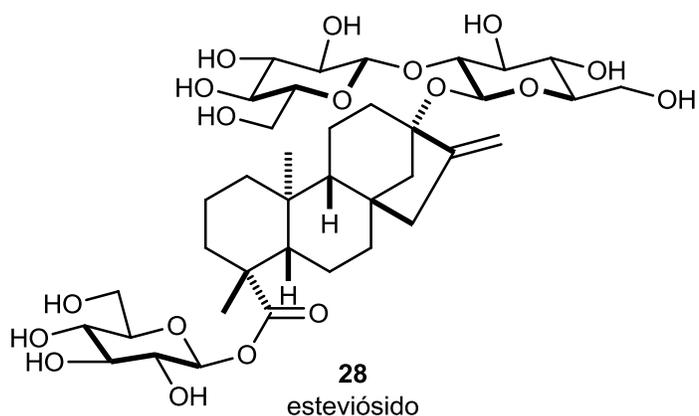
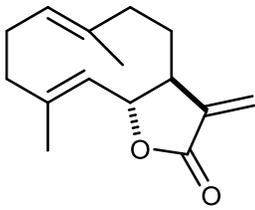
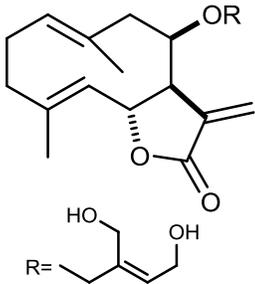
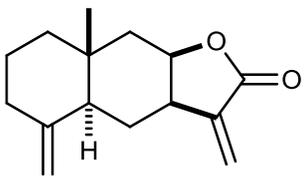
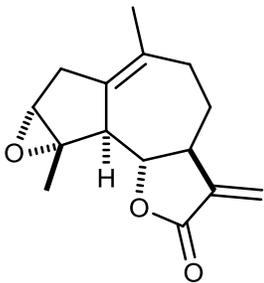


Figura 2.3. Imágenes de *Stevia rebaudiana* Bertoni y estructura del edulcorante esteviósido (**28**).

Se han descrito pocos usos en medicina tradicional para las especies de *Stevia* a pesar de que varios compuestos presentes en ellas, pero aislados de otras fuentes, han presentado actividad biológica y/o farmacológica importante. Por ejemplo, la cusionólida (29), constituyente activo de varias plantas medicinales, incluyendo las partes aéreas de *S. yaconensis* y *S. chamaedrys*, mostró actividad contra el virus de la hepatitis B; o la casticina (45), constituyente encontrado en *S. breviaristata* al que se le atribuyó la actividad antifúngica de los extractos de *Psiadia trinervia* (Asteraceae) contra *Cladosporium cucumerinum* (Cerdeja García-Rojas y Pereda Miranda, 2002).

Algunos estudios de actividad biológica se han llevado a cabo sobre extractos crudos de *Stevia* los cuales han mostrado actividad antimicrobiana y antifúngica. En ciertos casos esta actividad se ha asociado a la presencia de lactonas sesquiterpénicas o flavonoides (Díaz, 1976).

Tabla 2.2. Ejemplos de lactonas sesquiterpénicas aisladas de *Stevia* y su actividad biológica.

Lactona sesquiterpénica	Actividad biológica descrita	<i>Stevia</i> en la que se ha encontrado
 <p>custonólida (29)</p>	<p>Actividad contra el virus de la hepatitis B (Chen et al., 1995), efecto contra <i>Helicobacter pylori</i> (Park et al., 1997), actividad anticancerosa (Park et al., 2001)</p>	<p><i>S. yaconensis</i>, <i>S. chamaedrys</i></p>
 <p>eupatoriopirina (30)</p>	<p>Actividad citostática (Woerdenbag et al., 1989)</p>	<p><i>S. sarensis</i>, <i>S. procumbens</i>, <i>S. maimarensis</i></p>
 <p>isoalantolactona (31)</p>	<p>Actividad antibacterial (Changhong et al., 2001), actividad antifúngica (Calera et al., 1995)</p>	<p><i>S. polyphylla</i>, <i>S. achalensis</i></p>
 <p>ludartina (32)</p>	<p>Actividad citoprotectora (Giordano et al., 1990), inhibidor de biosíntesis de estrógenos (Fraga et al., 1999)</p>	<p><i>S. yaconensis</i> var. <i>subeglandulosa</i></p>

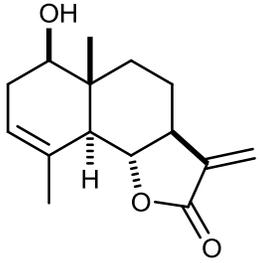
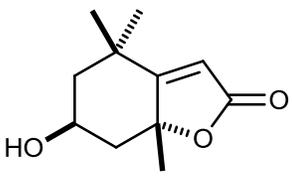
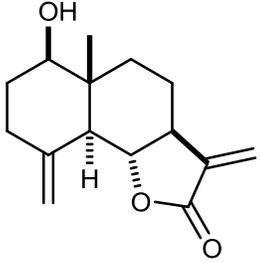
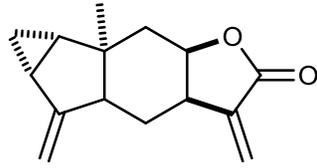
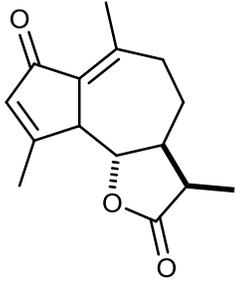
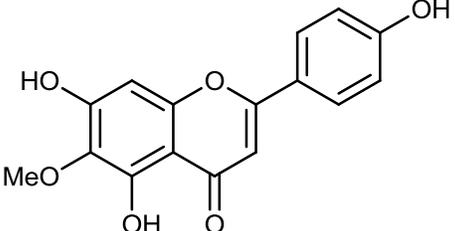
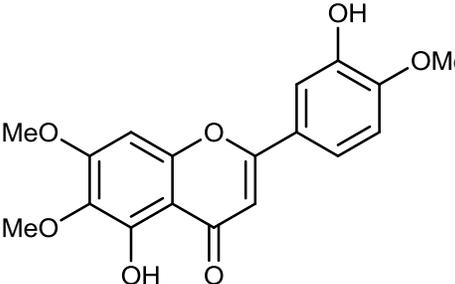
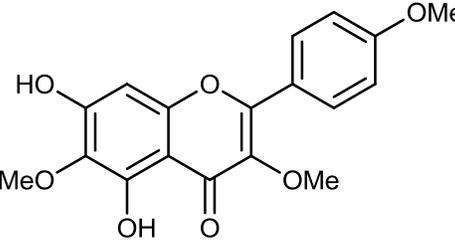
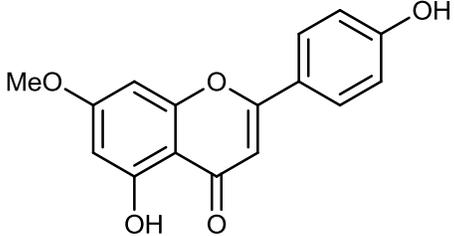
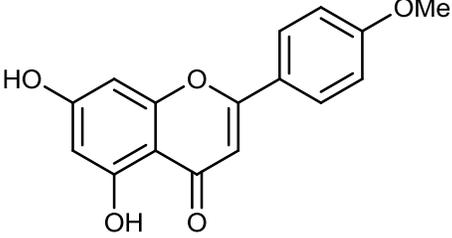
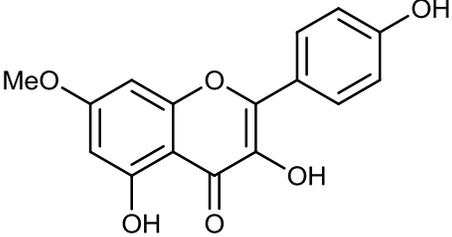
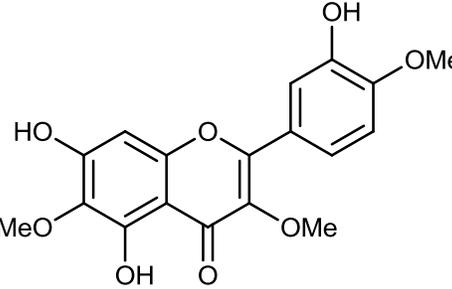
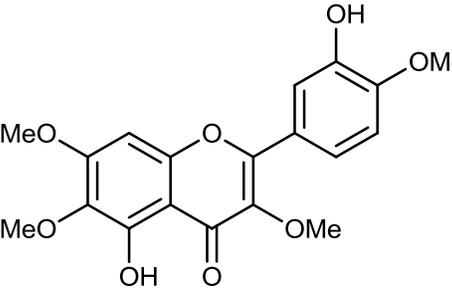
 <p>santamarina (33)</p>	<p>Actividad anticancerosa (Ma et al., 2009)</p>	<p><i>S. chamaedrys</i></p>
 <p>loliólido (34)</p>	<p>Actividad inmunosupresora (Okada et al., 1994)</p>	<p><i>S. grisebachiana</i></p>
 <p>reinosina (35)</p>	<p>Inhibidor de melanogénesis (Choi et al. 2008)</p>	<p><i>S. chamaedrys</i></p>
 <p>onoseriólido (36)</p>	<p>Actividad antiprotista (Acevey et al., 2010)</p>	<p><i>S. achalensis</i></p>
 <p>achillina (37)</p>	<p>Actividad anticancerosa (Kim et al., 2008)</p>	<p><i>S. pilosa</i>, <i>S. yaconensis</i> var. <i>subeglandulosa</i></p>

Tabla 2.3. Ejemplos de flavonoides obtenidos de *Stevia* y su actividad biológica.

Flavonoide	Actividad biológica descrita	<i>Stevia</i> donde se ha encontrado
 <p>hispidulina (38)</p>	<p>Actividad antitumoral (Lin et al., 2010), actividad antiinflamatoria (Moongkarndi et al., 1991), Actividad antiasmática (Anulakanapakorn et al., 1987)</p>	<p><i>S. organoides</i></p>
 <p>eupatorina (39)</p>	<p>Efecto citotóxico (Androutsopoulos et al., 2009) (Nagao et al., 2002) (Tezuka et al., 2000)</p>	<p><i>S. breviaristata</i>, <i>S. organoides</i>, <i>S. satureiaefolia</i>, <i>S. procumbens</i></p>
 <p>santina (40)</p>	<p>Actividad antiparasitaria (Sunsen et al., 2007)</p>	<p><i>S. organoides</i></p>
 <p>genkwanina (41)</p>	<p>Efecto citotóxico (Lin et al., 2001), efecto antibacterial (Lee et al., 2010)</p>	<p><i>S. subpubescens</i></p>

 <p>acacetina (42)</p>	<p>Actividad citotóxica (Hsu et al., 2004), actividad antiplasmodial (Ferreira et al., 2010)</p>	<p><i>S. subpubescens</i></p>
 <p>rhamnocitrina (43)</p>	<p>Efecto antiaterogénico (Tu et al., 2007), actividad antibacterial (Martini et al., 2004)</p>	<p><i>S. subpubescens</i></p>
 <p>centaureidina (44)</p>	<p>Actividad antiinflamatoria (Abad et al., 1993), actividad citotóxica (Trifunovic et al., 2006)</p>	<p><i>S. organoides</i>, <i>S. galeopsidifolia</i>, <i>S. rebaudiana</i></p>
 <p>casticina (45)</p>	<p>Actividad anticancerosa (Haidara et al., 2006) (Kobayakawa et al., 2004), actividad antifúngica (Wang et al., 1989), actividad antiplasmodial (Liu et al., 1992)</p>	<p><i>S. breviaristata</i></p>

Los alcaloides son un grupo importante de aminas biológicamente activas, que son sintetizadas por algunas plantas para protegerse de insectos y otros animales depredadores.

En el caso del género *Stevia*, hasta el momento se tiene un reporte de alcaloide, la esteviamina (**46**) (Fig. 2.4) aislada de *Stevia rebaudiana* (Michalik et al. 2010).

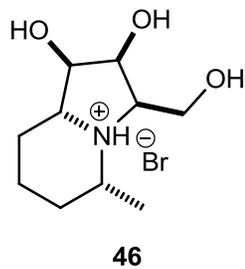


Figura 2.4. Alcaloide aislado de *Stevia rebaudiana*.

En una revisión bibliográfica se encontró un trabajo previo de la parte aérea de *Stevia tomentosa*, objeto de estudio de este trabajo, en el cual se describió un estudio químico del extracto metanólico de la parte aérea de donde se aisló y caracterizó por medio de métodos espectroscópicos y cromatográficos la lactona sesquiterpénica denominada dihidropseudoivalina (**47**) (Martínez et al., 1999) (Fig. 2.5).

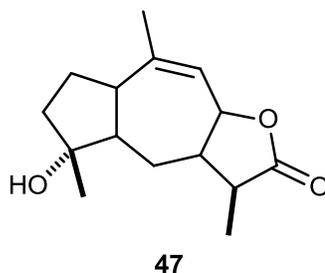


Figura 2.5. Lactona sesquiterpénica aislada de la parte aérea de *Stevia tomentosa*.

En un estudio previo en nuestro grupo de trabajo, se llevó a cabo la investigación del extracto hexánico de las raíces de *Stevia tomentosa*, del cual se aislaron: (–) - valeranona (**48**), 7 β ,8 α -diangeloxi-9 α -hidroxi-1-oxo-longipin-2-eno (**49**), 7 β -angeloiloxi-9 α -hidroxi-8 α -metilbutiroiloxi-1-oxo-longipin-2-eno (**50**), 2,3-epoxi-1-bisabolenona (**51**), 1-acetoxi-2,3-dihidroxibisaboleno (**52**), 3 β -friedalanol (**53**), acetato de (20S)-dammar-13(17),24-dien-3 β -ilo (**54**), β -sitosterol (**55**) y estigmasterol (**2**).

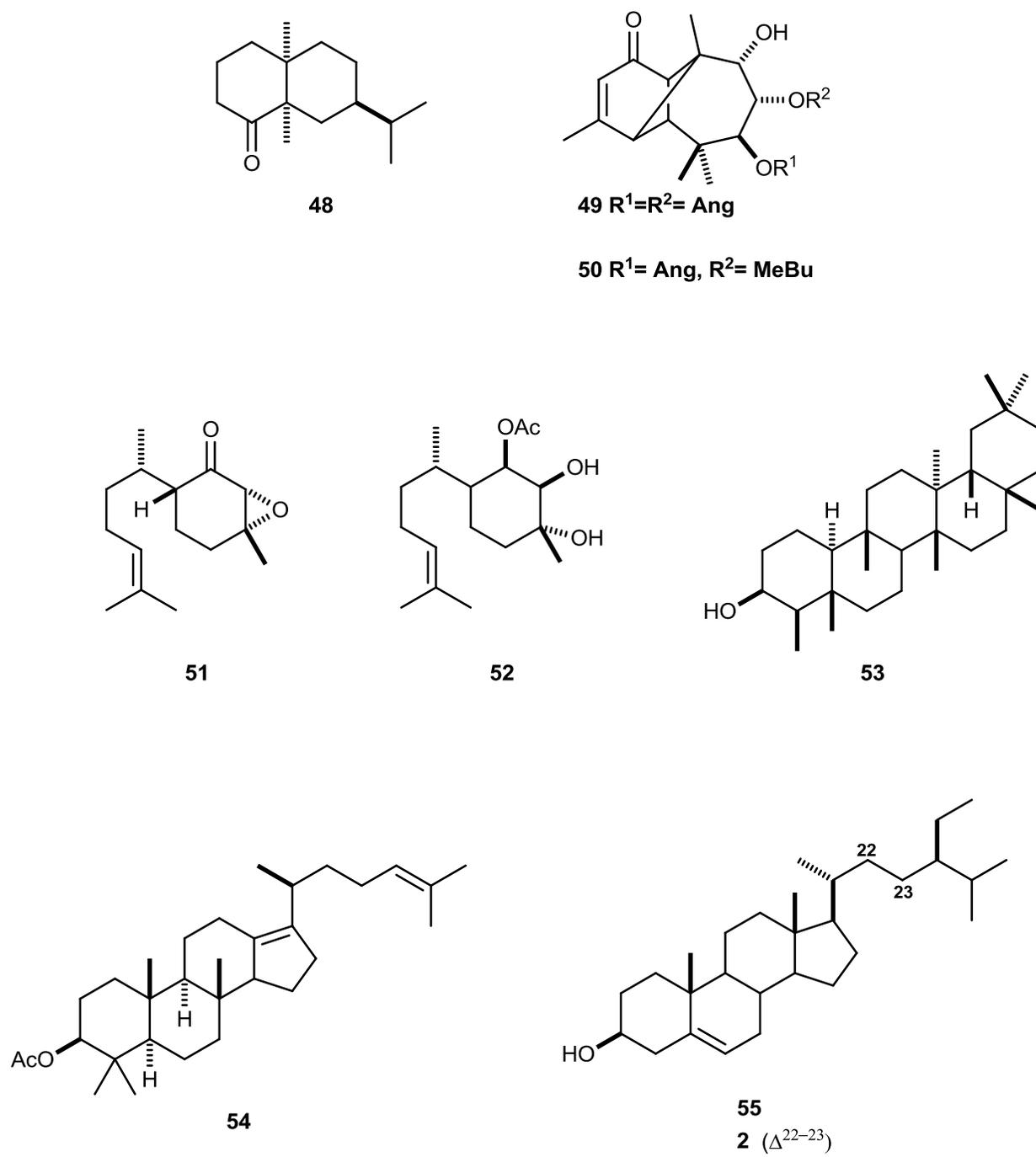


Figura 2.6. Metabolitos obtenidos de las raíces de *Stevia tomentosa*.

3. OBJETIVO

El objetivo del presente trabajo consistió en llevar a cabo el estudio químico de *Stevia tomentosa*, basado en el aislamiento de sus principales metabolitos secundarios de la parte aérea por métodos cromatográficos y su caracterización mediante técnicas espectroscópicas, con la finalidad de contribuir al conocimiento de sustancias naturales que puedan tener un uso potencial para el tratamiento del cáncer y la inflamación.

4. JUSTIFICACIÓN

A lo largo de la historia la medicina tradicional en México ha sido relevante en el desarrollo de las culturas. En la actualidad se utiliza como una importante alternativa para el tratamiento de diversas enfermedades. De allí lo relevante de conocer la composición química de las plantas para tener una mayor información y con ello un mejor aprovechamiento de las especies medicinales que se tiene en el país.

En épocas recientes, la química de los productos naturales se ha enfocado a la obtención de principios activos promisorios para el tratamiento de enfermedades crónicas degenerativas, en especial el cáncer, padecimiento de este tipo, con una de las tasas de mortalidad más altas de nuestro tiempo.

En particular nuestro grupo de trabajo se enfoca en la investigación de plantas que se dan en la región, ayudando al conocimiento de su composición química y en la búsqueda de metabolitos secundarios con posible actividad antiinflamatoria y/o anticancerosa. El género *Stevia* se distribuye a lo largo del estado de Hidalgo y de acuerdo a su estudio se tienen reportes de obtención de flavonoides y lactonas sesquiterpénicas, compuestos con importante actividad biológica, por lo que los resultados de este trabajo podrían contribuir al conocimiento de metabolitos secundarios con posible efecto farmacológico.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Colecta, identificación de la especie y obtención de extractos

Los especímenes de *Stevia tomentosa* (Fig. 5.1) se colectaron en la comunidad de Real del Monte, municipio de Mineral del Monte y en la comunidad El Guajolote, municipio de Epazoyucan, en el estado de Hidalgo, en agosto de 2008 y septiembre de 2009, respectivamente. Un ejemplar de esta planta se envió al Herbario del Centro de Investigaciones Biológicas del Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería de la UAEH, donde el M.C. Manuel González Ledesma identificó la especie como *Stevia tomentosa* H.B.K (No. de depósito JM Torres-Valencia 129). La planta se dejó secar a la sombra y se dividió en sus partes aéreas (hojas y flores) y raíces. Se obtuvieron los extractos de hexano, CHCl_3 , AcOEt y MeOH de estas partes mediante reflujo por 6 horas o maceración por 7 días.



Figura 5.1. Imágenes de *Stevia tomentosa*.

5.2 Estudio químico de *Stevia tomentosa*

El desarrollo de esta sección se dividió en dos partes. Primeramente se describe el estudio realizado a las raíces de la planta. En la segunda parte se muestra el tratamiento que se le dió a la parte aérea.

5.2.1. Estudio químico de las raíces de *Stevia tomentosa*

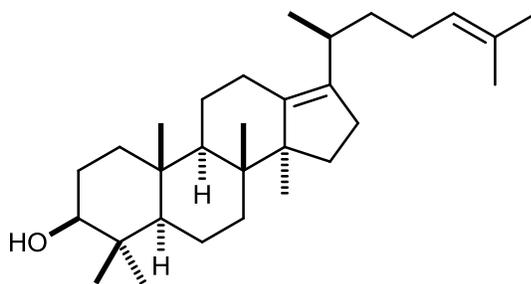
5.2.1.1. Separación cromatográfica del extracto hexánico

Anteriormente en nuestro equipo de trabajo se estudió el extracto hexánico de las raíces de *Stevia tomentosa* (López 2004). El interés por retomarlo se enfocó en rastrear el bisabolenol (51) obtenido, el cual se describió como producto natural nuevo y del que se planteó la necesidad de acumular mayor cantidad para realizarle estudios de dicroísmo circular vibracional y así determinar su configuración absoluta.

Las raíces (500 g) se extrajeron con hexano (2.5 L) calentando bajo reflujo durante 6 horas. Transcurrido el tiempo, el hexano se evaporó obteniendo 7.6 g de un aceite amarillo al cual se le agregó MeOH (200 mL) y se dejó 48 horas en el refrigerador para precipitar las grasas. Después se filtró y el MeOH se evaporó, de donde se obtuvieron 1.5 g de un residuo mieloso color amarillo.

El extracto obtenido se sometió a cromatografía en columna obteniendo fracciones gruesas (200 mL) con hexano, mezclas de hexano-AcOEt con polaridad creciente y CHCl_3 , las cuales se identificaron como A-G.

Las fracciones C y D eluidas con hexano-AcOEt (4:1) y hexano-AcOEt (7:3) se juntaron y se purificaron mediante recromatografías con CHCl_3 , permitiendo obtener un aceite amarillo claro que en su análisis por CCF (CHCl_3 -AcOEt 9:1) presentó R_f 0.6. Al comparar sus datos físicos y espectroscópicos con los datos obtenidos en el trabajo previo, se llegó a la conclusión que se trataba del (20S)-dammara-13(17),24-dienol (**1**) (Fig 5.2). Hasta el momento no ha sido posible la purificación completa de este triterpeno, pero aún en mezcla con otras sustancias se pudieron observar por RMN sus señales tanto de protón como de carbono-13.



1

Figura 5.2. Estructura del (20S)-dammara-13(17),24-dienol (**1**).

El espectro de RMN de protón (Fig. 5.3, Tabla 5.1) presentó en 5.09 ppm una señal triple con una constante de acoplamiento de 7.0 Hz que integró para un protón y que se asignó como H-24. En 3.24 ppm se observó una señal doble de dobles con constantes de acoplamiento de 11.6 y 4.5 Hz típica para un hidrógeno base de OH, la cual se asignó a H-3. Los metilos 26 y 27 se apreciaron como señales simples en 1.68 y 1.61 ppm. Los metilos terciarios observados, cuyas señales aparecen entre 1.00 y 0.70 ppm, se asignaron para las posiciones 28, 29, 18, 19 y 30. En el caso del metilo secundario (Me-21) se observó en 0.85 ppm como una señal doble con una constante de acoplamiento de 6.2 Hz.

En su espectro de ^{13}C (Fig. 5.4, Tabla 5.1) se identificaron las 30 señales, entre ellas las de 134.0 y 133.5 ppm debidas a los carbonos C-13 y C-17 que forman parte de un doble enlace. Los carbonos C-24 y C-25 que forman el otro doble enlace de la estructura se localizaron sus señales en 130.9 y 125.2 ppm. En 79.0 ppm se identificó una señal típica para carbonos base de OH, por lo que se asignó como C-3. Entre 55.0 y 15.0 ppm se observaron las señales restantes de los carbonos sp^3 presentes en la estructura.

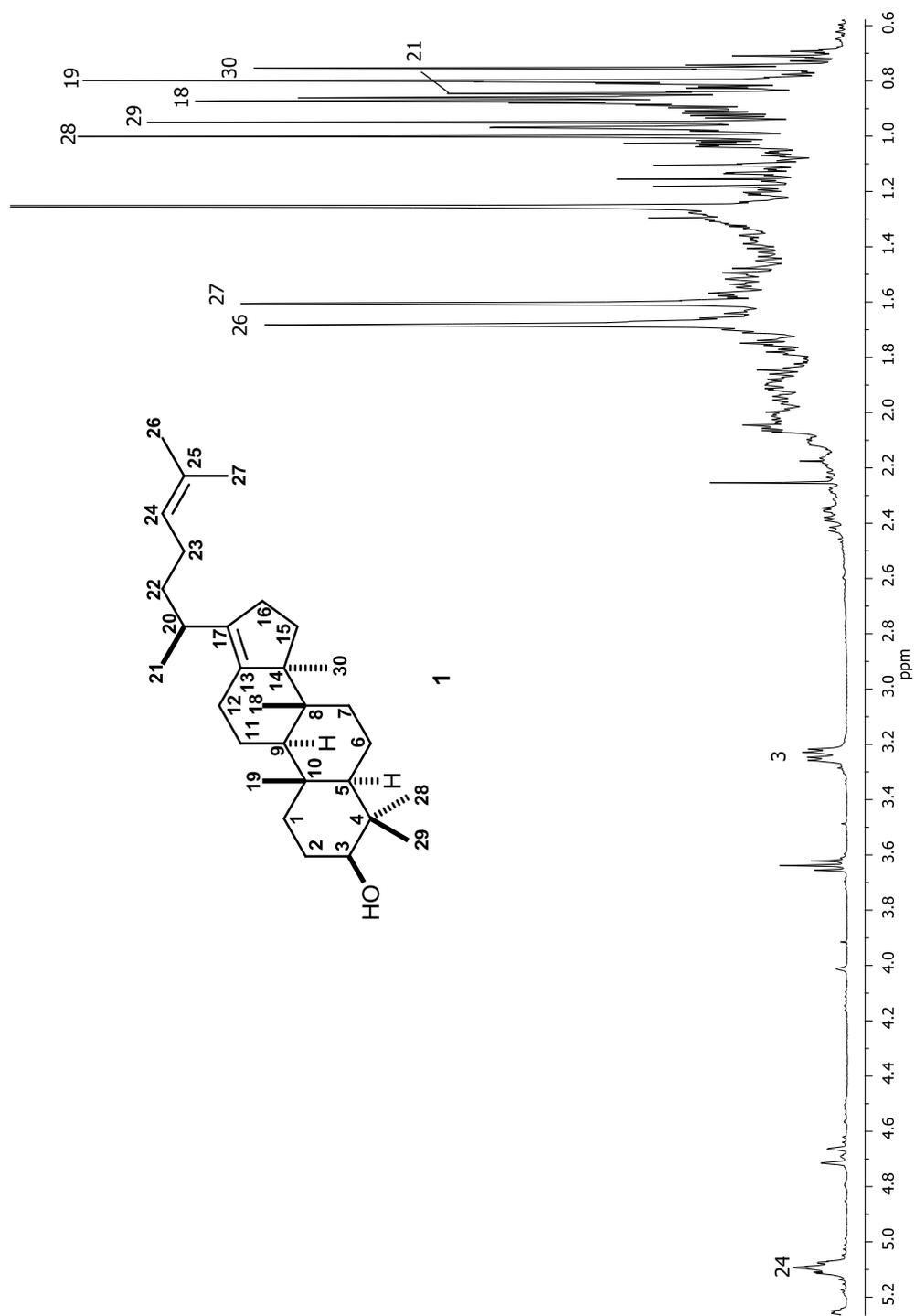


Figura 5.3. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz) del (20S)-dammara-13(17),24-dienol (1) en CDCl₃.

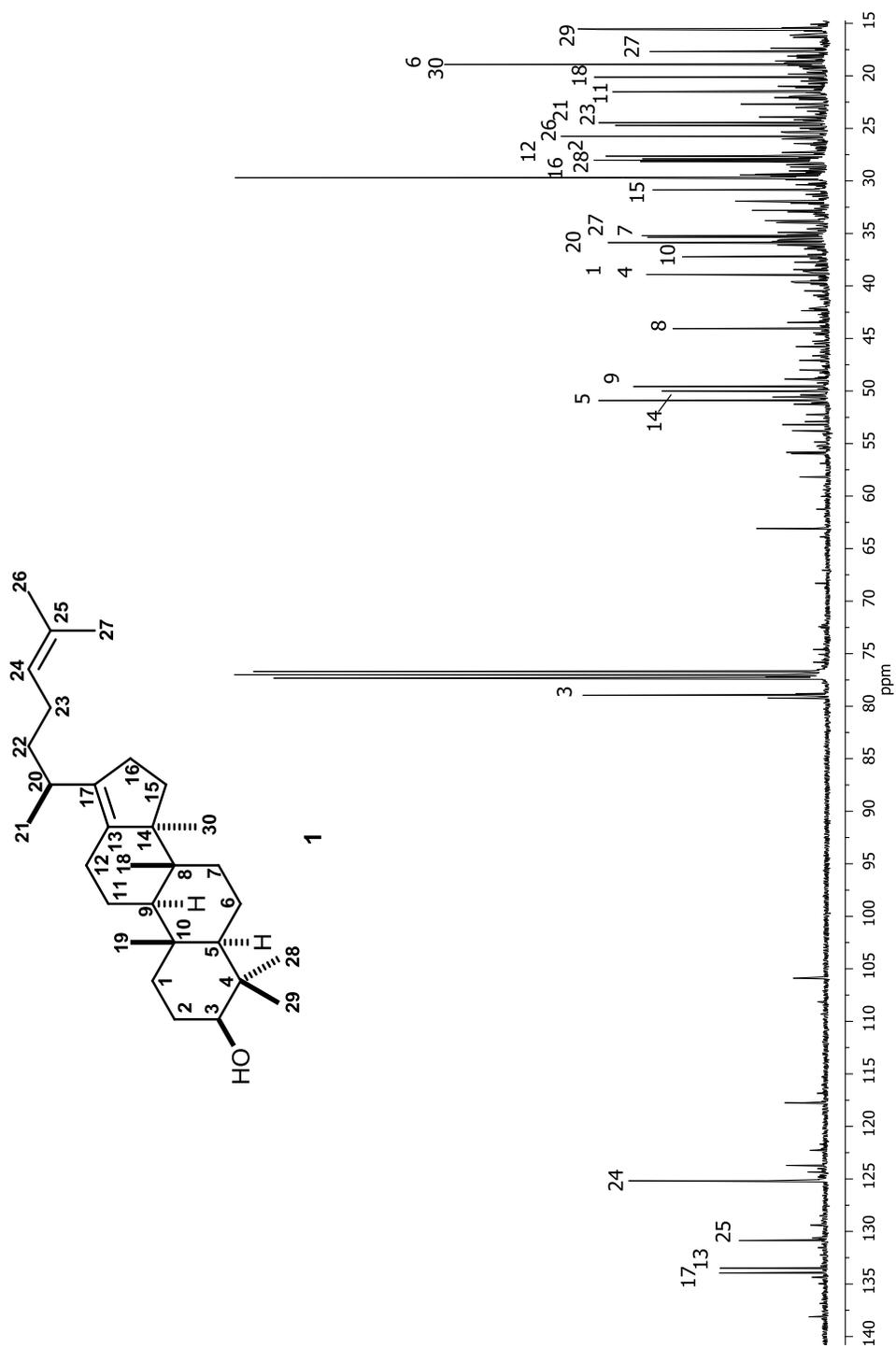


Figura 5.4. Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz) del (20S)-dammara-13(17),24-dienol (1) en CDCl₃.

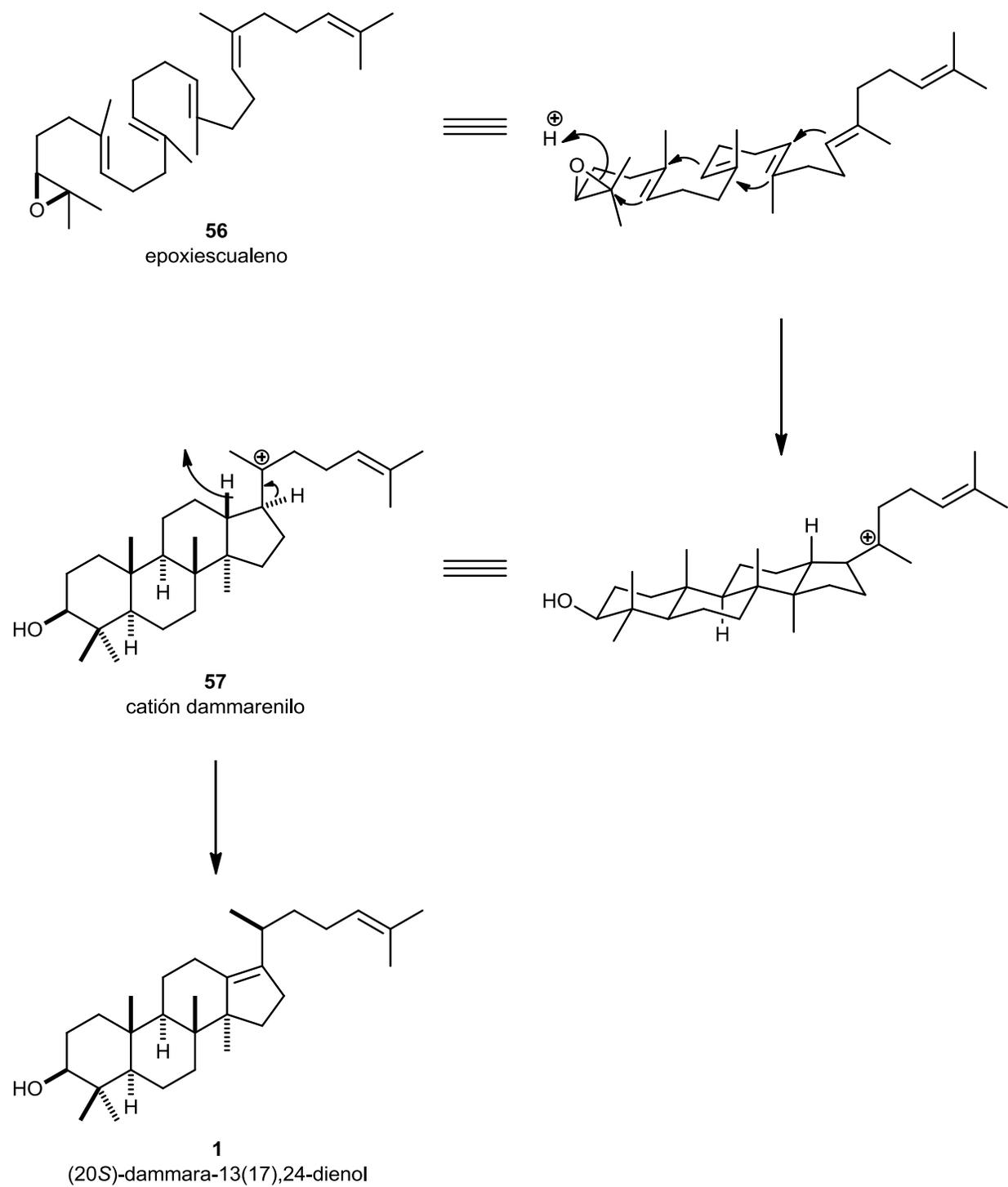
Tabla 5.1. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C del (20S)-dammara-13(17),24-dienol (1).

Posición	^1H m (J en Hz)	^1H m (J en Hz), lit*	^{13}C	^{13}C , lit*
1			38.9	38.89
2			27.6	27.61
3	3.24 dd (11.6, 4.5)	3.25 dd (10.0, 6.0)	79.0	78.84
4			38.9	38.87
5			50.9	50.89
6			18.9	18.01
7			35.2	35.19
8			44.1	44.05
9			49.6	49.55
10			37.2	37.20
11			21.5	21.50
12			27.6	27.81
13			134.0	133.95
14			50.0	49.98
15			30.8	30.83
16			28.1	28.13
17			133.5	133.48
18	0.87 s	0.87 s	20.1	20.11
19	0.80 s	0.80 s	15.5	15.50
20			35.8	35.85
21	0.85 d (6.2)	0.85 d (6.0)	24.5	24.44
22			35.4	35.35
23			24.7	24.70
24	5.09 t (7.0)	5.09 t (7.3)	125.2	125.16
25			130.9	130.86
26	1.61 s	1.60 s	25.8	25.73
27	1.68 s	1.68 s	17.7	17.67
28	1.00 s	1.00 s	28.0	28.01
29	0.95 s	0.95 s	15.6	15.57
30	0.75 s	0.75 s	18.9	18.89

d = doble, t = triple, s = simple. * Matta et. al., 1991.

5.2.1.1.1. Biosíntesis del (20S) dammara-13(17),24-dienol (1)

La biosíntesis del triterpeno **1** (Esq. 5.1) se propone a partir del epoxiescualeno (**56**) (conformación silla-silla-silla-bote), donde la apertura del epóxido por un protón induce la cascada del cierre de anillos generándose el catión dammarenilo (**57**). Si en el catión se produce una migración de hidruro, aunado a la pérdida de un protón para la formación de un doble enlace, se genera el (20S) dammara-13(17),24-dienol (**1**).



Esquema 5.1. Biosíntesis del (20S)-dammara-13(17),24-dienol (1).

5.2.1.2. Separación cromatográfica del extracto metanólico

Las raíces de *Stevia tomentosa* (600 g) se extrajeron con MeOH (2 L) mediante reflujo por 6 horas. Pasado este tiempo, el MeOH se evaporó obteniéndose 11.5 g de un aceite denso de color ligeramente amarillo. A este producto se le realizó una prueba cualitativa para determinar la presencia de alcaloides, por lo que en un tubo de ensaye se agregó una pequeña parte del extracto disuelto en HCl al 5 % y 2 gotas de reactivo de Dragendorff, observando la formación de un precipitado y con esto, un resultado positivo (Fig. 5.5).

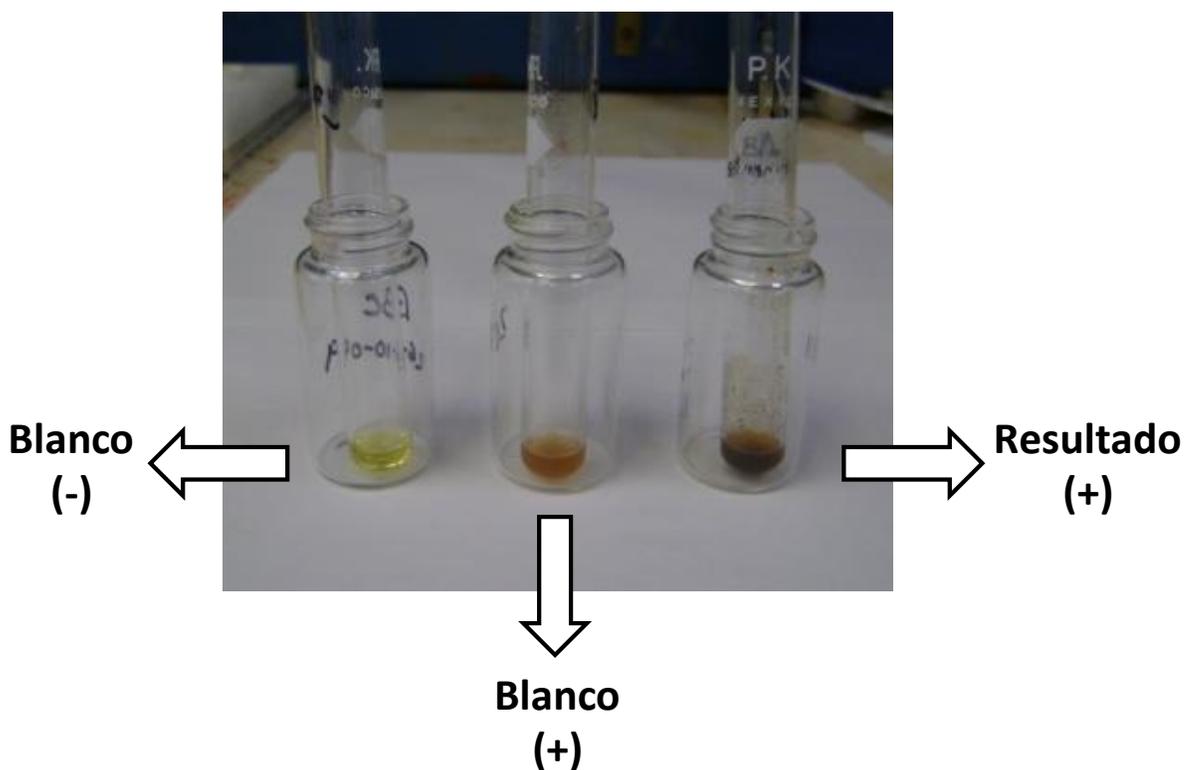


Figura 5.5. Prueba cualitativa para determinación de alcaloides.

Después se hizo una extracción selectiva para la obtención de “crudo de alcaloides”. Así, el concentrado metanólico se diluyó en 800 mL de HCl al 2%, se agregaron 10 g de zinc metálico y se dejó 1 día en agitación. Transcurrido este tiempo, la solución resultante se filtró y se llevó a pH 10 adicionando NH₄OH. Después se realizaron lavados con CHCl₃, se secó con sulfato de sodio anhidro y el MeOH se evaporó en el rotavapor para obtener el “crudo de alcaloides” (2 g).

La separación mediante cromatografía en columna del crudo, cuya intención era la de aislar alcaloides, condujo a la obtención de fracciones que dieron positivas las pruebas cualitativas de identificación de este tipo de metabolitos secundarios. Sin embargo, no se obtuvieron compuestos puros cuyo análisis por RMN de ¹H permitiera evidenciar la presencia de dichas sustancias. Por el contrario, se observaron mezclas difíciles de interpretar por lo que se decidió dejar el estudio químico de este extracto.

Adicional a estas mezclas, de los lavados obtenidos con CHCl₃ se obtuvo un sólido blanco (3 mg, 0.03 %) con un p. f. = 163-164°C que se identificó como estigmasterol (**2**) (Fig. 5.6) con base en sus datos de RMN de ¹H (Fig. 5.7, Tabla 5.2). El estigmasterol es un fitoesterol que presenta actividad antiosteoartrítica (Gabay et al. 2010) y antibacteriana (Prachayasittikul et al., 2009), además de ser materia prima para la síntesis de hormonas sexuales y corticoadrenales.

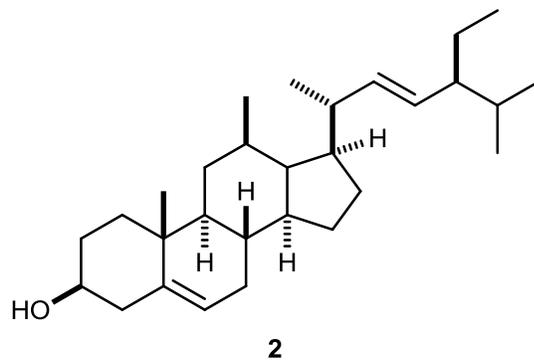


Figura 5.6. Estructura del estigmasterol (2).

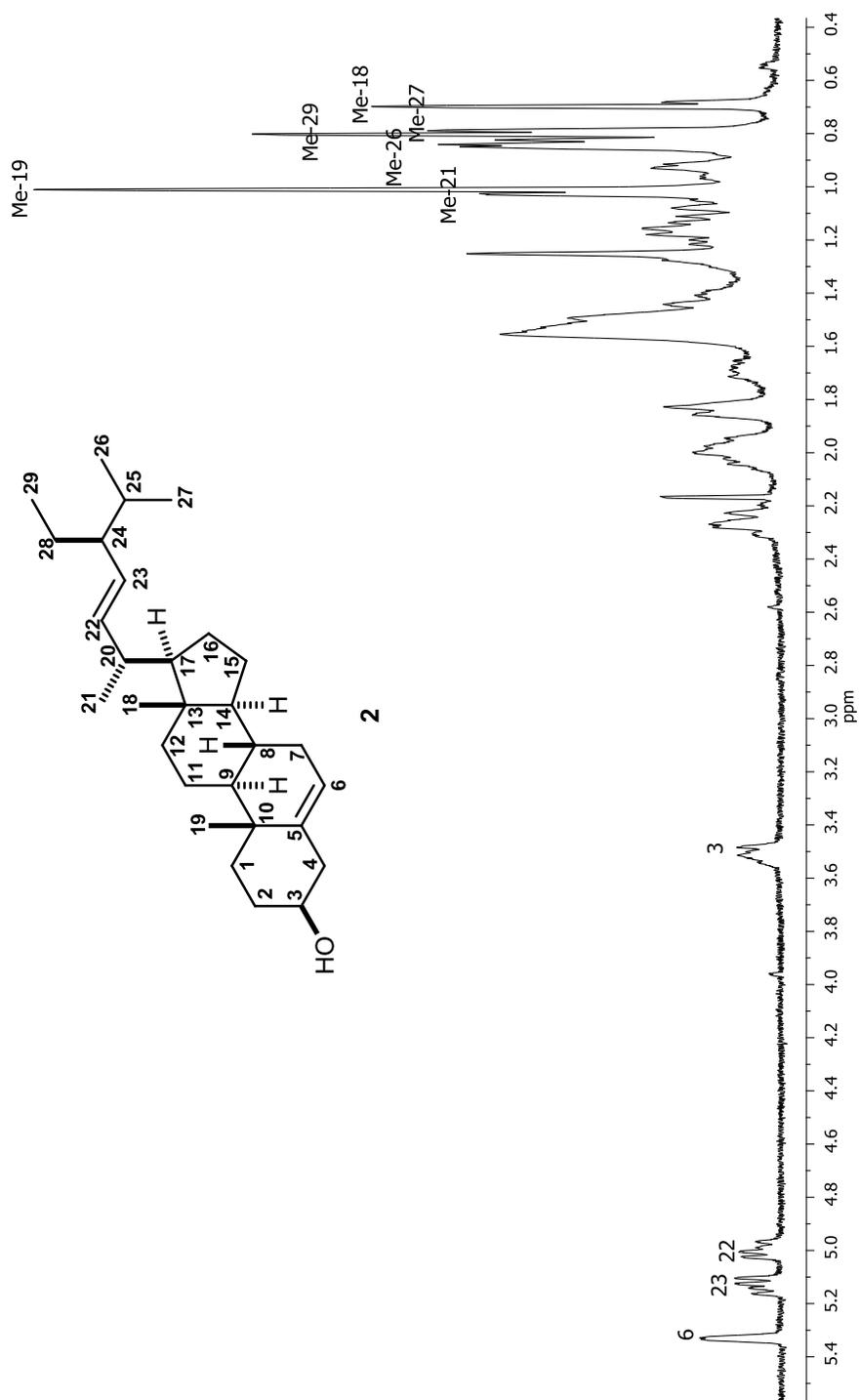


Figura 5.7. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) del estigmasterol (2) en CDCl_3 .

Tabla 5.2. Datos de RMN de ^1H del estigmasterol (2).

Posición	^1H m (J en Hz)	^1H m (J en Hz), lit*
3	3.52 m	3.52 m
6	5.33 m	5.34 m
18	0.68 s	0.69 s
19	1.01 s	1.01 s
21	1.02 d (6.4)	1.02 d (6.3)
22	4.96 m	4.96 m
23	5.18 m	5.19 m
26	0.84 d (6.6)	0.84 d (6.6)
27	0.79 d (6.6)	0.79 d (6.6)
29	0.80 t (7.3)	0.80 t (7.3)

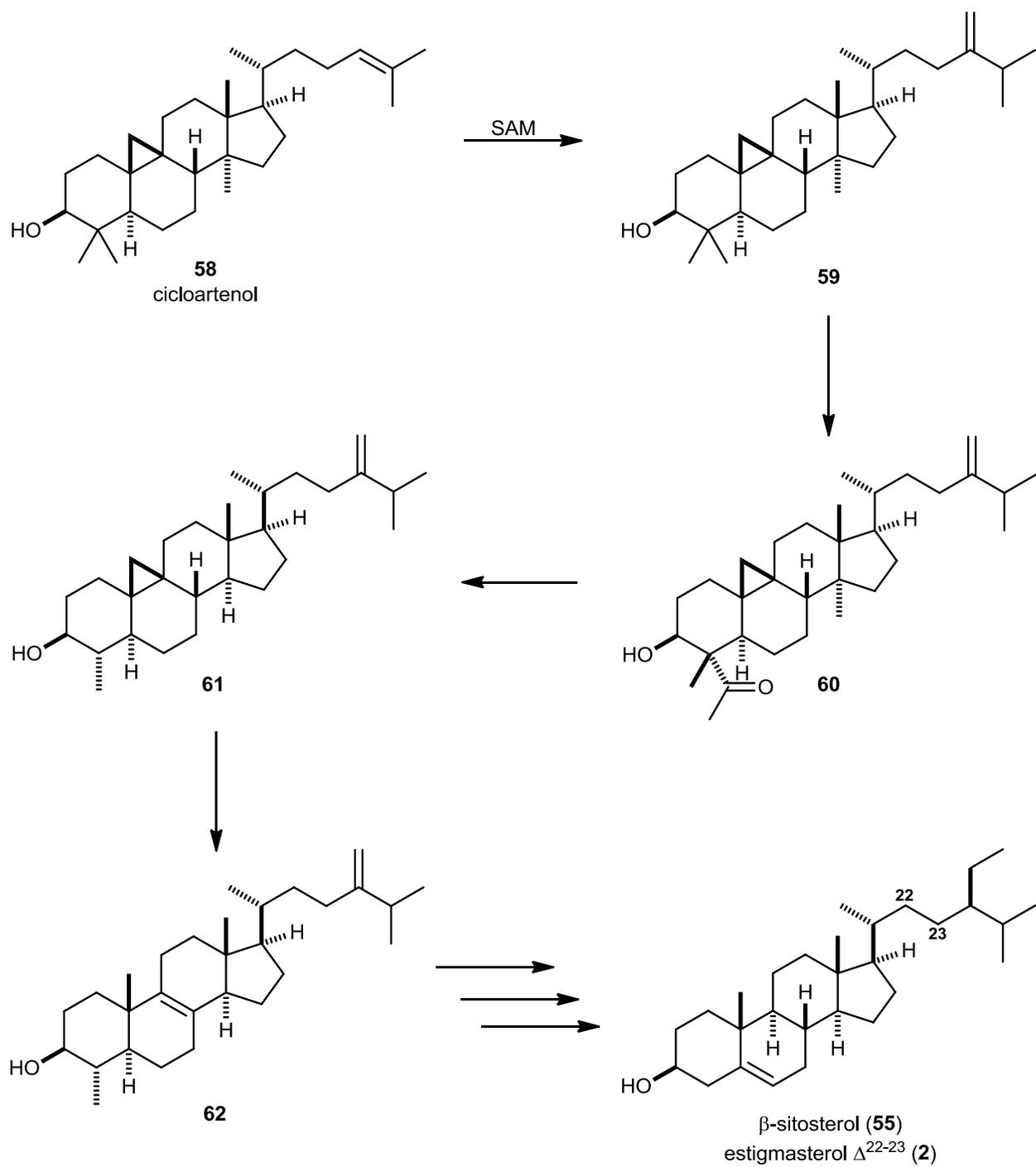
d = doble, t = triple, s = simple. m = múltiple.

* Itoh et. al., 2003.

5.2.1.2.1. Biosíntesis del estigmasterol (2)

Mientras que las membranas de las células animales contienen predominantemente un solo tipo de esteroide (colesterol), las membranas de las células vegetales incorporan una mezcla complicada de fitoesteroides incluyendo el estigmasterol.

La biosíntesis del estigmasterol (Esq. 5.2) a partir de cicloartenol (**58**) comienza con la transferencia de un grupo metilo (por el SAM) para obtener **59**. Uno de los metilos que presenta **59** es oxidado al ácido carboxílico generando el intermediario **60** y la descarboxilación de dicho grupo conduce al compuesto **61**. La apertura del anillo de ciclopropano en **61** genera un doble enlace dando lugar a **62**. Finalmente, una serie de reacciones que conducen a la pérdida de los metilos, reducción del doble enlace, formación de uno nuevo y la incorporación de un grupo metilo genera los esteroides β -sitosterol (**55**) o estigmasterol (**2**), cuya diferencia es un doble enlace en C-22 y C-23.



Esquema 5.2. Biosíntesis del estigmasterol (2).

5.2.2. Estudio químico de la parte aérea de *Stevia tomentosa*

5.2.2.1. Separación cromatográfica del extracto metanólico

De la parte aérea (500 g) de *S. tomentosa* se obtuvieron los extractos de hexano y MeOH por medio de reflujo (6 h). El extracto MeOH se filtró y evaporó dando como resultado un residuo verde oscuro (7.2 g), el cual se fraccionó dependiendo de su solubilidad con CHCl_3 , AcOEt y MeOH, lo que condujo a la obtención de las partes de CHCl_3 , AcOEt y MeOH.

La parte de CHCl_3 (200 mg) se pasó por cromatografía en columna con gel de sílice obteniéndose 70 fracciones (5 mL) utilizando como eluyente hexano, mezclas de hexano- CHCl_3 con polaridad creciente y CHCl_3 . Las fracciones 40-50 se juntaron y se recromatografiaron en sílice utilizando CHCl_3 como eluyente, de donde se obtuvo un sólido blanco (1.5 mg) que presentó una $[\alpha]_D^{25} = + 17.5$ (c 0.1, CHCl_3), el cual se identificó como el acetato de lupeol (**3**) (Fig. 5.8).

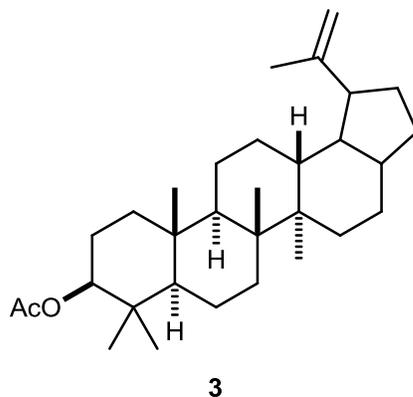


Figura 5.8. Estructura del acetato de lupeol (**3**).

Su espectro de protón (Fig. 5.9, Tabla 5.3) presentó en 4.67 y 4.56 ppm señales simples anchas que integraron para un protón cada una, típicas de protones de doble enlace, las cuales se asignaron a los protones 29 y 29'. En 4.45 ppm se observó una señal múltiple característica de protón base de éster que se asignó a H-3. El hidrógeno H-19 se observó como una señal múltiple en 2.37 ppm. El metilo vinílico 30 se apreció en 1.67 ppm, mientras que el resto de los metilos terciarios (Me-23 a Me-28) tuvieron desplazamientos entre 0.83 y 1.00 ppm. La comparación de sus datos de RMN de ^1H (Tabla 5.3) con los descritos (Jamal et al., 2008) dado que es un triterpeno conocido, permitió corroborar la estructura de esta sustancia.

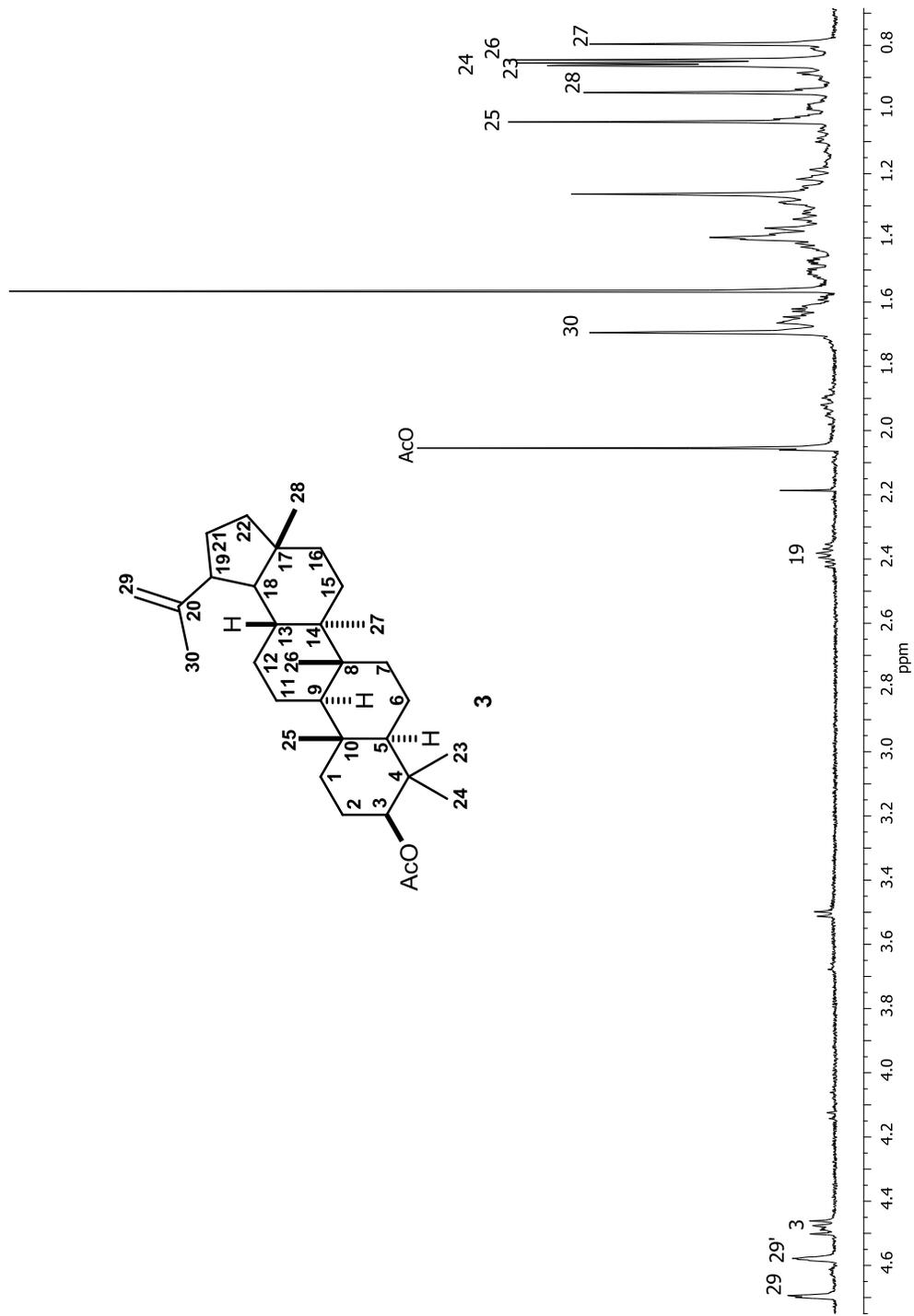


Figura 5.9. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz) del acetato de lupeol (**3**) en CDCl₃.

Tabla 5.3. Datos de RMN de ^1H del acetato de lupeol (**3**).

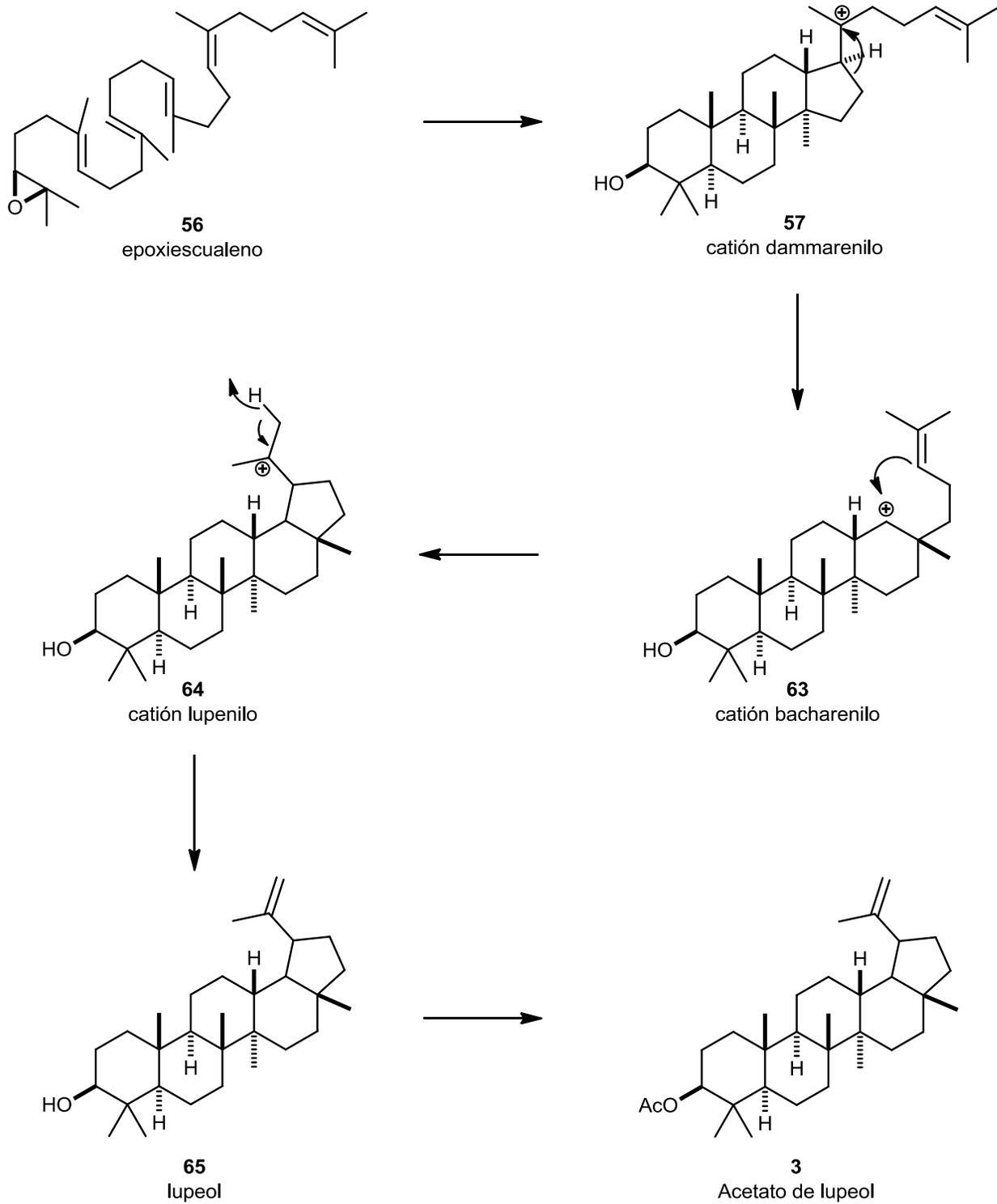
Posición	^1H m (J en Hz)	^1H m (J en Hz), lit*
3	4.45 m	4.47 dd (12.8, 4.4)
19	2.37 m	-
23	0.86 s	0.85 s
24	0.86 s	0.84 s
25	1.04 s	1.03 s
26	0.85 s	0.83 s
27	0.80 s	0.79 s
28	0.95 s	0.94 s
29	4.70 sa	4.69 sa
29'	4.58 sa	4.57 sa
30	1.70 s	1.69 s
Ac	2.05 s	2.05 s

d = doble, t = triple, s = simple. m = múltiple.

*Jamal et al., 2008.

5.2.2.1.1. Biosíntesis del acetato de lupeol (3)

La biosíntesis del acetato de lupeol (**3**) (Esq. 5.3) al igual que el caso del compuesto **1**, parte de epoxiesqualeno (**56**) seguido de la formación del catión dammarenilo (**57**). En **57** ocurre un reordenamiento de tipo Wagner-Meerwein desplazándose un grupo alquilo y generando el catión bacharenilo (**63**). El doble enlace de **63** ataca la carga positiva con lo que se obtiene un ciclo de cinco y con esto la formación del catión lupenilo (**64**), la que al perder un protón se genera el lupeol (**65**). El lupeol (**65**) puede acetilarse en su posición 3 y se produce el compuesto **3**.



Esquema 5.3. Biosíntesis del acetato de lupeol (**3**).

La parte de AcOEt se evaporó obteniéndose un líquido verde oscuro (6 g), al cual se le realizó una CC colectando fracciones gruesas (200 mL) utilizando como eluatos hexano, mezclas de hexano-AcOEt con polaridad creciente, CHCl_3 , CHCl_3 -MeOH con polaridad creciente y MeOH. Las fracciones se etiquetaron como A-K.

Las fracciones D y E que se obtuvieron con hexano-AcOEt (7:3 y 3:2) se juntaron y se les realizaron recromatografías en columna utilizando CHCl_3 , para obtener un sólido blanco. La caracterización de la sustancia se llevó a cabo a través de sus datos físicos y espectroscópicos, así como por comparación de datos descritos de compuestos afines (Thebtaranonth et al., 2006). Con la información adquirida se llegó a la conclusión que se trataba del óxido de β -cariofileno (**4**) (Fig. 5.10). Este compuesto presentó un punto de fusión de $60\text{-}61^\circ\text{C}$ y $[\alpha]_D = -12.4$ (c 0.4, CHCl_3).

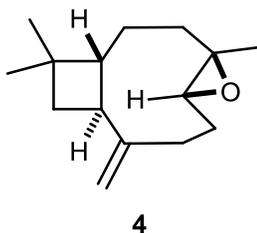


Figura 5.10. Estructura del óxido de β -cariofileno (**4**).

A continuación se describe el proceso de análisis por RMN que condujo a su caracterización.

En su espectro de RMN de protón (Fig. 5.11, Tabla 5.4) se observó en 4.97 y 4.85 ppm señales anchas que integraron para un protón típicas de protones que forman parte de un doble enlace exocíclico y los cuales se identificaron para H-13 y H-13'. En 2.87 ppm se apreció una señal doble de dobles que presentó constantes de acoplamiento de 10.6 y 4.4 Hz e integró para un protón, característica de un hidrógeno base de epóxido (H-5). En 2.61 ppm se observó señal cuádruple con constante de acoplamiento de 10.0 Hz que se asignó a H-9. En 1.18 ppm se observó una señal simple que integró para tres protones y que es típica para metilos con base de epóxido por lo que se identificó para Me-12. Los metilos geminales Me-14 y Me-15 se apreciaron como señales simples en 0.98 ppm y 0.96 ppm, respectivamente.

El espectro de ^{13}C (Fig. 5.12, Tabla 5.4) mostró 15 señales corroborando así la estructura de un sesquiterpeno. Sus señales características fueron la de 151.9 y 112.8 ppm que están formando el doble enlace exocíclico (C-8 y C-13). Para los carbonos C-5 y C-4 bases de epóxido se asignaron las señales en 63.8 y 59.9 ppm, respectivamente. De 55.0 a 15.0 ppm aparecen las señales de los carbonos sp^3 restantes de la molécula. En el caso de los metilos, los carbonos geminales Me-15 y Me-14 se asignaron en 29.2 y 21.6 ppm, respectivamente. El metilo Me-12 base de epóxido se observó en 16.8 ppm.

El óxido de β -cariofileno (**4**) es un compuesto conocido y sus datos espectroscópicos coincidieron con los descritos. Estudios han presentado su actividad analgésica (Chavan et al., 2010), antimalárica y antiinflamatoria (Kanokmedhakul et al., 2007).

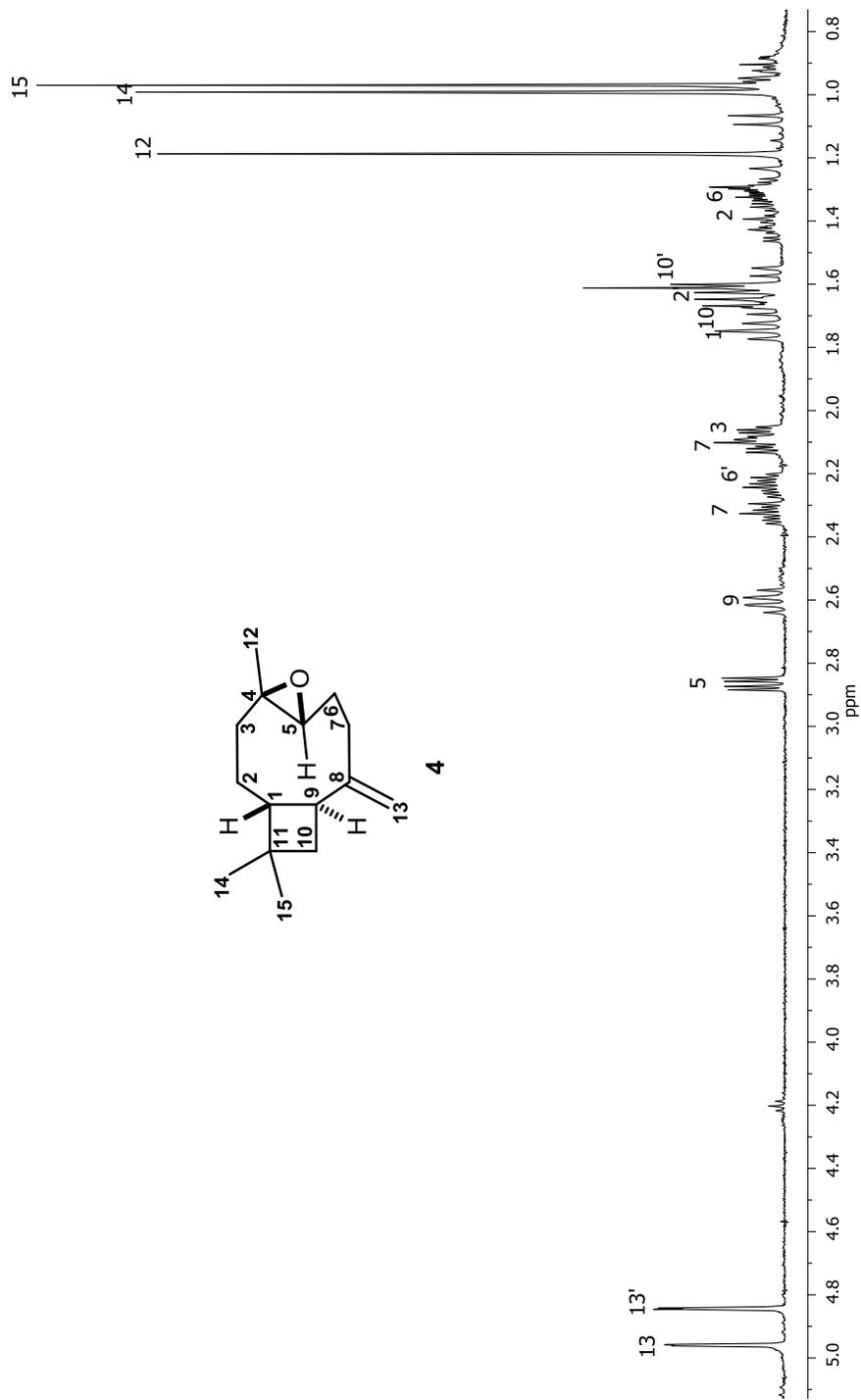


Figura 5.11. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) del óxido de β -cariofileno (4) en CDCl_3 .

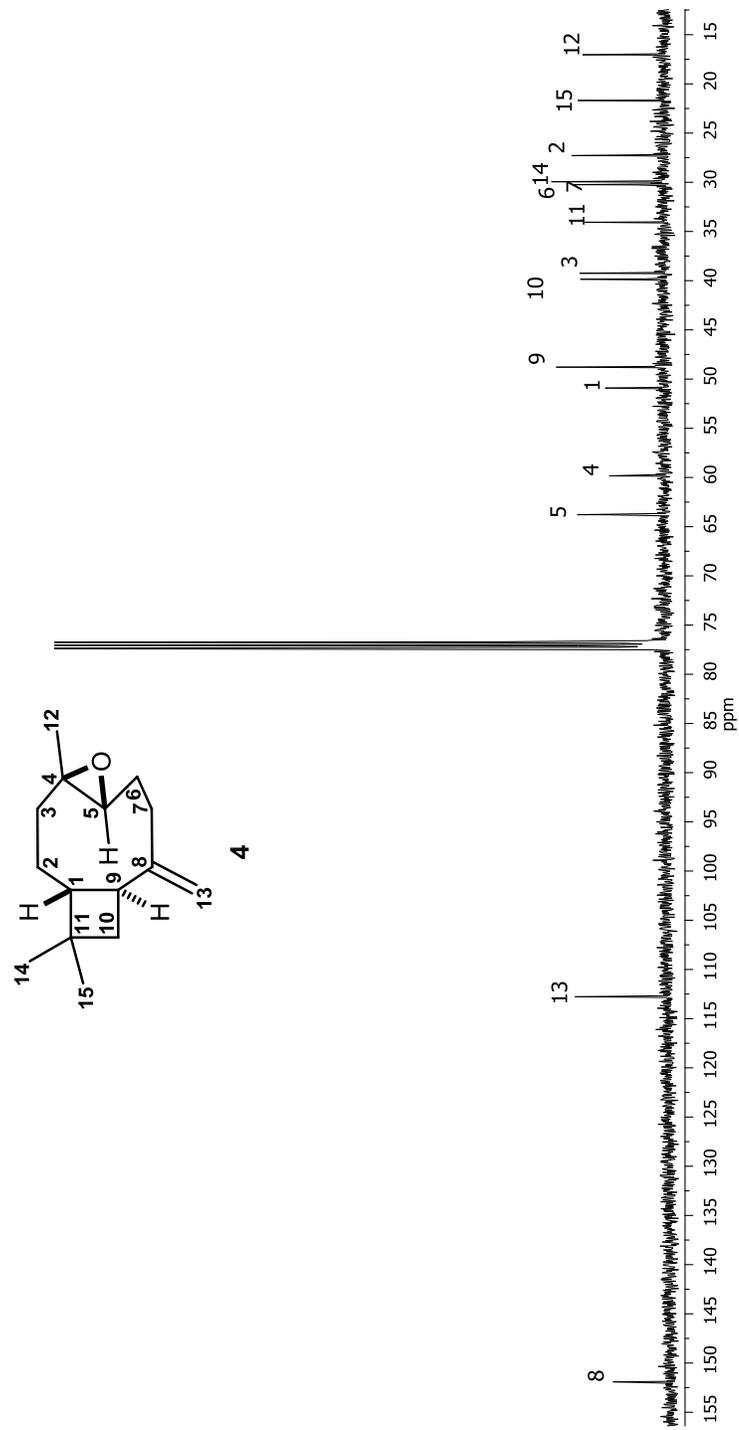


Figura 5.12. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) del óxido de β -cariofileno (4) en CDCl_3 .

Tabla 5.4. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C del óxido de β -cariofileno (4).

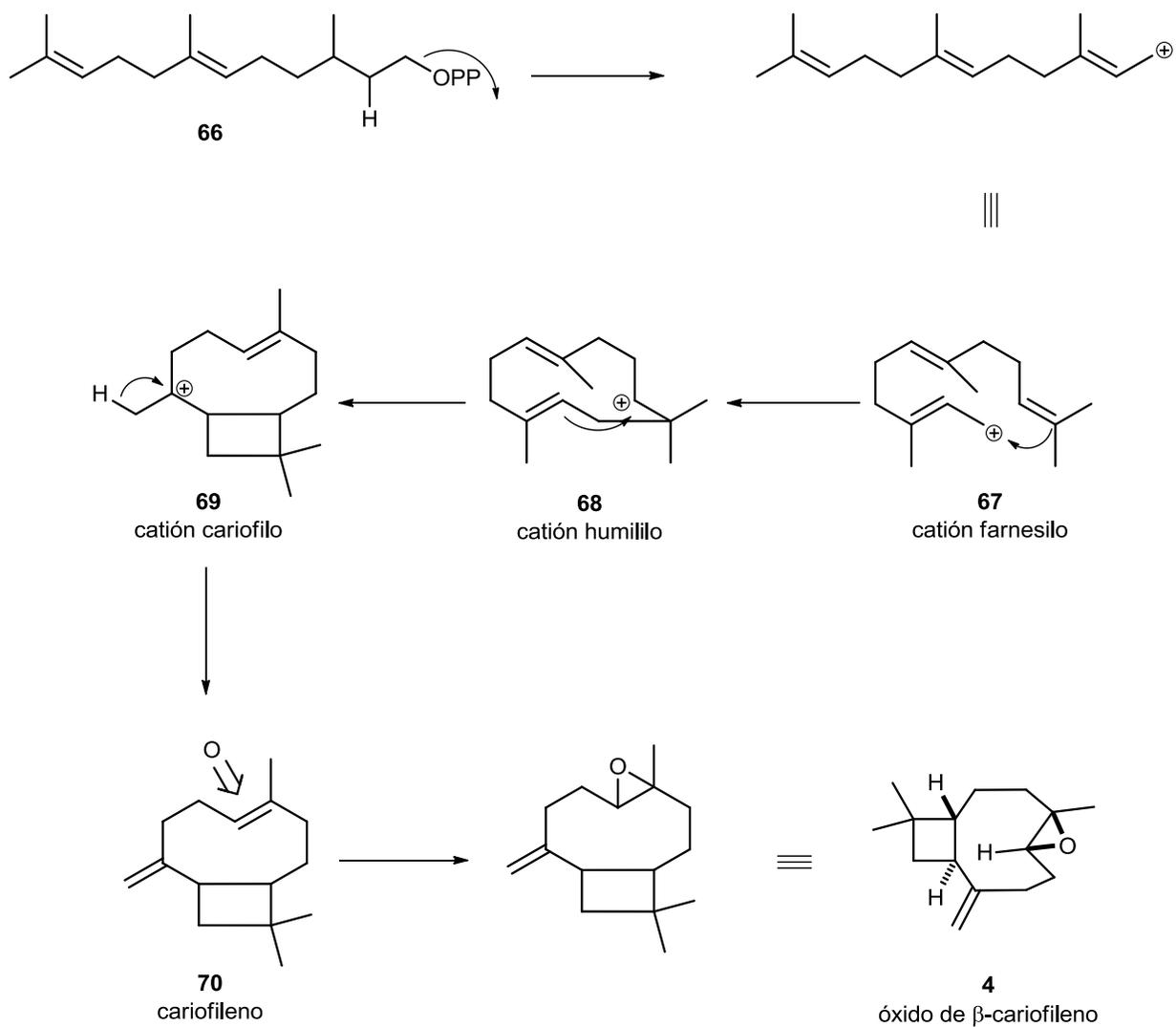
Posición	^1H m (J en Hz)	^1H m (J en Hz), lit*	^{13}C	^{13}C , lit*
1	1.75 t (10.0)	1.76 t (10.0)	50.8	50.8
2	1.41 m	1.32 m	27.2	27.2
2'	1.65 m	1.55-1.72 m		
3	0.93 m	0.95 m	39.2	39.1
3'	2.08 m	2.10 dt (12.5, 3.5)		
4			59.9	59.8
5	2.87 dd (10.6, 4.4)	2.87 dd (10.6, 4.1)	63.8	63.7
6	2.25 m	2.25 ddd(16.4, 7.8, 4.1)	30.6	30.3
6'	1.33 m	1.42 m		
7	2.33 m	2.34 ddd (12.6, 8.0, 4.3)	29.8	29.8
7'	2.11 m	2.11 t (12.4)		
8			151.9	151.8
9	2.61 c (10.0)	2.61 c a (10.0)	48.8	48.7
10	1.68 m	1.55-1.72 m	39.8	39.8
10'	1.63 m			
11			34.1	34.0
12	1.18 s	1.20 s	17.1	17.0
13	4.97 sa	4.97 sa	112.8	112.7
13'	4.85 sa	4.85 sa		
14	0.98 s	1.00 s	21.7	21.6
15	0.96 s	0.98 s	30.0	29.9

t= triple, m= multiple, d= doble, s= simple, sa= simple ancha, ca= cuádruple ancha.

*Thebtaranonth et al., 2006.

5.2.2.1.2. Biosíntesis del óxido de β -cariofileno (4)

La biosíntesis del óxido de β -cariofileno (4) (Esq. 5.4) puede visualizarse a partir del difosfato de farnesilo (66), cuya salida del grupo difosfato conduce al catión farnesilo (67). Este catión es atacado por el doble enlace terminal para generar el catión humililo (68), el cual puede dar lugar al catión cariofilo (69) que mediante la pérdida de un protón genera el doble enlace exocíclico del cariofileno (70). Una oxidación posterior en C-4 y C-5 da como resultado el óxido de β -cariofileno (4).



Esquema 5.4. Biosíntesis del óxido de β -cariofileno (4).

De las fracciones gruesas G-I obtenidas con CHCl_3 , $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ (9:1 y 4:1), y realizando cromatografías sucesivas con CHCl_3 y mezclas de $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ en orden creciente de polaridad se obtuvo un sólido amarillo que en CCF reveló con FeCl_3 dando una coloración verde oscuro e indicando así que el compuesto correspondía a un flavonoide.

Su espectro de RMN de protón en CDCl_3 (Fig. 5.13, Tabla 5.5) mostró una señal simple ancha en 12.40 ppm que integró para un protón, desplazamiento característico para protón de hidroxilo unido a un carbono aromático que puede estar formando un puente de hidrógeno en la estructura (HO-C5). En 7.71 y en 7.67 ppm se observó una señal doble y una doble de dobles, respectivamente, característicos para los protones aromáticos H-2' y H-6'. H-2' presentó una constante de acoplamiento *meta*, mientras que H-6' presentó constantes de acoplamiento *orto* y *meta*. Alrededor de 7.05 ppm se observó la señal doble de H-5', la cual presentó una constante de acoplamiento *orto*. En 6.56 ppm se observó el protón aromático H-8 como una señal simple. Entre 3.75 y 3.95 ppm se observaron tres señales simples que integraron para 9 protones evidenciando la presencia de los metoxilos en la estructura.

En el espectro de ^{13}C en CHCl_3 (Fig. 5.14, Tabla 5.5) se observaron 19 señales, entre ellas la señal característica para carbono de un carbonilo en 178.3 ppm, entre 135.0 y 160.0 ppm aparecieron las señales que fueron asignadas para los carbonos aromáticos base de oxígeno (C-5, C-7, C-9, C-3' y C-4'), mientras que C-2 y C-3 tuvieron un desplazamiento de 156.2 y 138.6 ppm, respectivamente. Entre 105.0 y 130.0 ppm se apreciaron los carbonos aromáticos restantes en posición 6, 6', 1', 2', 5' y 10, además que en 91.2 ppm se observó la señal para C-8. En 60.2, 56.5 y 55.2 ppm

se observaron las tres señales de los metoxilos. Para determinar la posición de los metoxilos en la estructura se utilizó el experimento HMBC (Fig. 5.15-5.16). Así, las señales de los carbonos C-7, C-3' y C-3 en 154.7, 147.6 y 137.6 ppm presentan correlaciones con las señales de metoxilos en el espectro de protón en 4.00, 3.99 y 3.86 ppm respectivamente, lo cual nos permitió asignar y confirmar las asignaciones de protones y carbonos del compuesto, sobre todo aquellos carbonos cuaternarios. En la tabla 5.6 se presentan las principales correlaciones observadas. Adicionalmente se determinaron los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C en DMSO- d_6 (Fig. 5.17 y 5.18), llegando así a la totalidad de la asignación de la estructura. Con base en lo anterior, y a la comparación con datos de la literatura (Houng et al. 2004) se llegó a la conclusión que se trataba del flavonoide crisosplenol C (**5**) (Fig. 5.18), al cual se le ha descrito actividad antiviral contra picornavirus y rinovirus (Semple et al., 1999).

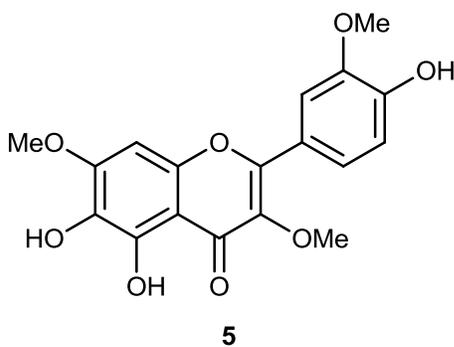


Figura 5.18. Estructura del crisosplenol C (**5**).

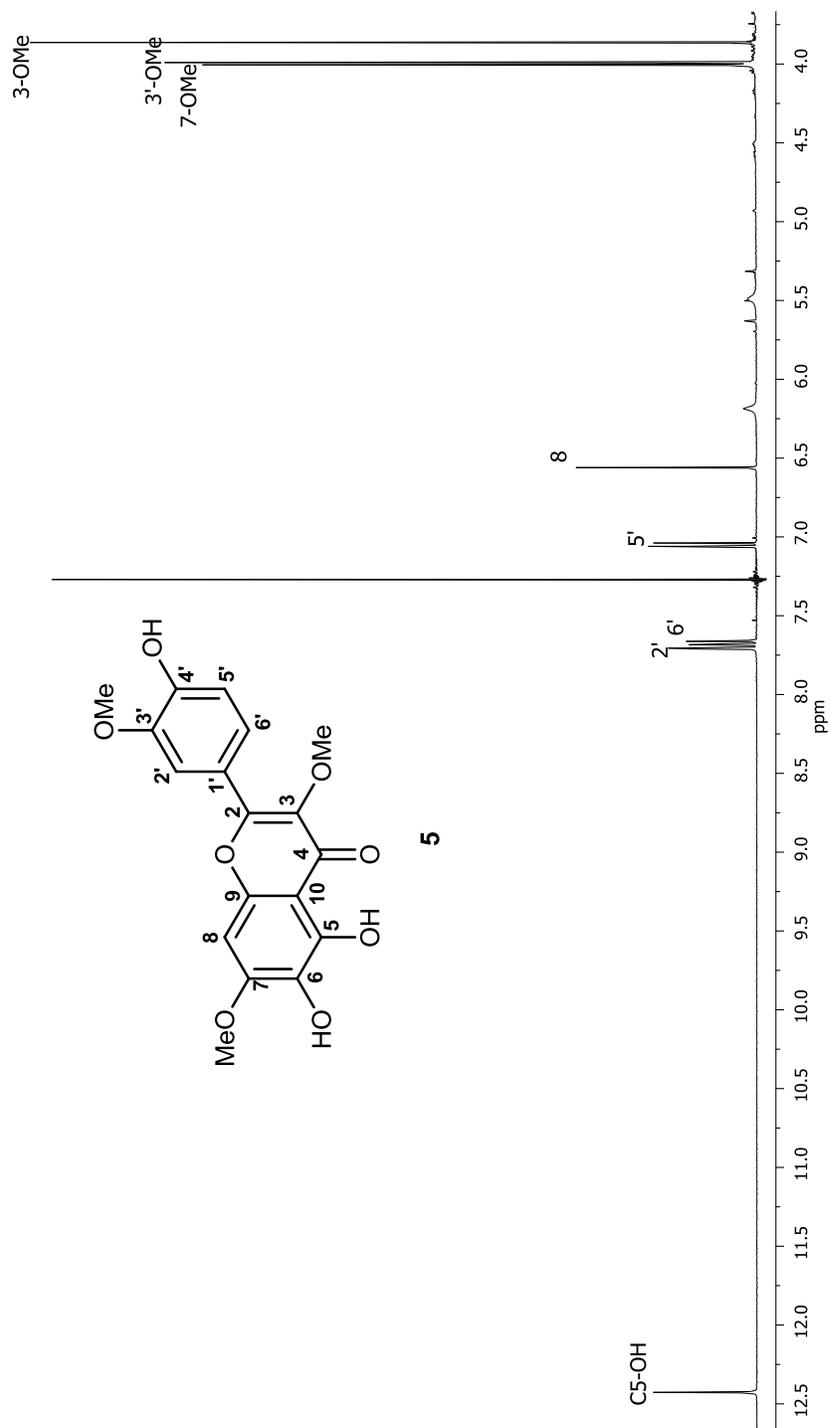


Figura 5.13. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) del crisosplenol C (5) en CDCl_3 .

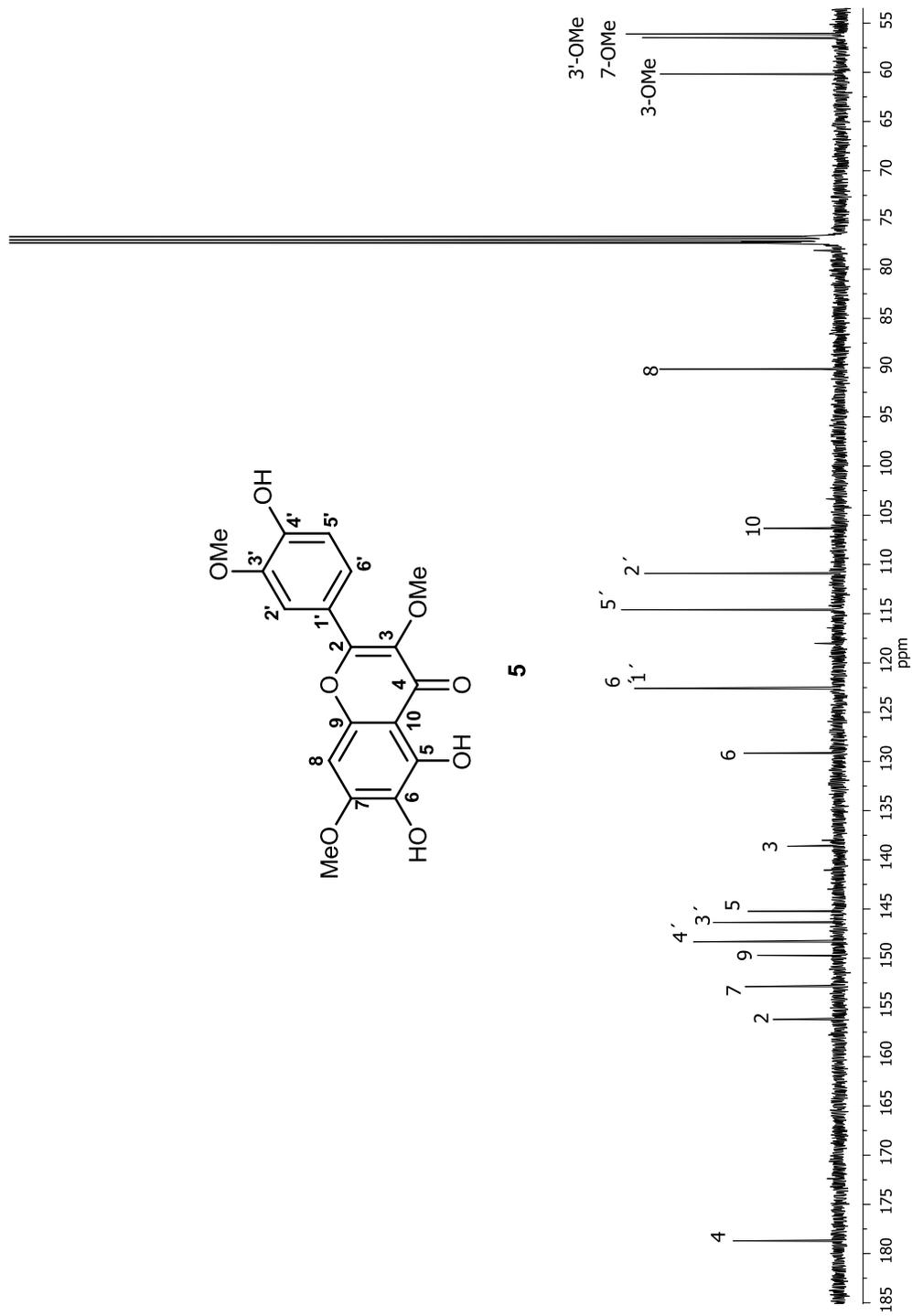


Figura 5.14. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) del crisosplenol C (5) en CDCl_3 .

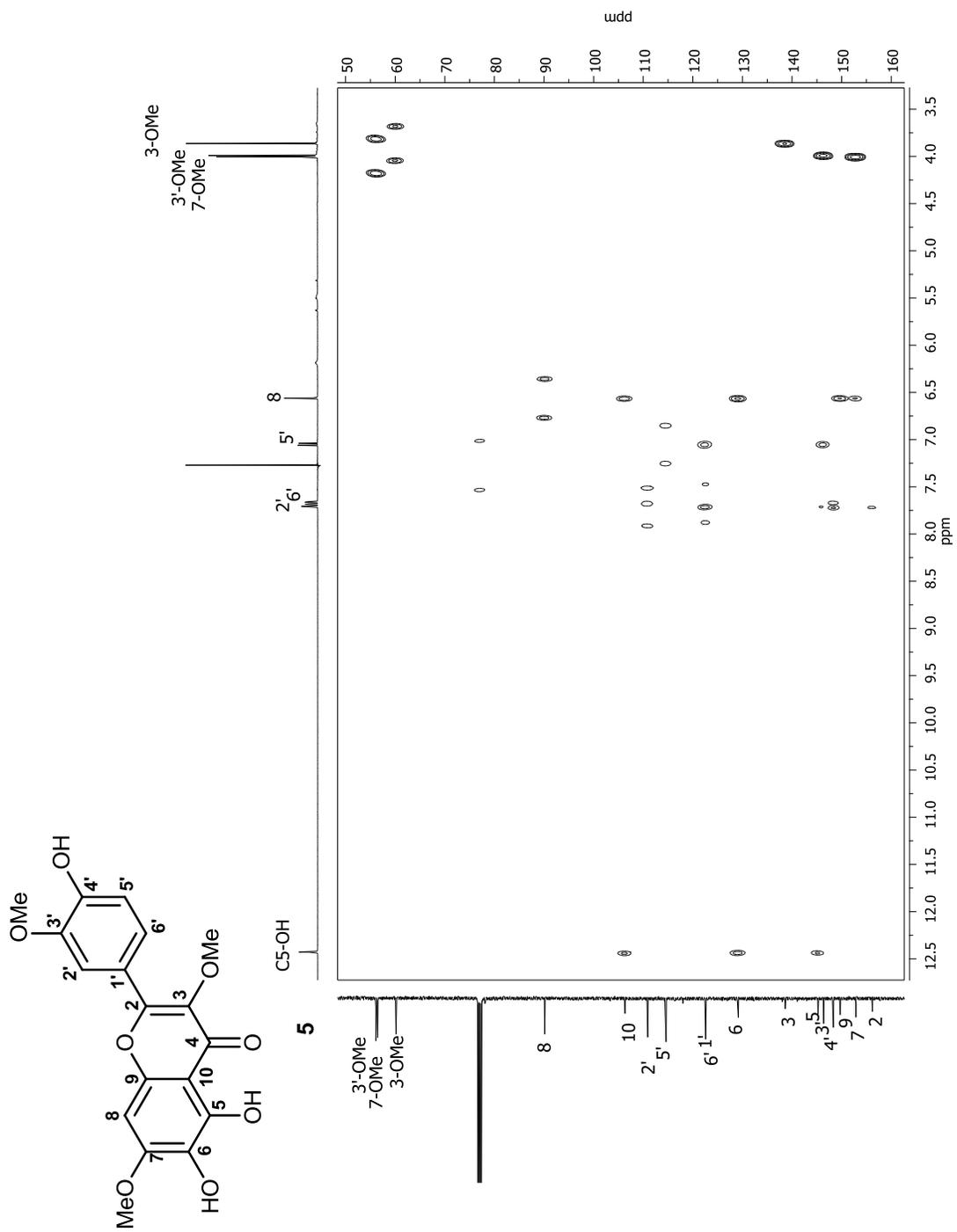


Figura 5.15. Espectro HMBC (400 MHz) del crisosplenol C (**5**) en $CDCl_3$.

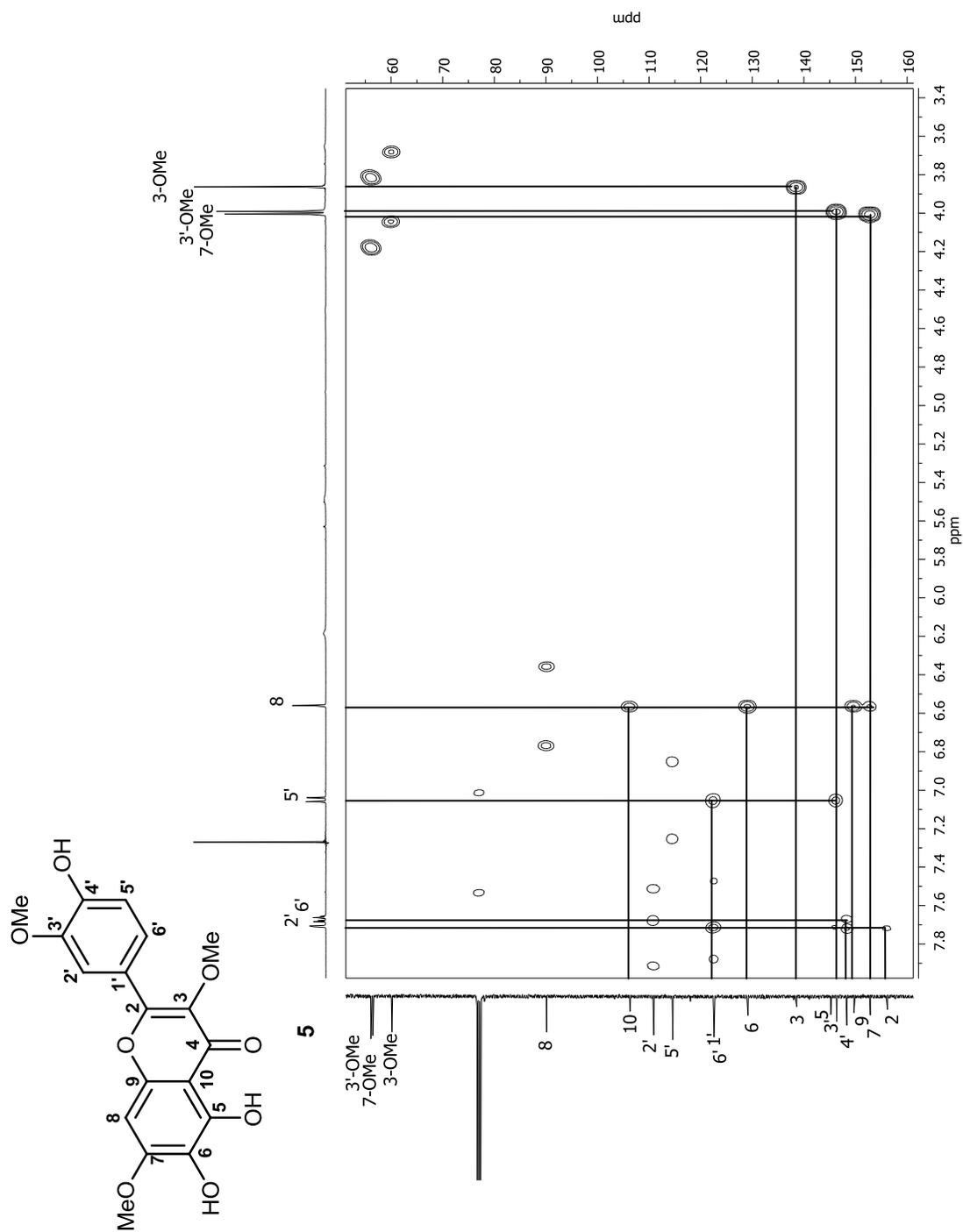


Figura 5.16. Ampliación del espectro HMBC (400 MHz) del crisosplenol C (**5**) en CDCl_3 .

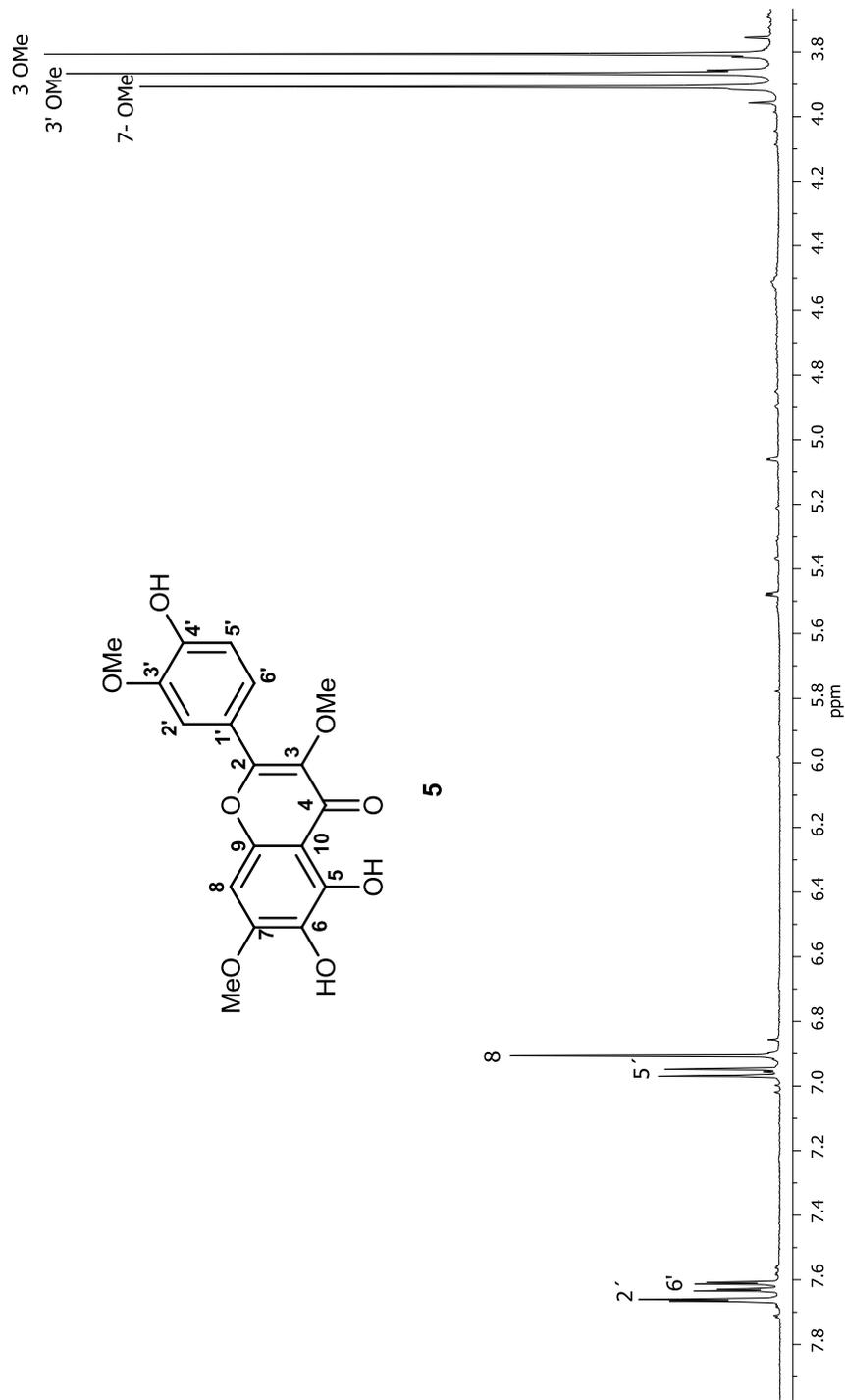


Figura 5.17. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz) del crisosplenol C (5) en DMSO-d₆.

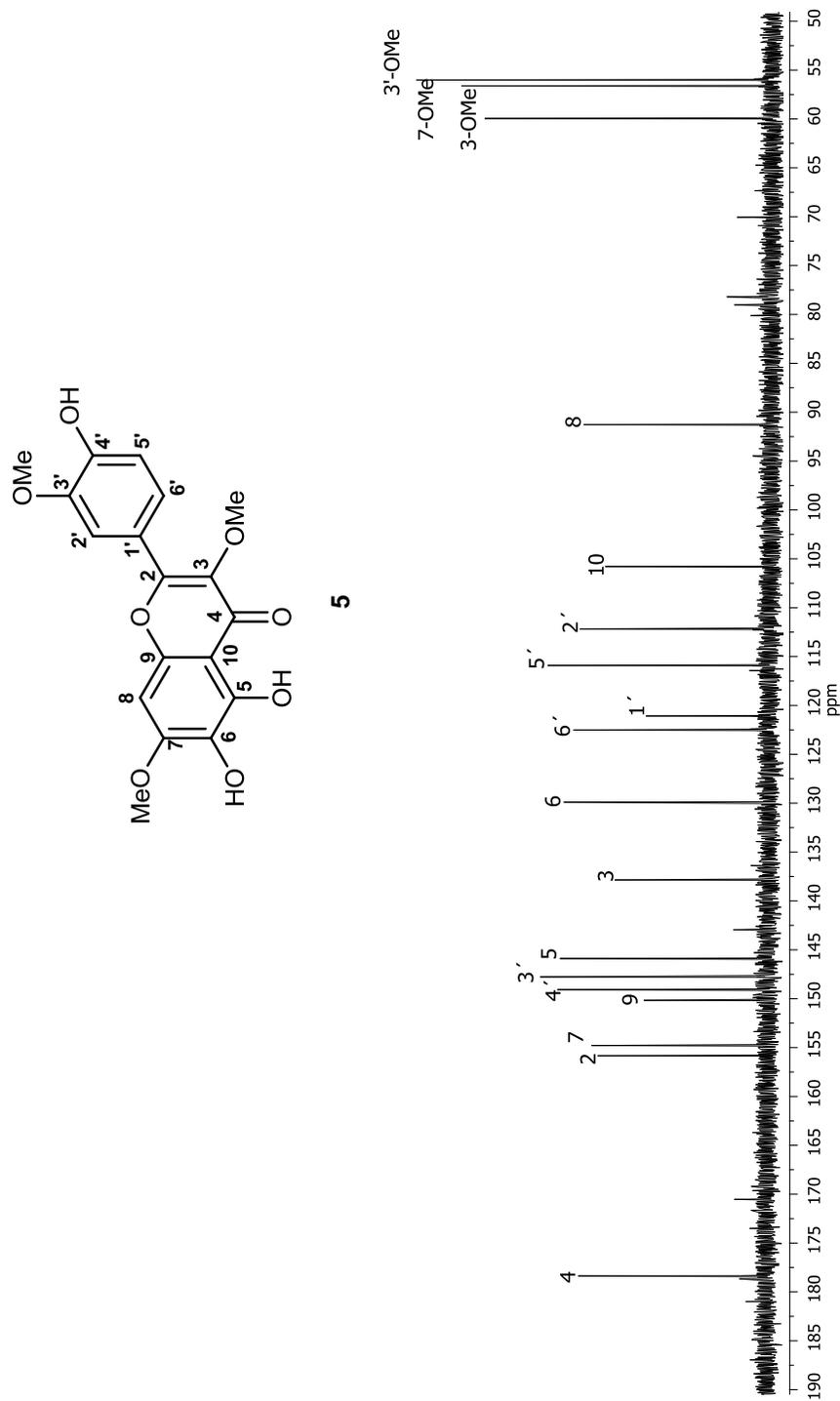


Figura 5.18. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) del crisosplenol C (5) en DMSO-d_6 .

Tabla 5.5. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C del crisosplenol C (5).

Posición	^1H m (J en Hz)	^1H m (J en Hz)*	^{13}C	$^{13}\text{C}^*$
2			156.2	155.8
3			138.6	137.8
4			178.7	178.4
5			145.2	145.9
6			129.2	129.9
7			152.9	154.8
8	6.56 s	6.91 s	90.1	91.2
9			149.7	149.1
10			106.3	105.8
1'			122.4	121.1
2'	7.71 d (2.0)	7.66 d (2.0)	110.9	112.3
3'			146.4	147.8
4'			148.3	150.2
5'	7.05 d (8.4)	6.96 d (8.4)	114.6	115.9
6'	7.67 dd (8.4, 2.0)	7.62 dd (8.4, 2.0)	122.6	122.5
3-OMe	3.86 s	3.81 s	60.2	60.0
7-OMe	4.00 s	3.91 s	56.5	56.6
3'-OMe	3.99 s	3.87 s	56.2	56.1

d = doble, s = simple.

* Datos obtenidos en DMSO- d_6 .

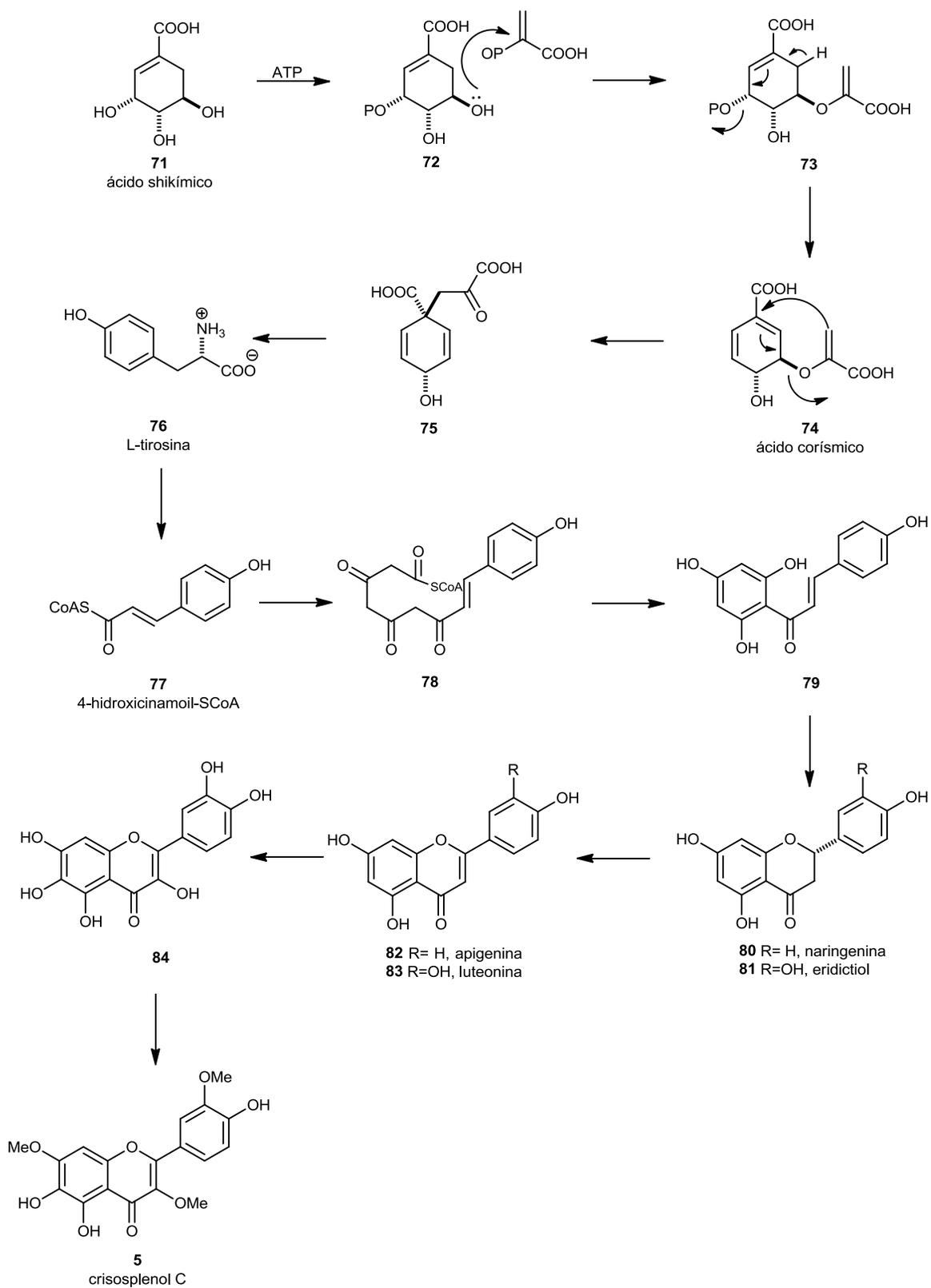
Tabla 5.6. Correlaciones importantes observadas en el experimento HMBC del crisosplenol C (5).

Protón	Correlaciones con carbonos
8	6, 7, 9, 10
2'	2, 3', 4'
5'	3', 6'
6'	4'
3-OMe	3
7-OMe	7
3'-OMe	3'
C5-OH	5, 6, 10

5.2.2.1.3. Biosíntesis del crisosplenol C (5)

Crisosplenol C se ha obtenido en cantidades importante de plantas del género *Chrysosplenium* (Arisagua et. al., 1991). En el género *Stevia* se han descrito varias flavonas metoxiladas, aunque en el caso de crisosplenol C se reporta por primera vez en el género.

La biosíntesis del crisosplenol C (Esq. 5.5) se ha propuesto a partir del ácido shikímico (71), que en presencia de ATP genera 72 seguido de un ataque nucleofílico de uno de los OH's al doble enlace del fosfoenolpiruvato y la eliminación 1-2 de fosfato se genera 73, que presenta eliminación 1-4 de fosfato con lo que se llega al ácido corísmico (74). Posteriormente, un reordenamiento tipo Claisen conduce al compuesto 75 que en presencia de NAD y glutamato da lugar a la L-tirosina (76). La L-tirosina (76) genera la 4-hidroxicinamoil-SCoA (77) que con 3 moléculas de malonil-SCoA conduce al tetracétido 78. La condensación de Claisen, seguido de una enolización de 78 da como resultado la chalcona 79, que en presencia de una flavonol sintetasa se cicla para dar la naringenina (80) y/o eridictiol (81). En presencia de O₂ y 2-oxoglutarato 80 y 81 producen apigenina (82) y luteolina (83), que se hidroxilan para dar la flavona 84. Las O-metilaciones selectivas realizadas por SAM generan el crisosplenol C (5).



Esquema 5.5. Biosíntesis del crisosplenol C (5).

La parte de MeOH (1 g) se disolvió en MeOH y se cromatografió en columna utilizando como soporte sephadex LH-20 colectando fracciones gruesas (250 mL) y utilizando como fase móvil H₂O, mezclas de H₂O-MeOH en orden decreciente de polaridad y MeOH. A la fracción obtenida con MeOH-Agua (1:1) se le realizaron posteriores cromatografías en columna en gel de sílice usando CHCl₃, CHCl₃-MeOH en orden creciente de polaridad y MeOH. De las fracciones obtenidas con CHCl₃-MeOH (4:1) se obtuvieron 5 mg (0.5 %) de un sólido de color amarillo claro que en CCF reveló con ácido difenilborínico y cloruro férrico evidenciando la presencia de un flavonoide.

En su espectro de RMN de protón (Fig. 5.19, Tabla 5.7) se observó una señal simple que integró para un protón en 12.60 ppm, típica de hidrógeno de hidroxilo en C-5. En 7.61 y 7.58 ppm se observaron una señal doble con constante de acoplamiento de 2.0 Hz (*meta*) y una señal doble de dobles con constantes de acoplamiento de 8.4 (*orto*) y 2.2 Hz (*meta*) que integraron para un protón cada una (H-2' y H-6'). En 6.89 ppm se observó la señal en H-5' (d, $J = 8.4$ Hz). En 6.45 y 6.24 ppm se apreciaron las señales dobles en cada caso que integraron para un protón cada una, con constante de acoplamiento *meta* de 2.2 Hz para los protones H-8 y H-6, respectivamente. En 5.38 ppm se apreció una señal doble que integró para un protón con constante de acoplamiento de 7.3 Hz, típica de un protón anomérico de azúcar, por lo que se asignó a H-1". Para los protones de H-(2"- 6") se observaron señales múltiples entre 3.70 ppm y 3.00 ppm.

De acuerdo a los datos físicos y espectroscópicos y comparación con datos descritos se concluyó que se trataba del compuesto conocido como isoquercitrina (6) (Fig. 5.20), un flavonoide que ha presentado actividad hepatoprotectora (Nasser et.al., 2005) y anticancerosa (Ferreira et. al., 2010).

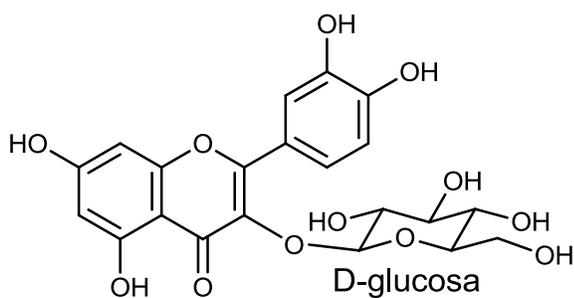


Figura 5.20. Estructura de la isoquercitrina (6).

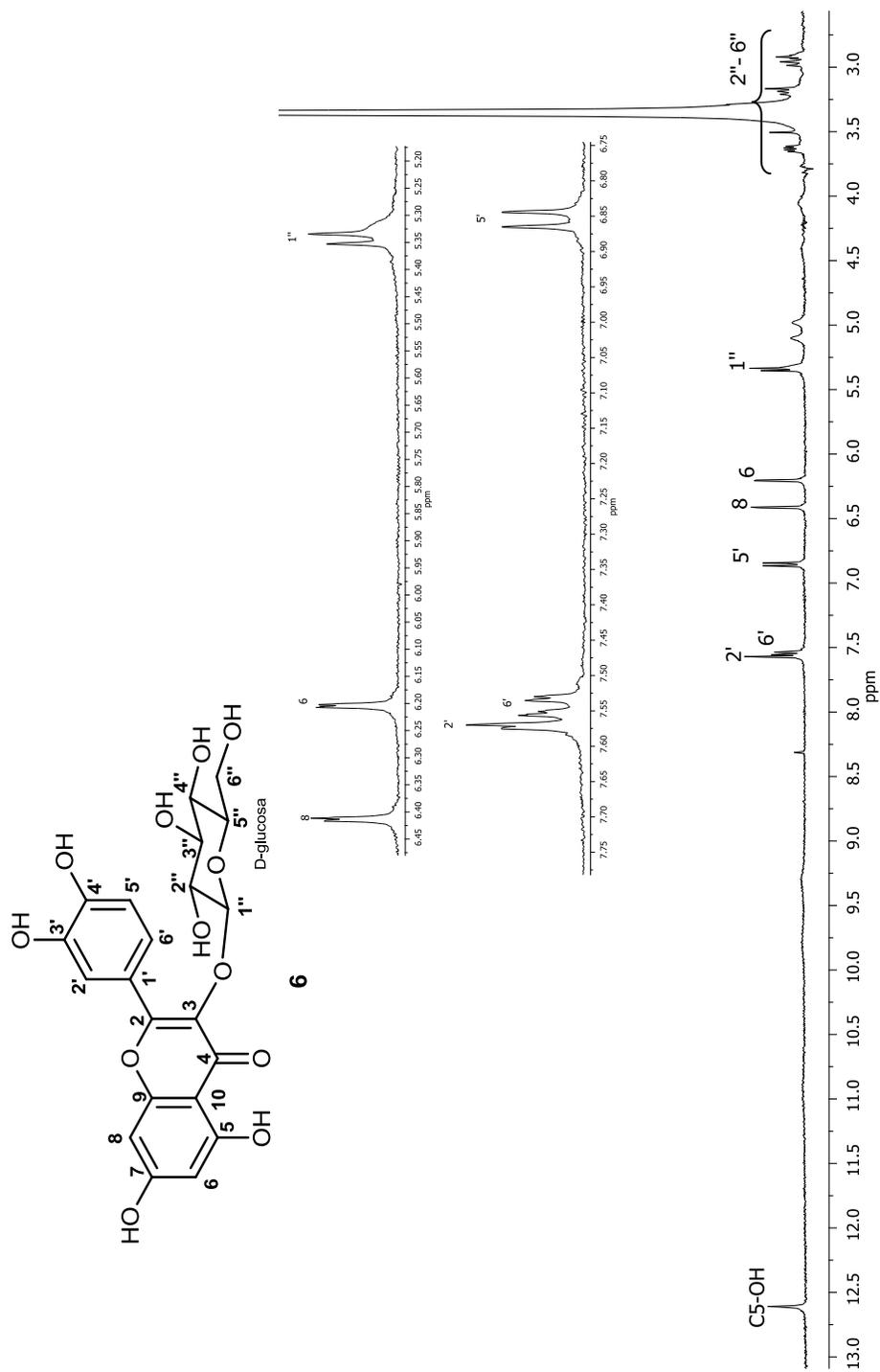


Figura 5.19. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de la isoquercitrina (6) en DMSO-d_6 .

Tabla 5.7. Datos de RMN de ^1H de la isoquercitrina (**6**).

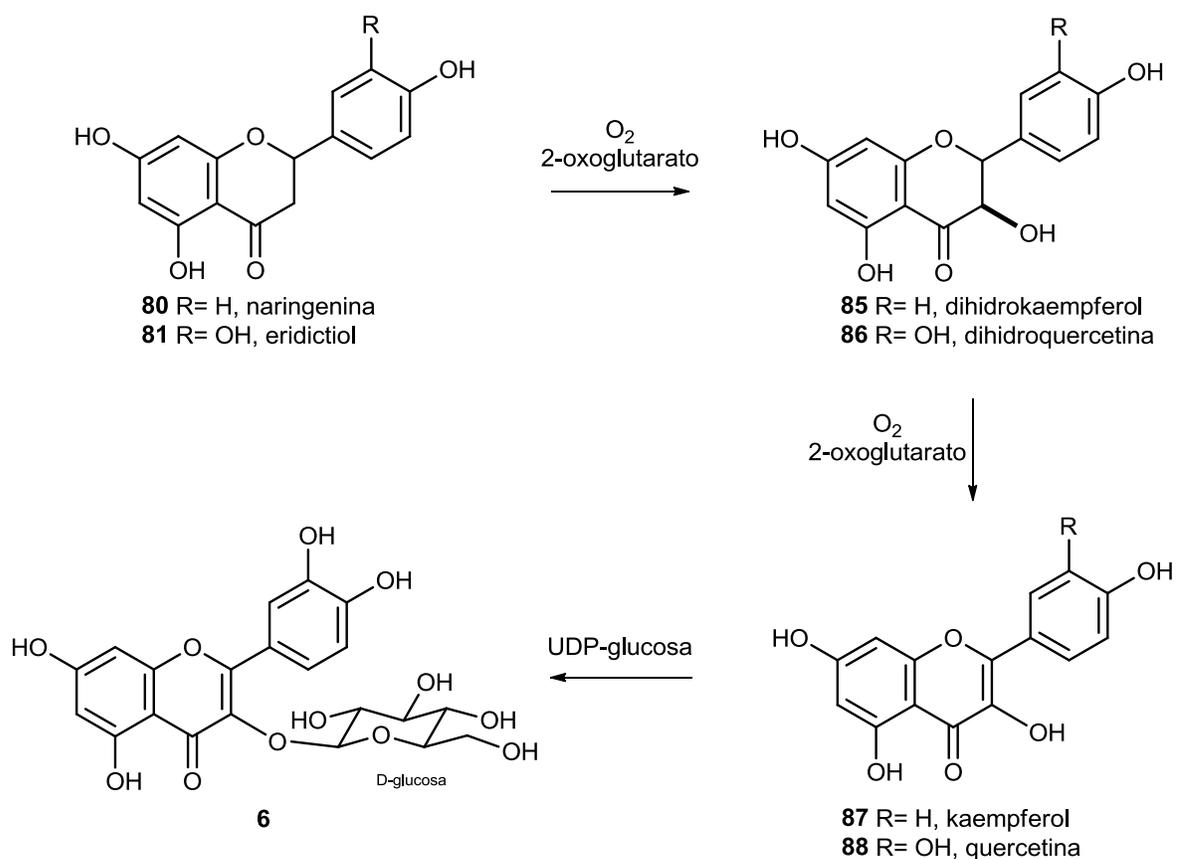
Posición	^1H m (J en Hz)	^1H m (J en Hz), lit*
6	6.24 d (2.2)	6.19 d (2.0)
8	6.45 d (2.2)	6.39 d (2.0)
2'	7.61 d (2.0)	7.58 d (2.4)
5'	6.89 d (8.4)	6.84 d (8.6)
6'	7.58 dd (8.4, 2.2)	7.56 dd (8.6, 2.4)
1''	5.38 d (7.3)	5.45 d (7.3)
2''- 6''	3.70 - 3.00 m	-
C5-OH	12.60 sa	-

d= doble, m= múltiple, sa= simple ancha.

* Singab et al., 2005.

5.2.2.1.4 Biosíntesis de la isoquercitrina (6)

La biosíntesis de isoquercitrina (Esq. 5.6) sigue la misma ruta que el crisosplenol C (5) hasta la formación de naringenina (80) y/o eridictiol (81). Estos últimos mediante la acción de O_2 y 2-oxoglutarato conducen a dihidrokaempferol (85) y dihidroquercetina (86). Los dihidroflavonoles 85 y 86 con O_2 y 2-oxoglutarato conducen a kaempferol (87) y quercetina (88). La adición de glucosa en la posición 3 de la quercetina se da por medio de la uridindifosfato glucosa (UDP-glucosa) generándose la isoquercitrina (6).



Esquema 5.6. Biosíntesis de la isoquercitrina (6).

5.2.2.2 Separación cromatográfica del extracto clorofórmico

La parte aérea de *S. tomentosa* (500 g) se sometió a maceración con CHCl_3 (4 L) por 7 días, seguido por filtración y concentrado en el rotavapor para obtener el extracto correspondiente (30 g), el cual se trató siguiendo un procedimiento conocido para la obtención selectiva de lactonas sesquiterpénicas (Hernández et al., 1994) (de Hernández et al., 1997). El extracto se redisolvió en EtOH (250 mL), se calentó a 60 °C, se adicionó H_2O (150 mL) y se llevó a temperatura ambiente. Posteriormente, se hicieron lavados con hexano (3 x 400 mL) y CHCl_3 (3 x 400 mL), las fases orgánicas se concentraron y se juntaron para obtener 9.5 g de un sólido verde oscuro. Este producto se sometió a separación cromatográfica usando la técnica de CC en gel de sílice, para obtener fracciones gruesas (250 mL) con mezclas de hexano-AcOEt y CHCl_3 -MeOH como eluyente, en orden creciente de polaridad. Las fracciones se etiquetaron como A-M.

Las fracciones G y H eluidas con CHCl_3 y CHCl_3 -MeOH (9:1) se juntaron y mediante sucesivas recromatografías utilizando CHCl_3 y mezclas de CHCl_3 -MeOH (19:1) se obtuvo un sólido ligeramente amarillo (30 mg, 0.31%) con p. f. 192.5-193.5 °C. Su análisis por RMN de ^1H y de ^{13}C en 1D y 2D nos llevó a la conclusión de que se trataba de una lactona sesquiterpénica cuya estructura se propuso tentativamente, la cual denominamos como guayanólida A (**7**) (Fig. 5.21).

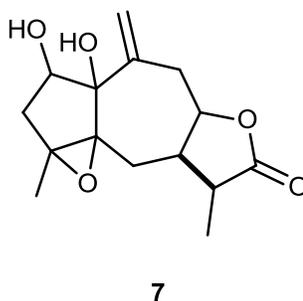


Figura 5.21. Estructura de la guayanólida A (7).

En el espectro de ^1H (Fig. 5.22, Tabla 5.8) de **7** se observaron dos señales simples anchas en 5.30 y 5.27 ppm que integraron para un protón cada una y características para hidrógenos de un doble enlace exocíclico. Estas señales se asignaron a los protones H-14 y H-14'. En 4.36 ppm se presentó una señal doble de doble de dobles con constantes de acoplamiento de 10.9, 5.7 y 5.5 Hz que integró para un protón, típica de un hidrógeno base de lactona (H-8). En 3.51 ppm se observó una señal doble con constante de acoplamiento de 2.6 Hz, la cual integró para un protón y que es característica de un hidrógeno base de OH (H-2). En 2.88 ppm se apreció una señal quintuple ($J= 7.4$ Hz) que integró para un protón y la cual se etiquetó para H-11. En 1.56 ppm se observó una señal simple característica de un metilo terciario (Me-15) base de oxígeno y en 1.24 ppm se observó una señal doble de un metilo secundario (Me-13) cuya constante de acoplamiento fue de 7.4 Hz. Con el experimento COSY (Fig. 5.23) se corroboraron asignaciones importantes de los protones de la estructura. Por ejemplo, como se observó la correlación del metilo secundario Me-13 con H-11, el protón base de lactona H-8 con el metileno en posición 9, además de la correlación observada de H-9 con uno de los protones del doble enlace exocíclico en posición 14.

En el espectro de ^{13}C (Fig. 5.24, Tabla 5.8) se observan 15 señales corroborando la estructura de una lactona sesquiterpénica. Entre las señales significativas fueron la de 177.6 ppm de un carbonilo de lactona, así como las señales en 139.0 y 119.1 ppm, típicas de un doble enlace exocíclico (C-10 y C-14). Entre 60.0 y 80.0 ppm se apreciaron 5 señales características de carbonos base de oxígeno, de las cuales según su espectro HSQC, 2 de ellas fueron CH y las otras 3 correspondieron a carbonos cuaternarios. En el experimento HSQC (Fig. 5.25) también se observaron todas las correlaciones esperadas, lo cual nos permitió asignar adecuadamente la mayoría de los protones y carbonos de la estructura. El experimento HMBC (Fig. 5.26-5.28) confirmó las asignaciones para las señales tanto en el espectro de protón como en el de carbono-13, lo cual nos condujo a proponer la estructura tentativa de esta lactona sesquiterpénica. Las correlaciones más importantes observadas en el experimento HMBC se presentan en la Tabla 5.9.

La sustancia cristalizó en CHCl_3 -hexano en forma de agujas y presentó p. f. 192.5-193.5 °C, pero hasta el momento no se han obtenido cristales adecuados para su difracción de rayos-X. Una búsqueda en la literatura reveló que esta sustancia representa un nuevo producto natural.

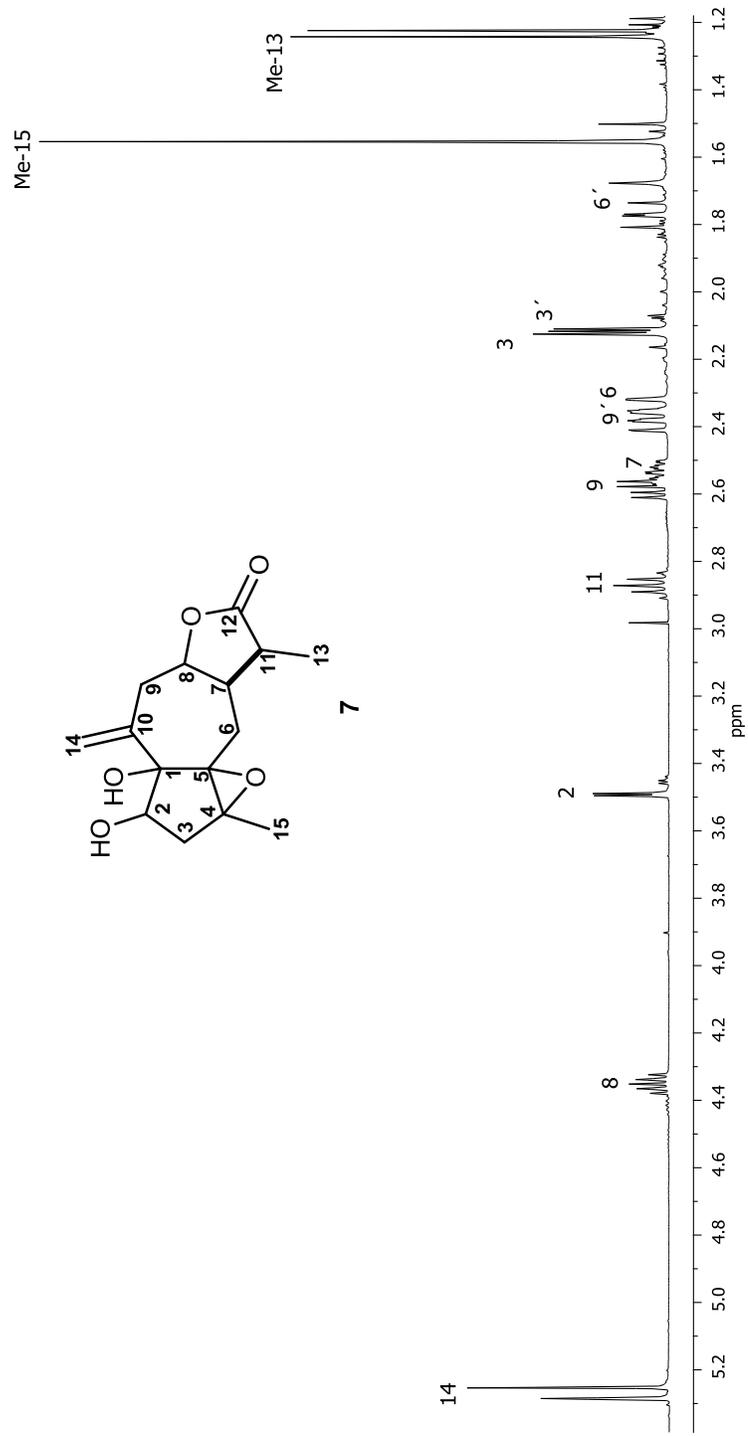


Figura 5.22. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de la guayanolida A (7) en CDCl_3 .

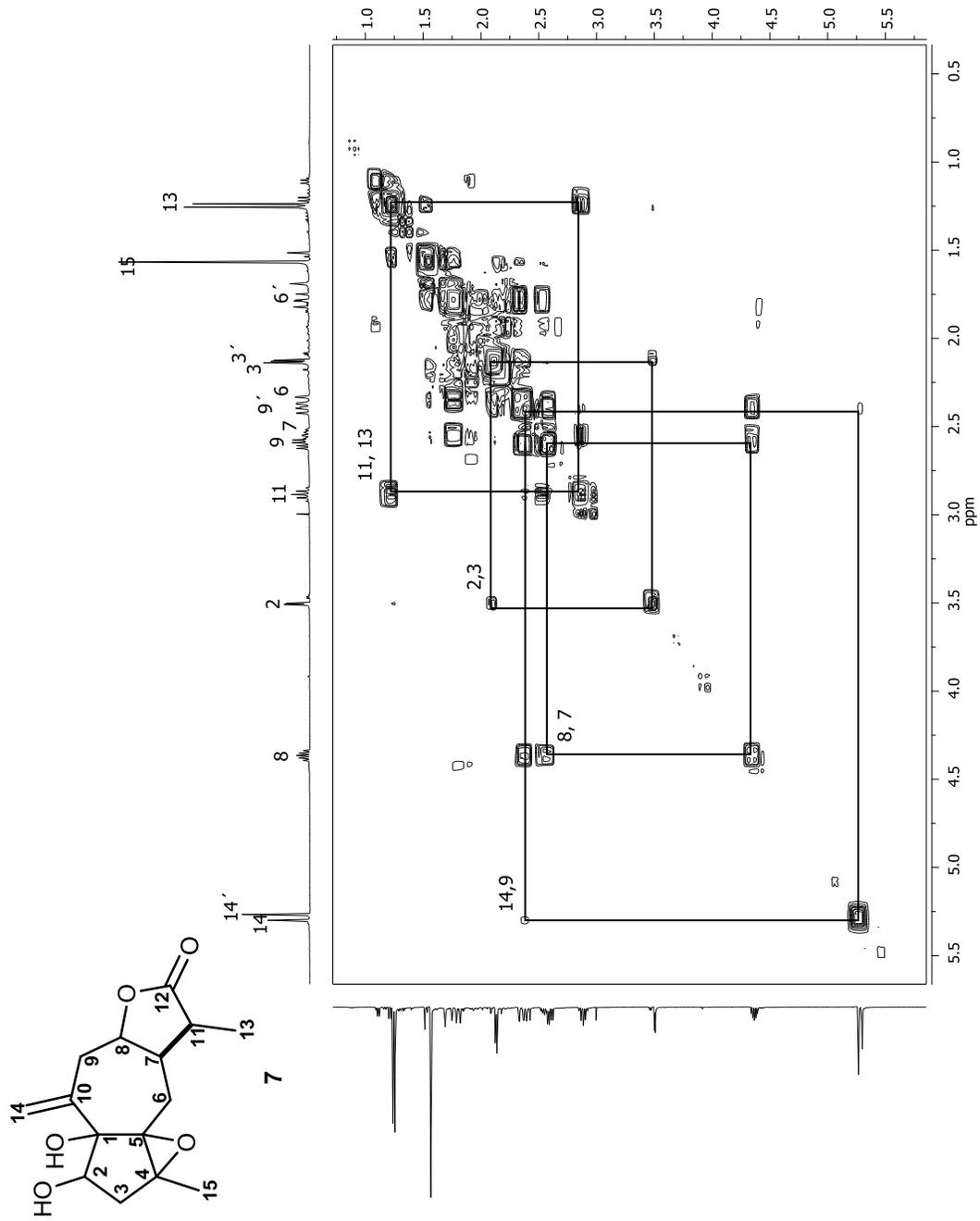


Figura 5.23. Espectro COSY (400 MHz) de la guayanolida A (7) en CDCl_3 .

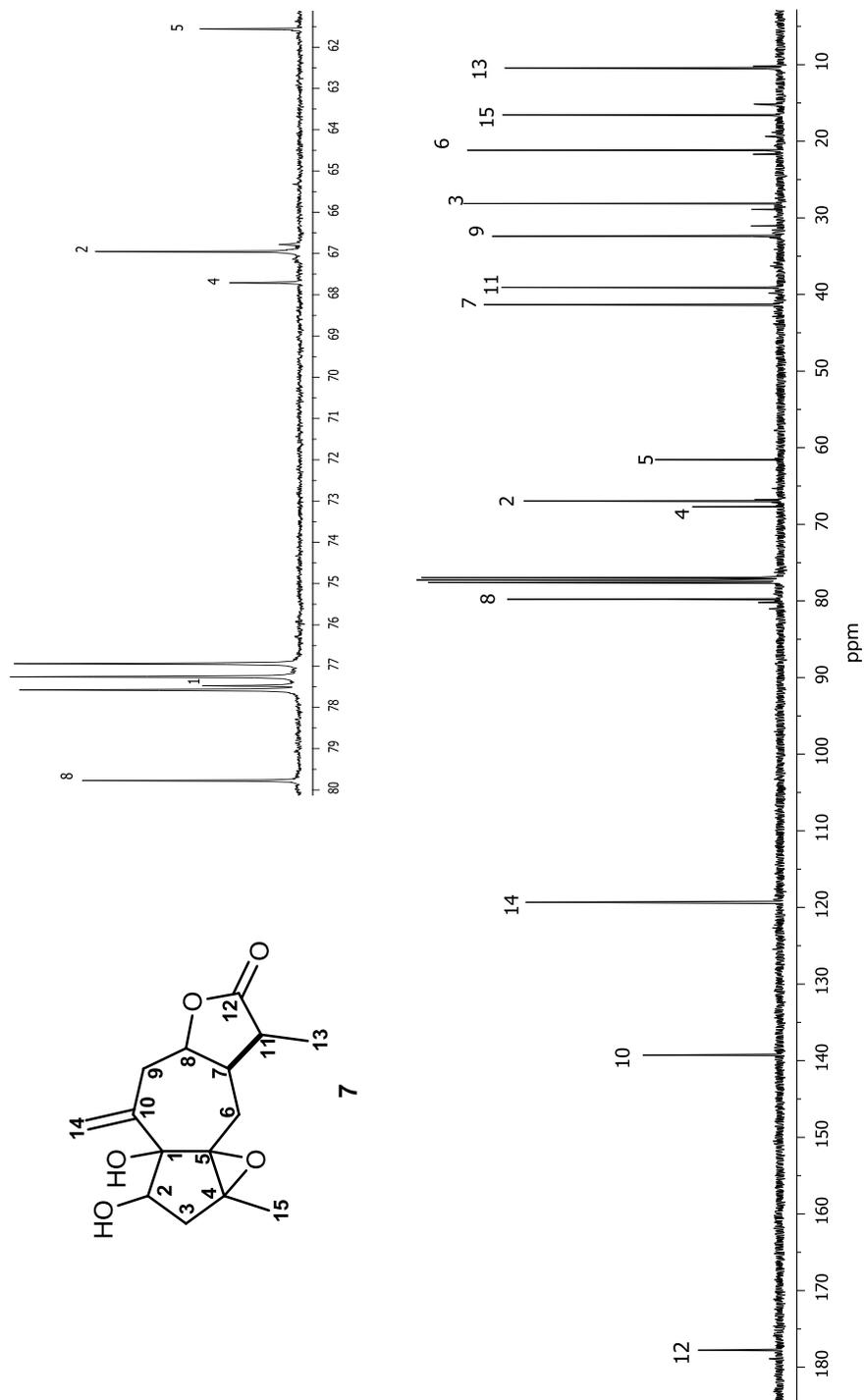


Figura 5.24. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de la guayanólida A (7) en CDCl_3 .

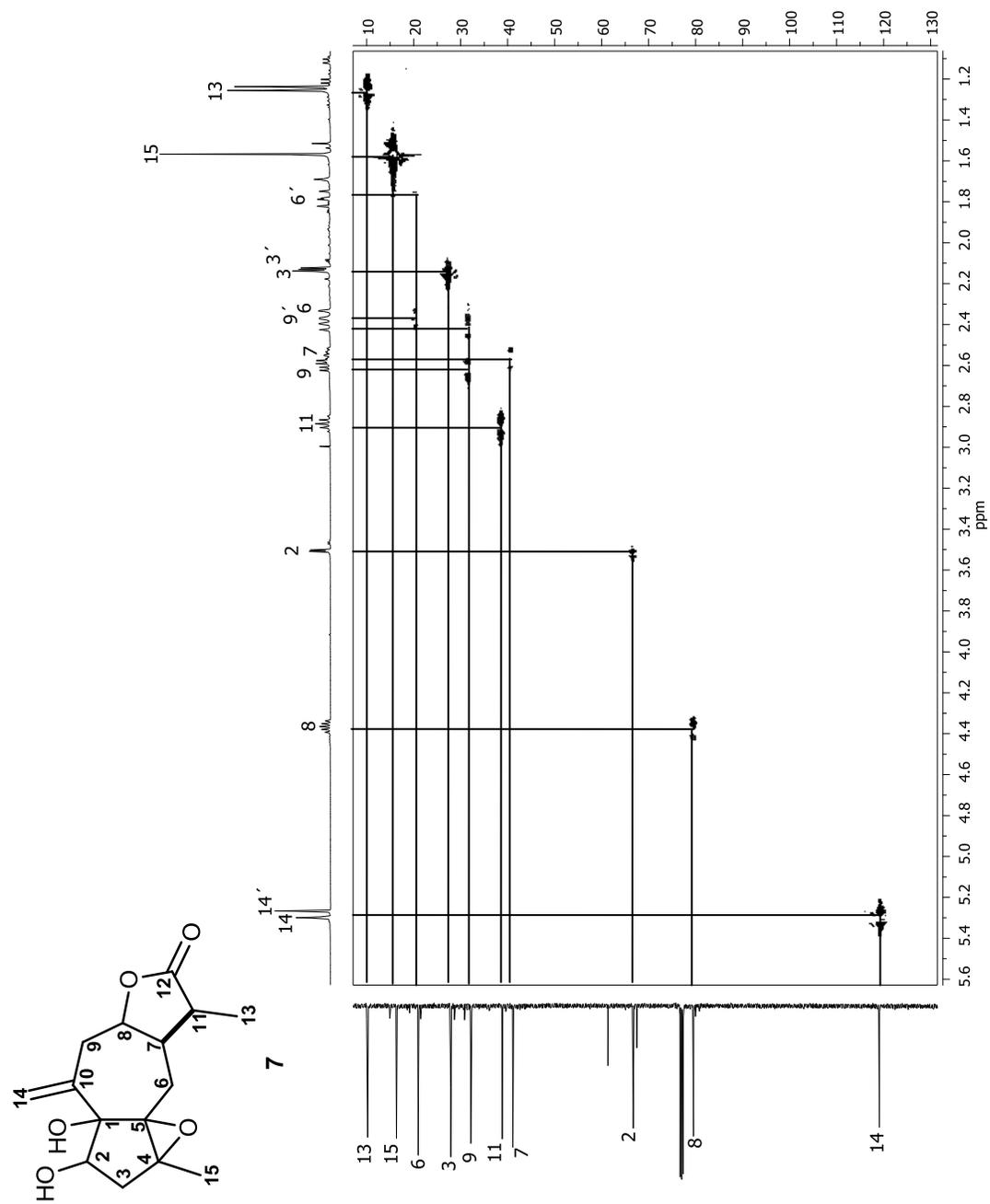


Figura 5.25. Espectro HSQC (400 MHz) de la guayanolida A (7) en CDCl_3 .

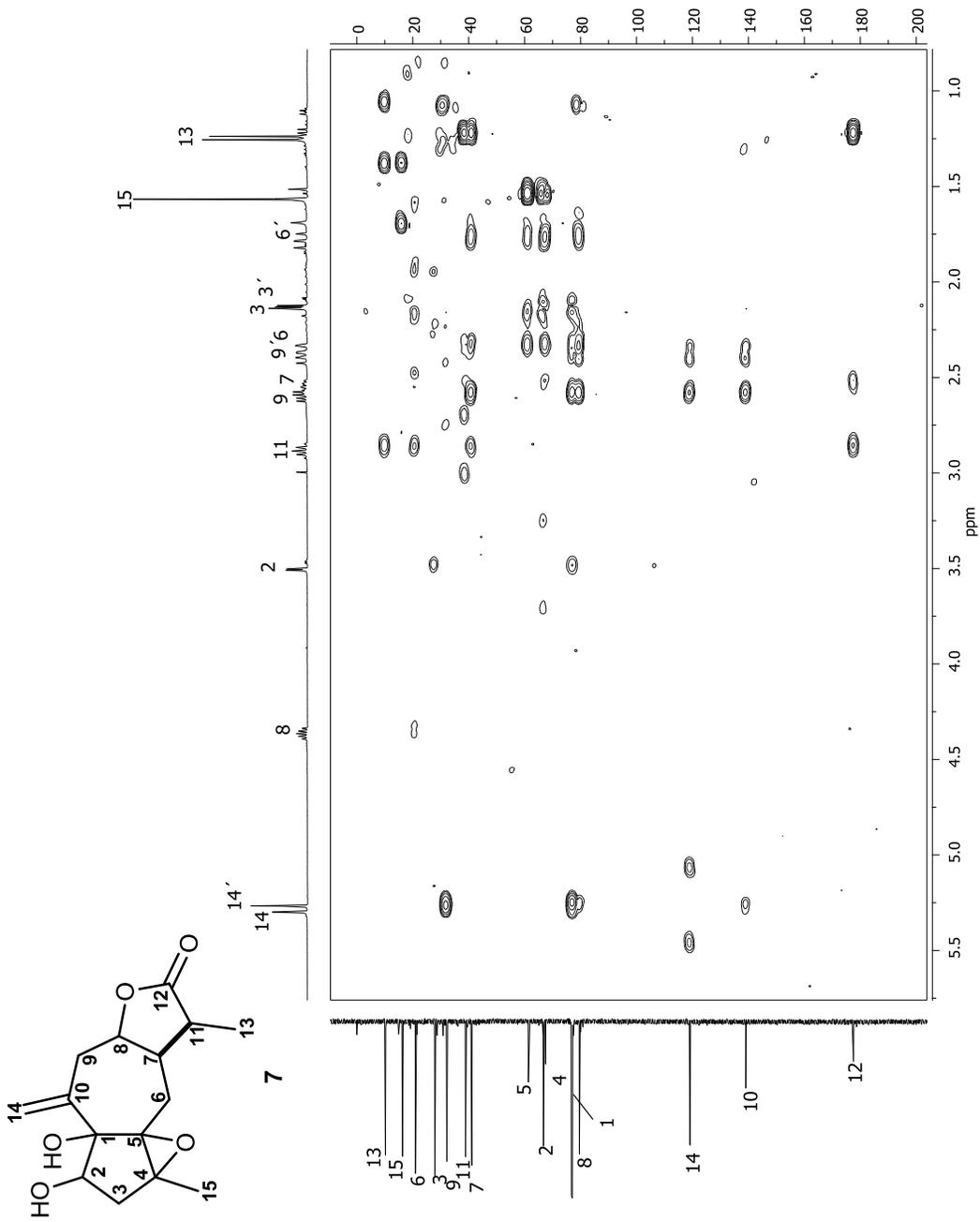


Figura 5.26. Espectro HMBC (400 MHz) de la guayanolida A (7) en CDCl_3 .

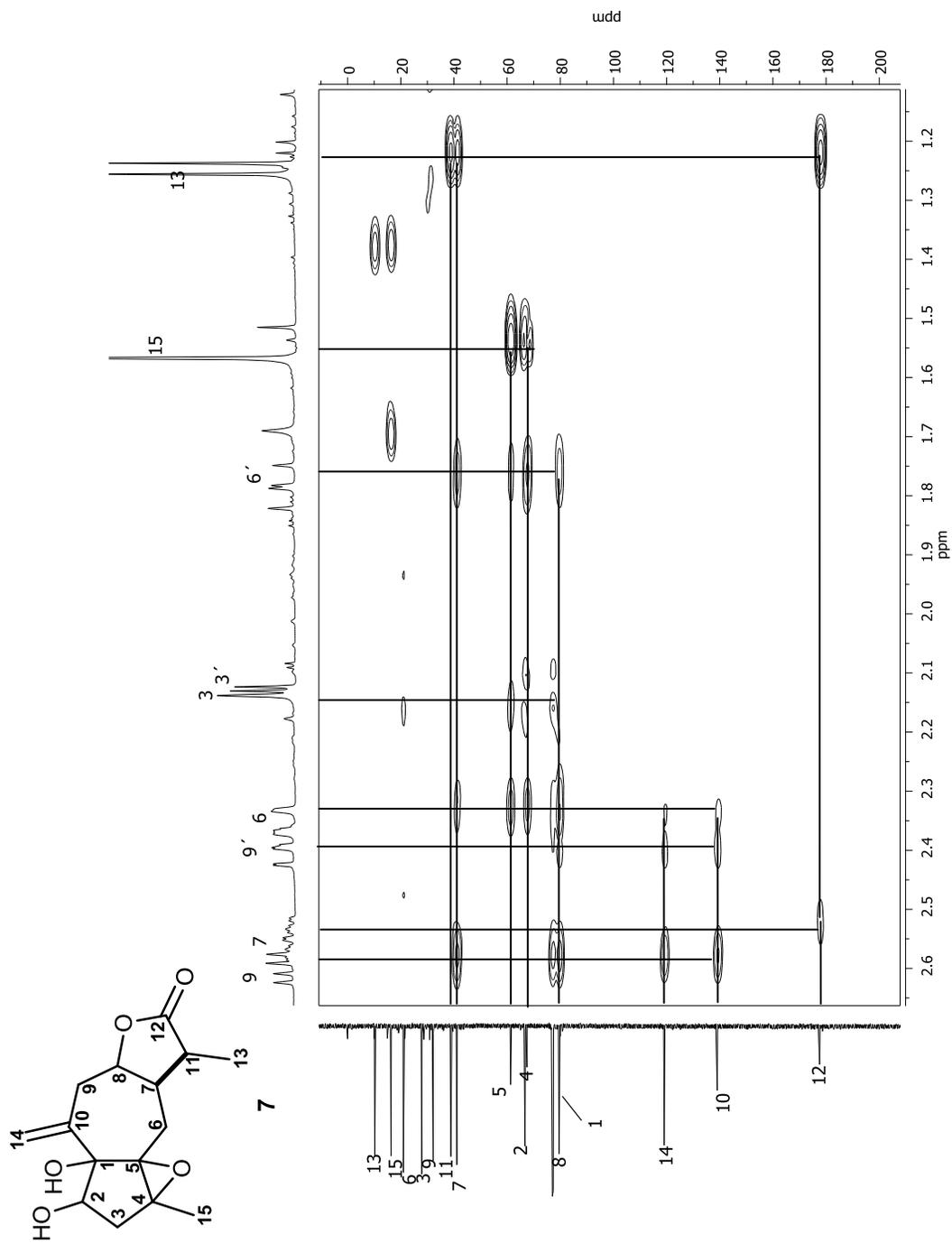


Figura 5.28. Ampliación del espectro HMBC (400 MHz) de la guayanólida A (7) en CDCl_3 .

Tabla 5.8. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C de la guayanólida A (7).

Posición	^1H m (J en Hz)	^{13}C
1		77.2
2	3.50 d (2.6)	66.7
3	2.16 d (15.6)	27.9
3'	2.11 dd (15.8, 2.8)	
4		67.5
5		61.3
6	2.35 dd (15.5, 1.4)	21.0
6'	1.78 dd (15.5, 13.6)	
7	2.55 dddd (13.7, 8.0, 5.2, 1.8)	41.1
8	4.36 ddd (10.9, 5.7, 5.5)	79.5
9	2.60 dd (13.0, 6.0)	32.2
9'	2.39 ddd (13.0, 11.0, 1.0)	
10		119.1
11	2.88 q (7.4)	38.8
12		177.6
13	1.25 d (7.4)	10.2
14	5.30 sa	139.5
14'	5.27 sa	
15	1.57 s	16.3

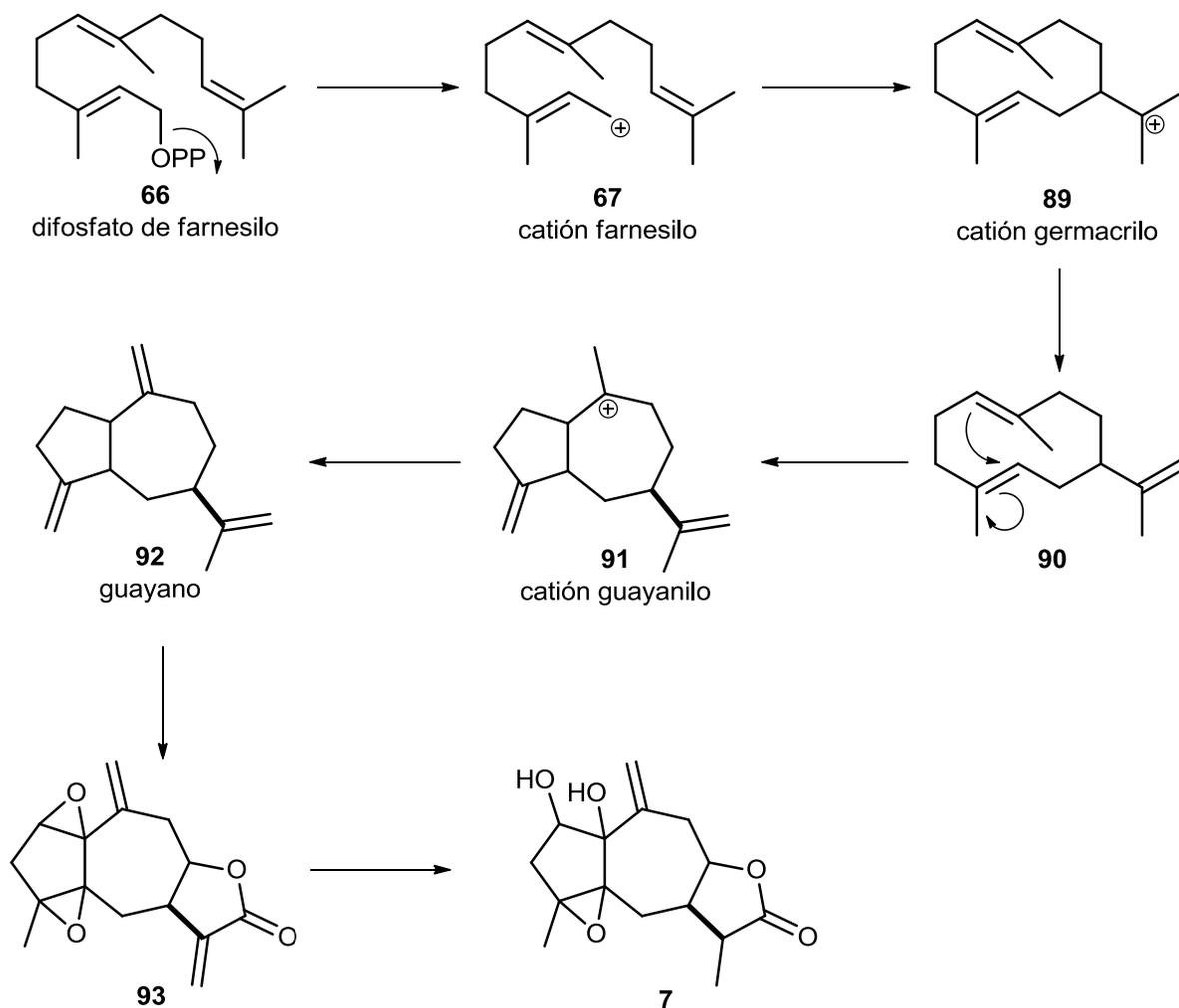
d= doble, q= quíntuple, s= simple, sa= simple ancha.

Tabla 5.9. Correlaciones mas importantes observadas en el experimento HMBC de la guayanólida A (7).

Posición	Correlaciones con carbonos
2	1, 3
3	1, 2, 4
6	4, 5, 7, 8,
9	1, 7, 8, 10, 14
11	6, 7, 12, 13
Me-13	7, 11, 12
14	1, 9, 10
Me-15	4, 5

5.2.2.1. Biosíntesis de la guayanólida A (7)

La biosíntesis que se propone para la guayanólida A (Esq. 5.7), parte del difosfato de farnesilo (**66**) el cual pierde difosfato con lo que se obtiene el catión farnesilo (**67**), este se cicla para dar el catión germacrilo (**89**) que mediante pérdida de un protón genera el germacreno (**90**). La ciclación promovida por un protón de **90** conduce al catión guayanilo (**91**) que produce al guayano (**92**) por pérdida de un protón. Oxidaciones sucesivas pueden conducir al diepóxido **93** que en presencia de H₂O y un agente reductor puede generar la guayanólida A (**7**).



Esquema 5.7. Biosíntesis de la guayanólida A (**7**).

De la fracción I eluída con $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ (4:1) se obtuvo una mezcla que se separó mediante recromatografías sucesivas empleando gel de sílice y CHCl_3 , $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ (9:1 y 4:1) y MeOH como eluyentes. Este procedimiento condujo a la obtención de dos compuestos en forma de sólido amarillo que en cromatografía en placa fina revelaron con FeCl_3 dando una coloración verde oscuro, por lo que se sospechó que las estructuras correspondían a flavonoides.

En el caso del primer compuesto, su espectro de ^1H en CDCl_3 (Fig. 5.29, Tabla 5.10) mostró una señal simple ancha en 12.40 ppm que integró para un protón. Este desplazamiento es característico para protón de hidroxilo unido a un carbono aromático y que puede estar formando un puente de hidrógeno. En 7.73 ppm se observó una señal doble de dobles característica para un protón aromático con constantes de acoplamiento *orto* y *meta*, el cual se asignó a H-6'. En 7.68 y 6.99 ppm se observaron señales dobles que integraron para un protón cada una y que debido a sus constantes de acoplamiento *orto* y *meta* respectivamente se asignaron a H-2' y H-5'. En 6.56 ppm se apreció una señal simple, la cual integró para un protón que se asignó a H-8. Entre 3.80 y 4.10 ppm se observaron cuatro señales que integraron para 12 protones y que fueron típicas para metoxilos.

En el espectro de ^{13}C en CDCl_3 (Fig. 5.30, Tabla 5.10) se observaron 19 señales. Entre las significativas la de 178.7 ppm de carbono de un carbonilo para C-4, entre 135.0 y 160.0 ppm se observaron las señales para los carbonos aromáticos 2, 7, 4, 9, 3', 5, 3 y 6 base de oxígeno. En 90.0 a 125.0 ppm se apreciaron las señales de los carbonos aromáticos restantes en posición 1', 6', 2', 5', 10 y 8. Los metoxilos tuvieron un desplazamiento de 55.0 a 60.0 ppm.

Con el experimento HMBC (Fig. 5.31-5.32) se asignó la posición de los metilos de metoxilos así como se corroboró la asignación de los protones aromáticos. Las correlaciones más importantes observadas se muestran en la Tabla 5.11. También se obtuvieron los espectros de ^1H y ^{13}C en DMSO-d_6 (Fig. 5.33 y 5.34).

La estructura se asignó como 5,6-dihidroxi-3,7,3',4'-tetrametoxiflavona (**8**) (Fig. 5.35).

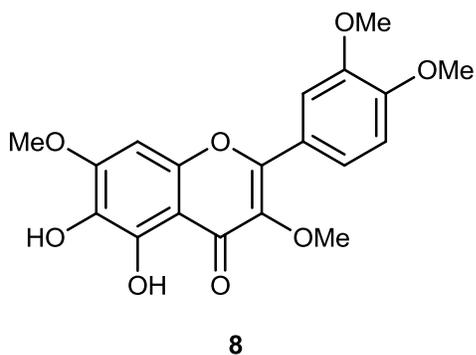


Figura 5.35. Estructura del 5,6-dihidroxi-3,7,3',4'-tetrametoxiflavona (**8**).

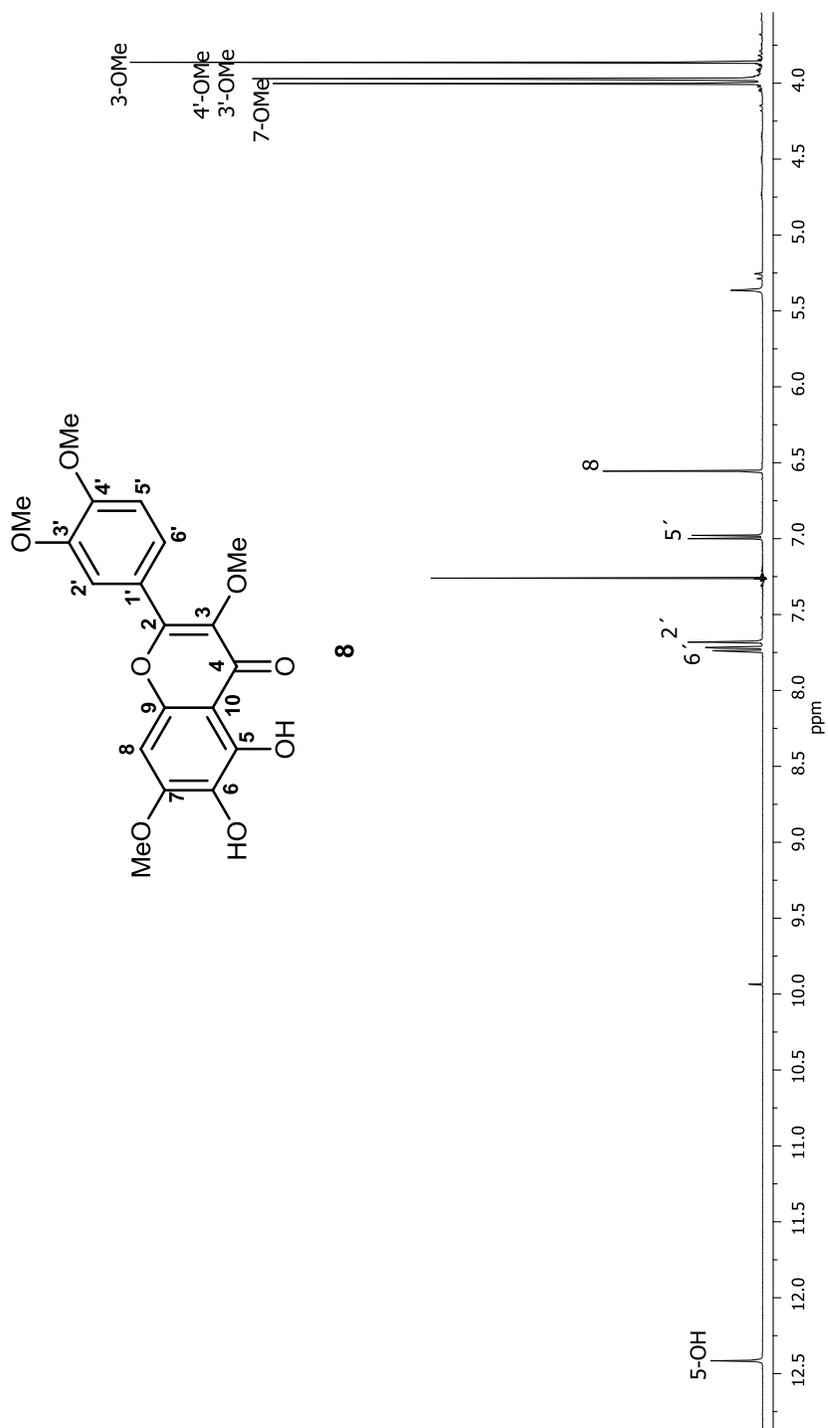


Figura 5.29. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz) de 5,6-dihidroxi-3,7,3',4'-tetrametoxiflavona (**8**) en CDCl₃.

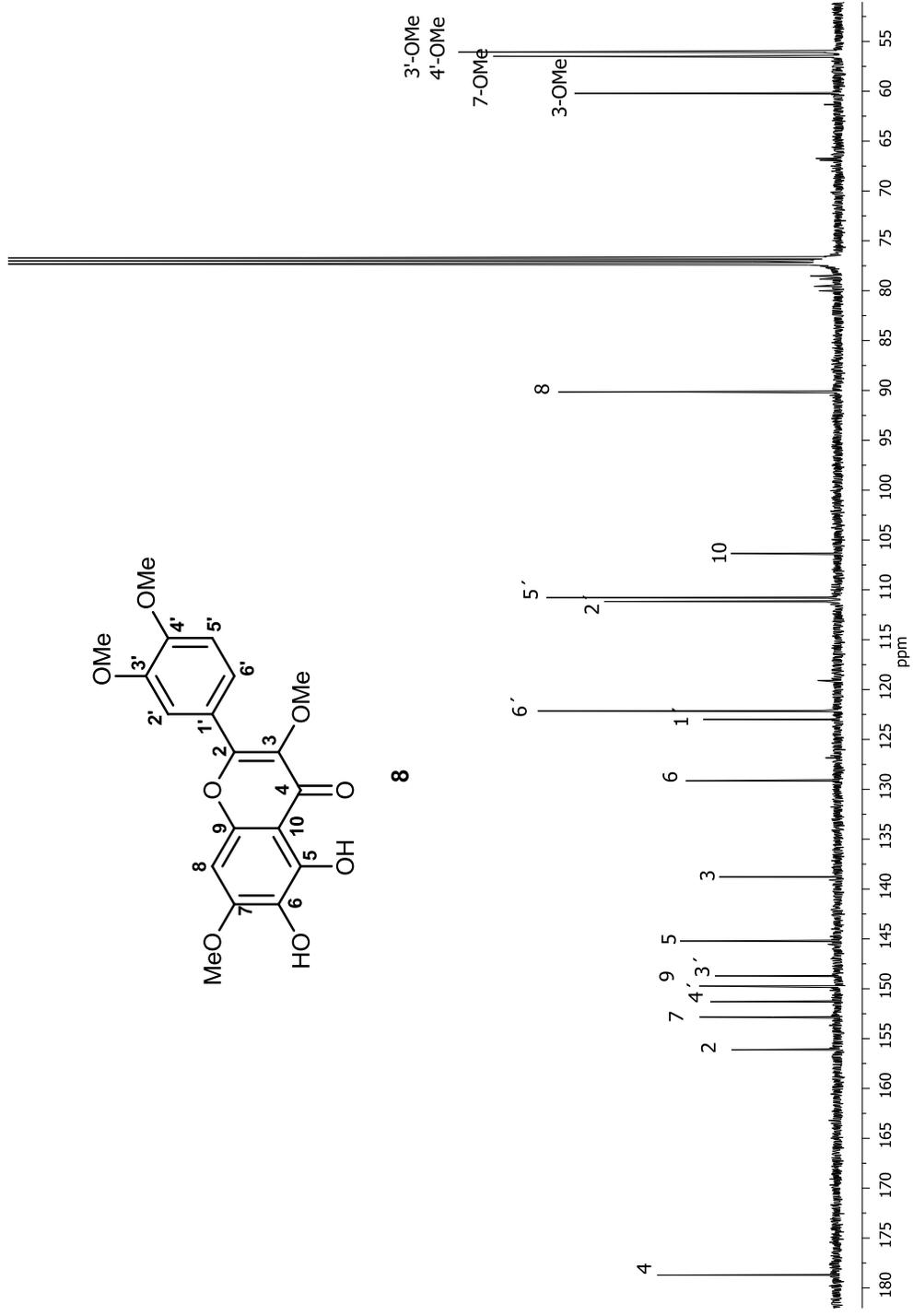


Figura 5.30. Espectro de RMN de ¹³C (400 MHz) de 5,6-dihidroxi-3,7,3',4'-tetrametoxiflavona (**8**) en CDCl₃.

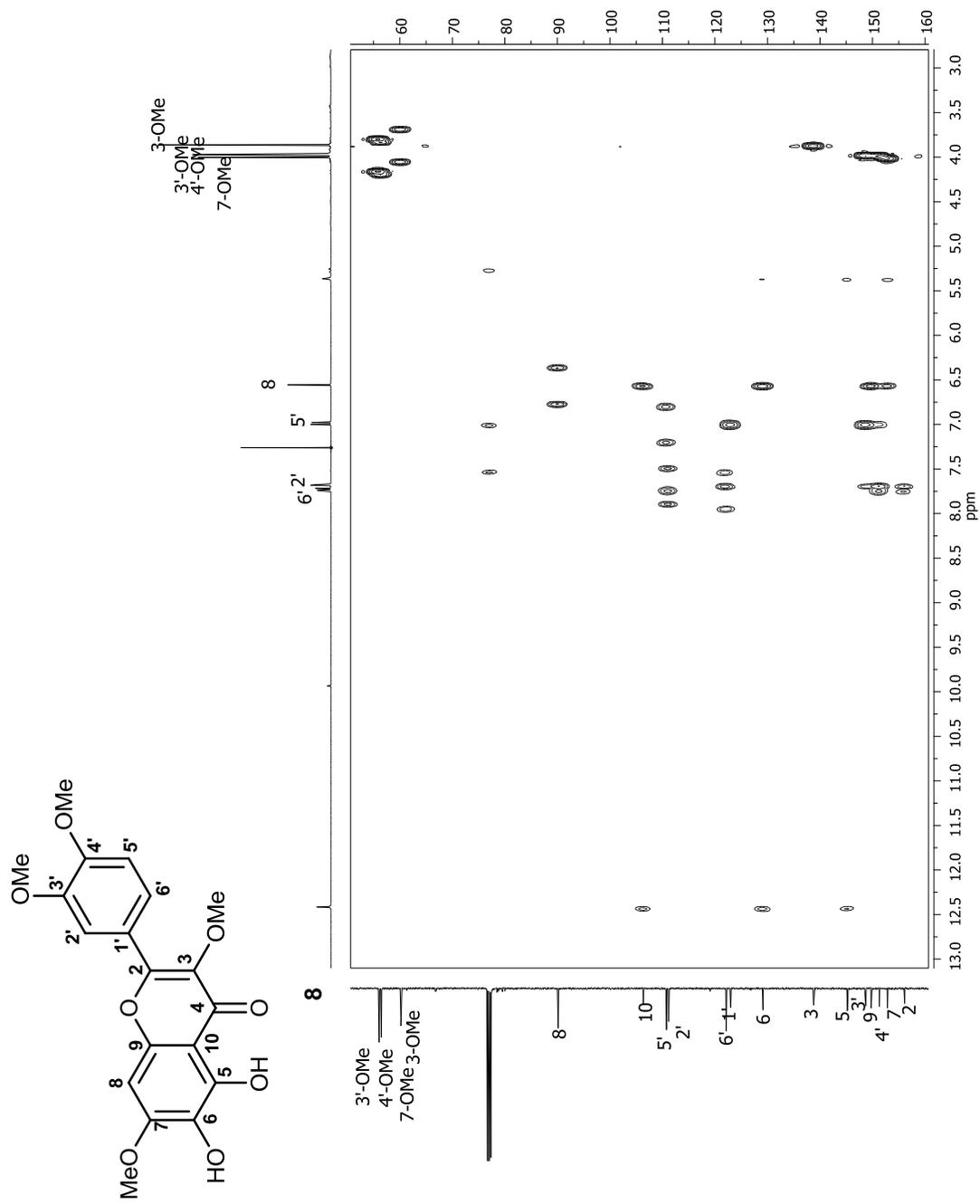


Figura 5.31. Espectro HMBC (400 MHz) de 5,6-dihidroxi-3,7,3',4'-tetrametoxiflavona (8) en CDCl₃.

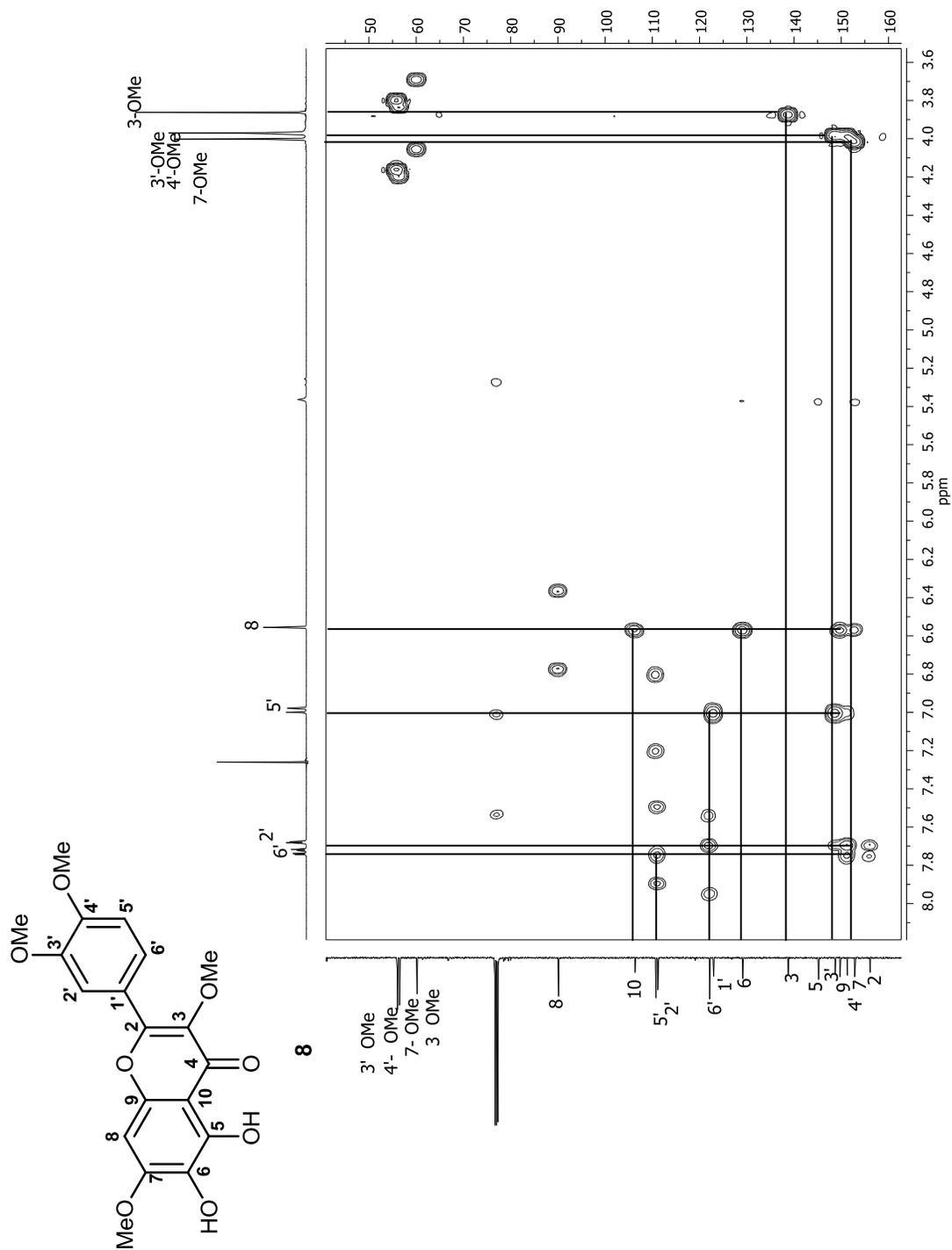


Figura 5.32. Ampliación del espectro HMBC (400 MHz) de 5,6-dihidroxi-3,7,3',4'-tetrametoxiflavona (**8**) en CDCl_3 .

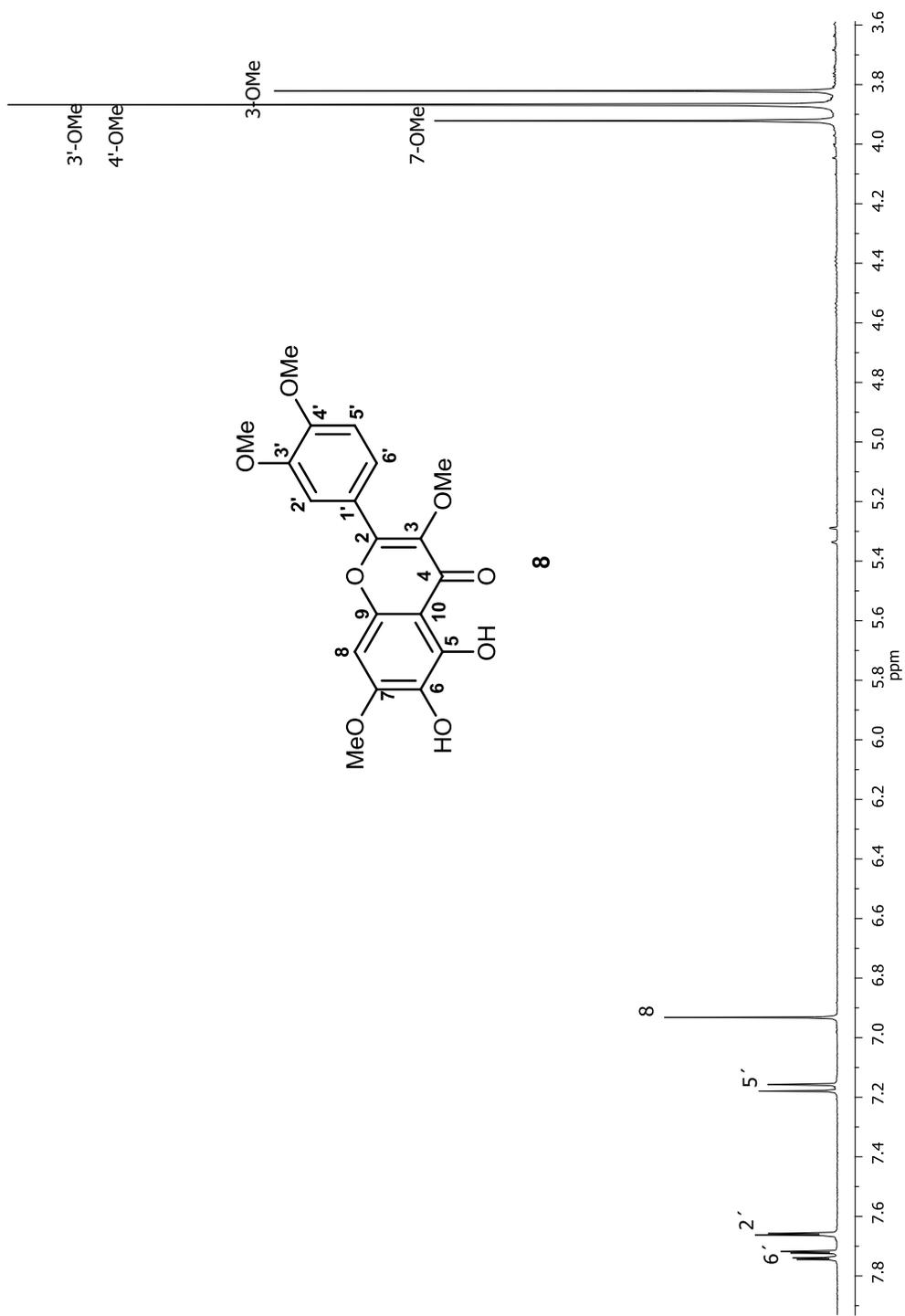


Figura 5.33. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de 5,6-dihidroxi-3,7,3',4'-tetrametoxiflavona (**8**) en DMSO-d_6 .

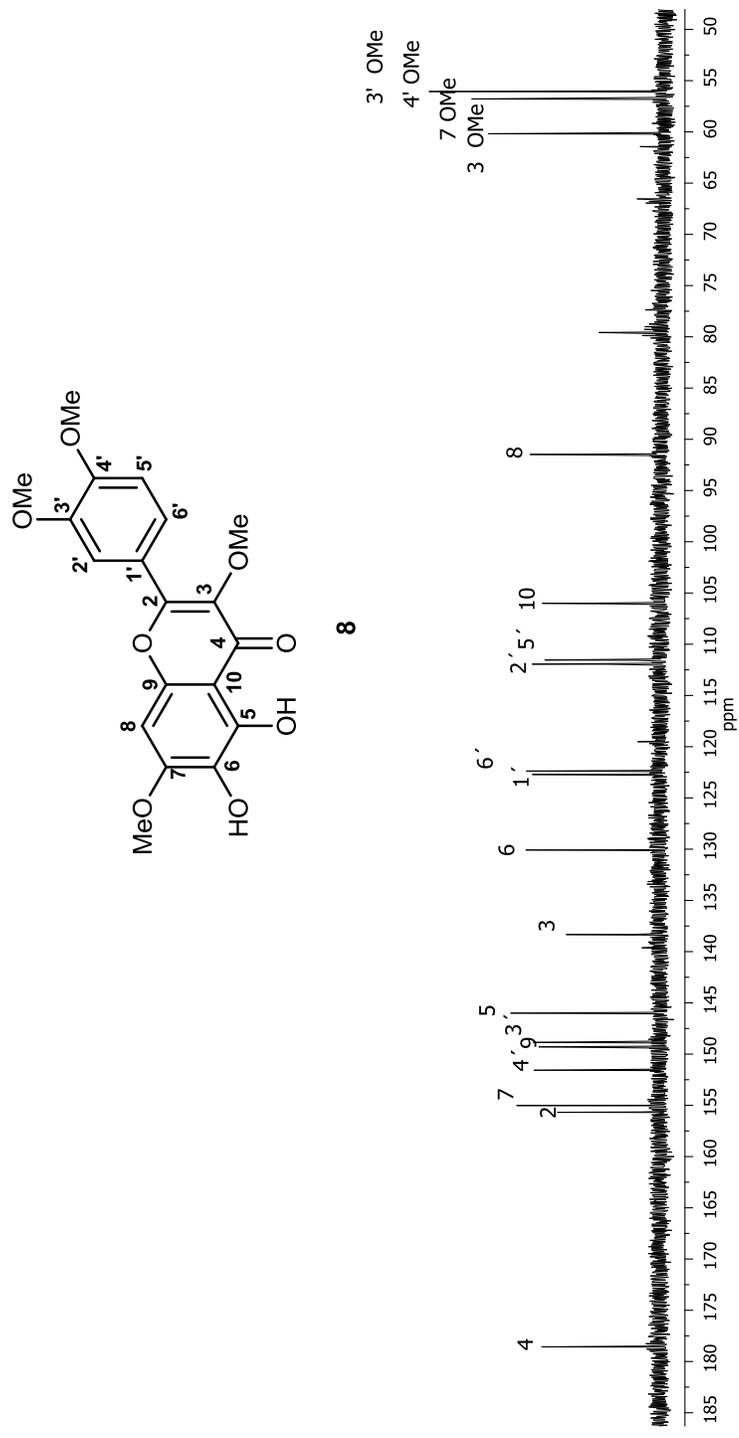


Figura 5.34. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) de 5,6,6'-dihidroxi-3,7,3',4'-tetrametoxiflavona (**8**) en DMSO- d_6 .

Tabla 5.10. Datos de RMN de ^1H y ^{13}C de la 5,6-dihidroxi-3,7,3',4'-tetrametoxiflavona (8).

Posición	^1H m (J en Hz)	^1H m (J en Hz)*	^{13}C	$^{13}\text{C}^*$
2			156.2	155.6
3			138.8	138.3
4			178.7	178.5
5			145.2	145.9
6			129.2	130.1
7			152.8	155.0
8	6.55 s	6.93 s	90.1	91.5
9			149.7	149.3
10			106.4	106.0
1'			122.9	122.4
2'	7.68 d (2.1)	7.66 d (2.0)	111.2	111.6
3'			148.7	148.8
4'			151.3	151.5
5'	6.99 d (8.5)	7.17 d (8.4)	110.8	111.9
6'	7.73 dd (8.6, 2.1)	7.73 dd (8.4, 2.0)	122.1	122.7
3-OMe	3.86 s	3.82 s	60.2	60.2
7-OMe	4.00 s	3.92 s	56.5	56.8
3'-OMe	3.97 s	3.87 s	56.1	56.1
4'-OMe	3.97 s	3.87 s	56.0	56.0

s= simple, d= doble

* Datos obtenidos en DMSO- d_6

Tabla 5.11. Correlaciones más importantes observadas en el experimento HMBC para 5,6-dihidroxi-3,7,3',4'-tetrametoxiflavona (**8**).

Posición	Correlaciones con carbonos
8	6, 7,9, 10
2'	2, 4', 6'
5'	4', 6'
6'	2, 2', 4'
3-OMe	3
7-OMe	7
3'-OMe	3'
4'OMe	4'
C5-OH	5, 6, 10

La 5,6-dihidroxi-3,7,3',4'-tetrametoxiflavona (**8**) es un flavonoide conocido en *Apuleia leicarpia* (Malan et. al. 1979). Aunque en *Stevia* se han descrito varios flavonoides tetrametoxilados, en el caso de **8** se reporta por primera vez en el género. Su biosíntesis se propone como análoga al crisosplenol C solo con la variante de una O-metilación adicional en C-4'.

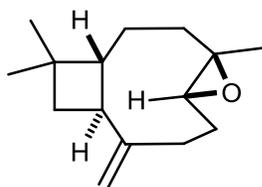
6. CONCLUSIONES.

Se llevó a cabo la colecta, identificación taxonómica y la identificación de extractos de la parte aérea y la raíz de *Stevia tomentosa* H. B. K.

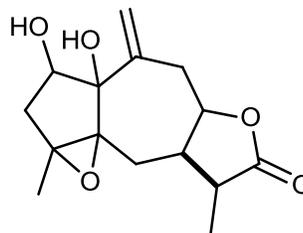
La separación cromatográfica de los extractos de las raíces y de la parte aérea condujo al aislamiento de los sesquiterpenos **4** y **7**, los triterpenos **1**, **2** y **3**, y de los flavonoides **5**, **6** y **8**. Los compuestos **1**, **5** y **8** se describen por primera vez para el género *Stevia*. En el caso de la lactona sesquiterpénica **7** se presenta como producto natural nuevo.

Los resultados de este trabajo contribuyen al conocimiento de los metabolitos secundarios presentes en las raíces y parte aérea de *Stevia tomentosa* y representan sustancias naturales promisorias para el tratamiento de enfermedades como el cáncer y la inflamación.

SESQUITERPENOS

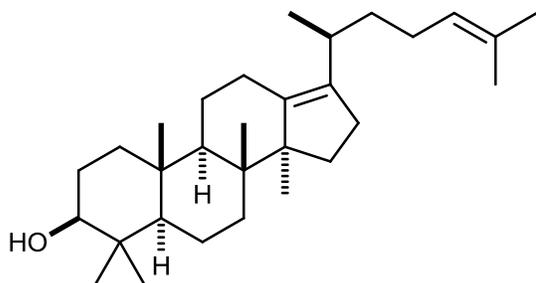


4

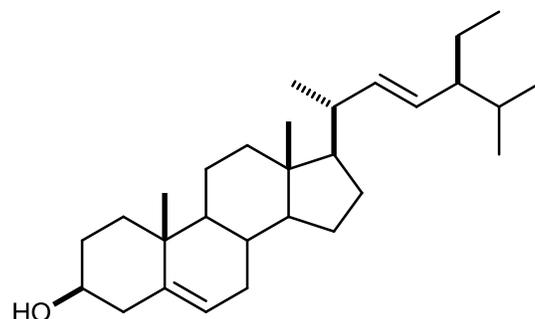


7

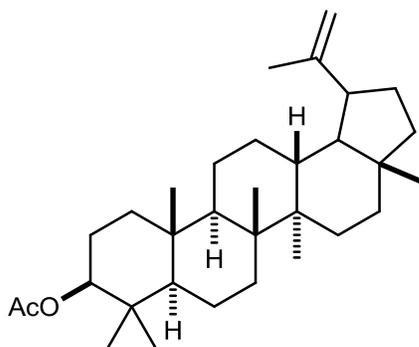
TRITERPENOS



1

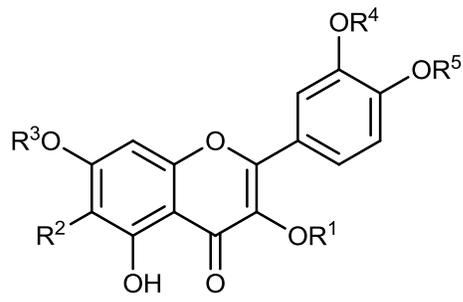


2



3

FLAVONOIDES



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
5	Me	OH	Me	Me	H
6	Glc	H	H	H	H
8	Me	OH	Me	Me	Me

7. PARTE EXPERIMENTAL

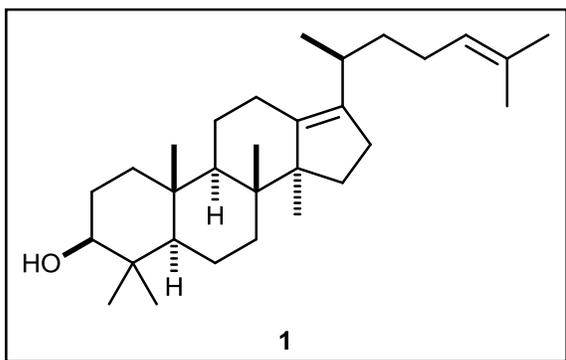
7.1. Generalidades

Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo empleando gel de sílice FLUKA 0.040-0.063 mm (230-400 mesh ASTM) y Sephadex LH-20 en columnas de vidrio de 1, 1.5, 2 y 3 cm de diámetro interno por 40 y 60 cm de largo. La separación por placa se realizó en cromatofolios de gel de sílice sobre aluminio de 2.5 x 5 cm. Los espectros de infrarrojo se obtuvieron con un espectrómetro Perkin-Helmer FT-IR System 2000 utilizando celdas de yoduro de cesio (CsI) y reflectancia difusa atenuada. Los espectros de masa se determinaron en un espectrómetro de masa Hewlett-Packard 5989-A, acoplado a un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890 series II, impacto electrónico a 60 eV. Los espectros de ^1H a 400 MHz y de ^{13}C a 100 MHz, así como los espectros COSY, HSQC y HMBC se determinaron en un equipo Varian mercury 400, usando como disolvente CDCl_3 y DMSO-d_6 teniendo como referencia interna TMS.

7.2. Desarrollo Experimental

Los especímenes de *Stevia tomentosa* se colectaron en la comunidad de Real del Monte, municipio de Mineral del Monte y en la comunidad el Guajolote, Municipio de Epazoyucan, Estado de Hidalgo, en Agosto de 2008 y Septiembre de 2009, respectivamente. Un ejemplar de esta planta se envió al Herbario del centro de Investigaciones Biológicas de Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería de la UAEH, donde el M.C. Manuel González Ledesma identificó la especie como *Stevia tomentosa* H.B.K (No. de depósito JM Torres-Valencia 129). La planta se dejó secar a la sombra y se dividió en sus partes aéreas (hojas y flores) y raíces. Se obtuvieron los extractos de hexano, CHCl₃, AcOEt y MeOH de estas partes mediante reflujo por 6 horas o maceración por 7 días.

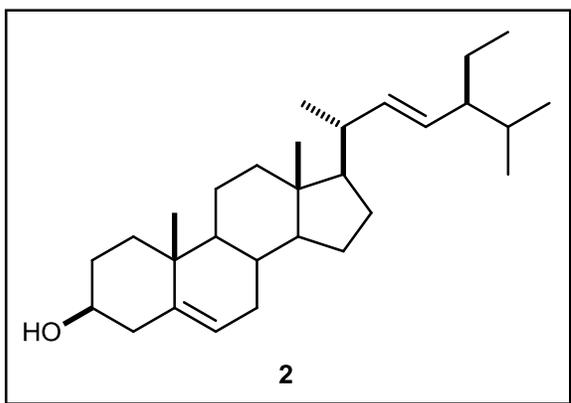
La raíz (500 g) se extrajo con hexano (2.5 L) dejándose a reflujo durante 6 horas. Transcurrido el tiempo el hexano se evaporó obteniendo 7.6 g de un aceite amarillo al cual se le agregó MeOH (200 mL) y se dejó 48 horas en el refrigerador. Pasado el tiempo se filtró y evaporó el MeOH para obtener una miel de color amarillo (1.5 g). Este residuo se separó por CC, obteniendo fracciones gruesas (200 mL) de hexano, mezclas de hexano-AcOEt (9:1, 4:1, 7:3, 3:2 y 1:1) con polaridad creciente y CHCl₃, las cuales se identificaron como A-G. Las fracciones C y D se juntaron y se le realizaron recromatografías con CHCl₃ para obtener el compuesto (20S)-dammara-13(17),24-dienol (**1**).



(20S)-dammara-13(17),24-dienol (1).

Aceíte amarillento (3 mg, 0.2%), $[\alpha]_D = +28.4$
(c 0.1, CHCl_3 . RMN de ^1H y ^{13}C (Tabla 5.1).

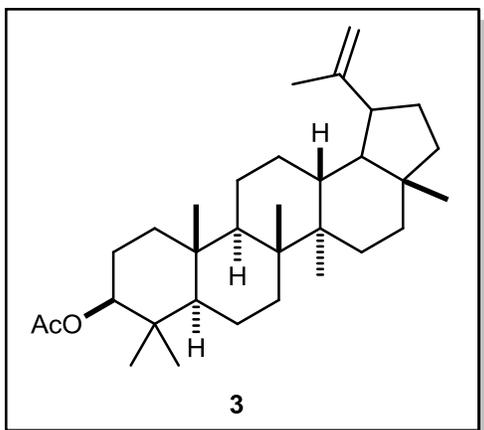
Otro lote de la raíz de *Stevia tomentosa* (600 g) se extrajo con MeOH (2 L) mediante reflujo por 6 horas. Pasado este tiempo se evaporó el MeOH obteniéndose 11.5 g de un aceite denso de color amarillo. Al producto se le realizó una prueba cualitativa para determinar la presencia de alcaloides teniendo un resultado positivo con lo que se procedió a su extracción selectiva para la obtención del extracto crudo de alcaloides. El concentrado metanólico se diluyó (800 mL) de HCl al 2% y se le agregó zinc metálico (10 g) dejándose por 1 día en agitación. Transcurrido este tiempo se filtró y se llevó a pH 10 adicionando NH_4OH . Se le realizaron lavados con CHCl_3 y se secó con sulfato de sodio anhidro para obtener el crudo de alcaloides (2 g). La separación de este producto mediante CC, condujo a fracciones que dieron positivas las pruebas cualitativas de alcaloides. Sin embargo, en el análisis por RMN de ^1H se observaron mezclas difíciles de interpretar por lo que se decidió dejar el estudio químico de este extracto. Adicional a estas mezclas, de las fracciones obtenidas con CHCl_3 se obtuvo estigmasterol (2).



Estigmasterol (2). Sólido blanco (3 mg, 0.03 %), p. f.= 163-164°C, RMN de ^1H (Tabla 5.2).

De la parte aérea (500 g) se obtuvieron los extractos de hexano y MeOH por medio de reflujo (6 h). El extracto MeOH se filtró y evaporó dando como resultado un residuo verde oscuro (7.2 g), al cual se le realizó una solubilización con CHCl_3 , además de posteriores lavados con AcOEt (3 x 200 mL) lo que condujo a la obtención de las partes de CHCl_3 , AcOEt y MeOH.

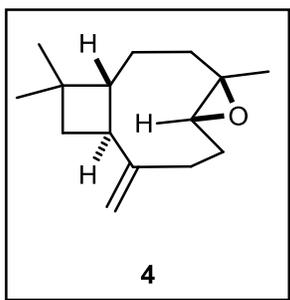
La parte de CHCl_3 (200 mg) se separó mediante cromatografía en columna en gel de sílice. Se colectaron 70 fracciones (5 mL) utilizando como eluyente hexano, mezclas de hexano- CHCl_3 con polaridad creciente y CHCl_3 . Las fracciones 40-50 se juntaron y se recromatografiaron utilizando CHCl_3 como eluyente, de donde se identificó el acetato de lupeol (3).



Acetato de lupeol (3). Sólido blanco (1.5 mg, 0.75 %), $[\alpha]_D = +17.5$ (c 0.1, CHCl_3). RMN de ^1H (Tabla 5.3).

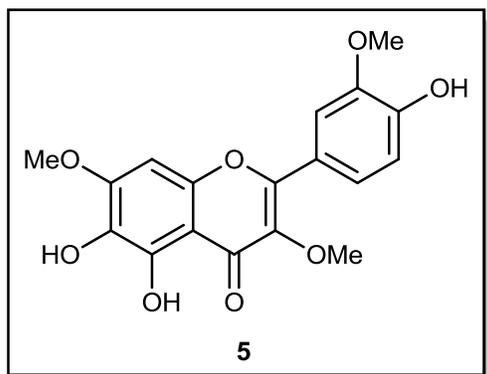
Los lavados con AcOEt que se le realizaron al extracto metanólico se juntaron y se evaporaron obteniéndose un líquido verde oscuro (6 g), al cual se le realizó una CC, de donde se colectaron fracciones gruesas (200 mL) utilizando como eluyente hexano, mezclas de hexano-AcOEt, CHCl_3 , $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ y MeOH. Las fracciones se etiquetaron como A-K.

Las fracciones D y E que se obtuvieron con hexano- AcOEt (7:3 y 3:2) se juntaron y se recromatografías en columna, utilizando CHCl_3 , para obtener el óxido de β -cariofileno (4).



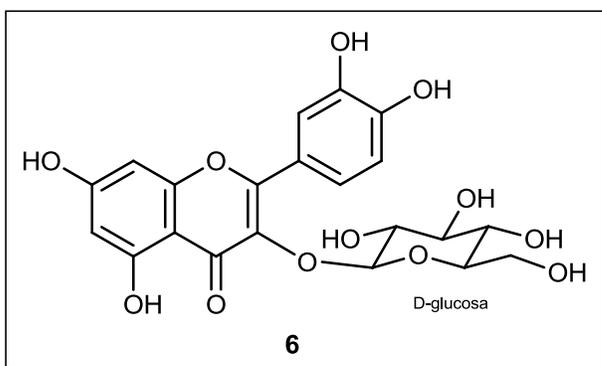
Óxido de β -cariofileno (4). Sólido blanco (4 mg, 0.08%), p.f.= 60-61°C, $[\alpha]_D = -12.4^\circ$ (c=0.4, CHCl_3), RMN de ^1H y ^{13}C (Tabla 5.4).

De las fracciones gruesas G-I obtenidas con CHCl_3 , CHCl_3 -MeOH (9:1 y 4:1), se recromatografiaron con CHCl_3 y mezclas de CHCl_3 -MeOH en orden creciente de polaridad, obteniendo el flavonoide crisosplenol C (5).



Crisosplenol C (5). Sólido amarillo (80 mg, 1.33%), IR ν_{max} cm^{-1} : 3369.9, 2920.0, 2849.7, 1763.0, 1705.7, 1662.7, 1595.2, 1515.0, 1488.2, 1354.7, 1219.8, 771.9. RMN de ^1H y ^{13}C (Tabla 5.5).

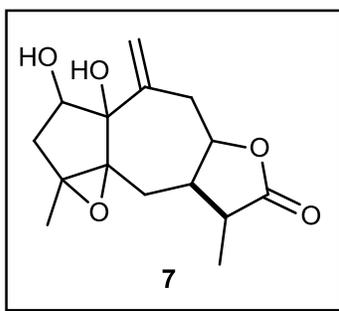
La parte restante de extracto MeOH (1 g) se disolvió en MeOH y se cromatografió en columna utilizando sephadex LH-20 y fracciones gruesas (250 mL) y como fase móvil H_2O , mezclas de H_2O -MeOH en orden decreciente de polaridad y MeOH. A la fracción obtenida con MeOH-Agua (1:1) se le realizaron posteriores cromatografías en columna en gel de sílice y CHCl_3 , mezclas de CHCl_3 -MeOH y MeOH. De las fracciones obtenidas con CHCl_3 -MeOH (4:1) se aisló la isoquercitrina (6).



Isoquercitrina (6). Sólido amarillo (0.5 mg, 0.5%). RMN de ^1H (Tabla 5.7).

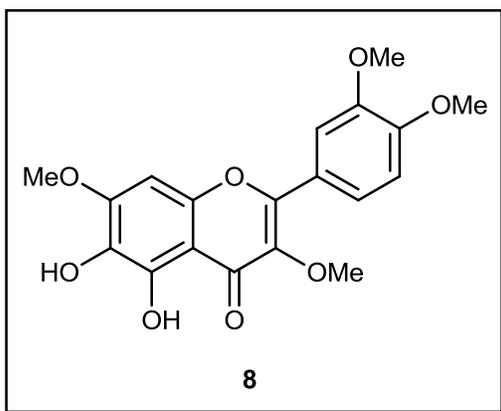
Otro lote de parte aérea de *S. tomentosa* (500 g) se sometió a maceración con CHCl_3 (4 L) por 7 días, seguido por filtración y concentrado en el rotavapor para obtener el extracto correspondiente (30 g), el cual se trató siguiendo un procedimiento conocido. El extracto se redisolvió en EtOH (250 mL), se calentó a 60 °C, se adicionó H_2O (150 mL) y se llevó a temperatura ambiente. Posteriormente, se hicieron lavados con hexano (3 x 400 mL) y CHCl_3 (3 x 400 mL), las fases orgánicas se concentraron y se juntaron para obtener 9.5 g de un sólido verde oscuro. Este producto se sometió a separación cromatográfica usando la técnica de CC en gel de sílice, para obtener fracciones gruesas (250 mL) usando hexano-AcOEt y CHCl_3 -MeOH como eluyente en orden creciente de polaridad. Las fracciones se etiquetaron como A-M.

Las fracciones G y H eluidas con CHCl_3 y CHCl_3 -MeOH (9:1) se juntaron y se recromatografiaron utilizando CHCl_3 y mezclas de CHCl_3 -MeOH (19:1), dando lugar a la guayanólida A (**7**).



Guayanólida A (7). Agujas transparentes (30 mg, 0.31 %), p.f.= 192.5-193.5°C, $[\alpha]_D = -56.5$ (c 0.2, CHCl_3), $[\alpha]_D = -49.7$ (c= 0.35, MeOH). IR $\nu_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$: 3531.6, 2973.3, 1770.8, 1456.6, 1156.4, 977.3, 838.4. RMN de ^1H y ^{13}C (Tabla 5.8).

De la fracción I eluída con CHCl_3 -MeOH (4:1) se obtuvo una mezcla que se separó mediante sucesivas recromatografías empleando gel de sílice y CHCl_3 , CHCl_3 -MeOH (9:1 y 4:1) y MeOH como eluyentes. Este procedimiento condujo a la obtención de dos compuestos: la 2,5-dihidroxi- 3,7,3',4'-tetrametoxiflavona (**8**) y el crisosplenol C (**5**).



5,6-Dihidroxi-3,7,3',4'-tetrametoxiflavona (8). Sólido amarillo (8 mg, 0.08%), p.f.= 106-107°C
IR $\nu_{\text{max}} \text{ cm}^{-1}$: 3356.8, 2921.2, 2849.3, 1769.8, 1488.8, 1361.0, 1263.3, 752.9. RMN de ^1H y ^{13}C (Tabla 5.10).

8. REFERENCIAS

- Abad MJ, Bermejo P, Villar A, **1993**. Anti-inflammatory activity of two flavonoids from *Tanacetum microphyllum*. *Journal of Natural Products* 56 (7), 1164-1167.
- Acebey L, Jullian V, Sereno D, Chevalley S, Estevez Y, Moulis C, Beck S, Valentín A, Giménez A, Sauvain M, **2010**. Antileishmanial lindenane sesquiterpenes from *Hedyosmium angustifolium*. *Planta Medica* 76(4), 365-368.
- Álvarez-García R. Estudio estereoquímico y conformacional de algunos metabolitos secundarios aislados de *Stevia pilosa* y *Stevia tomentosa*. Tesis Doctoral. Centro de Investigaciones Químicas, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca, Hidalgo, **2005**.
- Androutsopoulos VP, Lin L, Arroo RRJ, **2009**. The methoxylated flavones eupatorin and cirsiol induce CYP1 enzyme expression in MCF7 cells. *Journal of Natural Products* 72, 1390-1394.
- Anulakanapakorn K, Bunyaphatsara N, Satayavivad J, **1987**. Phytochemical and pharmacological studies of the flowers of *Millingtonia hortensis* Linn F. *Journal of Science Society Thailand* 13, 71-83.

- Arisawa M, Hayashi T, Shimuzu M, Morita M, **1991**. Isolated and cytotoxicity of two new flavonoids from *Chrysosplenium grayanum* and related flavonol. *Journal of Natural Products* 54(3) ,898-901.
- Barrios RMA, Medina CJM. Estudio Florístico de la Sierra de Pachuca, Estado de Hidalgo. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-IPN: México, **1996**.
- Calera MR, Soto F, Sánchez P, Bye R, Hernández BB, Anaya AL, Lotina HB, Mata R, **1995**. Biochemically active sesquiterpene lactones from *Ratibida mexicana*. *Phytochemistry* 40, 419-425.
- Cerda-García-Rojas CM, Pereda Miranda R. The phytochemistry of *Stevia*: a general survey, the genus *Stevia*, Chapter 5. Edited by Douglas Kinghorn, University of Illinois at Chicago, Taylor & Francis Inc. New York, USA, **2002**, pp. 86-118.
- Chavan MJ, Wakte PS, Shinde DB, **2010**. Analgesic and antiinflammatory activity of caryophyllene oxide from *Annona squamosa* N. Bar. *Phytomedicine* 17, 149-151.
- Changhong L, Mishra AK, Bing H, Renxiang T, **2001**. Antimicrobial activities of isoalantolactone, a major sesquiterpene lactone of *Inula racemosa*. *Chinese Science Bulletin* 46 (6), 498-501.
- Chen HC, Chou CK, Lee SD, Wang JC, Yeh SF, **1995**. Active compound from *Saussurea lappa* Clarks that suppress hepatitis B virus surface antigen gene expression in human hepatoma cells. *Antiviral Research* 27, 99-109.

- Choi JY, Choi EH, Jung HW, Oh JS, Lee WH, Lee JG, Son JK, Kim Y, Lee SH, **2008**. Melanogenesis inhibitory compounds from *Saussureae Radix*. *Archives of Pharmacal Research* 31 (3), 294-299.
- Choudhary MI, Siddiqui ZA, Nawaz SA, Rahman A, **2006**. Microbial transformation and butyrylcholinesterase inhibitory activity of caryophyllene oxide and its derivatives. *Journal of Natural Products* 69, 1429-1434.
- Dewick PM. Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach, John Wiley & Sons, New York, USA, **2009**, pp. 135-136; 176.
- Dholwani KK, Saluja AK, Gupta AR, Shah DR, **2008**. A review on plant derived natural products and their analogs with antitumor activity. *Indian Journal of Pharmacology* 40, 49-58.
- Díaz JL. Índice y Sinonimias de las Plantas Medicinales de México, Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales, A. C., Editorial Libros de México, México, D. F. **1976**.
- Ferreira JFS, Luthria DL, Sasaki T, Heyerick A., **2010**. Flavonoids from *Artemisia annua* L. as antioxidants and their potential synergism with artemisinin against malaria and cancer. *Molecules* 15, 3135-3170.
- Fraga BM, **1999**. Natural sesquiterpenoids. *Natural Products Report* 16, 21-38.
- Gabay O, Sanchez C, Salvat C, Chevy F, Breton M, Nourissat G, Wolf C, Jacques C, Berenbaum F, **2010**. Stigmasterol: Aphytosterol with potential antiosteoarthric properties. *Osteoarthritis and Cartilage* 18 (1), 106-116.

- Giordano OS, Guerreiro E, Pestchanker MJ, Guzmán J, Pastor D, Guardia T, **1990**.
The gastric cytoprotective effect of several sesquiterpene lactones. *Journal of Natural Products* 53 (4), 803-809.
- Haidara K, Samir L, Shi QW, Batist G, **2006**. The flavonoid casticin has multiple mechanism of tumor cytotoxicity action. *Cancer letters* 242, 180-190.
- Harborne JB, Mabry TJ, Mabry H. The Flavonoids. Chapman and Hall Ltd. **1975**, pp. 1011-1015.
- Harborne JB, Williams CA, **2000**. Advances in flavonoids research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481-504.
- Harborne JB, Williams CA, **2001**. Anthocyanins and other flavonids. *Natural Product Report* 18, 310-333.
- Hernández LR, Catalán CAN, Cerda-García RCM, Joseph Nathan P, **1994**.
Sesquiterpene lactones from *Stevia breviaristata*. *Phytochemistry* 37(5), 1331-1335.
- Hernández LR, Catalán CAN, Joseph-Nathan P. The Chemistry of The Genus *Stevia* (Asteraceae). *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas Físicas y Naturales* **1998**, 22, 229-279.
- Hernández ZNJ, Hernández LR, Catalán CAN, Gedris TE, Herz W, **1997**.
Guayanolides and germacradienolides from *Stevia sanguínea*. *Phytochemistry* 46(4), 721-727.

- Houng DT, Kamperdick C, Sung T, **2004**. Homogenetic acid derivates from *Miliusa balansae*. *Journal of Natural Products* 67, 445-447.
- Hsu YL, Kuo PL, Lin CC, **2004**. Acacetin inhibits the proliferation of Hep G2 by blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. *Biochemical pharmacology* 67, 823-829.
- Itoh D, Kawano K, Nabeta K, **2003**. Biosynthesis of Chloroplastidic and extrachloroplastidic terpenoids in liverwort cultured cells: ¹³C Serine as a probe of terpene biosynthesis via mevalonate and non-mevalonate pathways. *Journal of Natural Products* 66, 332-336.
- Kanokmedhakul S, Kanokmedhakul K, Lekphrom R, **2007**. Bioactive constituents of the roots of *Polyalthia serasoides* *Journal of Natural Products* 70, 1536-1538.
- Kim YS, Bahn KN, Hah CK, Gang HI, Ha YL, **2008**. Inhibition of 7, 12-dimetilbenz [a] anthracene induced mouse skin carcinogenesis by *Artemisia capillaries*. *Journal of Food Science* 73, 16-20.
- Kobayakawa J, Sato-Nishimori F, Moriyasu M, Matzukawa Y, **2004**. G2M arrest and antimitotic activity mediated by casticin, a flavonoid isolated from *Viticis Fructus* (*Vitex rotundifolia* Linne fil.). *Cancer letters* 208, 59-64.
- Jamal AK, Yaacob W.A. Din LB, **2008**. A chemical study on *Phyllanthus reticulantus*. *Journal of Physical Science* 19(2), 45-50.

- Lastra AL, Ramírez TO, Salazar L, Martínez M, Trujillo FJ, **2004**. The ambrosanolide cumenin inhibits macrophage nitric oxide synthesis: some structural considerations. *Journal of Ethnopharmacology* 95(2,3), 221-227.
- Lee KA, Moon SH, Kim KT, Mendonca AF, Paik HD, **2010**. Antimicrobial effects of various flavonoids on *Escherichia coli* O157:H7 cell growth and lipopolysaccharide production. *Food Science Biotechnology* 19 (1), 257- 261.
- Lin JH, Lin YT, Huang YJ, Wen KC, Chen RM, Ueng TH, Liao CH, **2001**. Isolation and cytotoxicity of flavonoids from *Daphnis Genkwae* Flos. *Journal of Food and Drug Analysis* 9(1), 6-11.
- Lin JK, Weng MS. The Science of Flavonoids, Chapter 8. Edited by Erich Grotewold, The Ohio State University at Columbus, Springer Science & Business Media, Inc. New York, USA, **2006**.
- Lin YC, Hung CM, Tsai JC, Lee JC, Chen YLS, Wei CW, Kao JY, Way TD, **2010**. Hispidulin potently inhibits human glioblastoma multiforme cells through activation of AMP-activated protein kinase (AMPK). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 9511-9517.
- Liu KCS, Yang SL, Roberts ME, **1992**. Antimalarial activity of *Artemisia annua* flavonoids from whole plants and cell cultures. *Plant Cell Reports* 11, 637-640.
- Ma G, Cho L, Chong L, Li Z, Cheung AHT, Tattersall MHN, **2009**. Anticancer activities of sesquiterpene lactones from *Cyathocline purpurea* in vitro. *Cancer Chemother Pharmacol* 64, 143-152.

- Malan E, Roux DG, **1979**. Flavonoids from *Disthemonantus benthamianus* Baillon. Methoxilated flavones and inter-relationship of benthamianin, a [2] benzopirano [4, 3b] [1] benzopyran. *Journal of the Chemistry Society, Perkin Transactions 1*, 2696-2703.
- Matta R, Rodríguez V, Pereda-Miranda R, Bye R, Linares E, **1991**. A dammarene from *Stevia salicifolia*. *Phytochemistry* 30(11), 3822-3823.
- Martínez VM, Cardenas J, Godoy L, Martínez BM, Miranda R, Salmón M, **1999**. Oxidative transformations of guaia-1(10)-en-12, 8-olides into xanthanolides. *Journal of Natural Products* 62, 920-922.
- Martini ND, Katerere DRP, Eloff JN, **2004**. Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae) *Journal of Ethnopharmacology* 93, 207-212.
- Michalik A, Hollinshead J, Jones L, Fleet GWJ, Yu CY, Hu XG, van Well R, Horne G, Wilson FX, Kato A, Jenkinson SF, Nash J, **2010**. Steviamine a new indolizidine alkaloid from *Stevia rebaudiana*. *Phytochemistry Letters* 3 (3), 136-138.
- Miglietta A, Bozzo F, Gabriel I, Bocca C, **2004**. Microtubule interfering activity of parthenolide. *Chemico Biological Interactions* 149, 165-173.
- Moongkarndi P, Bunyapraphatsara N, Srisukh V, Wagner H, **1991**. The inhibitory activity in 5-lipoxygenase pathway of hispidulin from *Millingtonia hortensis* Linn F. *Journal of Science Society Thailand* 17, 51-56.

- Nagao T, Abe F, Kinjo J, Okabe H, **2002**. Antiproliferative constituents in plants 10. Flavones from the leaves of *Lantana montevidensis* Briq. and consideration of structure-activity relationship. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 25, 875-879.
- Okada N, Shirata K, Niwano M, Koshino H, Uramoto M, **1994**. Immunosuppressive activity of a monoterpene from *Eucommia ulmoides*. *Phytochemistry* 37, 281-282.
- Park HJ, Kwon SH, Han YN, Choi JW, Miyamoto K, Lee SH, Lee KT, **2001**. Apoptosis inducing costunolide and nobel acyclic monoterpene from the Stem Bark of *Magnolia Sieboldii*. *Archives of Pharmacal Research* 24, 342-348.
- Park JB, Lee CK, Park HJ, **1997**. Antihelicobacter pylori effect of costunolide isolated from the Stem Bark of *Magnolia sieboldii*. *Archives of Pharmacal Research* 20, 275-279.
- Prachayasittikul S, Suphamong S, Worachartcheewan A, Lawung R, Ruchirawat S, Prachayasittikul V, **2009**. Bioactive metabolites from *Sphillanthes acmella* Murr. *Molecules* 14, 850-867.
- Raj Kapoor B, Anandan R, Jayacar B. *Current Science* **2002**, 82, 177-179.
- Romo de Vivar R. A. Química de la Flora Mexicana. Investigaciones en el Instituto de Química UNAM, Sociedad Química de México. México D. F. **2006**.
- Semple SJ, Nobbs SF, Pyke SM, Reynolds GD, Flower RLP, **1999**. Antiviral flavonoid from *Pterocaulon sphacelatum*, an Australian Aboriginal medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 68, 263-268.

- Singab NAB, Youssef DTA, Noaman E, Kotb S, **2005**. Hepatoprotective effect of flavonol glycosides rich fraction from Egyptian *Vicia calcarata* Desf. Against CCl₄ inducer liver damage in rats. *Archives of Pharmacal research* 28(7) 791-798.
- Sulsen VP, Cazorla SI, Frank FM, Redko FC, Anesini CA, Coussio JD, Malchiodi EL, Martino VS, Muschietti L, **2007**. Trypanocidal and leishmanicidal activities of flavonoids from Argentine medicinal plants *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 77 (4), 654-659.
- Téllez-Reyes M. Aislamiento y caracterización de lactonas sesquiterpénicas de *Zaluzania triloba*. Tesis de Licenciatura. Centro de Investigaciones Químicas, Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca, Hidalgo, **2005**.
- Tezuka Y, Stampoulis P, Banskota AH, Awale S, Tran KQ, Saiki I, Kadota S, **2000**. Constituents of the vietnamese medicinal plant *Orthosiphon stamineus*. *Cemical and Pharmaceutical Bulletin* 48, 1711-1719.
- Thebtarabnonth C, Thebtarabnonth Y, Wanauppathamkul S, Yuthabong T, **1995**. Antimalarial sesquiterpenes from tubers of *Cyperus rotundus*: structure of 10,12-peroxycalamenene, a sesquiterpene endoperoxide. *Phytochemistry* 40(1), 125-128.
- Trifunovic S, Vajs V, Juranie Z, Zizak Z, Tesevie V, Macura S, Milosavljevic S, **2006**. Cytotoxic constituent from *Achillea clavennae* from Montenegro. *Phytochemistry* 67, 887-893.

- Tu YC, Lian TW, Yen JH, Chen ZT, Wu MJ, **2007**. Antiatherogenic effects of kaempferol and rhamnocitrin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 9969- 9976.
- Villavicencio MA, Pérez EBE. Plantas Útiles del Estado de Hidalgo. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo: México. **1995**.
- Waksmundzka-Hajnos M, Sherma J. and Kowalska T. Thin Layer Chromatography in Phytochemistry; Taylor & Francis Group, USA, **2008**, pp. 406.
- Wang Y, Hamburger M, Gucho M, Hostettmann K, **1989**. Antimicrobial flavonoids from *Psidia trinervia* and their methylated and acetylated derivates. *Phytochemistry* 28, 2323-2327.
- Woerdenbag HJ, Lemstra W, Malingre TM, Konings AWT, **1989**. Enhanced cytostatic activity of the sesquiterpene lactone eupatoriopicrin by glutathione depletion. *British Journal of Cancer* 59, 68-75.
- Zhang S, Ong C, Shen H, **2004**. Involvement of proapoptotic Bcl-2 family members in parthenolide induced mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Cancer letters* 211, 175-188.