



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**“ESTUDIO QUÍMICO Y ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE
Verbesina parviflora”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

PRESENTA:

Q.F.B. JORGE GALILEO RUIZ JIMENEZ

ASESORES:

DOCTOR EN QUÍMICA MARIO ARMANDO GÓMEZ HURTADO

**DOCTORA EN CIENCIAS ROSA ELVA NORMA DEL RÍO
TORRES**

DEDICATORIA

Al Señor Dios por todas las oportunidades y experiencias brindadas.

A mi madre Elda Jiménez Custodio por darme la vida, enseñanzas, motivaciones, cariño infinito y siempre impulsando mi formación profesional.

A mis hermanas Elda Georgina Ruíz Jiménez, Heidy Ruíz Jiménez y Erandi Soledad Ruíz Jiménez por su constante apoyo y compañía en todo momento.

A mi esposa Idalia Palomares Olivo por su total apoyo, fiel compañía, paciencia y amor en todos mis proyectos profesionales, personales y de vida.

AGRADECIMIENTOS

ASESORES DE TESIS

Al **D.Q. Mario Armando Gómez Hurtado** por permitirme ingresar al laboratorio y al grupo de trabajo, asignarme tema de tesis, conducirme científica y académicamente hasta la culminación del presente trabajo.

A la **D.C. Rosa Elva Norma del Río Torres** por sus experimentadas y contundentes aportaciones durante el desarrollo este trabajo y su sinceridad en todo momento.

AL COMITÉ TUTORAL

Por la revisión, evaluación y recomendaciones de la presente tesis.

D.C. Luisa Urania Román Marín

D.C. Janett Betzabe González Campos

D.Q. Gabriela Rodríguez García

Un agradecimiento especial al **D.C. Juan Diego Hernández Hernández** por las remarcables aportaciones realizadas en cada seminario.

Al IIQB-UMSNH por proporcionar las instalaciones, material y equipos para la realización de este trabajo.

A la M.C. Concepción Armenta Salinas y al Q.F.B. José Manuel Zaragoza Ríos por la obtención de los espectros en RMN a 400 MHz.

Al D.Q. Juan Pablo García Merinos, por la obtención de los espectros de Infrarrojo.

A los Doctores Pedro Joseph-Nathan y Carlos M. Cerda García Rojas del Departamento de Química del CINVESTAV, por su invaluable ayuda en la realización de este trabajo, así como a su equipo de auxiliares de investigación, en especial a la Q.F.B. Angelina Hernández Barragán, por la difracción de Rayos X, Q.F.B. Verónica Reyes Olivares por la determinación de espectros de UV y rotación específica, Q.F.B. Yolanda Mora Reyes y Q.F.B. Elvia Celina Álvarez Cisneros por la determinación de los espectros de RMN a 300 MHz, Q.F.B. Nadia Azucena Pérez Rojas por la determinación de los espectros de masa.

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 dirección del D.Q. Mario Armando Gómez Hurtado y de la D.C. Rosa Elva Norma del Río Torres. Con una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) con número de registro 515426 y apoyo económico de **PROMEP-PTC-332, CECTI y CIC-UMSNH.**

ÍNDICE

SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	III
RESUMEN	V
ABSTRACT	VI
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. La Familia Asteraceae	4
2.2. El género <i>Verbesina</i>	4
3. JUSTIFICACIÓN	12
4. OBJETIVOS	13
4.1. Objetivo general	13
4.2. Objetivos específicos	13
5. METODOLOGÍA	14
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	15
6.1. Colecta e identificación de la especie	15
6.2. Obtención de los extractos de <i>Verbesina parviflora</i>	15
6.3. Análisis químico del extracto hexánico de las hojas	16
6.4. Análisis químico del extracto de acetato de etilo de las hojas	31
6.5. Análisis químico del extracto metanólico de las hojas	63
6.6. Análisis químico del extracto hexánico de las flores	65
6.7. Análisis químico del extracto de acetato de etilo de las flores	70

6.8. Análisis químico del extracto metanólico de las flores	72
6.9. Ensayo de la actividad antioxidante mediante el método de DPPH	74
7. CONCLUSIONES	77
8. PARTE EXPERIMENTAL	81
8.1. Material vegetal	81
8.2. Obtención de extractos	81
8.3. Métodos instrumentales	81
8.4. Cromatografía de los extractos	83
9. BIBLIOGRAFÍA	94

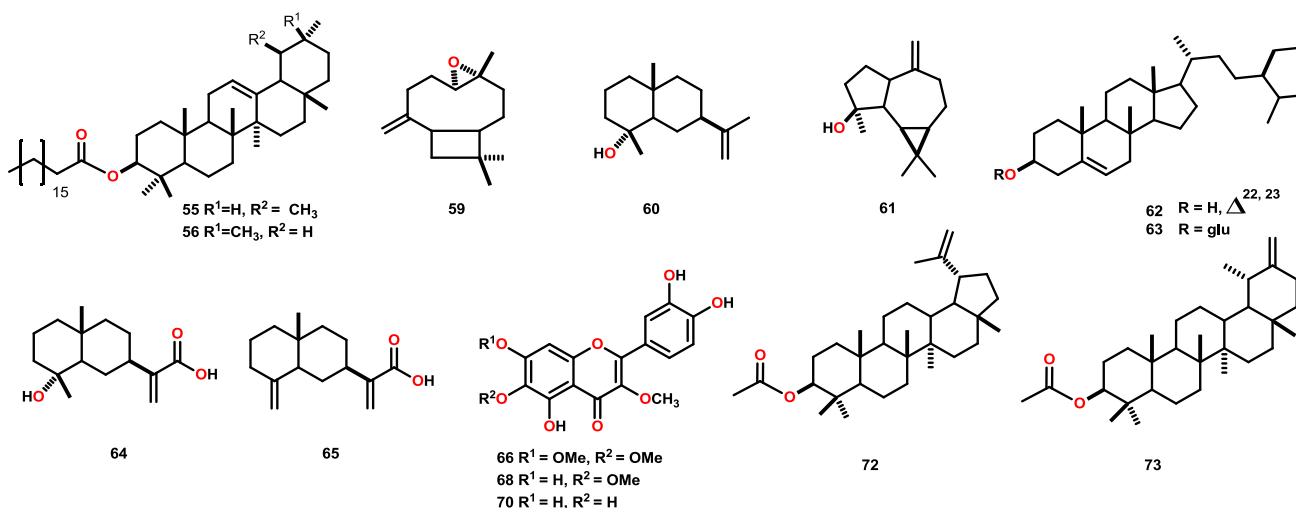
SÍMBOLOS, ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

δ	Desplazamiento químico
Ac	Grupo acetilo
AcOEt	Acetato de etilo
COSY	COrrrelation SpectroscopY
<i>c</i>	Concentración
d	Señal doble
da	Señal doble ancha
dc	Señal doble de cuádruples
dd	Señal doble de doble
ddd	Señal doble de dobles de dobles
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
DMSO	Dimetilsulfóxido
EROs	Especies reactivas de oxígeno
ERNs	Especies reactivas de nitrógeno
dt	Señal doble de triples
g	Gramos
h	Horas
HETCOR	Heteronuclear Correlation Spectroscopy
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
Hz	Hertz
IR	Infrarrojo
CE ₅₀	Concentración efectiva 50
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
μ M	Micromolar
m	Señal múltiple

Me	Grupo metilo
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
MHz	Mega Hertz
Min	Minutos
mL	Mililitros
nm	Nanómetros
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
OAc	Grupo acetoxi
OMe	Grupo metoxi
ppm	Partes por millón
Py	Piridina
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN de ^1H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RMN de ^{13}C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono trece
s	Señal simple
sa	Señal Simple ancha
t	Señal triple

RESUMEN

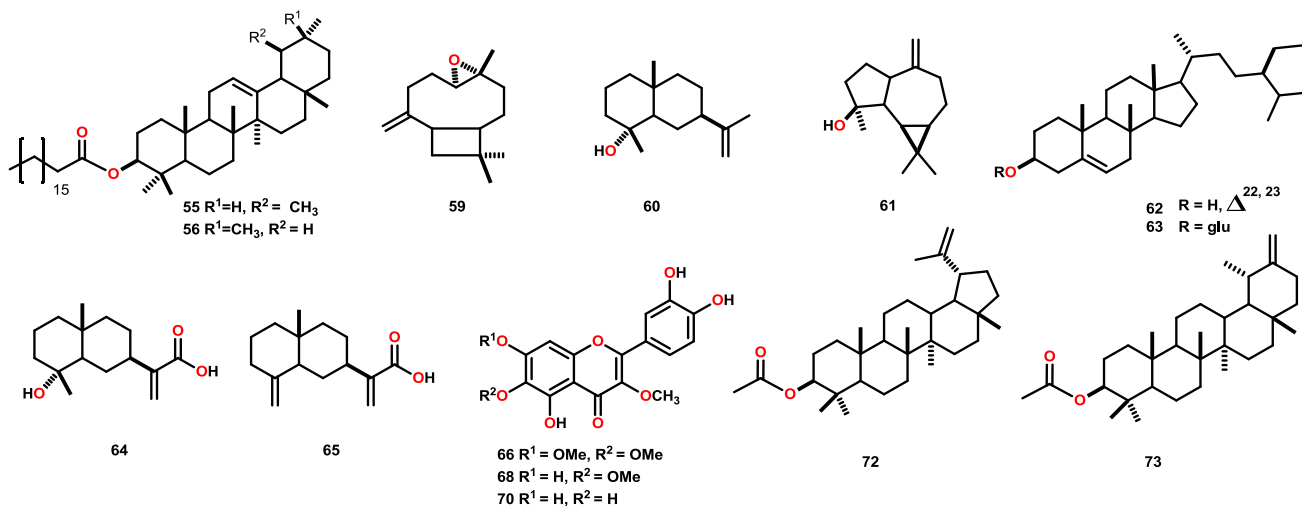
Los compuestos aislados de las plantas presentan un papel muy importante en el desarrollo de fármacos. La búsqueda de compuestos con aplicaciones médicas así como la contribución al conocimiento del género *Verbesina* nos lleva al estudio fitoquímico de la especie *V. parviflora*, así como a la evaluación antioxidante de los metabolitos aislados e identificados. El presente trabajo describe el estudio químico de los extractos de hexanos, acetato de etilo y metanol de hojas y flores de *V. parviflora* y el potencial antioxidante de los compuestos aislados. Del extracto hexánico de hojas se obtuvo la mezcla de estearato de α - y β -amirina (**55**, **56**), en polaridades mayores se obtuvo al epóxido de β -cariofileno (**59**), eudesmenol (**60**), espathulenol (**61**) y estigmasterol (**62**). Del extracto de AcOEt de las hojas se aislaron e identificaron al glucósido de β -sitosterol (**63**), ácido ilícico (**64**), ácido cóstico (**65**), chrysosplenol D (**66**), axillarina (**68**) y quercetagetina 3-metil éter (**70**). Del extracto de hexanos y de AcOEt de flores, se identificó a la mezcla de acetato de lupeólido (**72**) y acetato de taraxasterilo (**73**). Del extracto metanólico de flores se determinó la presencia de los flavonoides **66**, **68** y **70**. Los compuestos aislados fueron identificados mediante métodos físicos, químicos y espectroscópicos. Adicionalmente, se evaluó el potencial de captura de radicales libres empleando el 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH). El ácido ilícico (**64**) mostró una ligera actividad antioxidante (CE_{50} 2.2 mM); mientras que el chrysosplenol D (**66**) mostró una CE_{50} de 17.1 μ M y la axillarina (**68**) una CE_{50} de 11.4 μ M. Los compuestos **55**, **56**, **59**, **61-63** y **65** no presentaron actividad antioxidante.



Palabras clave: *Verbesina parviflora*, Asteraceae, actividad antioxidante.

ABSTRACT

Compounds isolated from plants represent an important role in pharmaceutical development. The research of chemical compounds with potential medical applications, as well as phytochemical contributions, lead us to develop the phytochemical study of leaves and flowers from *V. parviflora*, besides the antioxidant evaluation of the isolated compounds. In the present work, the chemical study of the hexanic, AcOEt and methanolic extracts from leaves and flowers of *V. parviflora* is described. From the hexanic extract from leaves α - y β -amyrin (**55**, **56**), β -caryophyllene epoxide (**59**), eudesmenol (**60**), spathulenol (**61**) and stigmasterol (**62**) were isolated. From the AcOEt extract from leaves β -sitosterol β -D-glucoside (**63**), illicic acid (**64**), costic acid (**65**), chrysosplenol D (**66**), axillarin (**68**) and quercetagenin 3-methyl ether (**70**) were isolated. From hexanic and AcOEt extracts from flowers, lupeol acetate (**72**) and taraxasterol acetate (**73**) were identified; while in the methanolic extract, the presence of the flavones **66**, **68** and **70** was determined. The physical, chemical and spectroscopic identification of isolated compounds were carried out. Additionally, the potential antioxidant capability of the isolated compound employing the colorimetric DPPH assay was measured; where the illicic acid (**64**) shown an EC₅₀ of 2204 mM, the chrysosplenol D (**66**) provided an EC₅₀ of 17.1 μ M, and the axillarina (**68**) displayed an EC₅₀ of 11.4 μ M. For compounds **55**, **56**, **59**, **61-63** and **65**, no antioxidant activity was observed.



Keywords: *Verbesina parviflora*, Asteraceae, antioxidant activity.

1. INTRODUCCIÓN

La diversidad florística mundial fue estimada entre 250,000 y 300,000 especies para la primera década del siglo XXI; esta enorme riqueza botánica constituye uno de los pilares de la civilización, pues los seres humanos encuentran en ella los alimentos, fibras, forrajes, pigmentos y muchos otros beneficios; destacando que desde siempre, las plantas han jugado un papel fundamental en el tratamiento de las enfermedades. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que el 80% de los habitantes de países en desarrollo depende de la medicina tradicional, principalmente las plantas, para atender necesidades de salud (Callejas *et al.*, 2008).

Las especies vegetales han constituido durante siglos la principal fuente de agentes medicinales. El enfoque etnomédico ha demostrado ser efectivo para el descubrimiento de nuevos compuestos con actividad biológica que pueden proveer protección contra varias enfermedades (Rong *et al.*, 2004). Estos compuestos conocidos como metabolitos secundarios aparentemente no efectúan funciones vitales en la planta y han sido empleados por los humanos en roles benéficos de diversas aplicaciones (Keeling *et al.*, 2006; Zwenger *et al.*, 2008).

Dentro de los metabolitos secundarios se encuentran los terpenoides, los cuales son una extensa familia, de compuestos que contienen esqueletos de carbono representados por $(C_5)_n$, y se clasifican como hemiterpenos (C_5), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), sesterterpenos (C_{25}), triterpenos (C_{30}) y tetraterpenos (C_{40}) (Dewick 2009).

Algunos terpenoides juegan un papel crucial en las especies vegetales, como ser mensajeros, atrayentes, disuasivos, fitoalexinas, entre otros. Se ha demostrado la actividad biológica de los terpenos y son usados en el tratamiento contra enfermedades como el cáncer, malaria, inflamación y en una variedad de infecciones causadas por virus y bacterias. Clínicamente, algunos terpenoides han destacado, entre estos se encuentra el paclitaxel (**1**) y el sesquiterpeno antimalárico artemisina (**2**) (Figura 1) (Ding *et al.*, 2012).

Entre las causas de los principales problemas de salud crónicos, los dañinos radicales libres y especies reactivas han sido implicados directamente como mediadores de enfermedades crónicas degenerativas y autoinmunes, como son la diabetes, enfermedades vasculares e hipertensión, cáncer, hiperplasias, formación de cataratas, enfisema, artritis, esclerosis múltiple, debilitación del sistema inmunológico así como también procesos de envejecimiento. Los antioxidantes han sido usados en la industria alimenticia para prolongar la conservación de los alimentos, especialmente aquellos ricos en grasas poliinsaturadas. Para frenar los procesos de deterioro, se lleva a cabo la adición de antioxidantes sintéticos, entre ellos el butilato de hidroxianisol (BHA), butilato de hidroxitolueno (BHT) y terbutilhidroquinona (TBHQ). La incorporación de estas sustancias sintéticas con actividad antioxidante en la preservación de alimentos es cuestionada debido al potencial riesgo a la salud y su toxicidad (Mosquera *et al.*, 2009; Tsao *et al.*, 2004).

Los antioxidantes actúan donando átomos de hidrógeno a los radicales; los efectos defensivos de antioxidantes naturales en frutas y vegetales que son relacionados con tres grupos principalmente: vitaminas, fenoles y carotenoides. El ácido ascórbico y fenoles son conocidos como antioxidantes hidrofílicos, mientras los carotenoides son conocidos como antioxidantes lipofílicos (Bondet *et al.*, 1997; Thaipong *et al.*, 2006).

Del género *Verbesina* se han aislado metabolitos secundarios de tipo terpenos (principalmente con esqueleto de eudesmano) flavonoides, alcaloides de guanidina, lactonas, amidas y aceites esenciales (Pérez 1997; Jane *et al.*, 2006;). En la medicina tradicional han sido empleadas para tratar desordenes gastrointestinales, hemorroides, cáncer, como tratamiento antagónico en mordeduras de araña y afectaciones en la piel estudios farmacológicos han demostrado que diferentes extractos de plantas de este género presentan diversa bioeficacia como antimicrobiano, antifúngico, antiviral, antitumoral, hipoglucémico, hipolipidémico y antioxidante. (Jain *et al.*, 2008; Toribio *et al.*, 2004; Sindhu *et al.*, 2011).

2. ANTECEDENTES

2.1. LA FAMILIA ASTERACEAE

La familia de las Asteráceas comprende a las plantas vasculares con mayor número de géneros en el mundo, siendo entre 1,600–1,700 géneros y 2,400–3,000 especies (Moreira-Muñoz *et al.*, 2006). En México se distribuyen en casi todo el territorio, representan el 12-15% de la flora vascular, son especialmente abundantes en zonas con una marcada alternancia entre episodios húmedos y secos. Los Estados de Chiapas, Oaxaca, Veracruz, Jalisco y Michoacán representan al 46.6% del total de la población de especies de esta familia y el 72% de esta población corresponde a especies endémicas (Castelo *et al.*, 2003; Cué-Bar *et al.*, 2006).

2.2. EL GÉNERO *VERBESINA*

Es un género americano de la tribu Heliantheae que comprende aproximadamente 300 especies distribuidas principalmente desde Canadá hasta Argentina (Panero *et al.*, 1997). Para México se reconocen poco más de 180 especies, con lo que se ubica, tras el desmembramiento de *Eupatorium*, como el género más diverso dentro de las compuestas mexicanas. Se conocen dos importantes centros de diversidad, las montañas del centro de México y la porción norte de la cordillera de los Andes (Figura 2) (Carrillo-Reyes *et al.*, 2010).



Figura 2. Distribución geográfica del género *Verbesina*.

En la medicina tradicional, las plantas de éste del género son empleadas para el tratamiento de la *diabetes mellitus*, malestares gastrointestinales, además se les atribuyen efectos anticancerosos, bactericidas, antiparasitarios y antioxidantes, así como también para el tratamiento de mordeduras de serpientes y arañas (Jain *et al.*, 2008).

De los estudios químicos realizados a especies del género *Verbesina*, se tiene reporte que en las partes aéreas de *V. virgata* identificaron a dos eudesmanos funcionalizados con grupos hidroxilo y cinnamatos (**3** y **6**), los cuales, mediante reacciones de acetilación obtuvieron a sus derivados **4** y **7**, respectivamente. Una hidrólisis alcalina de **3** generó al triol **5**. De las reacciones de oxidación efectuadas a **3** reportaron al derivado epoxidado **8** y el dialdehído **9**; la oxidación de **6** generó a la dicetona **10** (Figura 3) (Martínez *et al.*, 1983).

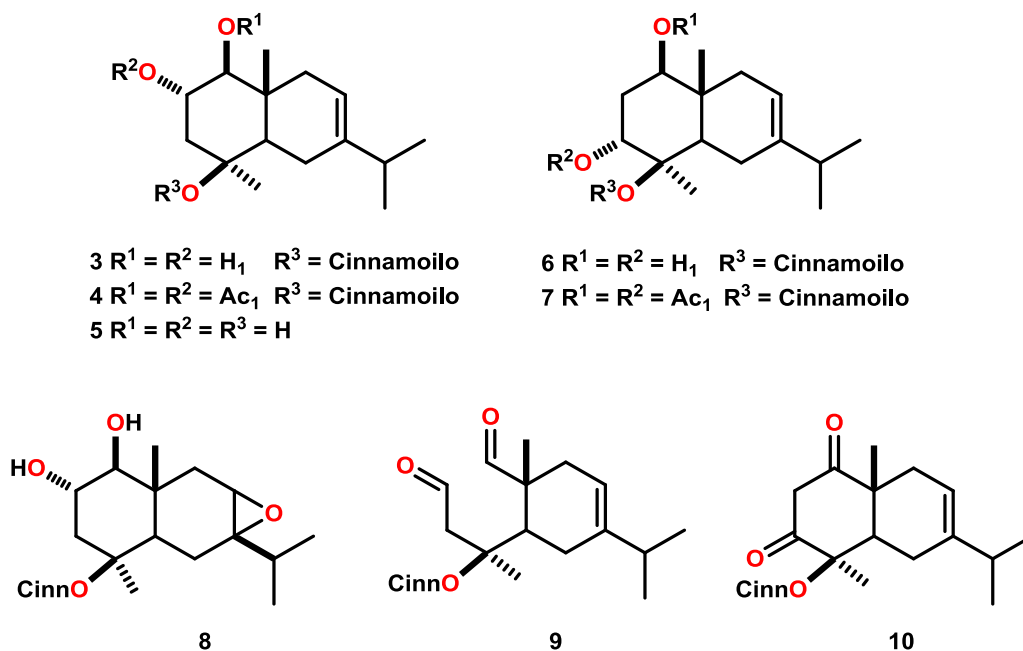


Figura 3. Eudesmanos naturales y preparados de *V. virgata*.

Otros reportes de estudios químicos, demostraron la presencia de eudesmanos esterificados con cinnamato en *V. oerstediana* (**3**, **6**, **11-13**) y en *V. virgata* (**7**) (Figura 4) (Wu *et al.*, 2006).

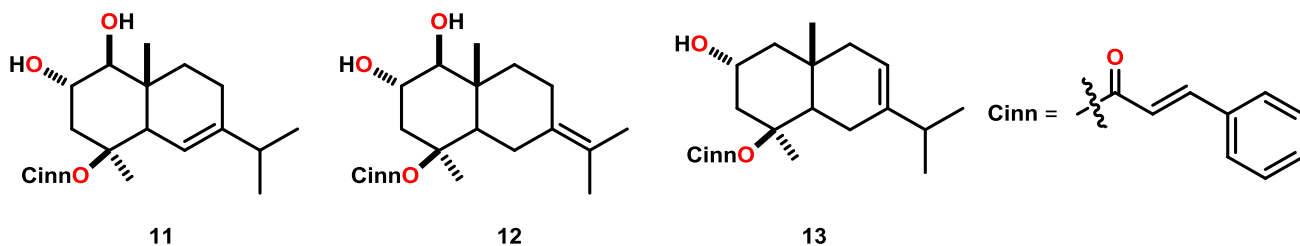


Figura 4. Eudesmanos aislados de *V. oerstediana* y de *V. virgata*.

Por su parte, de *V. turbacensis* fueron identificados los eudesmanos **14-22** (Figura 5) (Amaro-Luis *et al.*, 2002).

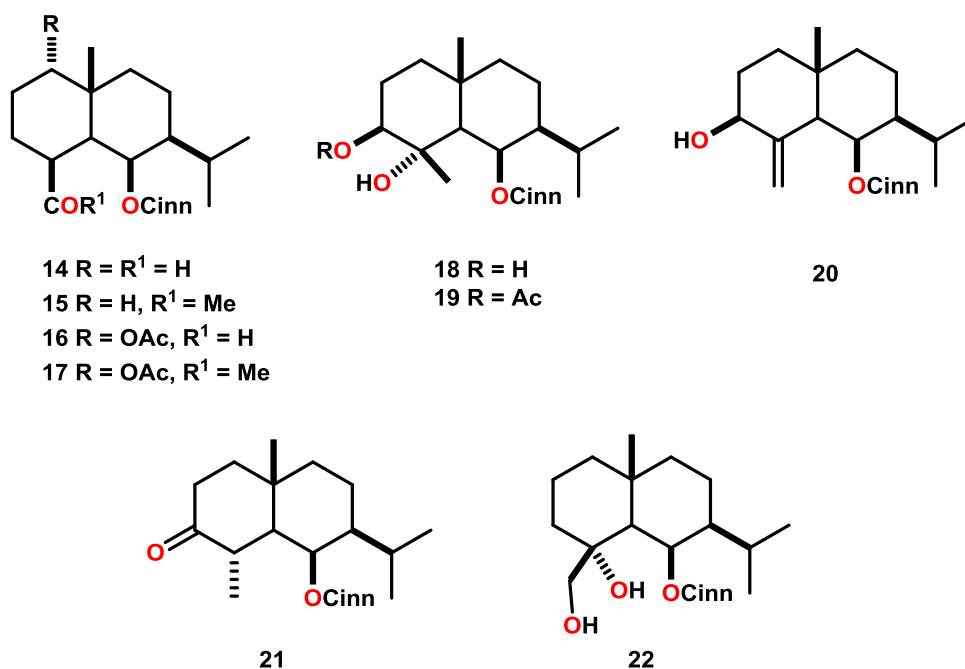


Figura 5. Eudesmanos reportados de *V. turbacensis*.

De las flores y hojas de *V. virginica* obtuvieron a los eudesmanoles esterificados con derivados del ácido *p*-coumárico **23-25** (Xu *et al.*, 2010). Otros estudios hacen referencia que en extractos etanólicos y de acetona de las hojas y flores de *V. turbacensis* aislaron dos nuevos eudesmanos **26** y **27** funcionalizados con un grupo cinnamato (Figura 6) (Bruno-Colmenárez *et al.*, 2010).

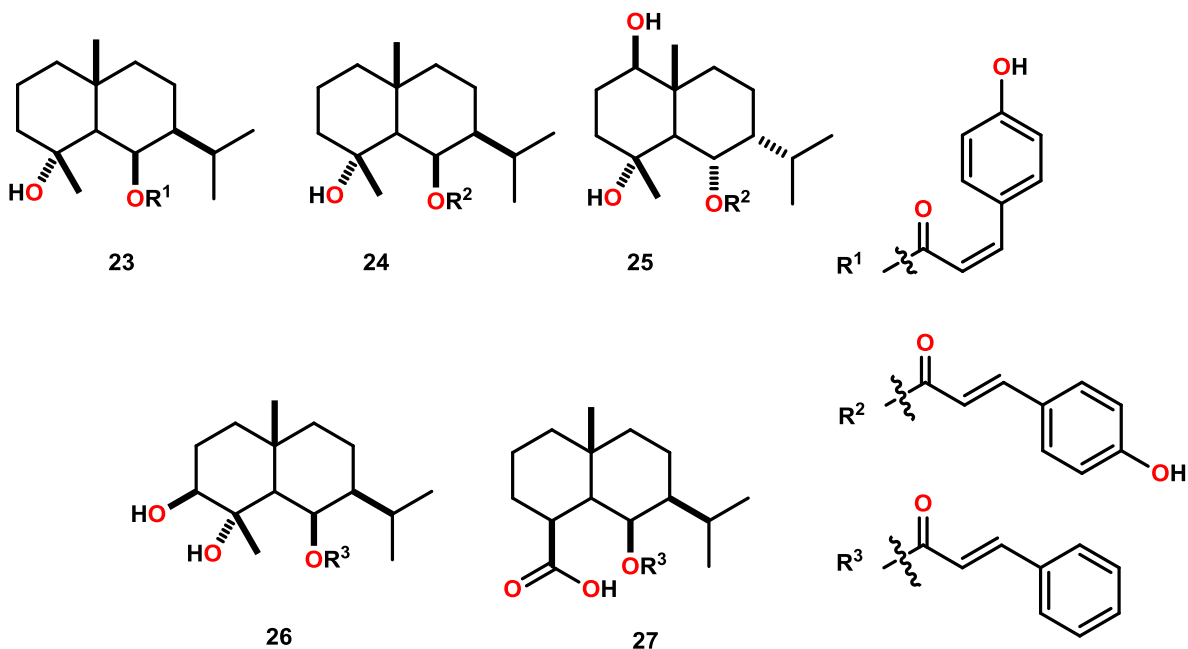


Figura 6. Eudesmanos aislados de *V. virginica* y *V. turbacensis*.

Del extracto clorofórmico obtenido de las partes aéreas de *V. negrensis*, reportaron la presencia de un nuevo germacreno esterificado con ácido cinnámico (**28**) (Figura 7) (Mora *et al.*, 2013).

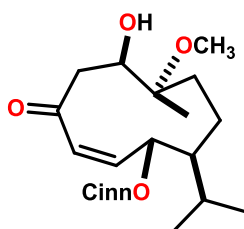


Figura 7. Germacreno aislado de *V. negrensis* (**28**).

De *V. seattonii*, reportaron seis compuestos (Figura 8) con esqueletos de elemanólida funcionalizados con grupos hidroxilo, isobutirato, aldehído y acetilo (**29-40**) (Ortega *et al.*, 1985).

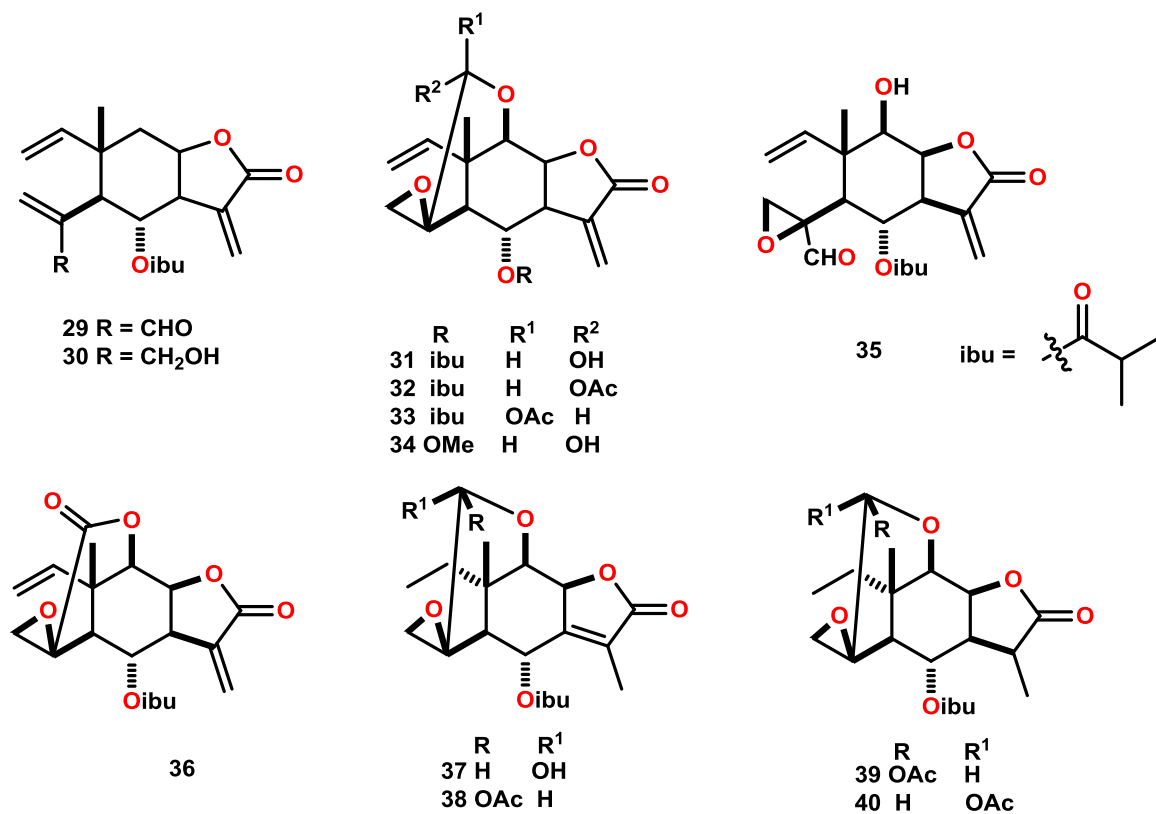


Figura 8. Sesquiterpenos de tipo elemanólida.

Del extracto metanólico de la especie venezolana *V. caracasana* reportaron al derivado de guanidina denominado caracasanamida (**41**) (Figura 9), el cual presentó actividad hipotensiva (Delle Monache *et al.*, 1999).

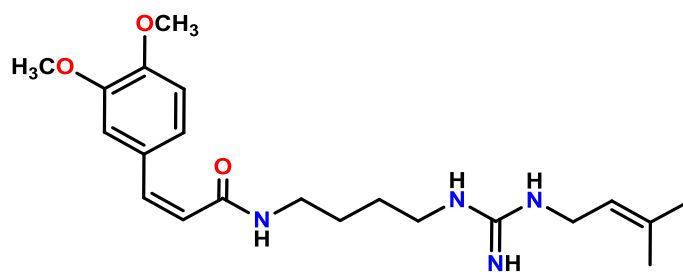


Figura 9. Caracasanamida (**41**).

A partir de la guanidina **41** reportaron la preparación del derivado dimérico **42** a través de reacciones fotoquímicas, este mostró efectos cardiovasculares interesantes (Figura 10) (Carmignani *et al.*, 1999).

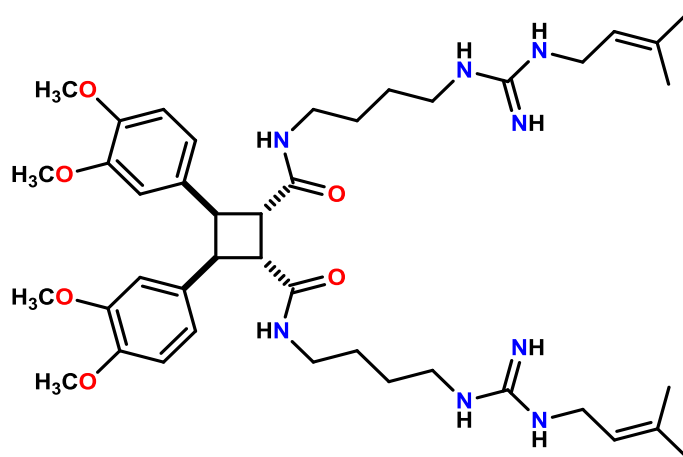


Figura 10. Dímero de caracasanamida (**42**).

De estudios realizados en *V. sphaerocephala* colectada en Soyotlán, Jalisco (Salomón *et al.*, 1985), aislaron al verocefol (**43**), y mediante un tratamiento con anhídrido acético-piridina obtuvieron al mono **44** y diacetato **45** correspondientes (Figura 11).

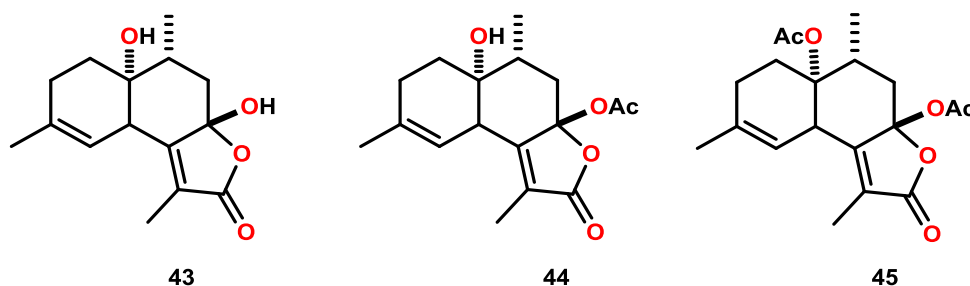


Figura 11. Eudesmanólidas aisladas y preparadas de *V. sphaerocephala*.

Por otra parte, los estudios efectuados a *V. encelioides*, demostraron que la toxicidad reportada de esta especie era atribuida a 3-metil-2-butenilguanidina también conocida como galegina (**46**), un alcaloide con núcleo de guanidina (Figura 12) (Oelrichs *et al.*, 1981).

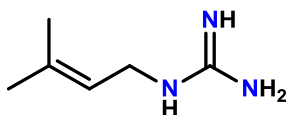


Figura 12. Galegina (46).

El estudio químico de extractos polares de *V. myricephala* evidenció la presencia de un nuevo flavonoide glicosilado, el cual fue identificado como rhamnocitrina-3-glucorónido (47) (Figura 13) (Hildebert *et al.*, 1974).

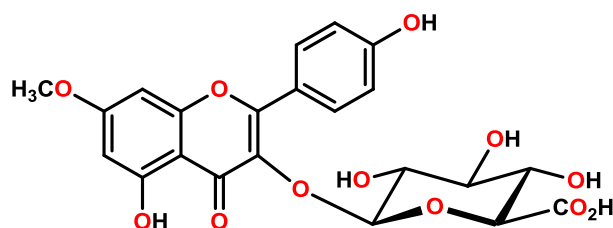


Figura 13. Rhamnocitrina-3-glucorónido (47).

Los estudios realizados en los extractos polares de flores y hojas de *V. encelioides* registraron la presencia de quercetina-3-galactósido (48), quercetina-3-galactósido-7-glucósido (49) y quercetina-3-xylósido-7-glucósido (50) (Glennie *et al.*, 1980) (Figura 14).

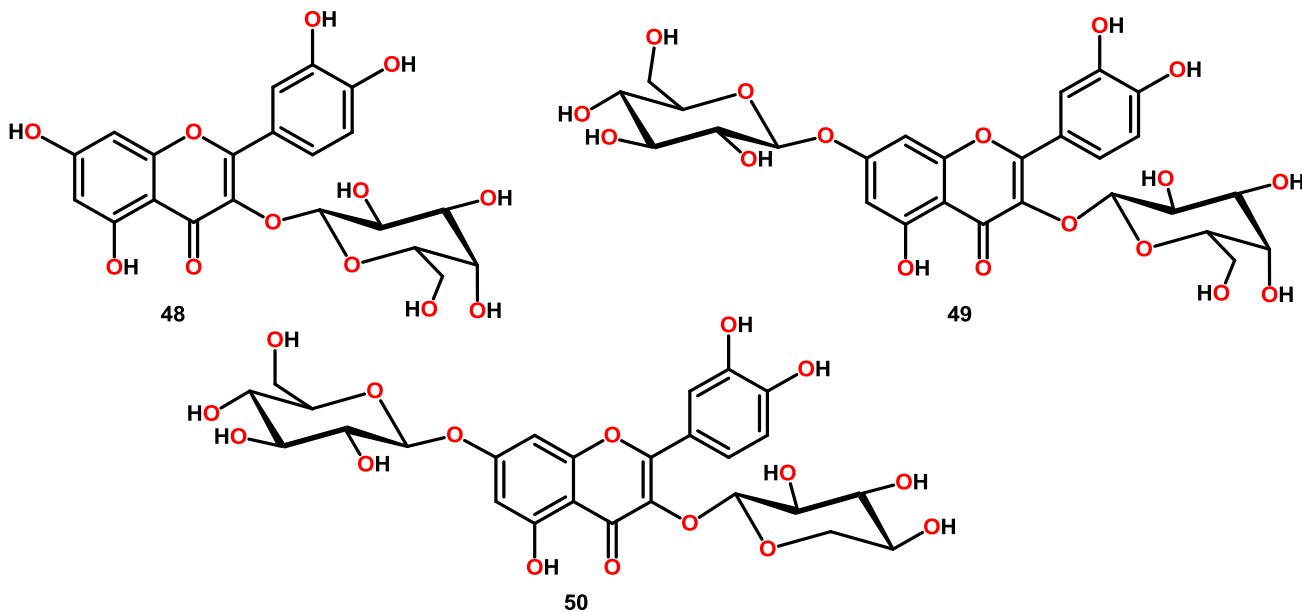


Figura 14. Flavonoides glicosilados de *V. encelioides*.

En un estudio de captura de radicales libres por el método DPPH del extracto acuoso de la raíz de *V. encelioides*, se encontró un porcentaje de inhibición del 20% a una concentración de 80 µg/mL, comparada con el estándar de quercetina de 95% y del ácido ascórbico de 98%, ambos a la misma concentración. Otras Investigaciones sobre los extractos acuosos de flores, hojas y tallos de *V. encelioides* reportaron una potente capacidad nematocida contra *Meloidogyne javanica*, realizada en experimentos *in vitro*. (Jain *et al.*, 2008; Oka, 2012). Por otro lado, se han empleado extractos frescos de tallos y hojas de *V. encelioides* para generar nanopartículas de plata (Malik *et al.*, 2013).

En un estudio químico de los aceites esenciales de las hojas de *V. diversifolia*, reportaron al biciclogermacreno (**51**) y germacreno-D-4-ol (**52**) (Jane *et al.*, 2005) (Figura 15).

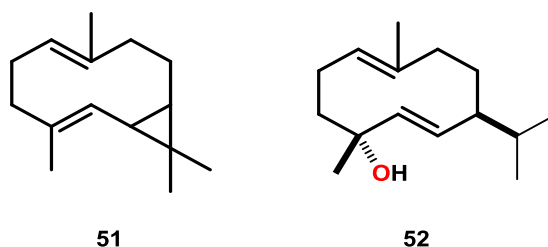


Figura 15. Germacrenos aislados *V. diversifolia*.

En nuestro grupo de trabajo se llevó a cabo el estudio químico preliminar de las raíces de *V. parviflora*, de la cual se obtuvieron a los derivados de borneol **53** y **54** (Figura 16) (Cruz, 2011).

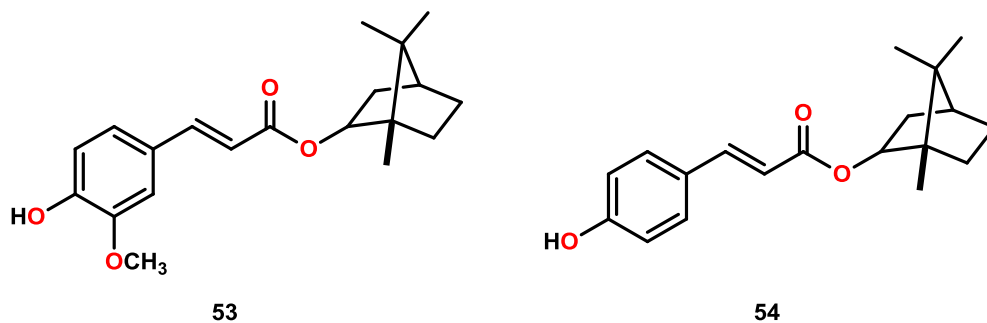


Figura 16. Ferulato **53** y *p*-cumarato de bornilo (**54**).

3. JUSTIFICACIÓN

De acuerdo a los antecedentes del género *Verbesina*, en los que se establece la presencia de metabolitos secundarios diversamente funcionalizados, y a que pocas especies de este género han sido estudiadas, surge el interés de llevar a cabo el estudio químico de hojas y flores de *Verbesina parviflora*, así como evaluar el potencial antioxidante de los metabolitos aislados. Con este estudio se pretende continuar el análisis fitoquímico de esta especie, ya que existe un estudio químico preliminar del extracto hexánico de raíces realizado por nuestro grupo de trabajo.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GENERAL

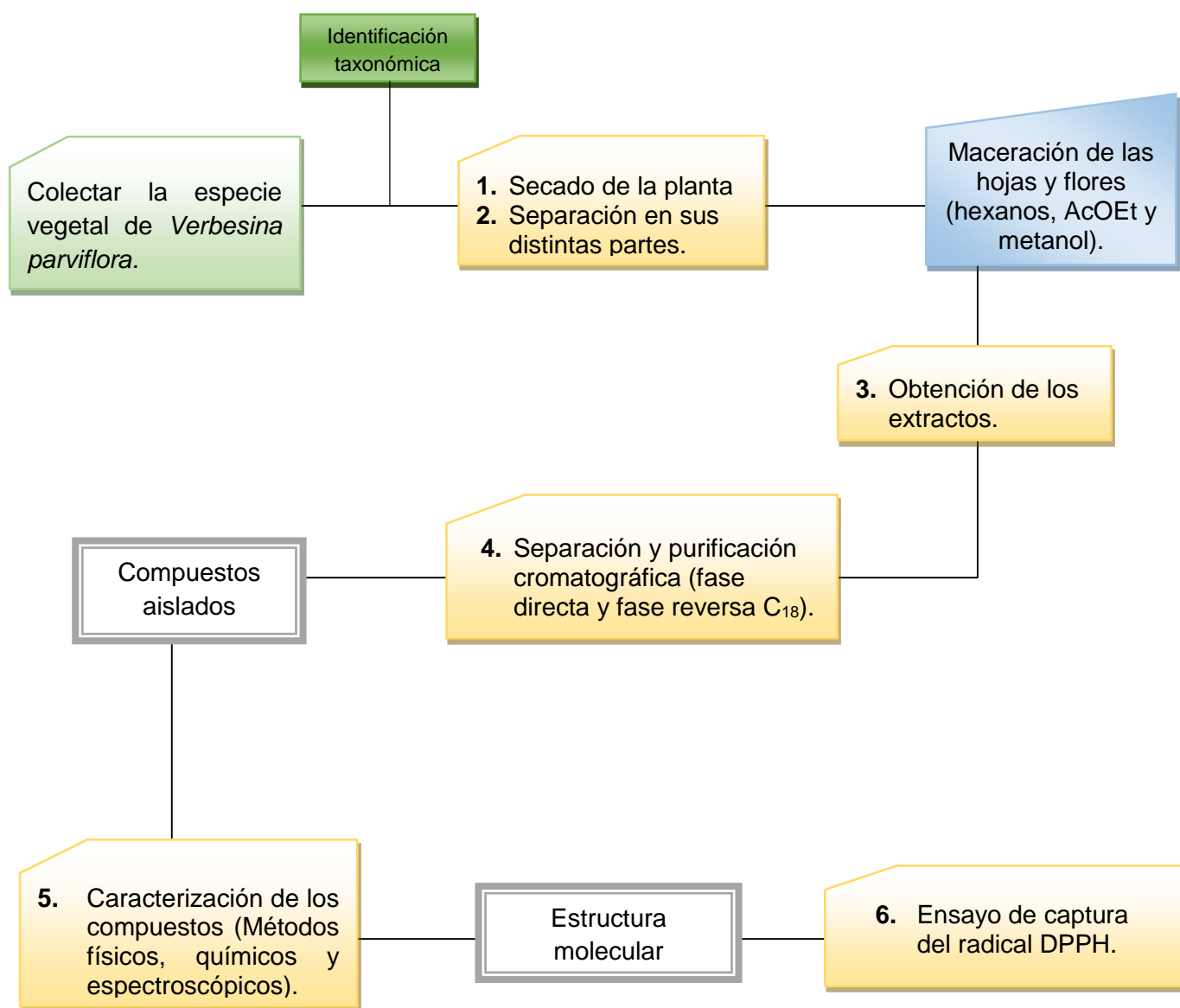
Realizar el estudio químico de hojas y flores de *Verbesina parviflora*, así como evaluar la actividad del potencial antioxidante de los metabolitos aislados mediante el ensayo de captura de radicales libres.

4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener los extractos de hexanos, acetato de etilo y metanol de las hojas y flores de *V. parviflora*.
2. Aislar mediante técnicas cromatográficas los componentes mayoritarios de los extractos de *V. parviflora*.
3. Caracterizar los compuestos químicos aislados mediante métodos físicos y espectroscópicos.
4. Evaluar el potencial antioxidante en metabolitos aislados de interés, mediante ensayos de captura de radical libre por el método de DPPH.

5. METODOLOGÍA

La metodología empleada en el desarrollo de este trabajo se muestra en el siguiente diagrama:



6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 COLECTA E IDENTIFICACIÓN DE LA ESPECIE

Verbesina parviflora se colectó en el km 3.5 de la carretera Tiripetío–Villa Madero, Michoacán. Se preparó una muestra y se envió al Instituto de Ecología, A.C., en Pátzcuaro, Michoacán, para su identificación botánica por el profesor Jerzy Rzedowski.

6.2 OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS DE *Verbesina parviflora*

La especie se separó en sus distintas partes (flores, hojas, tallos y raíces), se secaron a la sombra, obteniéndose 450 g de hoja y 280 g de flor, posteriormente se procedió a realizar la obtención de los extractos mediante el método de maceración con hexanos, acetato de etilo y metanol durante 3 días por triplicado obteniéndose a sus respectivos extractos (Tabla 1).

Tabla 1. Cuantificación de los extractos obtenidos de las partes aéreas de *V. parviflora*.

HOJAS	PESO	FLORES	PESO
Extracto hexánico	20 g	Extracto hexánico	15 g
Extracto de AcOEt	28 g	Extracto de AcOEt	9 g
Extracto de metanol	13 g	Extracto de metanol	6 g

6.3 ANÁLISIS QUÍMICO DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE LAS HOJAS

De un lote de 20 g de extracto de las hojas, se llevó a separación mediante cromatografía en columna utilizando como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil mezclas de hexanos-AcOEt, en orden de polaridad creciente, obteniéndose 123 fracciones de 100 mL cada una. De las fracciones 15-17, obtenidas en la polaridad hexanos-AcOEt (9:1) se obtuvo un precipitado, el cual, tras sucesivos lavados con hexanos, se obtuvo un sólido blanco. En su espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) destacan en 5.17 y 5.11 ppm, dos señales triples $J = 4.0$ Hz, pertenecientes a los protones vinílicos H-12 y H 12'; en 4.52 ppm se ubica una señal múltiple perteneciente al protón base de éster H-3; a campo alto se localiza en 1.25 ppm la señal simple e intensa típica de un ácido graso saturado; en 1.12 ppm se observa la señal simple de los protones del grupo metilo H-27; entre 0.86 y 0.82 ppm se observan las señales de los metilos terciarios que se asignan a H-28, H-29 (Figura 17).

Los datos obtenidos fueron comparados con los descritos (Lui *et al.*, 1998) encontrando que se trata de una mezcla de ésteres de α - y β -amirina (**55**, **56**).

La hidrólisis básica de la mezcla de ésteres de α - y β -amirina (**55**, **56**), empleando THF como disolvente y KOH como base, a reflujo durante 8 horas, condujo a la mezcla de los productos de hidrólisis **57** y **58**. En su espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) se observa un cambio en el desplazamiento del protón metínico H-3 en 3.20 ppm (Figura 18). El estudio por espectrometría de masa permitió determinar la presencia de ácido esteárico como sustituyentes en ambos triterpenos.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

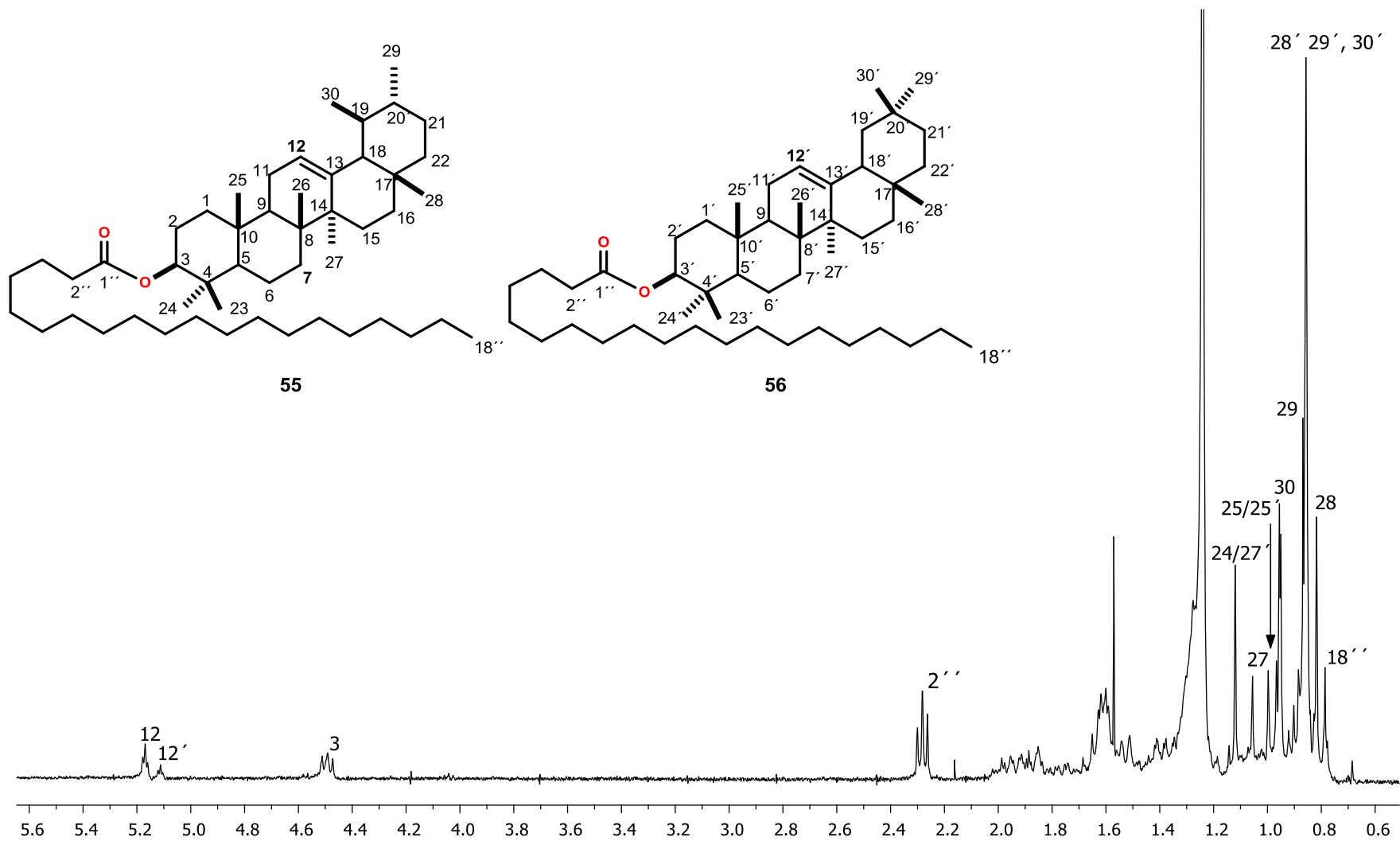


Figura 17. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz de la mezcla de estearatos **55** y **56**, en CDCl₃.

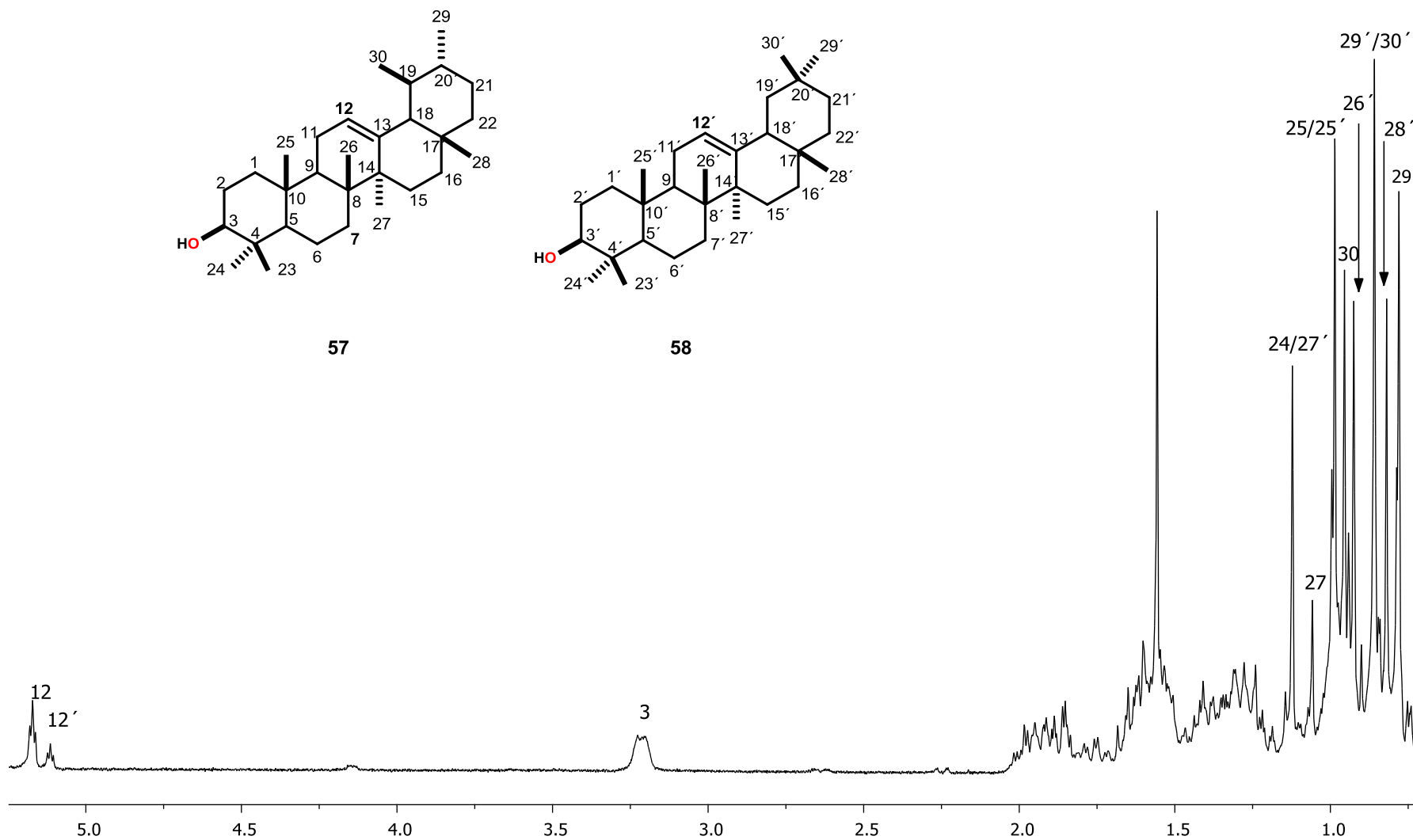


Figura 18. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz de la mezcla de α - y β -amirina (57, 58), en CDCl_3 .

Las fracciones 23-29 obtenidas con la polaridad hexanos-AcOEt (9:1) se recromatografiaron en columna abierta utilizando como fase estacionaria gel de sílice y mezclas de hexanos-AcOEt en polaridad ascendente como eluyente, obteniendo un total de 108 fracciones de 5 mL cada una. De esta recromatografía, en la fracción 14 obtenida en la polaridad hexanos-AcOEt (44:1) se aisló una miel color café. En su espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), se observa en 4.96 ppm la señal doble con $J = 1.6$ Hz, así como la señal doble en 4.85 ppm con $J = 1.6$ Hz, correspondientes a los protones del doble enlace exocíclico H-13a y H-13b, respectivamente; a campo alto en 2.88 ppm se observa una señal doble de dobles $J = 11.0, 4.0$ Hz, asignada al protón base de epóxido (H-5); en 2.65 ppm se ubica una señal múltiple, perteneciente al protón del metínico H-9; entre 2.33-0.93 ppm se localizan las señales múltiples correspondientes a los protones metilénicos H-2, H-3, H-6, H-7 y H-10, así como el metino H-1 ; en 1.76 ppm se ubica la señal triple $J = 10.4$ del H-1; finalmente, entre 1.20-1.00 ppm se encuentran las señales de los metilos H-12, H-14 y H-15. (Figura 19). En el espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3), se observan 15 señales de las que resaltan en 152.0 y 112.8 ppm las señales de los carbonos vinílicos C-8 y C-13, respectivamente; en 63.7 y 59.7 ppm se ubican dos señales de los carbonos base de epóxido (C-5 y C-4); entre 51.9-16.9 ppm se localizan las señales de los carbonos restantes (Figura 20). Los desplazamientos encontrados fueron iguales a los descritos (Berry *et al.*, 1985) para el epóxido de β -cariofileno (**59**).

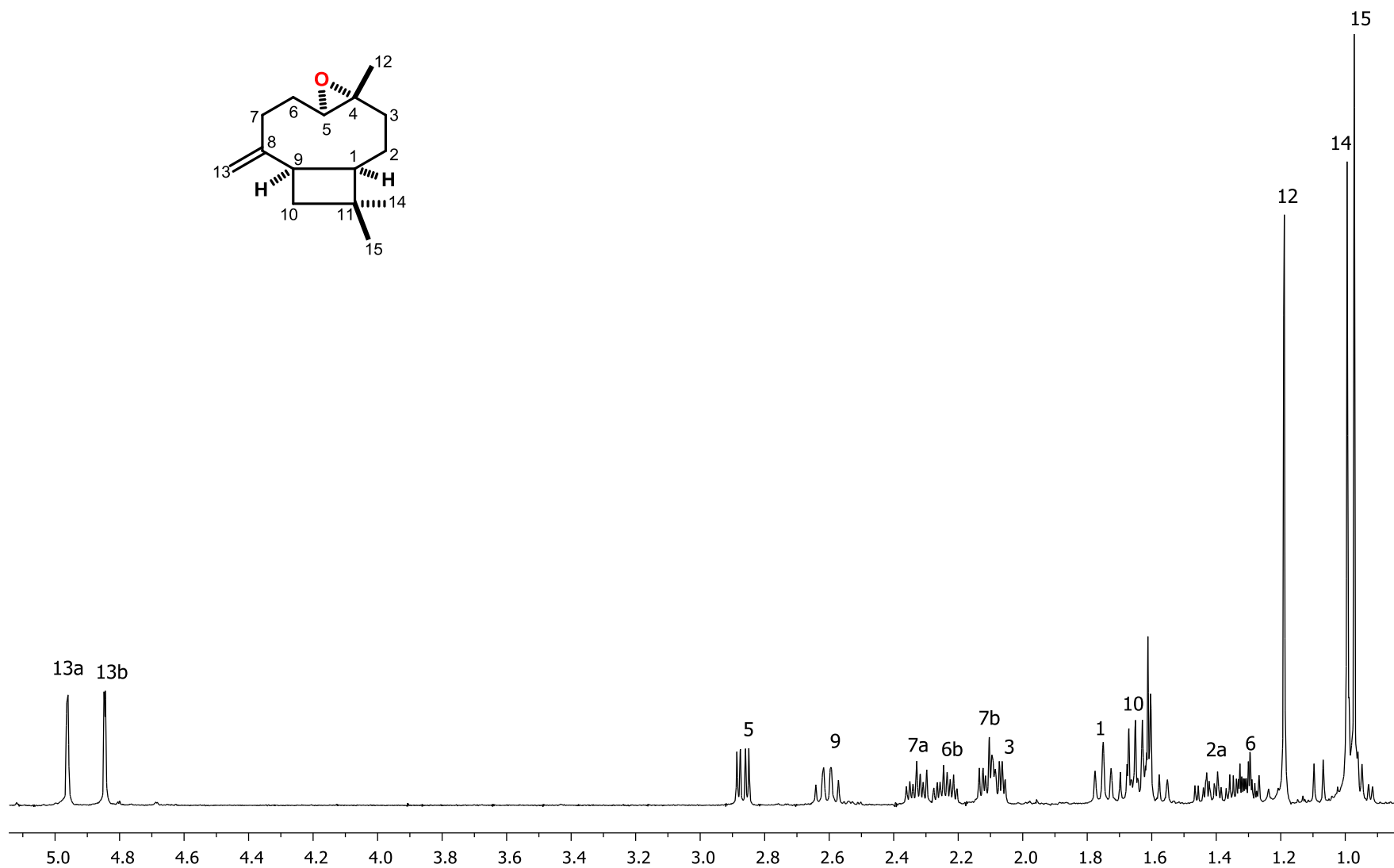


Figura 19. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del epóxido de β -cariofileno (59), en CDCl_3 .

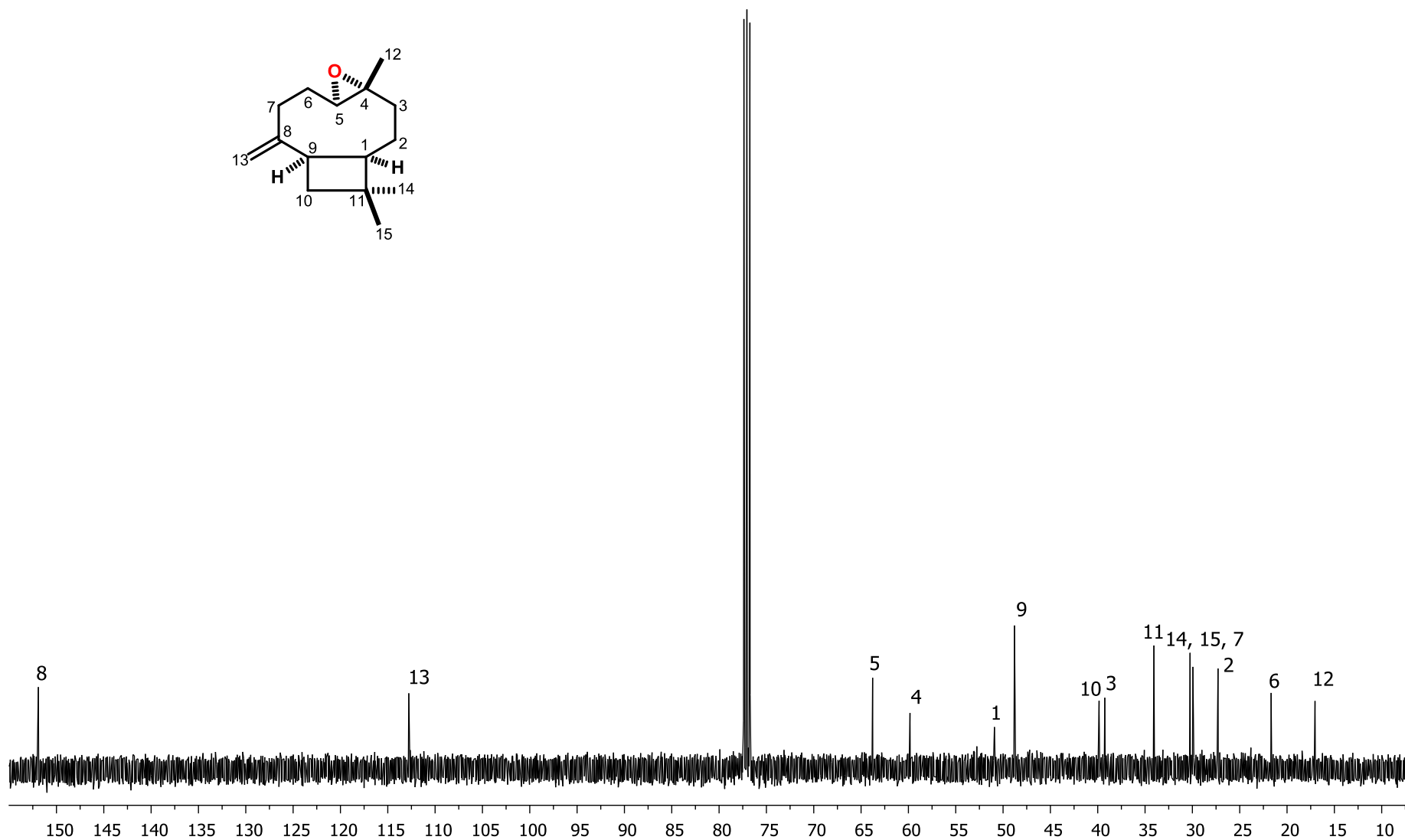


Figura 20. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del epóxido de β -cariofileno (59), en CDCl_3 .

Del extracto hexánico de hojas, en las fracciones 27-33 obtenidas en la polaridad de hexanos-AcOEt (24:1), se obtuvo una mezcla de dos compuestos, los cuales tras sucesivas cromatografías en columnas y una posterior cromatografía en placa preparativa impregnada con AgNO₃ fueron separados e identificados, el primero muestra en su espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) dos señales simples en 4.85 y 4.82 ppm pertenecientes a los hidrógenos vinílicos H-12; en 2.42 ppm se aprecia una señal triple de triples de $J = 12.0$ y 2.8 Hz para el protón metínico H-7; a campo alto se sitúa en 1.80 ppm una señal simple del metilo alílico H-13; en 1.05 ppm se encuentra la señal simple para el metilo base de hidroxilo H-15; finalmente en 0.90 ppm se sitúa la señal de los protones del metilo 14 (Figura 21). El espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃), mostró 15 señales correspondientes a un sesquiterpeno insaturado; en 146.9 y 110.8 ppm se encuentran las señales de los carbonos vinílicos C-11 y C-12, respectivamente; también se observa la señal de carbono base de oxígeno C-4 en 72.1 ppm; a campo alto se localiza la señal del metilo vinílico C-13 en 22.7 ppm; así como las señales de los metilos C-14 y C-15 en 22.3 y 18.4 ppm, respectivamente. Estos datos al ser comparados con los de la bibliografía Tabla 2 (Oliveira *et al.*, 2000) concuerdan con el eudesmenol (**60**).

El segundo compuesto, muestra en su espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) en 4.67 y 4.65 ppm las señales simples anchas pertenecientes a protones vinílicos de naturaleza exocíclica H-14a y H-14b, respectivamente; en 2.41 ppm se ubica una señal doble de dobles de dobles $J = 6.6$ Hz, perteneciente al protón metínico H-1; entre 1.28-1.04 ppm se localizan las señales simples de los metilos H-15, H-13 y H-12; en 0.70 y 0.46 ppm están presentes las señales de los protones metínicos del ciclopropilo asignados a H-7 y H-6, respectivamente (Figura 22). En el espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) se observan en 153.5 y 106.5 ppm se encuentran las señales de los carbonos de doble enlace exocíclico C-10 y C-14; en 81.0 ppm se observa la señal del carbono base de oxígeno C-4; en 53.7 y 53.4 ppm se localizan las señales correspondientes a los carbonos metínicos cabeza de puente C-1 y C-5. El resto de las señales corresponden a la parte alifática de la molécula (Figura 23). Estos datos al ser comparados con la bibliografía (Brochini *et al.*, 2000) concuerdan con el espathulenol (**61**).

RESULTADOS

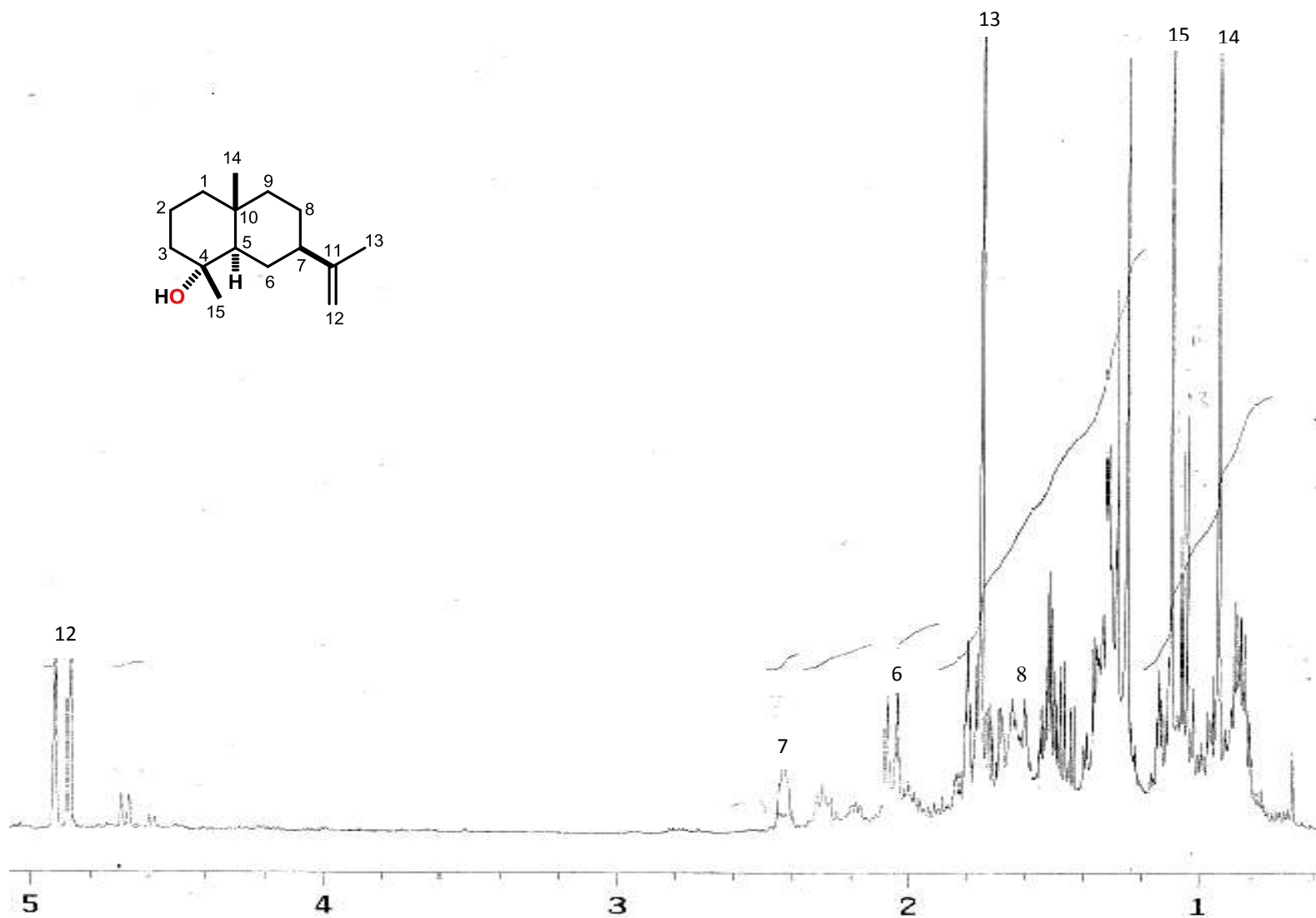


Figura 21. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del eudesmenol (60), en CDCl_3 .

Tabla 2. Comparación de los desplazamientos de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) del eudesmenol (**60**) con la literatura (Oliveira *et al.*, 2000).

C	$\delta_{\text{Exp.}}$	$\delta_{\text{Ref.}}$
1	41.3	41.1
2	20.1	20.2
3	43.5	43.6
4	72.1	72.1
5	49.1	49.2
6	22.8	22.8
7	39.3	39.4
8	23.4	23.6
9	40.3	40.4
10	35.3	35.3
11	146.9	147.0
12	110.8	110.9
13	22.7	22.8
14	22.3	22.3
15	18.4	18.5

Exp. = experimental. Ref. = referencia.

De la fracción 34, procedente de la cromatografía del extracto, se obtuvo un sólido blanco, en la polaridad hexanos-AcOEt (4:1). En el espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), se observan tres señales pertenecientes a protones vinílicos; en 5.34 ppm se observa una señal doble $J = 3.2$ Hz asignada para el protón H-6; en 5.14 y 5.00 ppm se observa la señal doble de dobles con $J = 15.2$ y 8.4 Hz, asignadas a los protones vinílicos H-22 y H-23, respectivamente; se aprecia una señal múltiple en 3.51 ppm, la señal perteneciente al protón base de hidroxilo H-3; a campo alto se observa en 1.02 ppm una señal doble con $J = 7.2$ Hz del metilo de isopropilo H-29; en 1.00 ppm se ubica una señal simple del perteneciente al metilo H-19; en 0.83 y 0.82 ppm se localiza las señal dobles de los protones del H-21 ($J = 6.4$) y H-26 (7.2 Hz), respectivamente; en 0.79 ppm se aprecia una señal triple con $J = 7.2$ Hz, correspondiente a los protones del metilo H-27; finalmente, en 0.68 ppm la señal simple del metilo H-18 (Figura 24).

En el espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3), son visibles 29 señales, entre las que destacan de 140.9-121.8 ppm cuatro señales de los carbonos vinílicos C-5, C-6, C-22 y C-23; en 71.9 ppm se observa la señal del carbono base de oxígeno C-3, el resto de la señales corresponden a un sistema alifático observadas entre 50.0 y 10.0 ppm (Figura 25), los datos espectroscópicos obtenidos experimentalmente, se compararon con literatura (Isah *et al.*, 2012) en la Tabla 3, los cuales coincidieron con el estigmasterol (**62**).

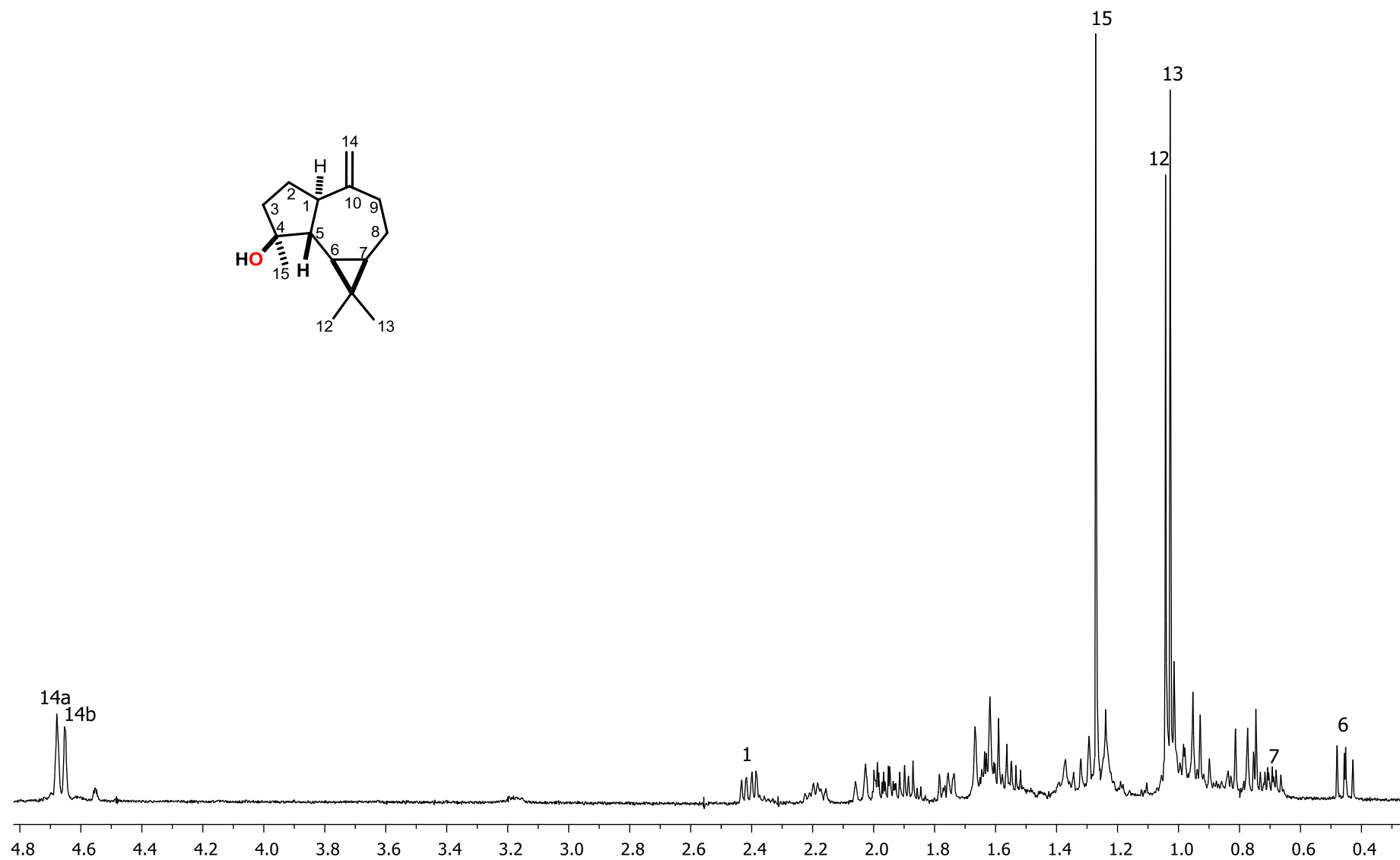


Figura 22. Espectro de RMN de ^1H 400 MHz del espathulenol (61), en CDCl_3 .

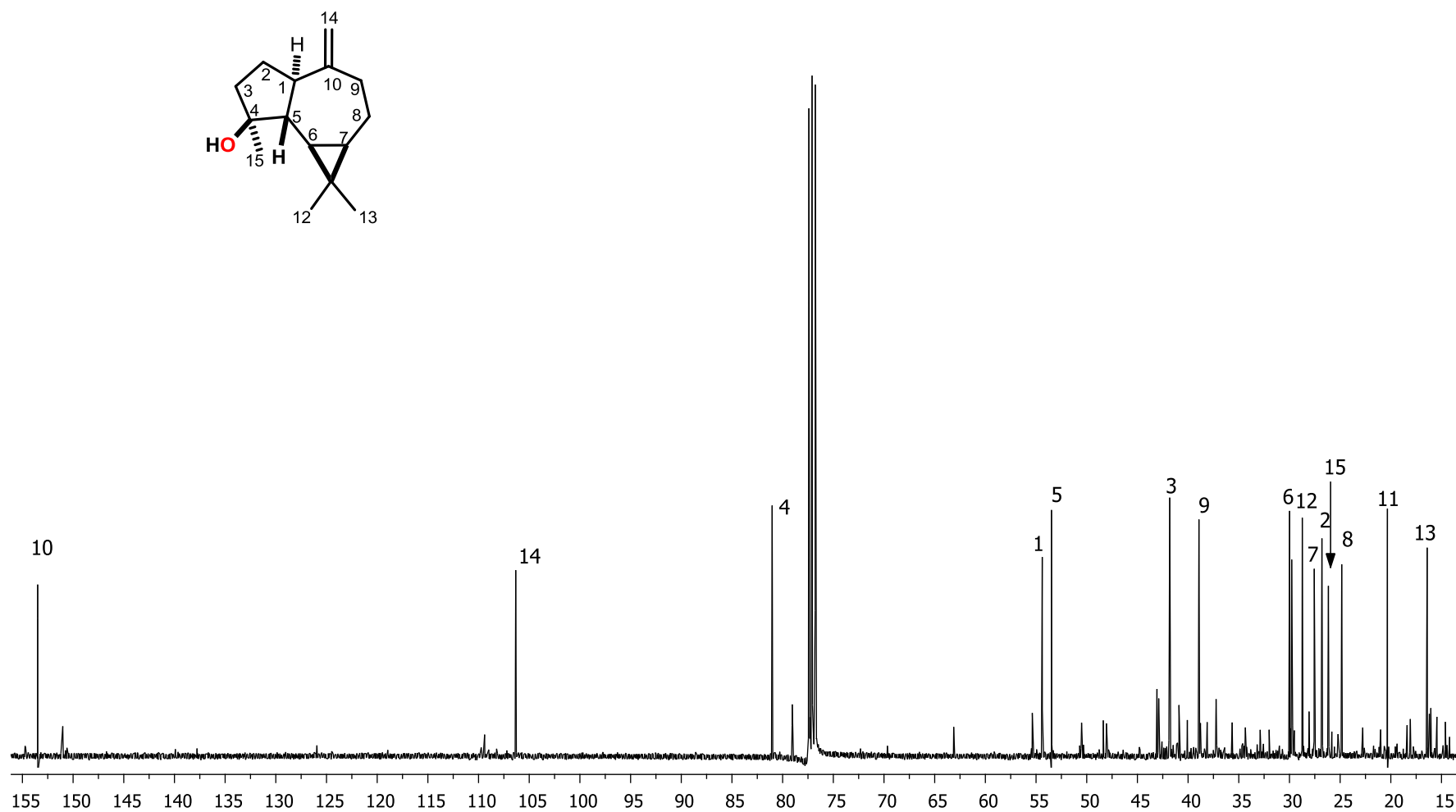


Figura 23. Espectro de RMN de ^{13}C 100 MHz del espathulenol (61), en CDCl_3 .

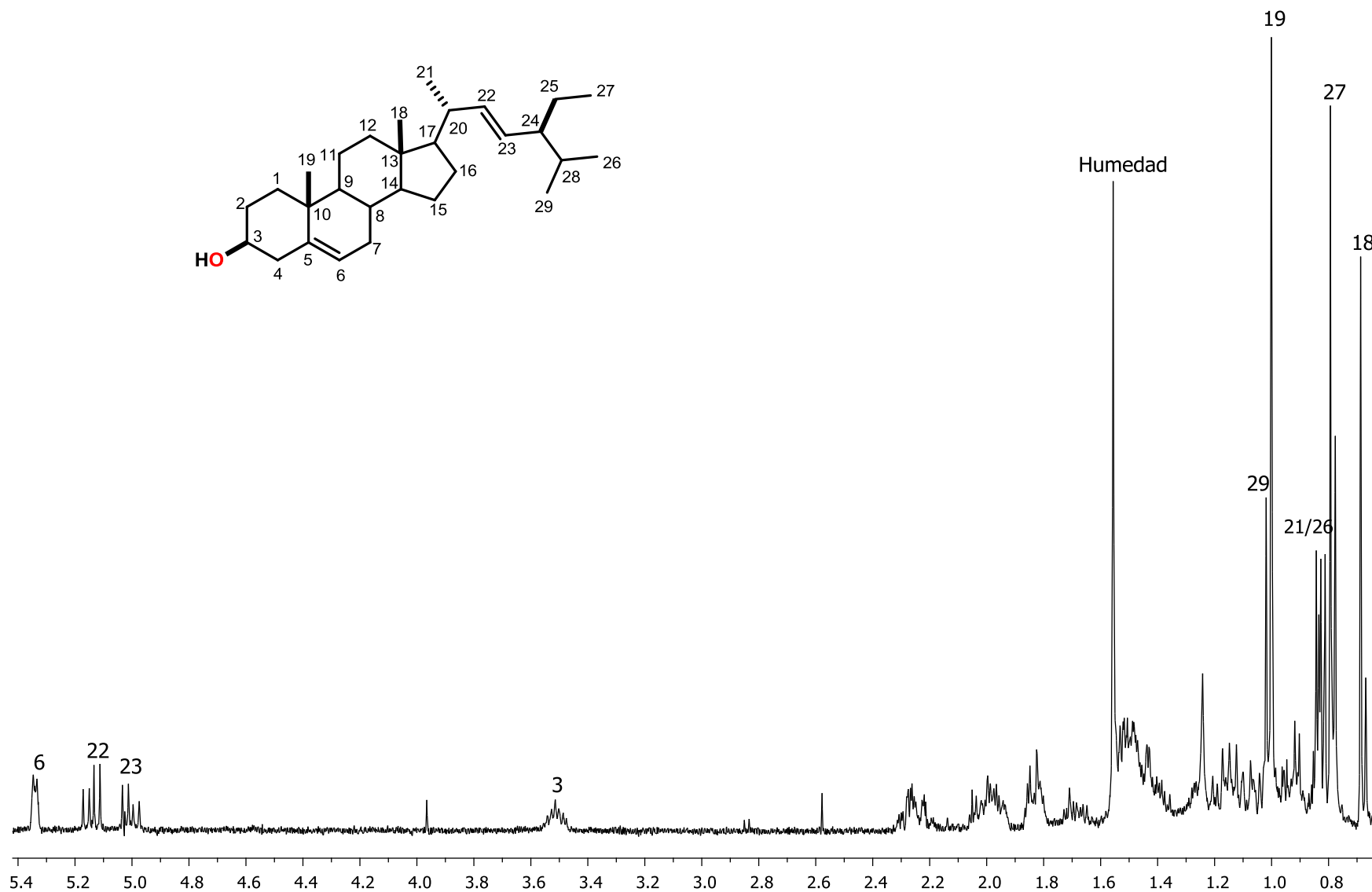


Figura 24. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del estigmasterol (62), en CDCl_3 .

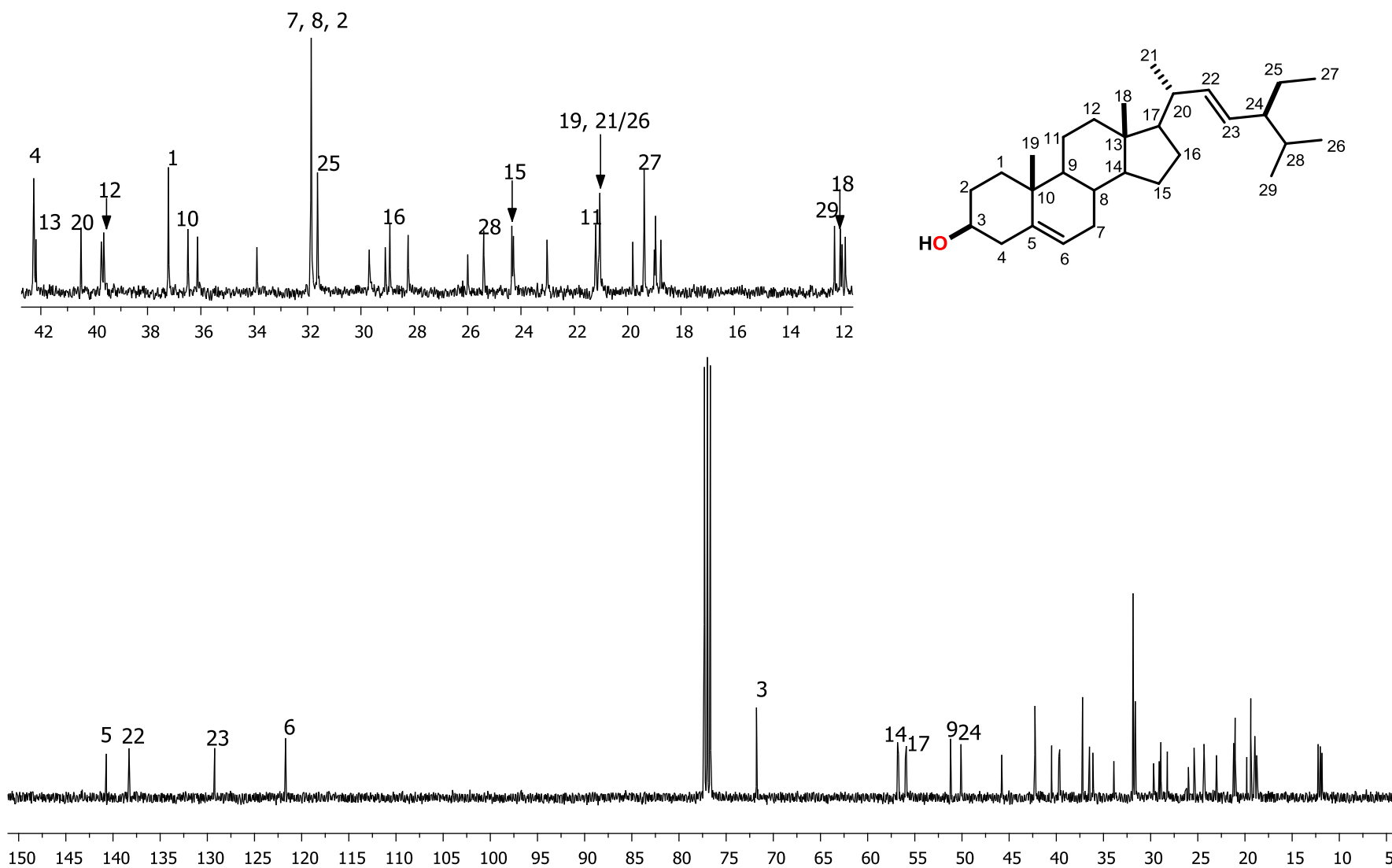


Figura 25. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del estigmasterol (62), en CDCl_3 .

Tabla 3. Comparación de los desplazamientos químicos de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) del estigmasterol (**62**) con la literatura (Yinusa *et al.*, 2012).

C	$\delta_{\text{Exp.}}$	$\delta_{\text{Ref.}}$
1	37.3	37.3
2	31.9	31.7
3	71.9	71.8
4	42.4	42.3
5	140.9	140.8
6	121.8	121.7
7	31.9	31.9
8	31.9	31.9
9	51.2	51.2
10	36.4	36.5
11	21.2	21.1
12	39.7	39.7
13	42.2	42.3
14	56.9	56.9
15	24.4	24.4
16	28.9	28.9
17	55.9	56.0
18	12.0	12.1
19	21.2	21.2
20	40.5	40.5
21	21.2	21.2
22	138.3	138.3
23	129.2	129.2
24	50.2	50.2
25	31.6	31.7
26	21.2	21.2
27	19.4	19.4
28	25.4	25.4
29	12.3	12.3

Exp. = experimental. Ref. = referencia.

6.4 ANÁLISIS QUÍMICO DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO DE LAS HOJAS

Un lote de 28 g del extracto se llevó a separación por cromatografía en columna abierta empleando como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil, una mezcla de CH₂Cl₂-MeOH en orden de polaridad ascendente, obteniendo 62 fracciones de 200 mL cada una; de las fracciones 22-25 obtenidas en la polaridad CH₂Cl₂-MeOH (97:3) se obtuvieron (0.26 g) de un sólido blanco. En su espectro de RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆) (Figura 26) resaltan en la región de hidrógenos vinílicos una señal doble en 5.32 ppm con *J* = 4.0 Hz asignada al protón H-6; alrededor de 4.85 ppm, se aprecian las señales de los protones de los grupos hidroxilos de la glucosa OH-2', OH-3' y OH-4'; en 4.20 ppm se observa una señal doble con *J* = 8.0 Hz, correspondiente al protón anomérico H-1'; en 3.61 ppm se localiza una señal múltiple que se asigna al protón base de oxígeno H-3; entre 3.10-2.88 ppm se encuentran tres señales múltiples correspondiente a los protones H-5', H-4' y H-2'; en 1.93 ppm se observan las señales de los protones metilénicos H-12; en 1.61 ppm se observa una señal múltiple del protón metínico H-25; entre 0.94-0.63 ppm están presentes las señales típicas de los grupos metilos H-18, H-19, H-21, H-26, H-27 y H-29.

En el espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆), se observan 35 señales, atribuidas a un triterpeno funcionalizado con una azúcar, en 140.4 y 121.1 ppm se ubican las señales correspondientes a los carbonos vinílicos C-5 y C-6, respectivamente; en 101.0 ppm se observa la señal del carbono anomérico C-1' de la glucosa; a campo alto se ubica la señal asignada al carbono base de oxígeno C-3 en 76.9 ppm; en 76.7 y 76.6 ppm se encuentran dos señales de los carbonos del azúcar C-3' y C-5', respectivamente; en 73.4, 70.1 y 61.1 ppm se observan las señales de los carbonos restantes de la glucosa C-2', C-4' y C-6', respectivamente; finalmente, entre 57.0-15.0 ppm se localiza el resto de las señales de la aglicona (Figura 27).

Los desplazamientos químicos de RMN de ¹³C obtenidos fueron comparados con los descritos en la literatura (Faizi *et al.*, 2001) en la Tabla 4, los cuales coincidieron con el glucósido de β-sitosterol (**63**).

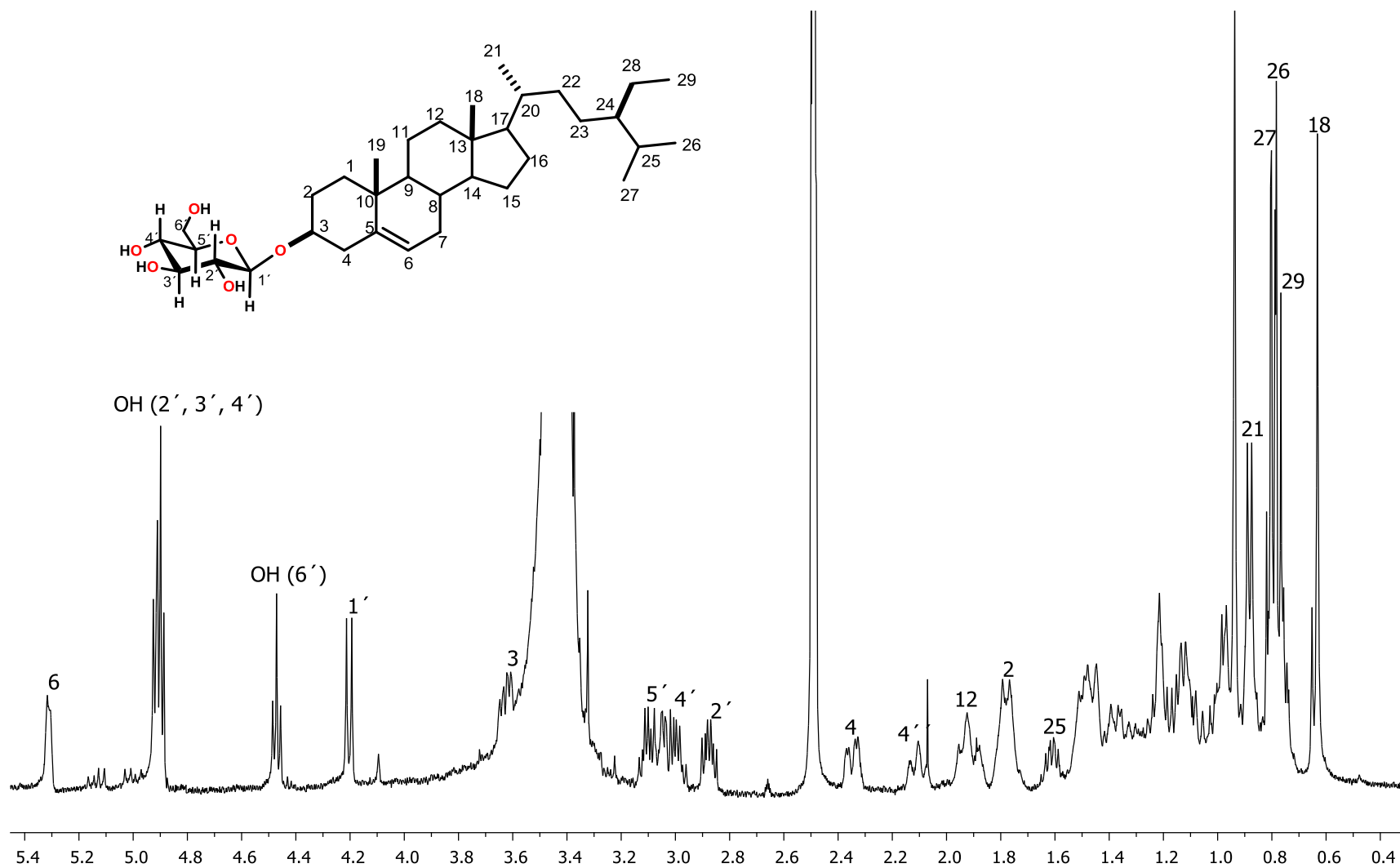


Figura 26. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del glucósido de β -sitosterol (63), en $\text{DMSO-}d_6$.

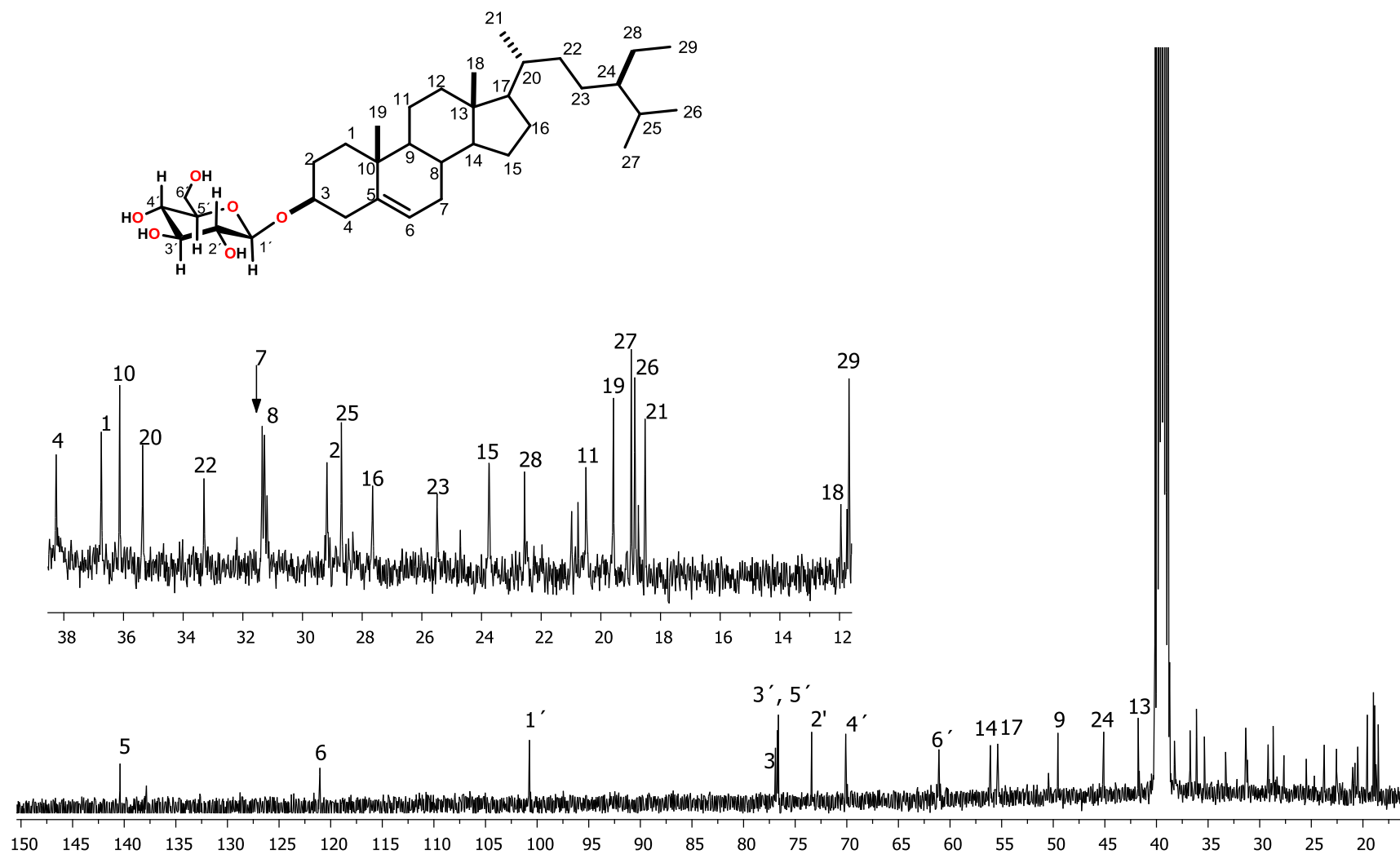


Figura 27. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del glucósido de β -sitosterol (63), en $\text{DMSO-}d_6$.

Tabla 4. Comparación de desplazamientos químicos de RMN de ^{13}C (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) del glucósido de β -sitosterol (**63**) con la literatura (Faizi *et al.*, 2001).

C	$\delta_{\text{Exp.}}$	$\delta_{\text{Ref.}}$
1	36.8	36.8
2	29.2	29.2
3	76.9	76.9
4	38.3	38.3
5	140.4	140.2
6	121.1	121.1
7	31.3	31.3
8	31.4	31.4
9	49.6	49.6
10	36.1	36.2
11	20.5	20.5
12	39.1	39.2
13	41.8	41.8
14	56.1	56.1
15	23.8	23.8
16	27.7	27.7
17	55.4	55.4
18	11.6	11.6
19	19.0	19.0
20	35.4	35.4
21	18.8	18.7
22	33.3	33.3
23	25.5	25.5
24	45.1	45.1
25	28.7	28.7
26	18.5	18.6
27	19.6	19.6
28	22.6	22.6
29	11.8	11.8
1'	101.7	101.8
2'	73.4	73.4
3'	76.7	76.7
4'	70.1	70.1
5'	76.6	76.5
6'	61.1	61.1

Exp. = experimental. Ref. = referencia.

Continuando con el análisis cromatográfico del extracto de AcOEt de las hojas, las fracciones 32-33 obtenidas en la polaridad CH₂Cl₂-MeOH (9:1) se recromatografiaron en columna abierta utilizando como fase estacionaria gel de sílice y mezcla de hexanos-acetona (1:1), se obtuvieron 35 fracciones de 10 mL, en las fracciones 10-13 se obtuvo un sólido blanco de 26 mg. En su espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) se observan dos señales simples en 6.26 y 5.63 ppm, características de protones vinílicos de un doble enlace terminal, asignados a los hidrógenos H-13a y H-13b, respectivamente; en 2.50 ppm se aprecia una señal triple de triples con $J = 12.0$ y 2.8 Hz para el protón H-7; se ubica en 1.97 ppm una señal doble de $J = 12.0$ Hz perteneciente al protón H-6a; en 1.81 ppm se localiza una señal doble con $J = 12.4$ Hz para el metileno H-9; en 1.35 ppm se observa una señal doble de dobles con $J = 12.0$ y 1.2 Hz del protón metínico H-5; en 1.17 ppm se ubica una señal del protón H-6b, en 1.10 ppm se encuentra la señal simple para el metilo H-15; finalmente en 0.95 ppm se sitúa la señal de los protones del metilo H-14 (Figura 28).

En el espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) se aprecian 15 señales, lo que sugiere la presencia de un sesquiterpeno, en 171.2 ppm se observa una señal que corresponde al carbonilo de ácido C-12, en 145.2 y 124.1 ppm aparecen las señales de doble enlace C-11 y C-13, respectivamente; en 72.5 ppm se muestra la señal del carbono base de hidroxilo C-4; en 54.9 ppm se encuentra la señal del carbono cabeza de puente C-5; entre 44.4-18.7 ppm se ubican el resto de las señales de la molécula (Figura 29). Los valores de los desplazamientos químicos experimentales de RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) se comparan con los de una muestra auténtica y son iguales para el ácido ilícico (**64**), Tabla 5 (Talavera-Alemán 2012).

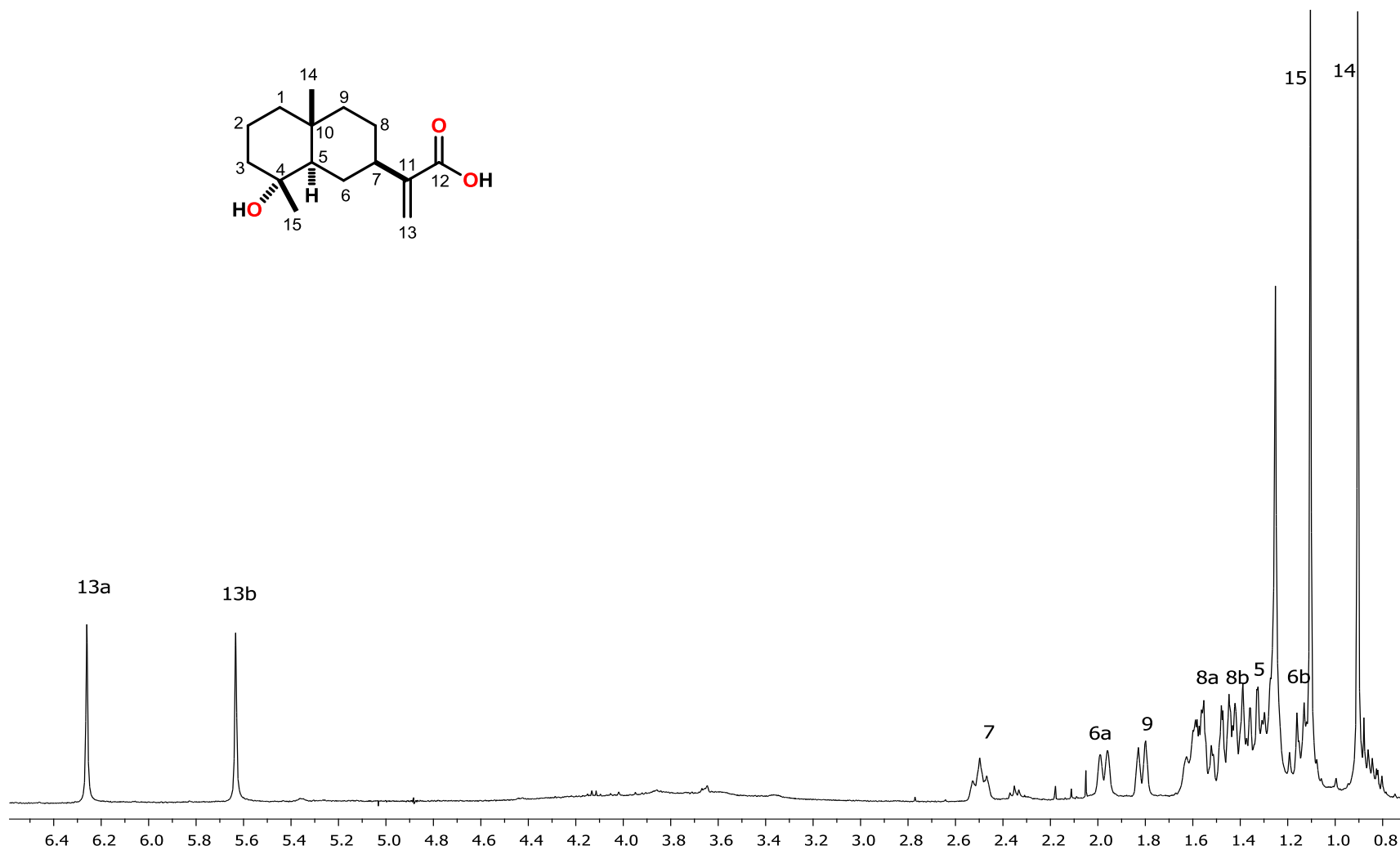


Figura 28. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del ácido ilícico (64), en CDCl_3 .

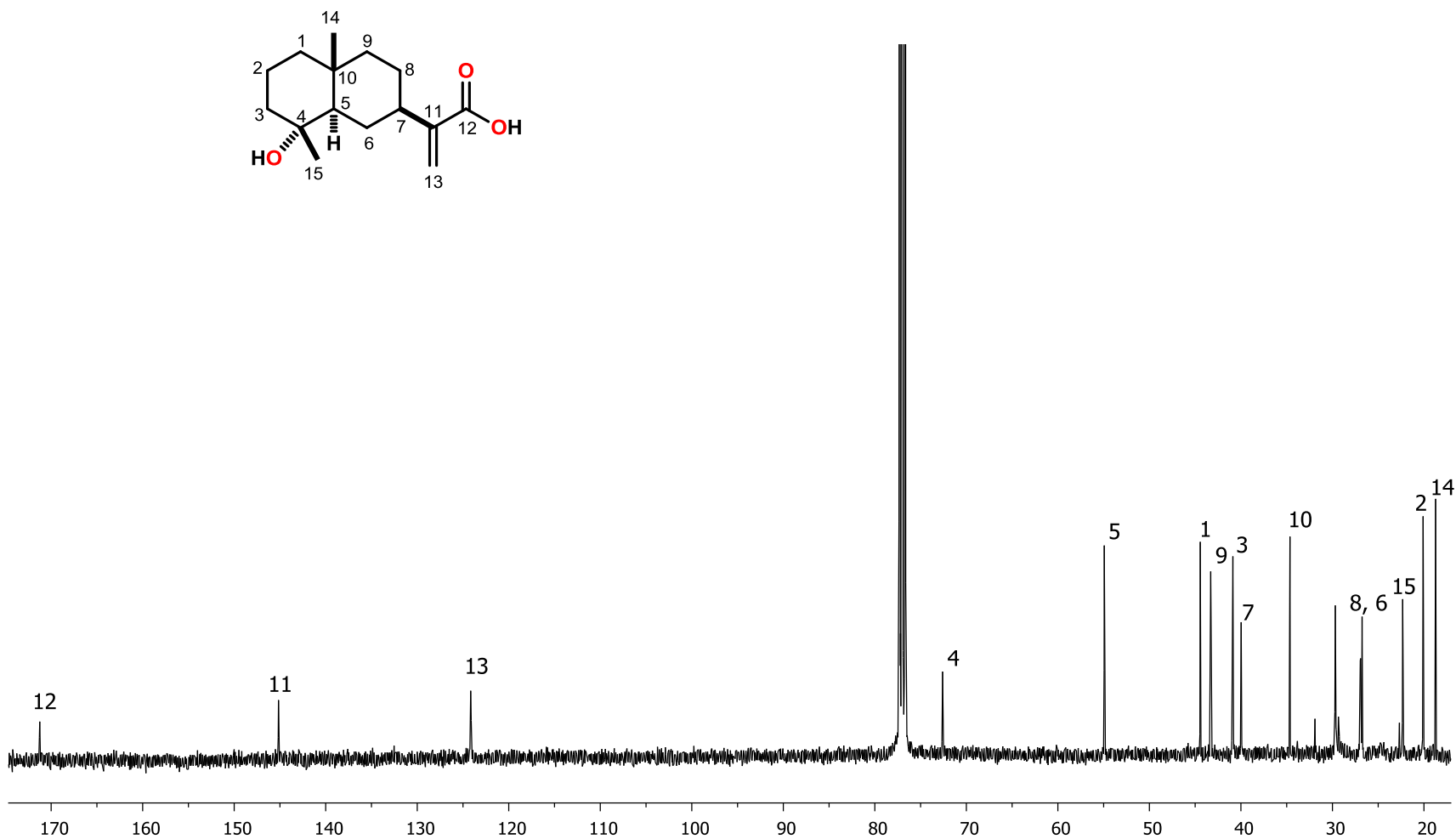


Figura 29. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del ácido ilícico (64), en CDCl_3 .

Tabla 5. Comparación de desplazamientos químicos de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) del ácido ilícico (**64**) con los de una muestra auténtica (Talavera-Alemán 2012).

C	$\delta_{\text{Exp.}}$	$\delta_{\text{Ref.}}$
1	44.4	44.4
2	20.1	20.0
3	40.9	40.8
4	72.5	72.5
5	54.9	54.9
6	26.7	26.6
7	40.0	39.9
8	27.0	27.0
9	43.3	43.3
10	34.6	34.6
11	145.2	145.1
12	171.2	171.4
13	124.1	124.3
14	18.7	18.7
15	22.3	22.3

Exp. = experimental Ref. = referencia

La fracción 9, obtenida en la polaridad CH₂Cl₂-MeOH (19:1), tras sucesivas cromatografías en columna abierta utilizando como fase estacionaria gel de sílice de fase reversa C₁₈, se logró obtener un sólido color blanco, el cual en su espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) se observan en 6.29 y 5.69 ppm las señales simples de los protones vinílicos H-13; además de dos señales de un doble enlace exocíclico correspondientes a los hidrógenos H-15 en 4.72 y 4.41 ppm; entre 2.54-1.20 ppm se aprecian señales múltiples que corresponden a hidrógenos alifáticos; en 0.74 ppm se aprecia la señal del metilo H-14 (Figura 30). En comparación con el espectro de RMN de ¹H del ácido ilícico (**64**) se observa la presencia otro doble enlace exocíclico.

En el espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) se observan 15 señales, de las cuales, en 170.7 ppm se localiza la señal de carbonilo de ácido del C-12; en 150.6 y 105.4 ppm se encuentran las señales de los carbonos del doble enlace exocíclico C-4 y C-15; en 144.9 y 124.6 ppm aparecen las señales de los carbonos vinílicos C-11 y C-13, respectivamente; a campo alto se observa la señal del grupo metilo C-14 en 16.3 ppm, el resto de las señales se conservan el patrón de señales con respecto a **64** (Figura 31). Los desplazamientos Tabla 6 resultaron iguales a los descritos para el ácido cóstico (**65**) (Ortega et al 1998).

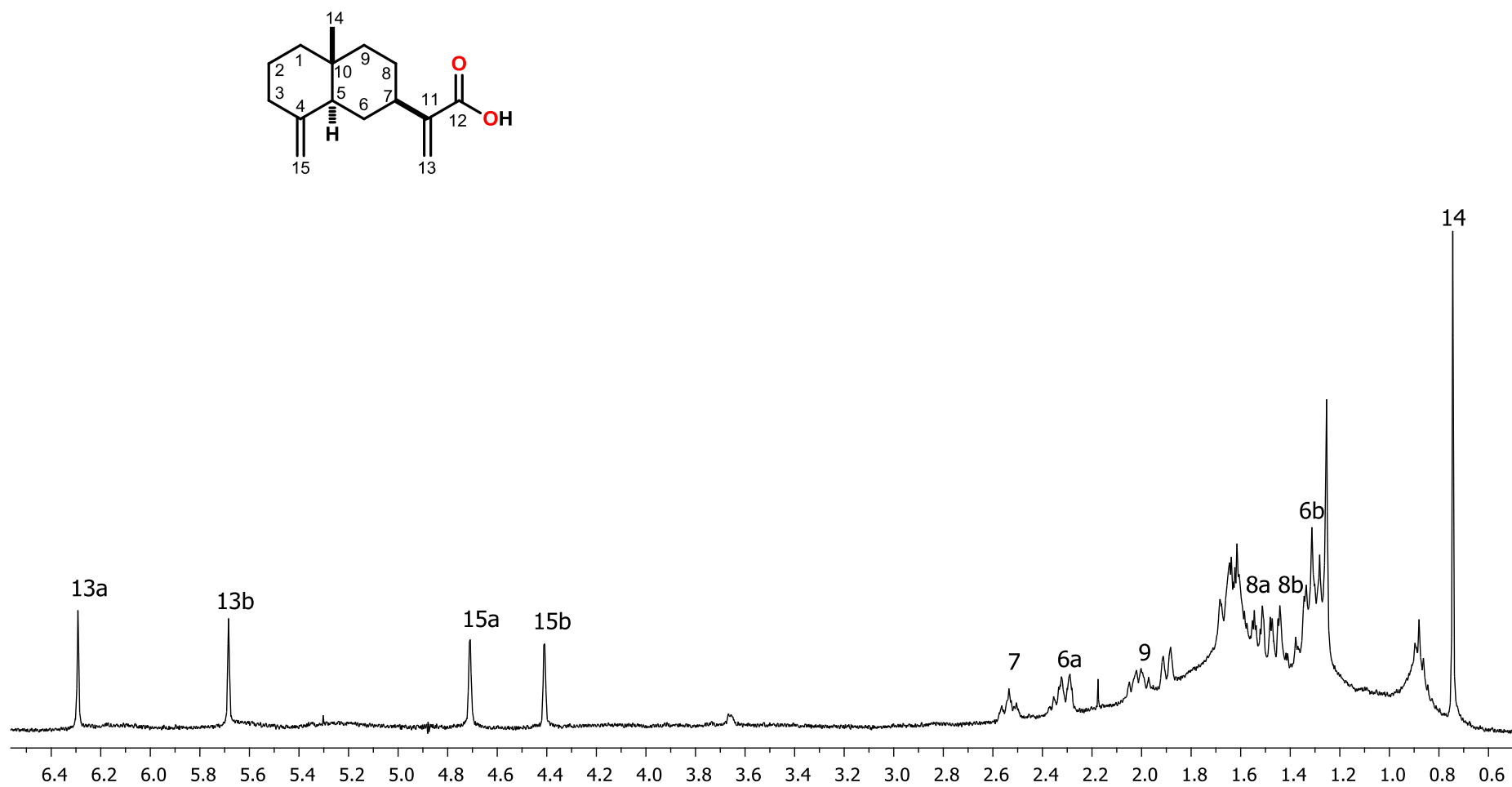


Figura 30. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz del ácido cóstico (**65**), en CDCl₃.

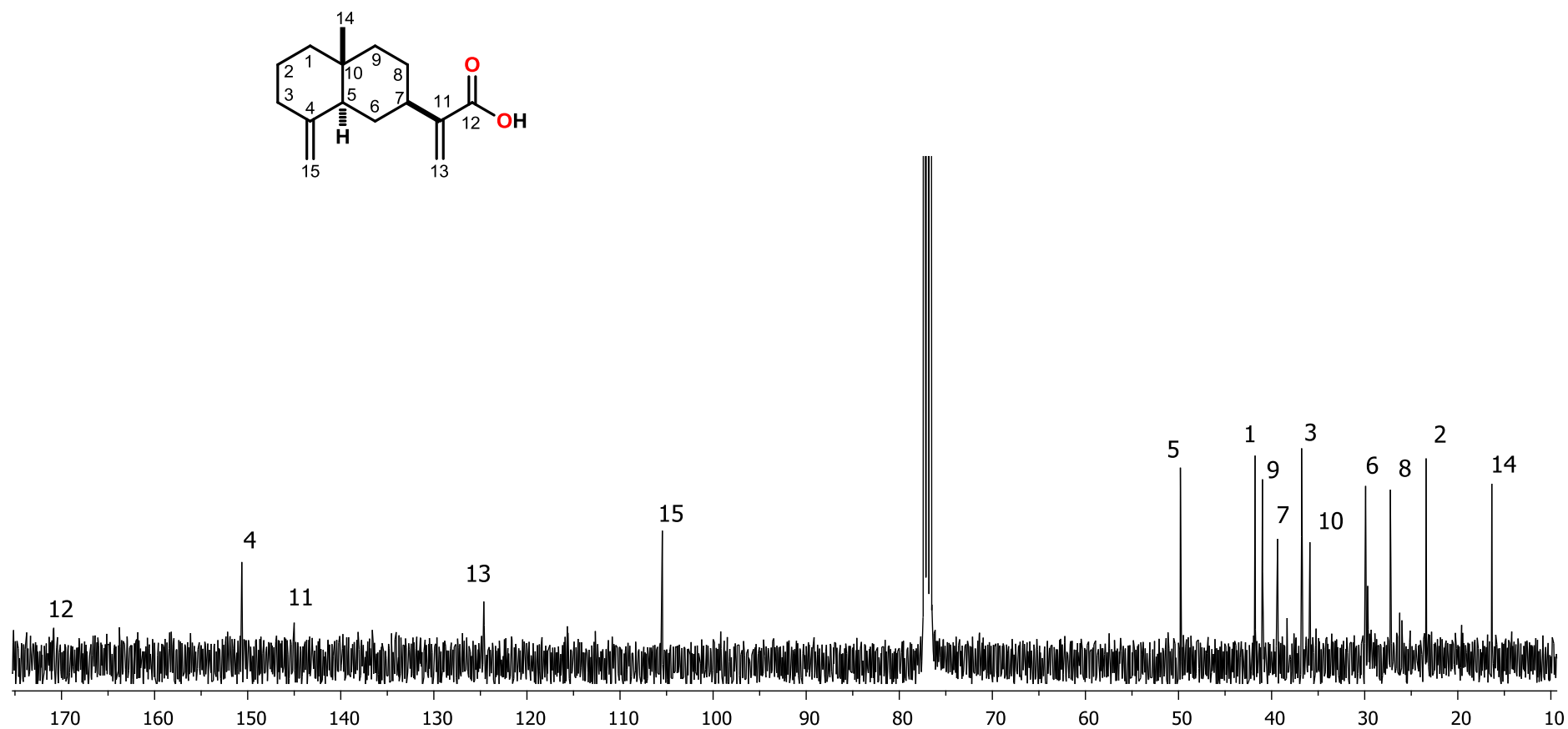


Figura 31. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del ácido cóstico (65), en CDCl_3 .

Tabla 6. Comparación de desplazamientos químicos de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) del ácido cóstico (**65**) con la bibliografía.

C	$\delta_{\text{Exp.}}$	$\delta_{\text{Ref.}}$
1	41.8	41.9
2	23.4	23.5
3	36.8	36.9
4	150.6	150.6
5	49.8	50.0
6	29.9	29.9
7	39.4	39.7
8	27.3	27.4
9	41.0	41.2
10	35.9	36.0
11	144.9	145.3
12	170.7	168.8
13	124.6	123.7
14	16.3	16.4
15	105.4	105.6

Exp. = experimental Ref. = referencia

Las fracciones 39-44 (0.28 g), obtenidas en la polaridad $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$ (24:1) se sometieron a separación cromatográfica en columna abierta, utilizando como fase estacionaria gel de sílice de fase reversa C_{18} y una mezcla de $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ (3:2), recuperándose 25 fracciones de 5 mL cada una, en las fracciones 6-11 se observó un compuesto impuro por cromatografía en capa fina por lo que se unieron y fueron recromatografiadas en columna abierta en fase reversa con polaridad $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ (1:1). En las fracciones 22-23 se obtuvieron cristales amarillos, con punto de fusión de 95-100 °C. En su espectro de RMN de ^1H (400 MHz, Acetona- d_6) se observa, una señal doble en 7.72 ppm con $J_m = 2.8$ Hz correspondiente al protón aromático H-2'; en 7.58 ppm se ubica la señal doble de dobles con $J_{o,m} = 8.5$ y 2.8 Hz del protón aromático H-6'; en 7.01 ppm se encuentra una señal doble con $J_o = 8.5$ Hz del protón aromático H-5'; en 6.82 ppm se localiza la señal simple perteneciente al protón aromático H-8; finalmente, se aprecian entre 4.00-3.82 ppm tres señales simples típicas de grupos metoxilo OMe (Figura 32).

En el espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, Acetona- d_6) se aprecia en 179.7 ppm la señal del carbono de carbonilo C-4; en 159.0 ppm se observa la señal de carbono aromático base de oxígeno C-7; en 156.2 ppm se encuentra la señal del carbono C-2, beta al carbonilo; en 153.1 ppm se ubica la señal del carbono base de hidroxilo C-5 del anillo A, traslapada con la señal de carbono cuaternario C-9; en 149.3 y 146.0 ppm se encuentran las señales de los carbonos base de hidroxilo C-4' y C-3' del anillo B, respectivamente; en 139.2 ppm se observa la señal de carbono vinílico alfa al carbonilo C-3; en 132.3 se localiza la señal del carbono base de metoxilo C-6; en 122.7 ppm se ubica la señal del carbono *ipso* C-1'; en 121.1, 116.3 y 116.1 ppm se aprecian las señales de los carbonos aromáticos C-6', C-2' y C-5' presentes en el anillo B, respectivamente; en 106.9 ppm se ubica la señal de carbono cabeza de puente C-10; en 91.8 ppm se aprecia la señal de carbono aromático C-8; finalmente, entre 60.6-56.1 ppm se encuentran tres señales de los carbonos de los grupos metoxilo OMe **a**, OMe **b** y OMe **c** (Figura 33).

Con el experimento bidimensional HETCOR fue posible asignar las señales de los carbonos a partir de su correlación con el espectro de protón, donde se muestra la señal doble en 7.72 ppm del protón aromático H-2' correlacionando con la señal en 116.3 ppm del C-2'; la señal doble de dobles en 7.58 ppm del protón H-6' correlaciona con la señal de carbono en 121.1 ppm del C-6'; la señal doble que se observa en 7.01 ppm del protón H-5' muestra correlación con la señal de carbono presente en 116.1 ppm del C-5'; la señal simple en 6.82 ppm del protón H-8 presenta una correlación con el carbono aromático en 91.8 ppm de C-8; las señales en 4.00, 3.89 y 3.82 ppm de los protones del grupo metoxilo correlacionan con su respectivo carbono en 60.6, 60.2 y 56.1 ppm (Figura 34).

En el experimento HMBC se observan las correlaciones a dos enlaces del protón aromático H-6' en 7.58 ppm con la señal del carbono aromático C-5' en 116.1 ppm, a dos enlaces con la señal del carbono *ipso* C-1' en 122.7 ppm y a tres enlaces con la señal del carbono aromático base de oxígeno C-4' en 149.3 ppm; se observan correlaciones a tres enlaces del protón aromático H-2' con el carbono vinílico C-2 en 156.2 ppm, a dos enlaces con el carbono aromático base de oxígeno C-3' en 146.0 ppm, y a tres enlaces tanto con el carbono aromático C-6' en 121.1 ppm como con el carbono base de oxígeno

C-4' en 149.3 ppm. Otras correlaciones visibles son las del protón aromático H-8 en 6.82 ppm a tres enlaces con el carbono cuaternario aromático C-10 en 106.9 ppm, a dos enlaces con el carbono aromático base de oxígeno C-7 en 159.0 ppm, a tres enlaces con el carbono base de oxígeno aromático C-6 en 132.3 (Figura 35).

El experimento NOESY permite observar la correlación de la señal simple en 6.82 ppm del protón aromático H-8 con la señal simple intensa en 4.00 ppm con los hidrógenos del grupo metoxilo OMe **a**, dicha correlación confirma la posición del OMe **a** en C-7 (Figura 36).

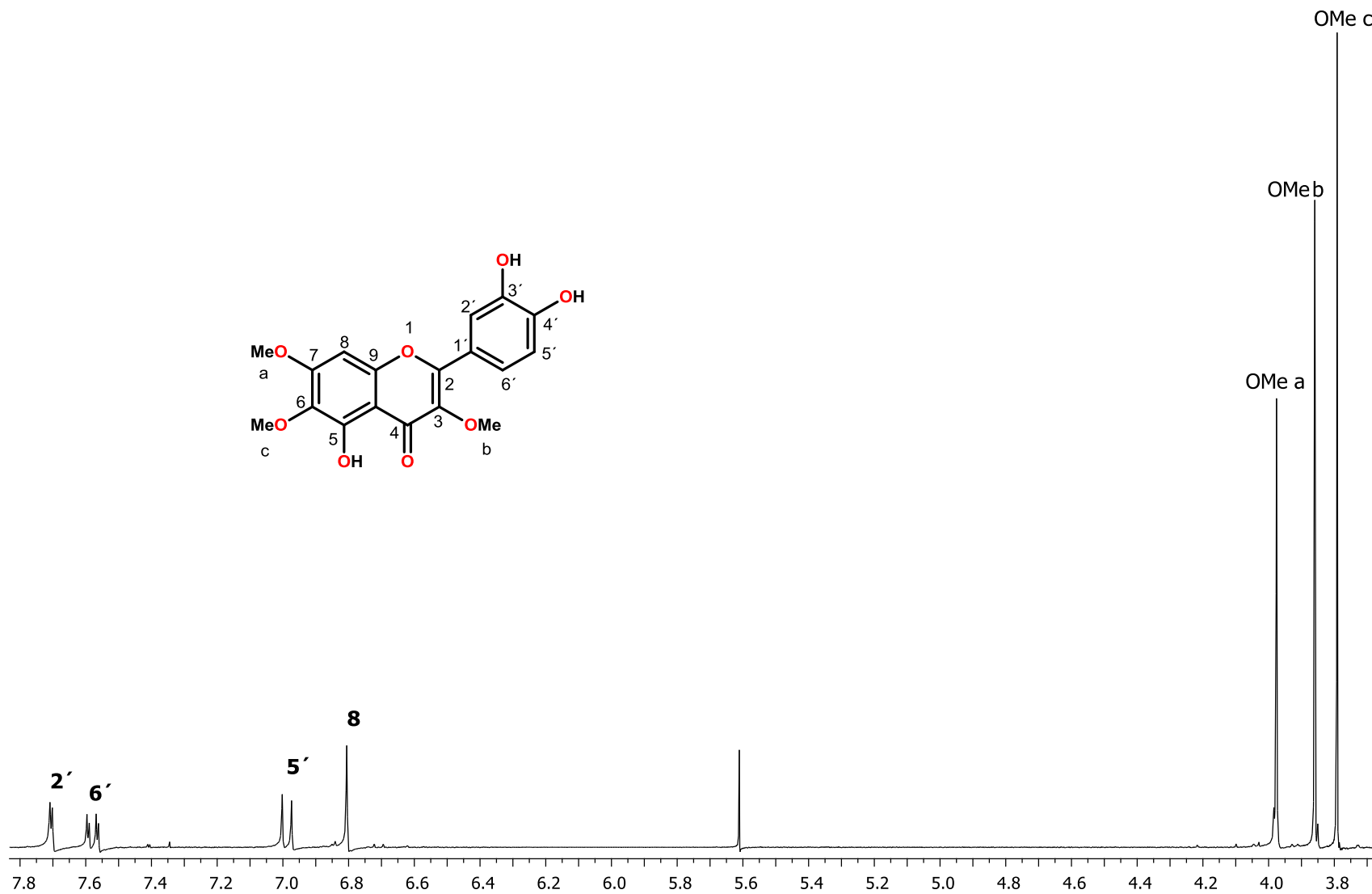


Figura 32. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz del chrysofenol D (66), en Acetona-d₆.

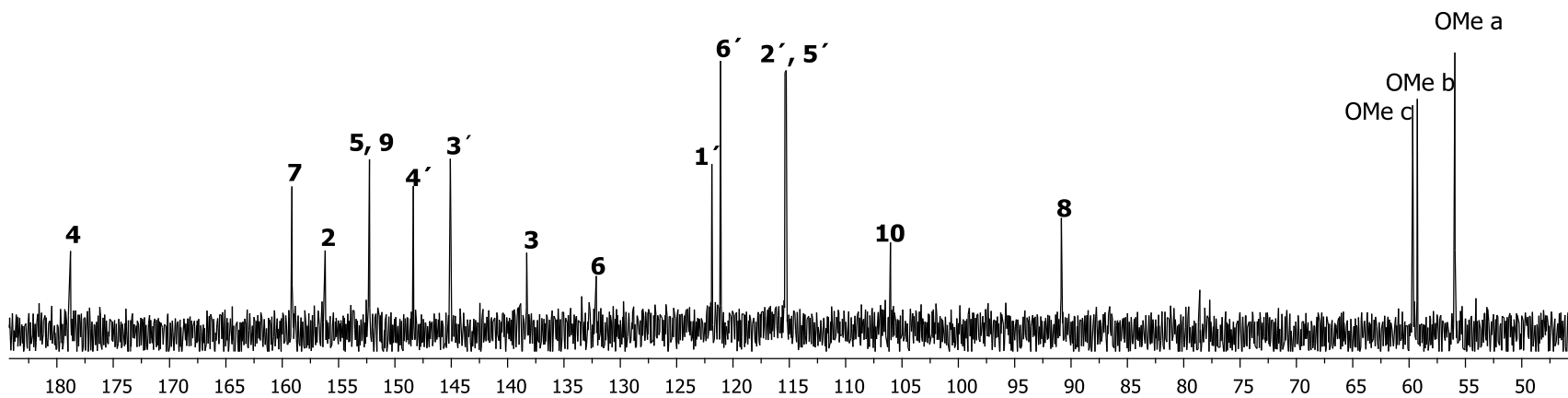
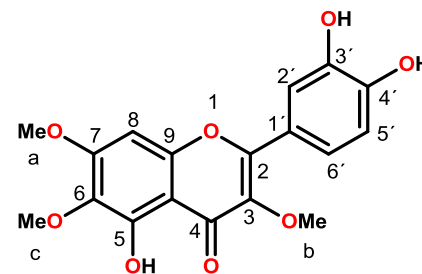
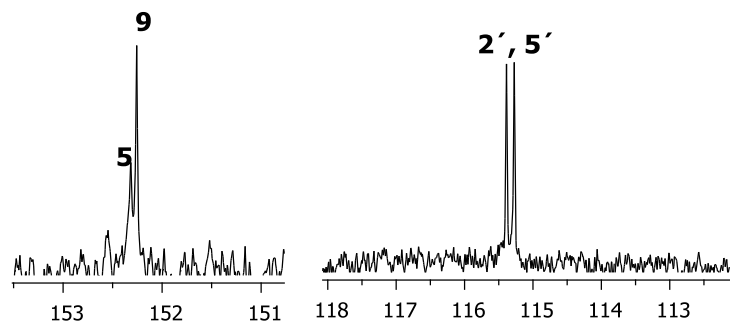


Figura 33. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del chryso splenol D (66), en $\text{Acetona-}d_6$.

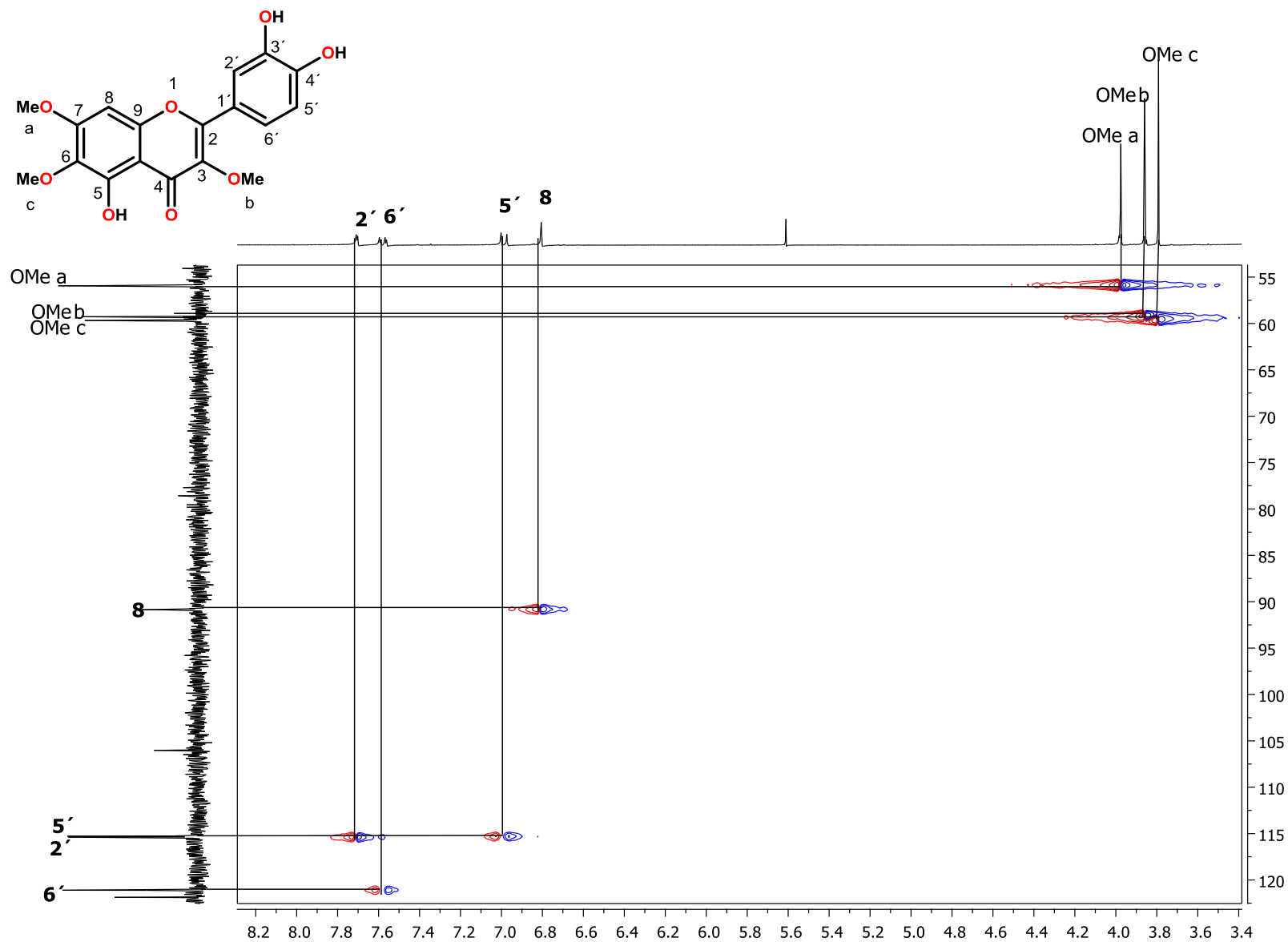


Figura 34. Experimento de correlación heteronuclear (HETCOR) del chrysofenol D (66).

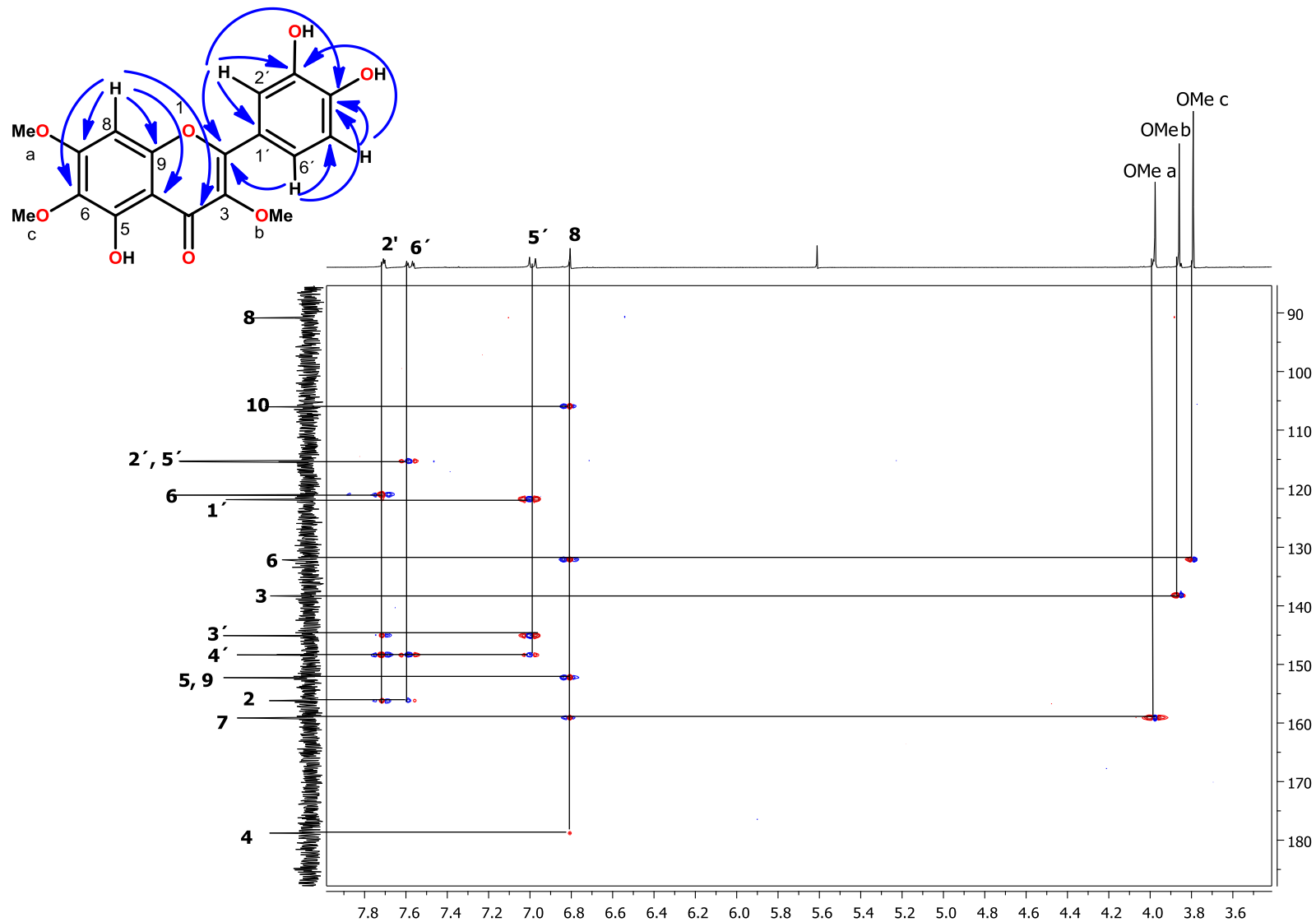


Figura 35. Experimento de correlación heteronuclear (HMBC) del chrysofenol D (66).

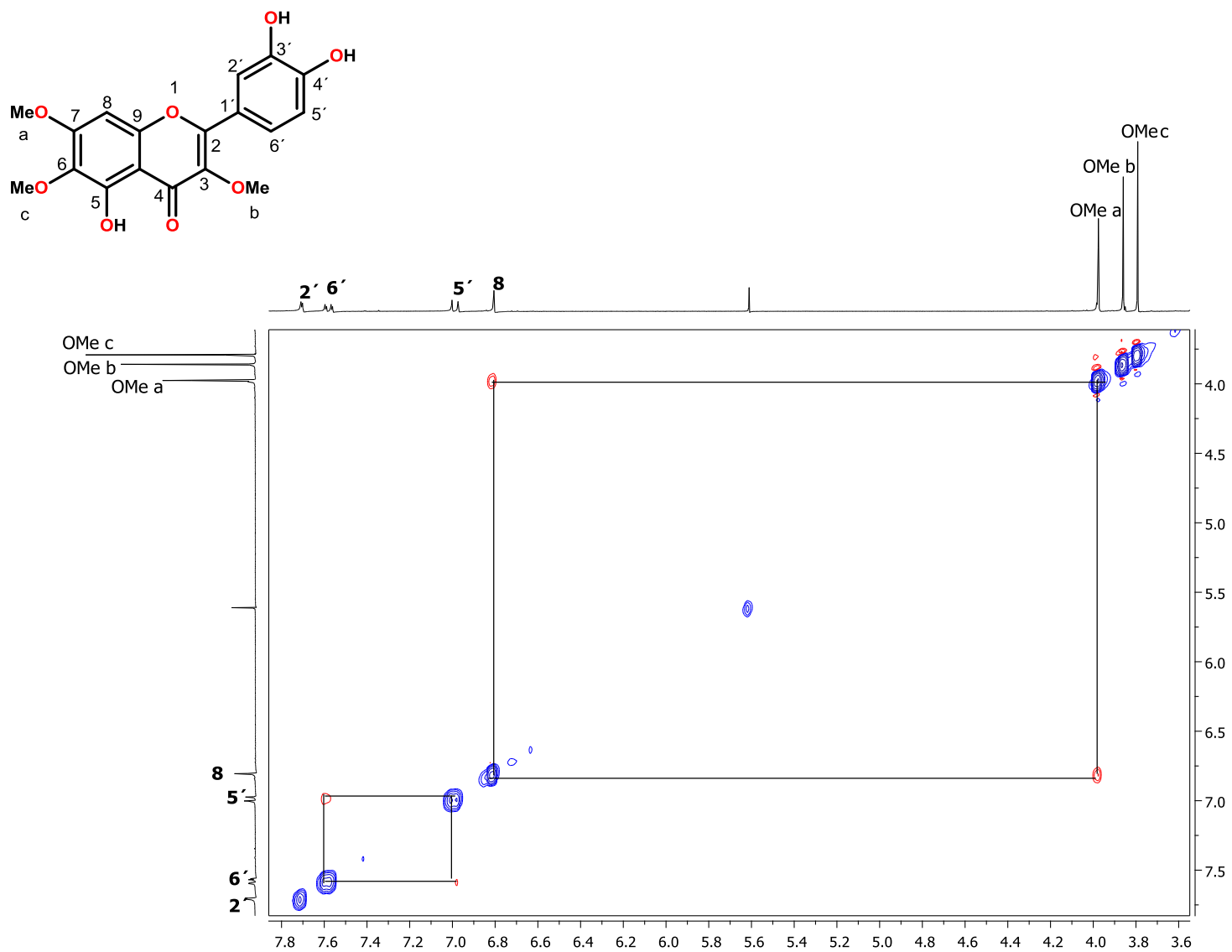


Figura 36. Experimento de correlación homonuclear (NOESY) del chrysoptenol D (66).

El derivado acetilado **67** se preparó con el objeto de confirmar químicamente el número de hidroxilos presentes en la molécula **66**, utilizando piridina y anhídrido acético. El producto de reacción fue purificado mediante cromatografía en columna, el cual en su espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3), se observan un intercambio de la señal doble de doble correspondiente del H-6' en 8.03 ppm; con la señal doble en 7.95 ppm del H-2'; además de que se aprecian tres señales pertenecientes a los metilos de grupos acetilo entre 2.51-2.33 ppm (Figura 37). En el espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) se observan 24 señales las cuales, en 169.5, 168.1 y 167.9 ppm corresponden a los carbonos de carbonilo de acetato; y entre 21.0-20.6 ppm se ubican las señales respectivas de los carbonos de los metilos de acetilo, con lo que se confirma la presencia de tres grupos hidroxilos posicionados en C-5, C-3' y C-4', respectivamente; el resto de las señales del flavonoide se mantienen sin cambios (Figura 38).

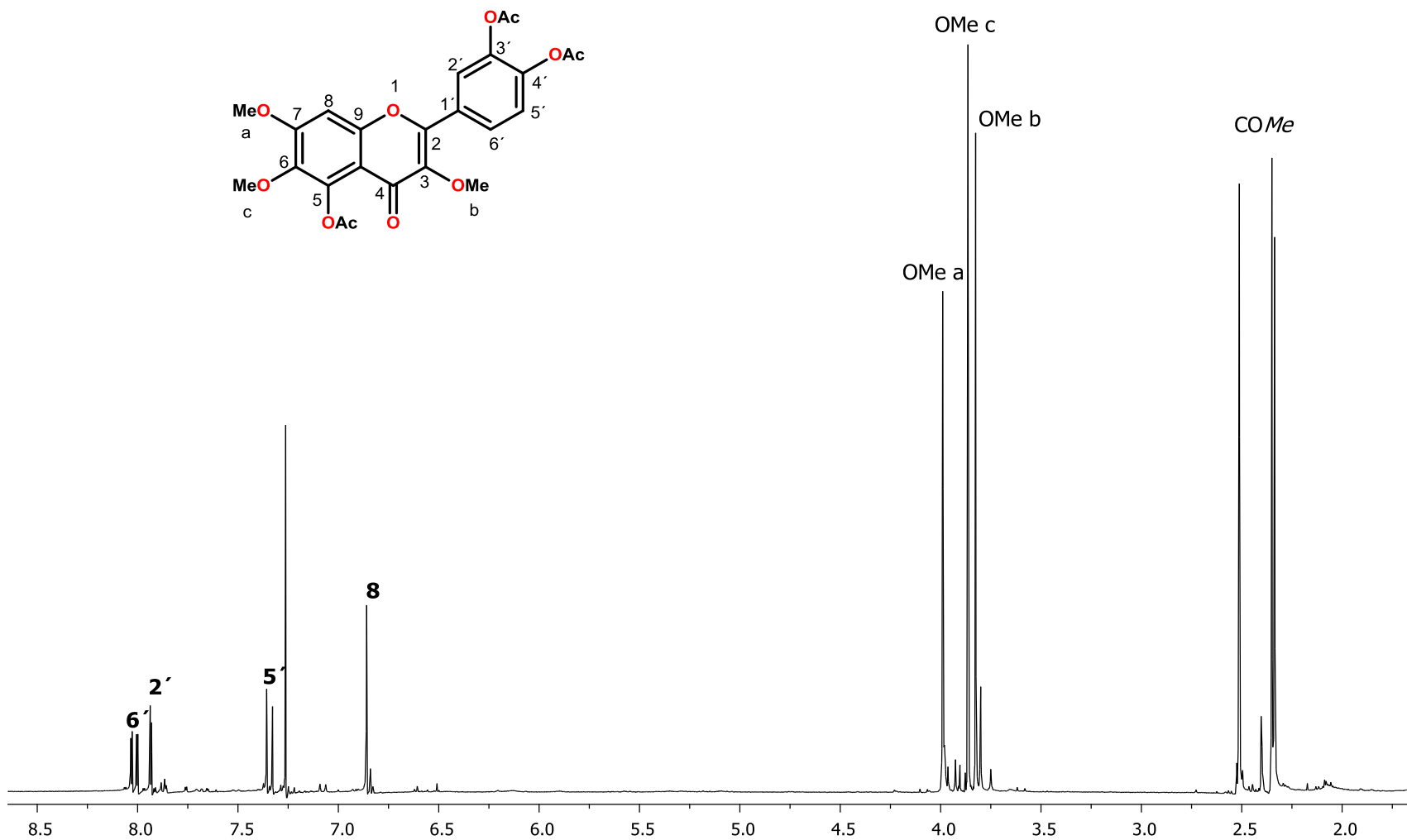


Figura 37. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del derivado peracetilado del chrysofenol D (**67**), en CDCl_3 .

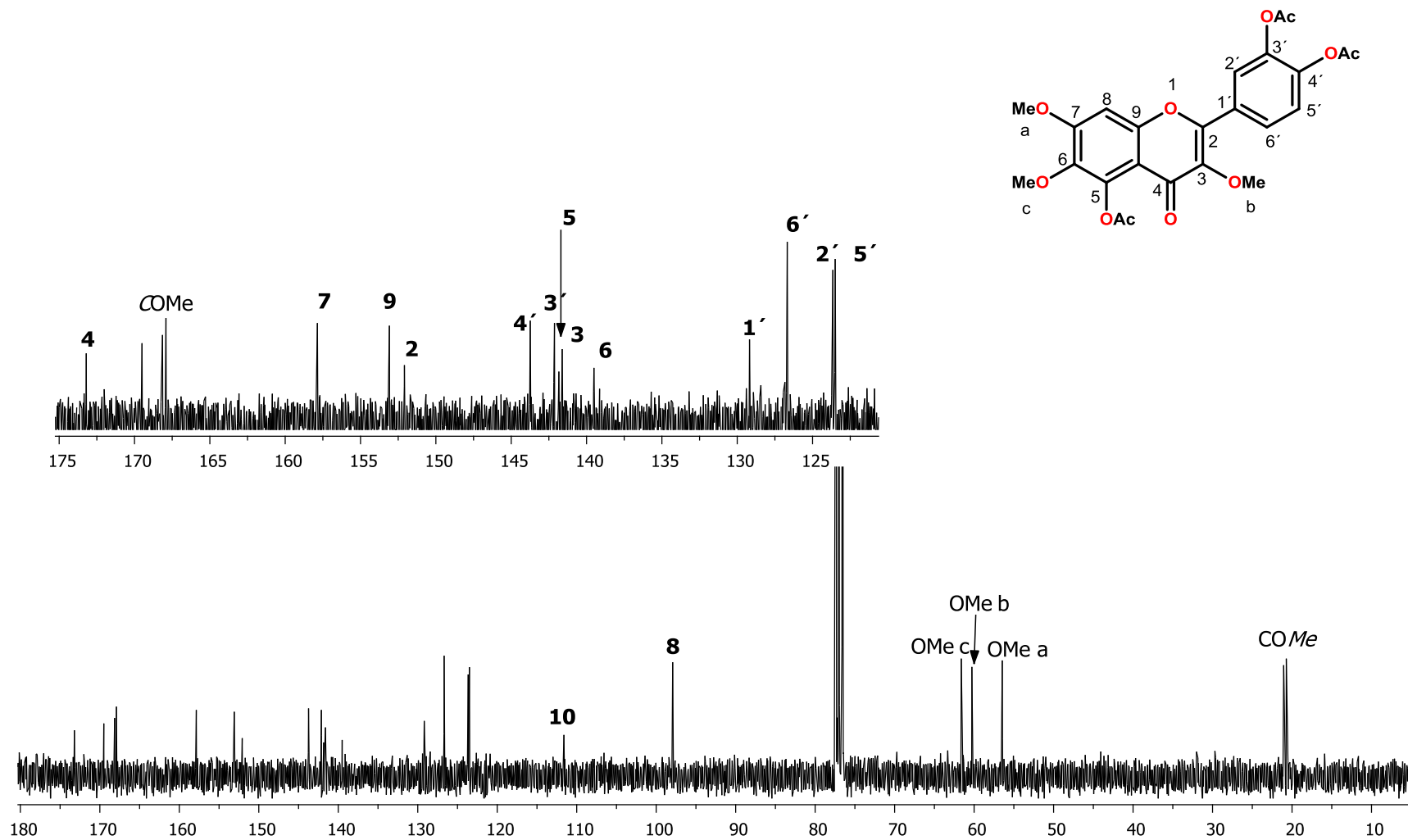


Figura 38. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del derivado peracetilado del chrysosplenol D (67), en CDCl_3 .

Para el compuesto **66** fue posible obtener cristales adecuados para su análisis por difracción de rayos X de monocristal (Figura 39), permitiendo confirmar la elucidación estructural de la molécula, estableciendo que se trataba del chryso splenol D.

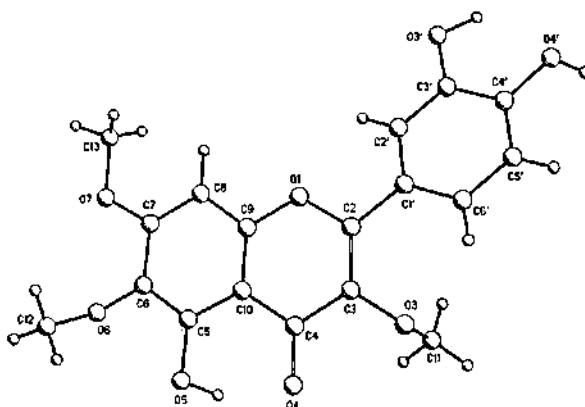


Figura 39. Difracción de Rayos X del chryso splenol D (**66**).

Las fracciones 44-52 recuperadas en la polaridad $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-MeOH}$ (47:3) fueron sometidas a separación, y tras varias cromatografías empleando gel de sílice de fase reversa C_{18} y mezclas de $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ con polaridades descendentes se obtuvieron cristales amarillos. En su espectro de RMN de ^1H (400 MHz, Acetona d_6) a campo bajo se observa un patrón de señales similar al compuesto **66**, aunque ahora solamente se aprecian dos señales simples en 3.89 y 3.88 ppm que integran para tres protones cada una, correspondientes a grupos metoxilo (Figura 40).

En el espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, Acetona d_6) se observan 17 señales correspondientes a un flavonoide funcionalizado, resaltando la presencia de las dos señales asignadas a carbonos de grupos metoxilos en 60.5 y 60.9 ppm (Figura 41).

Los datos de RMN DE ^{13}C de este compuesto resultaron iguales a los de la axillarina (**68**) reportada por Ahmad, en 2006 (Tabla 7).

Tabla 7. Comparación de desplazamientos químicos de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de la axillarina (**68**) con la literatura (Ahmad *et al.*, 2006).

C	$\delta_{\text{Exp.}}$	$\delta_{\text{Ref.}}$
2	158.1	158.1
3	139.2	139.2
4	180.2	180.3
5	153.7	153.7
6	132.5	132.6
7	158.7	158.8
8	94.9	95.0
9	153.6	153.8
10	106.3	106.3
1'	122.9	123.0
2'	116.4	116.5
3'	146.4	146.5
4'	149.9	150.0
5'	116.4	116.5
6'	122.3	112.3
OMeb	60.9	60.9
OMec	60.5	60.5

Exp. = experimental. Ref. = referencia.

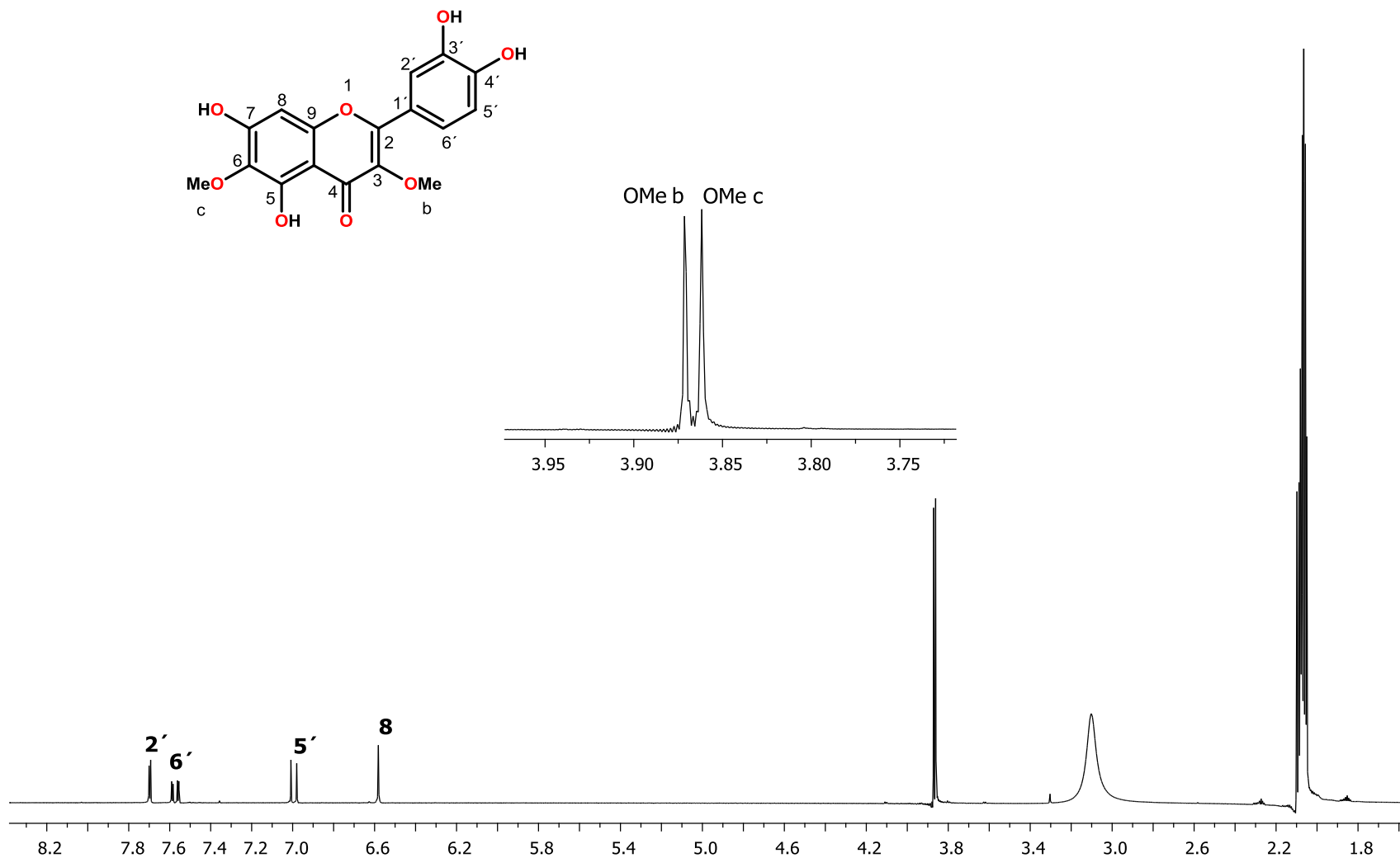


Figura 40. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz de la axillarina (68), en Acetona *d*₆.

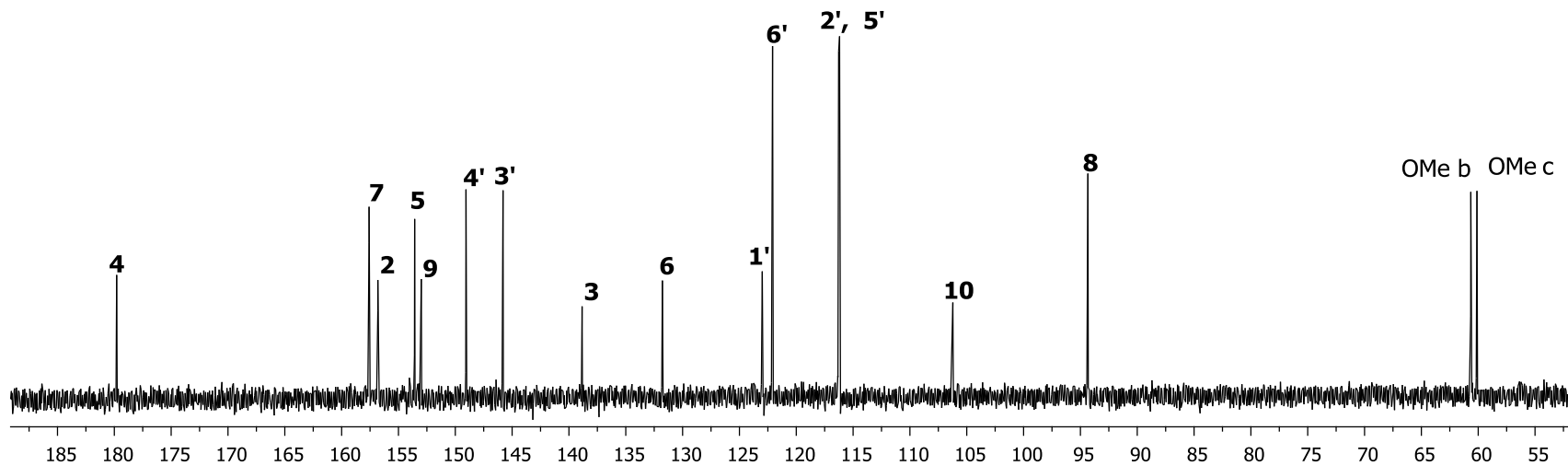
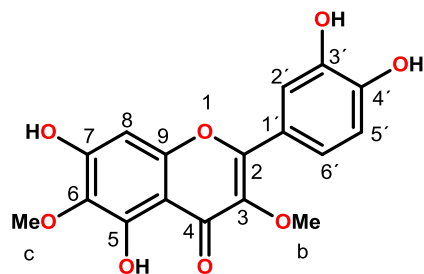


Figura 41. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz de la axillarina (68), en Acetona d_6 .

La preparación del derivado acetilado **69** se llevó a cabo, utilizando piridina y anhídrido acético. El producto de reacción purificado por cromatografía en columna. En el espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) se muestra el patrón de señales del flavonoide de origen (**68**); adicionalmente se aprecian cuatro señales de los protones de acetilos entre 2.51-2.35 ppm (Figura 42).

En el espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) se muestran, además de las señales del flavonoide, las cuatro señales de carbonilo de los grupos de acetato entre 169.1-167.9 ppm; adicionalmente, se observan las cuatro señales de los carbonos de los metilos de acetilo entre 21.1-20.7 ppm (Figura 43) demostrando químicamente la presencia de cuatro grupos de hidroxilo en la molécula.

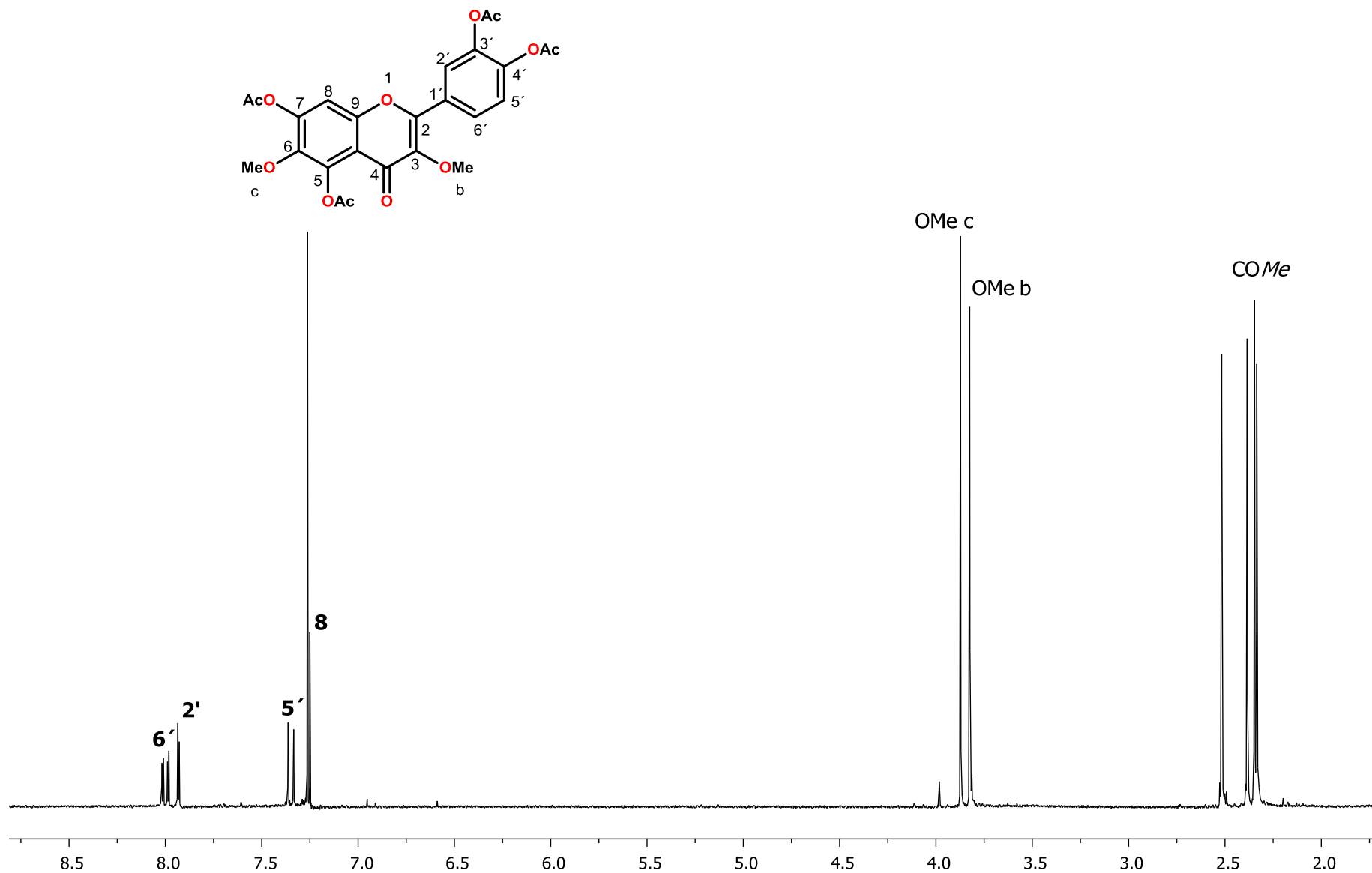


Figura 42. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz del derivado acetilado de la axillarina (**69**), en CDCl₃.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

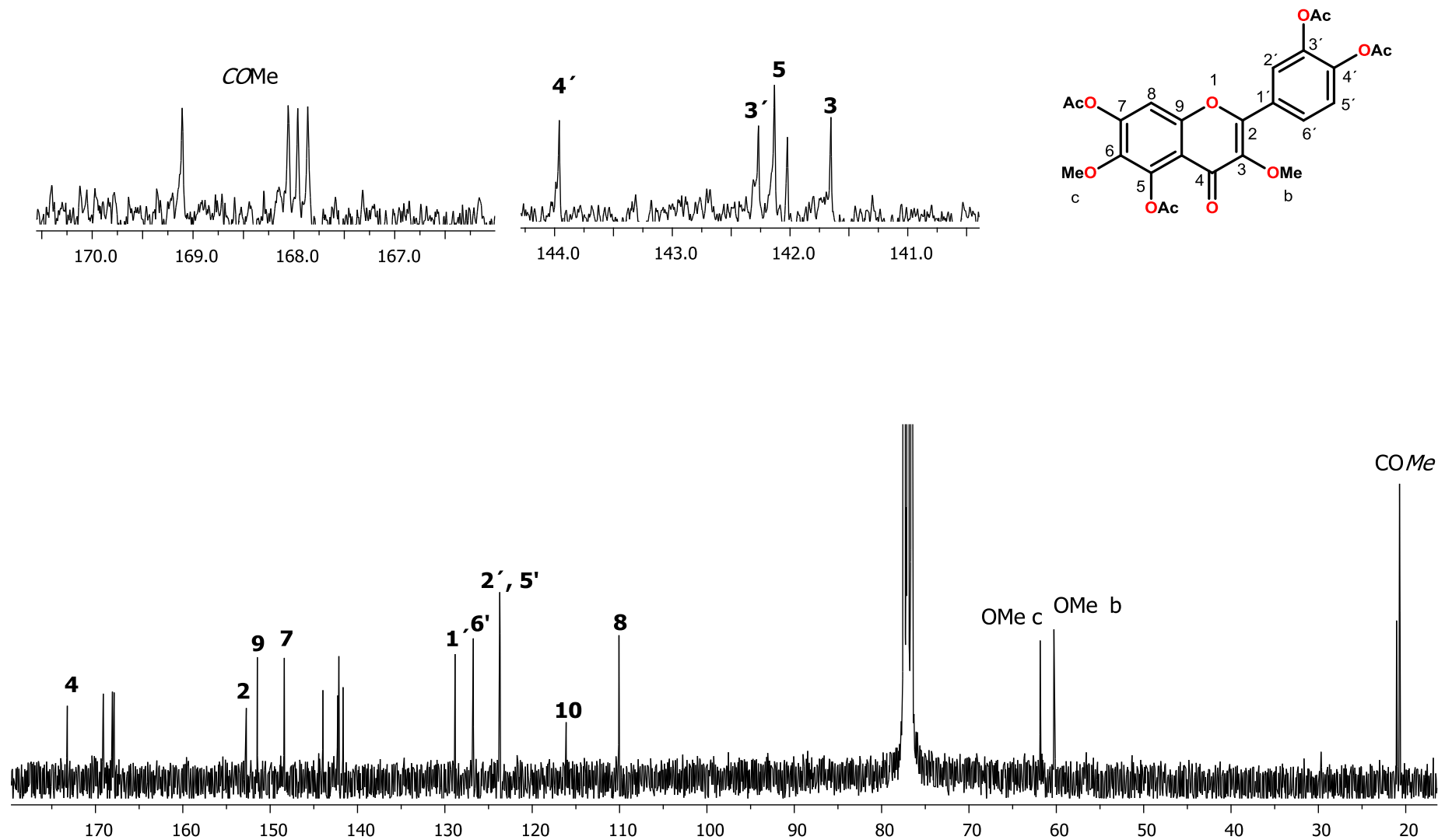


Figura 43. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del derivado acetilado de la axillarina (**69**), en CDCl_3 .

Continuando con la cromatografía del extracto de AcOEt de hojas, en las fracciones 19-21 fueron obtenidos cristales amarillos. Los cuales muestran en el espectro de RMN de ^1H (400 MHz, Acetona- d_6) el mismo patrón de señales en la región de aromáticos, correspondientes a los protones H-8, H-2', H-5' y H-6', observados en los flavonoides **66** y **68** anteriormente discutidos, diferenciándolo por la presencia de solo una señal simple en 3.88 ppm que integra para tres protones, lo que indica que este derivado contiene un solo grupo OMe (Figura 44), por lo que se puede establecer que se trata de la quercetagetina 3-metil éter (**70**).

De igual manera se preparó el derivado peracetilado **71**, en cuyo espectro de RMN de ^1H (400 MHz, Acetona- d_6) se observan las señales de los protones aromáticos desplazadas a campo bajo, en 7.86 ppm se observa la señal doble de dobles con $J = 8.5$, 2.0 Hz del protón H-6', en 7.83 ppm aparece la señal doble con $J = 2.0$ Hz del H-2', en 7.47 ppm se observa la señal simple del protón H-8, y en 7.38 ppm se muestra la señal doble con $J = 8.5$ Hz correspondiente al protón H-5'; de igual manera, se aprecian cinco señales de los protones de los grupos acetilos entre 2.40-2.30 ppm lo que confirma la presencia de cinco grupos hidroxilo en la molécula (Figura 45).

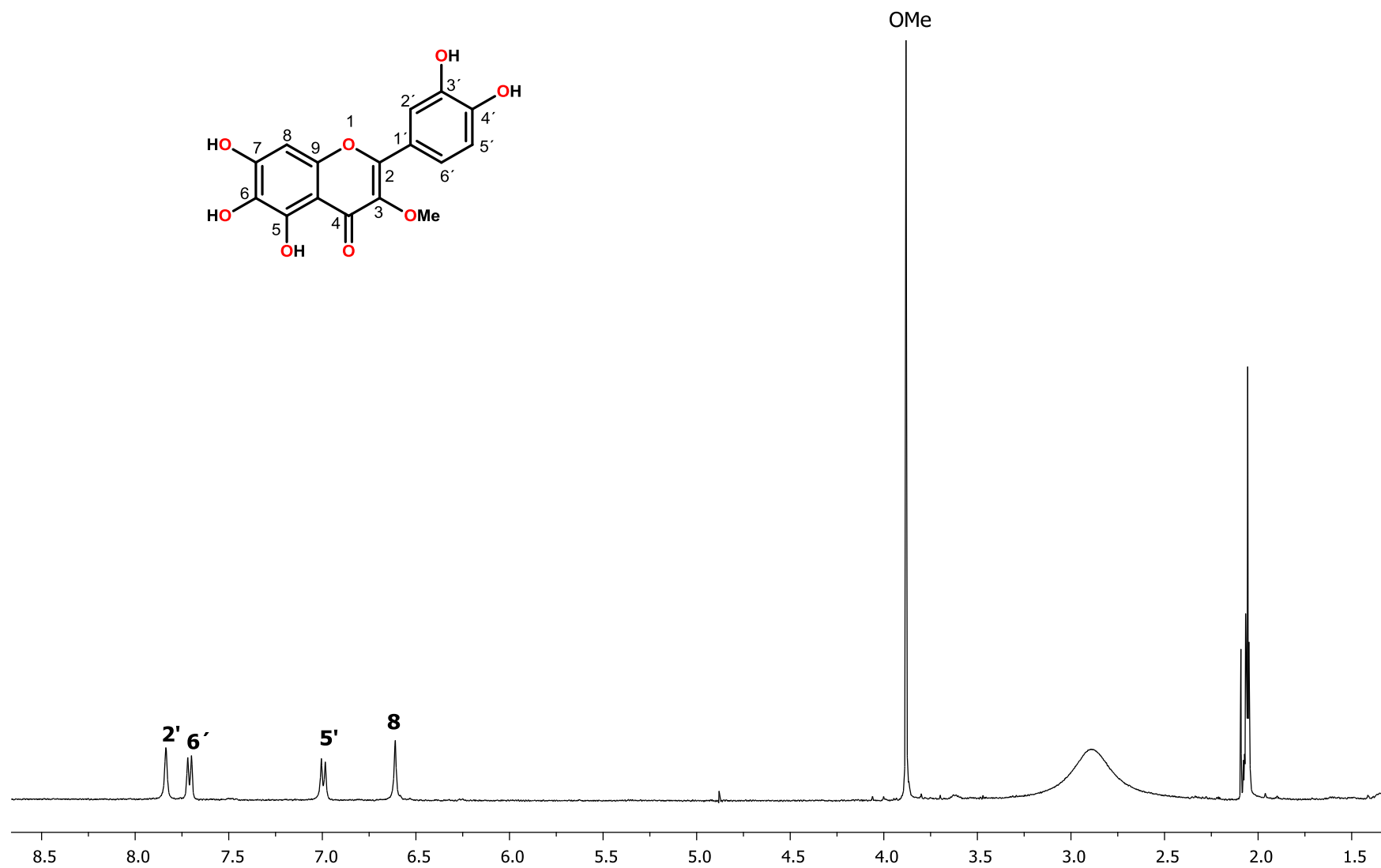


Figura 44. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz de la quercetagina 3-metil éter (70), en Acetona-*d*₆.

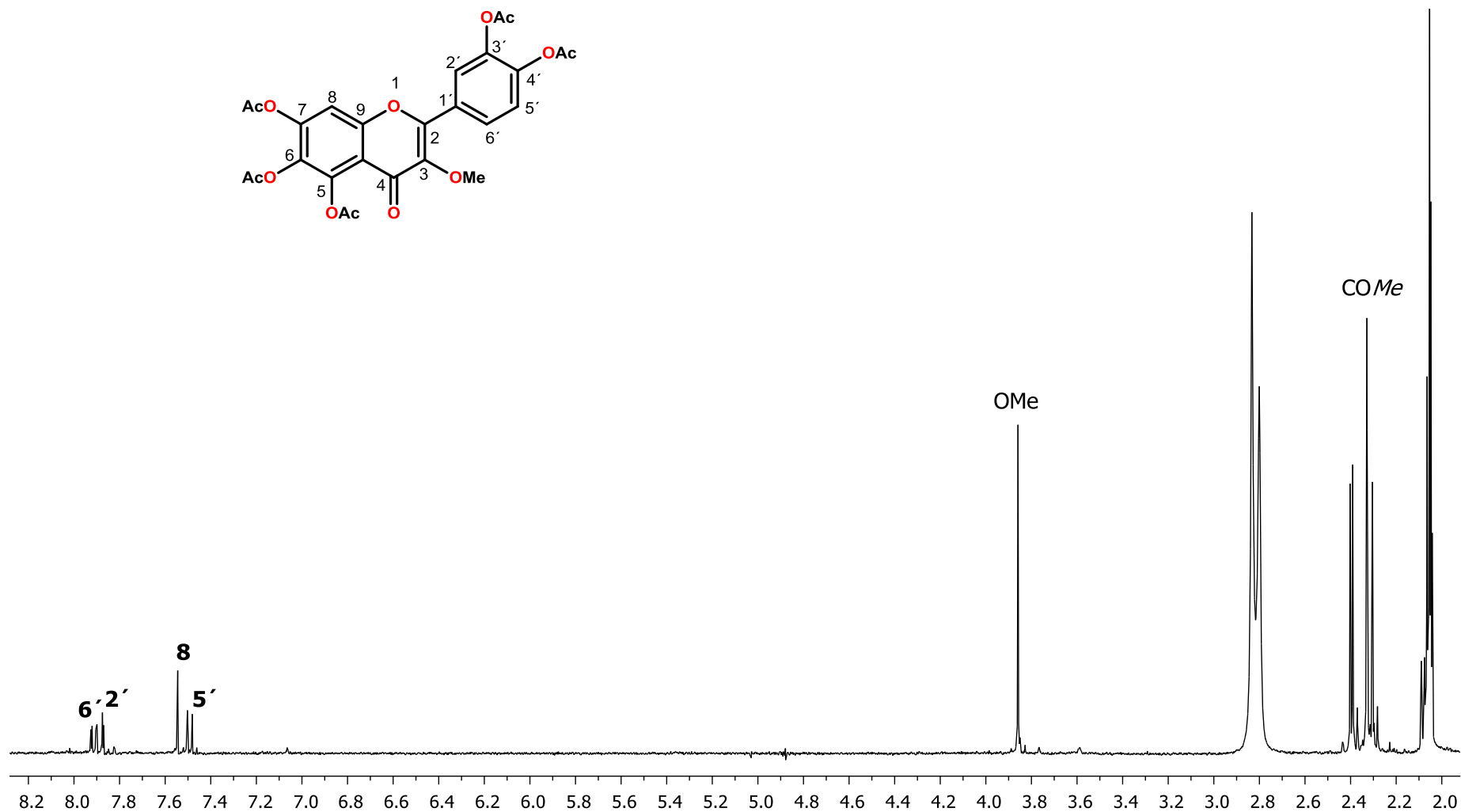


Figura 45. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz derivado acetilado de la quercetagina 3-metil éter (71), en Acetona-*d*₆.

6.5 ANÁLISIS QUÍMICO DEL EXTRACTO METANÓLICO DE LAS HOJAS

Para el análisis químico del extracto metanólico de las hojas de *V. parviflora*, primeramente se analizó su espectro de RMN de ^1H (400 MHz en CD_3OD), el cual muestra señales en la región de hidrógenos aromáticos, vinílicos y de grupos metoxilos. Se procedió a realizar su fraccionamiento en columna abierta utilizando gel de sílice de fase directa así como fase reversa C_{18} . Tras múltiples intentos en la búsqueda de condiciones cromatográficas, alternando polaridades y fases estacionarias, no fue posible aislar algún tipo de compuesto debido a la complejidad de las mezclas que se obtenían de las fracciones recuperadas (Figura 46).

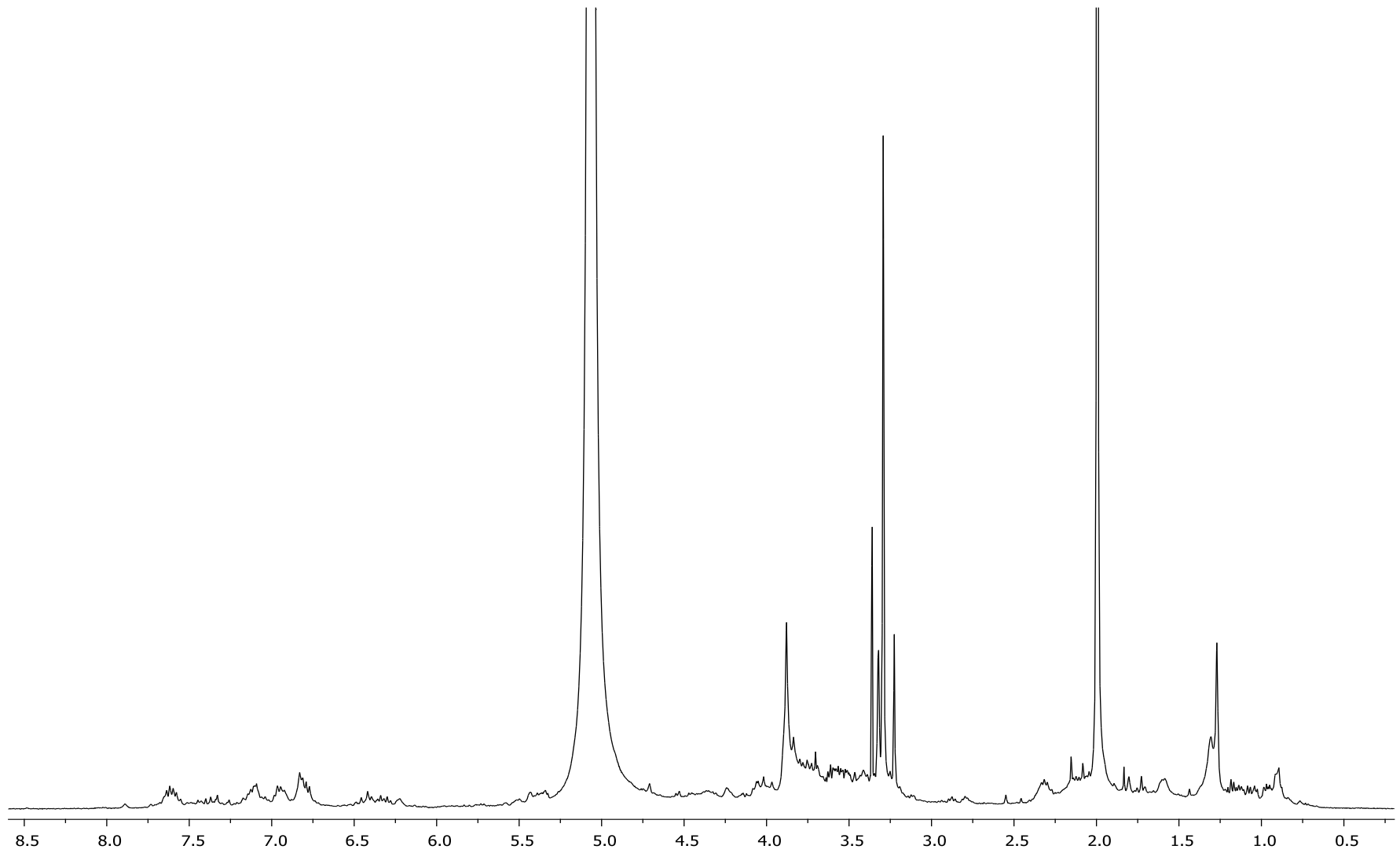


Figura 46. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del extracto de hojas de metanol en CD_3OD .

6.6 ANÁLISIS QUÍMICO DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE LAS FLORES

La separación cromatográfica de 15 g de extracto hexánico de flores, se realizó empleando como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil mezcla de hexanos-AcOEt en orden de polaridad ascendente, resultando un total de 135 fracciones de 100 mL cada una. Las fracciones 20-55 obtenidas en la polaridad hexanos-AcOEt (47:3) se unieron y sometieron a recromatografía en columna abierta empleando gel de sílice y una mezcla de hexanos-AcOEt (98:2), obteniendo 30 fracciones de 10 mL cada una; las fracciones 5-20 se reunieron y se realizó una recromatografía en placa preparativa, utilizando como fase móvil hexanos-AcOEt (95: 5) de la que se obtuvieron 4 bandas. En el espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de la banda 2 ($R_f=0.5$), se observa un patrón de señales de una mezcla de triterpenos; donde se aprecian en 4.69 ppm una señal doble ancha con $J = 2.4$ Hz que se asigna al protón vinílico H-29a; en 4.62 ppm la señal asignada a los protones del doble enlace exocíclico H-30' en 4.58 ppm se encuentra una señal doble de dobles con $J = 2.4, 1.6$ Hz asignada al protón H-29b; en 4.47 ppm se localiza la señal múltiple perteneciente a protones base de éster (H-3 y H-3'); a frecuencias altas se observa una señal múltiple en 2.44 ppm que se asigna a los protones metilénicos H-21'; también son visibles las señales múltiples en 2.20 y 2.09 ppm correspondientes a los protones metínicos H-19 y H-19', respectivamente; en 2.06 ppm se ubica la señal intensa de los protones del grupo acetilo; en 1.65 ppm se ubica la señal simple ancha del metilo alílico (H-30); finalmente entre 1.00-0.75 ppm se ubican las señales simples de grupos metilo H-5', H-22', H-23, H-23', H-24, H-25, H-27 y H-28 (Figura 47).

En el espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) se aprecian 64 señales que corresponden a una mezcla de los dos triterpenos acetilados (Figura 48a y Figura 48b), que al ser comparados sus desplazamientos químicos (Tabla 8) concuerdan con el acetato de lupeol (**72**) (Chaturvedula *et al.*, 2012), y para el acetato de taraxasterol (**73**) (Khalilov *et al.*, 2003). Esta mezcla fue sometida a múltiples cromatografías para su separación; sin embargo, no fue posible su separación.

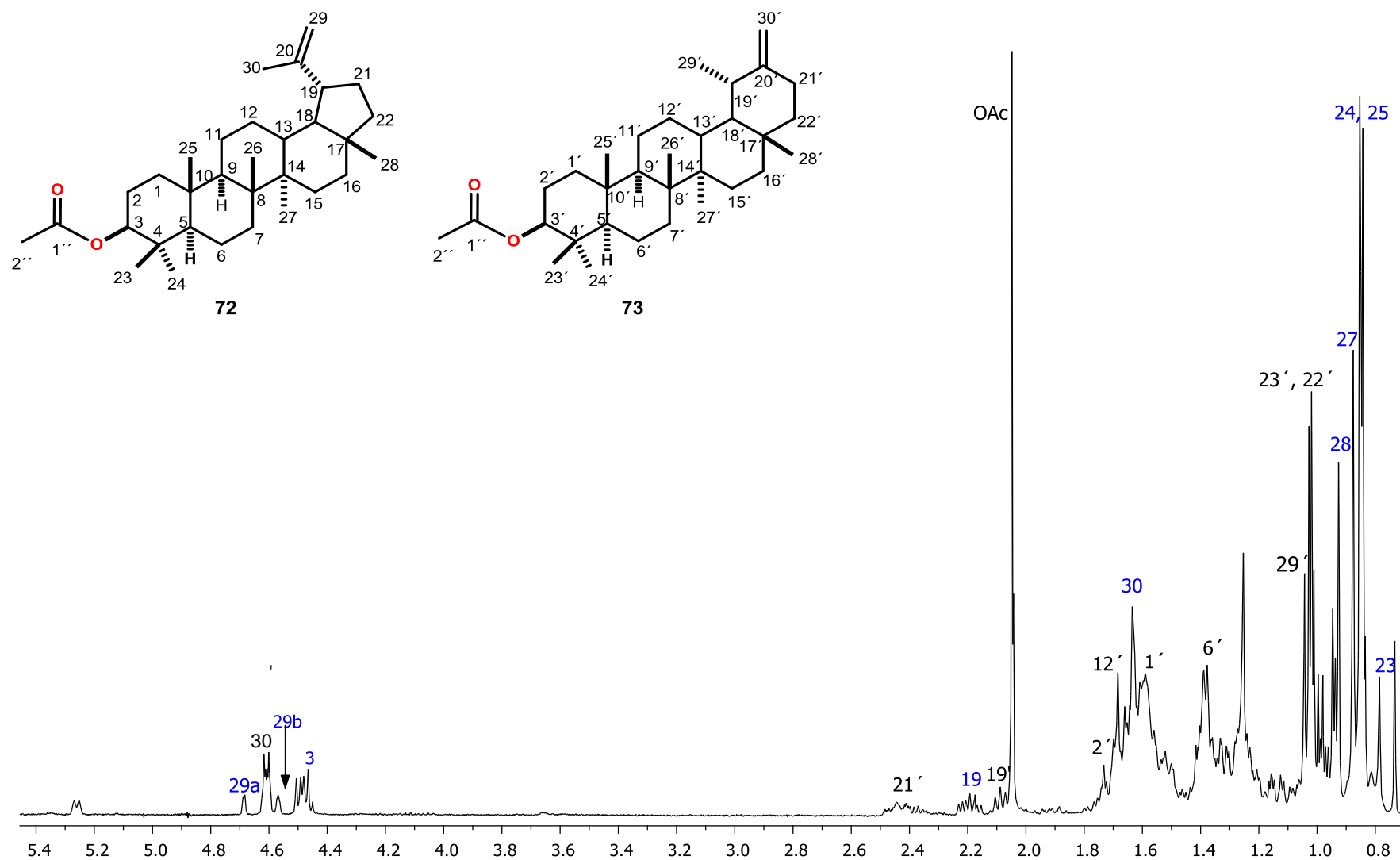


Figura 47. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del acetato de lupeol (72) y acetato de taraxasterol (73), en CDCl_3 .

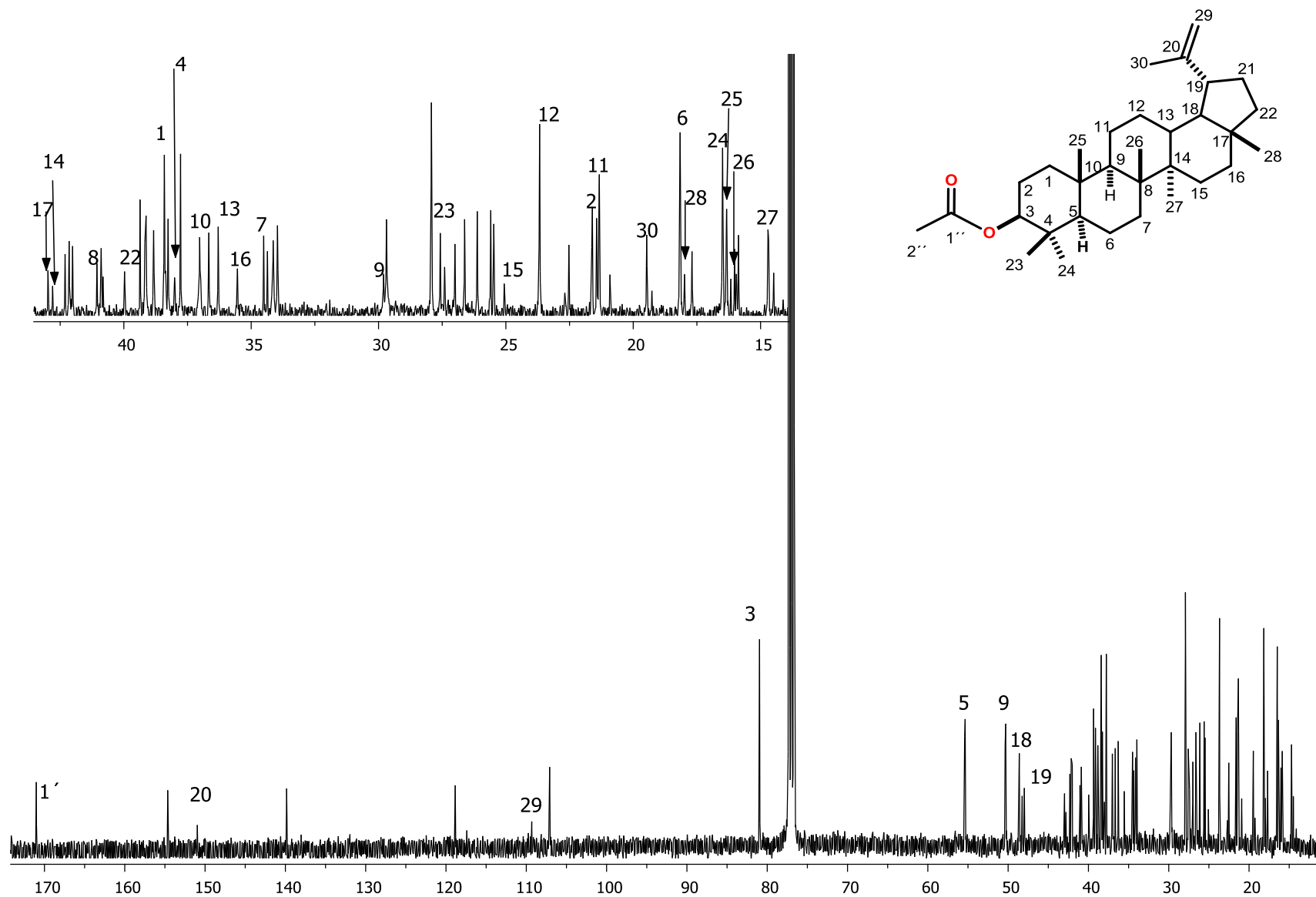


Figura 48a. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del acetato de lupeol (72), en CDCl_3 .

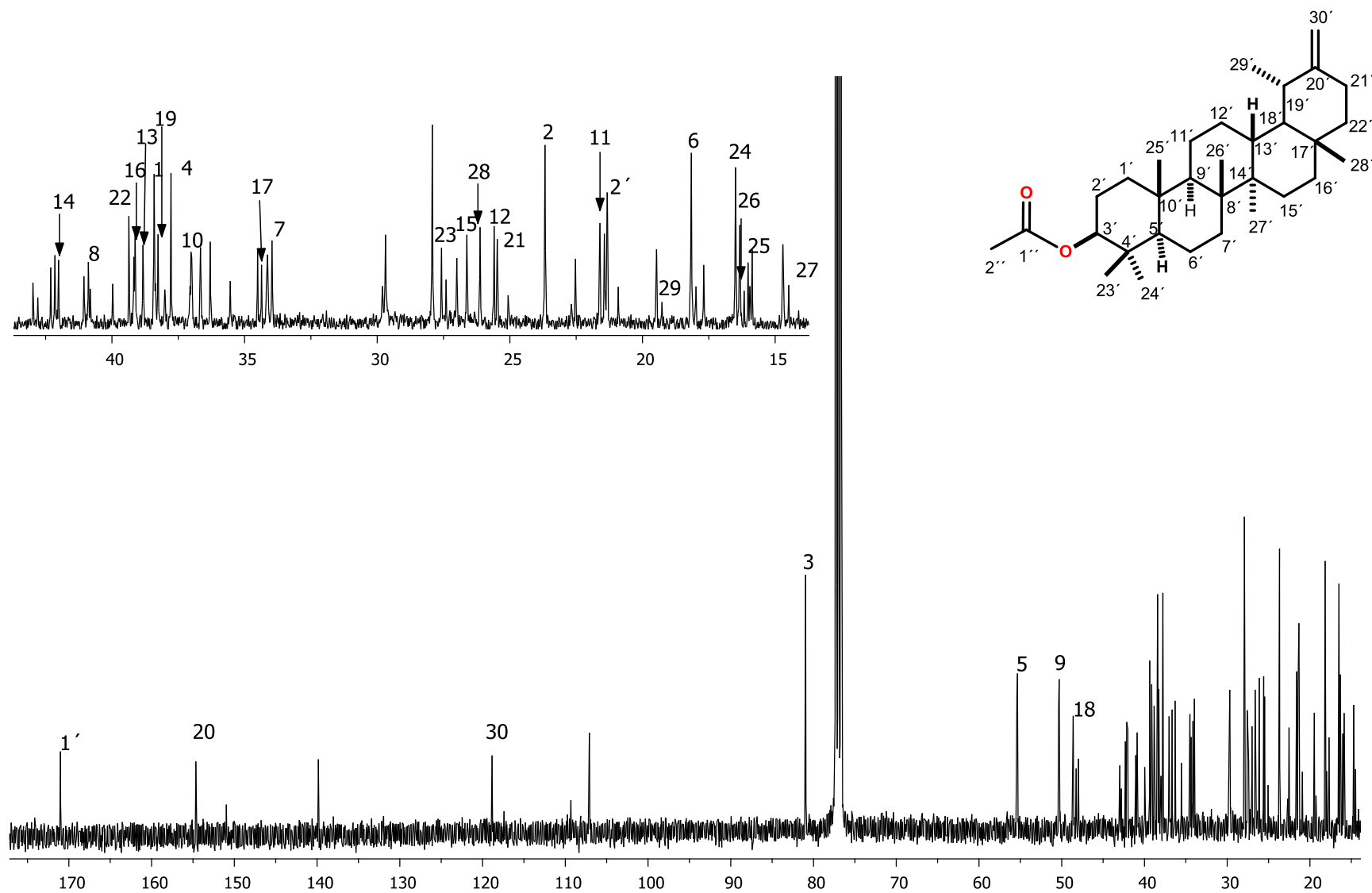


Figura 48b. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del acetato de taraxasterol (73), en CDCl_3 .

Tabla 8. Comparación de desplazamientos químicos de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) del acetato de lupeol (**72**) y acetato de taraxasterol (**73**) con la bibliografía (Chaturvedula *et al.*, 2012; Dzhemilev *et al.*, 2003).

C	$\delta_{\text{Exp.}}$ (72)	$\delta_{\text{Ref.}}$	$\delta_{\text{Exp.}}$ (73)	$\delta_{\text{Ref.}}$
1	38.6	38.4	38.4	38.4
2	21.7	21.6	23.6	23.6
3	81.2	81.0	80.8	80.9
4	38.0	38.0	37.7	37.7
5	55.6	55.4	55.4	55.4
6	18.4	18.2	18.1	18.1
7	34.4	34.4	33.9	33.9
8	41.0	41.1	40.8	40.8
9	50.5	50.4	50.3	50.3
10	37.3	37.0	37.0	37.0
11	21.1	21.3	21.4	21.4
12	24.0	23.7	25.5	25.5
13	36.2	36.3	38.8	38.8
14	43.0	42.8	41.9	42.0
15	25.3	25.1	26.6	26.6
16	35.8	35.5	39.1	39.1
17	43.2	43.0	34.4	34.5
18	48.5	48.6	48.6	48.6
19	48.2	48.2	38.3	38.3
20	151.2	151.6	154.4	154.6
21	30.0	29.8	25.4	25.4
22	40.2	40.0	39.3	39.3
23	27.6	27.6	27.8	27.4
24	16.7	16.5	16.4	16.4
25	16.4	16.3	15.4	15.8
26	16.2	16.2	16.2	16.0
27	14.7	14.7	14.6	14.5
28	18.2	17.98	26.1	26.1
29	109.6	109.6	19.4	19.4
30	19.5	19.5	107.0	107.1
1''	171.3	171.0	170.8	171.0
2''	28.2	27.9	21.1	20.9

Exp. = experimental. Ref. = referencia.

6.7 ANÁLISIS QUÍMICO DEL EXTRACTO DE ACETATO DE ETILO DE LAS FLORES

En el espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) del extracto, se observa a campo bajo entre 5.60-5.20 ppm señales de protones vinílicos; entre 4.80-4.50 ppm aparecen protones base de éster; y en campo alto entre 2.30-0.80 ppm se aprecian los protones alifáticos, mostrando el mismo patrón de señales con el espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) del extracto hexánico de flor (Figura 49), encontrándose presente mayoritariamente la mezcla de acetato de lupeol (**72**) y acetato de taraxasterol (**73**), motivo por el cual no se continuó con la separación y purificación de estos, quedando en la identificación de la mezcla por RMN de ^1H .

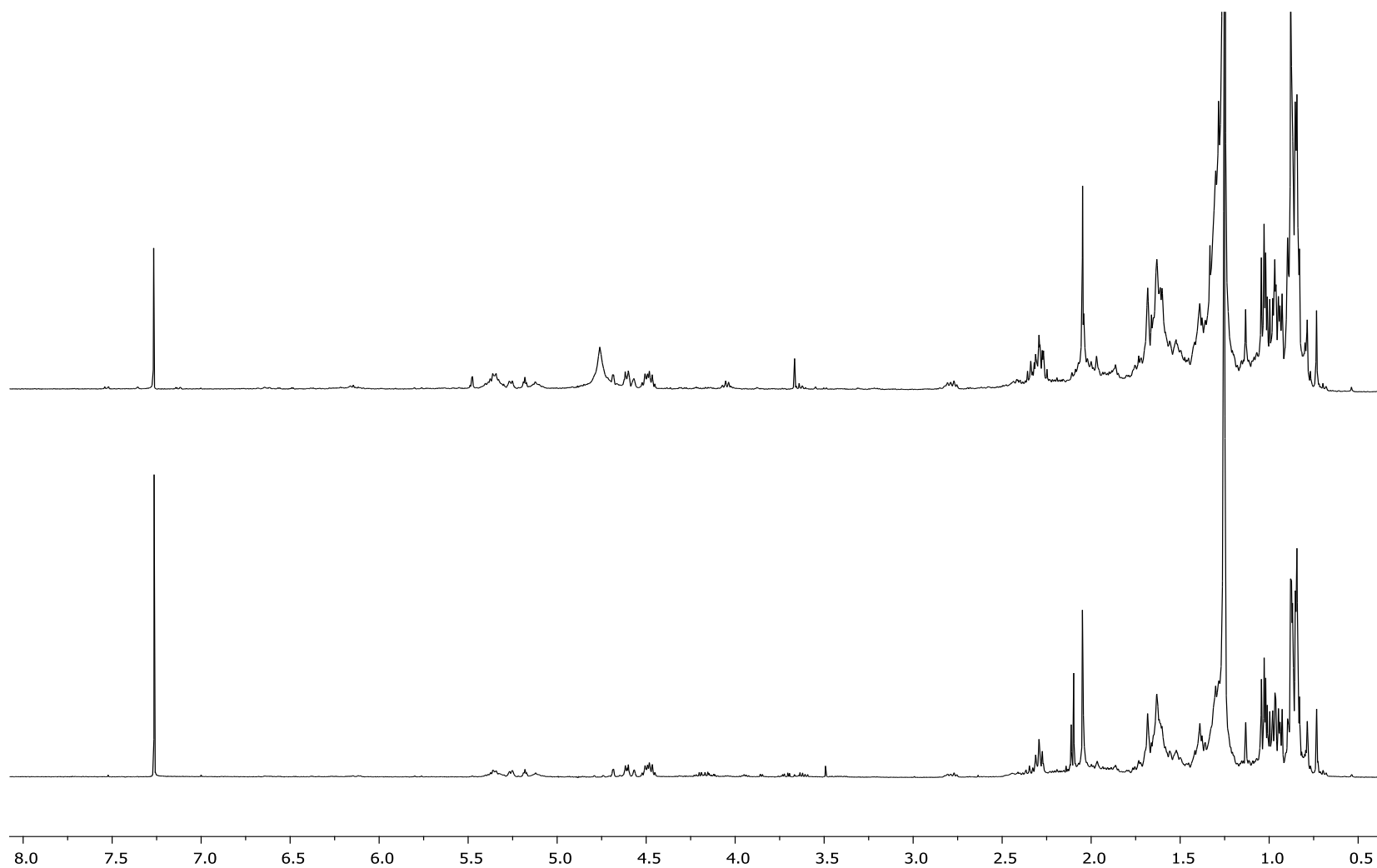


Figura 49. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del extracto hexánico (trazo superior) y de AcOEt (trazo inferior) de flor en CDCl_3 .

6.8 ANÁLISIS QUÍMICO DEL EXTRACTO METANÓLICO DE LAS FLORES

En el espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) del extracto de flor, se observan las señales entre 7.20-6.80 ppm de protones aromáticos así como la señales típicas de grupos metoxilo y azúcares entre 4.20-3.20 ppm. Al realizar un comparativo de los espectros de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de cada uno de los flavonoides aislados (**66**, **68** y **70**) con el del extracto metanólico total de flores, se aprecian similitudes en los desplazamientos de las señales H-2', H-5' y H-6' del anillo B; adicionalmente, en esta región se observan dos señales simples en 6.90 y 7.30 ppm, lo que sugiere que estos protones se pueden encontrar en las posiciones 8 y 3, las señales entre 4.20-3.20 ppm sugieren que estas flavonas se encuentran glicosiladas (Figura 50). Tras varios intentos por aislar a estos derivados mayoritarios puros, no fue posible debido a la complejidad de las mezclas obtenidas.

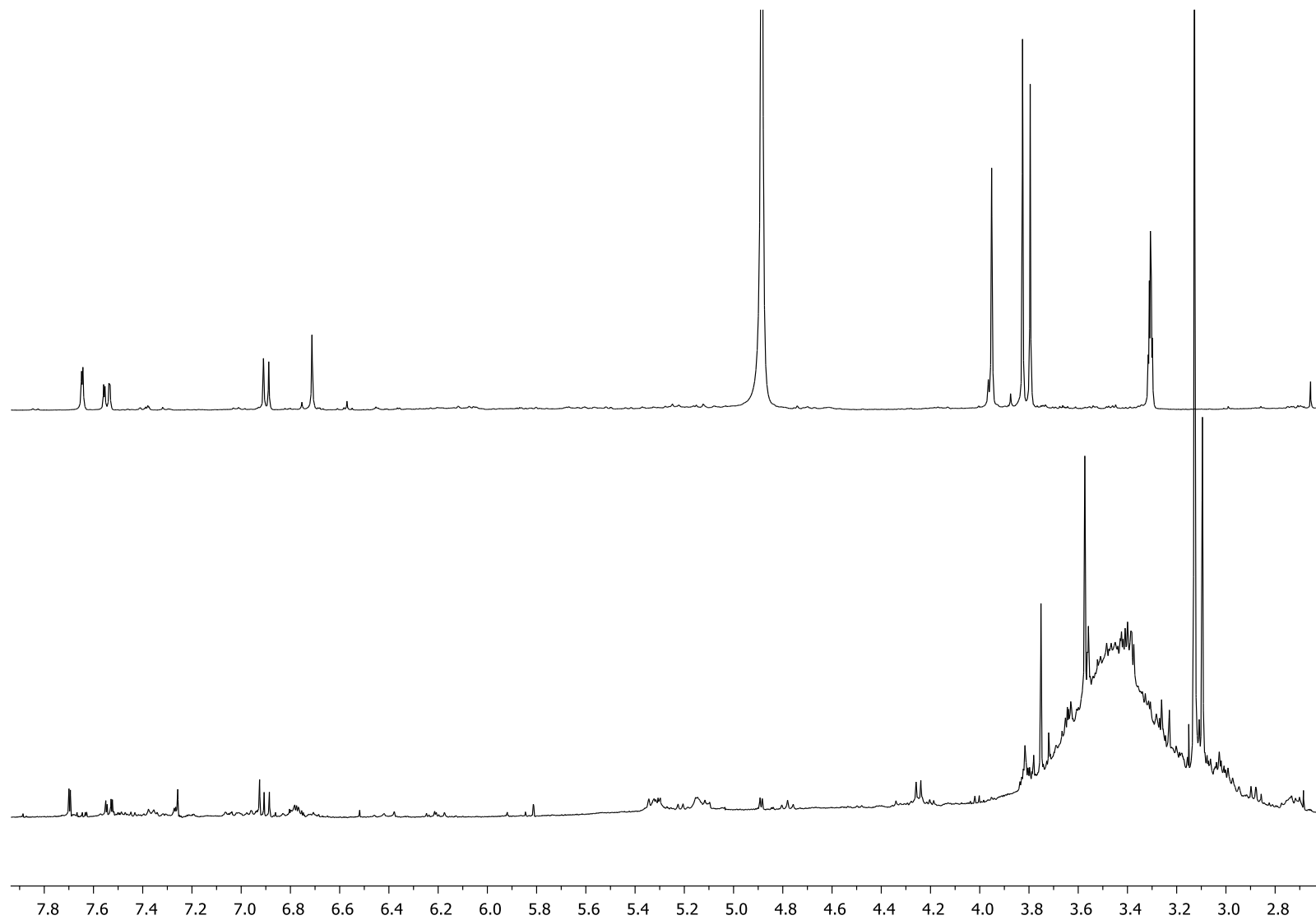


Figura 50. Espectros de RMN de ^1H a 400 MHz del de chrysosplenol D, en CD_3OD (trazo superior) y del extracto metanólico de flor, en CD_3OD (trazo inferior).

6.9 ENSAYO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE MEDIANTE EL MÉTODO DE DPPH.

Una vez concluido el análisis químico de los extractos de las partes aéreas de *V. parviflora*, se continuó con la determinación del potencial antioxidante de los compuesto obtenidos mediante el ensayo de captura del radical libre DPPH• (2,2 difenil-1-picrihidrazilo). Inicialmente, se realizó una búsqueda en la bibliografía para determinar si existían antecedentes de actividad antioxidante sobre estos compuestos. Se encontró que el chrysosplenol D (**66**), axillarina (**68**) y quercetagetina 3-metil eter (**69**) ya fue determinada su actividad antioxidante (Scotti et al 2011; Schmeda-Hirschmann *et al.*, 2004; Jung *et al.*, 2000); sin embargo, se ensayaron a **66** y **68** con fines de validación del método empleado.

Para llevar a cabo el ensayo, se preparó una curva control empleando ácido ascórbico como estándar a concentraciones de 200, 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 µg/mL. A estas mismas concentraciones se probaron a **66** y **68**. Se ensayó la mezcla de estearato α y β -amirina (**55** y **56**), epóxido de β -cariofileno (**59**), espathulenol (**61**), estigmasterol (**62**), glucósido de β -sitosterol (**63**), ácido ilícico (**64**) y ácido cóstico (**65**) a las concentraciones de 2000, 1000, 500, 250, 125 y 60.25 µg/mL. Por cada 195 µL cada muestra se agregaron 5 µL de DPPH• (2,2 difenil-1-picrihidrazilo) 5 mM y como control negativo se utilizó metanol; estas diluciones fueron preparadas en placa de 96 pocillos los cuales se incubaron por 30 minutos en obscuridad. Se midió la absorbancia a 515 nm (Brand-Williams *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2013). En este ensayo se obtuvo una potente capacidad de neutralización de DPPH por parte del chrysosplenol D (**66**) que presentó una concentración efectiva 50 (CE₅₀) de 6.24 ± 0.64 µg/mL, y de la axillarina (**68**) de 3.96 ± 0.35 µg/mL; también se observó una ligera capacidad de neutralización del ácido ilícico (**64**), que correspondió a una CE₅₀ de 556.30 ± 2.00µg/mL (Tabla 9). Los compuestos **55**, **56**, **59**, **61-63**, **65** no mostraron actividad antioxidante.

Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado y se validaron a partir de las curvas obtenidas del control positivo (ácido ascórbico). Cabe mencionar que no fue posible determinar el potencial antioxidante del eudesmenol (**60**) debido a su inestabilidad.

Tabla 9. Concentraciones efectivas encontradas (CE_{50}).

Muestra	Captación de radicales libres DPPH CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Captación de radicales libres DPPH CE_{50} ($\mu\text{M/mL}$)
Ácido ascórbico (Curva control)	5.26 ± 0.42	29.9
Ácido ilícico (64)	556.30 ± 2.00	2204.5
Chrysosplenol D (66)	6.24 ± 0.64	17.1
Axillarina (68)	3.96 ± 0.35	11.4

Las curvas de absorbancia de los compuestos **64**, **66**, **68**, así como del control positivo (ácido ascórbico) obtenidas con el ensayo de captura del radical libre DPPH se muestran en los gráficos 1-4.

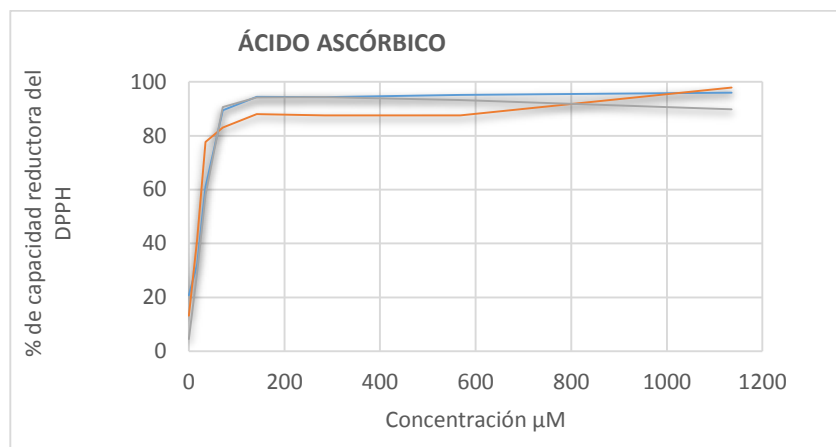


Gráfico 1. Representación de la captación de DPPH del ácido ascórbico.

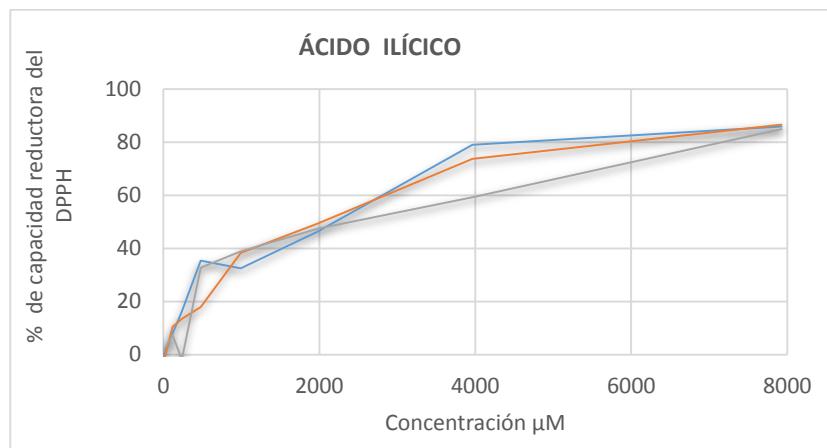


Gráfico 2. Representación de la captación de DPPH del ácido ilícico (64).

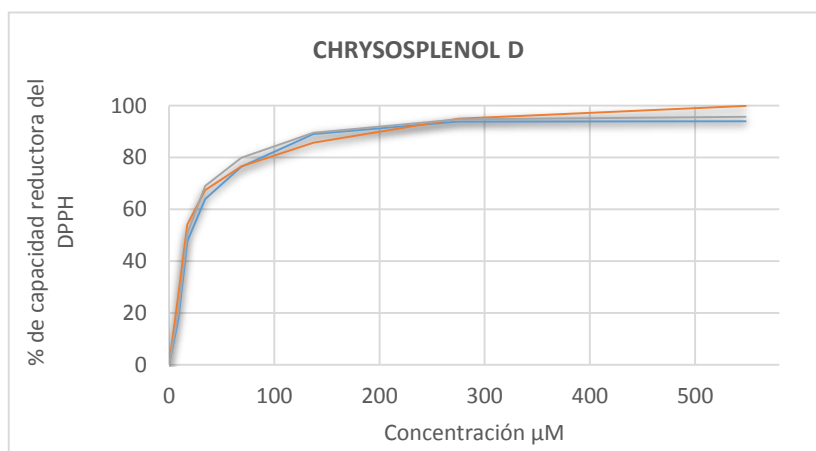


Gráfico 3. Representación de la captación de DPPH del chrysosplenol D (66).

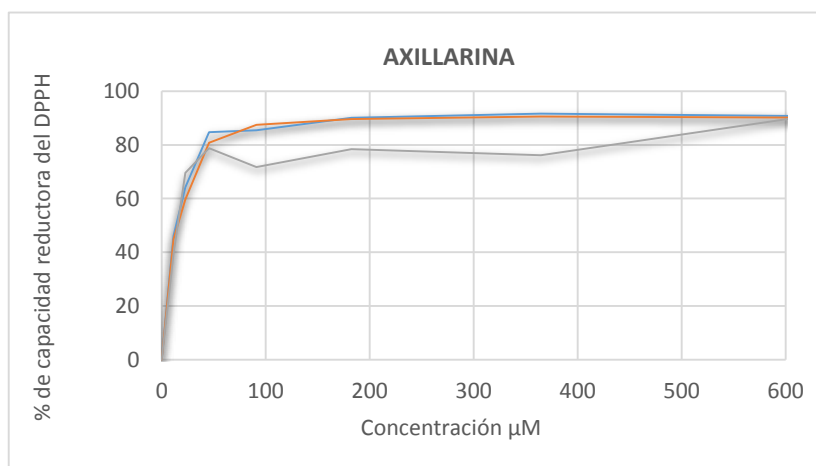
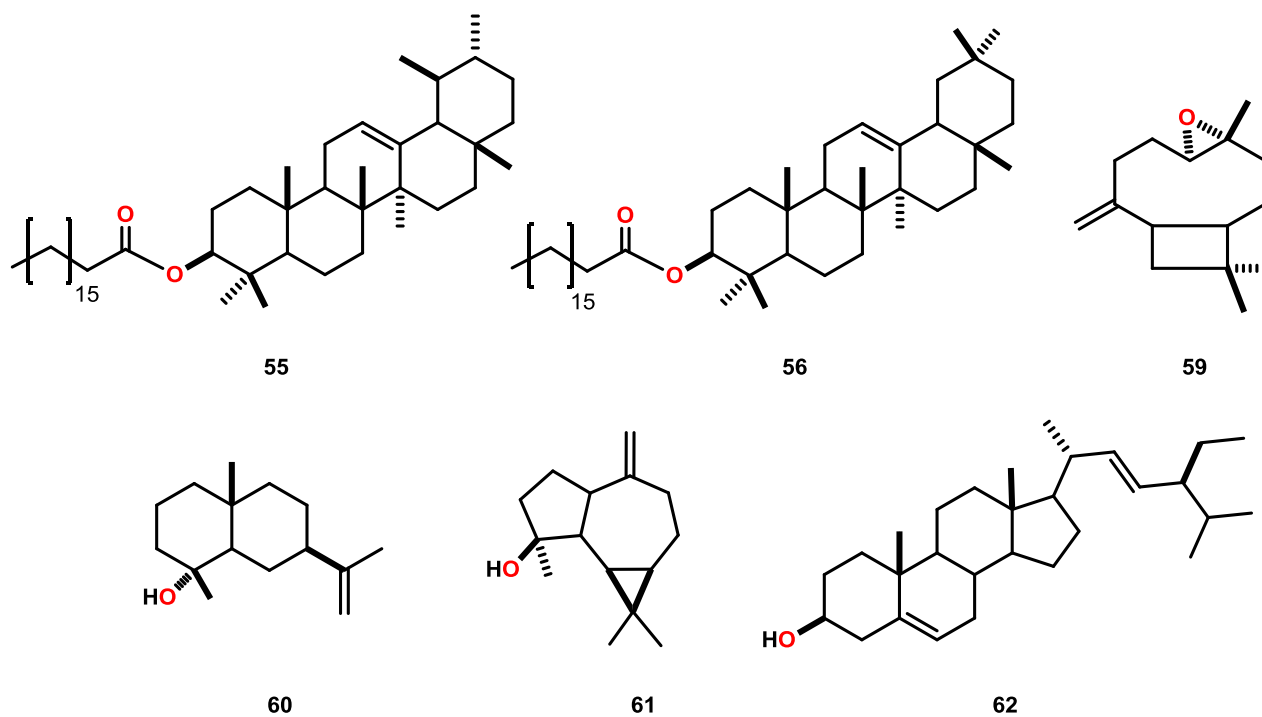


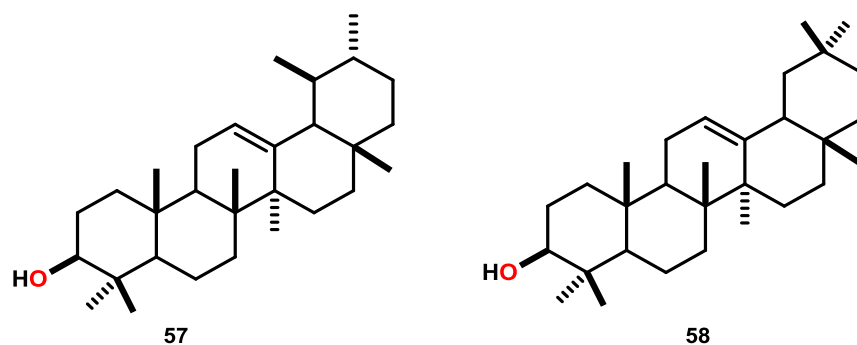
Gráfico 4. Representación de la captación de DPPH de la axillarina (68).

7. CONCLUSIONES

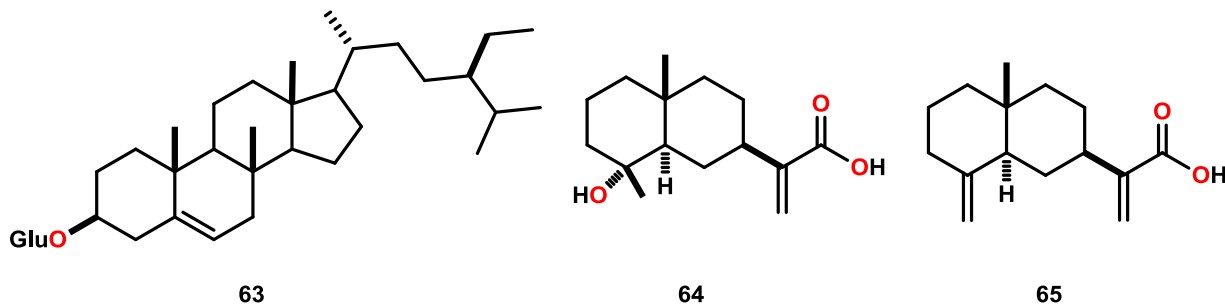
1. Del análisis del extracto hexánico de *V. parviflora*, se aislaron e identificaron a la mezcla de estearatos α - y β -amirina (**55**, **56**); tres sesquiterpenos oxigenados biciclos, epóxido de β -cariofileno (**59**), eudesmenol (**60**), espathulenol (**61**) y estigmasterol (**62**).



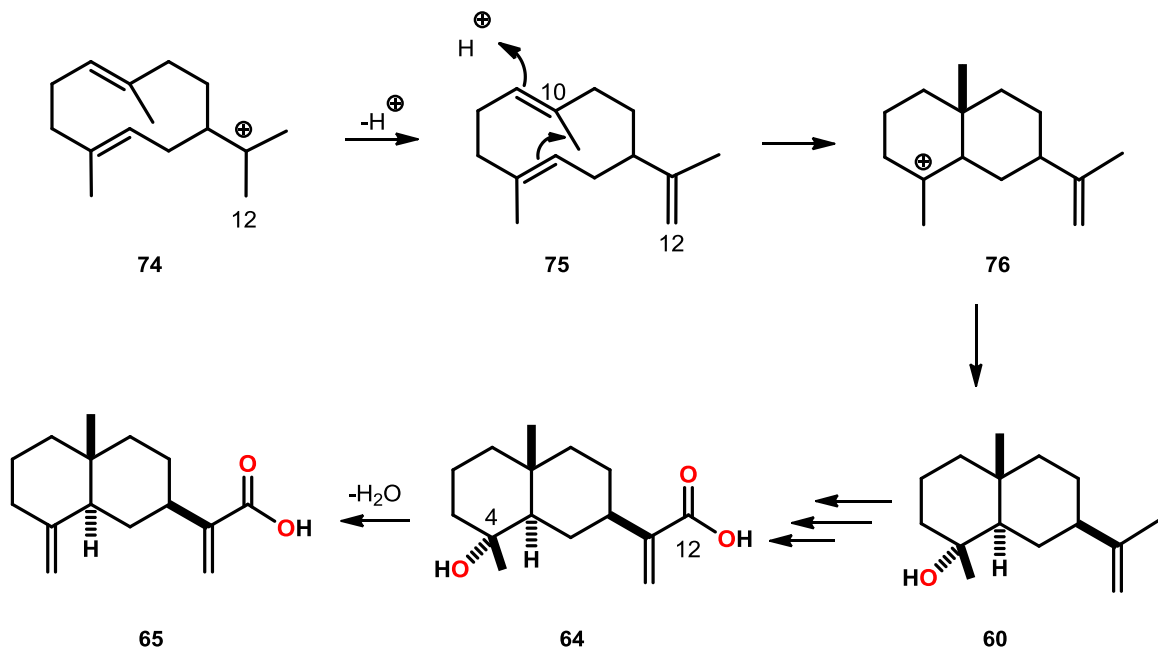
2. La hidrólisis alcalina empleando KOH de la mezcla de estearatos **55** y **56** condujo a la obtención de **57** y **58**.



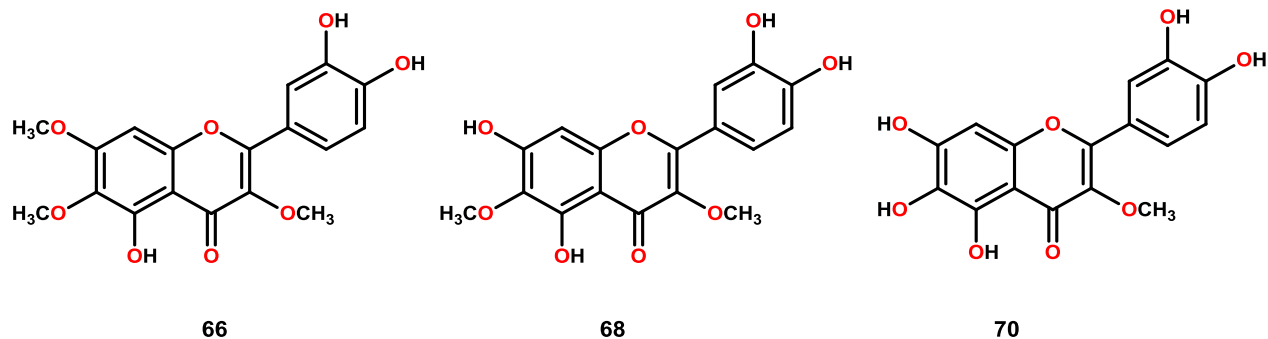
3. Del análisis químico efectuado al extracto de AcOEt de las hojas, se identificaron al glucósido de β -sitosterol (**63**), ácido ilícico (**64**) y ácido cóstico (**65**).



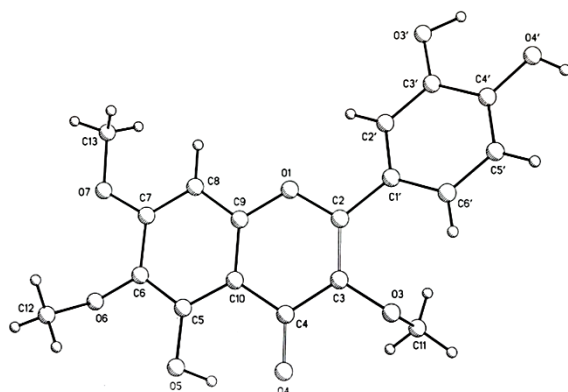
4. A partir de aislamiento de los eudesmanos **60**, **64** y **65** se propone la siguiente relación biosintética: el catión germacrilo **74**, que al desprotonarse en el metilo 12 genera el germacreno (**75**); una adición electrofílica intramolecular del doble enlace con el C-10 en **75** favorece la formación del catión eudesmilo **76**, que por hidroxilación genera **60**, el cual sufre oxidaciones sucesivas en el carbono 12 para formar **64**; finalmente, por deshidratación de éste se genera **65**.



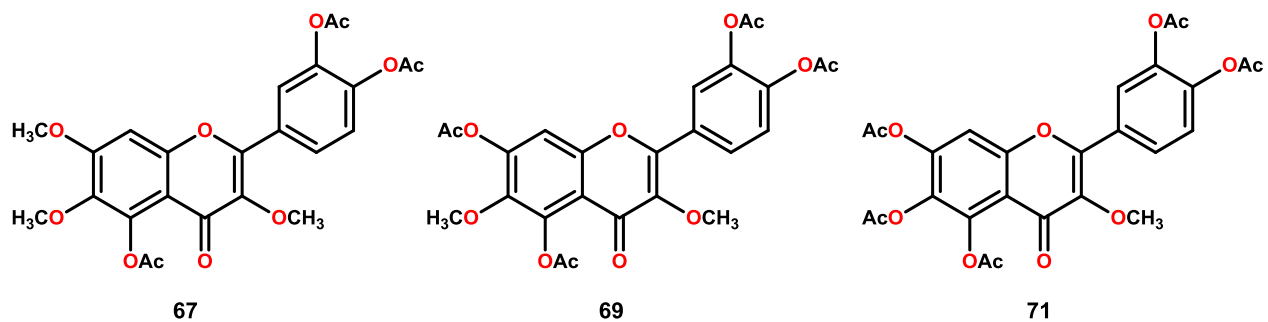
5. De las fracciones polares del extracto de AcOEt de las hojas, se aislaron tres flavonoides; al chrysofenol D (**66**), la axillarina (**68**) y la quercetagina 3-metil éter (**70**).



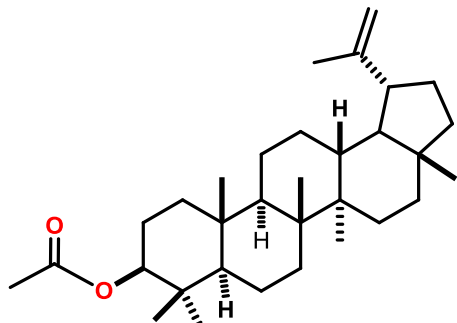
6. Del flavonoide **66** se logró obtener cristales adecuados para su análisis mediante difracción de rayos X, de esta manera se confirma la elucidación estructural realizada mediante espectroscopia de 1D y 2D.



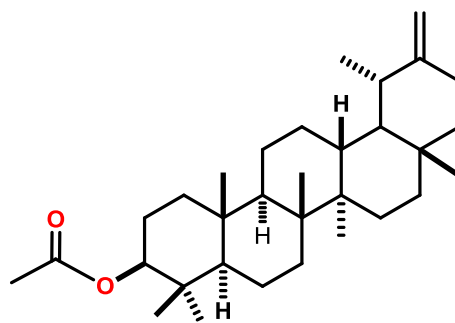
7. La preparación de los derivados acetilados; **67**, **69** y **71** permitió definir químicamente el número de grupos hidroxilo presentes en **66**, **68** y **70**.



8. Del análisis del extracto metanólico de hoja, no fue posible aislar e identificar alguna estructura química debido a la mezcla compleja de compuestos que lo conformaban.
9. Los extracto de hexanos y AcOEt de flor mostraron el mismo patrón de señales en su espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) aislando del primero a la mezcla de acetato de lupeólo (**72**) y acetato de taraxasterilo (**73**).



72



73

10. El espectro de RMN de ^1H del extracto metanólico de flores mostró como componentes mayoritarios posibles flavonas glicosiladas; sin embargo, no fue posible aislar y purificar a alguna de ellas.
11. Los ensayos de captura del radical libre DPPH permitió determinar que el chrysosplenol D y la axillarina mostraron los mejores resultados ($\text{CE}_{50} = 17.1$ y $11.4 \mu\text{M}$, respectivamente); mientras que el ácido ilícico (**64**) fue el único terpeno que mostró ligera capacidad de captura del radical libre (CE_{50} de $2204.5 \mu\text{M}$). Los compuestos **55**, **56**, **59**, **61-63** y **65** no presentaron actividad antioxidante.

8. PARTE EXPERIMENTAL

8.1. Material vegetal

Verbesina parviflora fue colectada en el mes de julio de 2012 en el Km 3.5 de la carretera Tiripetío-Acuitzio del Canje. La planta fue identificada por el Dr. J. Rzedowski, conservando un ejemplar en el Herbario del Instituto de Ecología Pátzcuaro A.C.

La planta se separó en sus distintas partes (hojas, flores, tallos y raíces) y se secaron a la sombra por 8 días.

8.2 Obtención de extractos

Un lote de 450 g de hojas y 280 g de flores secas y trituradas se sometieron a extracción por el método de maceración a temperatura ambiente, utilizando como disolventes hexanos, acetato de etilo y metanol por periodos de tres días y tres periodos por disolvente. Ver tabla 1.

8.3 Métodos instrumentales

Los espectros de Infrarrojo (IR) se obtuvieron con el instrumento Thermo Scientific Nicolet Is10FT IR Spectrometer con accesorio ATR, cristal de ZnSe y región de 4000 a 650 cm^{-1} , los datos se representaron en números de onda (cm^{-1}) para los máximos principales de absorción.

Los puntos de fusión se obtuvieron mediante el instrumento, Fisher Scientific, los cuales no están corregidos.

Los espectros de RMN de ^1H a 400 MHz y ^{13}C a 100 MHz, COSY, HETCOR se obtuvieron con el instrumento Varian Mercury Plus 400, utilizando disolventes CDCl_3 ,

DMSO- d_6 , CD₃OD, Acetona- d_6 ; se empleó tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los espectros se procesaron en el programa de computo MestReNova.

Los experimentos de HMBC fueron determinados por el Laboratorio de Química de Productos Naturales, del Departamento de Química del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) empleando un equipo Varian Mercury 300.

El análisis de rayos X se llevó a cabo en un difractómetro Bruker-Nonius CAD4 con radiación de Cu K α .

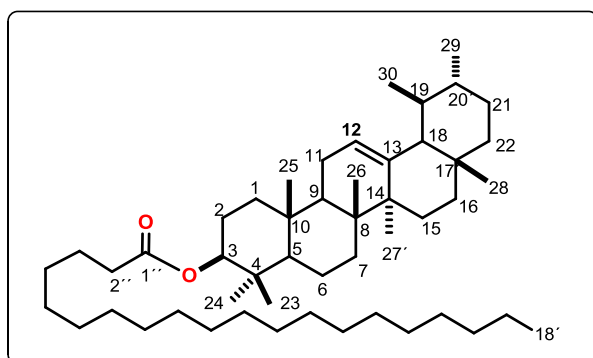
Las mediciones del potencial antioxidante, fueron realizadas en un espectrofotómetro de luz Ultravioleta-Visible, Biotek[®] modelo ELx808, a una longitud de onda de 515 nm, operado por el programa de computo Gen 5 versión 2.01.14. Los parámetros estadísticos de las absorbancias medidas, se determinaron, utilizando una hoja de cálculo Microsoft Office Excel[®] (2010).

8.4 Cromatografía de los extractos

El análisis de los extractos de hexanos y de acetato de etilo de *Verbesina parviflora* se inició con separaciones por cromatografía en columna de vidrio de diámetro 1.0, 2.5 y 5.0 cm; la fase estacionaria empleada fue gel de sílice 60 (230-400 mallas) de la marca MERCK®, y mezclas de disolventes destilados como fase móvil. Las purificaciones por placa preparativa se realizaron en cromatoplasmas de 10 x 20 cm y 1000 μ de espesor. Se utilizó gel de sílice de fase reversa C₁₈ (230-400 mallas) Sigma Aldrich, como fase estacionaria en la purificación de compuestos polares.

Un lote de 20 g de extracto hexánico de hoja se fraccionó empleado cromatografía en columna de 5.0 cm de diámetro, empacada con gel de sílice a una altura de 6 pulgadas (15.2 cm), y como fase móvil se utilizaron mezclas de hexanos-AcOEt en orden ascendente de polaridad; de las fracciones obtenidas en la polaridad hexanos-AcOEt (4:1) se obtuvo en un sólido blanco correspondiente a una mezcla de estearato de α - y β -amirina (**55**, **56**).

Estearato de α -amirina (**55**).

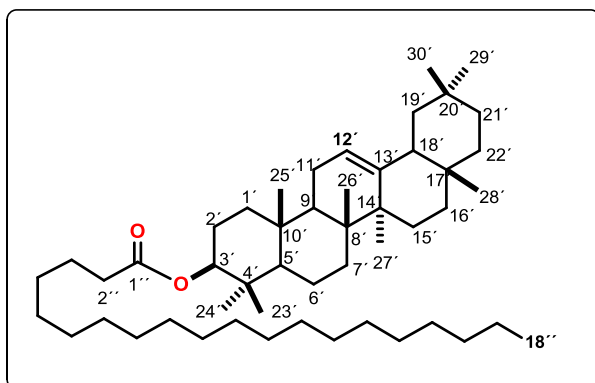


RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ : ppm 5.17 (t, $J = 4.0$ Hz, 1H, H-12), 4.52 (m, 1H, H-3), 2.29 (t, $J = 7.2$ Hz, 2H, H-2'), 1.25 (s), 1.12 (s, 3H, H-24), 1.12 (s, 3H, H-27), 1.00 (s, 3H, H-25), 0.95 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, H-30), 0.86 (d, $J = 7.0$ Hz, 3H, H-29), 0.82 (s, 3H, H-28), 0.78 (t, $J = 7.0$, 3H, H-18').

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ : ppm 173.8 (C, C-1'), 139.7 (C, C-13), 124.4 (CH, C-12), 80.6 (CH, C-3), 59.1 (CH, C-18), 55.3 (CH, C-5), 47.7 (CH, C-9), 42.2 (C, C-14), 41.6 (CH₂, C-22), 40.1 (C, C-8), 39.7 (CH, C-19, C-20), 37.8 (CH₂, C-1), 37.8 (C, C-4), 36.9 (C, C-10), 33.8 (C, C-17), 32.5 (CH₂, C-7), 31.3 (CH₂, C-21), 28.8 (CH₂, C-15), 28.1 (CH₃, C-28), 27.0 (CH₂, C-2), 26.7 (CH₂, C-16), 23.8 (CH₃, C-30), 23.4 (CH₂, C-11), 23.3

(CH₃, C-27), 22.8 (CH₃, C-23), 18.3 (CH₂, C-6), 17.6 (CH₃, C-29), 16.9 (CH₃, C-26), 15.8 (CH₃, C-25), 15.6 (CH₃, C-24).

Estearato de β-amirina (56).



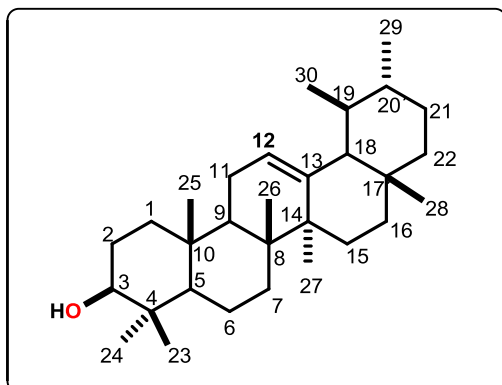
RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ: ppm 5.11 (t, *J* = 4.0 Hz, 1H, H-12'), 4.52 (m, 1H, H-3), 2.29 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, H-2'), 1.25 (s), 1.12 (s, 3H, H-27'), 1.00 (s, 3H, H-25'), 0.98 (s, 3H, H-26'), 0.86 (s, 9H, H-28', H-29', H-30'), 0.78 (t, *J* = 7.0, 3H, H-18'').

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ: ppm 173.8 (C, C-1'), 145.3 (C, C-13'), 121.7 (CH, C-12'), 80.6 (CH, C-3'), 55.3 (CH, C-5'), 47.7 (CH, C-9'), 47.3 (CH, C-18'), 46.9 (CH, C-19'), 41.8 (C, C-14'), 38.3 (C, C-4, C-8'), 37.8 (CH₂, C-1'), 37.2 (CH₂, C-22'), 36.9 (C, C-10'), 34.8 (CH₂, C-21'), 33.4 (CH₃, C-29'), 32.6 (CH₂, C-7'), 32.6 (C, C-17'), 31.2 (CH, C-20'), 28.5 (CH₃-C-28'), 27.0 (CH₂, C-2, C-16'), 26.2 (CH₂, C-15'), 26.0 (CH₃, C-27'), 23.6 (CH₂, C-11'), 22.8 (CH₃, C-23'), 21.5 (CH₃, C-30'), 18.3 (CH₂, C-6'), 16.9 (C, C-26'), 15.6 (C, C-24', C-25').

Hidrólisis de la mezcla de estearatos de α- y β-amirina (55, 56).

A una solución de la mezcla de **55** y **56** (40 mg) en 5 mL de THF, se le adicionaron 40 mg de KOH disueltos en 0.1 mL de agua; la mezcla se agitó bajo reflujo durante 8 horas. Posteriormente, el crudo de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, el disolvente se evaporó con ayuda de rotavapor. El residuo se purificó por cromatografía en columna empleando gel de sílice 230-400 mallas y polaridades de hexanos-AcOEt.

α - amirina (57).

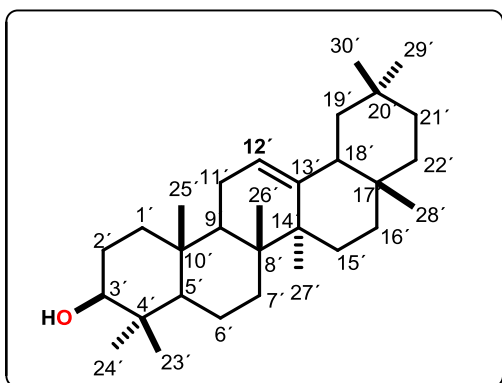


RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : ppm 5.17 (t, $J = 4$ Hz, 1H, H-12), 3.20 (m, 1H, H-3), 1.12 (s, 3H, H-24), 1.06 (s, 3H, H-27), 0.99 (s, 3H, H-25), 0.95 (d, $J = 7.0$, 3H, H-30), 0.78 (d, $J = 7.0$, 3H, H-29).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : ppm 139.7 (C, C-13), 124.4 (CH, C-12), 80.6 (CH, C-3), 59.1 (CH, C-18), 55.3 (CH, C-5), 47.7 (CH, C-9), 42.2 (C, C-14),

41.6 (CH_2 , C-22), 40.1 (C, C-8), 39.7 (CH, C-19, C-20), 37.8 (CH_2 , C-1), 37.8 (C, C-4), 36.9 (C, C-10), 33.8 (C, C-17), 32.5 (CH_2 , C-7), 31.3 (CH_2 , C-21), 28.8 (CH_2 , C-15), 28.1 (CH_3 , C-28), 27.0 (CH_2 , C-2), 26.7 (CH_2 , C-16), 23.8 (CH_3 , C-30), 23.4 (CH_2 , C-11), 23.3 (CH_3 , C-27), 22.8 (CH_3 , C-23), 18.3 (CH_2 , C-6), 17.6 (CH_3 , C-29), 16.9 (CH_3 , C-26), 15.8 (CH_3 , C-25), 15.6 (CH_3 , C-24).

β - amirina (58).



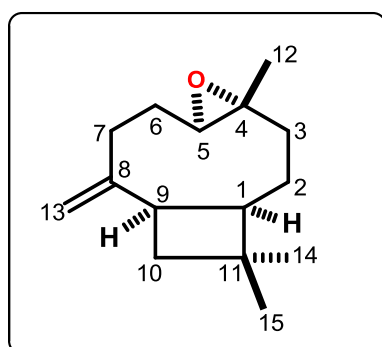
RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : ppm 5.11 (t, $J = 3.6$ Hz, 1H, H-12'), 3.20 (m, 1H, H-3'), 1.12 (s, 3H, H-27'), 0.99 (s, 3H, H-25'), 0.90 (s, 3H, H-26'), 0.86 (s, 6H, H-29', H-30'), 0.82 (s, 3H, H-28').

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : ppm 145.3 (C, C-13'), 121.7 (CH, C-12'), 80.6 (CH, C-3'), 55.3 (CH, C-5'), 47.7 (CH, C-9'), 47.3 (CH, C-18'), 46.9 (CH,

C-19'), 41.8 (C, C-14'), 38.3 (C, C-4, C-8'), 37.8 (CH_2 , C-1'), 37.2 (CH_2 , C-22'), 36.9 (C, C-10'), 34.8 (CH_2 , C-21'), 33.4 (CH_3 , C-29'), 32.6 (CH_2 , C-7'), 32.6 (C, C-17'), 31.2 (CH, C-20'), 28.5 (CH_3 -C-28'), 27.0 (CH_2 , C-2, C-16'), 26.2 (CH_2 , C-15'), 26.0 (CH_3 , C-27'), 23.6 (CH_2 , C-11'), 22.8 (CH_3 , C-23'), 21.5 (CH_3 , C-30'), 18.3 (CH_2 , C-6'), 16.9 (C, C-26'), 15.6 (C, C-24', C-25').

Las fracciones 23-29 obtenidas con la polaridad de hexanos-AcOEt (9:1) se unieron y se sometieron a cromatografías sucesivas. De la fracción 14 se obtuvo una miel café correspondiente al epóxido de β -cariofileno (**59**); de las fracciones 27-33 de esta cromatografía se obtuvo una mezcla de compuestos que fueron separados mediante cromatografía en placa preparativa impregnada con AgNO₃ al 20%, que correspondieron al eudesmenol (**60**) y espathulenol (**61**).

Epóxido β -cariofileno (**59**).

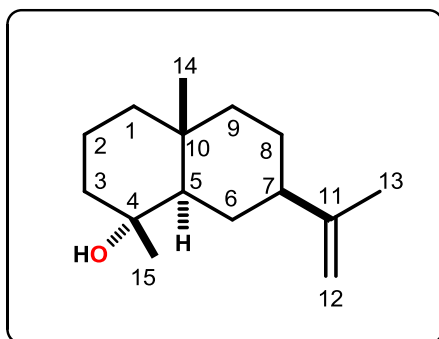


RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ : ppm 4.96 (d, $J = 1.6$, 1H, H-13a), 4.85 (d, $J = 1.6$, 1H, H-13b), 2.88 (dd, $J = 10.8, 4.4$, 1H, H-5), 2.65 (m, 1H, H-9), 2.33 (m, 1H, H-7a), 2.23 (m, 1H, H-6b), 2.11 (m, 1H, H-7b), 2.07 (m, 1H, H-3a), 1.76 (t, $J = 10.4$, 1H, H-1), 1.68 (m, 1H, H-10a), 1.66 (m, 1H, H-2b), 1.61 (m, 1H, H-10b), 1.42 (m, 1H, H-2a), 1.31 (m, 1H, H-6a), 1.19 (s, 3H, H-12), 1.00 (s, 3H, H-14), 0.97 (s, 3H, H-15)

0.93 (m, 1H, H-3b).

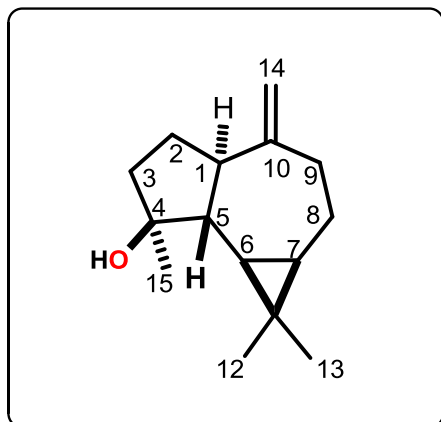
RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ : ppm 152.0 (C-8), 112.8 (C-13), 63.7 (CH, C-5), 59.7 (C-4), 50.9 (CH, C-1), 48.8 (CH, C-9), 39.9 (CH₂, C-10), 39.1 (CH₂, C-3), 34.0 (C-11), 30.2 (CH₃, C-14), 30.0 (CH₃, C-15), 29.9 (CH₂, C-7), 27.3 (CH₂, C-2), 21.7 (CH₂, C-6), 17.2 (C-12).

Eudesmenol (**60**).



RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ : ppm 4.85 (sa, 1H, H-12a); 4.82 (sa, 1H, H-12b), 2.42 (tt, $J = 12.0$ y 2.8 , 1H, H-7), 1.80 (s, 3H, H-13), 1.05 (s, 3H, H-15), 0.90 (s, 3H, H-14). RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃), ver tabla 2.

Espathulenol (61).

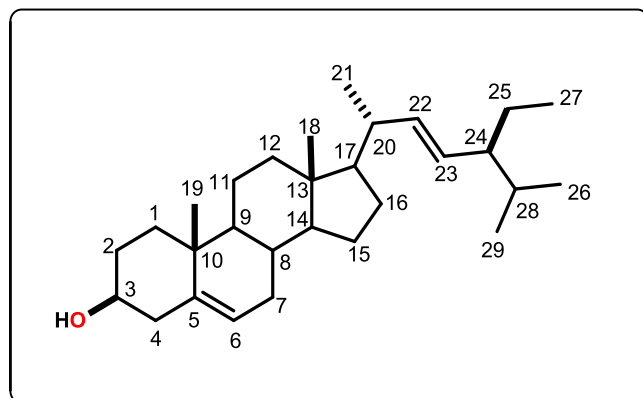


RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : ppm 4.67 (sa, 1H, H-14a), 4.65 (sa, 1H, H-14b), 2.41 (dd, $J = 6.6$ Hz, 1H, H-1), 1.28 (s, 3H, H-15), 1.25 (m, 1H, H-5), 1.05 (s, 3H, H-12), 1.04 (s, 3H, H-13), 0.70 (m, 1H, H-7), 0.46 (dd, $J = 11.6, 9$ Hz, 1H, H-6).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ : ppm 153.5 (C, C-10), 106.5 (CH_2 , C-14), 81.0 (C, C-4), 53.7 (CH, C-1), 53.4 (CH, C-5), 41.8 (CH_2 , C-3), 38.9 (CH_2 , C-9), 29.9 (CH, C-6), 28.7 (CH_3 , C-12), 27.5 (CH, C-7), 26.7 (CH_2 , C-2), 26.1 (CH_3 , C-15), 24.8 (CH_2 , C-8), 20.3 (C-11), 16.4 (C-13).

De la cromatografía del extracto hexánico de hojas, en la fracción 34 eluída con la polaridad hexanos-AcOEt (4:1), se obtuvo un precipitado blanco, que fue lavado con hexanos, resultando la purificación de **62**.

Estigmasterol (62).

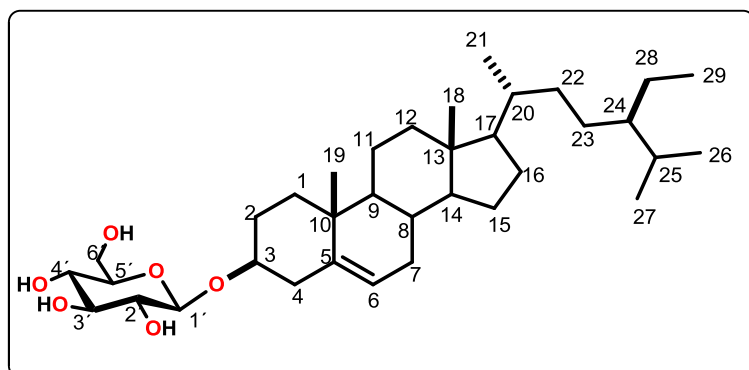


RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : ppm 5.34 (d, $J = 3.2$ Hz, 1H, H-6), 5.14 (dd, $J = 15.2, 8.4$ Hz, 1H, H-22), 5.00 (dd, $J = 15.2, 8.4$ Hz, 1H, H-23), 3.51 (m, 1H, H-3), 1.02 (d, $J = 7.2$, 3H, H-29), 1.00 (s, 3H, H-19), 0.83 (d, $J = 6.4$ Hz, H-21), 0.82 (d, $J = 7.2$, H-26), 0.79 (t, $J = 7.2$, H-27), 0.68 (s, 3H, H-18). RMN de ^{13}C (100

MHz, CDCl_3) ver tabla 3.

Un lote de 28 g de extracto de AcOEt de hojas se fraccionó mediante cromatografía, utilizando una columna de vidrio de 5.0 cm de diámetro, empacada con gel de sílice 230-400 a una altura de 6 pulgadas, como fase móvil se emplearon mezcla de CH₂Cl₂-MeOH en orden de polaridad creciente. En las fracciones eluidas con la polaridad CH₂Cl₂-MeOH (97:3) se obtuvo un precipitado que fue lavado con AcOEt, obteniendo de este proceso 0.26 g de un sólido blanco, correspondiente a **63**.

Glucósido de β -sitosterol (**63**).



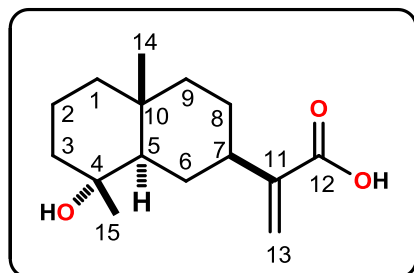
RMN de ¹H (400 MHz, DMSO-*d*₆)

δ : ppm 5.32 (da, $J = 4.0$ Hz, 1H, H-6), 4.85 (m, 1H, OH-2', OH-3', OH-4'), 4.20 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, 1'), 3.61 (m, 1H, H-3), 3.10 (m, 1H, H-5'), 3.00 (m, 1H, H-4'), 2.88 (m, 1H, H-2'), 2.35, (dd, $J = 11.6$,

3.2 Hz, 1H, H-4), 2.11 (d, $J = 11.6$ Hz, 1H, H-4''), 1.93 (m, 1H, H-12), 1.78 (da, $J = 10.4$ Hz, 1H, H-2), 1.61 (m, 1H, H-25), 0.94 (s, 3H, H-19), 0.88 (d, $J = 6.4$ Hz, 3H, H-21), 0.80 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, H-27), 0.78 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, H-26), 0.76 (t, $J = 7.0$, 3H, H-29), 0.63 (s, 3H, H-18). RMN de ¹³C (100 MHz, DMSO-*d*₆) ver tabla 4.

Las fracciones 32-33 provenientes del extracto AcOEt de hojas, se unieron y fueron recromatografiadas; en las fracciones 11-13, recuperadas en la polaridad hexanos-acetona (1:1) se obtuvieron 26 mg de un sólido amorfo blanco.

Ácido ilícico (**64**).

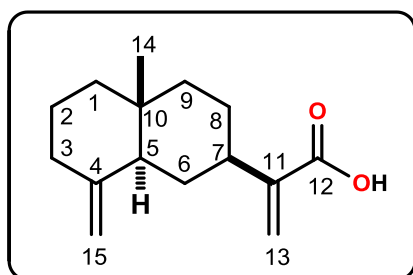


RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ : ppm 6.26 (sa, 1H, H-13a), 5.63 (sa, 1H, H-13b), 2.50 (tt, $J = 12.0, 2.8$ Hz, 1H, H-7) 1.97 (da, $J = 12.0$ Hz, 1H, H-6a), 1.81 (d, $J = 12.4$, 1H, H-9), 1.35 (dd, $J = 12.0, 1.2$ Hz, 1H, H-5), 1.17 (m, 1H, H-6b), 1.10 (s, 3H, H-15), 0.95 (s, 3H, H-14). RMN de

^{13}C (100 MHz, CDCl_3) ver tabla 5.

La fracción 9 del extracto de AcOEt de hojas se sometió a recromatografía utilizando una columna de vidrio de 1.0 cm de diámetro, empacada con gel de sílice fase reversa a una altura de 6 pulgadas; como fase móvil se empleó la polaridad MeOH- H_2O (4:1), las fracciones 20-27 se sometieron a recromatografía con gel de sílice de fase reversa y la mezcla MeOH- H_2O (9:1) como eluyente, con lo que se obtuvieron 9 mg de un sólido blanco.

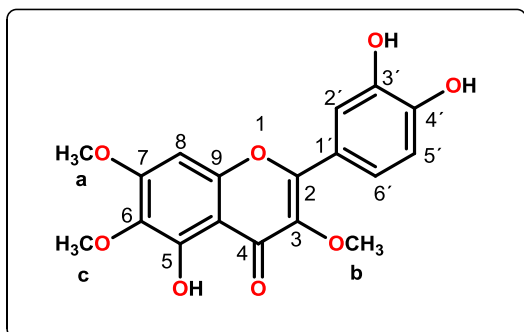
Ácido cóstico (65).



RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : ppm 6.29 (s, 1H, H-13a), 5.69 (s, 1H, H-13b), 4.72 (s, 1H, H-15a), 4.41 (s, 1H, H-15b), 2.54 (tt, $J = 11.2, 2.8$ Hz, 1H, H-7), 2.31 (da, $J = 12.4$ Hz, 1H, H-6a), 2.01 (m, 2H, H-9), 1.31 (m, 1H, H-6b), 0.74 (s, 3H, H-14). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) ver tabla 6.

Las fracciones 39-44 obtenidas en la polaridad CH_2Cl_2 -MeOH (24:1) de la cromatografía del extracto de AcOEt de hojas, resultaron ser una mezcla de compuestos en forma de polvo amarillo, esta fracciones se unieron y se sometieron a continuas recromatografías empleando gel de sílice de fase reversa y mezclas de MeOH- H_2O en orden de polaridad descendiente, obteniéndose un compuesto en forma de cristales de color amarillo.

Chrysosplenol D (66).



Cristales amarillo, p.f. 95-100 °C.

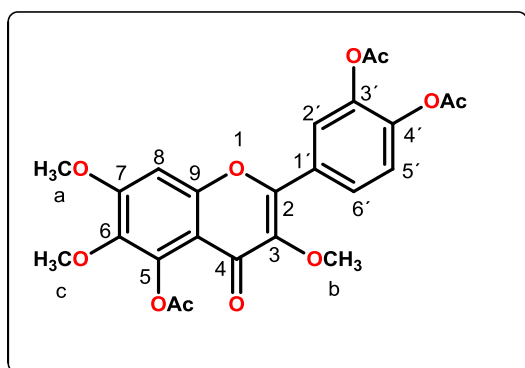
IR (CHCl_3) ν_{max} 3396, 1651, 1593, 1556, 1477, 1463, 1352, 1214 cm^{-1} .

RMN de ^1H (400 MHz, Acetona- d_6) δ : ppm 7.72 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H, H-2'), 7.58 (dd, $J = 8.5, 2.8$ Hz, 1H, H-6'), 7.01 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-5'), 6.82

(s, 1H, H-8), 4.00 (s, 3H, OMe a), 3.89 (s, 3H, OMe b), 3.82 (s, 3H, OMe c). RMN de ^{13}C (100 MHz, Acetona- d_6) δ : ppm 179.7 (C, C-4), 159.0 (C, C-7), 156.2 (C, C-2), 153.1 (C, C-5, C-9), 149.3 (C, C-4'), 146.0 (C, C-3'), 139.2 (C, C-3), 132.3 (C, C-6), 122.7 (C, C-1'), 121.1 (CH, C-6'), 116.3 (CH, C-2'), 116.1 (CH, C-5'), 106.9 (C, C-10), 91.8 (CH, C-8), 60.6 (CH₃, OMe a), 60.2 (CH₃, OMe b), 56.1 (CH₃, OMe c).

Reacción de acetilación de flavonoides

A una solución de 30 mg de los flavonoides **66**, **68** ó **70** en MeOH (1 mL) se le adicionó 1 mL de piridina y 1 mL de anhídrido acético, la mezcla se agitó y calentó a 40 °C durante 3h. Posteriormente, el crudo de reacción se disolvió en cloroformo y se vertió en un embudo de separación con hielo; el crudo de reacción se lavó tres veces de manera sucesiva con H₂O destilada, ácido clorhídrico al 10% en agua, solución saturada de bicarbonato de sodio y H₂O destilada; la fase orgánica se secó sobre sulfato de sodio, se filtró y se llevó a sequedad en rotavapor. El residuo fue purificado por cromatografía en capa fina (CCF) de fase reversa y una mezcla de MeOH-H₂O (1:1), con lo que se aisló a **67**; o bien, por cromatografía en columna de fase reversa empleando una mezcla de MeOH-H₂O (1:1) para **69** y **71**.



5,3',4'-Triacetoxi-quercetagina-3,6,7-trimetil

éter (**67**). Sólido amarillo pálido (15 mg). IR

(CHCl₃) ν_{max} 1771, 1623, 1489, 1473, 1473,

1368, 1253, cm^{-1} . RMN de ^1H (400 MHz, CDCl₃)

δ : ppm 8.03 (dd, $J = 8.8, 2.3$ Hz, 1H, H-6'), 7.95

(d, $J = 2.3$ Hz, 1H, H-2'), 7.35 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H,

H-5'), 6.86 (s, 1H, H-8), 3.86 (s, 3H, OMe a), 3.82

(s, 3H, OMe c), 3.99 (s, 3H, OMe b), 2.51 (s, 3H, OAc), 2.35 (s, 3H, OAc), 2.33 (s, 3H, OAc).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl₃) δ : ppm 173.2 (C, C-4), 169.5, 168.1, 167.9 (C, OAc),

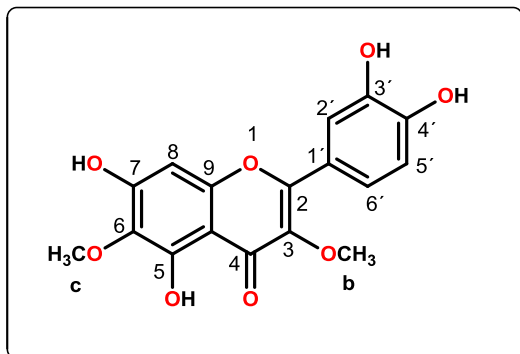
157.8 (C, C-7), 153.0 (C, C-9), 152.0 (C, C-2), 143.7 (C, C-4'), 142.1 (C, C-3'), 141.8 (C,

C-5), 141.6 (C, C-3), 139.5 (C, C-6), 129.2 (C, C-1'), 126.7 (CH, C-6'), 123.7 (CH, C-2'),

123.5 (CH, C-5'), 111.6 (C, C-10), 97.9 (CH, C-8), 61.5 (CH₃, OMe **a**), 60.2 (CH₃, OMe **b**), 56.2 (CH₃, OMe **c**), 21.0 (CH₃, OAc), 20.7 (CH₃, OAc), 20.6 (CH₃, OAc).

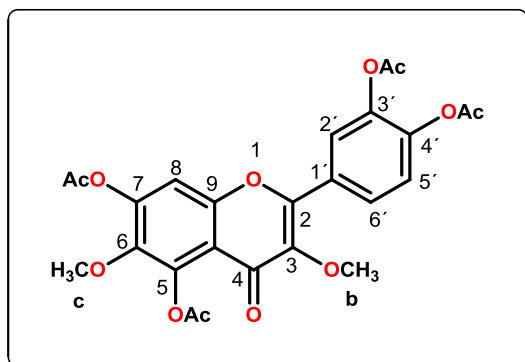
Las fracciones 45-52 provenientes del extracto de AcOEt de hojas, de la polaridad MeOH-H₂O (3:2) se reunieron y recromatografiaron empleando gel de sílice de fase reversa y mezclas de MeOH-H₂O en orden descendente de polaridad. De la fracción 14-18 se obtuvo a la axillarina (**68**) en forma de cristales amarillos; de la fracción 19-21 se obtuvieron cristales amarillos que correspondieron a la 5,7,3',4'-tetracetoxi-quercetagetina-3,6-dimetiléter (**69**).

Axillarina (**68**).



Cristales amarillos. IR (CHCl₃) ν_{\max} 3396, 1651, 1489, 1598, 1552, 1466, 1359, 1169 cm⁻¹. (RMN de ¹H (400 MHz, Acetona-d₆) δ : ppm 7.73 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-2'), 7.60 (dd, $J = 8.8, 2.4$ Hz, 1H, H-6'), 7.03 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-5'), 6.61 (s, 1H, H-8), 3.89 (s, 3H, OMe **b**), 3.88 (s, 3H, OMe **c**). RMN de ¹³C (100 MHz, Acetona-d₆) ver tabla 7.

5,7,3',4'-tetracetoxi-quercetagetina-3,6-dimetiléter (**69**).



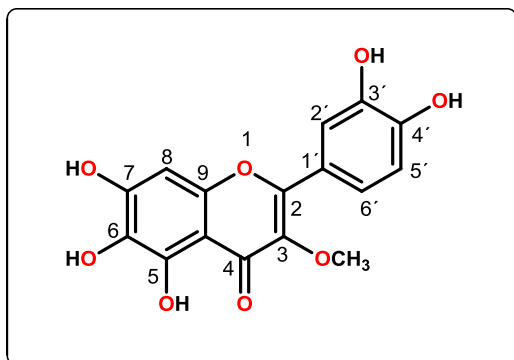
Sólido amarillo (IR (CHCl₃) ν_{\max} 1774, 1641, 1620, 1478, 1457, 1370, 1253, 1122 cm⁻¹. RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) δ : ppm 8.00 (dd, $J = 8.6, 2.1$ Hz, 1H, H-6'), 7.93 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, H-2'), 7.35 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, H-5'), 7.25 (s, 1H, H-8), 3.87 (s, 3H, OMe **b**), 3.83 (s, 3H, OMe **c**), 2.51 (s, 3H, OAc), 2.39 (s, 3H, OAc), 2.36 (s, 3H, OAc),

2.35 (s, 3H, OAc).

RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) δ : ppm 173.2 (C, C4), 169.1, 168.1, 168.0, 167.9 (C, OAc), 152.7 (C, C-2), 151.5 (C, C-9), 148.4 (C, C-7), 144.0 (C, C-4'), 142.3 (C, C-3'),

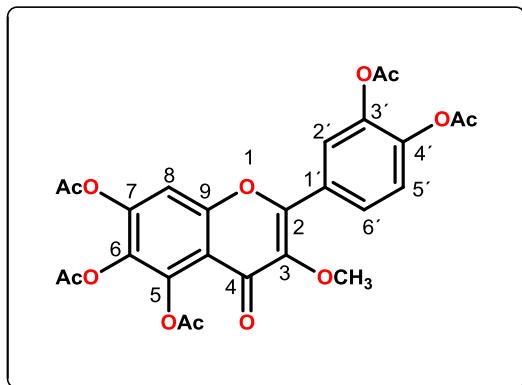
142.1 (C, C-5), 142.0 (C, C-3), 126.8 (C, C-1'), 123.7 (CH, C-2', C-5'), 116.1 (C, C-10), 110.1 (CH, C-8), 61.9 (CH₃, OMe **b**), 60.3 (CH₃, OMe **c**), 21.1 (CH₃, OAc), 20.7 (CH₃, OAc).

Quercetagetina 3-metil éter (70).



RMN de ¹H (400 MHz, Acetona-*d*₆) δ: ppm 7.83 (s, 1H, H-2'), 7.71 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-6'), 7.00 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-5'), 6.61 (s, 1H, H-8), 3.88 (s, 3H, OMe).

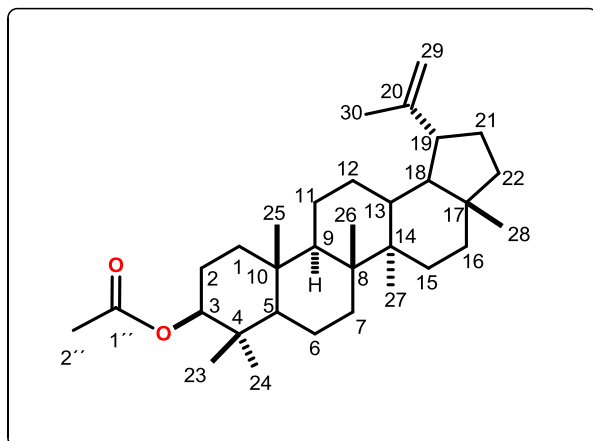
quercetagetina-5,6,7,3',4'-pentacetoxi-3-metil éter (71).



RMN de ¹H (400 MHz, Acetona-*d*₆) δ: ppm 7.86 (dd, *J* = 8.5, 2.0 Hz, 1H, H-6'), 7.83 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H, H-2'), 7.47 (s, 1H, H-8), 7.38 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-5'), 3.83 (s, 3H, OMe), 2.40 (s, 3H, OAc), 2.39 (s, 3H, OAc), 2.33 (s, 6H, OAc), 2.30 (s, 3H, OAc).

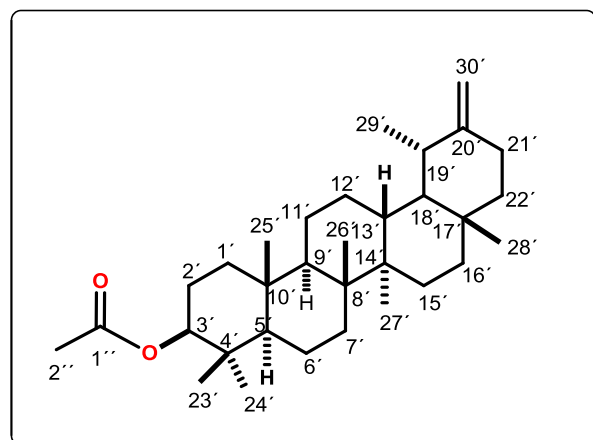
De las fracciones 20-25 obtenidas en polaridades hexanos-AcOEt (47:3) se obtuvo un sólido blanco que fue sometido a sucesivas cromatografías; sin embargo, no fue posible obtener a los componentes por separado. El análisis de la mezcla permitió determinar la presencia de acetato de lupeol (**72**) y al acetato de taraxasterol (**73**).

Acetato de lupeol (72).



RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 4.69 (da, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-29a,), 4.58 (dd, $J = 2.4, 1.6$ Hz, 1H, H-29b), 4.47 (dt, $J = 12.4, 6.0$ Hz, 1H, H-3), 2.20 (m, 1H, H-19), 2.06 (s, 3H, OAc), 1.65 (sa, 3H, H-30), 0.93 (s, 3H, H-28), 0.88 (s, 3H, H-27), 0.84 (s, 6H, H-24, H-25), 0.79 (s, 3H, H-23). RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) ver tabla 8.

Acetato de taraxasterol (73).



RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ : 4.62 (m, 2H, H-30'), 4.60 (m, 1H, H-3'), 2.47 (m, 2H, H-21'), 2.09 (q, $J = 6.8$ Hz 1H, H-19'), 2.06 (s, 3H, OAc), 1.73 (t, $J = 6.8$, 2H, H-2'), 1.69 (m, 2H, H-12'), 1.59 (m, 2H, H-1'), 1.40 (d, $J = 4.8$ Hz, H6'), 1.03 (s, 3H, H-29'), 1.02 (s, 3H, H-26'), 0.93 (s, 3H, H-27'), 0.87 (s, 3H, H-25'), 0.85 (s, 9H, H-23', H-24', H-28'), 0.73 (s, 1H, H-5'). RMN de ^{13}C (100 MHz,

CDCl_3) ver tabla 8.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, V. U., Rasool, N., Abbasi, M. A., Rashid, M. A., Kousar, F., Zubair, Ejaz, A., Choudhary, M. I., Tareen, R. B. (2006). Antioxidant flavonoids from *Pulicaria undulata*. *Polish Journal of Chemistry*, *80*, 745-751.
- Albuquerque, M. R. J. R., Canuto, K. M., Pessoa, O. D. L., Nunes, E. P., Nascimento, R. F., Silveira, E. R. (2006). Essential oil composition of *Verbesina diversifolia* DC. *Flavour and Fragrance Journal*, *21*, 634-636.
- Amaro-Luis, J. M., Ramírez, I., Delgado-Méndez, P., Jorge, Z. D. (2002). Eudesmane derivatives from *Verbesina turbacensis*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, *13*, 352-357.
- Balleza, J. D. J., Villaseñor, J. L. (2002). La familia Asteraceae en el estado de Zacatecas (México). *Acta Botánica Mexicana*, *59*, 5-69.
- Bartram, S., Jux, A., Gleixner, G., Boland, W. (2006). Dynamic pathway allocation in early terpenoid biosynthesis of stress-induced lima bean leaves. *Phytochemistry*, *67*, 1661-1672.
- Berry, K. M., Perry, N. B., Weavers, R. T. (1985). Foliage sesquiterpenes of *Dacrydium cupressinum*: identification, variation and biosynthesis. *Phytochemistry*, *24*, 2893-2898.
- Bhati-Kushwaha, H., Malik, C. P. (2013). Biopotential of *Verbesina encelioides* (stem and leaf powders) in silver nanoparticle fabrication. *Turkish Journal of Biology*, *37*, 645-654.
- Bohlmann, F., Zdero, C., Robinson, H., King, R. M. (1982). Two new eudesmane cinnamates from *Verbesina sordescens*. *Phytochemistry*, *21*, 1663-1664.
- Bondet, V., Brand-Williams, W., Berset, C. (1997). Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. *LWT-Food Science and Technology*, *30*, 609-615.
- Botta, B., Carmignani, M., Volpe, A. R., Botta, M., Corelli, F., Dalle Monache, G. (2003). Novel hypotensive agents from *Verbesina caracasana*: Structure, synthesis and pharmacology. *Current Medicinal Chemistry*, *10*, 1845-1862.
- Box, V. G., Bardouille, V., Chan, W. R. (1977). Enantio-eudesmane sesquiterpenes from *Verbesina rupestris*. *Phytochemistry*, *16*, 987-990.

- Brochini, C. B., Roque, N. F. (2000). Two new cneorubin related diterpenes from the leaves of *Guarea guidonia* (Meliaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 11, 361-364.
- Bran-Williams, M. E., Cuvelier and Berset. C. (1995) Use of a free radical method to evaluate to evaluate antioxidant activity. *Lebensm.-Wiss. u.-Techol*, 28, 25.30.
- Bruno-Colmenárez, J., Amaro-Luis, J. M., Ramírez, I., Delgado-Méndez, P., de Delgado, G. D. (2010). Absolute configuration of two eudesmane derivatives from *Verbesina turbacensis* HBK. *Journal of Chemical Crystallography*, 40, 110-115.
- Carmignani, M., Volpe, A. R., Delle Monache, F., Botta, B., Espinal, R., De Bonnevaux, S. C., De Luca, C., Botta, M., Corelli, F., Tafi, A., Ripanti, G., Delle Monache, G. (1999). Novel Hypotensive Agents from *Verbesina caracasana*. 6. Synthesis and Pharmacology of Caracasandiamide. *Journal of Medicinal Chemistry*, 42, 3116-3125.
- Carrillo-Reyes, P., Rzedowski, J., Calderon de Rzedowski, G. (2010). Cuatro nuevas especies de *Verbesina* (Compositae: Heliantheae) del centro de México. *Acta Botánica Mexicana*, 93, 127-143.
- Chaturvedula, V. S., Farooq, A., Schilling, J. K., Malone, S., Derveld, I., Werkhoven, M. C., Wisse, J. H., Ratsimbason., Kingston, D. G. (2004). New eudesmane derivatives from *Melampodium camphoratum* from the Suriname rainforest. *Journal of Natural Products*, 67, 2053-2057.
- Cheel, J., Theoduloz, C., Rodríguez, J., Schmeda-Hirschmann, G. (2005). Free radical scavengers and antioxidants from Lemongrass (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2511-2517.
- Chen, Z., Bertin, R., Frolidi, G. (2013). EC₅₀ estimation of antioxidant activity in DPPH assay using several statistical programs. *Food Chemistry*, 138, 414-420.
- Cheng, A. X., Lou, Y. G., Mao, Y. B., Lu, S., Wang, L. J., Chen, X. Y. (2007). Plant terpenoids: biosynthesis and ecological functions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 49, 179-186.
- Cruz Sánchez A. Estudio químico y actividad antimicrobiana de *Verbesina parviflora*. (2011). Tesis de licenciatura presentada en la Facultad de Químico Farmacobiología de la UMSNH.
- Cué-Bär, E. M., Villaseñor, J. L., Arredondo-Amezcuca, L., Cornejo-Tenorio, G., Ibarra-Manríquez, G. (2006). La flora arbórea de Michoacán, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 78, 47-81.

- Delle Monache, G., Volpe, A. R., Delle Monache, F., Vitali, A., Botta, B., Espinal, R., De Bonnevaux, S. C., De Luca, C., Botta, M., Corelli, F., Carmignani, M. (1999). Further hypotensive metabolites from *Verbesina caracasana*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 9, 3249-3254.
- Dewick, P. M. Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach, Third Edition. John Wiley & Sons.2009.
- Ding L., Maier, A., Fiebig, H. H., Lin, H. W. Peschel, G., Hertwec, C. (2012). Kandenols, A. E. eudesmenes from an Endophytic *Streptomyces sp.* of the mangrove tree *Kandelia candel*. *Journal of Natural Products*, 75, 2223-2227.
- Everett, S. A., Dennis, M. F., Patel, K. B., Maddix, S., Kundu, S. C., Willson, R. L. (1996). Scavenging of nitrogen dioxide, thiyl, and sulfonyl free radicals by the nutritional antioxidant-carotene. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 3988-3994.
- Faizi, S., Ali, M., Saleem, R., Bibi, S. (2001). Complete ¹H and ¹³C NMR assignments of stigma-5-en-3-O-β-glucoside and its acetyl derivative. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 39, 399-405.
- Fawole, O. A., Ndhlala, A. R., Amoo, S. O., Finnie, J. F., Van Staden, J. (2009). Anti-inflammatory and phytochemical properties of twelve medicinal plants used for treating gastro-intestinal ailments in South Africa. *Journal of Ethnopharmacology*, 123, 237-243.
- Garcez, F. R., Garcez, W. S., Hamerski, L., Miranda, A. C. D. M. (2010). Eudesmane and rearranged eudesmane sesquiterpenes from *Nectandra cissiflora*. *Química Nova*, 33, 1739-1742.
- Glennie, C. W., Jaint, S. C. (1980). Flavonol 3,7-diglycosides of *Verbesina encelioides*. *Phytochemistry*, 19, 157-158.
- Heinrich, M., Robles, M., West, J. E., Ortiz de Montellano, B. R., Rodriguez, E. (1998). Ethnopharmacology of Mexican Asteraceae (compositae). *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 38, 539-565.
- Ibarra, G., Ocaña, D. (1998). Strategies for the conservation of Asteraceae in Mexico. *Conservation Biology*, 12, 1066-1075.
- Jain, S. C., Jain, R., Singh, R., Menghani, E. (2008). *Verbesina encelioides*: Perspective and potentials of a noxious weed. *Indian Journal of Traditional Knowledge*, 7, 511-513.

- Jain, S. C., Singh, R., Jain, R. (2008). Antimicrobial and antioxidant potentials of *Verbesina encelioides* (Cav.) Benth. and Hook. Fil ex Gray. *Research Journal of Medicinal Plant*, 2, 61-65.
- Jung, P. E., Kim, Y., Kim, J. (2000). Acylated flavonol glycosides from flower of *Inula britannica*. *Journal of Natural Products*, 63, 34-36.
- Keeling, C. I., Bohlmann, J. (2006). Genes, enzymes and chemicals of terpenoid diversity in the constitutive and induced defense of conifers against insects and pathogens. *New Phytologist*, 170, 657-675.
- Khalaf, N. A., Shakya, A. K., Al-Othman, A., El-Agbar, Z., Farah, H. (2008). Antioxidant activity of some common plants. *Turkish Journal of Biology*, 32, 51-55.
- Khalilov, L. M., Khalilova, A. Z., Shakurova, E. R., Nuriev, I. F., Kachala, V. V., Shashkov, and Dzhemilev, U. M. (2013). PMR and ¹³C spectra of biologically active compounds. XII.* Taraxasterol and its acetate from the aerial part of *Onopordum acanthium*. *Chemistry of Natural Compounds*, 39, 285-289.
- Liang, X. L., Wang, X. L., Li, Z., Hao, Q. H., Wang, S. Y. (2010). Improved in vitro assays of superoxide anion and 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical-scavenging activity of isoflavones and isoflavone metabolites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 11548-11552.
- Maestri, D. M., Nepote, V., Lamarque, A. L., & Zygadlo, J. A. (2006). Natural products as antioxidants. En Filippo Imperato. *Phytochemistry: Advances in Research*, 2006 Trivandrum, Kerala, India, Research Signpost, 106-135.
- Martínez, M., de Vivar, A. R., Ortega, A., de Lourdes Quintero, M., García, C., Fronczek, F. R. (1983). Eudesmane triols from *Verbesina virgata*. *Phytochemistry*, 22, 979-982.
- Mora, F. D., Alpan, L., de Tommasi, N., McCracken, V. J., Nieto, M. (2013). New antibacterial germacrene from *Verbesina negrensis*. *Planta Medica*, 79, 707-710.
- Moreira-Muñoz, A. (2006). Posición filogenética y distribución de los géneros de Compuestas chilenas, con algunas notas biogeográficas. *Revista del Jardín Botánico Chagual*, 4, 12-28.
- Mosquera, O. M., Corraera, Y. M., Niño, J. (2009). Antioxidant activity of plant extracts from Colombian flora. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19, 382-387.

- Mosquera, O. M., Niño, J., Correa, Y. M., Bejarano, D. C. B. (2005). Estandarización del método de captura de radicales libres para la evaluación de la actividad antioxidante de extractos vegetales. *Scientia et Technica*, 1, 231-234.
- Oka, Y. (2012). Nematicidal activity of *Verbesina encelioides* against the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* and effects on plant growth. *Plant and Soil*, 355, 311-322.
- Oliveira, F. C., Ferreira, M. J. P., Núñez, C. V., Rodriguez, G. V., Emerenciano, V. P. (2000). ¹³C NMR spectroscopy of eudesmane sesquiterpenes. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 37, 1-45.
- Orabi, K. Y., Mossa, J. S., Muhammed, I., Alloush, M. H., Galal, A. M., El-Feraly, F. S., McPhail, A. T. (2000). New eudesmane sesquiterpenes from *Plectranthus cylindraceus*. *Journal of Natural Products*, 63, 1665-1668.
- Ortega, A., Maldonado, E., Fronczek, F. R., Delord, T. J., Chiari, G. (1985). Elemanolides from *Verbesina seattonii*. *Phytochemistry*, 24, 1755-1760.
- Ortega, A., Toscano, A. R., Maldonado, E. (1998). A costic acid guaianyl ester and other constituents of *Podachaemium eminens*. 49, 1085-1090.
- Panero, J. L., Jansen, R. K. (1997). Chloroplast DNA restriction site study of *Verbesina* (Asteraceae: Heliantheae). *American Journal of Botany*, 89, 90-93.
- Patel, R. M., Patel N. J. (2011). In vitro antioxidant activity of coumarin compounds by DPPH, super oxide and nitric oxide free radical scavenging methods. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 1, 52-68.
- Pérez G, R. M. Actividad hipoglucemiante de *Salpianthus arenarius*, *Acrocomia mexicana*, *Agarista mexicana* y *Verbesina persicifolia* (1997). Tesis Doctoral de presentada en la Universidad Autónoma Metropolitana (UAM).
- Prakash, C. V. S., Prakash, I. (2012). Isolation of stigmasterol and β -sitosterol from dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. *International current Pharmaceutical Journal*, 1, 239-242.
- Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290-4302.
- Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chemistry*, 66, 401-436.

- Salmon, M., Soriano-Garcia, M., Toscano, R. A., Cardenas, J., Miranda, R., Vargas, F., Angeles, E. (1985). Verocephol, a unique amorphane sesquiterpene. *gamma-lactol. The Journal of Organic Chemistry*, 50, 4171-4172.
- Samanta, A., Das, G., Das, S. K. (2011). Roles of flavonoids in plants. *International Journal Pharmaceutical Sciences Technology*, 6, 12-35.
- Schmeda-Hirschmann, G., Tapia, A., Theoduloz, C., Rodriguez, J., Lopez, S., Feresin, E. G. (2004) Free radical scavengers and Antioxidants from *Tagetes mendocina*. *Verlag der Zeitschrift fur Naturforschung*, 9, 345-353.
- Scotti, L., Fernandes, M. B., Maramatsu, E., Emereciano, V. P., Tavares, J. F., Silvia, M. S., Scotti, M. T. (2011). ¹³C NMR spectral data and molecular descriptors to predict the antioxidant activity of flavonoids, 47, 241-249.
- Sindhu, R. K., Vasudeva, N., Sharma, S. K. (2011). Hypolipidemic potential of ethanolic extract of *Verbescina encelioides* Benth. roots. *Acta Poloniae Pharmaceutica: Drug Research*, 68, 301-304.
- Singh, R., Jain, S. C., & Jain, R. (2009). Antioxidant activity of some medicinally important arid zone plants. *Asian Journal of Experimental Science*, 23, 215-221.
- Singh, S., Garg, V., Yadav, D., Nadeem, B. M., Sharma, N. (2012). In-vitro antioxidative and antibacterial activities of various parts of *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 4, 468-473.
- Singh, U., Kunwar, A., Srinivasan, R., Nanjan, M. J., Priyadarsini, K. I. (2009). Differential free radical scavenging activity and radioprotection of *Caesalpinia digyna* extracts and its active constituent. *Journal of Radiation Research*, 50, 425-433.
- Sun, Z., Chen, B., Zhang, S., Hu, C. (2004). Four new eudesmanes from *Caragana intermedia* and their biological activities. *Journal of Natural Products*, 67, 1975-1979.
- Takahashi, A., Ohnishi, T. (2004). The significance of the study about the biological effects of solar ultraviolet radiation using the exposed facility on the international space station. *Biological Sciences in Space*, 18, 255-260.
- Talavera-Alemán A. Componentes minoritarios de *Ageratina glabrata*. (2012). Tesis de licenciatura presentada en la facultad de Químico Farmacobiología de la UMSNH.
- Thaipong, K., Boonprakob, U., Crosby, K., Cisneros-Zevallos, L., Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating

- antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 669-675.
- Toribio, M. S., Oriani, D. S., Fernández, J. G., Skliar, M. I. (2005). Actividad antimicrobiana de *Verbesina encelioides*. *Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal*, 7, 41-45.
- Tsao, R., & Deng, Z. (2004). Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. *Journal of Chromatography B*, 812, 85-99.
- Viswanadh, G. S., Ramaiah, P. A., Laatsch., Maskey, R. (2006). Chemical constituents of the heartwood and bark of *Homonoia riparia*. *Journal Tropical Medical Plants*, 7, 267-273.
- Wagner, H., Iyengar, M. A., Seligmann, O., Herz, W. (1974). Rhamnocitrin-3-glucuronid in *Verbesina myricephala*. *Phytochemistry*, 13, 493-494.
- Wang, C. C., Chen, L. G., & Yang, L. L. (2002). Cytotoxic activity of sesquiterpenoids from *Atractylodes ovata* on leukemia cell lines. *Planta Medica*, 68, 204-208.
- Woo, H. H., Kuleck, G., Hirsch, A. M., Hawes, M. C. (2002). Flavonoids: signal molecules in plant development. *Kluwer Academic/ Plenum Publishers*. 2002, 51-60.
- Wu, Q. X., Shi, Y. P., Jia, Z. J. (2006). Eudesmane sesquiterpenoids from the Asteraceae family. *Natural Product Reports*, 23, 699-734.
- Xu, W. H., Jacob, M. R., Agarwal, A. K., Clark, A. M., Liang, Z. S., Li, X. C. (2009). Verbesinosides A- F, 15, 27-cyclooleanane saponins from the American native plant *Verbesina virginica*. *Journal of Natural Products*, 72, 1022-1027.
- Xu, W. H., Liang, Q., Liang, Z. S., Li, X. C. (2010). Two new eudesmane derivatives from *Verbesina virginica*. *Chinese Chemical Letters*, 21, 693-695.
- Yayli, N., Yildirim, N., Usta, A., Özkurt, S., Akgün, V. (2003). Chemical constituents of *Campanula lactiflora*. *Turkish Journal of Chemistry*, 27, 749-756.
- Yinusa, I. S. A. H., Ilogbulem, N. G., Joseph, A. O. (2012). Isolation of stigmasterol from serial plant part of *Spillanthes acmella* Murr. *World Journal of Life Sciences and Medical Research*, 2, 77-80.
- Zwenger, S., & Basu, C. (2008). Plant terpenoids: applications and future potentials. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews*, 3, 1-7.