



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**Estudio Químico del Extracto de Diclorometano de las
Flores de *Stevia dictyophylla* B. L. Rob.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACOBIOLOGA**

PRESENTA

MELISSA GISELLE HERNÁNDEZ MENDOZA

DIRECTORAS

D.C. ROSA ELVA NORMA DEL RÍO TORRES

D.C. CONCEPCIÓN ARMENTA SALINAS

MORELIA, MICHOACÁN

JULIO 2023

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres, Martha Eugenia Mendoza Mendoza y J. Jesús Hernández Barragán, por siempre apoyarme, motivarme e impulsarme en mi formación profesional.

A mis hermanas, Leslie Janette Hernández Mendoza y Michelle Alessandra Hernández Mendoza, por su constante apoyo y compañía en todo momento.

A mi familia por su cariño, apoyo y comprensión.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesoras:

A mi asesora de tesis D.C. Rosa Elva Norma del Río Torres, por haberme brindado la oportunidad de formar parte de su equipo de investigación, por guiarme en mi formación científica y académica, por su apoyo incondicional, y, sobre todo, por siempre motivarme a dar el máximo con la mejor actitud en este mundo de la Investigación.

A mi co-asesora de tesis D.C. Concepción Armenta Salinas, por brindarme su confianza desde el primer día que llegué al laboratorio, por su paciencia, por resolver mis dudas en todo momento, sus recomendaciones, su disposición y el tiempo invertido en la revisión de este proyecto. La estimo mucho Dra. Conny.

Agradezco a mi comité tutorial integrado por: D.Q. Mario Armando Gómez Hurtado, D.C. Armando Talavera Alemán, D.C. Laura Hernández Padilla, D.C. Sandra Guadalupe Sánchez Ceja y la M.C. Cintia Aire Rincón Hernández, por sus valiosas aportaciones y correcciones a este proyecto.

De la misma forma quiero agradecer a la D.C. Concepción Armenta Salinas por la determinación de los espectros de RMN de 400 MHz y 100 MHz.

Al Dr. Jerzy Rzedowski, del Instituto de Ecología A.C. Pátzcuaro, Mich., por la autenticación de la planta.

A la profesora Norma Patricia Reyes Martínez por la determinación taxonómica de la especie.

A mi tía, Q. F. B. Angelina Hernández Barragán del Cinvestav, por sus valiosos consejos y aportaciones en la realización de este proyecto, por motivarme a seguir adelante en el ámbito de la investigación, por todas las bonitas experiencias y por permitirme conocer a su gran grupo de trabajo, gracias por siempre creer en mí.

A Diana Laura Contreras Reyes, por tu valiosa amistad y acompañamiento durante estos 5 años de carrera, por la confianza que me has dado, agradezco todos los momentos que pasamos juntas, así como las anécdotas de cada semestre, eres una gran amiga. #Teamsmart

A Jessica Nohemí Cervantes García, por ofrecerme esta bella amistad desde nuestros primeros días en la Ciudad, por escucharme y aconsejarme, una amiga como tú no se encuentra dos veces en la vida, gracias por hacer cada momento especial.

A María Guadalupe Lira Jerónimo, por contagiarme siempre de su alegría, te agradezco por siempre estar, por todos los buenos momentos, sé que puedo contar contigo, que nuestra amistad perdure por siempre.

A Adan Pantoja Jr. Por estar presente en mi vida, y por ser quien me motiva a ser mejor persona día con día, por todos los momentos que hemos compartido, y por tu apoyo incondicional.

Agradezco de forma especial a Sinuhé, Ponti, Irving, Jose Carlos, Laura, Dalia, y Esaú por haberse tomado el tiempo de explicarme, confiar en mí y ayudarme en todo momento, por su valiosa amistad y consejos de vida que me han brindado.

A mis amigos y compañeros del IIQB, Rosario, Lizza, Rodrigo, Hilda, Leo, Axel, Nancy, Julio, Brayan, Héctor, Karen Derek, Isaías, Maritsa, Jacob, Anahí, y Karla Cetz, gracias por su amistad y por los buenos momentos compartidos.

Al Team Rosy: Ode, Sinu, Gaby, Dalia, Eva, Toño, Monse, Esaú, Irving, Gude, Mitzy, Carlos, Michele, Ponti, Alonso, David, Dani y Adan. En cada uno de ustedes encontré una gran amistad, gracias por hacerme parte de su grupo de trabajo, y por hacer del laboratorio algo mucho más agradable e inolvidable.

También quiero agradecer a mis roomies Andy, Ale, Fran, Naye, Sofi, y Dany, por su apreciada amistad, por todas las risas y los buenos momentos compartidos.

A mis amigos César, Mike, Jorge, Roby, Caro, Gabriel, Yaky, Willi, y Ángel, por brindarme su amistad, por creer en mí y motivarme día con día, siempre con una actitud positiva.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Química de Productos Naturales del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la asesoría de la D.C. Rosa Elva Norma del Río Torres y la D.C. Concepción Armenta Salinas, con apoyo económico de la CIC-UMSNH.

Un resumen de este trabajo se presentó en la 18ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales “Dr. Carlos M. Cerda-García-Rojas”, realizado del 24 al 27 de mayo de 2023 en Morelia, Michoacán. Hernández-Mendoza, M. G., Armenta-Salinas, C., Rodríguez-García, G., Gómez-Hurtado, M. A., Cerda-García-Rojas, C. M., & Del Río, R. E. *Rev. Mex. Inv. Prod. Nat.* 1 (*Supl, Especial*), Resumen 28, p. 66. (2023).

Este trabajo se presentó en el Congreso de la 18ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales “Dr. Carlos M. Cerda-García-Rojas”, realizado del 24 al 27 de mayo de 2023 en Morelia, Michoacán. Hernández-Mendoza, M. G., Armenta-Salinas, C., Rodríguez-García, G., Gómez-Hurtado, M. A., Cerda-García-Rojas, C. M., & Del Río, R. E. *Rev. Mex. Inv. Prod. Nat.* 1 (*Supl, Especial*), EB28, p. 66. (2023).

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	III
ÍNDICE DE TABLAS	IV
RESUMEN DE ESTRUCTURAS	V
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	VIII
RESUMEN	X
ABSTRACT.....	XI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Productos Naturales.	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Familia Asteraceae.....	4
2.2. Género <i>Stevia</i>	6
2.3. Componentes Químicos de <i>Stevia</i>	7
2.4. <i>Stevia dictyophylla</i> B. L. Rob.	14
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. OBJETIVOS.....	17
4.1. Objetivo General.....	17
4.2. Objetivos Específicos.....	17
5. PARTE EXPERIMENTAL.....	18

5.1.	Generalidades.....	18
5.2.	Material Vegetal.....	18
5.3.	Obtención del extracto	19
5.4.	Separación Cromatográfica.....	19
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
6.1.	Purificación de compuestos	22
6.1.1.	Derivado de Labdano	22
6.1.2.	Derivado de Clerodano.....	29
7.	CONCLUSIÓN.....	36
8.	BIBLIOGRAFÍA.....	37

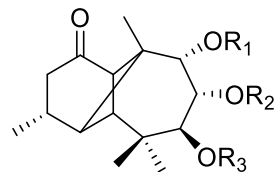
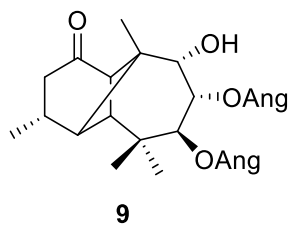
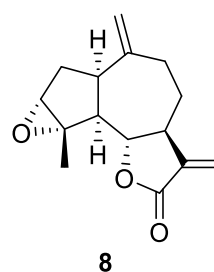
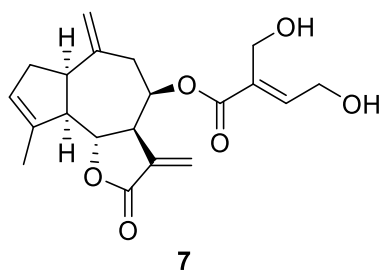
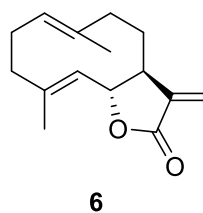
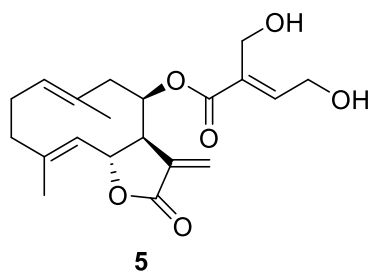
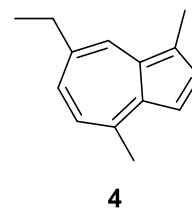
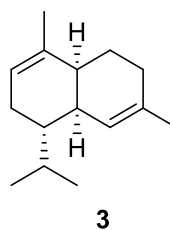
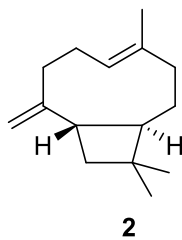
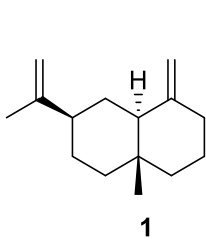
ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Biosíntesis de Terpenos.....	3
Figura 4. Componentes activos con esqueleto de germacreno.	8
Figura 5. Componentes químicos con esqueleto de guaiano.	9
Figura 6. Derivados de longipinano.....	9
Figura 7. Derivados de acetofenona, benzofurano y cromeno de <i>Stevia</i>	10
Figura 8. Flavonoides aislados de <i>Stevia</i>	10
Figura 9. Glucósido derivado del <i>ent</i> -kaurano aislado de algunas especies de <i>Stevia</i>	11
Figura 10. Componentes químicos con esqueleto de labdano aislados de <i>Stevia</i>	12
Figura 11. Diterpeno tipo grindelano aislado de <i>S. subpubescens</i> Lag.	12
Figura 12. Diterpenos de tipo clerodano aislados de <i>Stevia</i>	13
Figura 13. <i>Stevia dictyophylla</i> B. L. Rob.....	14
Figura 14. Distribución de <i>Stevia dictyophylla</i> en México.....	15
Figura 15. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del $9\alpha,13\alpha$ -epoxi-14-labden-18,6 β -diol (22).	23
Figura 16. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 del $9\alpha,13\alpha$ -epoxi-14-labden-18,6 β -diol (22).	24
Figura 17. Fórmulas de grindelano y <i>ent</i> -grindelano.....	28
Figura 18. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del $3\beta,4\beta$ -epoxi- <i>cis</i> -13-cleroden-15,16-ólida (25).....	31
Figura 19. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 del $3\beta,4\beta$ -epoxi- <i>cis</i> -13-cleroden-15,16-ólida (25).....	32

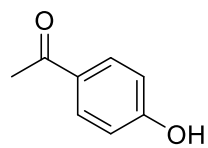
ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de los desplazamientos químicos del derivado 22 , RMN de ^1H a 400 MHz.....	25
Tabla 2. Comparación de los desplazamientos químicos del derivado 22 , RMN de ^{13}C a 100 MHz.....	26
Tabla 3. Comparación de los desplazamientos químicos del derivado 25 , RMN de ^1H a 400 MHz.....	33
Tabla 4. Comparación de los desplazamientos químicos del derivado 25 , RMN de ^{13}C a 100 MHz.....	34

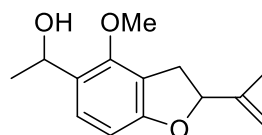
RESUMEN DE ESTRUCTURAS



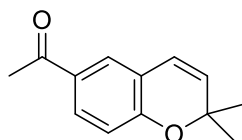
10: $R_1 = R_3 = \text{Ang}$; $R_2 = \text{H}$
11: $R_1 = R_2 = \text{Ang}$; $R_3 = \text{OH}$
12: $R_1 = R_3 = \text{Ang}$; $R_2 = \text{Ac}$



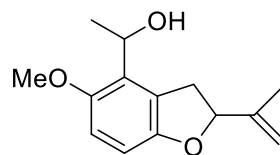
13



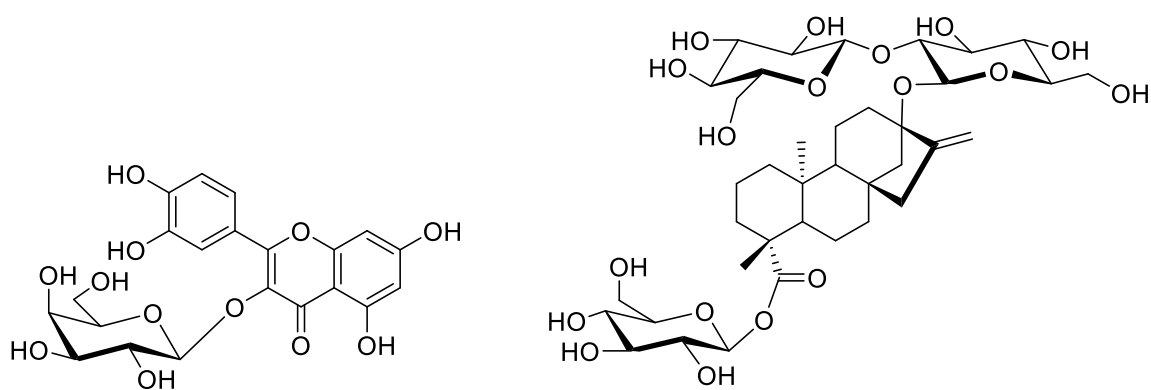
14



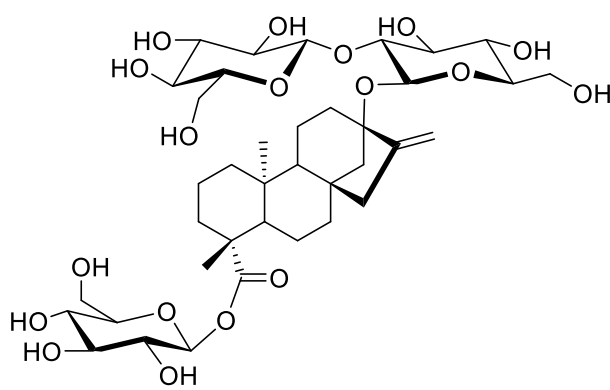
15



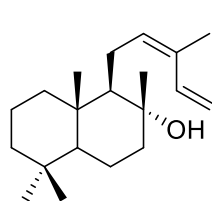
16



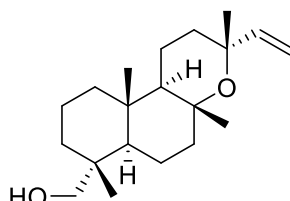
17



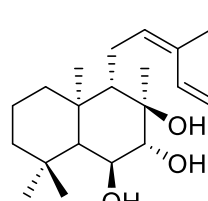
18



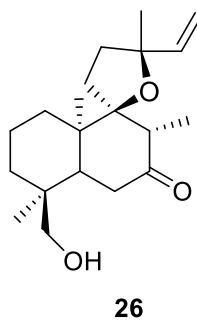
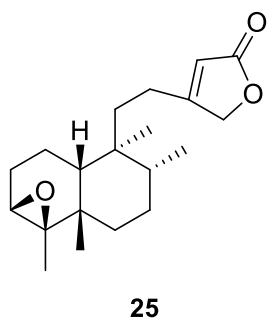
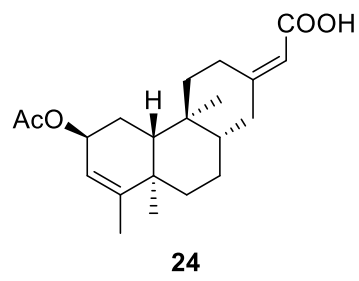
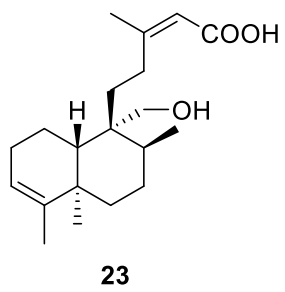
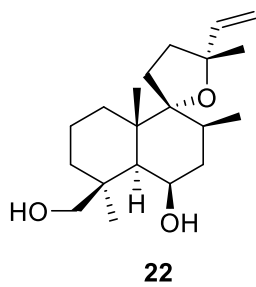
19



20



21



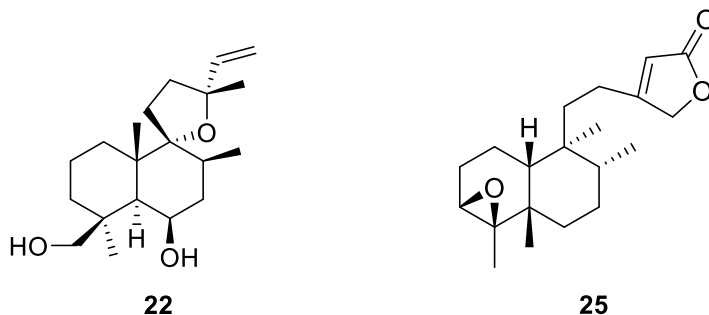
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Ac	Grupo Acetilo
AcOEt	Acetato de Etilo
Ang	Grupo Angeloílo
cm	Centímetro
d	Doble
dd	Doble de dobles
DMAPP	Pirofosfato de dimetilalilo
g	Gramo
GGPP	Geranil-Geraniol pirofosfato
Hz	Hertz
IPP	Isopentenil difosfato
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
m	Múltiple
Meacr	Grupo Metacriloílo
MEP	Ruta del Metileritritol Fosfato
MHz	MegaHertz
mg	Miligramos
mL	Mililitros
MVA	Ruta del Ácido Mevalónico

N	Latitud
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN de ^{13}C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN de ^1H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
s	Simple
Sen	Grupo Senecioílo
t	Triple
Tigl	Grupo Tigloílo
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
W	Longitud
δ	Desplazamiento químico en ppm
1D	Una dimensión
2D	Dos dimensiones

RESUMEN

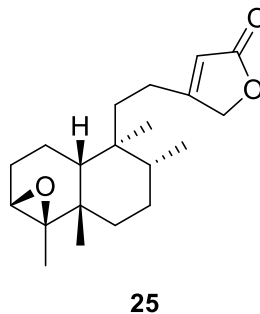
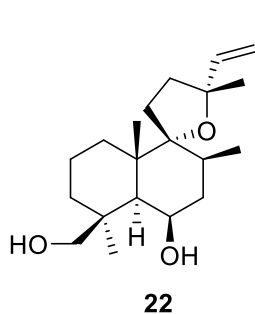
En el presente trabajo se describe el primer estudio químico a partir del extracto de diclorometano de las flores de *Stevia dictyophylla* B. L. Rob, una especie perteneciente a la extensa familia Asteraceae, el cual comprendió una revisión bibliográfica sobre los estudios químicos y biológicos de las especies de este género, así como la metodología llevada a cabo para la obtención de dicho extracto. Esto condujo al aislamiento e identificación de dos diterpenos como compuestos mayoritarios, el $9\alpha,13\alpha$ -epoxi-14-labden-18,6 β -diol (**22**), y el $3\beta,4\beta$ -epoxi-*cis*-13-cleroden-15,16-ólida (**25**), ambos caracterizados mediante espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de 1D y 2D, y por comparación con los datos reportados en la literatura.



Palabras Clave: Estudio Químico, Diterpenos, *Stevia dictyophylla*.

ABSTRACT

In the present work, the first chemical study from the dichloromethane extract of the flowers of *Stevia dictyophylla* B. L. Rob, a species belonging to the extensive family Asteraceae, is described, which included a bibliographic review of chemical and biological studies of the species in this genus, as well as the methodology carried out to obtain the said extract. This led to the isolation and identification of two diterpenes as major compounds, 9 α ,13 α -epoxy-14-labden-18,6 β -diol (**22**), and the 3 β ,4 β -epoxy-*cis*-13-cleroden-15,16-olide (**25**), both characterized by 1D and 2D Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy, and by comparison with the data reported in the literature.



Keywords: Chemical Study, Diterpenes, *Stevia dictyophylla*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Productos Naturales.

Los productos naturales son todos aquellos compuestos de origen orgánico e inorgánico encontrados en la naturaleza y que puedan ser procesados por el hombre. De acuerdo con las investigaciones basadas en la química orgánica moderna, son considerados productos naturales aquellos agentes provenientes de plantas, hongos, bacterias y organismos marinos, los cuales llevan a cabo dos tipos de procesos, el metabolismo primario y secundario. El metabolismo primario es aquel donde los organismos sintetizan y convierten sustancias esenciales para la vida celular y la planta en general a partir de compuestos simples como CO₂, N₂, H₂O y algunos metales, los cuales son transformados en polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos. Este proceso lo efectúan todos los organismos (Dhaniaputri *et al.*, 2022).

En cuanto a los metabolitos secundarios, estos desempeñan diversas funciones clave en el desarrollo de las plantas como por ejemplo en la supervivencia, proporcionando sustancias de defensa, atracción de insectos polinizadores u otros compuestos fisiológicamente importantes. De acuerdo con varios estudios, los metabolitos secundarios protegen a las plantas de la ingestión por herbívoros y de la infección por patógenos microbianos, sirven como atrayentes de polinizadores y dispersadores de semillas, como agentes en la competencia planta-planta (alelopatía), así como de protección contra el efecto de la radiación UV (Erb & Kliebenstein, 2020).

El estudio de los metabolitos secundarios fue iniciado por químicos orgánicos del siglo XIX y de principios del siglo XX, denominándose “Productos Naturales” de acuerdo con los productos formados según el tipo de especie (Taiz & Zeiger, 2006). Pueden ser excretados dentro

de las células, en vacuolas, o de forma extracelular como resinas o material de pared celular (Pang *et al.*, 2021).

Los compuestos que forman parte de este metabolismo se clasifican en tres grupos principales: alcaloides, terpenoides, y fenoles (Erb & Kliebenstein, 2020). Los terpenos, también denominados isoprenoides o terpenoides, son los productos naturales más abundantes, son derivados del isopentenil difosfato (IPP) o de su isómero de doble enlace pirofosfato de dimetilalilo, conocido como DMAPP, ambas moléculas son unidades básicas de 5 átomos de carbono (Kitaoka *et al.*, 2015).

Anteriormente se creía que la única ruta de síntesis del IPP era la vía del mevalonato o ruta del Ácido Mevalónico (MVA), a partir del Acetil-CoA; sin embargo, actualmente se reconoce a la ruta del metileritritol fosfato (MEP), a partir del piruvato y gliceraldehído-3-fosfato (**Figura 1**). El nombre de isopreno fue atribuido ya que estos compuestos se descomponen a altas temperaturas y producen isopreno (Dhaniaputri *et al.*, 2022).

Los terpenos son involucrados en diferentes funciones en plantas, como por ejemplo en la regulación del crecimiento y desarrollo (fitohormonas), en pigmentos fotosintéticos (carotenos), transporte de los electrones en la fosforilación oxidativa y en la fotofosforilación (ubiquinona y plastoquinona), vitaminas liposolubles, como son la D (colecalfiferol) y la K, aceites esenciales, en la glicosilación de proteínas (dolicol) o como elementos estructurales y funcionales de la membrana celular (fitoesteroles) (Tholl, 2015).

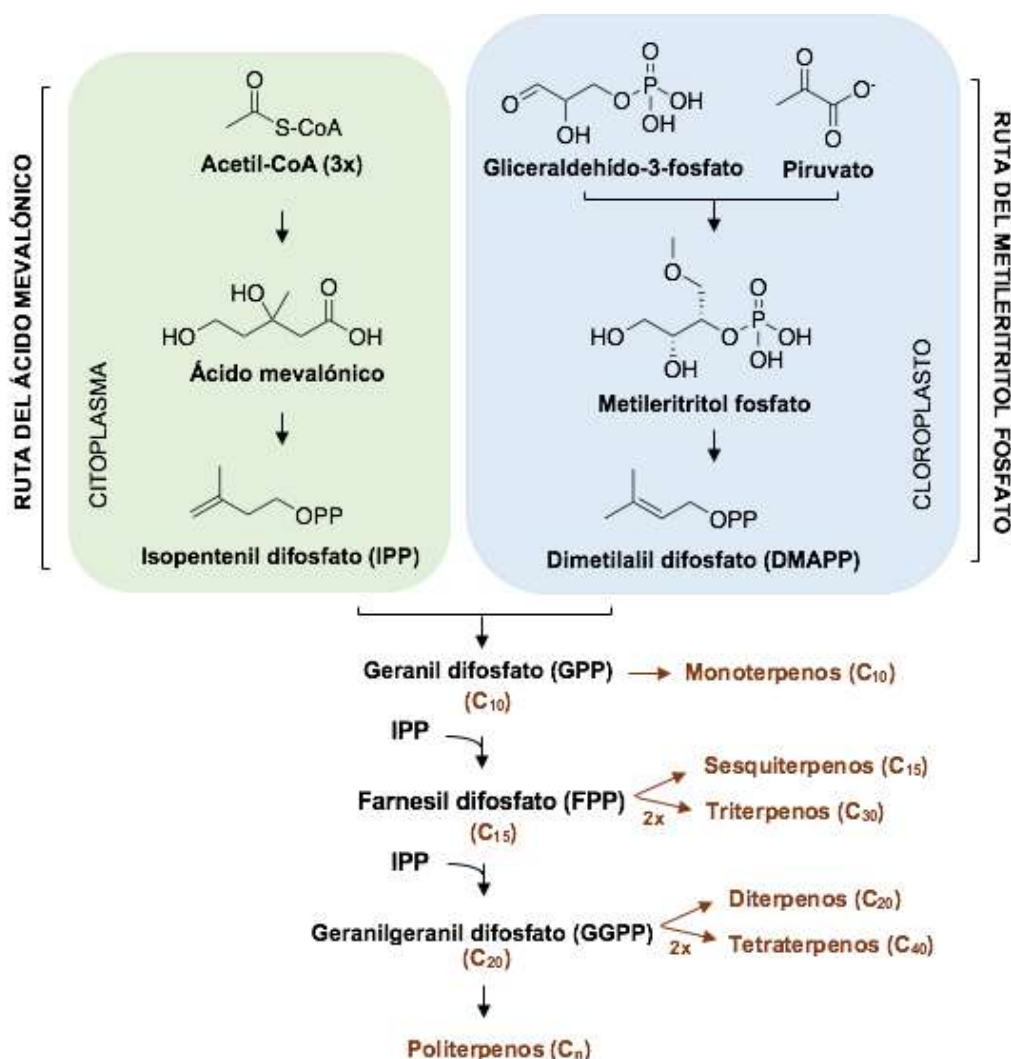


Figura 1. Biosíntesis de Terpenos. Modificado de Ávalos-García y Pérez-Urria, 2009.

Los terpenos han sido requeridos en la industria farmacéutica, agroalimentaria, cosmética y química debido a su gran diversidad en estructura y función. Su importancia en la medicina radica en las propiedades biológicas que se han atribuido, las cuales son su actividad antioxidante, antiinfecciosa, antirreumática, antipirética, antitumoral, antiinflamatoria y antibacteriana (Masyita *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2020).

2. ANTECEDENTES

2.1. Familia Asteraceae

La familia Asteraceae o Compositae, a menudo conocida como la familia del girasol, es una de las familias más grandes de plantas con flores en la división Magnoliophyta comprende 23,314 especies, distribuidas en 2,854 géneros, 297 familias y 73 órdenes, distribuidas sobre los 5 continentes a excepción de la Antártida, dado que sus miembros han sido extraordinariamente exitosos en la adaptación a los distintos hábitats. Algunos autores mencionan la presencia de 32,000 especies de la familia Asteraceae (Devkota, 2022). De acuerdo con el número de especies, México ocupa el cuarto lugar a nivel mundial (Villaseñor, 2016).

Está ampliamente distribuida en todo el mundo en una variedad de hábitats ecológicos, mostrando mayor diversidad en áreas montañosas que en regiones semiáridas o desérticas. Se encuentran en hábitats forestales, pastizales de gran altitud e incluso espacios verdes urbanos, pero son mucho menos comunes en áreas tropicales (Bohm & Stuessy, 2001).

Actualmente, existen alrededor de 417 géneros y 3,113 especies presentes en México, de las cuales 3,050 son especies nativas, y 1,988 (63.9%) son endémicas en el territorio nacional. Entre los géneros más representativos tanto por su número de especies como por su componente endémico son *Ageratina* (164 y 135, respectivamente), *Verbesina* (164, 138) y *Stevia* (116, 95). Los estados con mayor número de especies son Oaxaca (1,040), Jalisco (956), Durango (909), Guerrero (855) y Michoacán (837) (Villaseñor, 2018).

Las especies de esta familia se caracterizan por ser herbáceas, anuales o perennes, rara vez son arbustos o árboles. Poseen inflorescencias primarias conformadas por una cabezuela

pseudántica. Sus frutos tienen forma de aquenio, donde en la parte superior se encuentra un vilano, un conjunto de filamentos o pelos simples que aparece en la etapa de maduración de las flores, producto de la modificación del cáliz. Sus raíces son fibrosas, los tallos son usualmente rígidos, en algunas ocasiones ascendentes con rizomas aterciopelados. Habitualmente, sus hojas son alternas u opuestas, pecioladas, raramente estipuladas y sésiles (Del Vitto & Petenatti, 2009).

Con base a la importancia que ha adquirido esta familia en la medicina tradicional se han llevado a cabo diversos estudios atribuidos a los constituyentes activos o metabolitos secundarios, incluidos compuestos de tipo inulina, aceites esenciales, lignanos, saponinas, compuestos polifenólicos, ácidos fenólicos, esteroides, polisacáridos y diterpenos (Rolnik & Olas, 2021).

2.2. Género *Stevia*

El género *Stevia* pertenece a la familia Asteraceae, dentro de la tribu Eupatorieae, subfamilia Asteroideae. El número de especies dentro del género se estima en 230. México y América del Sur se caracterizan por tierras altas donde crecen las especies de *Stevia* (Soejarto, 2002).

La mayoría de las especies de *Stevia* se encuentran en países como Perú, Bolivia, sur de Brasil, Paraguay y norte de Argentina, siendo aproximadamente 120. Existen más de 80 especies en América del Norte, de las cuales 70 son nativas de México. Los registros indican que el género no está presente en las Bahamas, las Antillas o Amazonía.

Los miembros de *Stevia* se encuentran principalmente a altitudes entre 500 y 3500 msnm. Generalmente crecen en una amplia gama de entornos, sus hábitats van desde praderas, pastizales, matorrales, laderas de montañas boscosas, bosques de coníferas y vegetación subalpina, aunque con mayor frecuencia habitan en terrenos montañosos semiáridos (Borgo *et al.*, 2021).

En cuanto a su aspecto morfológico, es diverso, se conforma por hierbas o arbustos anuales o perennes, en su mayoría erectos, con hojas simples, opuestas, raramente alternas, pecioladas, pero exstipuladas, penninervadas o reticuladamente nervadas. Las inflorescencias son capítulos dispuestos en corimbos, panículas o tirseiformes sobre las puntas de las ramas o el tallo, el conjunto de flores está rodeado por fuera por 5 (raramente 6) brácteas que constituyen el involucre. *Stevia* es un género complejo debido a su elevado número de especies, su amplia distribución geográfica y la variabilidad de los caracteres morfológicos. Una forma de desenredar la taxonomía del género es su tratamiento por zonas biogeográficas (Rodríguez-Craverro *et al.*, 2019).

2.3. Componentes Químicos de *Stevia*

La composición química de *Stevia* es muy variada, donde los principales metabolitos secundarios son: lactonas sesquiterpénicas, kaurenos, triterpenos, y en algunas especies, la presencia de diversos flavonoides. En menor proporción se han aislado labdanos, clerodanos, bisabolanos, por mencionar algunos (Borgo *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2011; Cerda-García-Rojas y Pereda-Miranda, 2002). Además, se han reportado derivados de longipineno (Guerra-Ramírez *et al.*, 1998).

Con base a lo anterior, se han realizado estudios en hojas y flores de plantas de este género para obtener metabolitos tales como aceites esenciales y otros constituyentes volátiles, por ejemplo, del aceite esencial de *S. achalensis* Hieronymus se han identificado compuestos de tipo sesquiterpeno como β -selineno (**1**), β -cariofileno (**2**) y α -muuroleno (**3**) (**Figura 2**) (Zygadlo *et al.*, 1997).

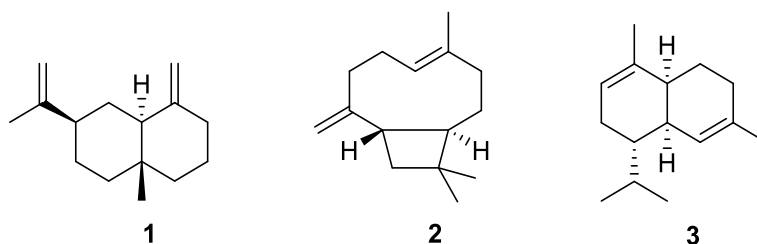


Figura 2. Aceites esenciales aislados de *Stevia achalensis* Hieronymus.

Los sesquiterpenos, compuestos de 15 átomos de carbono, son los componentes mayoritarios encontrados en las partes aéreas y raíces del género *Stevia*, destacan los grupos como germacrenos, guaianos, longipinanos, eudesmanos, eremofilanos (Chadwick *et al.*, 2013; Chacón-Morales *et al.*, 2021).

En adición a estos estudios, del aceite esencial obtenido de las partes aéreas de *S. serrata* Cav. se ha identificado el Chamazuleno (**4**), en buenos rendimientos (60.1%) y con actividad antinociceptiva (**Figura 3**) (Cordeiro *et al.*, 2020; Román *et al.*, 1990).

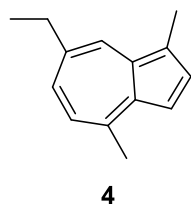


Figura 3. Componente principal aislado del aceite esencial de *Stevia serrata* Cav.

Los sesquiterpenos muestran actividad biológica, como es el caso de la Eupatoriopirina (**5**), aislada de los extractos orgánicos de *S. sarensis*, *S. procumbens*, *S. alpina* var. *glutinosa* y *S. maimarensis*, con actividad antiparasitaria contra los epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* (IC_{50} = 2.3 μ g/mL y 7.2 μ g/mL, respectivamente) (Elsó *et al.*, 2020; Hernández *et al.*, 1999). Así como la Costunólida (**6**), un componente activo encontrado en las partes aéreas de *S. yacomensis* y *S. chamaedrys*, *S. mercedensis*, *S. lemmonia* y *S. sanguínea* (**Figura 4**) (Zdero *et al.*, 1988; Bohlmann *et al.*, 1986; De Hernández *et al.*, 1997).

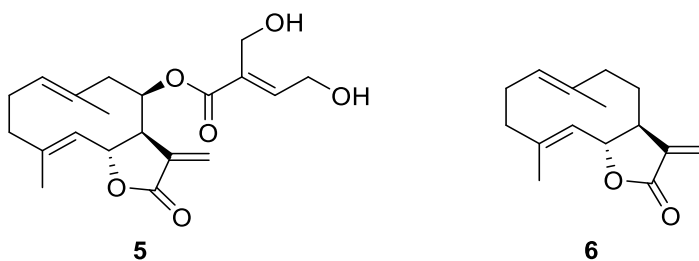


Figura 4. Componentes activos con esqueleto de germacreno.

De acuerdo con lo descrito en la literatura, se ha reportado en las partes aéreas de *S. satureiaefolia*, *S. procumbens*, *S. setifera*, *S. gilliesii* var. *gilliesii* y *S. sarensis*, la presencia de un

derivado guaianólido con buenos rendimientos, la Eupahaconenina B (**7**) (Hernández *et al.*, 1995; Sosa *et al.*, 1984; Sosa *et al.*, 1985). Así como la estafietina (**8**), obtenida de *S. alpina* (Figura 5) (Sülsen *et al.*, 2019).

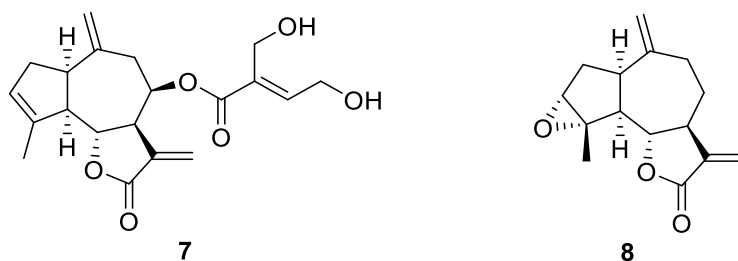


Figura 5. Componentes químicos con esqueleto de guaiano.

Los derivados de longipinano, constituyentes presentes en el género *Stevia*, se conforman por 61 compuestos, es decir, 43 longipinanos y 18 longipinenos. En cuanto a los ésteres se encuentran angelatos (Ang), tiglatos (Tigl), senecioatos (Sen), metacrilatos (Meacr) y acetatos (Ac) (Joseph-Nathan *et al.*, 1989). De las raíces de *S. serrata* aislaron el producto natural Rasteviona (**9**) como producto mayoritario, mientras que los derivados **10**, **11**, y **12** fueron aislados como componentes minoritarios (Figura 6) (Román *et al.*, 1981; Sánchez-Arreola, 1995).

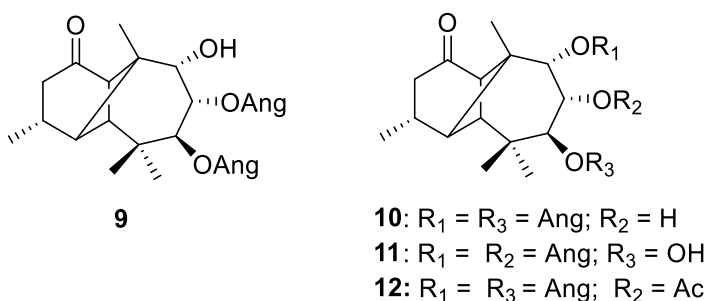


Figura 6. Derivados de longipinano.

Por otra parte, en las partes aéreas de *S. setifera*, se han encontrado derivados de acetofenona, benzofurano y cromeno, donde identificaron la *p*-hidroxiacetofenona (**13**). Estos dos

últimos derivados han sido aislados de las raíces de *S. lemmonia* **14** y **15**, mientras que en sus partes aéreas se reporta un derivado de benzofurano **16**, el cual ha sido reportado en *S. brevistarata*, *S. salicifolia* y *S. mercedensis* (**Figura 7**) (Bohlmann *et al.*, 1979; Hernández, *et al.*, 1994).

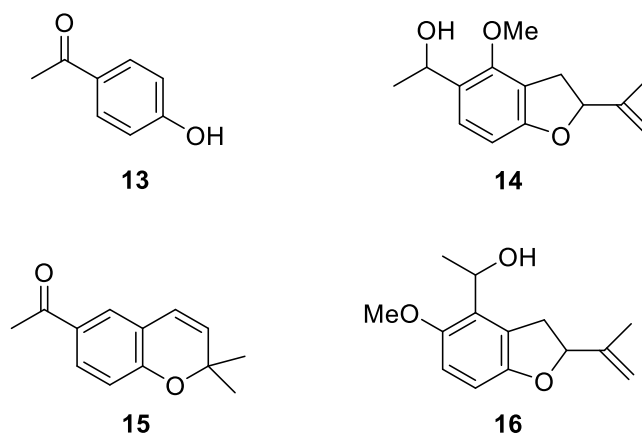


Figura 7. Derivados de acetofenona, benzofurano y cromeno de *Stevia*.

De acuerdo con varios estudios, se han identificado diversos flavonoides, presentados generalmente en forma de glucósidos, por ejemplo, de *S. microchaeta* aislaron el 3-O- β -D-galactósido de quercetina (**17**) (**Figura 8**) (Rajbhandari & Roberts, 1985).

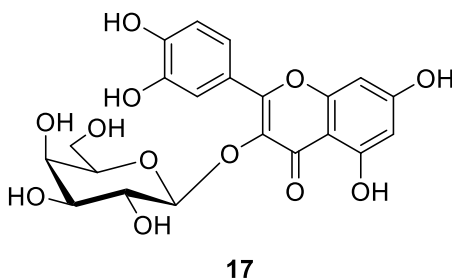


Figura 8. Flavonoides aislados de *Stevia*.

También han aislado diterpenos, compuestos de 20 átomos de carbono derivados del geranil-geraniol pirofosfato (GGPP), los cuales se biosintetizan por una ruta en común con varias diterpen sintasas y enzimas como las oxidasas del citocromo P450, las glucosidasas y acetiltransferasas; su ciclación da lugar a estructuras de tipo labdano, clerodano, kaurano, taxano y giberelano, entre otros (Liu *et al.*, 2023).

Los diterpenoides tetracíclicos son los componentes más comúnmente encontrados en *Stevia*, la mayor parte de éstos pertenecen al grupo *ent*-kaurano, tal como es el caso del esteviósido (**18**), aislado por primera vez de las hojas de *S. rebaudiana* y actualmente también en *S. phlebophylla*, conocido por su poder como edulcorante de gran interés científico (**Figura 9**) (Soejarto, 1983; Muanda *et al.*, 2011).

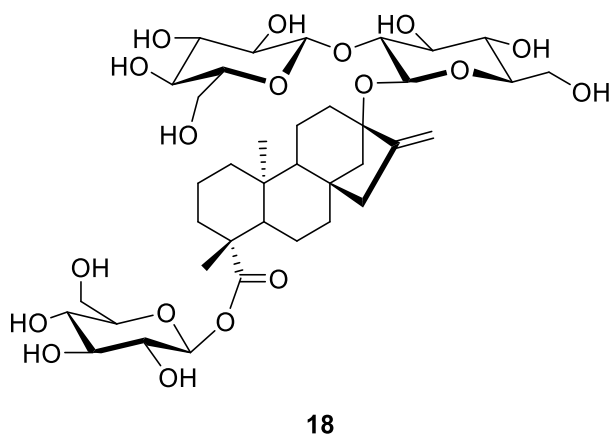


Figura 9. Glucósido derivado del *ent*-kaurano aislado de algunas especies de *Stevia*.

Los diterpenos bicíclicos como los labdanos, poseen un amplio rango de actividad biológica, un ejemplo de ello es el *cis*-abienol (**19**), intermediario en perfumería, aislado de las partes aéreas de *S. monardifolia*, *S. sarensis*, y *S. lucida* (Zerbe & Bohlmann, 2015). En las flores de *S. rebaudiana* se ha aislado el jhanol (**20**) y la austroinulina (**21**), ambos con actividad citotóxica (**Figura 10**) (Darise *et al.*, 1983).

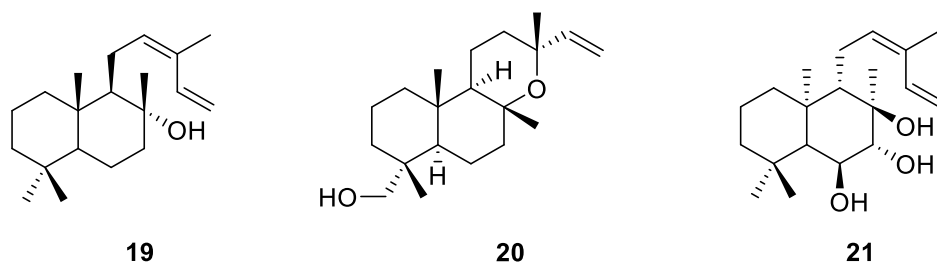


Figura 10. Componentes químicos con esqueleto de labdano aislados de *Stevia*.

Otro hecho que también contribuye a la riqueza química del género es que de algunas especies como *S. subpubescens* Lag. se han aislado compuestos con esqueletos hidrocarbonados poco frecuentes en la naturaleza, por ejemplo, los diterpenos tipo grindelano 22 (**Figura 11**) (Román *et al.*, 2000).

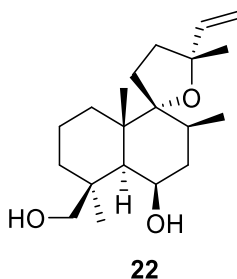


Figura 11. Diterpeno tipo grindelano aislado de *S. subpubescens* Lag.

En cuanto a los clerodanos se encuentra el ácido estefálico (23), obtenido del extracto metanólico de *S. polycephala* mediante rayos X de monocristal establecieron la estructura, el cual muestra una estructura similar a la previamente reportada en *S. myriadenia*, el ácido 2 β -acetoxi-13,14-Z-colavenoico (24) (**Figura 12**) (Angeles *et al.*, 1982; Bohlmann *et al.*, 1982).

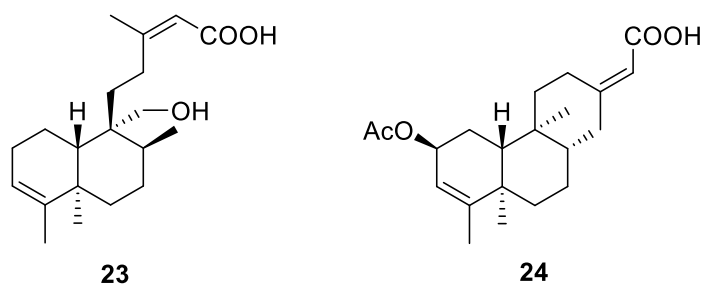


Figura 12. Diterpenos de tipo clerodano aislados de *Stevia*.

2.4. *Stevia dictyophylla* B. L. Rob.

Stevia dictyophylla B. L. Rob. (**Figura 13**) es un arbusto muy ramificado, de 1-1.5 m de alto, con abundante pubescencia a lo largo de la planta, posee tricomas de base rígida, brillantes, multicelulares; ramas jóvenes con tricomas finos y adpresos; hojas opuestas, oblongo-lanceoladas a ovadas, acuminadas o subacuminadas en el ápice, (4-) 5-9 cm de largo, 1.5-3.5cm de ancho, trinervadas, venas primaria y secundaria, pálidas, fuertemente marcadas en el envés, y ligeramente en el haz, lamina-entera, o crenado-dentada hacia el ápice, base decurrente, pecíolo de 5-8 mm de largo; inflorescencia densa, formando corimbos de 5-15 cm de largo y ancho; cabezuelas sésiles, de 9 mm de largo; brácteas del involucre visiblemente pubescentes, 5-6.5 mm de largo, linear, redondeado, estrechándose hacia el ápice; flores blancas, tubo ligeramente rosa, corola de 6 mm de largo, con puberulenta o glandular a lo largo de la garganta, tubo glandular pubescente, lóbulos de 1 mm de largo, conspicuamente largo-pilosos; aquenios iguales de 3 mm de largo, estrigosos, glandulares cerca del ápice, vilano en forma de corona de 0.2-0.3 cm.



Figura 13. *Stevia dictyophylla* B. L. Rob.

Distribución: Generalmente en bosque de encino y pino-encino, de los 1500-2300 msnm, nativa de México, distribuida en el centro, sureste y noreste del territorio mexicano. Su época de floración se encuentra entre diciembre y abril (**Figura 14**).



Figura 14. Distribución de *Stevia dictyophylla* en México.

3. JUSTIFICACIÓN

Considerando que *Stevia dictyophylla* B. L. Rob es una especie nativa de México y no cuenta con estudios previos, surge el interés de realizar un estudio químico de las flores para contribuir con la quimiotaxonomía del género.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Realizar el estudio químico del extracto de diclorometano de las flores de *Stevia dictyophylla* B. L. Rob., por métodos cromatográficos y espectroscópicos para contribuir con la quimiotaxonomía del género.

4.2. Objetivos Específicos

- Preparar la muestra de *Stevia dictyophylla* B. L. Rob.
- Obtener el extracto de diclorometano de las flores de *Stevia dictyophylla* B. L. Rob.
- Aislar y purificar los componentes mayoritarios por métodos cromatográficos.
- Caracterizar los compuestos mediante métodos espectroscópicos.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. Generalidades

Para las separaciones cromatográficas en columna, se utilizó columna de vidrio, gel de sílice marca Merck 60 de 70-230 mallas como fase estacionaria y como fase móvil mezclas de Hexanos-AcOEt.

El monitoreo de las placas se llevó a cabo mediante cromatografía en placa preparativa utilizando placas TLC Silica Gel 60 F254.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H y ^{13}C se obtuvieron en un espectrómetro Varian Mercury Plus (400 MHz ^1H , 100 MHz ^{13}C), utilizando como disolvente cloroformo deuterado (CDCl_3). Los desplazamientos químicos (δ) están dados en ppm con respecto al Tetrametilsilano (TMS) que se usó como referencia interna. Los espectros fueron procesados en el programa MestReNova.

5.2. Material Vegetal

El material vegetal fue recolectado en la carretera San Miguel del Monte, municipio de Morelia, Michoacán. Se depositaron tres ejemplares de la especie en el Herbario de la Facultad de Biología de la UMSNH presentando las características necesarias para formar parte de la Colección de Plantas Vasculares del EBUM. Se usaron claves dicotómicas de distintas fuentes bibliográficas para la determinación de la familia, género y especie. Con base a la Flora Fanerogámica del Valle de México de Rzedowski, J. y G. Calderón de Rzedowski se identificó la familia; y posteriormente, se utilizó la Flora Novo Galiciana, Vol. 2, *Compositae*, de Roger

Estudio Químico del Extracto de Diclorometano de las Flores de *Stevia dictyophylla* B. L. Rob.

McVaugh para la determinación de género, especie, y descripción de esta. Los datos de recolección son los siguientes:

***Stevia dictyophylla* B. L. Rob.**

Voucher 30913, Carretera de San Miguel del Monte, municipio de Morelia, 19° 37' 43.4'' N, 101° 8' 38.5'' W, 2143 m, con fecha del 6 de febrero de 2022. Determinadas por la Bióloga Norma Patricia Reyes Martínez y la Bióloga Rosa Isabel Fuentes Chávez del EBUM.

5.3. Obtención del extracto

Las flores del material vegetal fueron separadas de sus partes aéreas, obteniendo un lote de 720 g de flores frescas; las cuales se maceraron con diclorometano durante 3 días a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo, el extracto se filtró y concentró a sequedad en un rotavapor, este proceso se efectuó 2 veces, obteniéndose 102 g de extracto total, al cual se le adicionó metanol para la precipitación de grasas colocando en refrigeración a 4 °C, transcurrido 7 días se filtró y se llevó a sequedad en el rotavapor. Este procedimiento se realizó varias veces hasta que quedó libre de grasas obteniendo 98 g de extracto desengrasado.

5.4. Separación Cromatográfica.

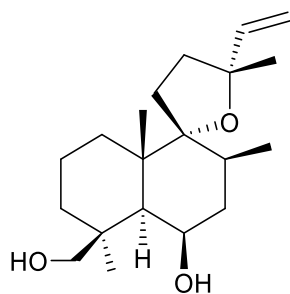
La purificación de los compuestos del extracto de diclorometano se realizó mediante una cromatografía de columna abierta con un diámetro de 2 cm de ancho, empleando gel de sílice marca Merck 60 de 70-230 mallas como fase estacionaria a una altura de 32 cm, y como fase móvil, una mezcla de disolventes Hexanos-Acetato de etilo como eluyentes, en orden de polaridad ascendente, recuperando fracciones de 20 mL cada una. Las fracciones colectadas fueron

Estudio Químico del Extracto de Diclorometano de las Flores de *Stevia dictyophylla* B. L. Rob.

monitoreadas por cromatografía en capa fina, empleando el mismo sistema de disolventes, observándose bajo luz UV y reveladas con sulfato sérico amoniacal.

9 α ,13 α -epoxi-14-labden-18,6 β -diol (22).

De las fracciones 71-89 eluídas con la polaridad 9:1 (Hexanos-AcOEt) se obtuvieron 200 mg (73% de rendimiento) de una miel ligeramente amarilla correspondiente al derivado **22**.



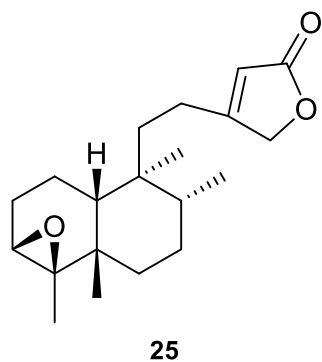
22

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ ppm: Ver **tabla 1.**

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ ppm: Ver **tabla 2.**

3 β ,4 β -epoxi-*cis*-13-cleroden-15,16-ólida (25).

De las fracciones 90-95 eluídas con la polaridad 4:1 (Hexanos-AcOEt) se obtuvieron 68 mg (25% de rendimiento) de una miel de color amarillo correspondiente al derivado 25.



RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3): δ ppm: Ver **tabla 3.**

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3): δ ppm: Ver **tabla 4.**

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Purificación de compuestos

6.1.1. Derivado de Labdano

El extracto de diclorometano previamente desengrasado de las flores de *Stevia dictyophylla* (0.275 g) se sometió a una separación mediante cromatografía en columna utilizando como disolventes mezclas de Hexanos-AcOEt a una polaridad 9:1, de las fracciones 72-89 se obtuvieron 200 mg de una miel ligeramente amarilla con un rendimiento del 73%, la cual en su espectro de RMN de ^1H (**Figura 15**) se observó una señal doble de dobles en δ 6.05 con $J_{trans} = 17.6$ y $J_{cis} = 10.9$ Hz del H-14, en δ 5.14 se apreció una señal doble de dobles con una $J_{trans} = 17.6$ y $J_{gem} = 1.40$ Hz correspondiente a H-15; en δ 4.97 se observó otra señal doble de dobles con $J_{cis} = 10.9$, 1.40 Hz de H-15', el conjunto de estas tres señales así como los valores de las constantes de acoplamiento confirman la presencia de un grupo vinilo. En δ 4.29 y δ 3.15 se observaron dos señales dobles con una $J = 11.4$ Hz para cada una, características de los hidrógenos H-18 y H-18' unidos a un oximetileno. En δ 4.35 se observó una señal ancha con apariencia de cuádruple ($J = 3.2$ Hz) del hidrógeno base de oxhidrilo H-6. En la región de metilos se observaron 3 señales de metilos terciarios en δ 1.37, δ 1.32, y δ 1.05, además de uno secundario en δ 1.36 ($J = 7.9$ Hz).

En su espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 16**) se aprecian 20 señales, en las cuales se observaron carbonos del grupo vinilo en δ 144.8 (C-14) y δ 110.5 (C-15) en δ 68.8 de CH_2OH (C-18) y la del CH-OH en δ 67.2 (C-6). Además, se observaron dos señales de carbonos cuaternarios bases de oxígeno en δ 92.8 (C-9) y δ 82.5 (C-13), dos señales de CH 's, dos de carbonos cuaternarios, seis de CH_2 's y cuatro de CH_3 's.

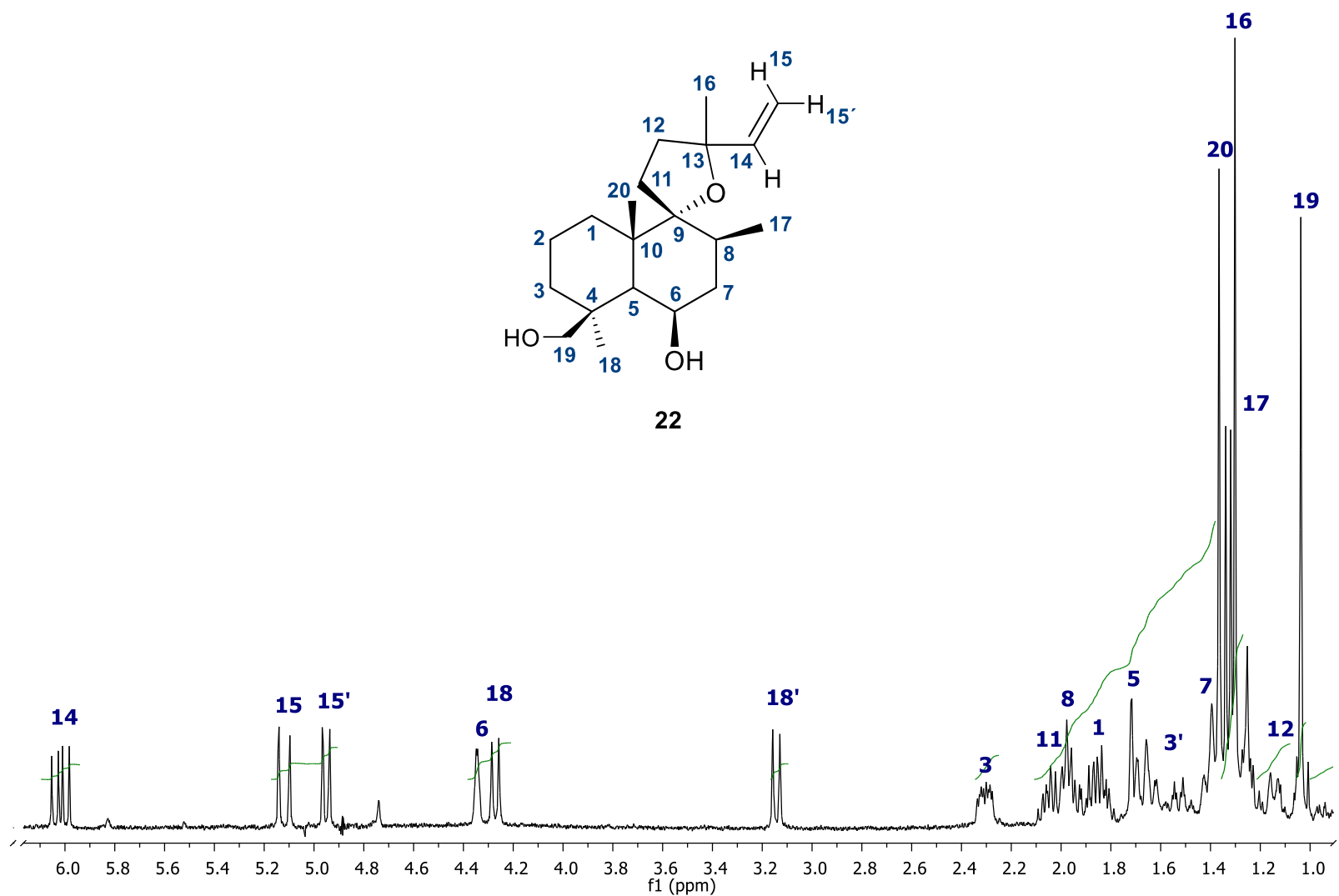


Figura 15. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz en CDCl₃ del 9 α ,13 α -epoxi-14-labden-18,6 β -diol (22).

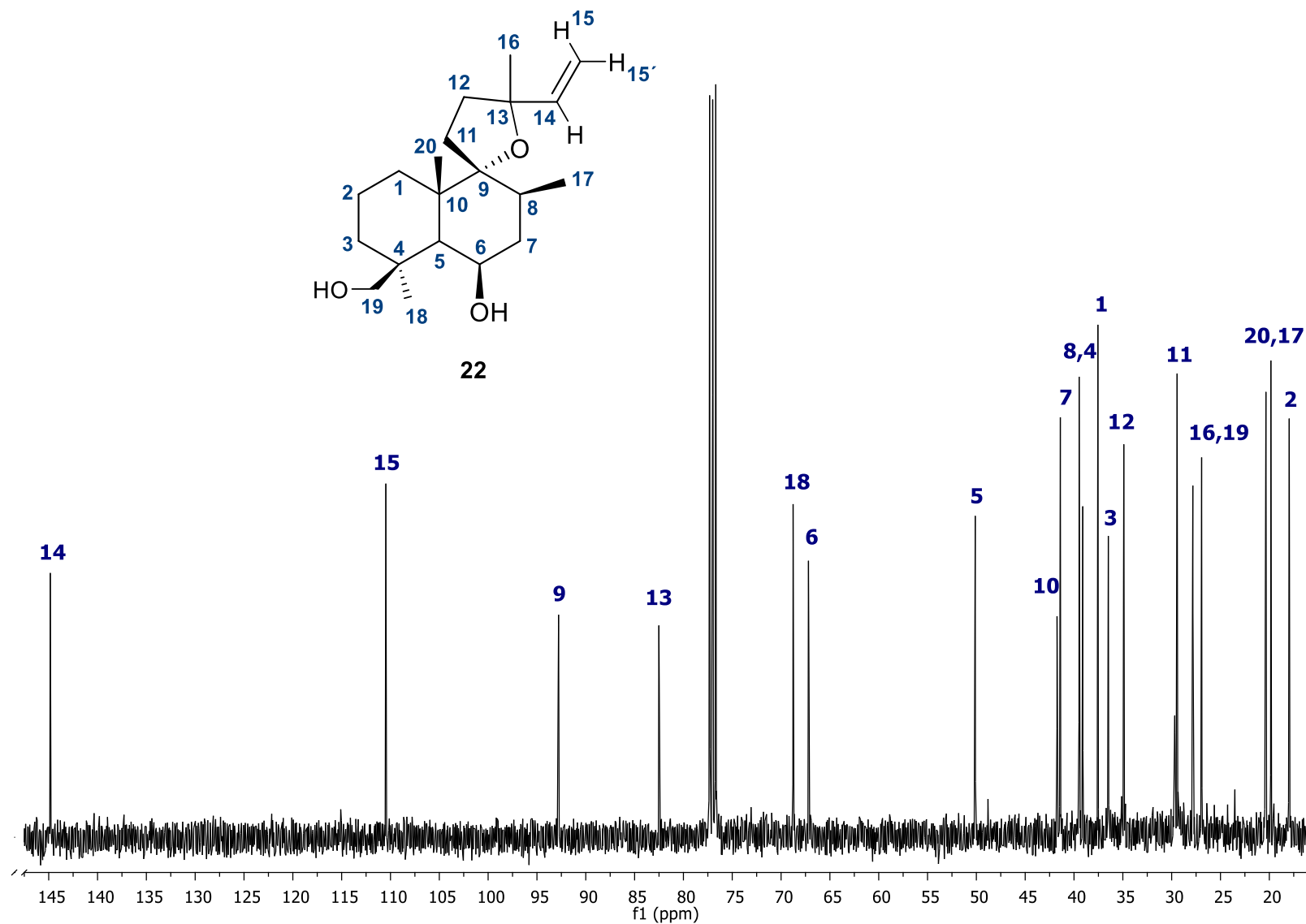
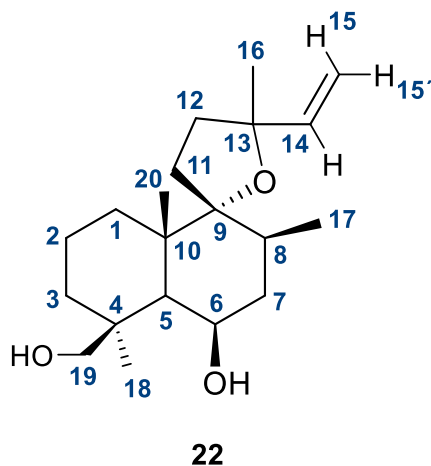


Figura 16. Espectro de RMN de ¹³C a 100 MHz en CDCl₃ del 9 α ,13 α -epoxi-14-labden-18,6 β -diol (22).

Tabla 1. Comparación de los desplazamientos químicos del derivado **22**, RMN de ^1H a 400 MHz.



Hidrógeno	Experimental 22 en δ	Román <i>et al.</i> , 2000 en δ
H-1	1.85 (1H, m)	1.84 (1H, m)
H-1'	1.85 (1H, m)	1.84 (1H, m)
H-2	1.35 (1H, m)	1.35 (1H, m)
H-2'	1.35 (1H, m)	1.35 (1H, m)
H-3	2.31 (2H, m)	2.25 (2H, m)
H-3'	1.64 (3H, m)	1.68 (3H, m)
H-5	1.73 (1H, d, $J = 10.5$ Hz)	1.73 (1H, d)
H-6	4.35 (1H, d, $J = 3.2$ Hz)	4.35 (1H, d, $J = 2.8$ Hz)
H-7	1.41 (1H, m)	1.40 (1H, m)
H-7'	1.41 (1H, m)	1.40 (1H, m)
H-8	1.98 (1H, m)	1.97 (1H, m)

H-11	2.04 (1H, m)	2.01 (1H, m)
H-12	1.14 (1H, m)	1.12 (1H, m)
H-12'	1.14 (1H, m)	1.12 (1H, m)
H-14	6.02 (1H, dd, $J = 17.6$ Hz, 10.9 Hz)	6.04 (1H, dd, $J = 17.5$ Hz, 10.8 Hz)
H-15	5.12 (1H, dd, $J = 17.6$ Hz, 1.4 Hz)	5.14 (1H, dd, $J = 17.5$ Hz, 1.4 Hz)
H-15'	4.96 (1H, dd, $J = 10.9$ Hz, 1.4 Hz)	4.97 (1H, dd, $J = 10.8$ Hz, 1.4 Hz)
H-16	1.30 (s)	1.32 (s)
H-17	1.33 (1H, d, $J = 7.9$ Hz)	1.36 (1H, d, $J = 7.0$ Hz)
H-18	4.29 (1H, d, $J = 11.4$ Hz)	4.28 (1H, d, $J = 11.4$ Hz)
H-18'	3.15 (1H, d, $J = 11.4$ Hz)	3.15 (1H, d, $J = 11.4$ Hz)
H-19	1.05 (s)	1.05 (s)
H-20	1.38 (s)	1.38 (s)

Tabla 2. Comparación de los desplazamientos químicos del derivado **22**, RMN de ^{13}C a 100 MHz.

Carbono	Experimental 22 en δ	Román <i>et al.</i> , 2000 en δ
C-1	37.6	37.6
C-2	18.0	18.0
C-3	36.5	36.5

C-4	39.1	39.2
C-5	50.1	50.2
C-6	67.2	67.2
C-7	41.4	41.5
C-8	39.5	39.5
C-9	92.8	92.9
C-10	41.7	41.8
C-11	29.4	29.5
C-12	34.9	34.9
C-13	82.5	82.6
C-14	144.8	145.0
C-15	110.5	110.6
C-16	27.8	27.9
C-17	19.8	19.9
C-18	68.8	68.8
C-19	26.9	27.0
C-20	20.3	20.4

De acuerdo con los desplazamientos químicos de estas señales, en comparación con los diterpenos aislados de *Stevia*, los datos corresponden con el grindelano **22** aislado de las hojas de *Stevia subpubescens* Lag., **Tabla 1** y **Tabla 2** (Román *et al.*, 2000). Diterpenos derivados del ácido grindélico se han reportado de varios géneros como *Grindelia*, *Chrysothamnus*, *Haplopappus*, con actividad antialimentaria (Bohlmann *et al.*, 1982; Rose, 1980). Mientras que de los géneros *Erigeron* y *Austrobrickellia* han aislado diterpenos del tipo de *ent*-grindelano **26** aislado de las hojas de *Austrobrickellia patens* (Jakupovic *et al.*, 1986) (**Figura 17**). Este es el segundo reporte que se tiene de la obtención de un diterpeno con esqueleto de grindelano aislado del género *Stevia*.

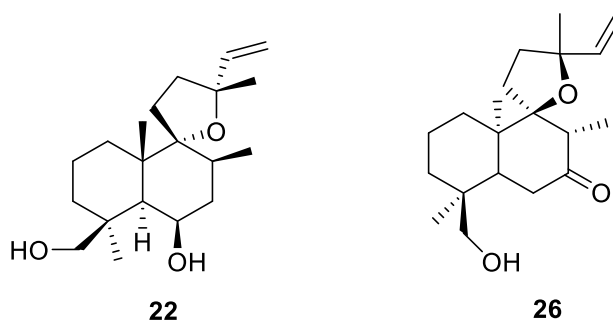


Figura 17. Fórmulas de grindelano y *ent*-grindelano.

6.1.2. Derivado de Clerodano

Continuando con la purificación del extracto de las flores, de las fracciones 90-95 en la polaridad 4:1 Hexanos-AcOEt, se obtuvieron 68 mg de una miel de color amarillo, con un rendimiento del 25%; que al ser analizada por RMN de ^1H (**Figura 18**) se observó una señal simple ancha en $\delta 5.83$ del hidrógeno vinílico en H-14, y otra señal doble que integró para dos hidrógenos correspondientes a los hidrógenos H-16 del oximetileno en $\delta 4.75$ (2H, d, $J = 1.7$) señales características de un butenólido sustituido en la posición beta. En $\delta 3.02$ se observó una señal doble con una $J = 5.9$ correspondiente al H-3 base de oxígeno y en $\delta 2.50$ y $\delta 2.26$ se observaron las señales de los hidrógenos alílicos H-12 y H-12' como doble de doble de doble anchas. En la región de campo alto se observaron tres señales simples de metilos terciarios (CH_3 -18 a $\delta 1.19$, CH_3 -19 a $\delta 0.93$, y CH_3 -20 a $\delta 1.24$), la señal doble correspondiente al metilo secundario se observó en 0.83, el resto de los hidrógenos se encuentran de $\delta 2.10$ a $\delta 1.30$.

En cuanto al espectro de RMN de ^{13}C (**Figura 19**) se observó la señal del carbonilo del butenólido (C-15) en $\delta 174.0$ y muy cercana a ésta, en $\delta 171.3$, una señal de menor intensidad debida al carbono vinílico C-13. Los otros dos carbonos del butenólido C-14 y C-16 se encontraron en $\delta 115.1$ y $\delta 73.1$, respectivamente. Las señales de los carbonos 3 y 4 base de oxígeno correspondientes al epóxido aparecieron en $\delta 62.6$ y $\delta 65.9$. Las demás señales fueron corroboradas mediante el espectro DEPT y correspondieron a dos carbonos cuaternarios, dos CH's, seis CH_2 y cuatro metilos.

Los valores de los desplazamientos químicos en este espectro de ^{13}C , fueron idénticos a los diterpenos de tipo clerodano descritos en la literatura (Fang *et al.*, 1988). Cabe destacar que dicha estructura ha sido encontrada en los géneros *Ageratina saltillensis* (Fang *et al.*, 1988),

Estudio Químico del Extracto de Diclorometano de las Flores de *Stevia dictyophylla* B. L. Rob.

Colophospermum mopane (Du *et al.*, 2015) y *Stevia subpubescens* Lag (Cambrón-Rosas, 1996).

Es importante mencionar que derivados de clerodano han sido aislados del género *Solidago* como *Solidago shorti* (Anthonsen & Bergland, 1971), *Solidago serotina* (McCrindle & Nakamura, 1974), y *Solidago arguta* (McCrindle *et al.*, 1976); sin embargo, estos derivados presentan principalmente estereoquímica alfa en el grupo epóxido 3,4. Los datos espectroscópicos fueron comparados con los descritos en la literatura, esto se muestra en la **Tabla 3** y **Tabla 4** con una notable concordancia en cuanto a los desplazamientos químicos.

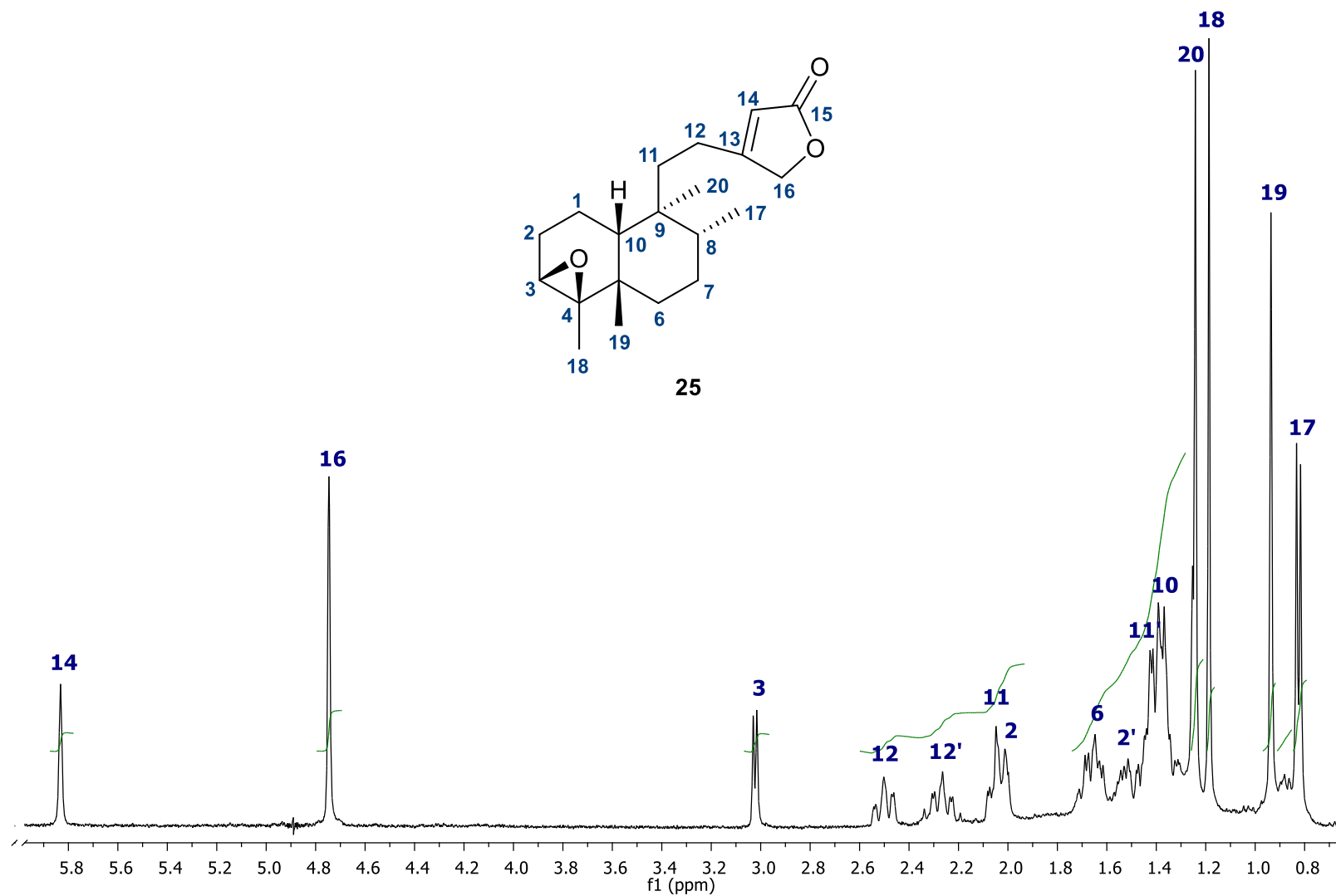


Figura 18. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz en CDCl₃ del 3β,4β-epoxi-*cis*-13-cleroden-15,16-ólida (25).

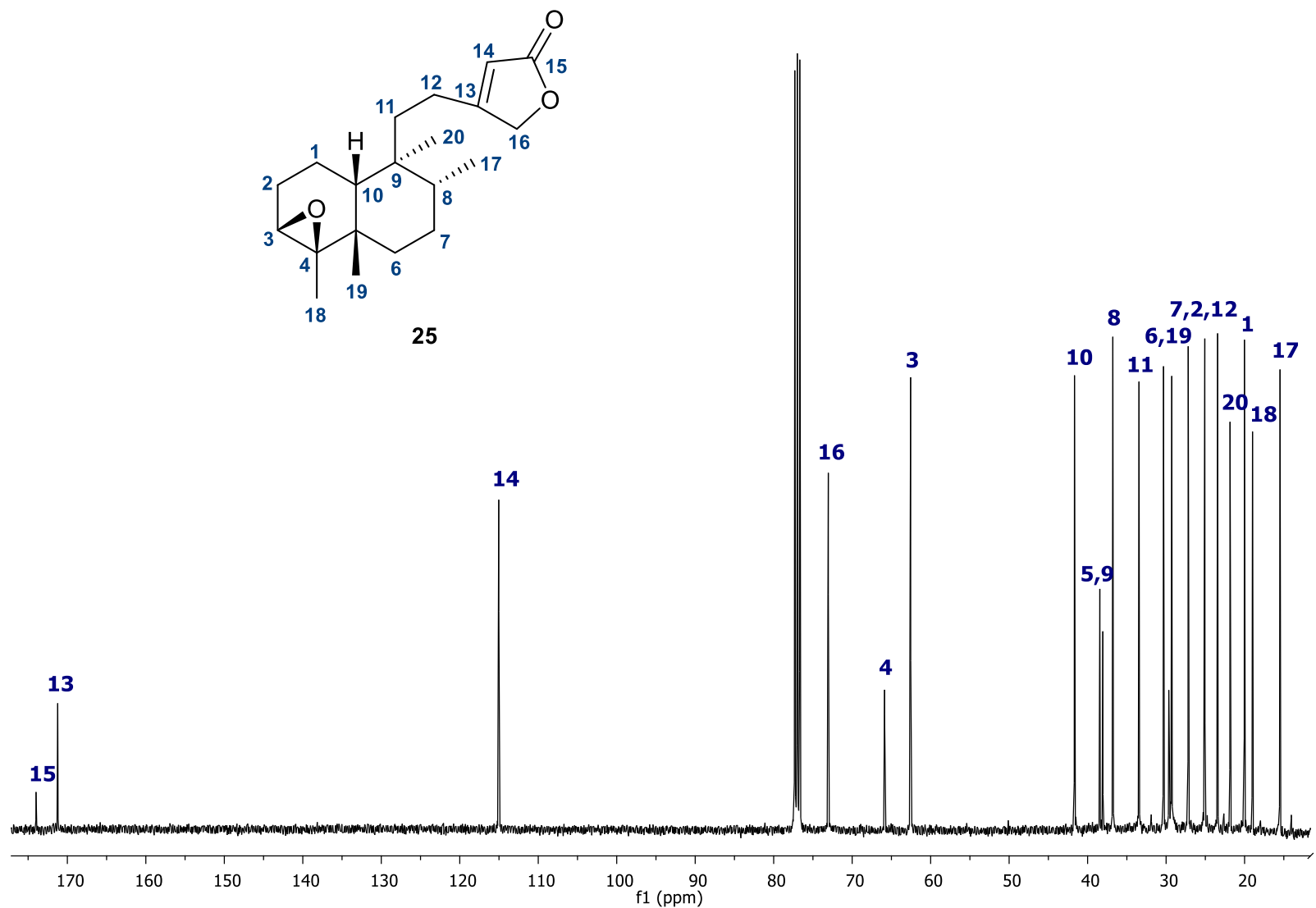
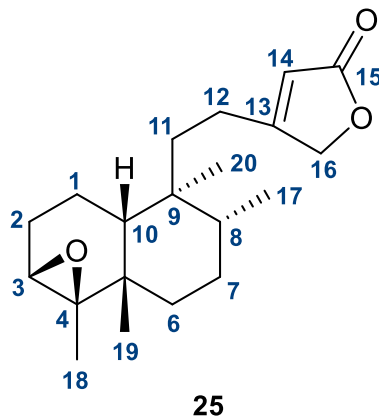


Figura 19. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 del 3 β ,4 β -epoxi-cis-13-cleroden-15,16-ólida (25).

Tabla 3. Comparación de los desplazamientos químicos del derivado **25**, RMN de ^1H a 400 MHz.



Hidrógeno	Experimental 25 en δ	Cambrón-Rosas, 1996 en δ
H-1	1.40 (1H, m)	1.40 (1H, m)
H-1'	1.18 (1H, m)	1.17 (1H, m)
H-2	2.05 (1H, m)	2.05 (1H, m)
H-2'	1.54 (1H, m)	1.67 (1H, m)
H-3	3.02 (1H, d, $J = 5.9$ Hz)	3.02 (1H, d, $J = 5.8$ Hz)
H-6	1.66 (3H, m)	1.67 (3H, m)
H-6'	1.36 (1H, m)	1.36 (1H, m)
H-7	1.42 (1H, m)	1.43 (1H, m)
H-7'	1.42 (1H, s)	1.40 (1H, m)
H-8	1.53 (1H, m)	1.53 (1H, m)
H-10	1.25 (1H, m)	1.25 (1H, m)
H-11	1.95 (1H, m)	1.95 (1H, m)
H-11'	1.39 (1H, m)	1.39 (1H, m)

H-12	2.50 (1H, m)	2.51 (1H, m)
H-12'	2.26 (1H, m)	2.26 (1H, m)
H-14	5.83 (1H, s)	δ 5.83 (1H, s)
H-16	4.75 (2H, d, $J = 1.7$ Hz)	4.75 (2H, d, $J = 1.7$ Hz)
H-17	0.83 (1H, d, $J = 6.4$ Hz)	0.82 (1H, d, $J = 6.8$ Hz)
H-18	1.19 (1H, s)	1.18 (1H, s)
H-19	0.93 (3H, s)	0.93 (3H, s)
H-20	1.24 (3H, s)	1.24 (3H, s)

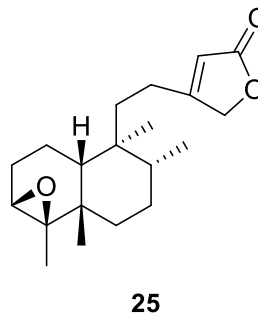
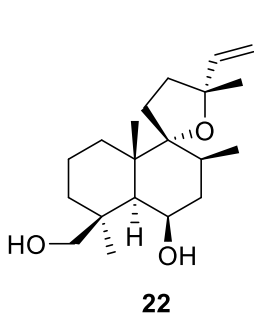
Tabla 4. Comparación de los desplazamientos químicos del derivado **25**, RMN de ^{13}C a 100 MHz.

Carbono	Experimental 25 en δ	Fang <i>et al.</i> , 1988 en δ
C-1	20.0	20.2
C-2	30.3	30.4
C-3	62.6	62.5
C-4	65.9	65.8
C-5	38.5	38.1
C-6	25.1	25.2
C-7	27.2	27.3
C-8	36.8	36.9

C-9	38.1	38.6
C-10	41.7	41.8
C-11	33.5	33.5
C-12	23.4	23.5
C-13	171.3	171.3
C-14	115.1	115.1
C-15	174.0	174.2
C-16	73.1	73.1
C-17	15.5	15.5
C-18	29.3	29.3
C-19	19.0	19.0
C-20	21.9	21.9

7. CONCLUSIÓN

Del extracto de diclorometano de las flores de *Stevia dictyophylla* se logró aislar e identificar un derivado de labdano, el 9 α ,13 α -epoxi-14-labden-18,6 β -diol (**22**), y un derivado de clerodano, el 3 β ,4 β -epoxi-*cis*-13-cleroden-15,16-ólida (**25**), los cuales fueron caracterizados mediante Resonancia Magnética Nuclear de 1D y 2D. Lo que contribuye a su estudio químico y pone de manifiesto una vez más la riqueza química presente en las especies de este género. Los cuales ya han sido aislados de otra especie de *Stevia* y otros géneros diferentes. Estos resultados son alentadores e indican que es conveniente continuar con el estudio químico de los extractos más polares de las flores y de las otras partes de la especie vegetal.



8. BIBLIOGRAFÍA

- Angeles, E., Folting, K., Grieco, P. A., Huffman, J. C., Miranda, R., & Salmón, M. (1982). Isolation and structure of stephalic acid, a new clerodane diterpene from *Stevia polycephala*. *Phytochemistry*. 21(7): 1804–1806.
- Anthonsen, T., & Bergland, G. (1971). Diterpenoids of some *Solidago* species. *Acta Chemica Scandinavica*. 25(5): 1924.
- Ávalos-García, A. & Pérez-Urria C. E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). *Serie Fisiología Vegetal*. 2(3): 119–145.
- Bohlmann, F., Dutta, L.N., Dorner, W., King, R.M. & Robinson, H. (1979). Zwei neue Guajanolide sowie weitere Longipinenester aus *Stevia*-Arten. *Phytochemistry*. 18(4): 673–675.
- Bohlmann, F., Ahmed, M., Borthakur, N., Wallmeyer, M., Jakupovic, J., King, R. M., & Robinson, H. (1982). Diterpenes related to grindelic acid and further constituents from *Grindelia* species. *Phytochemistry*, 21(1), 167–172.
- Bohlmann, F., Zdero, C., King, R. M., & Robinson, H. (1982). Sesquiterpenes, guaianolides and diterpenes from *Stevia myriadenia*. *Phytochemistry*. 21(8): 2021–2025.
- Bohlmann, F., Zdero, C., King, R. M., & Robinson, H. (1986). Neue Sesquiterpenlactone und andere Inhaltsstoffe aus *Stevia mercedensis* und *Stevia achalensis*. *Liebigs Ann. Chem*. 799-813.
- Bohm, B. A., & Stuessy, T. F. (2001). *Flavonoids of the Sunflower Family* (Asteraceae). 1st Edition. Springer Vienna. British Columbia University, Vancouver, Canada. 64–122.
- Borgo, J., Laurella, L. C., Martini, F., Catalán, C. A. N., & Sülsen, V. P. (2021). *Stevia* Genus: Phytochemistry and Biological Activities Update. *Molecules*. 26(9): 2733.

Estudio Químico del Extracto de Diclorometano de las Flores de *Stevia dictyophylla* B. L. Rob.

Cambrón-Rosas, J. I. (1996). *Diterpenos de Stevia subpubescens* Lag., y *Análisis de Glucósidos Flavonoides de Stevia connata mediante HPLC*. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Michoacán, México.

Cerda-García-Rojas, C. M., & Pereda Miranda, R. (2002). *The phytochemistry of Stevia: a general survey*. In *Stevia: The genus Stevia*. 1st Edition. Edited by A. Douglas, Kinghorn. Taylor & Francis: London, Chapter 5. pp 86–118.

Chacón-Morales, P. A., Santiago Dugarte, C., & Amaro-Luis, J. M. (2021) Helenin from *Stevia lucida*. The first report of this natural eudesmanolide mixture in Eupatorieae tribe. *Natural Product Research*. 35(21): 4139–4142.

Chadwick, M., Trewin, H., Gawthrop, F., & Wagstaff, C. (2013). Sesquiterpenoids lactones: benefits to plants and people. *International Journal of Molecular Sciences*. 14(6): 12780–12805.

Cordeiro, M. S., Simas, D. L. R., Pérez-Sabino, J. F., Mérida-Reyes, M. S., Muñoz-Wug, M. A., Oliva-Hernández, B. E., Giorno, T. B. S. (2020). Characterization of the antinociceptive activity from *Stevia serrata* Cav. *Biomedicines*, 8(4): 79.

Darise, M., Kohda, H., Mizutani, K. & Tanaka, O. (1983) Chemical constituents of flowers of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Agricultural and Biological Chemistry*. 47(1):133–135.

De Hernández, Z. N. J., Hernández, L. R., Catalán, C. A., Gedris, T. E., & Herz, W. (1997). Guaianolides and germacradienolides from *Stevia sanguinea*. *Phytochemistry*, 46(4): 721–727.

Del Vitto, L. & Petenatti, M. E. (2009). Asteraceae of economic and environmental importance. First part. Morphological and taxonomic synopsis, environmental importance, and plants of industrial value. *Multequina*. 18: 87–115.

- Devkota, H. P. (2022). An overview of medicinal plants of the Asteraceae family and their role in human health. In: Devkota, H. P., Aftab, T. (eds) Medicinal Plants of the Asteraceae Family. Chap.1, pp 1–15. Springer, Singapore.
- Dhaniaputri, R., Suwono, H., Amin, M. & Lukiati, B. (2022). Introduction to plant metabolism, secondary metabolites biosynthetic pathway, and In-silico molecular docking for determination of plant medicinal compounds: An overview. *Proceedings of the 7th International Conference on Biological Science (ICBS 2021)*. 22: 373–377.
- Du, K., De Mieri, M., Neuburger, M., Zietsman, P. C., Marston, A., van Vuuren, S. F., Ferreira, D., Hamburger, M. & van der Westhuizen, J. H. (2015). Labdane and clerodane diterpenoids from *Colophospermum mopane*. *Journal of Natural Products*. 78(10): 2494–2504.
- Elso, O. G., Bivona, A. E., Alberti, A. S., Cerny, N., Fabian, L., Morales, C., Catalán, C. A. N., Malchiodi, E. L., Cazorla, S. I. & Sülsen, V. P. (2020). Trypanocidal activity of four sesquiterpene lactones isolated from Asteraceae species. *Molecules*. 25(9): 2014
- Erb, M., & Kliebenstein, D. J. (2020). Plant secondary metabolites as defenses, regulators, and primary metabolites: The blurred functional trichotomy, *Plant Physiology*. 184(1): 39–52.
- Fang, N., Yu, S., Mabry, T. J., Abboud, K. A. & Simonsen, S. H. (1988). Terpenoids from *Ageratina saltillensis*. *Phytochemistry*. 27(10): 3187–3196.
- Guerra-Ramírez, D., Cerda-García-Rojas, C. M., Puentes, A. M. & Joseph-Nathan, P. (1998). Longipinene diesters from *Stevia lucida*. *Phytochemistry*. 48(1): 151–154.
- Hernández, L. R., Catalán, C. A. N., Cerda-García-Rojas, C. M., & Joseph-Nathan, P. (1995). Guaianolides from *Stevia gilliesii*. *Natural Product Letters*, 6(3), 215–221.

Hernández, L. R., Catalán, C. A. N., Cerda-García-Rojas, C. M. & Joseph-Nathan, P. (1994)

Sesquiterpene lactones from *Stevia breviaristata*. *Phytochemistry*. 37(5): 1331–1335.

Hernández, Z. N. J. d., Catalán, C. A., Hernández, L. R., Guerra-Ramírez, D., & Joseph-Nathan,

P. (1999). Sesquiterpene lactones from *Stevia alpina* var. *glutinosa*. *Phytochemistry*, 51(1), 79–82.

Jakupovic, J., Ellmauerer, E., Bohlmann, F., King, R. M., & Robinson, H. (1986). *Ent*-labdanes

from *Austrobrickellia patens*. *Phytochemistry*, 25(8): 1927–1929.

Joseph-Nathan, P., Cerda-García-Rojas, C. M., Román, L. U. & Hernández J. D. (1989).

Preparation and Characterization of Naturally Occurring Longipinene Esters. *Journal of Natural Products*. 52(3): 481-496.

Kitaoka, N., Lu, X., Yang, B. & Peters, R. J. (2015). The application of synthetic biology to

elucidation of plant mono-, sesqui-, and diterpenoid metabolism. *Molecular plant*. 8(1): 6–16.

Liu, Y., Chen, X. & Zhang, C. (2023). Sustainable biosynthesis of valuable diterpenes in microbes.

Engineering Microbiology. 3(1): 100058.

Masyita, A., Mustika, S. R., Dwi, A. A., Yasir, B., Rahma, N. R., Bin, T. E., Nainu, F. & Simal-

Gandara, J. (2022). Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. *Food Chemistry: X*. 13: 100217.

McCrindle, R. & Nakamura, E. (1974). Constituents of *Solidago* Species. Part VI. The constitution

of diterpenoids from a chemically distinct variety of *Solidago serotina*. *Can. J. Chem*. 52: 2029–2036.

Estudio Químico del Extracto de Diclorometano de las Flores de *Stevia dictyophylla* B. L. Rob.

McCrindle, R., Nakamura, E. & Anderson, A.B. (1976). Constituents of *Solidago* species. Part VII. Constitution and stereochemistry of the *cis*-Clerodanes from *Solidago arguta* Ait. and of related diterpenoids. *J.C.S. Perkin I*: 1590–1597.

McVaugh, R. (1984). Flora Novo-Galiciana: A descriptive account of the Vascular Plant of Western Mexico. Vol. 2. *Compositae*. Ann Arbor, The University of Michigan Press. 1157.

Muanda, F. N., Soulimani, R., Diop, B. & Dicko, A. (2011). Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *Stevia rebaudiana* leaves. *LWT- Food Science and Technology*. 44: 1865–1872.

Pang, Z., Chen, J., Wang, T., Gao, C., Li, Z., Guo, L., Xu, J. & Cheng, Y. (2021). Linking plant secondary metabolites and plant microbiomes: A review. *Frontiers Plant Science*. 12: 621276.

Rajbhandari, A. & Roberts, M. F. (1985). The flavonoids of *Stevia microchaeta*, *S. monardifolia* and *S. origanoides*. *Journal of Natural Products*. 48(3): 502–503.

Rodríguez-Craveró, J. F., Gutiérrez, G. D., Katinas, L., Grossi, M. A., Bonifasino, J. M. & Marchesi, E. (2019). A revision and morphological analysis of the Uruguayan species of *Stevia* (Compositae, Eupatoriae). *Rodriguésia*, 70.

Rolnik, A., & Olas, B. (2021). The Plants of the Asteraceae family as agents in the protection of human health. *International Journal of Molecular Sciences*. 22(6): 3009.

Román, L. U., del Río, R. E., Hernández, J. D., Joseph-Nathan, P. Zabel, V. & Watson, W. H. (1981). Structure, chemistry, and stereochemistry of Rastevione, a sesquiterpenoid from the genus *Stevia*. *Tetrahedron*. 37(16): 2769–2778.

Román, L. U., Mora, Y., & Hernández, J. D. (1990). *Stevia serrata*, a source of chamazulene. *Fitoterapia*, 61(1).

Estudio Químico del Extracto de Diclorometano de las Flores de *Stevia dictyophylla* B. L. Rob.

- Román, L. U., Cambrón, J. I., del Río, R. E., Hernández, J. D., Cerda-García-Rojas, C. M. & Joseph-Nathan, P. (2000). Grindelane diterpenoids from *Stevia subpubescens*. *Journal of Natural Products*. 63(2): 226–229.
- Rose, A. F. (1980). Grindelane diterpenoids from *Chrysothamnus nauseosus*. *Phytochemistry*, 19(12), 2689–2693.
- Rzedowski, J. & Calderón de Rzedowski, G. (2001). Flora Fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología, A.C. y Centro Regional del Bajío. Pátzcuaro, Michoacán. 1406 pp.
- Sánchez-Arreola, E., Cerda-García-Rojas, C. M., Joseph-Nathan, P., Román, L. U. & Hernández, J. D. (1995). Longipinene derivatives from *Stevia serrata*. *Phytochemistry*, 39(4): 853–857.
- Singh, P., Kumari, M., Prakash, H. G. Rao, G. P. & Solomon, S. (2019). Phytochemical and pharmacological importance of Stevia: A calorie-free natural sweetener. *Sugar Tech*. 1–8.
- Silva, L., Gomes, A. C., & Rodilla, J. M. (2011). Diterpene lactones with labdane, halimane and clerodane frameworks. *Natural Product Communications*. 6(4): 497–504.
- Soejarto, D.D. (2002). Botany of *Stevia* and *Stevia rebaudiana*. In *Stevia*. The Genus *Stevia*; Kinghorn, A.D., Ed.; Taylor and Francis: London, UK, Chap. 2; pp. 18–39.
- Soejarto, D. D., Compadre, C. M., Medon, P. J., Kamath, S. K. & Kinghorn, A. D. (1983). Potential sweetening agents of plant origin II. Field search for sweet-tasting *Stevia* species. *Economic Botany* 37: 71–78.
- Sosa, V. E., Gil, R., Oberti, J. C., Kulanthaivel, P., & Herz, W. (1985). Sesquiterpene Lactones and Flavones from *Stevia procumbens*. *Journal of Natural Products*, 48(2): 340–341.
- Sosa, V. E., Oberti, J. C., Prasad, J. S. & Herz, W. (1984). Flavonoids and Eupahakonenin B from *Stevia satureiaefolia*. *Phytochemistry*. 23: 1515–1516.

- Sülsen, V. P., Lizarraga, E. F., Elso, O. G., Cerny, N., Sanchez Alberti, A., Bivona, A. E., Malchiodi, E. L., Cazorla, S. I. & Catalán, C. A. N. (2019). Activity of Estafietin and Analogues on *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania braziliensis*. *Molecules*. 24(7): 1209.
- Taiz, L., Zeiger, E. (2006). *Secondary metabolites and plant defense*. In *Plant Physiology*. Chapter 13. Vol. I. pp 533–535.
- Tholl, D. (2015). Biosynthesis and biological functions of terpenoids in plants. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, 148: 63–106.
- Villaseñor J. L. (2016). Checklist of the native vascular plants of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87: 559–902.
- Villaseñor, J. L. (2018). Diversidad y distribución de la familia *Asteraceae* en México. *Botanical Sciences*, 96(2): 332–358.
- Yang, W., Chen, X., Li, Y., Guo, S., Wang, Z. & Yu, X. (2020). Advances in pharmacological activities of terpenoids. *Natural Product Communications*. 15(3): 1–13.
- Zdero, C., Bohlmann, F., King, R. M. & Robinson, H. (1988). The first 12.8 β -germacrolide and other constituents from Bolivian *Stevia* species. *Phytochemistry*. 27(9): 2835–2842.
- Zerbe, P. & Bohlmann, J. (2015). Enzymes for synthetic biology of ambroxide-related diterpenoid fragrance compounds. In: Schrader, J., Bohlmann, J. (eds) *Biotechnology of Isoprenoids*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, vol 148. pp 427–447. Springer.
- Zygadlo, J. A., Ariza-Espinar, L., Velasco-Negueruela, A., & Perez-Alonso, M. J. (1997). Volatile constituents of *Stevia achalensis* Hieronymus. *Flavour and Fragrance Journal*, 12(4), 297–299.