



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

Licenciatura en Química

Metabolitos secundarios aislados de las raíces
y las hojas de *Stevia jorullensis* H.B.K.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

Q U Í M I C O

P R E S E N T A :

P.Q. IMELDA PÉREZ PÉREZ

ASESOR: DR. J. JESÚS MARTÍN TORRES VALENCIA

PACHUCA DE SOTO, HIDALGO, 2006.

Agradecimientos

A mis padres por confiar en mí y por el gran apoyo que me han brindado aun en los momentos más difíciles, sobre todo a mi madre quien por ningún motivo pierde su fortaleza demostrando que siempre se puede salir adelante.

A mis hermanos porque con su esfuerzo, apoyo y confianza concluyo esta etapa de mi vida.

A mi hermana Jovana pues contribuyo de manera importante en mis estudios profesionales.

A mi sobrino Miguel Ángel ya que con solo una sonrisa me enseña que hay que apreciar la vida y ayuda a olvidar los momentos difíciles.

A mis compañeros de laboratorio quienes en ningún momento me negaron su ayuda.

A los compañeros del grupo de investigación por sus consejos y su sentido del humor que crea un ambiente de trabajo agradable y de apoyo mutuo.

A Rosa María por su apoyo durante los últimos semestres de la carrera y durante mi estancia en el laboratorio.

A Diego por brindarme su apoyo y comprensión incondicional, por sus consejos y las palabras de aliento y más aun por su valiosa compañía en estos últimos años y por todos los momentos lindos que hemos pasado juntos.

Con respeto y admiración, mi más sincero agradecimiento al Dr. J. Jesús Martín Torres Valencia por la dirección de este trabajo pero sobre todo por la confianza y la paciencia que me ha tenido durante todo este tiempo.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Usos Especiales del Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, bajo la dirección del Dr. J. Jesús Martín Torres Valencia, con recursos del proyecto CONACYT “Búsqueda de nuevos productos naturales con actividad biológica en especies de los géneros *Mimosa* y *Stevia*”. ref.: 37574-E.

Esta tesis generó la siguiente participación:

ESTUDIO QUÍMICO DE LAS RAÍCES DE *STEVIA JORULLENSIS*.

Imelda Pérez Pérez, Juan C. Macías Pulido, Rocío Álvarez-García, Carlos M. Cerda-García-Rojas, Luisa U. Román, J. Martín Torres-Valencia

Presentado en la 2ª Reunión de la Academia Mexicana de Química Orgánica, el 23 y 24 de febrero de 2006, Guanajuato, Guanajuato.

Memorias del congreso 2006, página 61, cartel No. 20.

Abreviaturas y Símbolos

AcOEt	Acetato de Etilo
Ang	Angelato
CC	Cromatografía en columna
CCF	Cromatografía en capa fina
COSY	Correlation Spectroscopy
d	Doble
da	Doble ancha
dd	Doble de dobles
dq	Doble de quintuple
Et ₂ O	Éter etílico
g	Gramos
Gal	Galactosa
Glc	Glucosa
Glic	Glicósido
H	Protón
HETCOR	Heteronuclear Correlation
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
Hz	Hertz
J	Constante de acoplamiento
m	Múltiple
MeBu	Metilbutirato
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
MHz	Mega hertz
mL	Mililitros
<i>n</i> -BuOH	<i>n</i> -butanol
°C	Grados celsius

PEG	Polietilen glicol
ppm	Partes por millón
R _f	Relación de frente
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN de ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de carbono trece
RMN de ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de protón
TMS	Tetrametilsilano
δ	Desplazamiento químico

ÍNDICE

RESUMEN	i
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Medicina Tradicional	1
1.2 Productos Naturales. Metabolitos Primarios y Metabolitos Secundarios	2
1.3. Fitoquímica	6
2. ANTECEDENTES	11
2.1 Plantas del género <i>Stevia</i>	11
2.2. <i>Stevia jorullensis</i>	19
2.3. Actividad Biológica	21
3. OBJETIVOS	22
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
4.1. Descripción de <i>Stevia jorullensis</i> H. B. K.	23
4.2. Extracto hexánico de la raíz.	24
4.3. Extracto metanólico de las hojas.	28
5. CONCLUSIONES	47
6. PARTE EXPERIMENTAL	50
6.1. General	50
6.2. Colecta e identificación de la especie	50
6.3. Obtención de los Extractos	51
6.4. Aislamiento de sustancias	52
BIBLIOGRAFÍA	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	pág.
Figura 1. <i>Stevia jorullensis</i> H.B.K.	i
Figura 2. Compuestos aislados de <i>Stevia jorullensis</i> H.B.K.	ii
Figura 3. Productos naturales base de esteroides.	2
Figura 4. Algunos alcaloides importantes.	3
Figura 5. Compuestos químicos importantes de origen vegetal	3
Figura 6. Los primeros alcaloides aislados.	7
Figura 7. Plantas colectadas en lugares diferentes.	8, 9
Figura 8. Aceites esenciales aislados de <i>Stevia</i> .	12
Figura 9. Principales Metabolitos aislados de <i>Stevia</i> .	13,14,15
Figura 10. Flavonoides glicosidados aislados de <i>Stevia microchaeta</i> .	15
Figura 11. Metabolitos aislados de las raíces de <i>Stevia eupatoria</i> (Spreng.) Will.	16
Figura 12. Metabolitos aislados de <i>Stevia tomentosa</i> H.B.K.	17
Figura 13. Compuestos aislados de <i>Stevia pilosa</i> Lag.	18
Figura 14. Metabolitos secundarios aislados de las raíces de <i>Stevia jorullensis</i> .	20
Figura 15. Algunos componentes activos de <i>Stevia</i> .	21
Figura 16. Muestra de <i>Stevia jorullensis</i> H.B.K.	23
Figura 17. Espectro de RMN de H (400 MHz) de (–)-valeranona (39), en CDCl ₃ .	25
Figura 18. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz) de la mezcla de compuestos 32 y 33 en CDCl ₃ .	27
Figura 19. Espectro de RMN de H (400 MHz) de la muestra conteniendo el glicósido de quercetina (54).	30

Figura 19a. Ampliación del espectro de RMN de H (400 MHz) de la muestra conteniendo el glicósido de quercetina (54).	31
Figura 20. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) del ácido clorogénico (55) en $\text{DMSO-}d_6$.	34
Figura 20a. Ampliación del espectro de RMN de ^1H (400 MHz) del ácido clorogénico (55) en $\text{DMSO-}d_6$.	35
Figura 21. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz) del ácido clorogénico (55) en $\text{DMSO-}d_6$	36
Figura 22. Diagrama HETCOR (100 MHz) del compuesto 55 en $\text{DMSO-}d_6$.	37
Figura 22a. Ampliación del diagrama HETCOR (100 MHz) del compuesto 55 en $\text{DMSO-}d_6$.	38
Figura 23. Diagrama COSY (400 MHz) del compuesto 55 en $\text{DMSO-}d_6$.	39
Figura 23a. Ampliación del diagrama COSY (400 MHz) del compuesto 55 en $\text{DMSO-}d_6$.	40
Figura 24. Diagrama HMBC del ácido clorogénico (55) en $\text{DMSO-}d_6$.	41
Figura 24a. Ampliación del diagrama HMBC del ácido clorogénico (55) en $\text{DMSO-}d_6$.	42
Figura 25. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) del ácido clorogénico (55) en D_2O .	43
Figura 25a. Ampliación del espectro de RMN de ^1H (400 MHz) del ácido clorogénico (55) en D_2O .	44
Figura 26. Diagrama del experimento COSY (400 MHz) del compuesto 55 en D_2O .	45

ÍNDICE DE TABLAS Y ESQUEMAS

Tabla	pág.
Tabla 1. Algunas rutas metabólicas y metabolitos generados.	6
Tabla 2. Comparación entre las especies colectadas.	10
Tabla 3. Especies estudiadas en México	11
Tabla 4. Datos de RMN de ^1H (400 MHz) para el compuesto (54), δ en ppm, disolvente CDCl_3 , referencia interna TMS.	32
Tabla 5. Datos de RMN de ^1H (400 MHz) del ácido clorogénico (55).	46
Tabla 6. Obtención de extractos de las raíces.	51
Tabla 7. Obtención de extractos de las hojas.	51
Tabla 8. Eluatos colectados en la CC del extracto hexánico de las raíces.	52
Tabla 9 Eluatos colectados en la CC del extracto de MeOH de las hojas.	53

Esquema	pág
Esquema 1. Metabolismo primario y secundario	5
Esquema 2. Metodología utilizada para el extracto de MeOH.	28

RESUMEN



Figura 1. *Stevia jorullensis* H.B.K.

El presente trabajo describe el estudio químico de *Stevia jorullensis* H. B. K. (Figura 1), el cual comprendió una revisión bibliográfica sobre los estudios de actividad biológica y químicos de las especies de este género, la colecta de la especie, su preparación para su identificación botánica, el secado a la sombra, la separación de sus partes aéreas y raíces, la molienda y se la obtención de los extractos de hexano, AcOEt y MeOH. La separación cromatográfica del extracto hexánico condujo al aislamiento y caracterización de β -sitosterol (**32**), estigmasterol (**33**), y valeranona (**39**), mientras que del extracto metanólico de las hojas se lograron aislar y caracterizar un glicósido de quercetina (**54**) y el ácido clorogénico (**55**) (Figura 2).

La caracterización de las sustancias se llevó a cabo mediante sus datos físicos y espectroscópicos, principalmente por RMN en 1D y 2D, y por comparación con datos descritos.

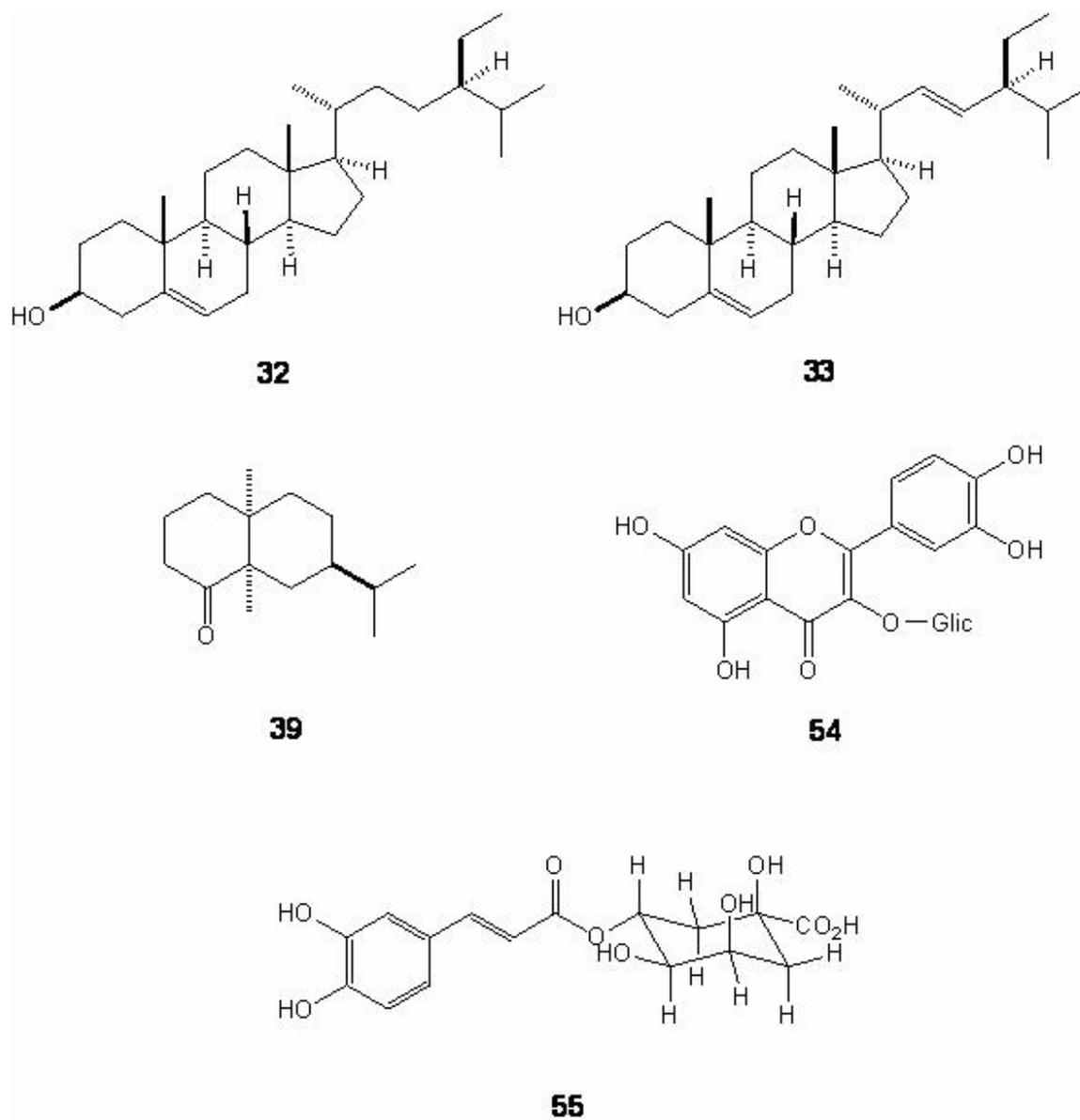


Figura 2. Compuestos aislados de *Stevia jorullensis* H.B.K.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Medicina Tradicional



La Organización Mundial de la Salud define la Medicina Tradicional como un conjunto de prácticas, enfoques, conocimientos y creencias sanitarias diversas que incorporan medicinas de origen animal, mineral y otras provenientes de plantas. También se incluyen terapias espirituales, técnicas manuales o ejercicios practicados de forma individual o grupal, utilizando varias alternativas al mismo tiempo, con la finalidad de mantener el bienestar del individuo y en algunos casos para tratar, diagnosticar y prevenir enfermedades.¹



La medicina tradicional es un elemento cultural con profundas raíces en todas las civilizaciones de la Tierra. Según la Organización Mundial de la Salud, entre 66 y 85% de la población del planeta recurre a la herbolaria para atender diversos padecimientos y enfermedades.²

En el estado de Hidalgo existen varias plantas útiles cultivadas y silvestres, destacando las especies medicinales usadas por la sociedad. Los estudios realizados evidencian un conocimiento empírico importante del valor curativo de varias de ellas.

1.2 Productos Naturales. Metabolitos Primarios y Metabolitos Secundarios

Cuando se habla de productos naturales se hace referencia a los extractos o sustancias que se obtienen de plantas, generalmente de aquellas que tienen un uso medicinal o nutricional. De manera particular, se les llama productos naturales a los metabolitos secundarios obtenidos de organismos vivos tales como bacterias, algas, hongos, animales y vegetales.

La sabiduría popular conoce las cualidades curativas de muchas plantas de su medio y, a través del tiempo ha estimulado a la ciencia para descubrir los principios activos de especies botánicas lo que ha propiciado la fabricación industrial de medicamentos.¹

En la década de los cincuenta nuestro país fue pionero en el desarrollo de productos naturales con la producción de esteroides a partir de la “cabeza de negro” y el “barbasco” (Figura 3).³



Cabeza de negro



barbasco

Figura 3. Productos naturales base de esteroides.

Varios productos naturales han sido seleccionados por los químicos debido a sus notables propiedades fisiológicas. Por ejemplo la morfina (**1**) generada por la adormidera, (*Papaver somniferum*) es un analgésico potente en los animales y en el hombre. La atropina (**2**), principio tóxico de la belladona, (*Atropa belladonna*), es

un agente antsecretorio valioso que actúa bloqueando la transmisión en la sinapsis controlada por el neurotransmisor acetilcolina. La cocaína (**3**), aislada a partir de la planta de la coca, (*Erythoxylon coca*,) fue el primer anestésico local efectivo y todavía se usa en la cirugía de la nariz y ocular.⁴

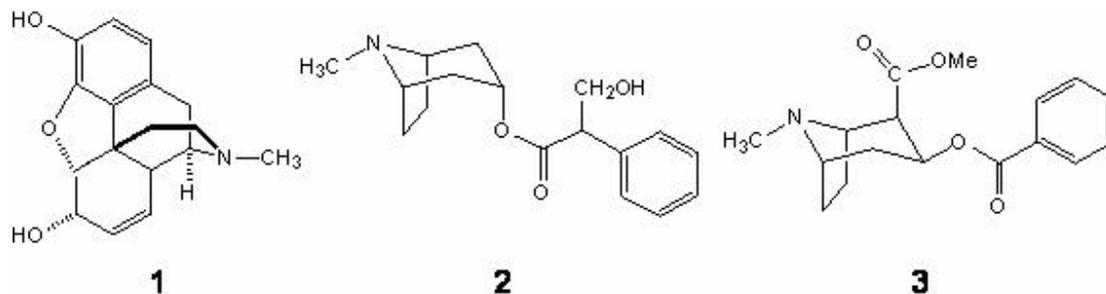


Figura 4. Algunos alcaloides importantes.

Es muy larga la lista de compuestos químicos vegetales que ofrecen respuesta valiosa a severos problemas de salud pública. Por ejemplo la quinina (**4**) que salvó cientos de miles de vidas en la primera mitad del siglo pasado y que ahora, sintetizada, mantiene libre de malaria a muchas zonas tropicales. Otro ejemplo es el taxol (**5**), alcaloide extraído de una especie de *Taxus* del noreste de Estados Unidos que ha sido exitosamente utilizado en el tratamiento de fases avanzadas de cáncer ovárico (Figura 5).³

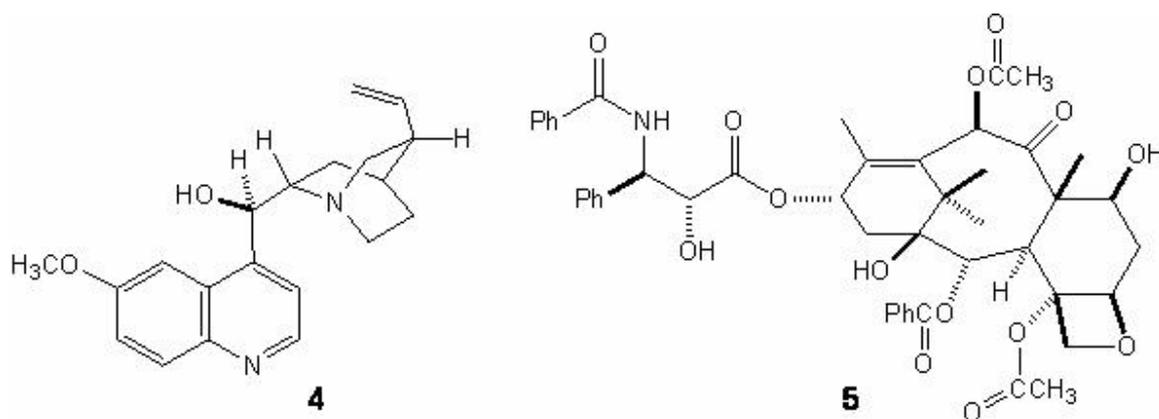


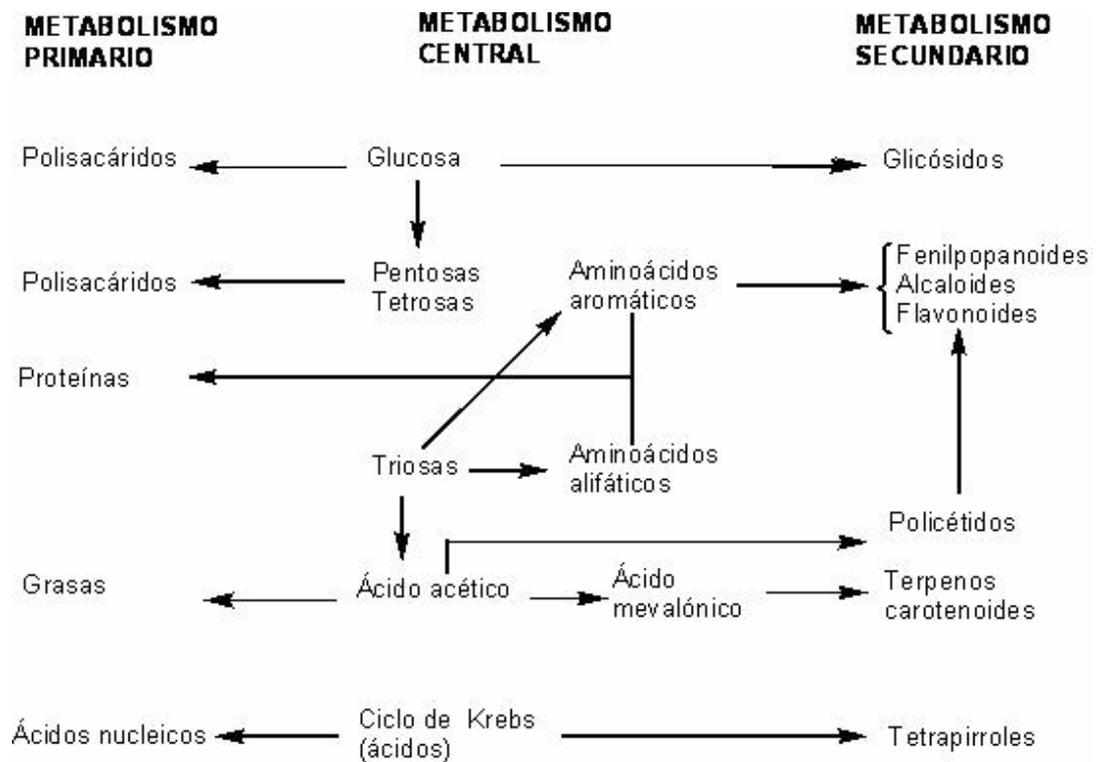
Figura 5. Compuestos químicos importantes de origen vegetal

El reino vegetal es el gran productor de las sustancias nutritivas que posibilitan la vida humana, y al mismo tiempo le brinda productos que le ayudan a prevenir y curar sus enfermedades.⁵

Existen dos tipos fundamentales de metabolismo: El metabolismo primario, que se considera esencial para la vida y es común a todos los seres vivos y el metabolismo secundario, que se considera no-esencial para la vida y se produce en bacterias, algas, hongos, animales y vegetales.

En los vegetales el metabolismo secundario es muy importante puesto que da lugar a productos (denominados metabolitos secundarios) que resultan de sumo interés desde el punto de vista farmacológico. La mayoría de los principios activos que se obtienen de las plantas medicinales proceden del metabolismo secundario.⁶

En el Esquema 1 se muestra un panorama resumido de la generación de metabolitos primarios y secundarios.



Esquema 1. Metabolismo primario y secundario.

En los organismos vivos se pueden diferenciar tres rutas biosintéticas que dan lugar a los metabolitos secundarios.⁶

- Ruta del ácido shikímico (Alcaloides y fenilpropanoides)
- Ruta del acetato-malonato (Policétidos)
- Ruta del acetato-mevalonato (Terpenos o isoprenoides)

Hay metabolitos secundarios que proceden de más de una ruta biosintética, como se muestra en la siguiente tabla.⁶

Tabla 1. Algunas rutas metabólicas y metabolitos generados.

Metabolito	Ruta Biosintética
Taninos	Ácido shikímico
Flavonoides	Ácido shikímico y policétidos
Alcaloides	Ácido shikímico y ácido mevalónico
Terpenos	Ácido mevalónico

1.3. Fitoquímica

Hasta el año 1800, poco progreso se había tenido en el campo de la fitoquímica. Solo se conocían unas cuantas sustancias, como el azúcar de caña, almidón, alcanfor y ácido benzoico, debido a que su preparación era sumamente sencilla. En 1803 se aisló el primer alcaloide, la narcotina (**6**), y le siguieron rápidamente muchos otros como la morfina (**1**), estricnina (**7**) y emetina (**8**) (Fig. 6). Hasta mediados del siglo XX el principal empeño, en cuanto a la química de los productos naturales, siguió siendo el aislamiento y determinación de la estructura de una amplia gama de compuestos.⁷

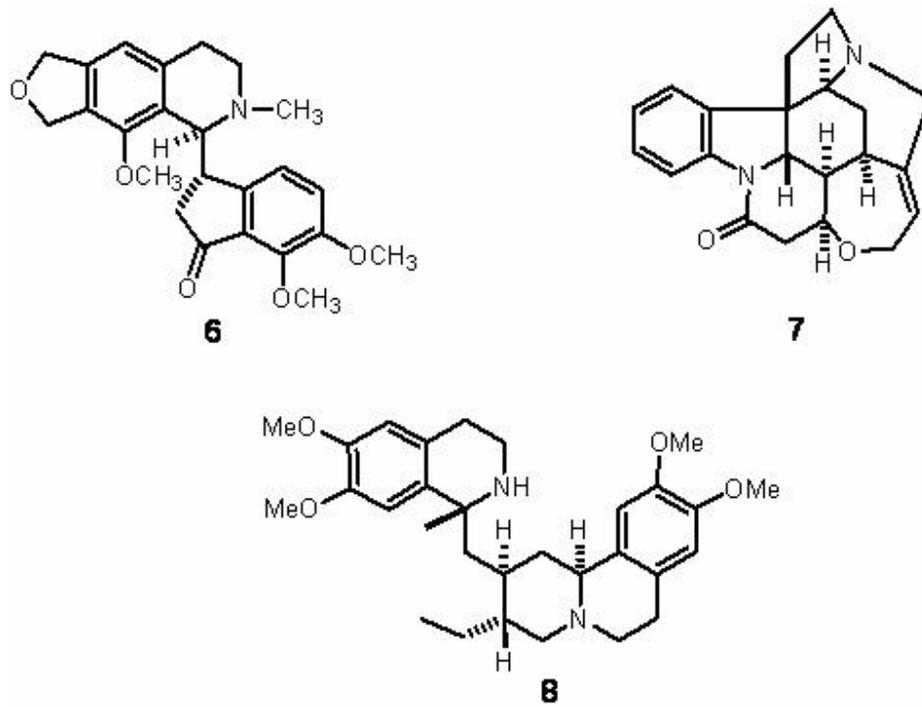


Figura 6. Los primeros alcaloides aislados

Continuando con la investigación sobre especies de *Stevia* en nuestro grupo de trabajo, esta tesis describe la obtención y caracterización de los metabolitos presentes en las raíces y las hojas de *Stevia jorullensis* H.B.K.

De esta especie ya se ha descrito un estudio químico de las raíces, también por nuestro grupo de trabajo, el cual se menciona en la parte de Antecedentes. En este caso la planta fue colectada en el 2003 en la localidad de El Guajolote, Epazoyucan, Hidalgo.

En una colecta llevada a cabo en el 2004 en las cercanías de la localidad conocida como Peñas Cargadas, Mineral del Monte, Hidalgo, se encontró una especie de *Stevia* con características morfológicas distintas a las otras estudiadas en nuestro laboratorio. Esta planta se colectó, se envió a su identificación botánica y se inició el estudio químico de sus raíces. Posteriormente, derivado de su análisis botánico, conocimos que se trataba de la misma especie, *Stevia jorullensis*, estudiada antes en nuestro grupo. Por lo tanto, sólo se llevó a cabo el estudio de las raíces hasta los avances de la primera separación cromatográfica del extracto hexánico y se procedió con el estudio químico de la parte aérea que no había sido estudiada. A continuación se presentan algunas fotos que permiten notar algunas diferencias entre estas plantas.



Color de las inflorescencias

Planta colectada en El Guajolote

Planta colectada en Peñas Cargadas

Figura 7. Diferencias morfológicas de las plantas.



Tamaño de las hojas



Tallos

Planta colectada en El Guajolote

Planta colectada en Peñas Cargadas

Figura 7. Diferencias morfológicas de las plantas (continuación).

En la siguiente tabla se resumen las características morfológicas que diferencian las plantas estudiadas.

Tabla 2. Comparación entre las especies colectadas.

Planta colectada en el Guajolote	Planta colectada en las cercanías de Peñas Cargadas
Inflorescencias color guinda intenso	Inflorescencias color guinda claro
Hojas pequeñas	Hojas más grandes
Tallo sin ramas	Tallo con ramas
Raíces pequeñas	Raíces abundantes y más grandes

Las diferencias morfológicas (tamaño de la planta, color de flores y tallo) de las especies colectadas se deben probablemente a las variaciones de habitats, principalmente de terreno, donde se colectaron. La especie de El Guajolote se encontró entre la zona de bosque, mientras que la de Peñas Cargadas se encontró en las orillas del bosque y el terreno de pastizal.

2. ANTECEDENTES

2.1 Plantas del género *Stevia*

El género *Stevia* (Asteraceae) comprende aproximadamente 300 especies de las cuales 80 se encuentran en Norteamérica. Cerca de 70 de éstas últimas, son endémicas de México y sólo 27 de éstas han sido exploradas en su composición química.⁸

Tabla 3. Especies estudiadas en México.⁹

Espece	Parte estudiada
<i>S. aff. tomentosum</i>	Aérea
<i>S. berlandieri</i>	Aérea
<i>S. chamaedrys</i>	Aérea
<i>S. eupatoria</i>	Aérea
<i>S. hyssopifolia</i>	Aérea
<i>S. isomeca</i>	Aérea
<i>S. lemmonia</i>	Aérea y Raíz
<i>S. lucida</i>	Aérea y Raíz
<i>S. microchaeta</i>	Aérea
<i>S. monardaefolia</i>	Aérea
<i>S. nepetifolia</i>	Aérea
<i>S. organoides</i>	Aérea y Raíz
<i>S. ovata</i>	Aérea y Raíz
<i>S. phebohylla</i>	Aérea
<i>S. pilosa</i>	Raíz
<i>S. polycephala</i>	Aérea y Raíz
<i>s. salicifolia</i>	Aérea
<i>S. salicifolia var.</i>	Aérea y Raíz
<i>S. salicifolia var. typica</i>	Aérea
<i>S. seleriana</i>	Aérea
<i>S. serrata</i>	Aérea
<i>S. subpubescens</i>	Aérea y Raíz
<i>S. subpubescens var. intermedia</i>	Raíz
<i>S. viscida</i>	Raíz

Algunas especies de *Stevia* tienen un uso medicinal, como las que a continuación se mencionan.

- *S. salicifolia* Cav. Ha sido empleada por los indios Tarahumaras para curar molestias gastrointestinales y como catártico.¹⁰
- *S. eupatoria*. Se ha utilizado como diurético y antipalúdico.¹¹
- *S. linoides*. Ha tenido uso como astringente.¹²

Se han realizado estudios en flores y hojas de plantas de este género para obtener aceites esenciales, por ejemplo, de *S. satureiaefolia* colectada en Argentina, se identificaron una serie de compuestos (Figura 8) como el borneol (9), cineol (10), la pulegona (11), geraniol (12), nerol (13) y el limoneno (14).⁸

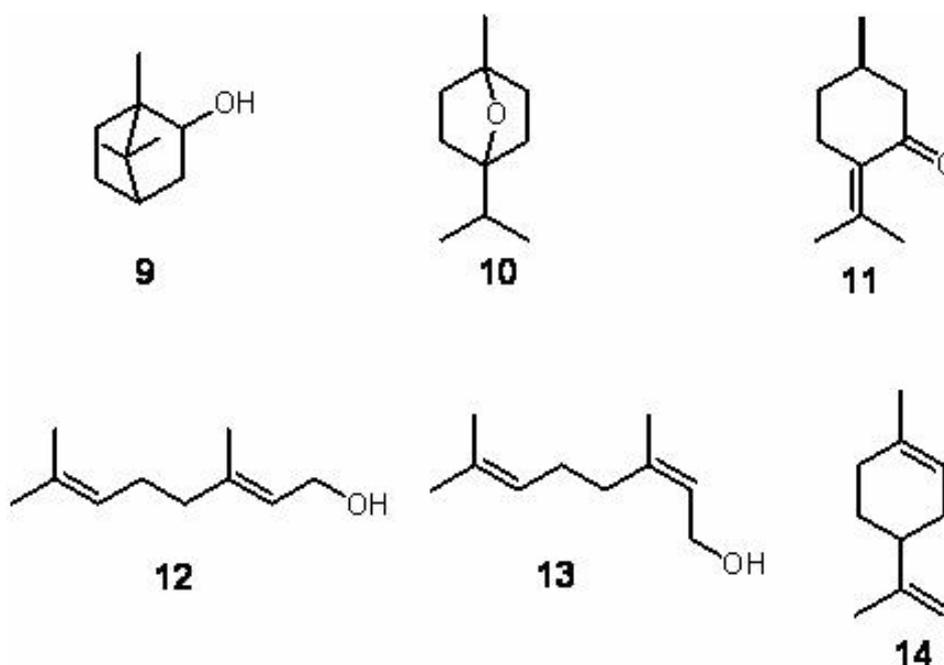
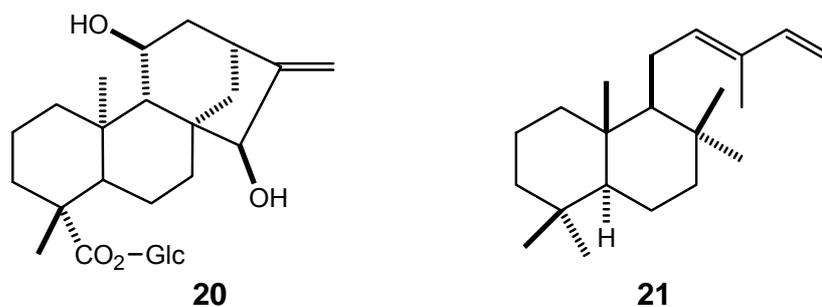


Figura 8. Aceites esenciales aislados de *Stevia*.

Diterpenos

Diterpenos como el *ent*-kaureno (20) y el abienol (21).



Triterpenos

β -amirina (22) y el damarano (23).

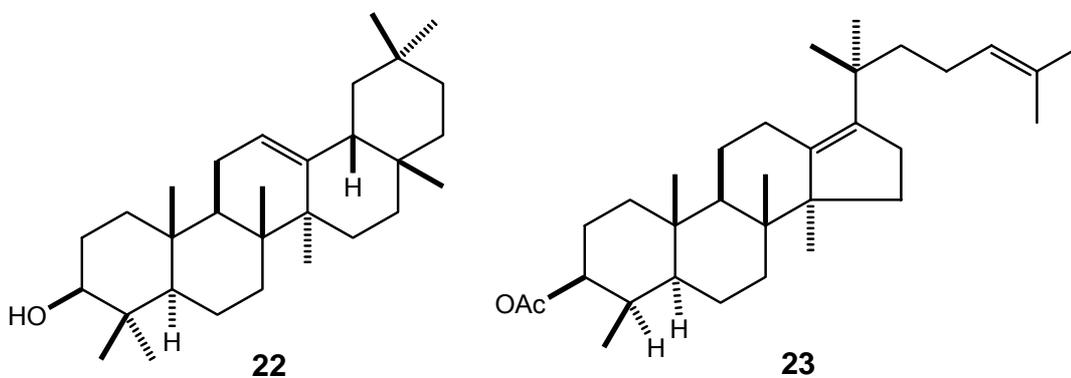
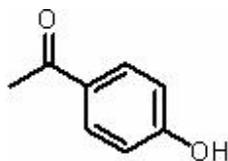


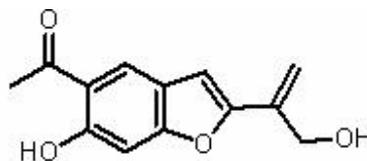
Figura 9. Metabolitos aislados de *Stevias* (Continuación).

En estas especies se han encontrado derivados de la acetofenona, tal es el caso de la *p*-hidroxiacetofenona (24), así como también derivados de benzofuranos (25) y cromenos (26).

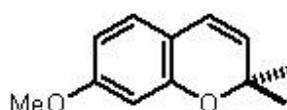
Derivados de la acetofenona, benzofuranos y cromenos



24



25



26

Figura 9. Metabolitos aislados de *Stevias* (Continuación).

En estas plantas también se han encontrado flavonoides por ejemplo, de *Stevia microchaeta* se aislaron los siguientes flavonoides glicosidados: el 3-O-β-D-galactósido de quercetina (**27**), el 7-O-β-D-glucósido de luteolin (**28**), el 4'-O-β-D-glucósido de luteolin (**29**) y el 3-O-β-D-glicósido de quercetina ⁸ (**30**) (Figura 10).

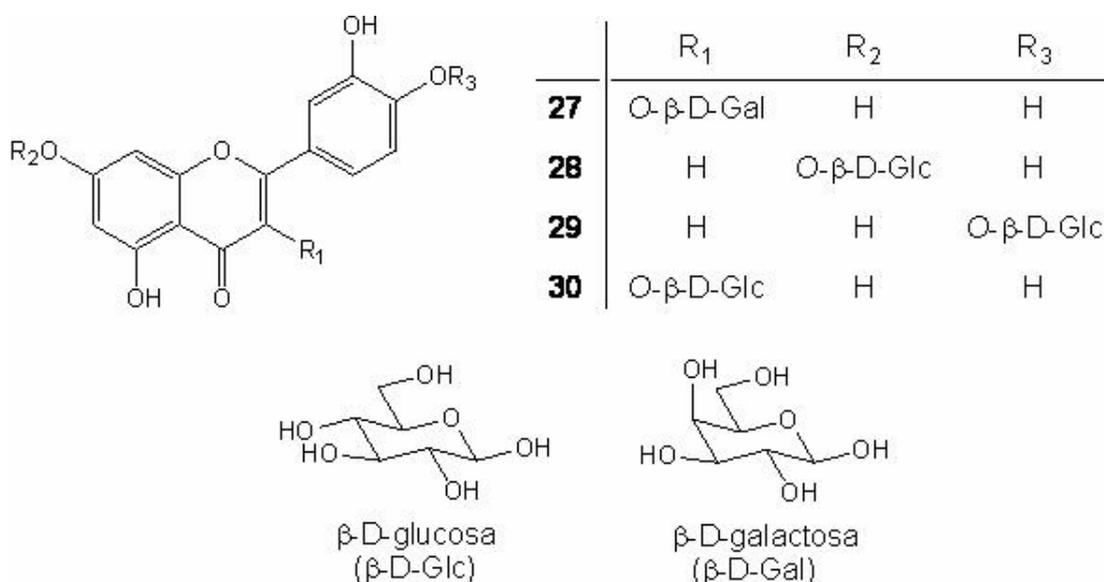


Figura 10. Flavonoides glicosidados aislados de *Stevia microchaeta*.

En nuestro grupo de investigación se han realizado estudios químicos en especies de este género, una de ellas es *Stevia eupatoria* (Spreng.) Will. De las raíces de esta especie se obtuvieron los compuestos acetato 8-14-seco-oleana-8(26)-13(14)-dien-3 β -ilo (**31**), β -sitosterol (**32**), estigmasterol (**33**), friedelanol (**34**), y los derivados del longipineno **35-38** (Figura 11).¹⁴

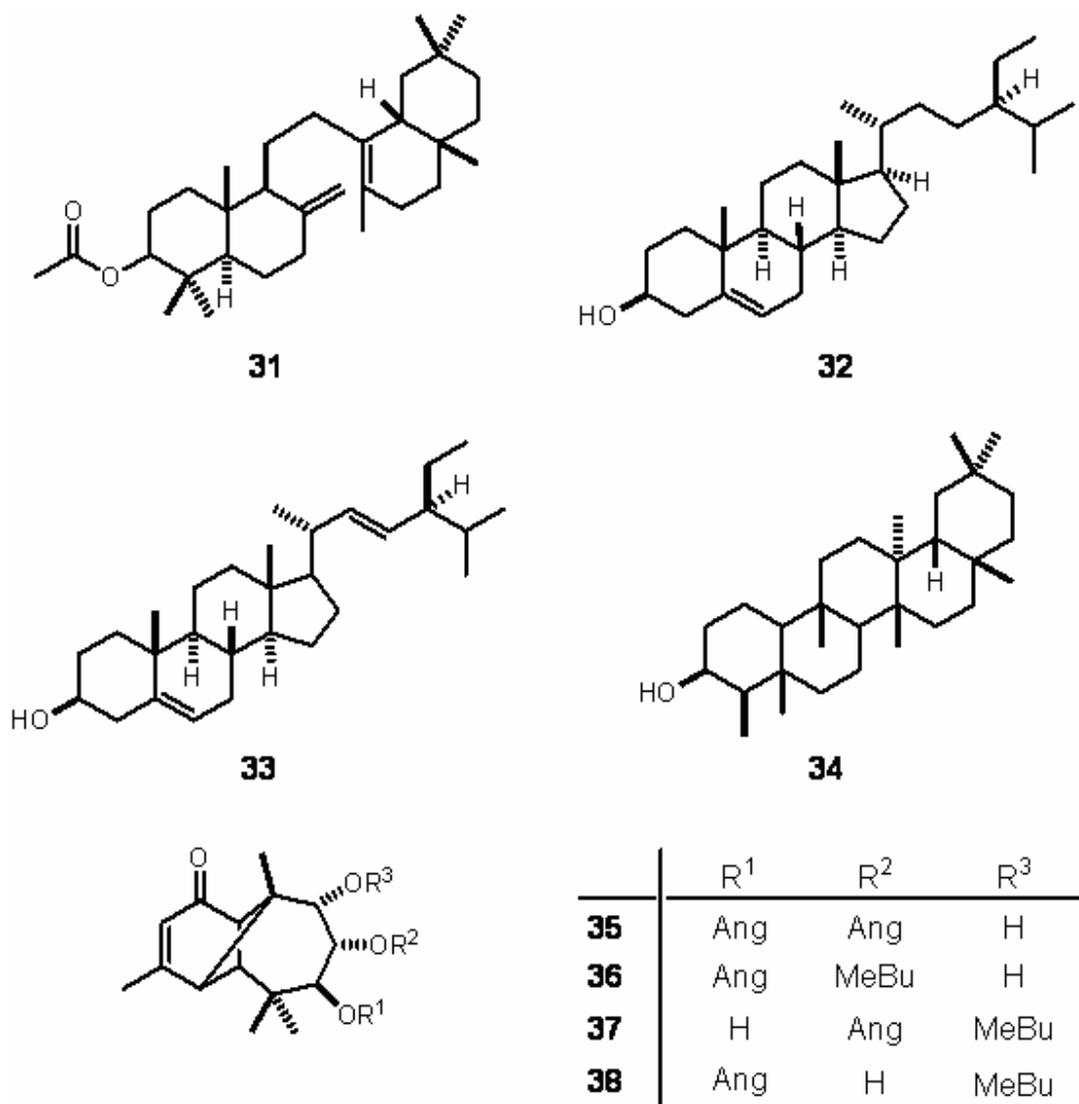


Figura 11. Metabolitos aislados de las raíces de *Stevia eupatoria* (Spreng) Will.

Otra especie estudiada por nuestro grupo, es *S. tomentosa* H.B.K. de la cual se aislaron el dammarano acetilado **23**, β -sitosterol (**32**), friedelanol (**34**) y los derivados del longipineno **35** y **36**, la (-)-valeranona (**39**) y los bisabolenos **40** y **41**,¹⁵

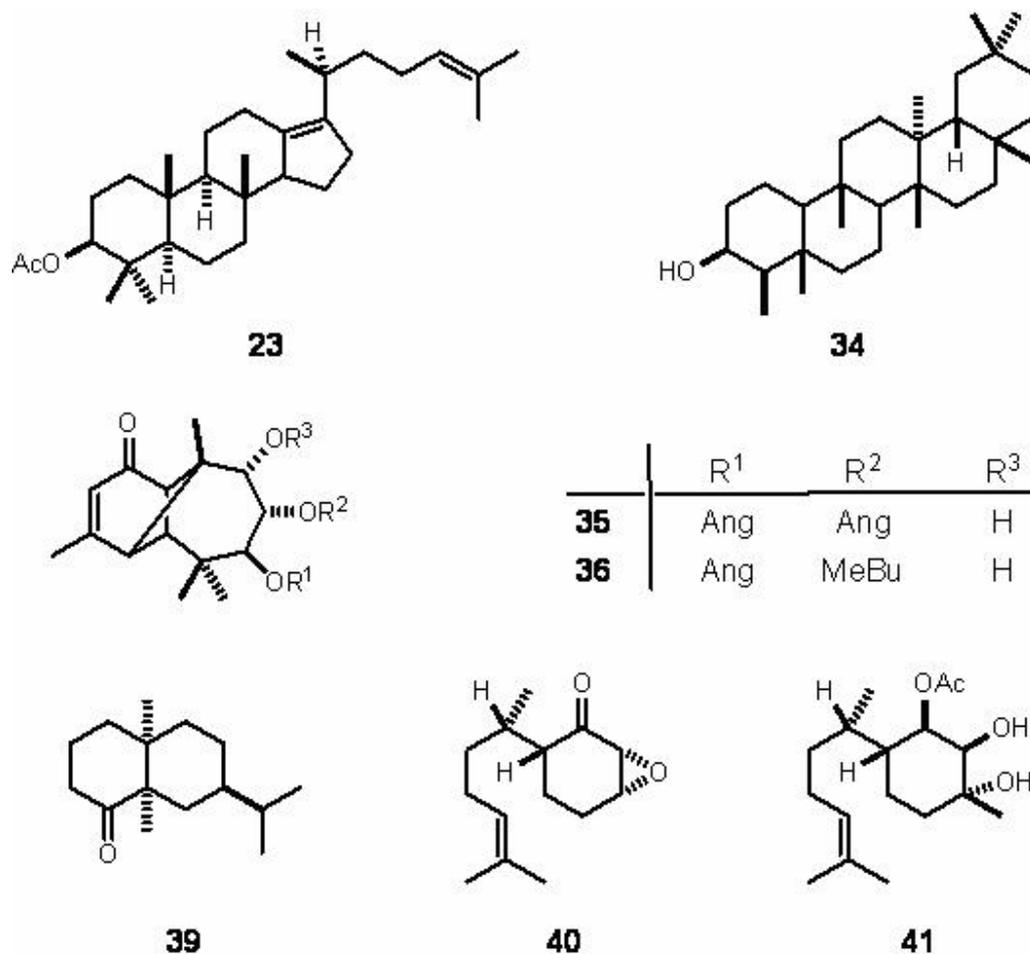


Figura 12. Metabolitos aislados de *S. tomentosa* H.B.K

De *Stevia pilosa* Lag. se aislaron los compuestos β - sitosterol (**32**), estigmasterol (**33**) así como los derivados del longipineno **42** y **43**.¹⁶

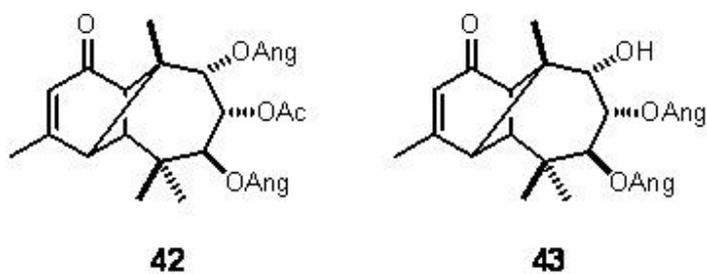


Figura 13. Compuestos aislados de *Stevia pilosa* Lag.

2.2. *Stevia jorullensis*

De *Stevia jorullensis* colectada en el Guajolote, Epazoyucan Hidalgo, se realizó un estudio para conocer la actividad antibacteriana de los extractos hexánico, acetato de etilo y metanol de la hojas, así como también el extracto metanólico de las raíces, utilizando el método de Kirby-Bauer modificado, contra bacterias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis*, y Gram negativas: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhymurium*. Todos los extractos mostraron actividad antibacteriana por lo menos contra una de las 5 bacterias estudiadas; esta inhibición se presentó en una concentración de 500 mg/mL. Todos los extractos presentaron actividad contra *S. aureus*. Se pudo observar que el extracto metanólico de las hojas fue el más activo y fue el único que inhibió además a *B. subtilis*, *K. pneumoniae* y *S. typhymurium*. La cepa de *E. coli* no fue inhibida por ningún extracto obtenido de esta planta.¹⁷

Un estudio químico previo del extracto hexánico de las raíces, condujo al aislamiento y caracterización de los compuestos **23**, **32**, **33**, α -isocomeno (**44**), el β -isocomeno (**45**), el γ -cadineno (**46**), trideciliglicerol (**47**), ácido trans-9-octadecanóico (**48**), el acetato de dammar-20(21),24-dien-3 β -ilo (**49**), 2,3-epoxibisabolenona (**50**) y 7-angeloil longipin-2-en-ona (**51**).¹⁸

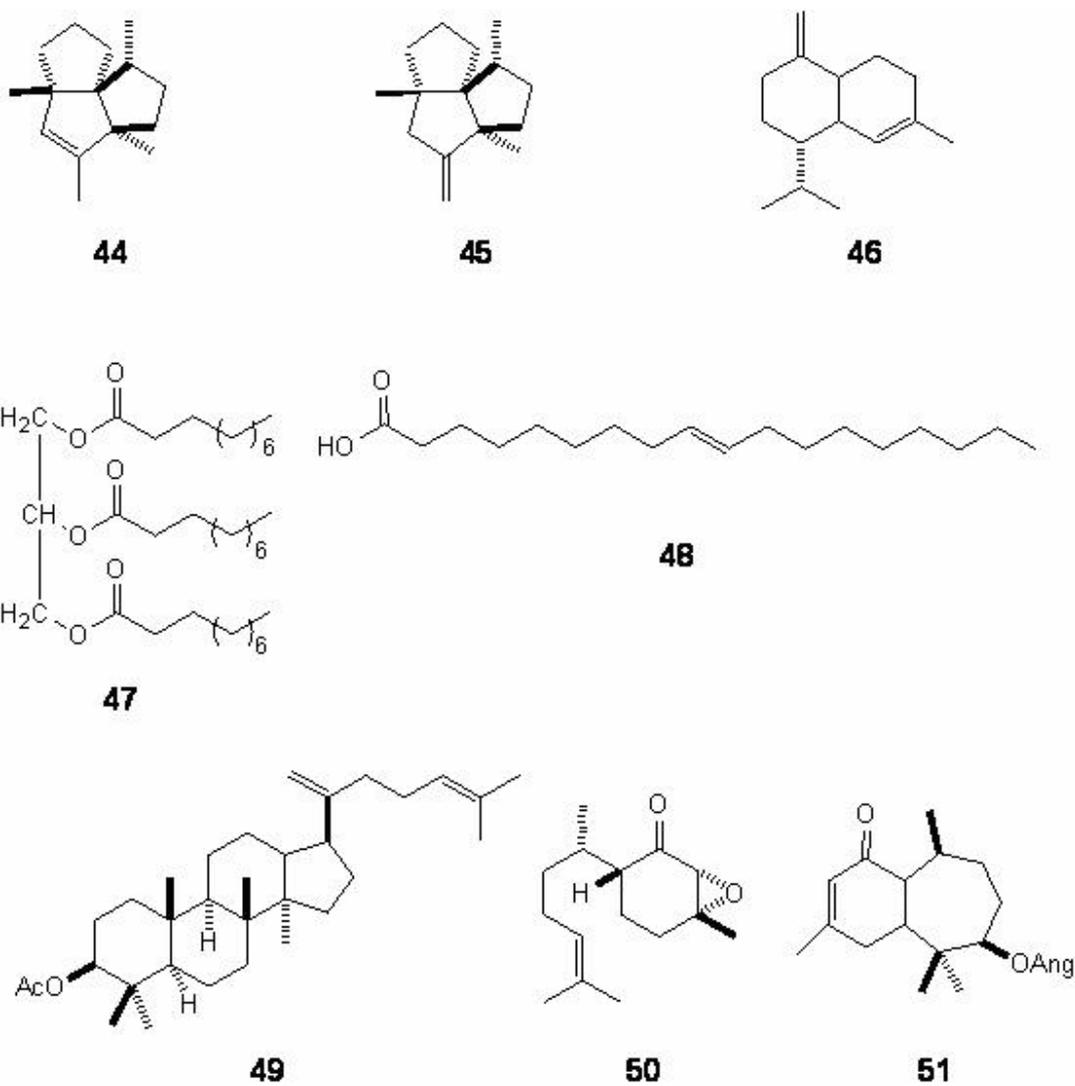


Figura 14. Metabolitos secundarios aislados de las raíces de *Stevia jorullensis*.

2.3. Actividad Biológica

Las lactonas sesquiterpénicas constituyen un grupo grande y diverso de los componentes con actividad biológica de plantas, de la familia Asteraceae. Por ejemplo, la custonólida (**17**) es un componente activo de varias hierbas medicinales y se ha encontrado en las partes aéreas de *S. yaconensis* y *S. chamaedrys*, este compuesto suprime el virus que causa la hepatitis B. Otro ejemplo es el eupatoriopicrin (**52**) que ha sido aislado de *S. sarensis*, *S. procumbens* y *S. yaconensis* var. *sublegandulosa* y que ha mostrado actividad antitumoral. De *Stevia yaconensis* var. *sublegandulosa*, también se aisló el ludartin (**53**), compuesto que mostró un efecto citoprotector importante. Los extractos de *Stevia* tienen actividades antimicrobianas que en algunos casos han sido asociadas con la presencia de lactonas sesquiterpénicas y/o flavonoides.⁸

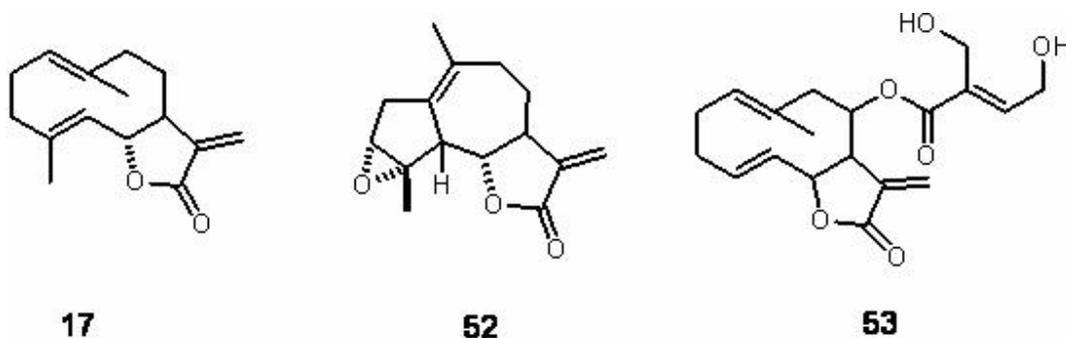


Figura 15. Algunos componentes activos de *Stevia*

3. OBJETIVOS

- Llevar a cabo un estudio químico de *Stevia jorullensis* con la finalidad de contribuir al conocimiento de los metabolitos presentes en esta especie y a sustancias útiles obtenidas de fuentes naturales.
- Aislar y caracterizar metabolitos secundarios del extracto hexánico de las raíces de *Stevia jorullensis* H. B. K.
- Aislar y caracterizar metabolitos secundarios del extracto metanólico de las hojas de *Stevia jorullensis* H. B. K.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Descripción de *Stevia jorullensis* H. B. K.

Stevia jorullensis H. B. K. (Figura 16) es una planta herbácea perenne, erecta, hasta de 1.3 m de alto. La planta contiene numerosas raíces delgadas; tallo por lo común sin ramificarse en las partes inferiores, hojas opuestas, con peciolo de 0 a 15 mm de largo, lámina por lo general ovada, pero a veces elíptica, deltoidea o lanceolada, de 1.5 a 5 cm de largo, de 1 a 3 cm de ancho, cabezuelas agrupadas en un corimbo terminal, inflorescencias laterales; corolas de 3 a 5 mm de largo, rosadas a color guinda. Ampliamente distribuida en el valle de México, con excepción de las partes más áridas. Crece abundantemente en bosques de pinos y zona de matorrales.

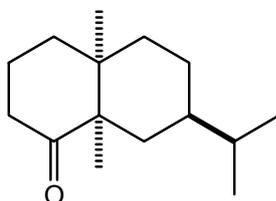


Figura 16. Muestra de *Stevia jorullensis* H.B.K.

4.2. Extracto hexánico de la raíz

La separación cromatográfica en gel de sílice del extracto hexánico de la raíz, usando la técnica de la cromatografía rápida y hexano y mezclas de hexano-AcOEt como eluyentes, condujo al aislamiento del sesquiterpeno conocido como (–)-valeranona (**39**), (134 mg), cuyos datos físicos y espectroscópicos resultaron iguales a los descritos.¹⁹

En la Figura 17 se muestra el espectro de RMN de ¹H de esta sustancia, en el cual se observaron, entre sus señales más significativas, las señales doble de doble de dobles del los hidrógenos alfa al carbonilo, 3 β y 3 α , en 2.68 y 2.22 ppm, respectivamente, la señal triple de dobles del hidrógeno 1 β en 2.38 ppm, así como las señales simples de los metilos 15 y 14 en 1.04 y 0.80 ppm, correspondientemente, y las señales dobles de los metilos del grupo isopropilo en 0.86 y 0.84 ppm.



39

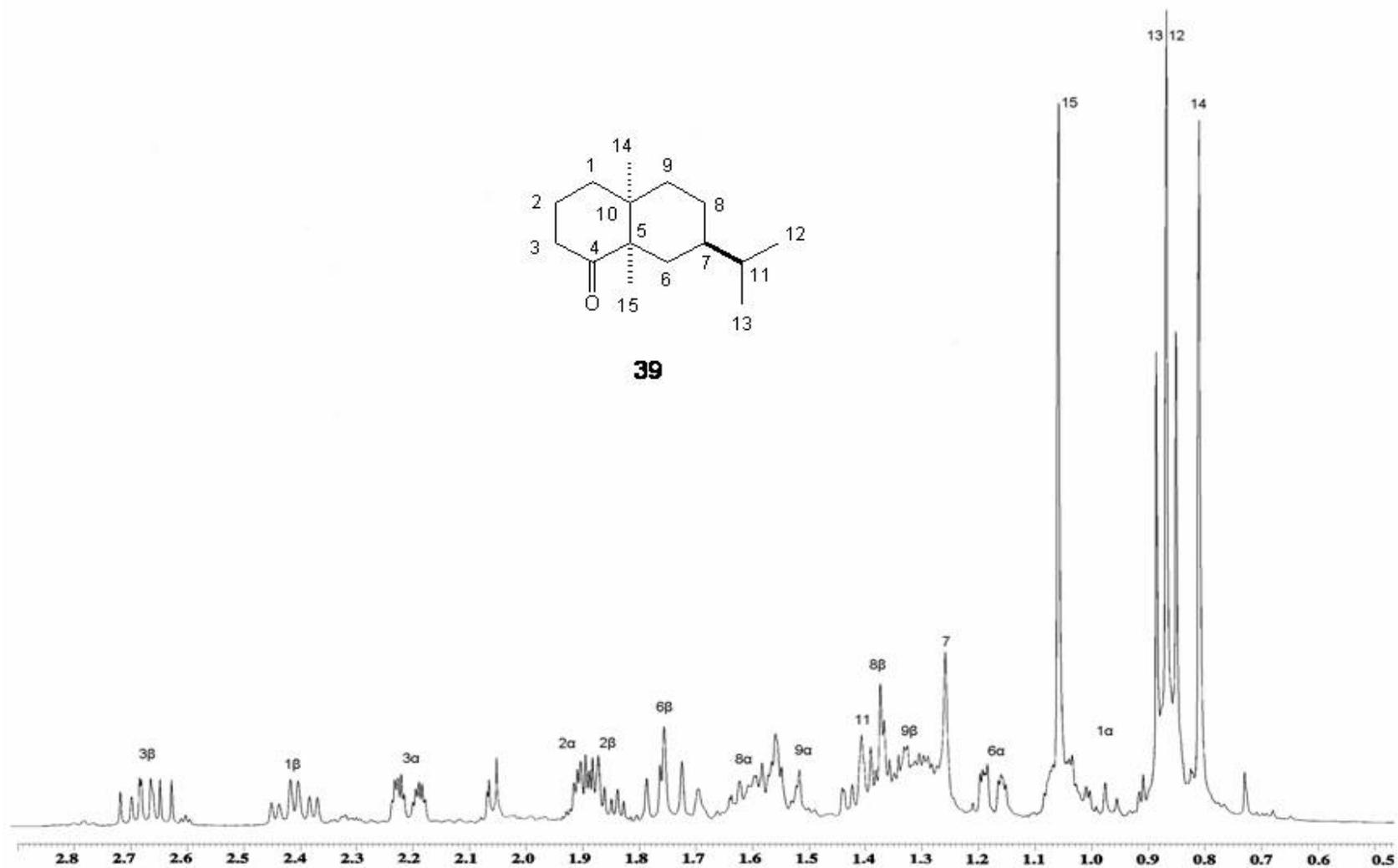


Figura 17. Espectro de RMN de ¹H (400MHz) de (-)-valeranonona (**39**), en CDCl₃.

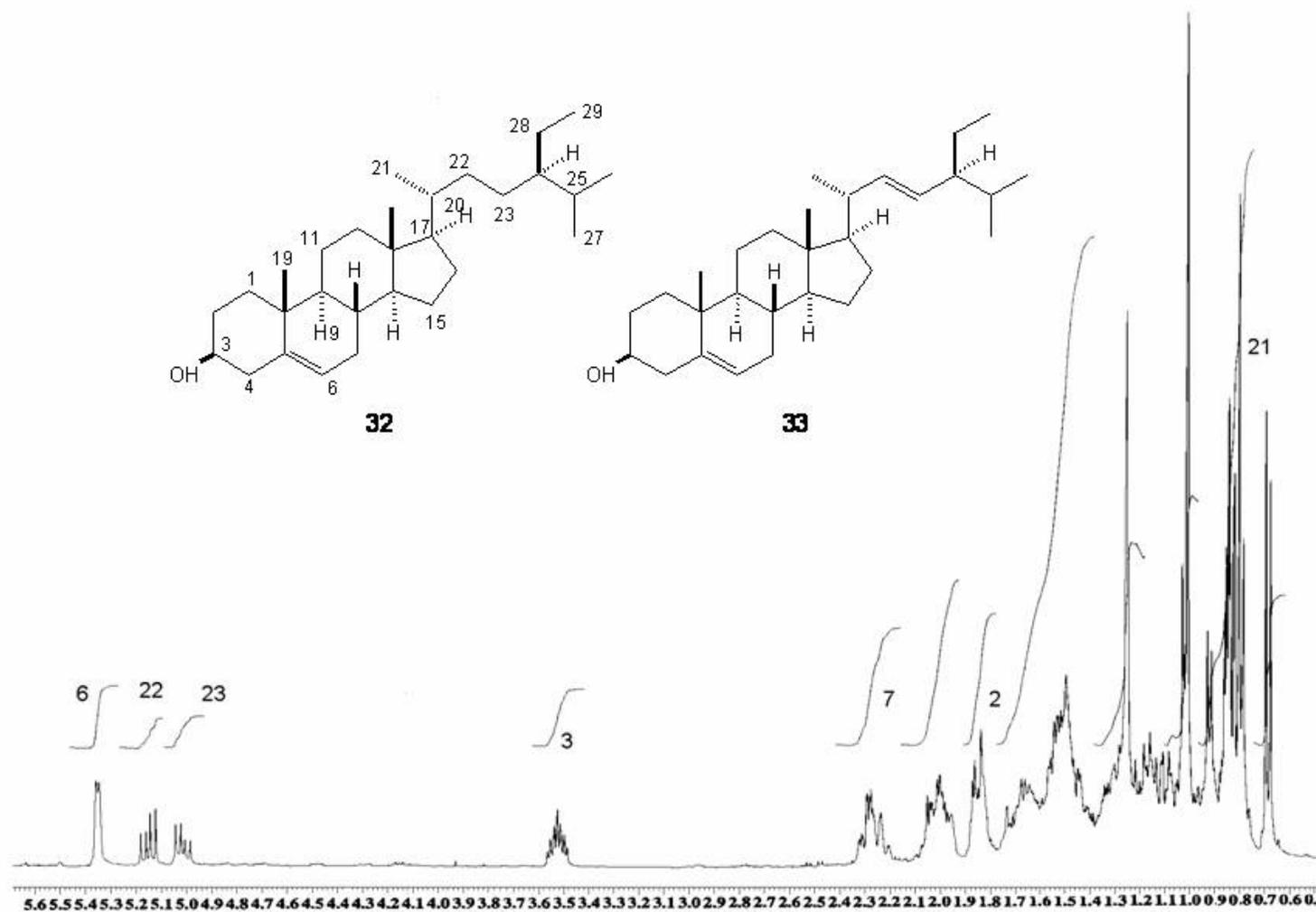
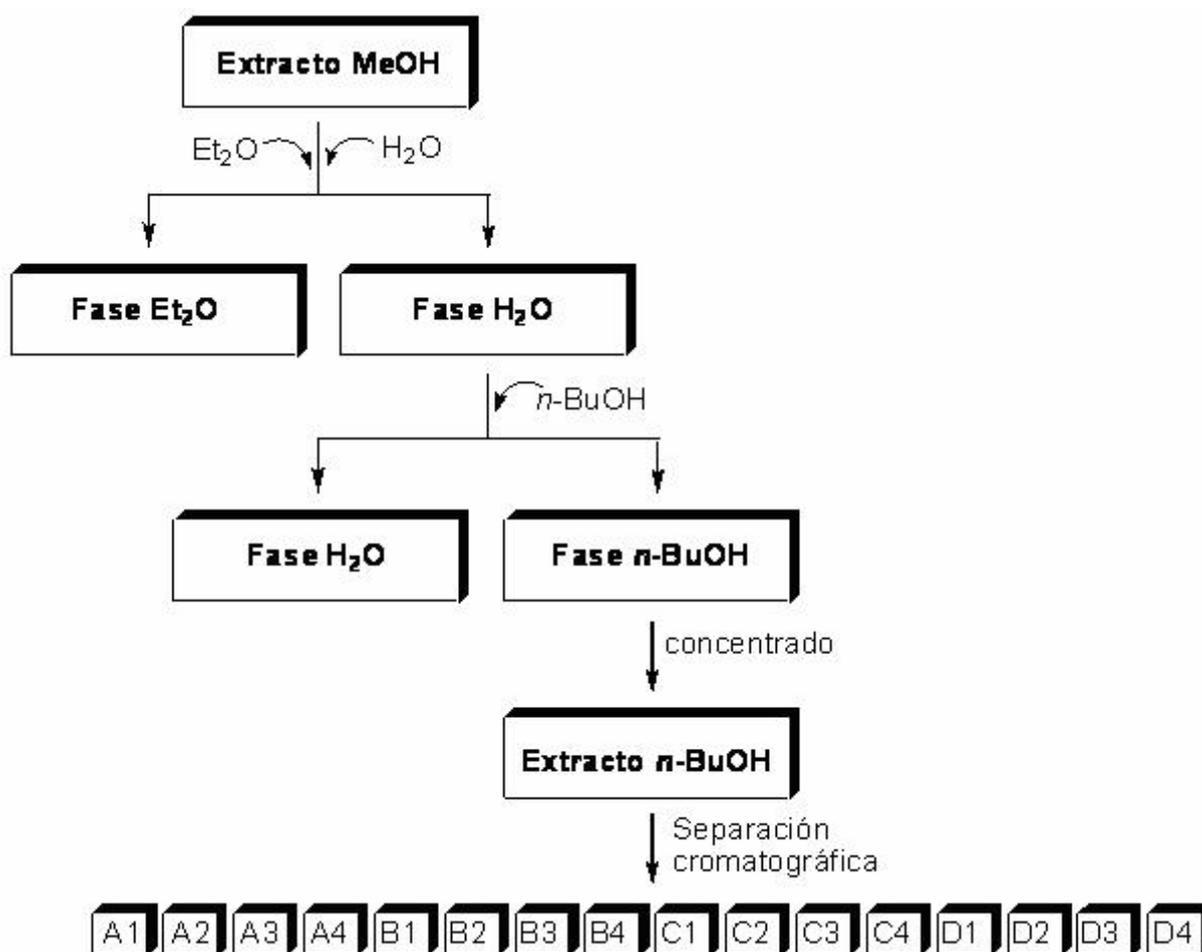


Figura 18. Espectro de RMN de ^1H de la mezcla de compuestos **32** y **33** en CDCl_3 .

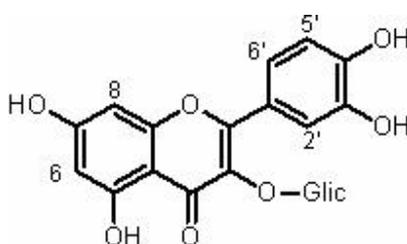
4.4. Extracto metanólico de las hojas

Del extracto MeOH de las hojas se hizo una partición con *n*-BuOH y H₂O con la finalidad de llevar a cabo una separación preliminar de posibles glicósidos de polisacáridos. Previamente, al extracto se le practicó un lavado con éter etílico (Et₂O) para separar el material graso. El extracto *n*-BuOH se sometió a separación mediante cromatografía rápida usando como disolventes mezclas de CHCl₃-MeOH-H₂O. De este proceso se obtuvieron las fracciones A1–A4, B1–B4, C1–C4, y D1–D4, como se muestra en el Esquema 2.



Esquema 2. Metodología utilizada para el extracto de MeOH.

Las fracciones obtenidas se analizaron mediante CCF evidenciando una composición similar en las fracciones A4, B1, B2, B3 y B4 por lo cual se juntaron y se sometieron a cromatografía en columna, usando las mezclas y disolventes de la cromatografía anterior como eluyentes. En esta ocasión se obtuvieron 6 fracciones que se marcaron como R1 a R6. Las fracciones R2 y R3 se juntaron y recromatografiaron usando mezclas de CHCl_3 -Acetona-MeOH- H_2O . En el eluato 8, se observó la presencia de un glicósido de quercetina (**54**) (20 mg, cristales amarillos), cuya identificación se llevó a cabo mediante la comparación de sus datos espectroscópicos con los de glicósidos de quercetina conocidos.²⁰

**54**

En las Figuras 19 y 19a se presenta el espectro de RMN de ^1H y una ampliación del mismo, a 400 MHz en $\text{DMSO}-d_6$ de esta muestra (**54**). En el espectro se observó la señal característica del OH en C-5 en 12.6 ppm, una señal doble en 7.77 ppm con constante de acoplamiento *meta* ($J = 2.2$ Hz) que se asignó a H-2', una señal doble de doble en 7.67 ppm con constantes de acoplamiento *orto* y *meta* ($J = 8.4$ y 2.2 Hz) la cual fue asignada a H-6' y una señal doble con constante de acoplamiento *orto* ($J = 8.4$ Hz) en 6.91 ppm que se asignó a H-5'. En 6.62 y 6.91 ppm se observaron las señales para H-8 y H-6, respectivamente, ambas con acoplamiento *meta* ($J = 2.2$ Hz), así como una señal doble ancha ($J = 7.0$ Hz) en 5.29 ppm que es característica de un protón anomérico de un azúcar (Tabla 2). El desplazamiento químico de esta última señal hace suponer que se trata de glucosa, pero desafortunadamente la muestra no se pudo obtener de manera pura por lo que fue difícil identificar en el espectro el resto de las señales para este carbohidrato.

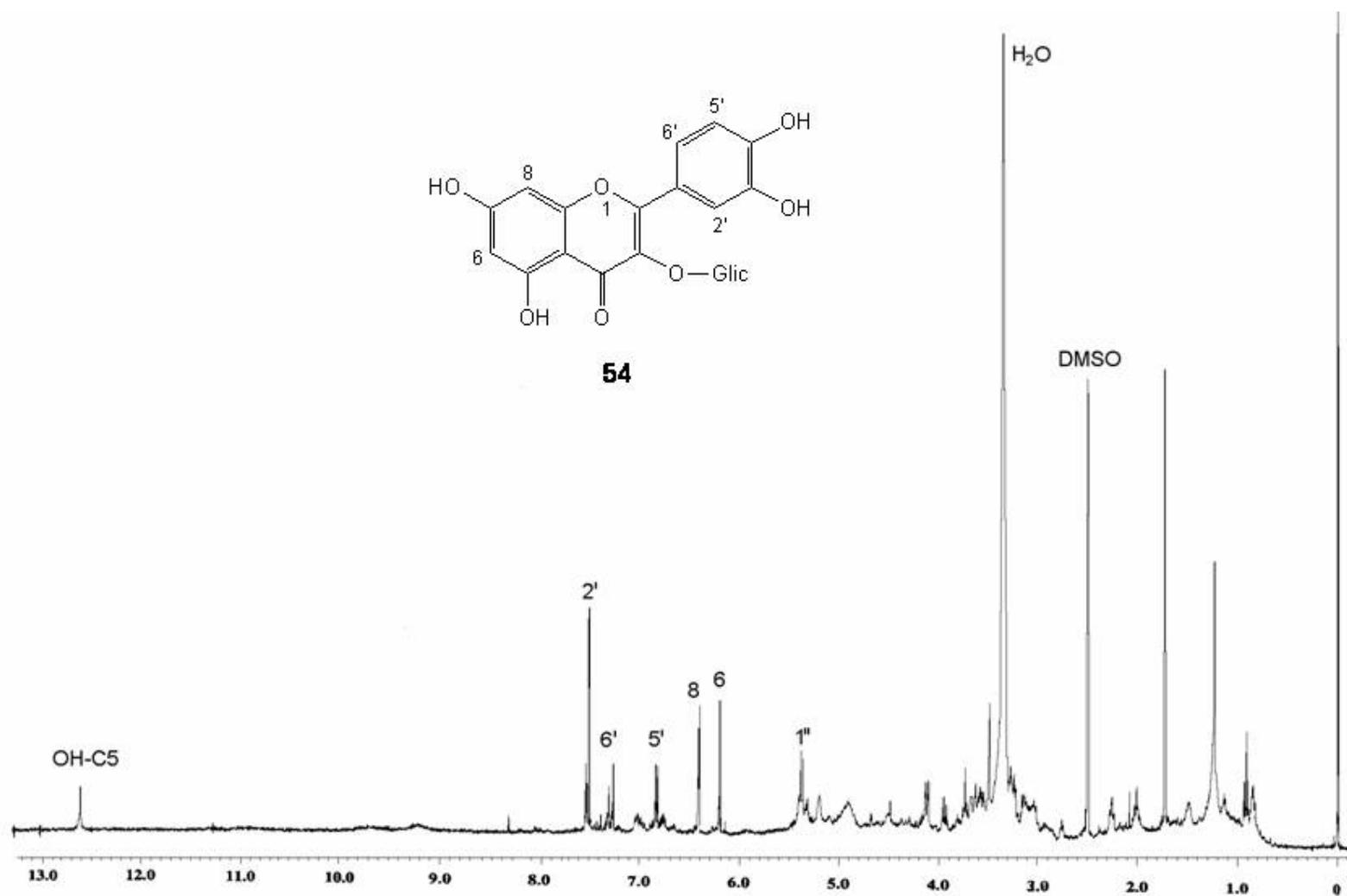


Figura 19. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) de la muestra conteniendo el glicósido de quercetina (**54**) en $\text{DMSO}-d_6$.

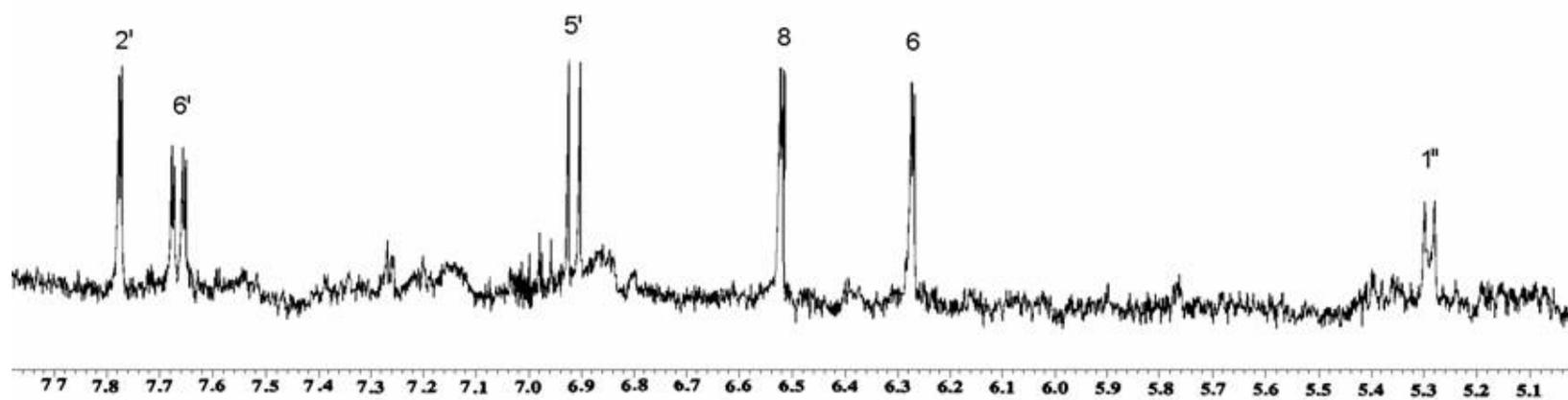
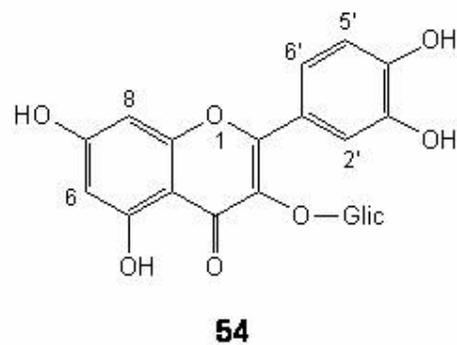
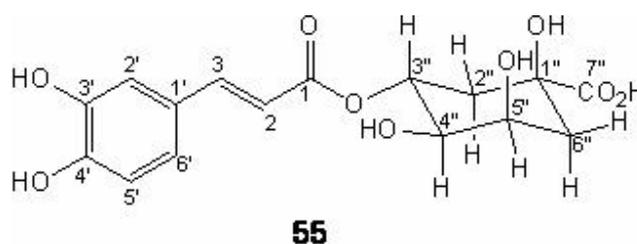


Figura 19a. Ampliación del espectro de RMN de ¹H (400 MHz) de la muestra conteniendo el glicósido de quercetina (**54**) en DMSO-d₆.

Tabla 4. Datos de RMN de ^1H (400 MHz) para el compuesto **54**, δ en ppm, disolvente $\text{DMSO-}d_6$, referencia interna TMS.

H	δ_{H} /ppm (H; mult; J/Hz)
1''	5.3 (1H; d; 7.0)
2'	7.7 (1H; d; 2.2)
6'	7.6 (1H; dd; 8.4, 2.2)
5'	6.9 (1H; d; 8.4)
8	6.5 (1H; d; 2.2)
6	6.2 (1H; d; 2.2)

En la fracción C3 de la cromatografía del extracto *n*-BuOH se obtuvo un sólido amorfo el cual mediante análisis por RMN de ^1H y ^{13}C , incluyendo experimentos COSY, HMBC Y HETCOR, se caracterizó como el ácido clorogénico (**55**) (273 mg, cristales color café). Este compuesto es un producto natural conocido, aunque es la primera vez que se encuentra en especies del género *Stevia*. Sus datos espectroscópicos se compararon con los descritos,²¹ los cuales resultaron iguales permitiendo corroborar su estructura.



El espectro de RMN de ^1H (Figuras 20 y 20a), mostró señales en la zona aromática para los protones 2', 6' y 5' en 7.08, 6.96 y 6.77 ppm, respectivamente, una señal en 7.44 y 6.22 ppm para los protones vinílicos H-3 y H-2, correspondientemente, así como señales entre 1.89 y 1.84 ppm para los protones H-2''a, H-2''b y las señales en 2.00 (*da*, $J=11.7$ Hz) y 1.68 (*da*, $J=11.7$ Hz) ppm para H-6''a y H-6''b.

En la Figura 21 se muestra el espectro de RMN de ^{13}C para el compuesto **55**, donde podemos observar en 177.13 ppm una señal que corresponde al carbono del carboxilo C-7'', las señales en la región aromática en 149.13 y 146.34 ppm para C-4' y C-3', señales en 145.28 y 115.09 ppm correspondientes a C-3 y C-2, una señal en 71.50 ppm para el C-3'', así como una señal característica de metileno en 39.84 ppm. El experimento HETCOR (Figuras 22 y 22a) permitió la asignación de la mayoría de las señales en el espectro de ^1H , por ejemplo permitió distinguir los protones H-2'' y H-6''. El experimento COSY (Figuras 23 y 23a) confirmó la asignación de los protones H-2'' y H-6'' ya que los protones H-6''a y H-6''b mostraron correlación con H-5'' así como los protones H-2''a y H-2''b con H-3''. En el experimento HMBC (Figuras 24 y 24a) se observó la correlación a tres enlaces entre H-3'' y el carbonilo C-1, lo cual confirmó que el éster está en esta posición. Este experimento permitió además corroborar las asignaciones hechas tanto para las señales de ^1H como de ^{13}C . Con fines comparativos, en adición de los experimentos determinados en $\text{DMSO}-d_6$, se obtuvo el espectro de ^1H y el experimento COSY en D_2O de **55**, los cuales se muestran en las figuras 25, 25a y 26 respectivamente.

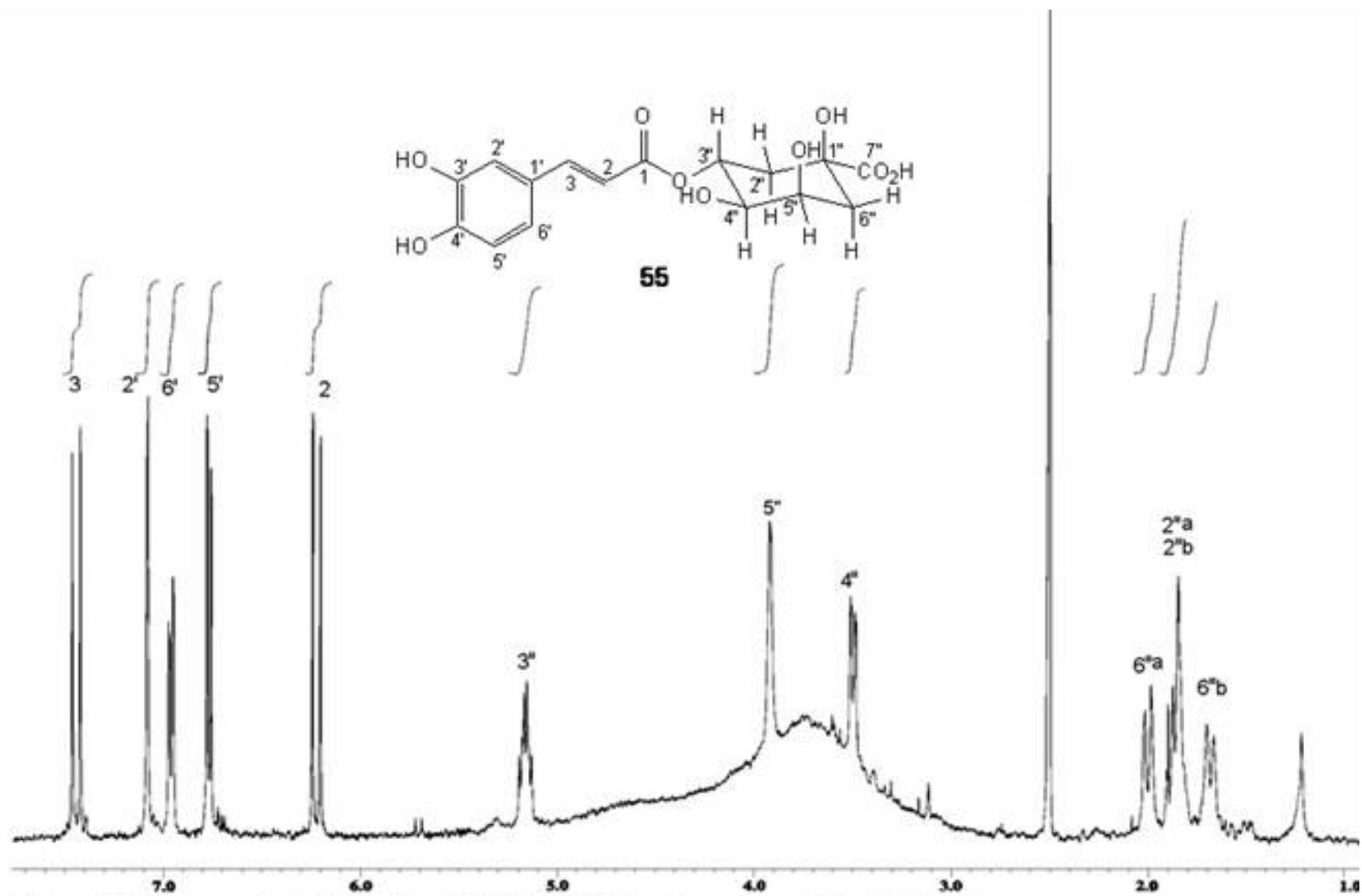


Figura 20 Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) del ácido clorogénico (**55**) en $\text{DMSO-}d_6$

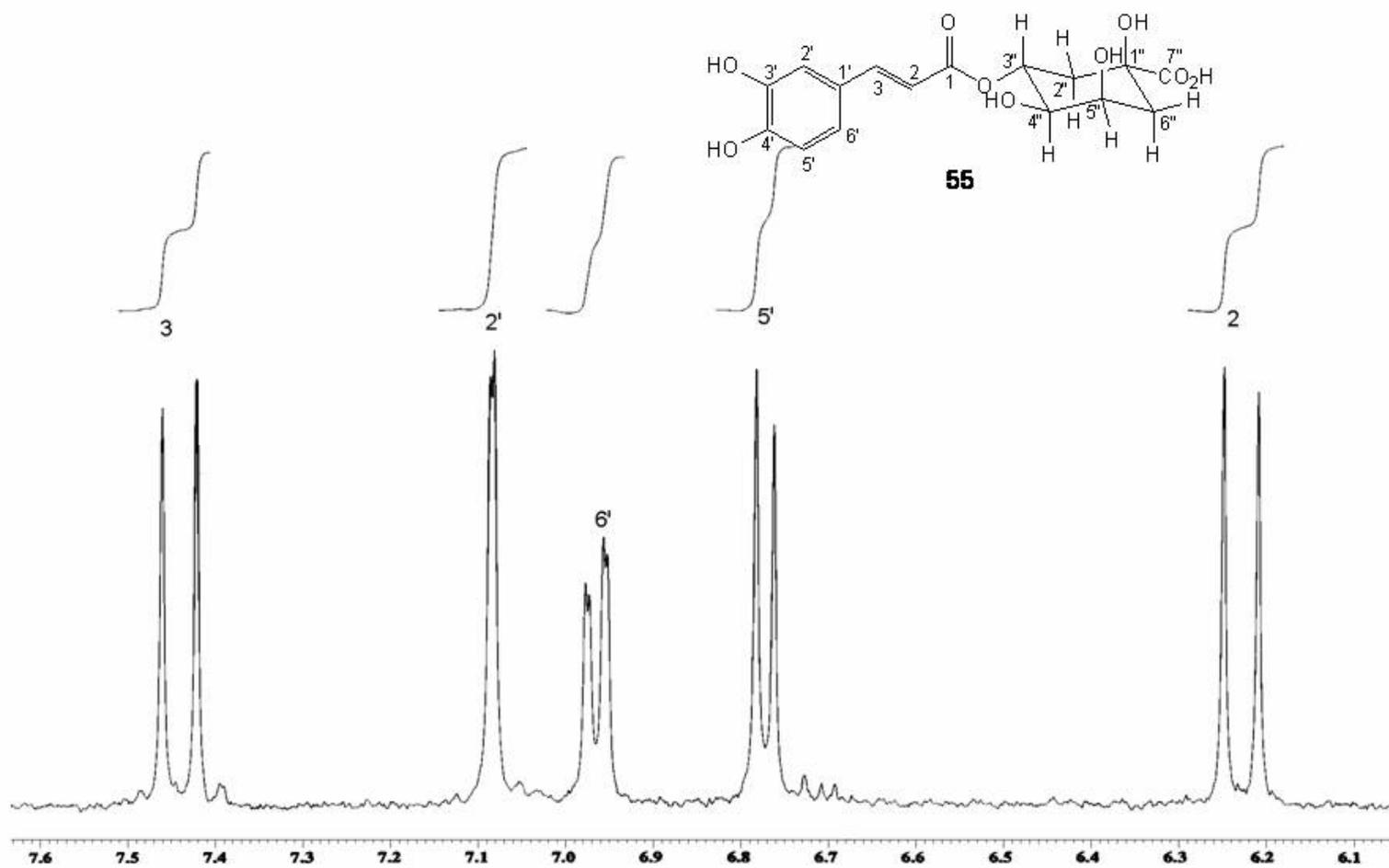


Figura 20a. Ampliación del espectro de RMN de ^1H (400 MHz) del ácido clorogénico (**55**) en $\text{DMSO-}d_6$

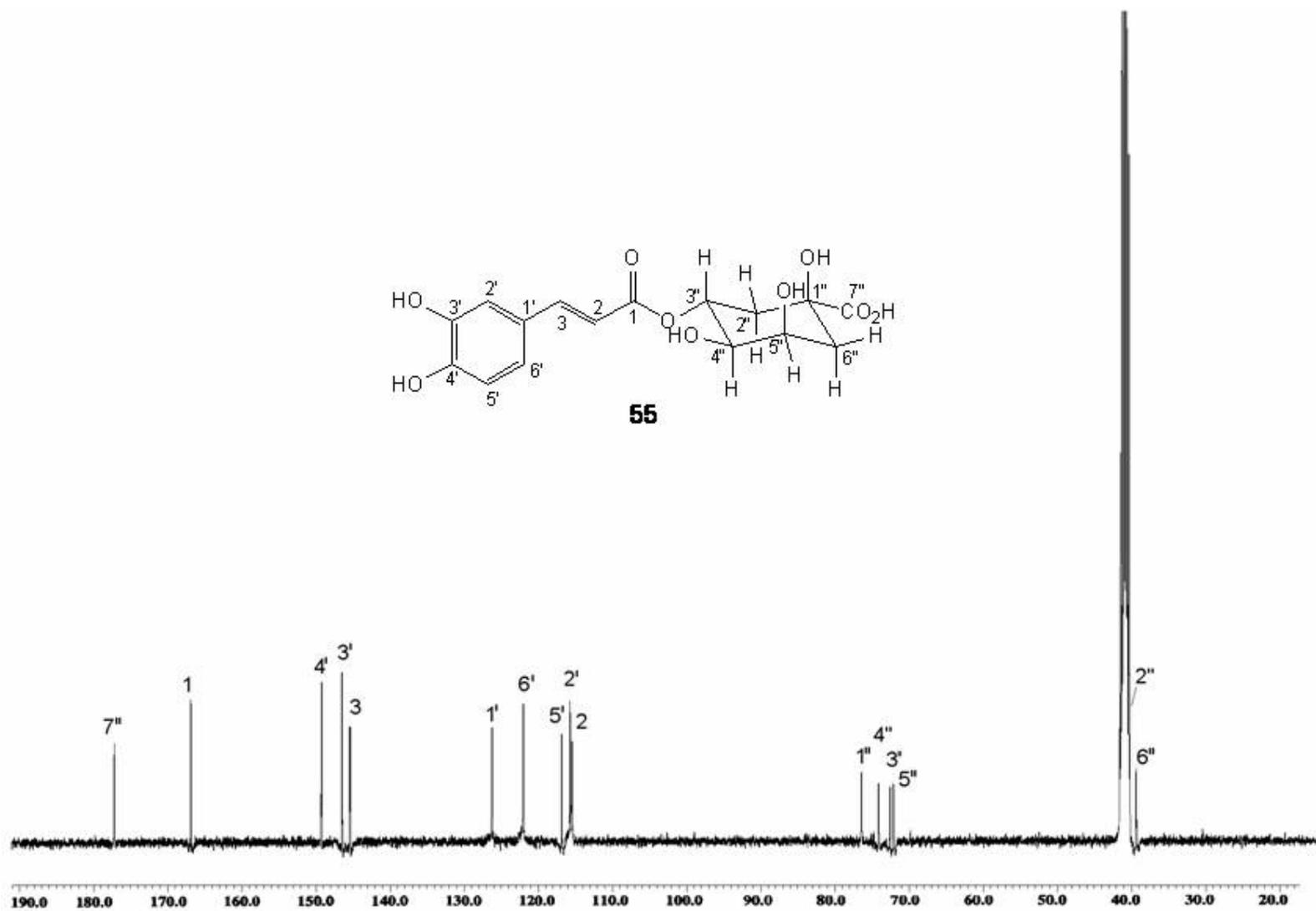


Figura 21. Espectro de RMN de ^{13}C (100MHz) del ácido clorogénico (**55**) en $\text{DMSO-}d_6$.

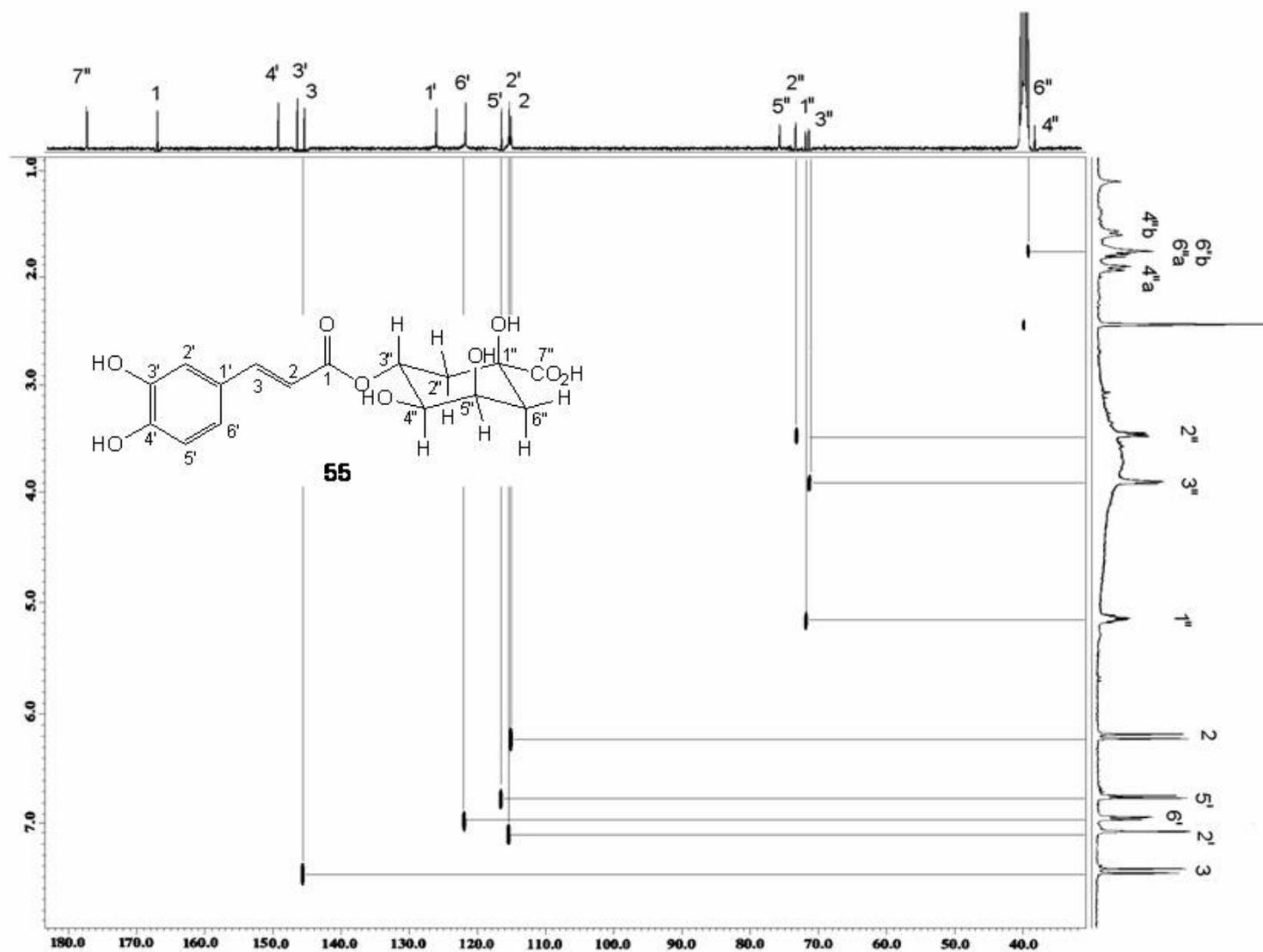


Figura 22. Diagrama HETCOR (100 MHz) del compuesto (**55**) en DMSO- d_6 .

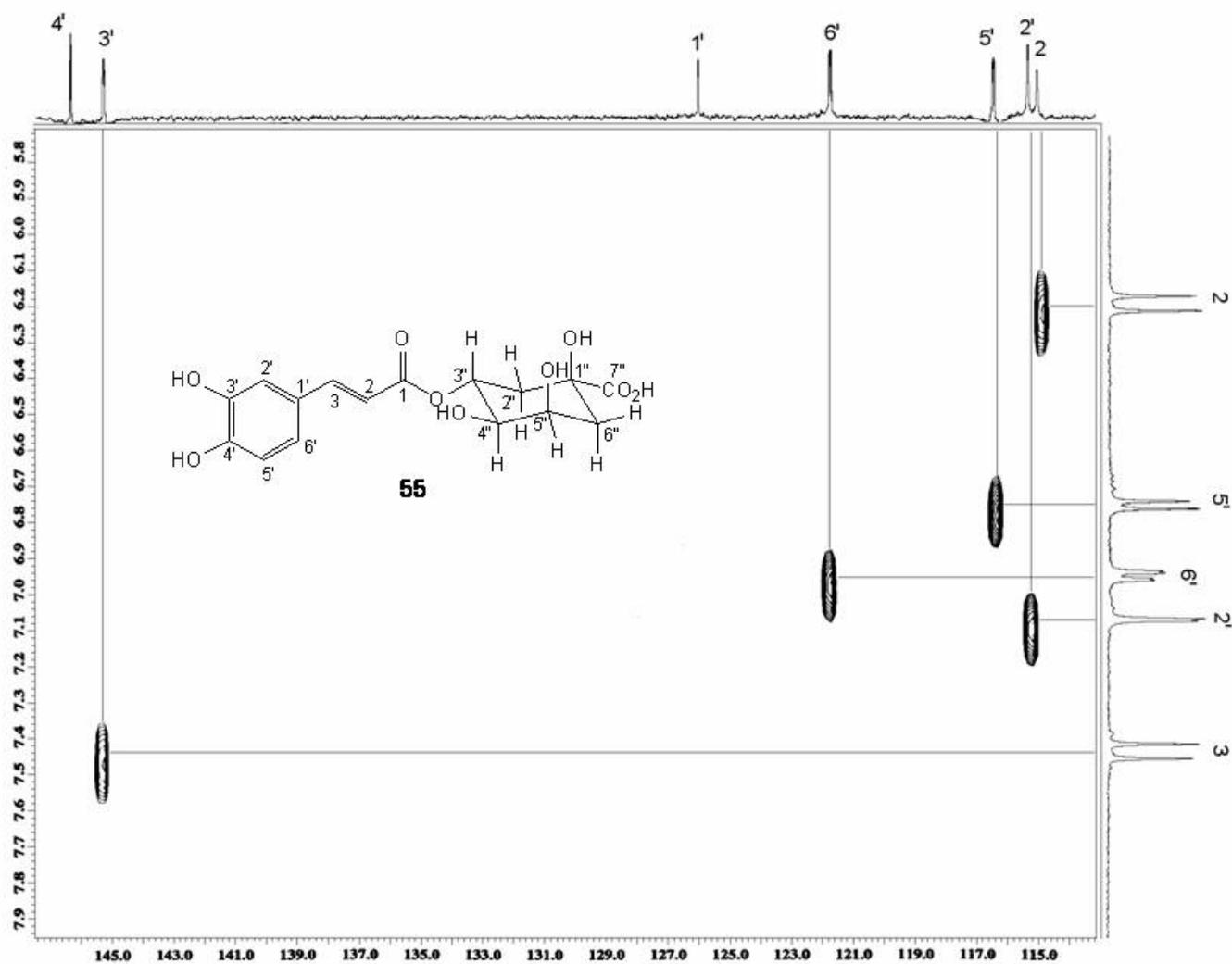


Figura 22a. Ampliación del diagrama HETCOR (100 MHz) del compuesto (**55**) en DMSO-*d*₆.

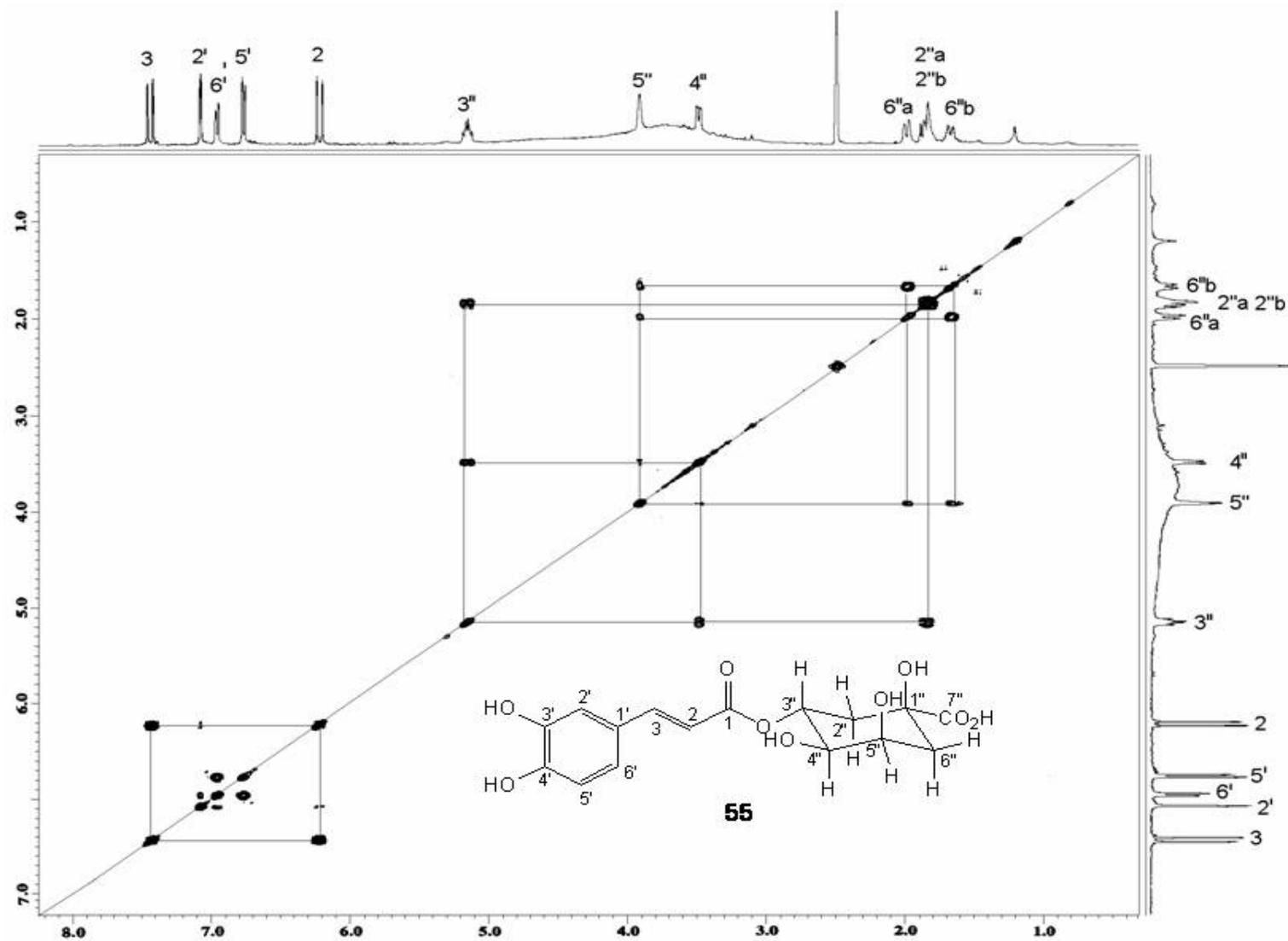


Figura 23. Diagrama COSY (400 MHz) del compuesto **55** en DMSO- d_6 .

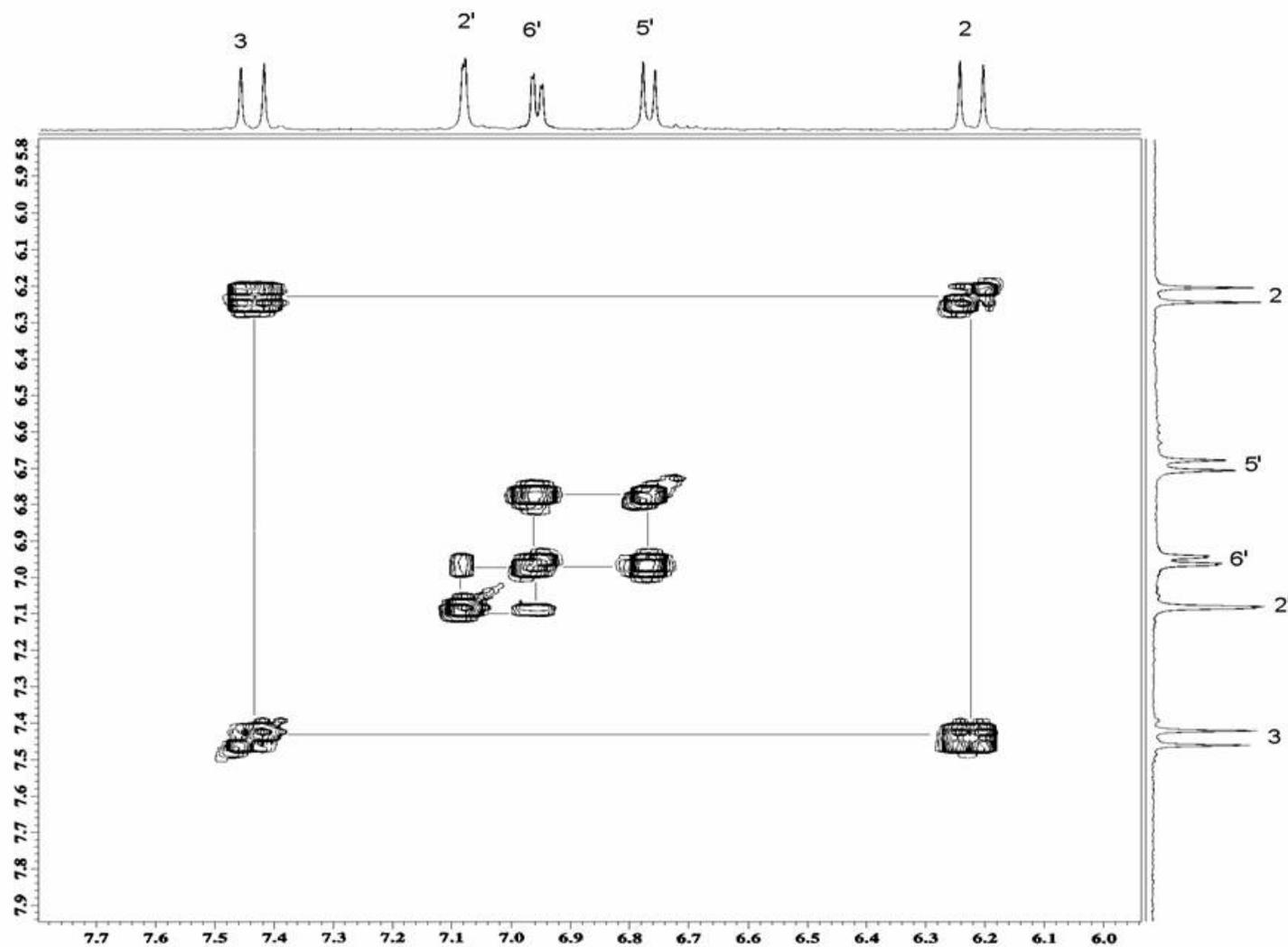


Figura 23a. Ampliación del diagrama COSY (400 MHz) del compuesto **55** en DMSO- d_6 .

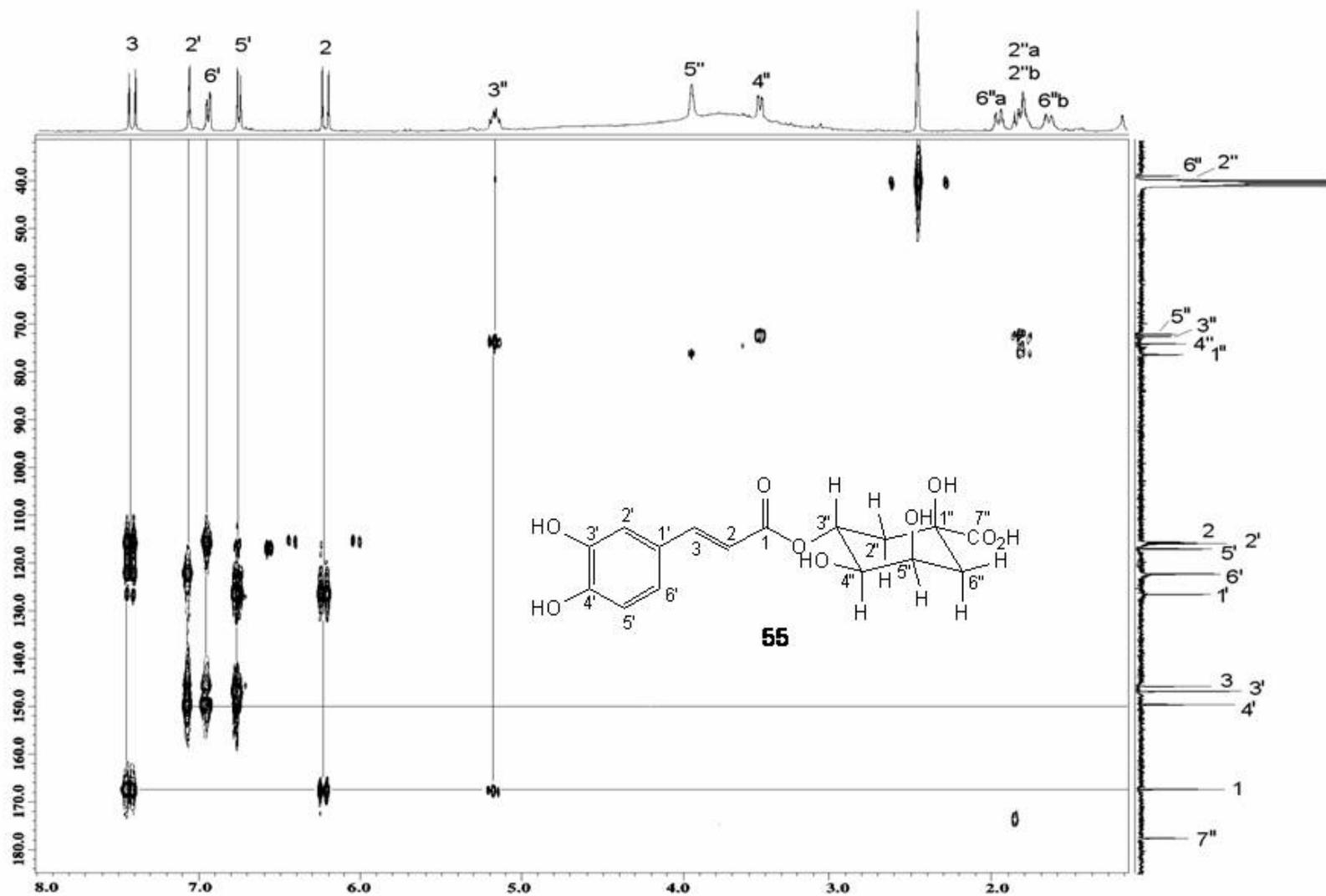


Figura 24. Diagrama HMBC del ácido clorogénico (**55**) en DMSO- d_6 .

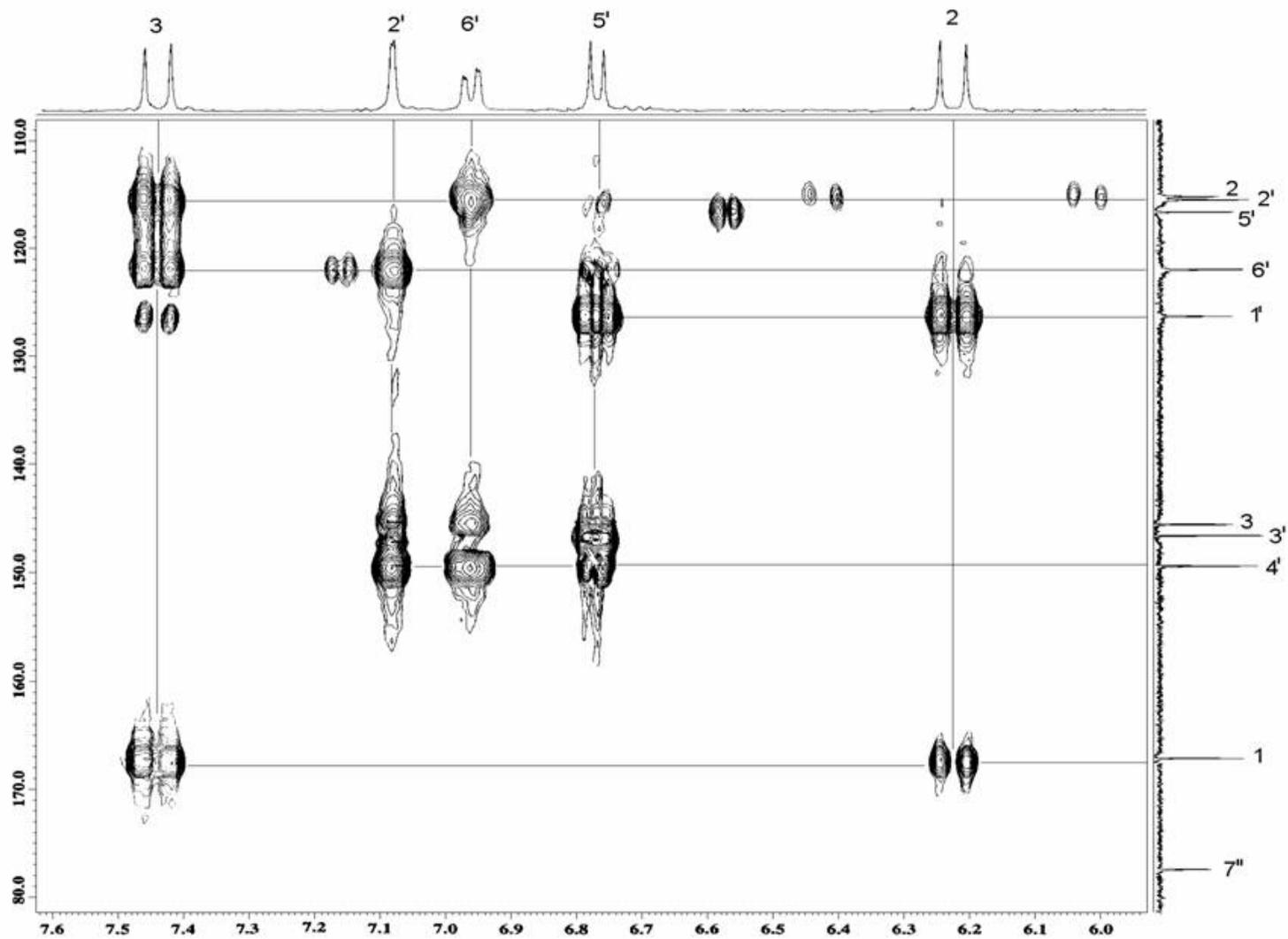


Figura 24a. Ampliación del diagrama HMBC del ácido clorogénico (**55**) en DMSO-*d*₆.

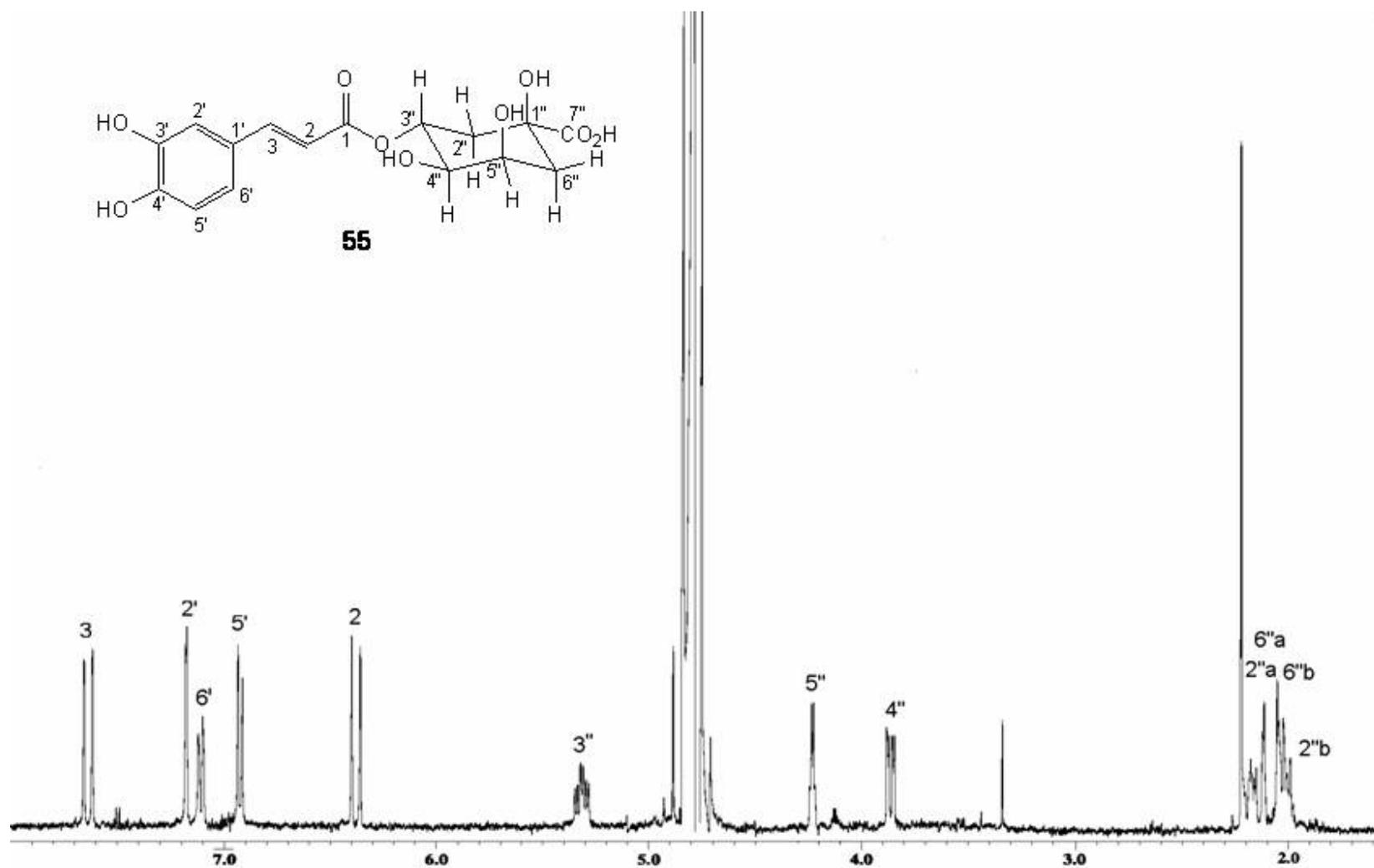


Figura 25. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz) del ácido clorogénico (**55**) en D_2O .

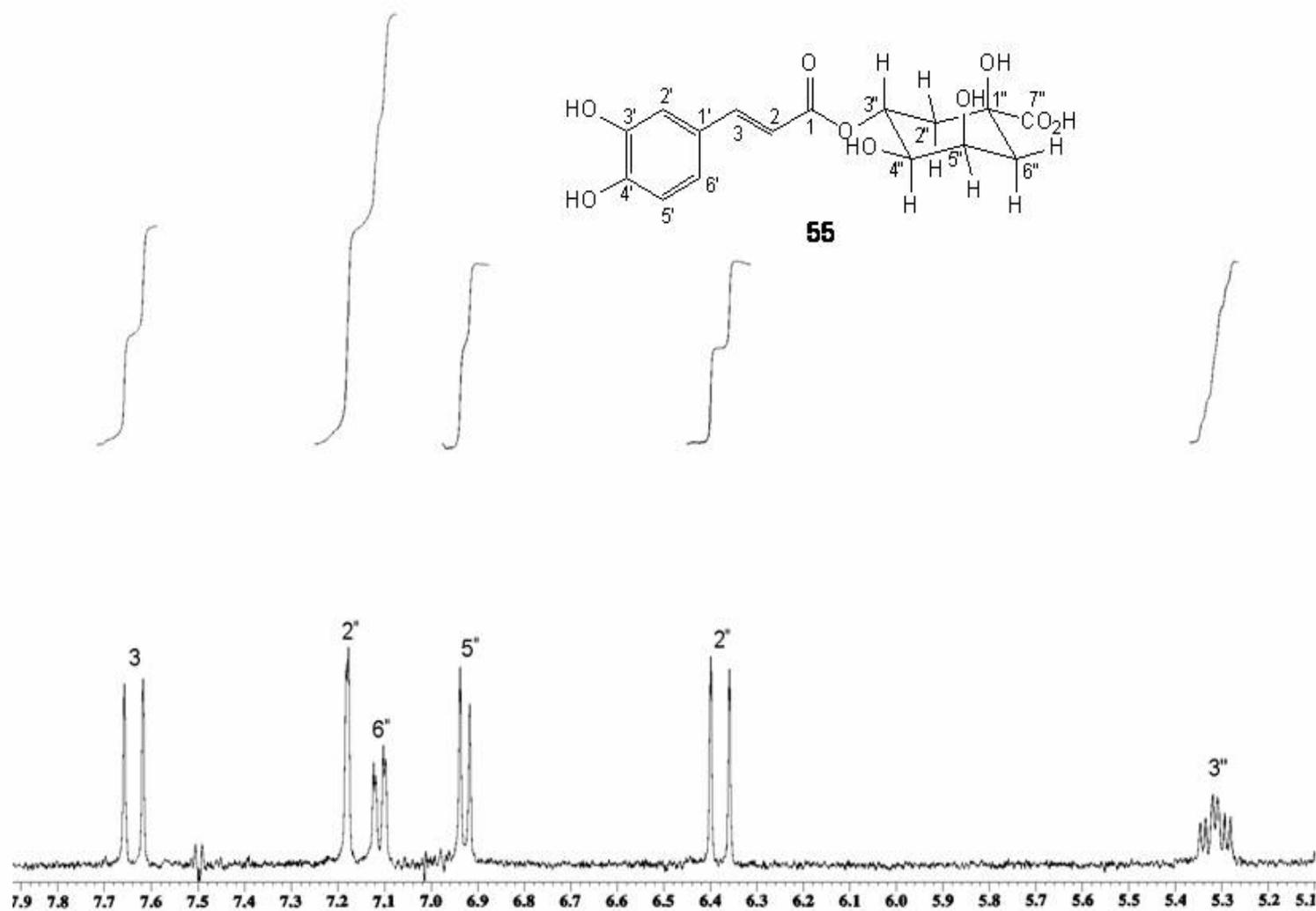


Figura 25a. Ampliación del espectro de RMN de ^1H (400 MHz) del ácido clorogénico (**55**) en D_2O .

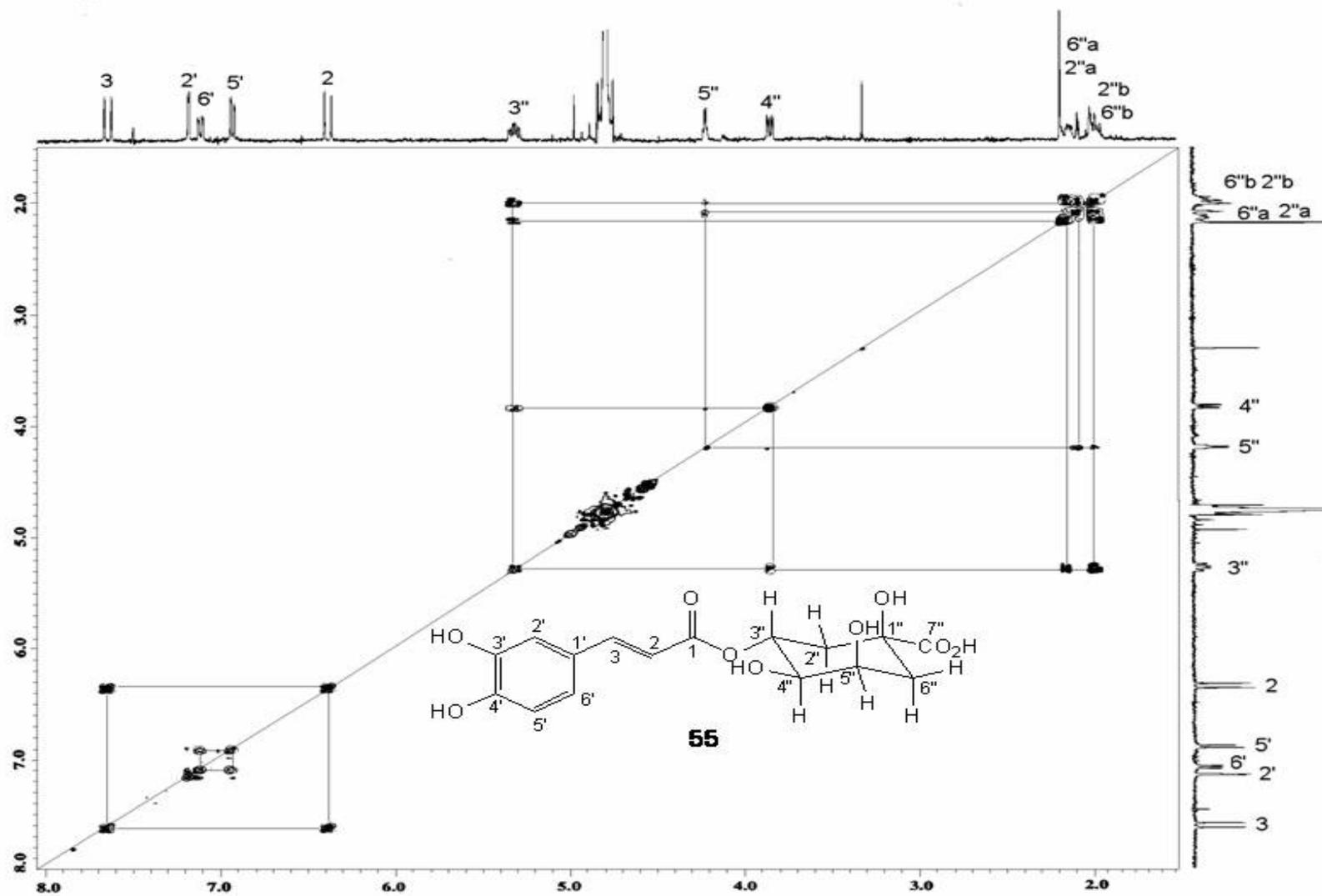
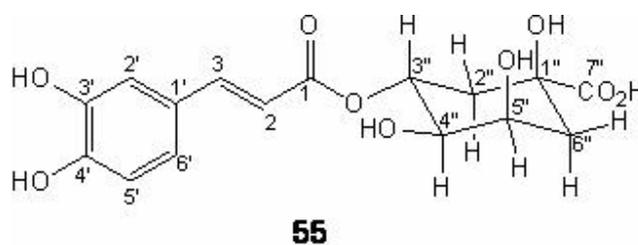


Figura 26. Diagrama del experimento COSY (400 MHz) del compuesto **55** en D₂O.

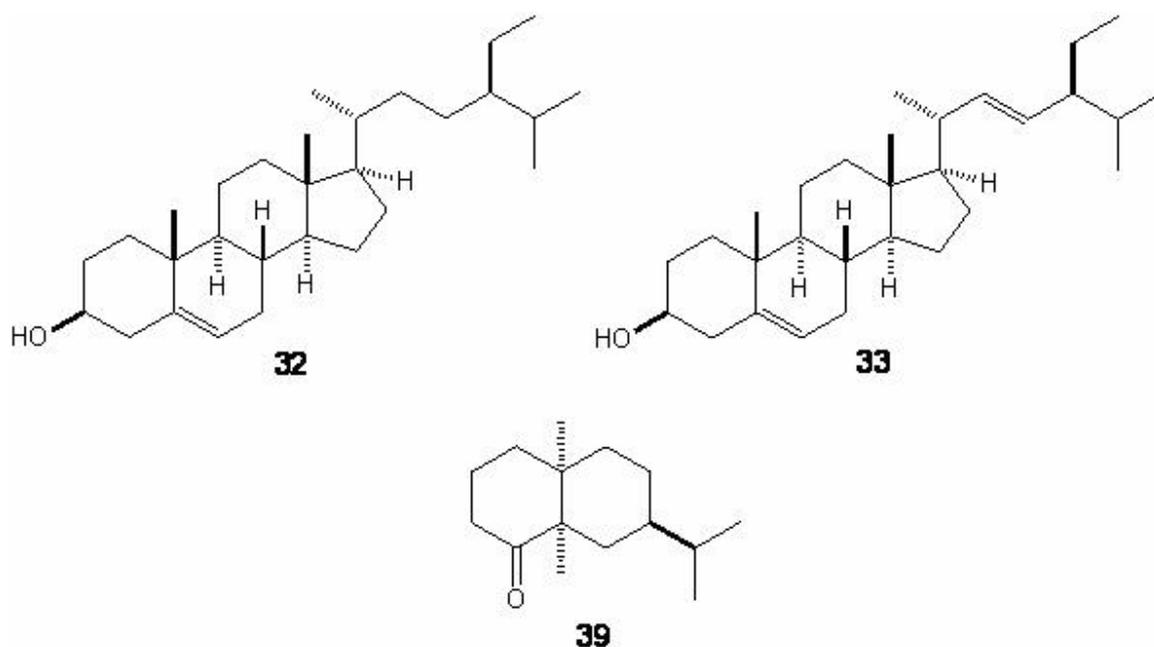
Tabla 5. Datos de RMN de ^1H (400 MHz) del ácido clorogénico (**55**), δ en ppm.

H	$\delta_{\text{H}}/\text{ppm}$ (H; <i>mult</i> ; <i>J</i> /Hz)	
	DMSO- <i>d</i> ₆	D ₂ O
2	6.22 (1H; <i>d</i> ; 15.7)	6.38 (1H; <i>d</i> ; 15.7)
3	7.44 (1H; <i>d</i> ; 15.7)	7.63 (1H; <i>d</i> ; 15.7)
2'	7.08 (1H; <i>d</i> ; 1.8)	7.18 (1H; <i>d</i> ; 1.8)
5'	6.77 (1H; <i>d</i> ; 8.4)	6.92 (1H; <i>d</i> ; 8.0)
6'	6.96 (1H; <i>dd</i> ; 8.4, 1.8)	7.11 (1H; <i>dd</i> ; 8.4, 1.8)
2''a	1.89-1.84 (1H; <i>m</i>)	2.16 (1H; <i>m</i>)
2''b	1.89-1.84 (1H; <i>m</i>)	1.90 (1H; <i>m</i>)
3''	5.16 (1H; <i>ddd</i> ; 9.9, 9.5, 5.5)	5.30 (1H; <i>ddd</i> ; 9.9, 9.9, 5.1)
4''	3.49 (1H; <i>dd</i> ; 9.5, 2.6)	3.86 (1H; <i>dd</i> ; 9.9, 3.3)
5''	3.92 (1H; <i>da</i> ; 2.6)	4.23 (1H; <i>d</i> ; 3.3)
6''a	2.00 (1H; <i>da</i> ; 11.7)	2.10 (1H; <i>m</i>)
6''b	1.68 (1H; <i>da</i> ; 11.7)	2.03 (1H; <i>m</i>)

5. CONCLUSIONES

Se llevó a cabo el estudio químico de las raíces y hojas de la *Stevia jorullensis* H. B. K.

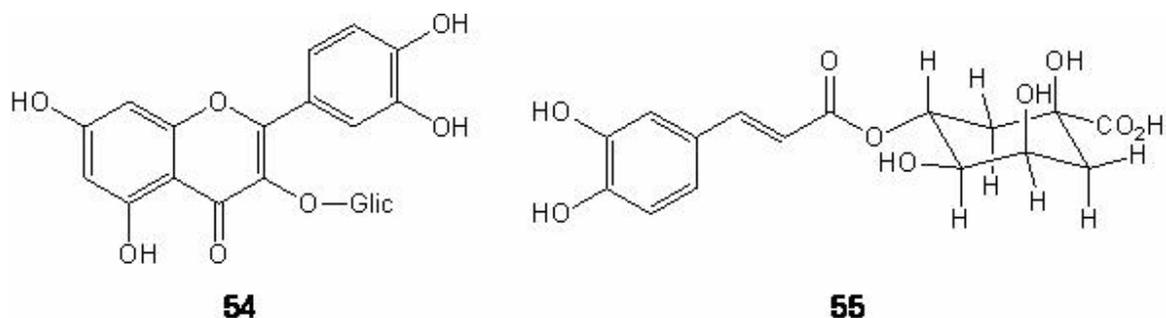
La separación cromatográfica de extracto hexánico de la raíces condujo al aislamiento y caracterizaron los esteroides β -sitosterol (**32**) y estigmasterol (**33**) y del sesquiterpeno conocido como valeranona (**39**).



Los compuestos **32** y **33** son metabolitos primarios muy comunes en los vegetales donde participan formando parte de las paredes celulares. Tienen una importante función en los humanos que lo ingieren durante el consumo de vegetales, ya que ayuda a disminuir el colesterol y son precursores de hormonas sexuales²².

La valeranonona (**39**) es un producto natural que fue aislado por vez primera de la especie *Valeriana officinalis*, la cual ha tenido uso en medicina tradicional como tranquilizante e hipnótica.²³ En un estudio reciente, **39** mostró actividad antiespasmódica. Tanto en este trabajo como en un estudio reciente de *Stevia tomentosa*, llevado a cabo por nuestro grupo de trabajo,¹⁵ este importante sesquiterpeno fue aislado con buen rendimiento (0.03%) (139 mg), es decir, se encuentra en concentraciones altas en estas especies.

Del extracto metanólico de las hojas se aislaron y caracterizaron el glicósido de quercetina (**54**) y el ácido clorogénico (**55**).



Los glicósidos de quercetina han sido encontrados en algunas especies de *Stevia*,²⁰ y su concentración oscila entre el 0.01 al 0.006% (1-40 mg) (considerando la cantidad de material vegetal) principalmente en las partes aéreas. En este trabajo se obtuvo el compuesto **54** en una porcentaje de aproximadamente 0.01 %. Es bien conocido que los glicósidos de quercetina, y la misma quercetina, presentan importante actividad antioxidante. Una sustancia antioxidante ayuda a preservar el buen funcionamiento de las células que componen un órgano o tejido, mediante la captura de radicales libres que son muy dañinos. Es decir, un compuesto antioxidante puede tener un uso potencial para el tratamiento del cáncer.²⁴

En cuanto al ácido clorogénico (**55**), si bien es cierto que es un producto natural conocido, es la primera vez que se encuentra en especies de *Stevia*. En este trabajo se aisló con un rendimiento del 0.18%, similar al obtenido de otras fuentes.²⁵ Este metabolito es muy importante dado que también presenta actividad antioxidante relevante, además de tener actividad como estimulante, expectorante, diurético, colerético y antihepatotóxico.²⁶

Con base en lo anterior, consideramos que los resultados de este trabajo contribuyen no sólo al conocimiento de los metabolitos presentes en especies del género *Stevia*, particularmente en *Stevia jorullensis*, sino también al conocimiento de sustancias útiles aisladas de fuentes naturales.

6. PARTE EXPERIMENTAL

6.1. General

Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo en gel de sílice, Merck, tamaño de partícula 0.063-0.200mm (70-230 Mesh ASTM) y 0.040-0.063 m (230-400 Mesh ASTM), en columnas de vidrio de 2.5 y 5 cm de diámetro interno, por 60 cm de largo. Las cromatografías en capa fina se hicieron en folios de gel de sílice 60 F₂₅₄, espesor de capa 0.2 mm, utilizando como revelador sulfato cérico (IV) amoniacal en una solución de H₂SO₄/H₂O (para el caso de **32**, **33** y **39**) y una solución al 1% de ácido difenilboríco β-etilamino éster (solución I) en metanol y una solución al 5% de polietilen glicol-4000 (PEG) en etanol (solución II) para el caso de **54** y **55**.

Los espectros de RMN de ¹H a 400 MHz y de ¹³C a 100 MHz, así como los experimentos HETCOR, HMBC Y COSY, se determinaron en un equipo JEOL 400 eclipse.

6.2. Colecta e identificación de la especie

Los ejemplares de *Stevia jorullensis* H. B. K. se colectaron en el mes de octubre de 2004 y 2005, en las cercanías de la localidad de Peñas Cargadas en el municipio de Mineral del Monte, Hidalgo. Se depositó un espécimen en el Herbario del Centro de Investigaciones Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (J. M. Torres Valencia 53), donde el M.C. Manuel González Ledesma identificó la planta.

6.3. Obtención De Extractos

La planta colectada se extendió y se dejó secar a las sombra. Posteriormente se dividió en sus partes aéreas (hojas, tallo y flores) y raíces. Las hojas y las raíces se molieron por separado y se obtuvieron los extractos de hexano, AcOEt y MeOH mediante reflujo por 6 horas. Los extractos se filtraron y concentraron en el rotavapor. A estos extractos excepto al de MeOH, se agregaron 250 mL de MeOH con la finalidad de precipitar las grasas. Esta solución se llevó a temperatura ambiente y posteriormente a 0° C por 12 horas con lo que se consiguió la precipitación de las grasas que se eliminaron por filtración. La solución filtrada se concentró en el rotavapor para obtener el nuevo extracto.

A continuación se muestra la relación de pesos de los extractos obtenidos a partir de 450 g de raíces (Tabla 4) y de 150 g de hojas (Tabla 5).

Tabla 6. Obtención de extractos de las raíces.

Disolvente	Extracto (g)	Rendimiento (%)
Hexano	1.9	0.42
AcOEt	1.5	0.33
MeOH	12.4	2.70

Tabla 7. Obtención de extractos de las hojas.

Disolvente	Extracto (g)	Rendimiento (%)
Hexano	2.7	1.8
AcOEt	4.3	2.6
MeOH	17.8	11.9

6.3. Aislamiento de sustancias

El extracto hexánico de las raíces, se sometió a CC usando como disolventes hexano y mezclas de hexano AcOEt en orden creciente de polaridad. La cromatografía se realizó en una columna de vidrio de 2.5 cm. de diámetro interno por 50 cm de largo, usando gel de sílice, Merck, tamaño de partícula 0.063-0.200 mm (70-230 Mesh ASTM) y colectando 109 eluatos que se juntaron de la siguiente forma:

Tabla 8. Eluatos colectados en la CC del extracto hexánico de las raíces.

Mezcla de disolvente	Eluatos colectados	Eluatos que se juntaron
Hexano	1 -30	1-41
hexano-AcOEt (9:1)	31-84	42-45 46-55 56-59 60-64 65-69 70-84
hexano-AcOEt (8:2)	85-109	85-109

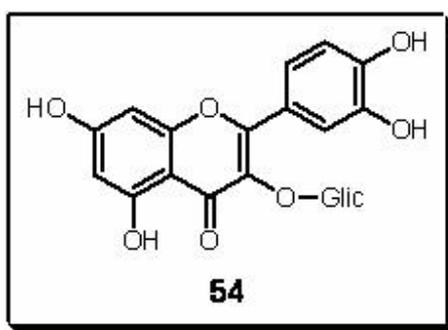
Para el caso del extracto de MeOH de las hojas, la metodología utilizada consistió en lo siguiente: el extracto (15g), se disolvió en agua y posteriormente se lavó con 20 mL de éter etílico. La fase acuosa se mezcló con una solución de *n*-BuOH saturado en agua (50 mL de *n*-BuOH con 10 mL de H₂O destilada). Posteriormente, la fase de *n*-BuOH se concentró en el rotavapor y se pesó (7.4g).

La CC de éste extracto, se realizó en gel de sílice Merck, tamaño de partícula 0.063-0.200 mm (70-230 Mesh ASTM) en una columna de vidrio de 5 cm de diámetro interno por 60 cm de largo, colenctando fracciones de 50 mL. Las mezclas utilizadas y las fracciones colectadas son las siguientes:

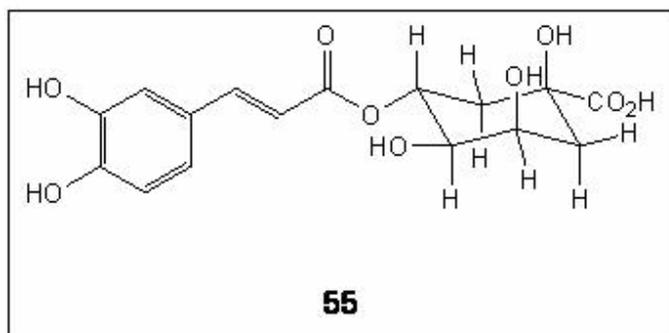
Tabla 9. Eluatos colectados en la CC del extracto de MeOH de las hojas.

Mezcla de disolventes CHCl₃ – MeOH – H₂O	Fracciones colectadas
200 : 30 : 1	A1, A2, A3, A4
50 : 50 : 1	B1, B2, B3, B4
25 : 75 : 2	C1, C2, C3, C4
100	D1, D2, D3, D4

Glicósido de quercetina (54). Las fracciones A4, B1, B2, B3 y B4 de la CC del extracto metanólico de las hojas, se juntaron y se sometieron a cromatografía en columna, usando mezclas de disolventes ($\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$). Se colectaron 89 eluatos de 5 mL. Las fracciones etiquetadas como R2 y R3 se juntaron y recromatografiaron usando como eluyentes mezclas de $\text{CHCl}_3\text{-Acetona-MeOH-H}_2\text{O}$ y colectando eluatos de 5 mL. En el eluato 8, se observó la presencia de glicósidos de flavonoides tipo quercetina (**54**) (20 mg. cristales color amarillo).²⁰



Ácido clorogénico (55). En la fracción C3 de la cromatografía del extracto metanólico de las hojas se obtuvo ácido clorogénico (**55**) (274.3 mg, un sólido café). La caracterización de esta sustancia se llevó acabo mediante comparación de sus espectroscópicos con los datos de la literatura.²¹ Los datos de RMN de ^1H 3. RMN de ^{13}C (100 MHz), $\text{DMSO-}d_6$, δ en ppm: (C-1) δ :166.87, (C-2) δ : 115.09, (C-3) δ :145.28, (C-1') δ :126.05, (C-2') δ :115.37, (C-3') δ :146.34, (C-4') δ :149.13, (C-5'9) δ : 116.39, (C-6') δ : 121.77, (C-1'') δ : 72.00, (C-2'') δ :73.46, (C-3'') δ : 71.50, (C-4'') δ : 39.84, (C-5'') δ :75.77, (C-6'') δ :40.05, (C-7'') δ :177.13



BIBLIOGRAFÍA

-
- ¹ http://www.ops.org.ni/Reportajes/Reportaje_3.htm
- ² Villavicencio Miguel Ángel, Pérez Escandón Blanca Estela. Plantas Útiles del Estado de Hidalgo, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México, **1995**
- ³ Lara Ochoa Francisco, Márquez Alonso Carmen, Plantas medicinales de México. Composición, usos y actividad biológica. **1996**.
- ⁴ S. Kemp Daniel, Vellaccio Frank. Química Orgánica, Ediciones Omega, S. A., Barcelona, **1986**.
- ⁵ Chessi Edmund. El mundo de las plantas peligrosas. Series en Iberlibro. Barcelona: Ultramar, **1998**.
- ⁶ Kuklinski, Claudia. Farmacognosia. España. Omega, **2000**.
- ⁷ Evans, W.C. Farmacognosia. 13ª Edición. Editorial Interamericana-McGraw Hill. México, D.F. **1991**.
- ⁸ Cerda-García-Rojas C.M. y Pereda-Miranda R. The Phytochemistry of *Stevia*: a general survey, in *Stevia*, The genus *Stevia*. Edited By A. Douglas Kinghorn, University of Illinois at Chicago, Taylor & Francis Inc. New York, USA, **2002**, pp.86-118.
- ⁹ Hernández, L.R., Catalán C. A. N. & Joseph-Ntahan P. La química del género *Stevia* (Asteraceae). Rev. Acad. Colomb. Cienc. Vol.22, No. 83: 239-279. **1998**.
- ¹⁰ Díaz, J.L. índice y Sinonimia de las Plantas Medicinales de México. IMEPLAM, A.C. México, D.F. **1976**

- ¹¹ Martínez, M. Las Plantas Medicinales de México. 6ª Edición. Ediciones Botas. México, D. F. **1996**.
- ¹² Sánchez-Arreola, E. Estudio Químico de *Stevia serrata*, *Stevia porphyrea* y *Stevia connata*. Tesis doctoral. Departamento de química, CINVESTAV-IPN. México, D.F. **1996**
- ¹³ Cerda-García-Rojas C.M., Pereda-Miranda R. Medicinal and Aromaticas Plants-Industrial Profiles, vol. 19; KJinghorn A.D. ed.; Taylor & Francis: London, 2002, cap. 5, pp 86-118.Sánchez-Arreola, E.
- ¹⁴ Romero, M. L. Estudio químico de las raíces de *Stevia eupatoria* (Spreng) Will. Tesis. Centro de Investigaciones Químicas, UAEH. Pachuca, Hgo. **2003**.
- ¹⁵ López O. A. Triterpenos y sesquiterpenos aislados de raíces de *Stevia tomentosa* H. B. K. Tesis. Centro de Investigaciones Químicas, UAEH. Pachuca, Hgo. **2004**.
- ¹⁶ Moreno-Moreno I. Estudio químico de las raíces de *Stevia pilosa* Lag. Trabajo de Investigación, Centro de Investigaciones Químicas, UAEH. Pachuca, Hgo. **2002**.
- ¹⁷ González, H.M.Y. Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos de cuatro plantas del género *Stevia* y cuatro plantas del género *Mimosa*. Tesis. Centro de Investigaciones Químicas. UAEH. Pachuca, Hgo. **2004**.
- ¹⁸ Macias, P. J.C. Estudio químico de las raíces de *Stevia jorullensis* H.B.K. Tesis. Centro de Investigaciones Químicas, UAEH. Pachuca, Hgo. **2004**.

¹⁹ J. Martín Torres-Valencia, Myriam Meléndez-Rodriguez, Rocío Álvarez-García, Carlos M. Cerda-García-Rojas y Pedro Joseph-Nathan. *Mang. Reson. Chem.* **2004**, 42, 898-902.

²⁰ A. Rajbhandari and M. F. Roberts, *J. Nat. Prod.* **1984**, 47,3, 559.

²¹ A. Kumaran and R. Joel Karunakaran. *Food Chemistry.* **2006**, 100, 1, 356-361.

²² <http://www.zumoni.com/zumo-noni/Propiedades.html>

²³ http://www.biotech.com.ve/consumo/pages/nat_fichaprod.asp?d=137

²⁴ http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol7_4_02/san11402.htm

²⁵ A.C. Hulme, *Biochem J.* 1953, 53,337.340

²⁶ <http://www.webcolombia.com/plantscurativas/Cafe.htm>