



**UNIVERSIDAD MICHUACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

“Aislamiento e identificación de terpenos del género *Buddleja* de
la región oriente del Estado de Michoacán”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO
DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA

JUAN JOSÉ GARCÍA VANEGAS

ASESOR

DOCTOR EN CIENCIAS EN LA ESPECIALIDAD
DE FARMACOLOGÍA HUGO ALEJANDRO GARCÍA GUTIÉRREZ

Morelia, Michoacán.

Enero de 2016.

EL PRESENTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO EN EL LABORATORIO DE QUÍMICA MEDICINAL DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO BAJO LA ASESORÍA DEL D.C. HUGO ALEJANDRO GARCÍA GUTIÉRREZ. PROYECTO REALIZADO CON APOYO ECONÓMICO OTORGADO POR CIC-UMSNH, CONACYT CIENCIA BÁSICA (167952) Y SEP-PROMEP (UMSNH-CA-239, IDCA 11176).

Parte de este trabajo se presentó en el siguiente evento académico:

- ❖ Estudio fitoquímico preliminar del género *Buddleja* de la región Oriente del Estado de Michoacán. García-Vanegas, Juan J.; García-Gutiérrez, Hugo A. Presentado en el Congreso Nacional del XX Verano de la Investigación Científica y Tecnológica del Pacífico realizadó, del 22 de junio al 7 de agosto de 2015 en Puerto Vallarta, Nayarit.

ÍNDICE

I. Abreviaturas y símbolos	v
II. Resumen	vi
III. Abstract	viii
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1. Familia Buddlejaceae	13
2.2. Género <i>Buddleja</i>	15
2.3. Perfil químico del género <i>Buddleja</i>	17
2.3.1. Terpenoides en el género <i>Buddleja</i>	17
2.3.2. Estudios fitoquímicos reportados en el género <i>Buddleja</i>	20
3. Objetivos	24
3.1. Objetivo general	24
3.2. Objetivos particulares	24
4. Resultados y discusión	25
5. Conclusiones	49
6. Parte experimental	52
7. Bibliografía	55

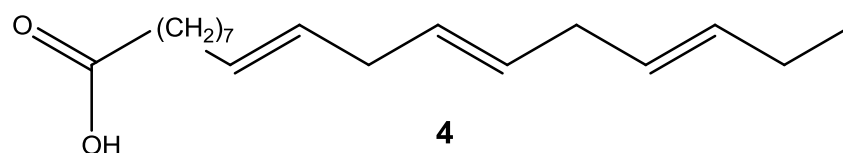
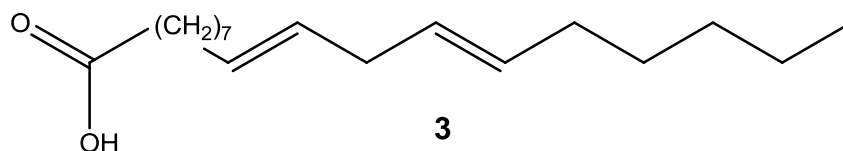
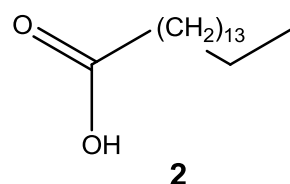
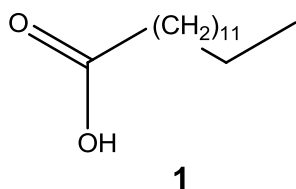
I. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

a.e.c.	Antes de la Era Común
A.C.	Asociación Civil
AcOEt	Acetato de etilo
AMV	Ácido mevalónico
ATP	Adenosintrifostato
<i>B.</i>	<i>Buddleja</i>
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
C.C.F	Cromatografía en capa fina
d	Doble
e.c.	Era común
g	Gramo
h	Horas
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
m	Múltiple
mg	Miligramo
msnm	Metros sobre el nivel del mar
mL	Mililitro
NIST	Nacional Institute of Standars and Technology
ppm	Partes por millón
p.f.	Punto de fusión
ren	Rendimiento
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN de ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RMN de ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono
<i>sp</i>	Sin especie
t	Triple
UV	Ultravioleta

II. RESUMEN

En México, algunas especies del género *Buddleja* son conocidas como tepozanes y se utilizan en la medicina tradicional para el tratamiento de diversas enfermedades. *Buddleja sp* crece en el Oriente del Estado de Michoacán, conocida popularmente como “peralvillo”. Se emplea de manera tradicional para tratar enfermedades gastrointestinales, así como herpes labial. La familia Buddlejaceae cuenta con alrededor de ocho géneros y aproximadamente 125 especies distribuidas en zonas tropicales y subtropicales de América, África y Asia. Los géneros *Buddleja* y *Polypremum* son los principales integrantes de esta familia que se encuentran en México. En el presente trabajo se realizó el aislamiento e identificación de terpenos de los extractos orgánicos de raíz, tallo, hoja y flor de *Buddleja sp*, obtenidos con disolventes en orden ascendente de polaridad.

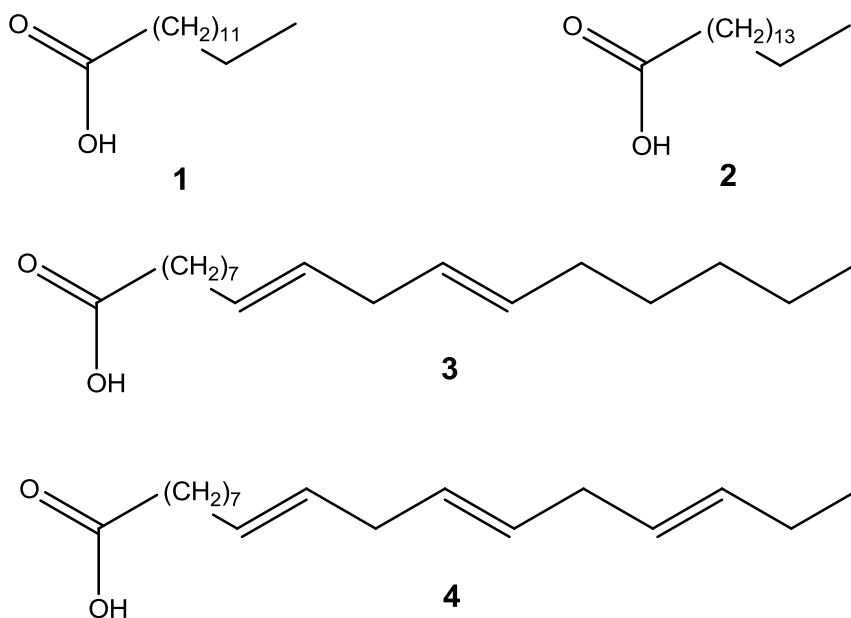
De los extractos no polares de raíces, tallos, hojas y flores, se pudieron identificar cadenas hidrocarbonadas tales como ácido tetradecanoico (**1**), ácido hexadecanoico (**2**), ácido 9,12-octadecadienoico (**3**), ácido 9,12,15-octadecatrienoico (**4**), el triglicérido del ácido octanoico (**5**), octacosano (**6**), tetracosano (**7**), además de identificar dos sesquiterpenos: la 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona (**8**), de las partes aéreas y el dehidro-aromadendrano (**9**) de la raíz. Del extracto hexánico de tallos se aislaron el estigmasterol (**11**), y el triterpeno β -sitosterol (**10**), este último también se aisló del extracto hexánico de flores. Del β -sitosterol se preparó el derivado acetilado correspondiente (**12**) y del estigmasterol se realizó su monoepoxidación, obteniendo los oxiranos, α -epoxiestigmasterol (**13**) y β -epoxiestigmasterol (**14**). Finalmente del extracto hexánico de raíz se aisló una mezcla de compuestos de la cual se identificaron al campesterol (**15**) y estigmasterol (**11**).

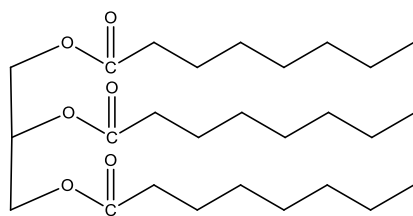


III. ABSTRACT

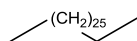
In Mexico, some species of *Buddleja* are known as tepozanes, they are used in traditional medicine to treat various diseases. *Buddleja sp* grows in the East of Michoacan, typically known as “peralvillo”. It is used traditionally to treat gastrointestinal diseases, and cold sores. Buddlejaceae family has about eight genera and about 125 species distributed in tropical and subtropical areas of America, Africa and Asia. *Buddleja* and *Polypremum* genders are primarily members of this family found in México. The present work describes the isolation and identification of terpenes from the organic extracts of roots, stems, leaves and flowers of *Buddleja sp* obtained with solvents in ascending order of polarity.

Non-polar extracts of roots, stems, leaves and flowers, gave hydrocarbon compounds such as tetradecanoic acid (**1**), hexadecanoic acid (**2**), 9,12-octadecadienoic acid (**3**), 9,12,15-octadecatrienoic acid (**4**), the triglyceride of octanoic acid (**5**), octacosane (**6**), tetracosane (**7**), in addition to identify two sesquiterpenes: 6,10,14-trimethyl-2-pentadecanone (**8**), from aerial parts and the dehydro-aromadendrano (**9**), from roots. From hexane extract of stems stigmasterol (**11**) and the triterpene β -sitosterol (**10**) were isolated. β -sitosterol was subjected to acetylation yielding **12** and epoxidation stigmasterol was carried out in basic medium yielding α -epoxystigmasterol (**13**) and β -epoxystigmasterol (**14**). Finally, from the hexane extract of roots, a mixture of two substances which there were identified as campesterol (**15**) and stigmasterol (**11**) compounds.

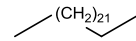




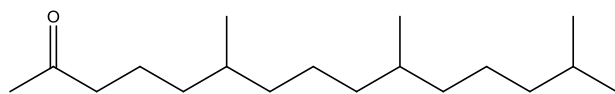
5



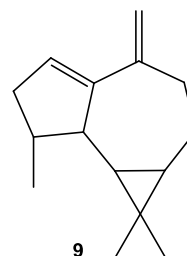
6



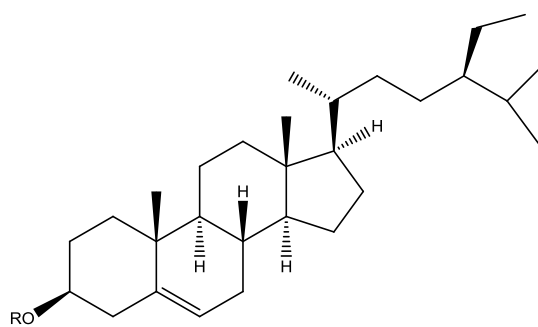
7



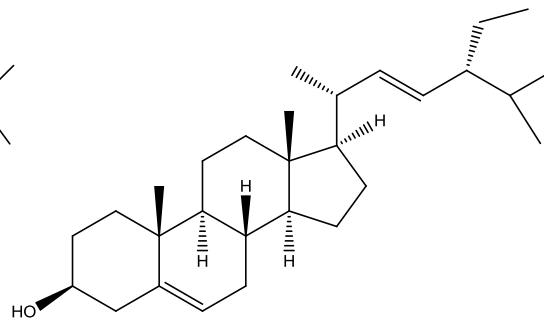
8



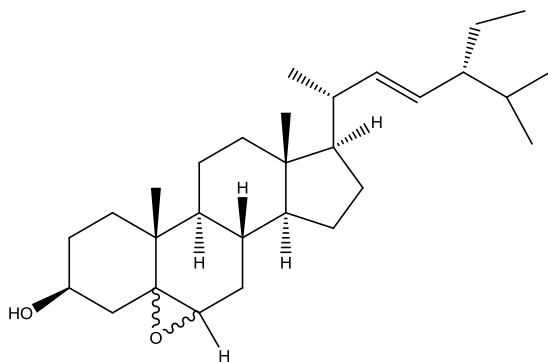
9



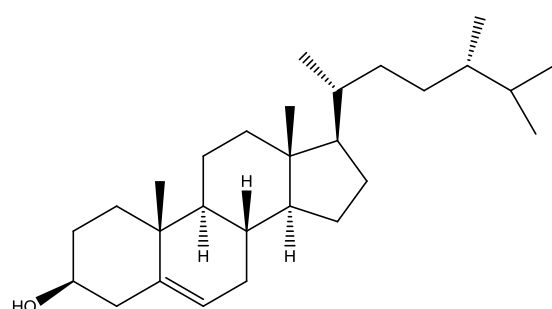
R
10 = H
12 = AcO



11



13 α -epoxistigmasterol
14 β -epoxistigmasterol



15

1. INTRODUCCIÓN

A lo largo de los siglos los seres humanos se han basado en la naturaleza para satisfacer sus necesidades básicas y para obtener las sustancias utilizadas para tratar diversos padecimientos y enfermedades. Las plantas han representado la base de sofisticados sistemas de medicina tradicional que han existido desde hace miles de años.

Los primeros registros, provienen de la medicina egipcia de aproximadamente 2900 años a.e.c., más tarde alrededor de 2600 años a.e.c., se encontraron en Mesopotamia escritos en tablillas de arcilla en escritura cuneiforme referente a medicina herbolaria. El escrito más conocido de farmacéutica egipcia es llamado “Papiro de Ebers”, y data de 1500 años a.e.c. La Materia Médica de China ha sido ampliamente documentada en los siglos, con el primer registro (Wu Shi Er Bing Fang), que contiene 52 recetas, que datan de alrededor de 1100 años a.e.c., aunque los registros de la Pent'sao tienen fama de ser incluso anteriores.¹



Figura 1. Código de la Cruz Badiano.

En el antiguo mundo occidental, los griegos contribuyeron sustancialmente al desarrollo racional del uso de medicamentos a base de hierbas. El filósofo y científico natural, Teofrasto (300 años a.e.c.), en su libro “Historia de las plantas”, trata las cualidades medicinales de diversas hierbas y Dioscórides, que fue médico (100 años e.c.), registró la colecta, almacenamiento y uso de las hierbas medicinales durante sus viajes con los ejércitos romanos. Por su parte Galeno (130-200 años e.c.), practicó y enseñó la farmacia y Medicina en Roma, publicó más de 30 libros sobre estos temas y es bien conocido por sus recetas y fórmulas utilizadas en medicamentos complejos.¹

En México son notables los códices mayas, mixtecos, mexicas y purépechas. De los códices aztecas, destacan el Códice Matritense, el Códice Florentino y el Códice de la Cruz-Badiano, Figura 1, que ilustran maravillosamente la vida de la antigua Tenochtitlán, sus habitantes y costumbres, entre las que destacan la herbolaria y la medicina, entre otras ciencias.²

El Códice De la Cruz-Badiano (*Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*) es una recopilación gráfica de las plantas medicinales usadas en la Nueva España del siglo XVI y su riqueza conceptual le ha ganado ser considerado una de las obras maestras de la literatura médica mundial.²

En la actualidad cientos de plantas son utilizadas en la medicina, pero la ciencia moderna analizando y estudiando los efectos terapéuticos de las plantas, quiere precisar, comparar y clasificar sus diversas propiedades, no con el fin de disminuir esta confianza en la naturaleza, sino agrupar las plantas de efectos similares, para conocer los principios activos responsables de aliviar o curar enfermedades y extraerlos de las plantas que los contienen, determinar sus estructuras químicas, establecer su síntesis, proponer modificaciones estructurales en busca de una mayor actividad y finalmente, dar a conocer a la humanidad los resultados de los estudios.³

Los principios activos tienen propiedades medicinales o preventivas, o también se dice que funcionan incrementando el bienestar. El estudio de las sustancias de origen natural que poseen una virtud medicinal se conoce como farmacognosia, y el efecto que ocasionan esas sustancias en el organismo se estudia en farmacología. La fitoquímica permite detectar y posteriormente identificar los principios activos responsables de las propiedades atribuidas a las plantas.⁴

Por otro lado, el conocimiento estructural de los compuestos químicos forman parte de las plantas y podría dar lugar al diseño de rutas sintéticas diversas para producir diferentes derivados; así por ejemplo, el uso de la diosgenina como materia prima inicial de la mayoría de hormonas esteroidales usadas corrientemente en la medicina, o dar pauta para la síntesis de compuestos similares como el caso de la cocaína, que sirvió como compuesto modelo para la producción de procaína y otros anestésicos locales.³

Por tanto es de gran importancia aislar los diferentes principios activos de las plantas, que se encuentran en las distintas partes de las mismas, o en sus extractos de diferente polaridad.³

2. ANTECEDENTES

Los organismos necesitan transformar una gran variedad de compuestos orgánicos. para poder vivir, crecer y reproducirse Estas transformaciones requieren energía que obtienen en forma de ATP y la presencia de sistemas enzimáticos. El conjunto de reacciones específicas mediante el cual un organismo fabrica sus propias sustancias y mantiene la vida se conoce como metabolismo.⁵

Las moléculas más importantes para la vida son las proteínas, los hidratos de carbono, las grasas y los ácidos nucleicos. A pesar de las características extremadamente diferentes de los distintos seres vivos, las rutas generales para modificar y sintetizar estas sustancias son esencialmente las mismas para todos con muy pequeñas modificaciones. Estos procesos se conocen como Metabolismo Primario y los compuestos implicados se conocen como metabolitos primarios.⁵

Azúcares

Los carbohidratos son polihidroxialdehídos, polihidroxicetonas o compuestos que por hidrólisis se convierten en aquellos. Como su nombre lo indica se componen de carbono, hidrógeno y oxígeno también llamados sacáridos. Son utilizados por los seres vivos como elementos energéticos y sustancias de reserva, que constituyen los compuestos más abundantes de las plantas y son productos de la fotosíntesis entre otros.⁶

Se pueden encontrar una gran diversidad de monosacáridos; pentosas, hexosas, desoxiosas y derivados, como ácidos urónicos, polioles y azúcares aminados entre otros.⁷

Lípidos

Los lípidos son compuestos orgánicos que sólo se encuentran en los organismos vivos y que son solubles en disolventes no polares. Estos compuestos son clasificados como lípidos en base a sus propiedades físicas, como la solubilidad y a su estructura, por lo que presentan una diversidad estructural y funcional.^{6,8}

Los ácidos grasos son uno de los principales grupos dentro de los lípidos. Son ácidos carboxílicos con cadenas largas de hidrocarburo. La mayor parte de los ácidos grasos naturales contiene un número par de átomos de carbono y no son ramificados porque se sintetizan a partir de acetil-coenzima A Tabla 1.⁸

Tabla 1. Ácidos grasos saturados e insaturados.

Ácidos grasos saturados	Símbolo	Nombre común	Nombre sistemático	Estructura
	8:0	Ácido caprílico	Ácido octanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
	10:0	Ácido cáprico	Ácido decanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$
	12:0	Ácido láurico	Ácido dodecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$
	14:0	Ácido mirístico	Ácido tetradecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
	16:0	Ácido palmítico	Ácido hexadecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
	18:0	Ácido esteárico	Ácido octadecanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
	20:0	Ácido araquídico	Ácido eicosanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$
	24:0	Ácido lignocérico	Ácido tetracosanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$

Ácidos grasos insaturados (Uno y dos enlaces dobles)	Símbolo	Nombre común	Nombre sistemático	Estructura
	16:1n-7	Ácido palmitoléico	Ácido 9-hexadecenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
	18:1n-9	Ácido oleico	Ácido 9-octadecenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
	22:1n-9	Ácido erúcico	Ácido 13-docosanoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$
	24:1n-9	Ácido nervónico	Ácido 15-tetracosenoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7(\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$
	18:2n-6	Ácido linoléico	Ácido 9,12-octadecadienoico	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_2(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
Ácidos grasos insaturados (Tres o más enlaces dobles)	18:3n-6	Ácido α -linolénico	Ácido 9,12,15-octadecatrienoico	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
	20:4n-6	Ácido araquidónico	Ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
	20:5n-3	Ácido timmodónico	Ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_5(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
	20:6n-3	Ácido clupanodónico	Ácido 4,7,10,13,16,19-docosohexenoico	$\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_6\text{CH}_2\text{COOH}$

Aminoácidos

Las proteínas de origen vegetal están constituidas por alrededor de 300 aminoácidos en forma libre, la mayoría de ellos son tóxicos y cuyo interés en fitoterapia es prácticamente nulo. Sin embargo ciertos derivados de aminoácido tienen importancia farmacológica.⁷

Se tiene muy poca información acerca de la función de los aminoácidos dentro de las plantas, pero su número y universalidad indican que no se trata de errores metabólicos por lo menos no en todos los casos.⁹

Se sabe que algunos se acumulan en las semillas de diversos géneros de plantas y desaparecen a lo largo de la germinación y pueden, por este motivo, ser considerados como reserva de nitrógeno. En numerosos casos, participan en la conservación y supervivencia de la especie; así, actúan como inhibidores de la germinación de pólenes extraños sobre el *estilo* de la flor; y otros, como tóxicos sobre depredadores.⁹

Nucleótidos

En toda célula viva hay nucleoproteínas y son sustancias formadas por proteínas combinadas con polímeros naturales de ácidos nucleicos. De todos los campos de la química, el estudio de los ácidos nucleicos quizá sea el más valioso, puesto que estos compuestos son las sustancias de la herencia. Los dos tipos de ácidos nucleicos son el ARN (ácido ribonucleico) y el ADN (ácido desoxirribonucleico).^{10,11}

Por otro lado, los metabolitos secundarios se definen como un grupo de compuestos naturales que, en contraste con los metabolitos primarios, no están directamente involucrados en el crecimiento, desarrollo o reproducción de los organismos. Típicamente, los metabolitos secundarios pertenecen a diferentes clases de sustancias químicas y se consideran como característica para las especies individuales (quimiotaxonomía) y podemos observar el metabolismo secundario en la Figura 2.¹

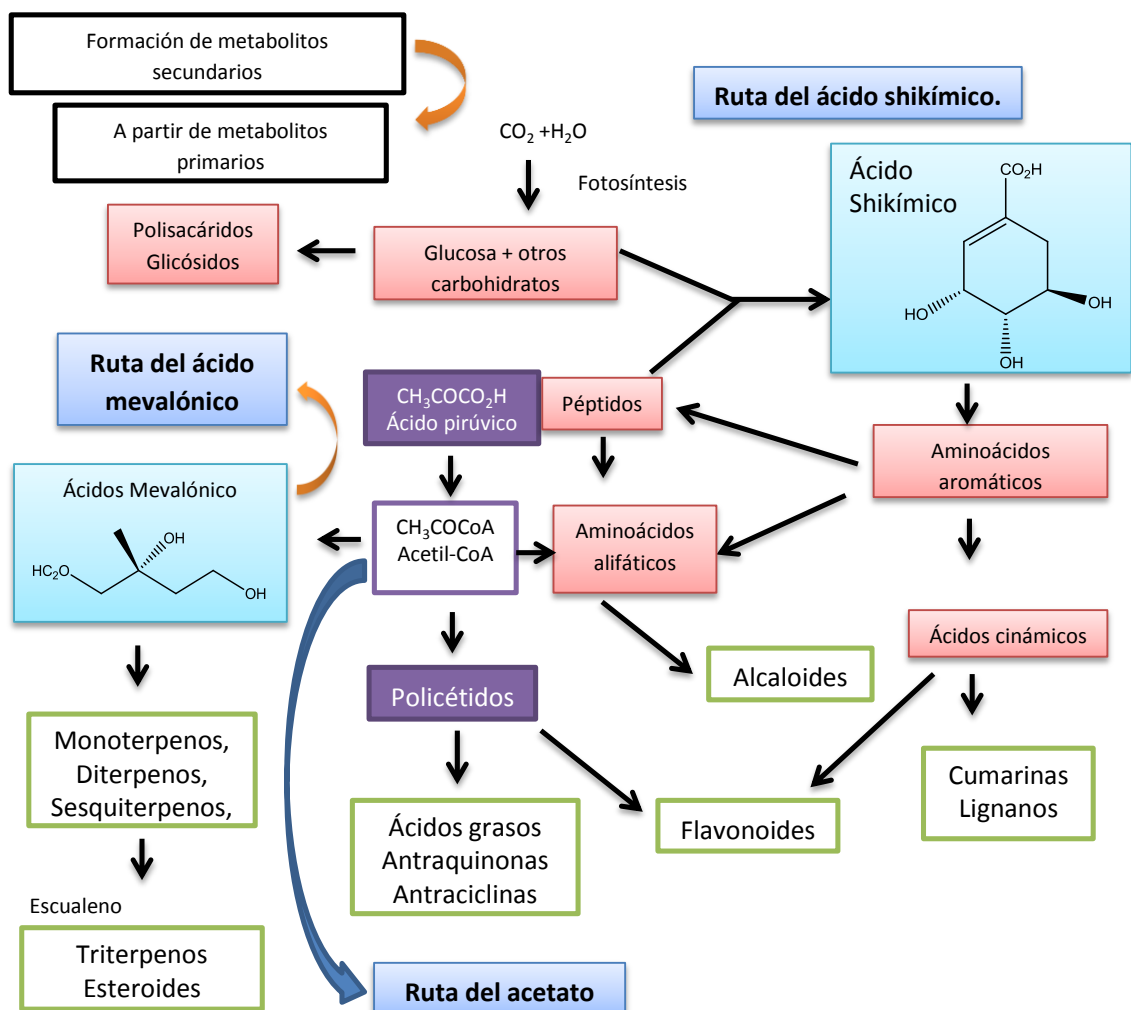


Figura 2. Metabolismo secundario de las plantas y productos naturales que genera el proceso.

Algunos productos del metabolismo secundario tienen funciones ecológicas específicas como atrayentes. Muchos son pigmentos que proporcionan color a flores y frutos, jugando un papel esencial en la reproducción atrayendo a insectos polinizadores, o atrayendo a animales que van a utilizar los frutos como fuente de alimento, contribuyendo de esta forma a la dispersión de semillas.¹²

Otros compuestos tienen función protectora frente a predadores, actuando como repelentes, proporcionando a la planta sabores amargos, haciéndolas indigestas o venenosas. También intervienen en los mecanismos de defensa de las plantas frente a diferentes patógenos, actuando como pesticidas naturales.¹²

Podemos mencionar que los metabolitos secundarios también son denominados productos secundarios o productos naturales y los podemos agrupar en cuatro tipos o clases:

- Terpenoides
- Fenilpropanoides
- Alcaloides
- Glicósidos

Terpenoides.

Los isoprenoides, son mejor conocidos como terpenoides o terpenos. Son un grupo de productos naturales que incluyen todas aquellas sustancias químicas que derivan biosintéticamente del ácido mevalónico (AMV). Wallach (1887) propuso la clasificación de éste grupo de compuestos atendiendo al número de átomos de carbono de los mismos Tabla 2.¹³

Terpeno, en el sentido más estricto, se refiere a una serie de isómeros, hidrocarburos insaturados de la fórmula general $C_{10}H_{16}$ y se pueden encontrar en el vapor (etéreo) de los aceites esenciales de origen vegetal. La palabra deriva del alemán "Terpentin" (trementina en inglés o terebenthine en francés), los primeros compuestos de esta clase se aislaron de la trementina, y su primer uso es comúnmente atribuido a Kekulé.¹⁴

La unidad estructural básica de los terpenoides es el isopreno cuya fórmula es 2-metil-1,3-butadieno (Figura 3), constituido por cinco átomos de carbono. Su unión sucesiva da lugar a los distintos tipos de terpenos conocidos.¹³

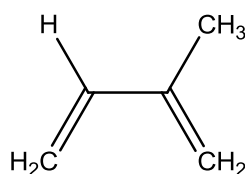


Figura 3. Estructura del isopreno.

Aunque el isopreno se había considerado en un principio como base estructural de una serie de compuestos terpenoides, fue el químico alemán Otto Wallach quien primero reconoció la importancia de esta regularidad en la estructura de los terpenos. Wallach estableció que la tarea más crítica en el estudio de terpenos de aceites esenciales, se basa en la identificación de derivados cristalinos, siendo ésta la única forma para separar e identificar las sustancias químicas con certeza. Wallach (1887) esbozó la que sería conocida como "regla del isopreno", debida a Ruzicka (1922).¹⁴

Tabla 2. Clasificación de terpenos según Wallach (1887).

Grupo	Nº de átomos de carbonos	Nº de unidades de isopreno
Hemiterpeno	5	1
Homoterpenos	10	2
Sesquiterpenos	15	3
Diterpenos	20	4
Sesterterpenos	25	5
Triterpenos	30	6
Tetraterpenos	40	8
Politerpenos	5n	n

El grupo de los terpenos, incluye hormonas, pigmentos carotenoides (carotenos y xantofilas), esteroides (ergosterol, β -sitosterol), derivados de los esteroides (glicósidos cardiacos), látex y aceites esenciales (proporcionan el olor y el sabor característico de las plantas). Aunque las citoquininas y las clorofilas no son terpenos, contienen en su estructura una cadena lateral que es un terpeno. A la vista de esta variedad de compuestos, es evidente que muchos terpenos tienen un importante valor fisiológico y comercial, ejemplos de este tipo de compuestos se presentan en la Figura 4.¹²

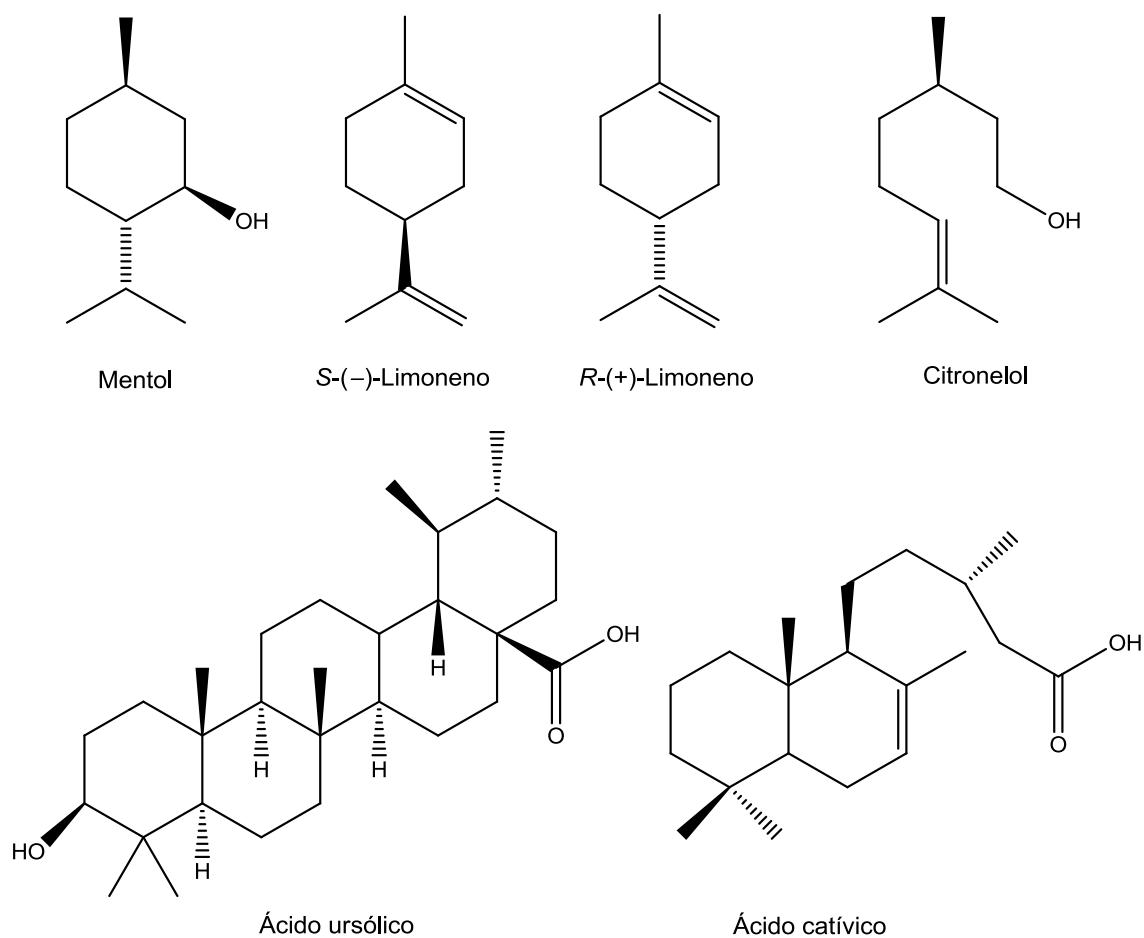


Figura 4. Compuestos terpenoides.

Derivados fenólicos.

Las plantas sintetizan una gran variedad de productos secundarios que contienen un grupo fenol. Estas sustancias reciben el nombre de compuestos fenólicos, poli-fenoles o fenilpropanoides y todas ellas derivan del fenol, un anillo aromático con un grupo hidroxilo Figura 5.¹²

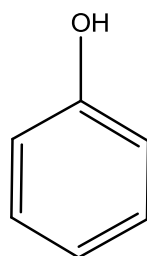


Figura 5. Estructura del fenol.

Las plantas producen gran cantidad de compuestos fenólicos, tanto en términos de diversidad molecular y de cantidad absoluta de estos compuestos. Los fenilpropanoides, y los policétidos de plantas relacionadas, tienen múltiples funciones biológicas.¹

Las funciones de derivados fenilpropanoides son tan diversas como su estructura. Algunos fenilpropanoides son pigmentos de bajo peso molecular que se encuentran en las flores, antibióticos (fitoalexinas), protectores UV, repelentes de insectos, y también participan en las interacciones planta-microorganismo. Además, funcionan como complejos, componentes poliméricos de estructuras superficiales y de apoyo, como la suberina, lignina y otros componentes de la pared celular.³

La formación de los compuestos fenólicos da inicio con el aminoácido fenilalanina por eliminación de una molécula de amonio para formar ácido cinámico. Este se alimenta en diversas rutas biosintéticas generando diversos compuestos polifenólicos.^{2,13}

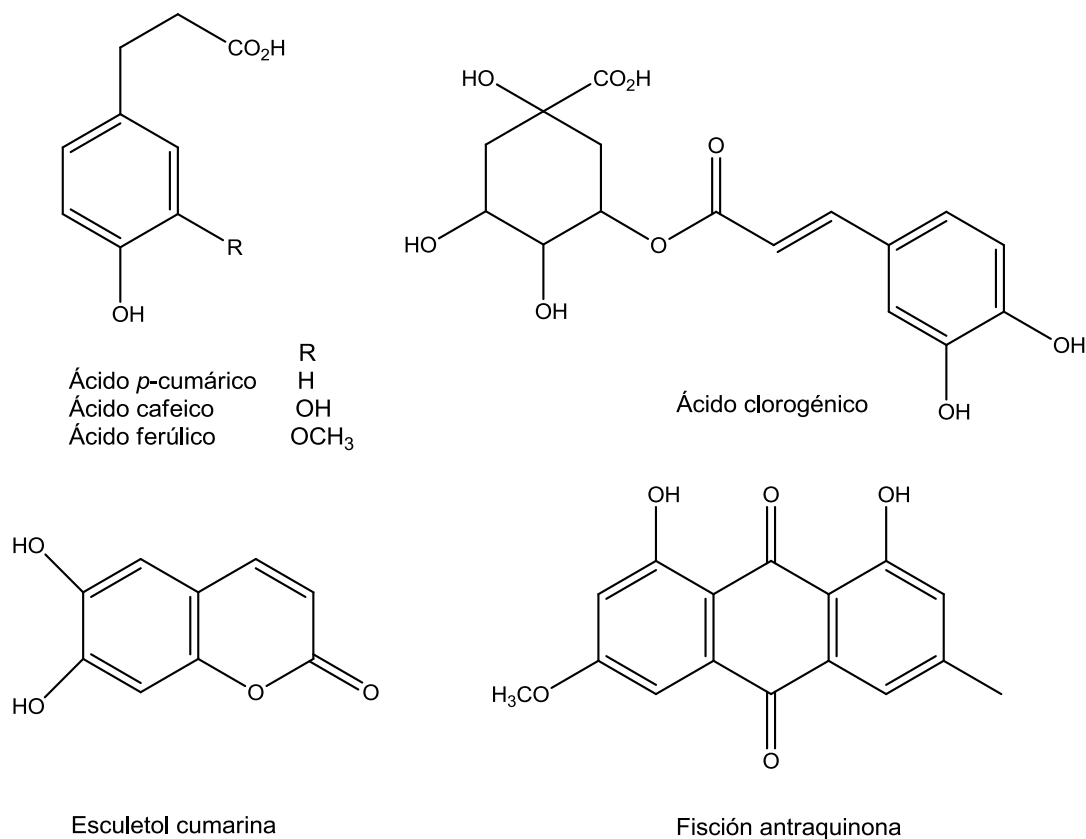
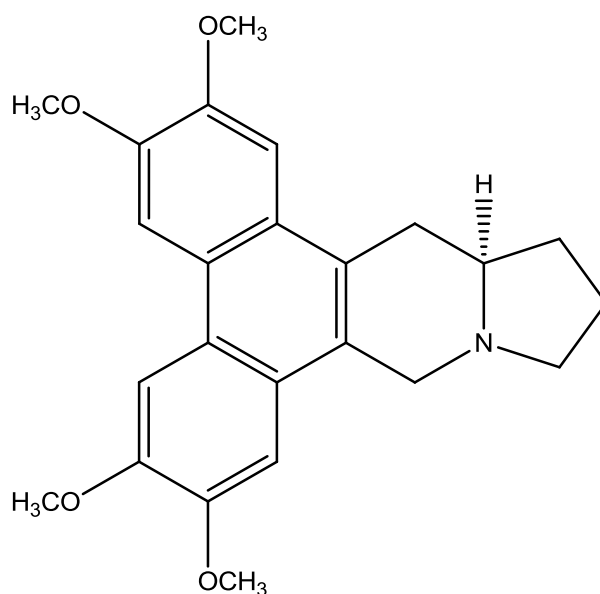


Figura 6. Compuestos fenilpropanoides.

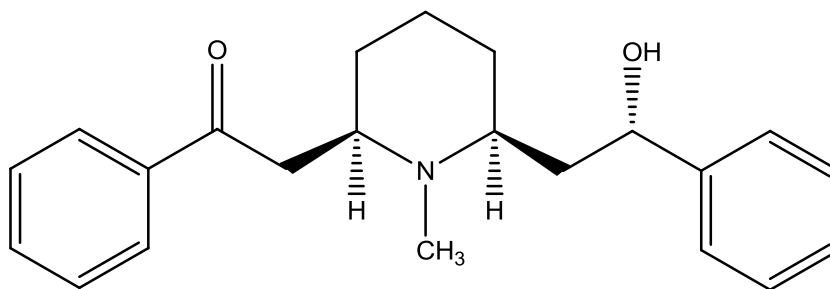
Alcaloides

En lo que se refiere al empleo de los alcaloides en la medicina, es relativamente reciente. Ya que se han aislado sustancias terapéuticamente activas. El primer fármaco investigado químicamente fue el opio, que es látex seco de *Papaver somniferum* que se utilizó durante siglos por sus propiedades analgésicas y narcóticas.¹⁵

Un alcaloide es un compuesto orgánico de origen natural nitrogenado formando parte de un heterociclo, y por consiguiente básico, de distribución restringida y dotado, a bajas dosis, de marcadas propiedades farmacológicas. Los alcaloides, son compuestos que se encuentran esencialmente en las Angiospermas. Algunos autores estiman que entre un 10-15% de ellas sintetizan este tipo de moléculas.⁹



Tiloforina, (Alcaloide indolizidínico)

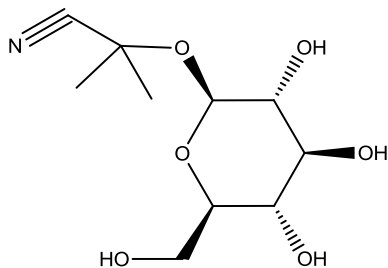


Lobelina, (Alcaloide piperidínico)

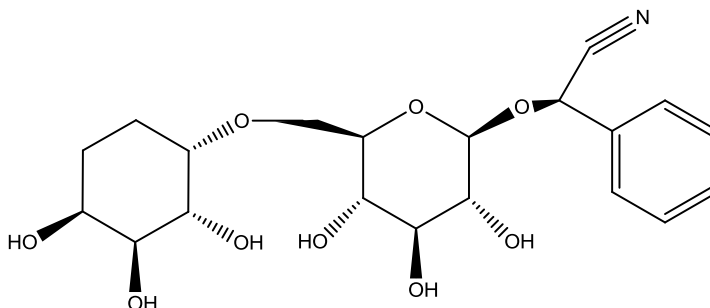
Figura 7. Ejemplos de Alcaloides.

Glicósidos

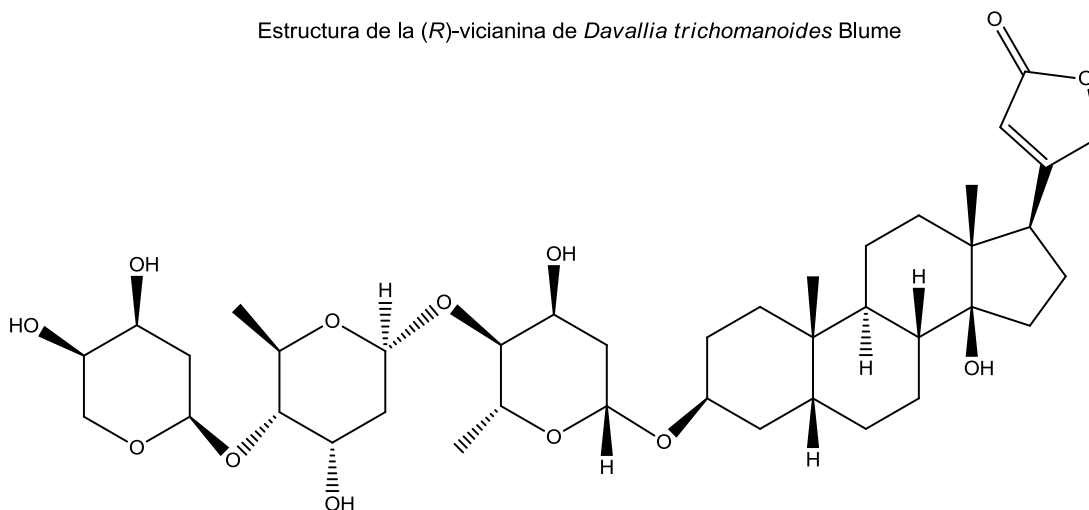
Los glicósidos son metabolitos secundarios donde su nombre hace referencia al enlace glicosídico entre una molécula de azúcar unida a un grupo hidroxilo de otra molécula. Por ejemplo, los glucósidos cianogénicos son el producto, de una aglicona tipo α -hidroxinitrilo y de un azúcar, principalmente D-glucosa. La distribución de los glucósidos cianogénicos en el reino vegetal es relativamente amplia, algunos pertenecen a las familias Fabaceae, Rosaceae, Linaceae, Compositae y otras.^{10,16}



Estructura de la Linamarina de *Manihot esculenta* (Yuca)



Estructura de la (R)-vicianina de *Davallia trichomanoides* Blume



Estructura de la digitoxina de *Digitalis purpurea*

Figura 8. Ejemplos de Glicósidos.

2.1. Familia Buddlejaceae

Está constituida por árboles o arbustos y en raras ocasiones plantas herbáceas de hojas opuestas, decusadas, a veces alternas o dispuestas a manera de verticilos, estípulas, comúnmente conectando las bases de las hojas, láminas por lo regular con pubescencia estrellada y glandular, sobre todo en el envés; inflorescencias terminales o axilares, pedúnculo con hojas o brácteas en su base, las flores frecuentemente dispuestas en cimas, las cuales a su vez se agrupan a manera de panículas, racimos o verticilos; flores tetrámeras, en raras ocasiones pentámeras, actinomorfas o ligeramente zigomorfas, perfectas o funcionalmente dioicas; cáliz sinsépalo, en ocasiones profundamente partido; corola sinpétala, generalmente actinomorfa, tubular, hipocraterimorfa o campanulada; estambres, insertos en el tubo corolino, dehiscentes longitudinalmente; ovario súpero, en muy raras ocasiones semiínfero, usualmente con tejido nectarífero en su base, bilocular o rara vez tetralocular, óvulos anátropos, estilo, estigma por lo común ligeramente bilobado; fruto por lo regular en forma de cápsula septicida, en ocasiones carnoso o indehiscente, raramente loculicida; semillas diminutas, a menudo aladas y con endospermo carnoso.^{17,18}



Figura 9. *Buddleja crissa*.

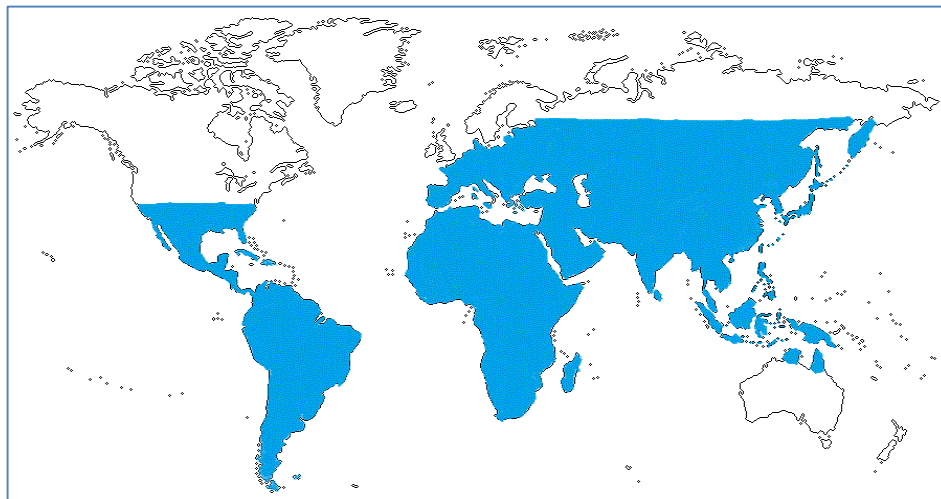


Figura 10. Distribución geográfica de la Familia Buddlejaceae.

La familia cuenta con alrededor de ocho géneros y aproximadamente 125 especies distribuidas en zonas tropicales y subtropicales de América, África y Asia, Figura 10. El criterio de Cronquist, considera a la familia Buddlejaceae como un taxón independiente de Loganiaceae.^{17,19}

Aún, cuando existen trabajos moleculares que apoyan este punto de vista, hay evidencias que además sugieren que la familia es un taxón parafilético así, *Buddleja*, *Nicodemia*, *Emorya* y *Gomphostigma* formarían parte de Buddlejaceae, la cual a su vez muestra gran afinidad hacia Scrophulariaceae; *Sanago* y *Peltanthera* se presentan más relacionados con Gesneriaceae, *Polypremum* con Tetrachondraceae y *Retzia* con Stilbaceae, de acuerdo con Oxelman, por lo que se requiere de un estudio más profundo para determinar una adecuada circunscripción de la familia.¹⁷

En México se conocen tres géneros, de los cuales se ha detectado la presencia de *Buddleja* y *Polypremum*, Figura 11 y 12.¹⁷



Figura 11. *Polypremum procumbens*.



Figura 12. *Buddleja saligna*.

2.2. Género *Buddleja*

Descripción botánica

El género *Buddleja* está compuesto por árboles o arbustos dicóicos, que miden desde menos de 1 metro hasta 30 metros de alto, en ocasiones dicóicos, ramas jóvenes con pubescencia brillante; hojas pecioladas o sésiles, ovadas, lanceoladas, oblongas o elípticas, densamente estrellado-tomentosas en las ramas jóvenes y el envés de las hojas; inflorescencias en panículas, capitadas o en cabezuelas esféricas axilares; flores blanco-verdosas, amarillas o amarillento-anaranjadas, más bien pequeñas, cáliz persistente, lóbulos de la corola imbricados o valvados en el botón, oblongos u ovado-redondeados; estambres con los filamentos adheridos a la garganta de la corola; ovario bilocular y bicarpelar, con muchos óvulos, estilo corto, estigma casi entero a manifiestamente bilobado, a veces algo bilabiado; frutos capsulares con dehiscencia loculicida y septicida o indehiscentes, semillas pequeñas, numerosas o escasas, aladas o sin alas. Su corteza es rugosa y fracturada, en promedio un fruto puede tener 80 semillas, de las cuales el 30% son vanas.^{18,20}

Taxonomía y Distribución

El género *Buddleia* fue nombrado en honor al naturalista inglés Adam Buddle (1660-1715), frecuentemente se le nombra *Buddleja*, por una antigua costumbre de escribir una “i” alargada.²⁰

El género *Buddleja* consta de aproximadamente 100 especies, nativas de Norte y Sudamérica, del Este y Sur de África, y del Sur de Asia. El género se ha colocado en varias familias, incluyendo la Loganiaceae y la Tubiflorae. Actualmente se encuentra en la familia Buddlejaceae. A continuación se muestra la organización taxonómica en la Tabla 3.^{19,20}

Tabla 3. Organización taxonómica del género *Buddleja*.

Reino	Plantae
Subreino	Tracheobionta
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Asteridae
Orden	Scrophulariales
Familia	Buddlejaceae
Género	<i>Buddleja</i>

México cuenta con 16 especies distribuidas en toda la república. El nombre genérico se ha citado de diversas maneras a través del tiempo (*Buddleia*, *Buddleja* o *Buddleya*). No obstante, el Código Internacional de Nomenclatura Botánica vigente indica que se trata de un nombre conservado, por lo que la denominación *Buddleja*, establecida por Linneo, debe considerarse como de ortografía correcta.¹⁷

Principales usos del género

El género tiene poca importancia económica, sólo un número muy reducido de especies son empleadas como ornamentales. En México muchas se conocen ampliamente con el nombre general de “tepozán” y se utilizan en medicina vernácula para curar una gran variedad de enfermedades.¹⁷

En México, el género *Buddleja* se encuentra ampliamente distribuido, desde altitudes de 2200 a los 3000 msnm. El género *Buddleja* presenta diversos usos económicos, como son: para reforestación, forraje, construcción y fabricación de herramientas; así como uso medicinal, siendo éste el que predomina en todas las especies de *Buddleja* (Tabla 4). Las especies con uso forrajero son *B. skutchii*, *B. cordata*, *B. crotonoides*, *B. americana*, *B. nitida* y *B. parviflora*.^{19,20}

Tabla 4. Uso medicinal de algunas especies del género *Buddleja*.

Especie	Uso	Parte utilizada	Forma
<i>B. americana</i>	Diurético y estomacal, combate el insomnio, para problemas dermatológicos padecimientos gástricos y respiratorios.	Hojas.	Cocción.
<i>B. cordata</i>	Evita exceso de sudor y como diurético.	Hojas. Raíces y Corteza.	Cocción, infusión y ungüento.
<i>B. skutchii</i>	Relacionada con enfermedades femeninas.		
<i>B. sessiliflora</i>	Para las úlceras	Hojas.	Cocción.
<i>B. perfoliata</i>	Como diurético y estomacal.	Hojas.	Infusión.
<i>B. curviflora</i>	Para la disentería.		
<i>B. officinales</i>	Hipertensión, diabetes, nefritis y cáncer.		
<i>B. davidii</i>	En heridas, y lesiones relacionadas con lepra y para tratar la malaria.		
<i>B. scordioides</i>	Contra la indigestión, empacho, fiebre, aliviar la disentería y la diarrea. En niños y lactantes para evitar cólicos.	Hojas y raíces. Partes aéreas.	Infusión.
<i>B. parviflora</i>	Protector solar. Hidropesía, sinusitis, y como antiséptico.	Tallos.	Infusión.
<i>B. madagascariensis</i>	Asma, tos y bronquitis.	Hojas.	Infusión.

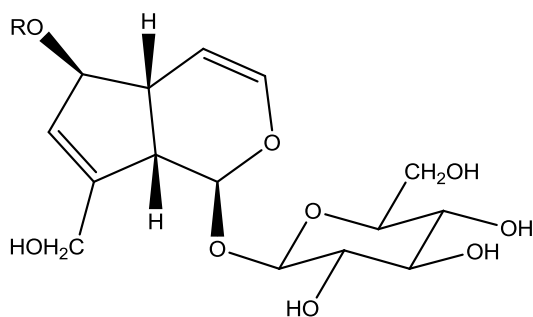
2.4. Perfil químico del género *Buddleja*

2.4.1. Terpenoides en el género *Buddleja*

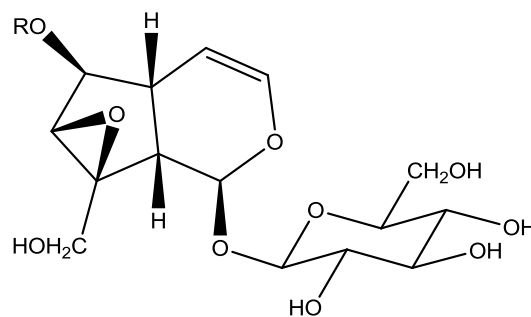
Monoterpenos

Los principales monoterpenos presentes en este género, especialmente en hojas y tallos jóvenes de la planta, son consistentes iridoides de un esqueleto de 9 carbonos con un éster o enlace glicosídico en C-6. Algunos compuestos reportados incluyen aucubina y el mayor grupo de iridoides contienen catalpol junto con su metoxibenzoilo y análogos *p*-metoxicinamoilo.²¹

Las flores de algunas especies tienen un distintivo olor, bastante fuerte y es probable que esto se deba a compuestos volátiles que bien puede ser monoterpenos no glicosilados. Sin embargo, no se han realizado estudios sobre la constitución química de los compuestos volátiles de flores, a pesar de sus posibles propiedades atrayentes de insectos.²¹



Aucubina

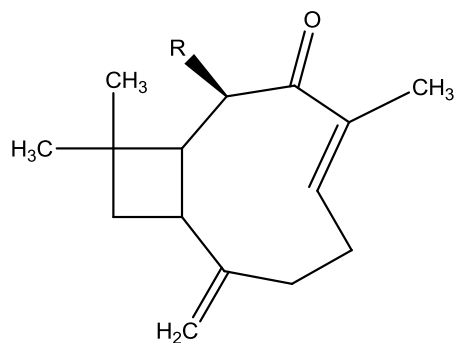


Catalpol

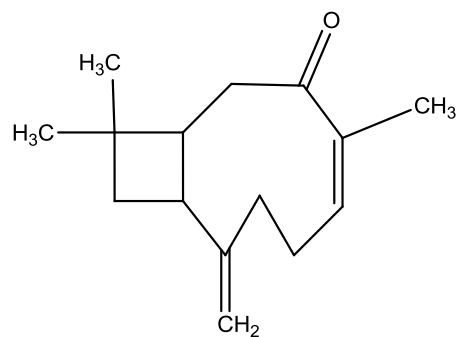
Sesquiterpenos

Se han registrado en las raíces y corteza de algunas especies de *Buddleja*., una serie de compuestos cariofilanos conocido como buddledina A, buddledina B, buddledina C y buddledina D. La dehidrobuddledina se aisló a partir de raíces de *B. globosa*, además de tres sesquiterpenos que tienen un esqueleto de humuleno; uno de éstos fue el

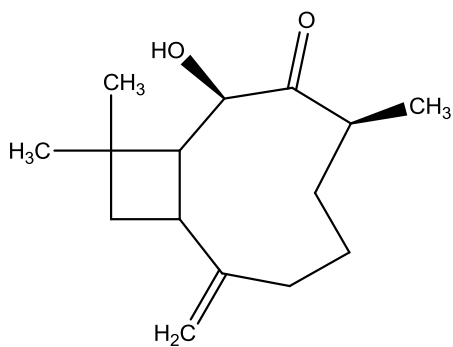
compuesto conocido zerumbona, los otros dos fueron nuevos y nombrados buddledonas A y B.^{21,22}



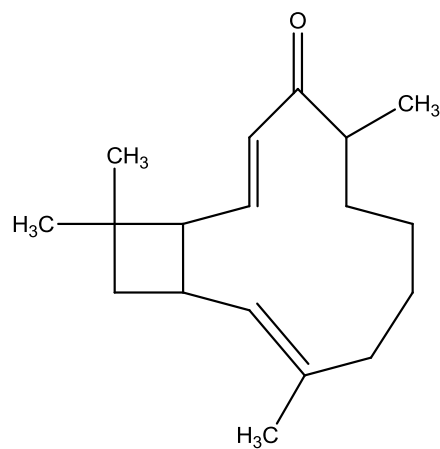
R
 Buddledina A H
 Buddledina B OH
 Buddledina C COOCH₃



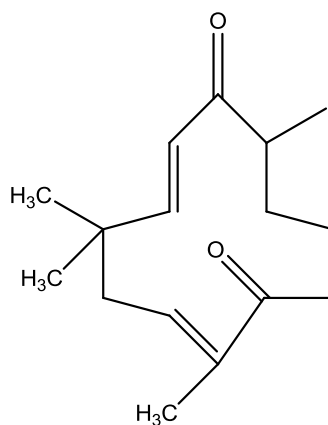
Buddledina D



Dehidrobuddledina



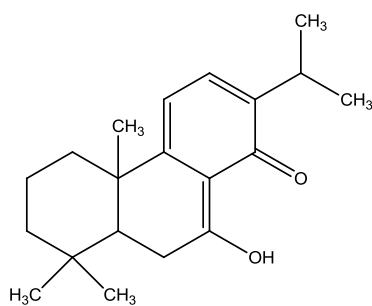
Zerumbona



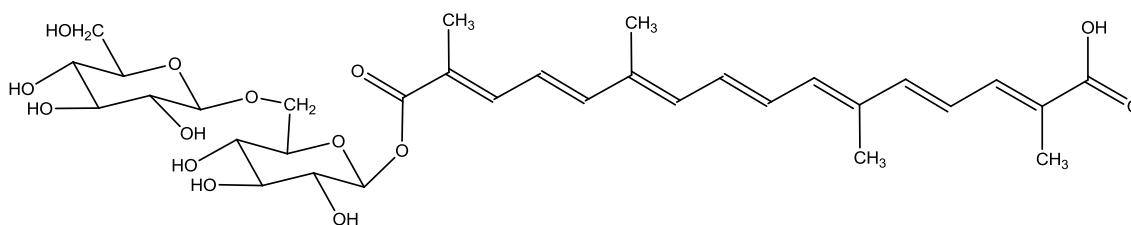
Buddledona A

Diterpenos

Los diterpenos reportados como el “abietano” llamado buddlejona que fue detectado en *B. albiflora* Hemsl. De las flores de *B. officinalis* Maxim., se han reportado cantidades apreciables de otros tipos de diterpenos, como el éster acíclico crocetina-gentiobiosa, su derivado diesterificado también ha sido reportado y se utiliza como colorante amarillo en alimentos. Estos ésteres también se encuentran en las flores de otras especies tales como *Crocus sp.* y presumiblemente, son los principales compuestos responsable del intenso color amarillo que se encuentran en la base de la superficie interior del tubo corolar en las flores de las especies *Buddleja*.^{21,22}



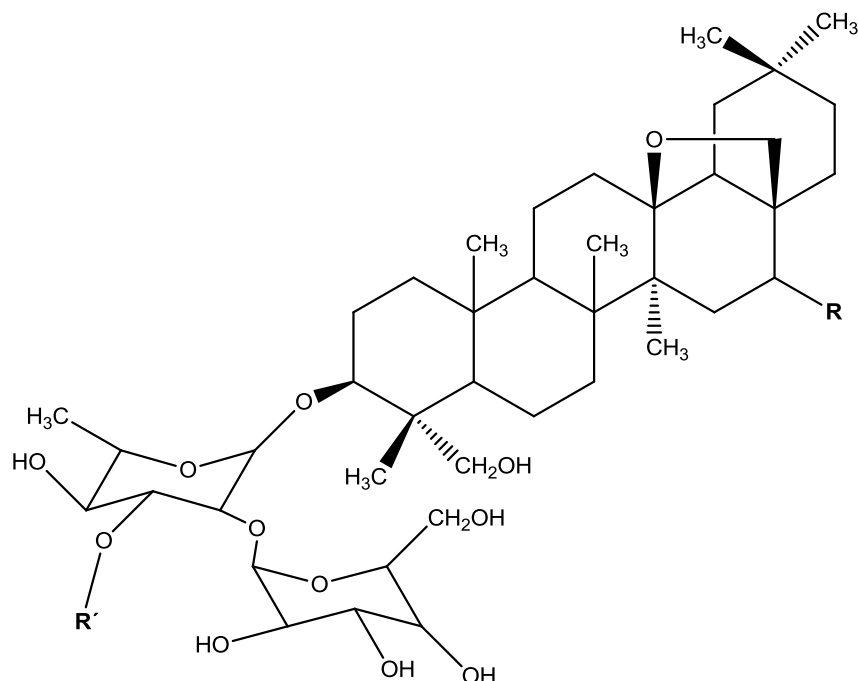
Buddlejona



Crocetina-gentiobiosa

Triterpenos

Durante algún tiempo se sospechó de la presencia de saponinas en las hojas de especies de *Buddleja*, debido al uso de las hojas para la limpieza, lavado y como venenos para peces. Los primeros cuatro compuestos glucósidos de saikosaponina reportados, se aislaron de las partes aéreas de *B. japonica* Hemsl., estos fueron nombrados: buddlejasaponinas I-IV, Buddlejasaponina I, que también se ha aislado de las hojas de *B. madagascariensis* Lam., y dos compuestos relacionados llamados mimengosido A y mimengosido B aislados de las flores de *B. officinalis* Maxim., conocido como 'Mi Meng Hua' en la Medicina Tradicional China.²¹



	R	R'
Saikosaponina A	OH	H
Buddlejasaponina I	OH	Ramnosa (1-4) de glucosa
Buddlejasaponina II	OH	Xilosa (1-4) de glucosa
Buddlejasaponina III	OH	Xilosa
Buddlejasaponina IV	OH	Glucosa
Mimengosido A	H	Ramnosa (1-4) de glucosa

2.4.2. Estudios fitoquímicos reportados del género *Buddleja*

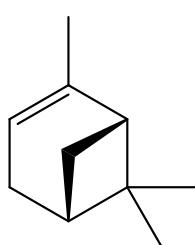
Buddleja thyrsoidea Lam.

La especie *Buddleja thyrsoidea* Lam., de Argentina, Brasil, Uruguay y Paraguay es popularmente conocida como “barbasco” y “cambarazinho”; en el tamizaje fitoquímico del aceite esencial se reportaron 12 componentes que representan el 91.4% de su composición total. Los componentes principales. Germacreno D (27.16%), 1,10-di-*epi*-Cubenol (13.37%), Cadinol (12.95%), Biciclogermacreno (9.00%), Globulol (8.59%), y *E* cariofileno (5.26%).^{23,24}

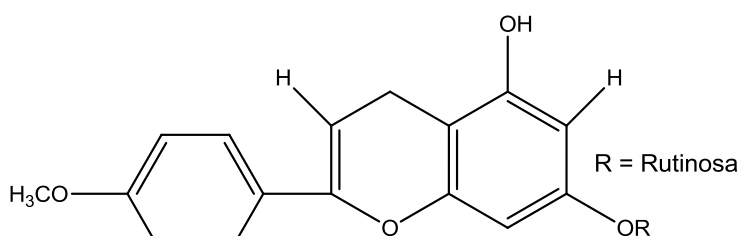
Buddleja cordata

En Oaxaca popularmente lo conocen como “tepozán” y “zompance”, son principalmente usadas en infusión para desinflamar zonas afectadas en los animales.

Los estudios fitoquímicos describen que entre los componentes aislados de *B. cordata* se encuentran los fenilpropanoides aislados principalmente de partes aéreas tales como el verbascósido o acteósido, los ácidos hidroxicinámicos: *p*-cumárico, cafeico, ferúlico, y el flavonoide linarina. Las propiedades terapéuticas de la planta se han asociado principalmente con los compuestos del tipo fenilpropanoide por presentar una o varias de las siguientes actividades: parasitocida, antimicrobiana, analgésica, antiviral, antiproliferativa o citotóxica, antihipertensiva, antioxidante, antipirética y anti-inflamatoria. También se han identificado metabolitos del tipo terpenoide como el sesquiterpeno buddledina A, con actividad plaguicida y antifúngica y el iridoide aucubina con actividad antibacterial y antioxidante.^{25,26}



α -pineno

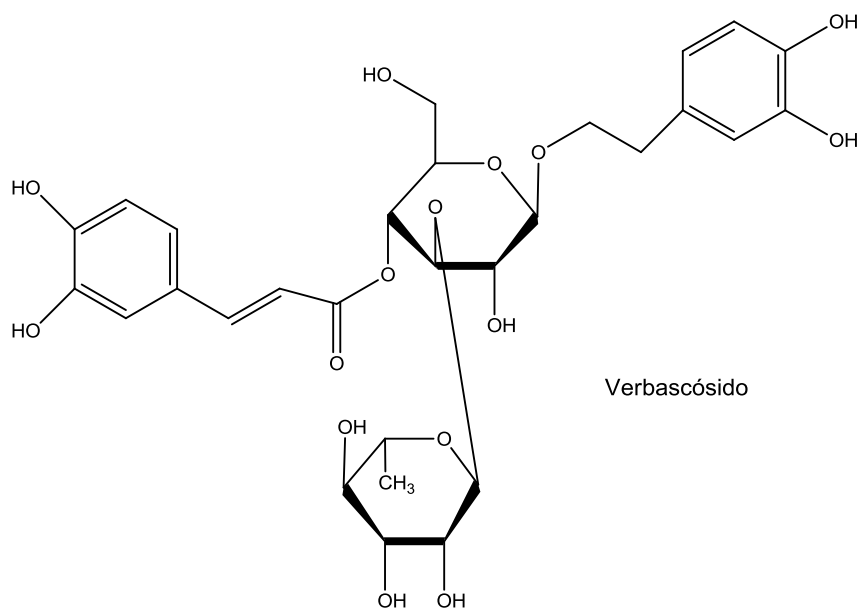


Linarina

Buddleja perfoliata y *Buddleja scordioides*

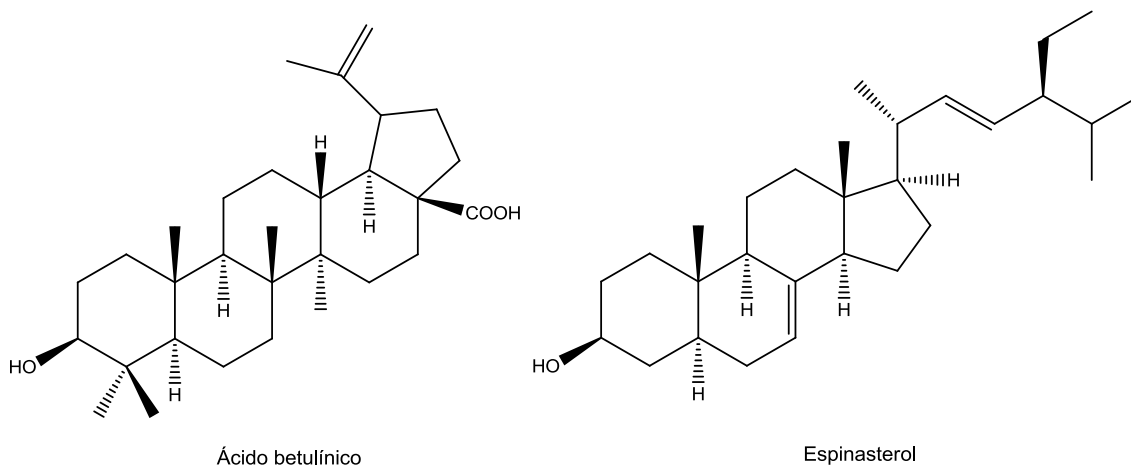
La *Buddleja perfoliata* conocida popularmente como “salvia de bolita” se emplea como diurético, para desinfectar heridas y contra infecciones gastrointestinales y la *B. scordioides* conocida como “escobilla” y utilizada artesanalmente para fabricar escobas, además la cocción de sus hojas sirve para la digestión. Hay estudios donde se han reportado compuestos comunes como la linarina y el verbascósido.²⁷

En cuanto a *B. scordioides* encontramos compuestos como el manitol, metilcatalpol y siringinina, este último se reporta por primera vez en el género *Buddleja*, además de que se encontraron saponinas derivadas del oleanano, uno de estos derivados es la buddlejasaponina I, también se ha descrito el α -pineno en un 96% del aceite esencial de *B. perfoliata*.²⁷



Buddleja saligna y *Buddleja davidii*

La Buddleja saligna, es una planta medicinal de Sudáfrica y se ha informado de su uso como antidiabético y antimalárico. Se han descrito tres terpenoides conocidos el ácido betulínico, betulona y espinasterol. Los estudios fitoquímicos reportados de *B. davidii* en relación con la mayoría de las otras especies, encontramos la linarina aislada de las flores junto con la acetina y su aglicona libre y su glicósido iridoide aucubina; y a partir de las hojas se han reportado los iridoide relacionados catalpol y metilcatalpol; además de las cuatro buddledinas A-D sesquiterpénicas. El reporte de Houghton informó la presencia de coniferaldehído y compuestos de tipo lignanos en el tallo de esta especie.^{22,28}

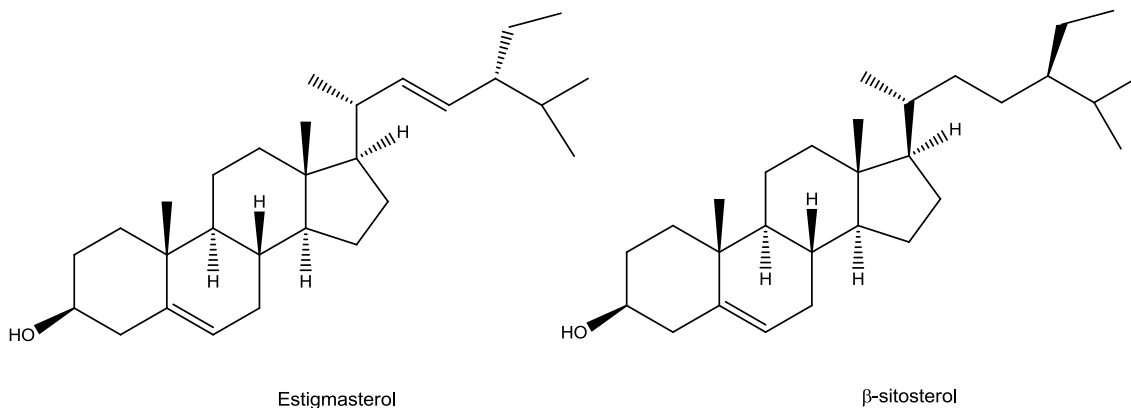


Buddleja salviifolia y *B. madagascarensis* Lam.

La *Buddleja salviifolia*, conocida como “madero sabio sudafricano”, es un arbusto usado por varias tribus en África del Sur donde utilizan las hojas para el tratamiento de infecciones oculares y enfermedades neurodegenerativas. Hay estudios donde aislaron y caracterizaron los productos naturales acteosida y quercetina, las cuales exhiben un amplio espectro de actividad antibacteriana.²⁹

La *B. madagascarensis* Lam., es un arbusto o enredadera de Madagascar cultivada y naturalizada en muchas regiones tropicales y subtropicales. Esta planta en Madagascar es conocida como “seua” o “seuafotsy”.³⁰

En Madagascar la planta se utiliza para tratar la disentería, se ha empleado como un sustituto de jabón y como un remedio para el asma, la tos y la bronquitis; en Uruguay las hojas frescas se utilizan en infusión para tratar afecciones bronquiales. Debray en 1971 detectó en las hojas y corteza de la raíz de esta especie alcaloides y saponinas; y Kapoor, en 1981 aisló de las hojas una mezcla de *n*-alcanos y triterterpenos como β -sitosterol, estigmasterol, y β -amirina, otros compuestos que se han descrito actualmente son la hesperetina y el 7-O-glucósido diosmetina.^{22,30}



Buddleja globosa

La *Buddleja globosa* Hope es un arbusto de 1.5 a 3 metros de altura con ramas jóvenes pubescentes amarillentas, conocida vulgarmente como “matico”, “palquil” o “pañil”, en estudios previos se identificaron como componentes mayoritarios el feniletanoide verbascósido y el flavanoide 7-O-glucósido de luteolina.³¹

Otros estudios mencionan su actividad antifúngica, donde cuatro compuestos conocidos fueron responsables de dicha actividad, el diterpeno buddlejona, el bisditerpeno maytenona y los dos sesquiterpenos buddledina A y la buddledina B.³²

De acuerdo con la literatura las especies del género *Buddleja* son una fuente abundante de sustancias terpenoides, por lo que resulta interesante conocer los componentes terpénicos presentes en la *Buddleja* conocida como “peralvillo” del municipio de Zitácuaro, ubicado en la región oriente del Estado de Michoacán a través de su aislamiento e identificación por métodos físicos y espectroscópicos.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Realizar el aislamiento e identificación de terpenos del género *Buddleja* (peralvillo) del oriente del Estado de Michoacán.

3.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Obtener los extractos de hexano, cloruro de metileno, acetato de etilo y metanol de las diferentes partes de *Buddleja sp* (raíz, tallo, hoja y flor).
- Separación cromatográfica de los componentes de los extractos obtenidos.
- Caracterizar mediante métodos físicos y espectroscópicos los compuestos obtenidos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La *Buddleja sp* fue colectada en el oriente de Michoacán en el municipio de Zitácuaro, es conocida tradicionalmente como “piralvillo”, “Hierba del tapón” y “Peralvillo”; en la medicina tradicional se utilizan las hojas en infusión para enfermedades gastrointestinales además de utilizarse para el herpes labial. Esta planta crece en climas templados y florece principalmente en verano.



Figura 13. Cerro Cacique de la H. Zitácuaro, Michoacán.



Figura 14. *Buddleja sp* mejor conocida como “peralvillo”.

La *Buddleja* es conocida popularmente como “peralvillo”, y fue separada en cada una de sus partes, éstas se secaron a la sombra, después la raíz fue sometida a reflujo; mientras que los tallos, las hojas y las flores se sometieron a maceración, con disolventes en orden ascendente de polaridad (hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol), se filtraron y se llevaron a sequedad con ayuda del rotavapor. Cada uno de los extractos se resuspendieron en metanol para precipitar las grasas, la metodología se puede observar en la Figura 15.

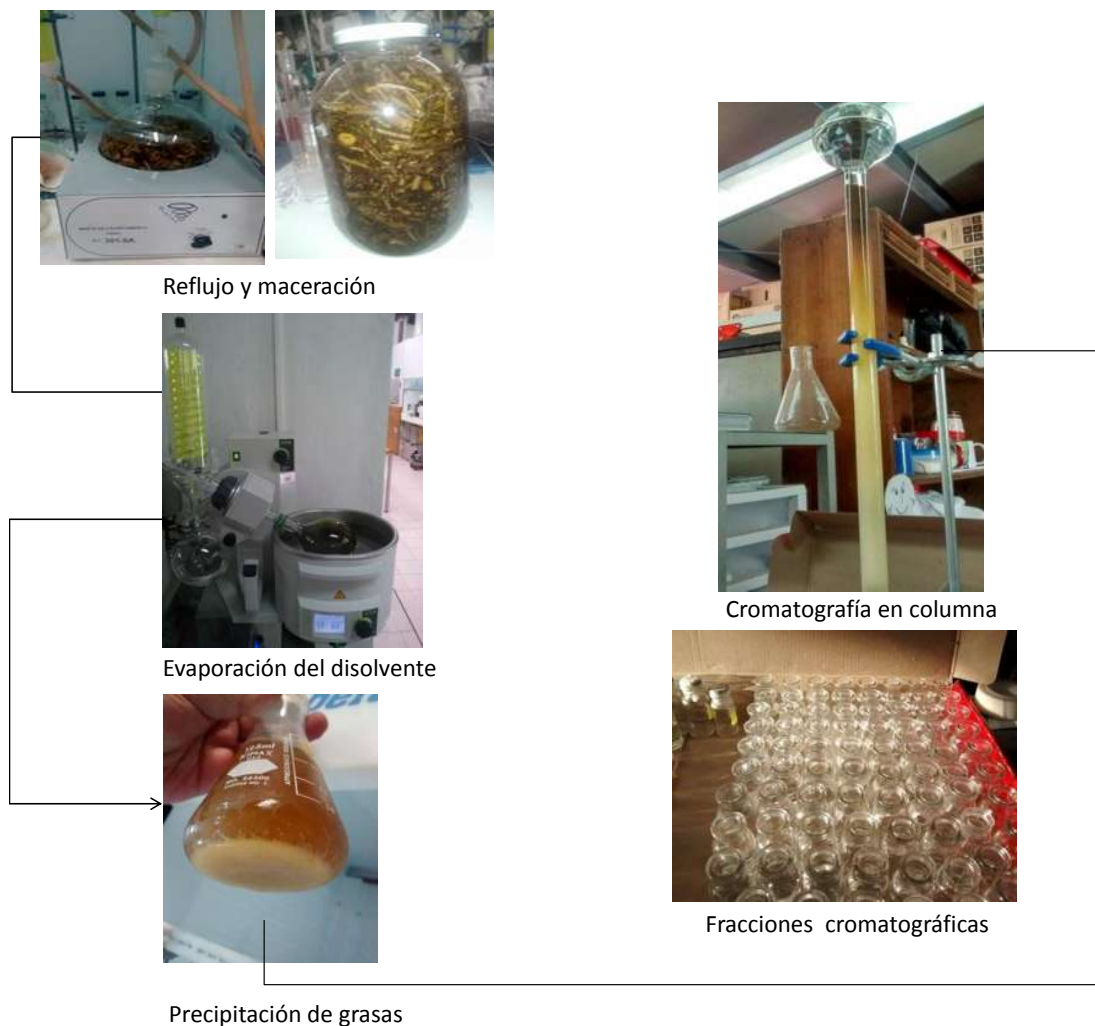


Figura 15. Metodología de la planta del género *Buddleja* (Peralvillo).

Tabla 5. Rendimientos obtenidos de los extractos, expresado en gramos.

Solvente		Raíz (1870g)	Tallo (1650 g)	Hoja (760 g)	Flor (30 g)
Hexano	I	1.2	4.0	15	0.870
	II	0.646	3.5	3.2	0.474
	II	0.474	1.7	2.2	0.484
CH ₂ Cl ₂	I	4.0	8.0	6.4	0.978
	II	3.348	2.1	2.2	0.560
	III	0.522	1.3	1.9	0.487
AcOEt	I	1.9	3.2	4.2	0.862
	II	1.2	2.2	2.8	0.463
	III	0.600	1.9	2.1	0.120
Metanol	I	28	3.4	4.4	2.5
	II	15	1.6	2.5	1.3
	III	11	1.3	1.8	1.2

El análisis de los extractos hexánicos de las diferentes partes de la planta por medio de RMN de ¹H nos permitió observar que en cada una de las muestras la presencia de cadenas hidrocarbonadas de ácidos grasos, y posteriormente fueron enviados a cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa, identificándose por comparación de sus patrones de fragmentación con la base de datos NIST 2011.

Tabla 6. Compuestos en mayor abundancia en el precipitado metanólico de los extractos en crudo de cada una de las partes de *Buddleja sp.*

Nombre	RT(min)	Calidad ^a	Flor	Hoja	Tallo	Raíz
Ácido tetradecanoico	12.79	84		●	●	
Ácido hexadecanoico	14.43	98	●	●	●	●
Ácido 9,12-octadecadienoico	16.73	84		●		
Ácido 9, 12, 15-octadecatrienoico	16.86	88		●		
Triglicérido del ácido octanoico	26.73	96				●
Octacosano	25.82	85	●			
Tetracosano	19.90	86	●			

^aCalidad correspondiente a los datos NIST 2011.

Las condiciones en que se sometieron cada una de las muestras de los extractos en crudo a cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa. Fueron con una fuente de ionización de 200°C por impacto electrónico a 70 eV por 30 minutos, iniciando con una temperatura inicial de 50°C.

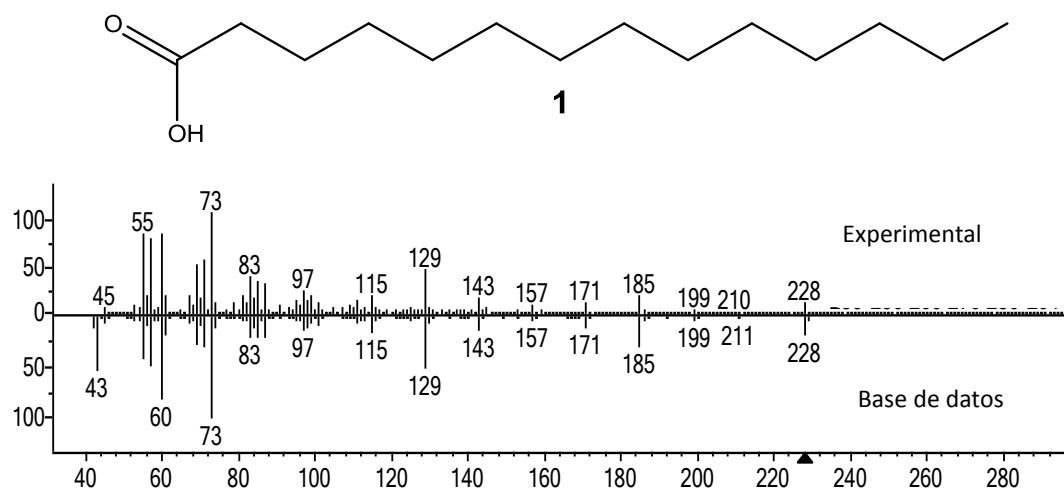


Figura 16. Espectro de masa del Ácido tetradecanoico (1).

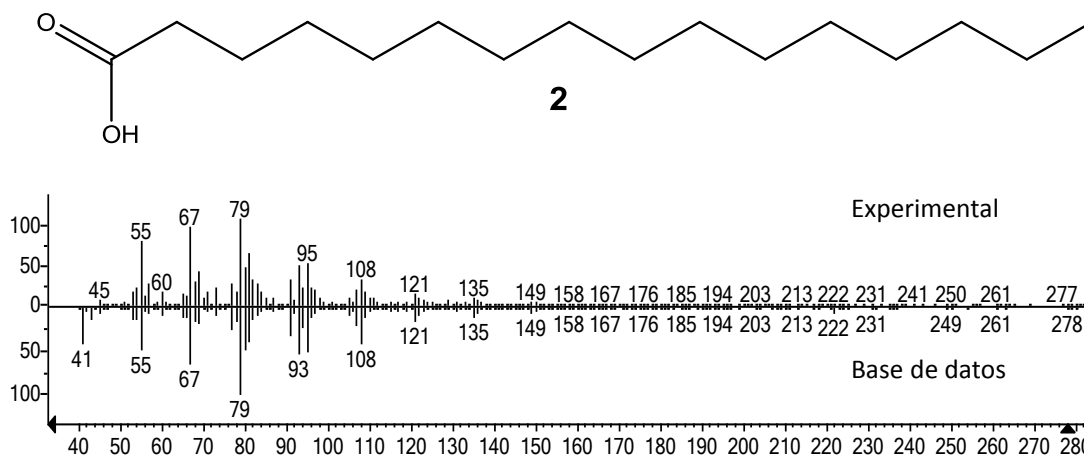


Figura 17. Espectro de masa del Ácido hexadecanoico (2).

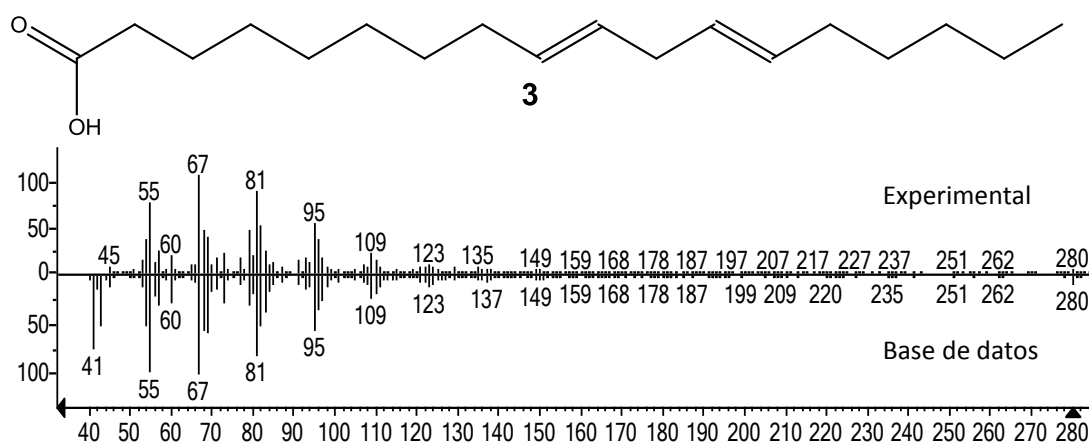


Figura 18. Espectro de masa del Ácido 9,12-octadecadienoico (3).

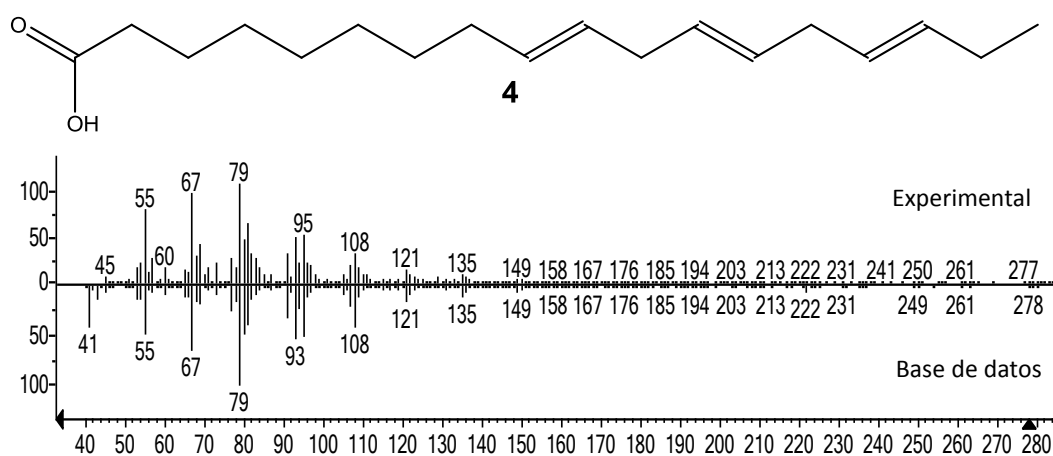


Figura 19. Espectro de masa del Ácido 9,12,15-octadecatrienoico (4).

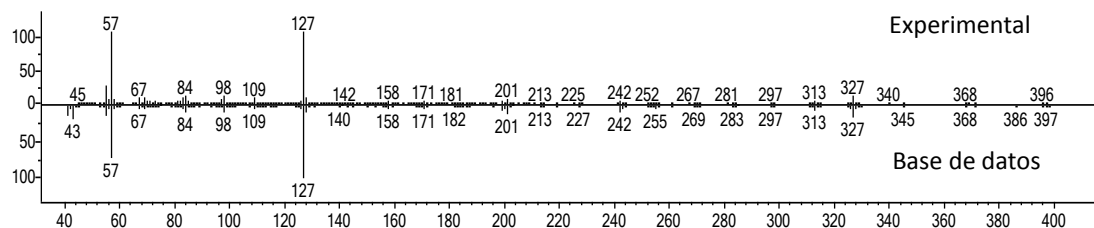
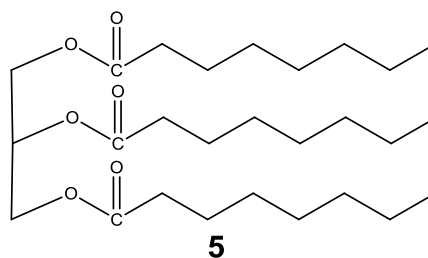


Figura 20. Espectro de masa del Triglicérido del ácido octanoico (**5**).

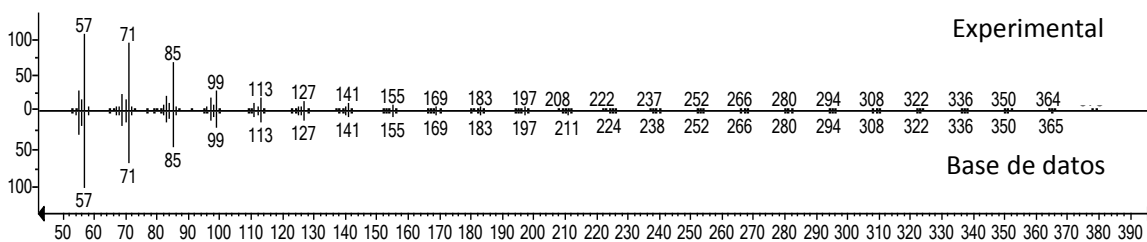
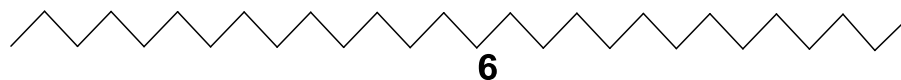


Figura 21. Espectro de masa del Octacosano (**6**).

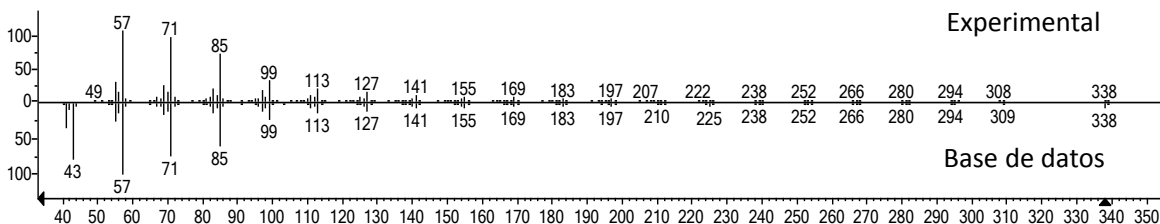


Figura 22. Espectro de masa del Tetracosano (**7**).

Al realizar el análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa se identificaron los sesquiterpenos 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona (**8**) (hexahidrofarnesil acetona) y el dehidro-aromadendrano (**9**).

Tabla 7. Sesquiterpenos representativos de *Buddleja sp.*

Nombre	RT(min)	Calidad ^a	Flor	Hoja	Tallo	Raíz
6,10,14-trimetil-2-pentadecanona	13.34	90	●	●	●	
dehidro-aromadendrano	11.44	82				●



Figura 23. Espectro de masa de la 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona.

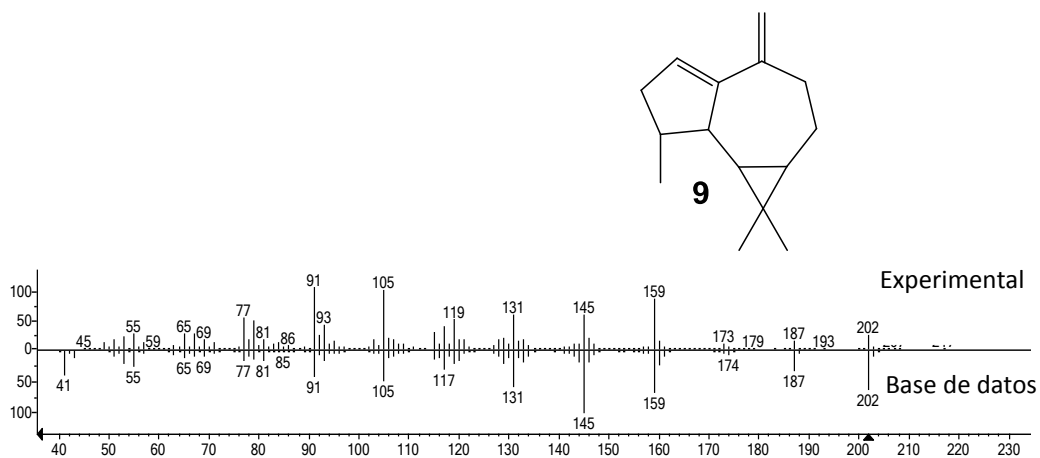


Figura 24. Espectro de masa del dehidro-aromadendrano.

Primeramente se realizó el análisis del primer extracto hexánico de la flor (30 g) obteniéndose 0.870 g de un aceite denso en 2.9% de rendimiento respecto al peso inicial de las flores. Posteriormente se determinó su espectro de RMN de ^1H observándose las señales de los componentes mayoritarios, se vieron señales en la región de los aromáticos y de los hidrógenos bases de alcohol (Figura 26). El extracto fue sometido a cromatografía en columna usando como fase móvil Hexano-AcOEt en orden ascendente de polaridad, de las fracciones gruesas eluídas con Hexano-AcOEt 8:2 se obtuvieron 30 mg de un sólido blanco.

Este residuo se re-cromatografió en columna, empleando como eluentes mezclas de Hexano-AcOEt en orden ascendente de polaridad. De las fracciones eluídas con Hexano-AcOEt 93:7 se obtuvieron 10.6 mg (ren 1.21%) como agujas incoloras (Figura 25.); correspondiente al β -sitosterol (**10**) con un punto de fusión de 142 °C. En su espectro de RMN de ^1H (Figura 27), mostró en 5.35 ppm una señal doble con $J = 5.40$ Hz que se asignó al protón vinílico H-6; en 3.52 ppm se observó una señal múltiple debida al metileno base de alcohol H-3; además de las señales simples de los metilos presentes en la molécula, Tabla 8.



Figura 25. Cristales del β -sitosterol.

Tabla 8. Desplazamientos (ppm) para las señales simples de los metilos.

CH_3	ppm
19	0.92
24	0.84
26	0.82
27	0.80
28	0.68
29	1.01

En el espectro de RMN de ^{13}C (Figura 28) se distinguieron 29 señales características de un triterpeno; en 140.7 ppm y 121.7 ppm se observaron las señales correspondientes a un enlace doble en las posiciones del carbono vinílico C-6 y C-5; en 71.8 ppm se vio el carbono base de alcohol y entre 56.01 y 11.8 ppm se observaron el resto de las señales características del triterpeno.^{10,33}

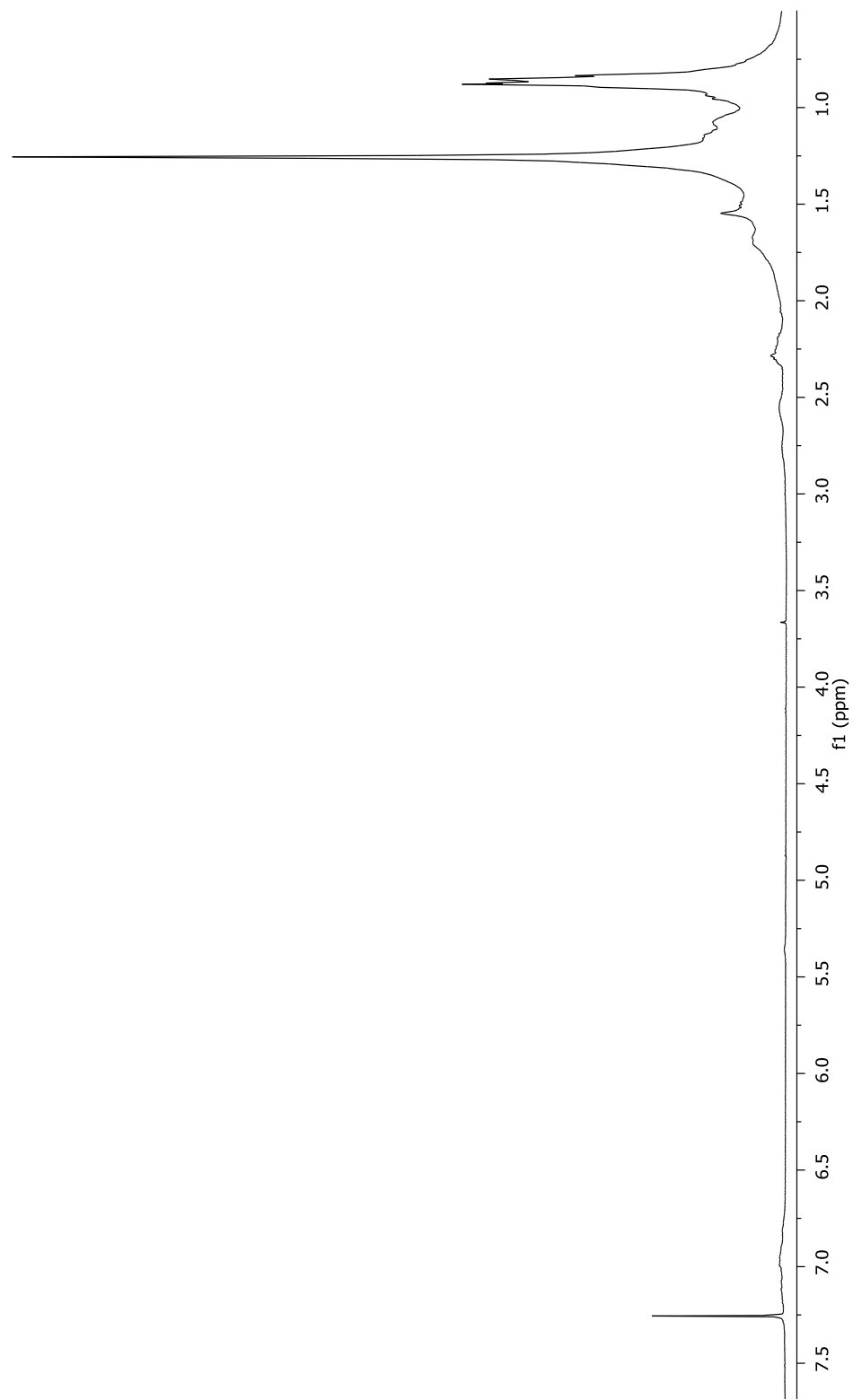


Figura 26. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del extracto en crudo de flores de *Buddleja* sp.

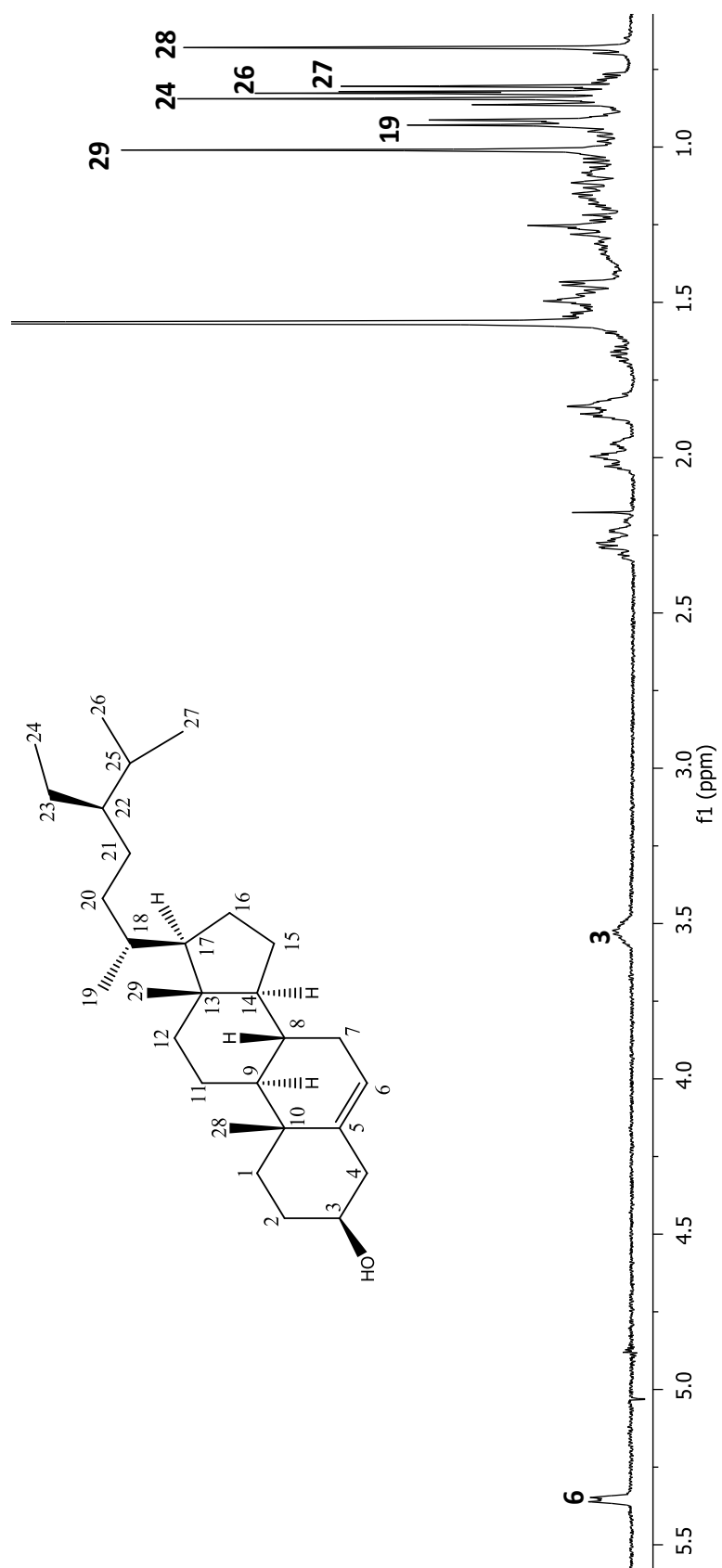


Figura 27. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del β -sitosterol (**10**) aislado de flores de *Buddleja* sp.

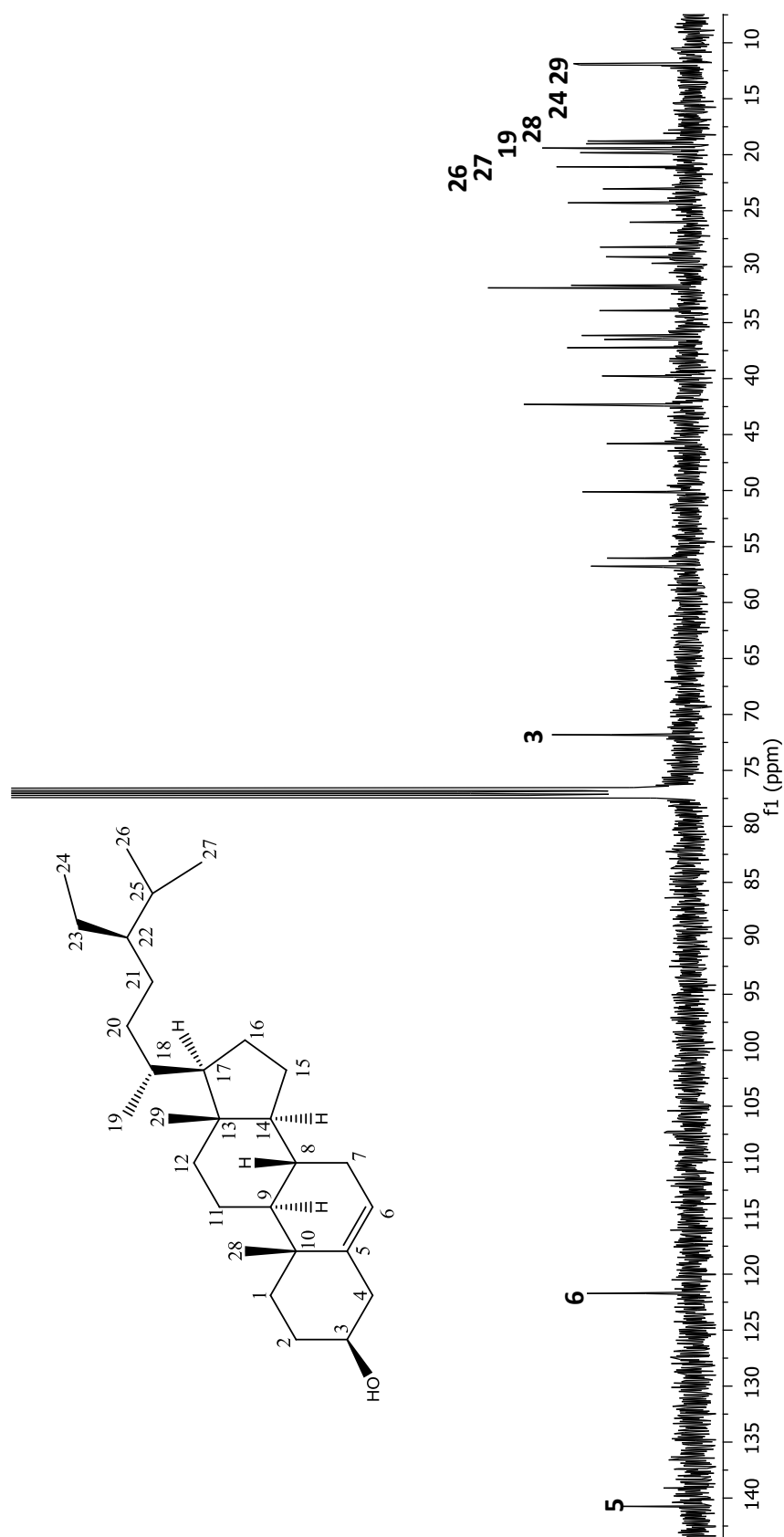


Figura 28. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 del β -sitosterol (**10**) aislado de flores de *Buddleja* sp.

Enseguida, el extracto hexánico crudo de tallos (1650 g) fue analizado por Resonancia Magnética Nuclear de ^1H , observándose la naturaleza y abundancia de los componentes (Figura 29), de dicho extracto se tomó una muestra de 4g (0.24%) fue purificado por cromatografía en columna colectándose fracciones de 15 ml. En las fracciones eluidas con Hexano-AcOEt 93:7 se obtuvieron 22 mg de agujas incoloras (ren 0.55%) que correspondieron al β -sitosterol (**10**) (Figura 30). Debido a lo anterior, al asignar las señales, coincidieron con el espectro de hidrógeno de RMN del β -sitosterol extraído de las flores, Figura 27.

En las fracciones eluidas con Hexano-AcOEt 9:1 se obtuvieron 4.3 mg (ren 0.1%) de cristales que correspondieron a estigmasterol (**11**). En su espectro de RMN de ^1H (Figura 31) se observó en 5.36 ppm se observó una señal doble que se asignó al protón vinílico H-6; en 5.01 ppm y 5.15 ppm se mostraron señales múltiples que se asignaron a los protones vinílicos de las posiciones H-20 y H-21 respectivamente así como el metileno base de alcohol H-3 en 3.53 ppm. Cabe mencionar que del tallo se obtuvo la mayor cantidad de β -sitosterol.

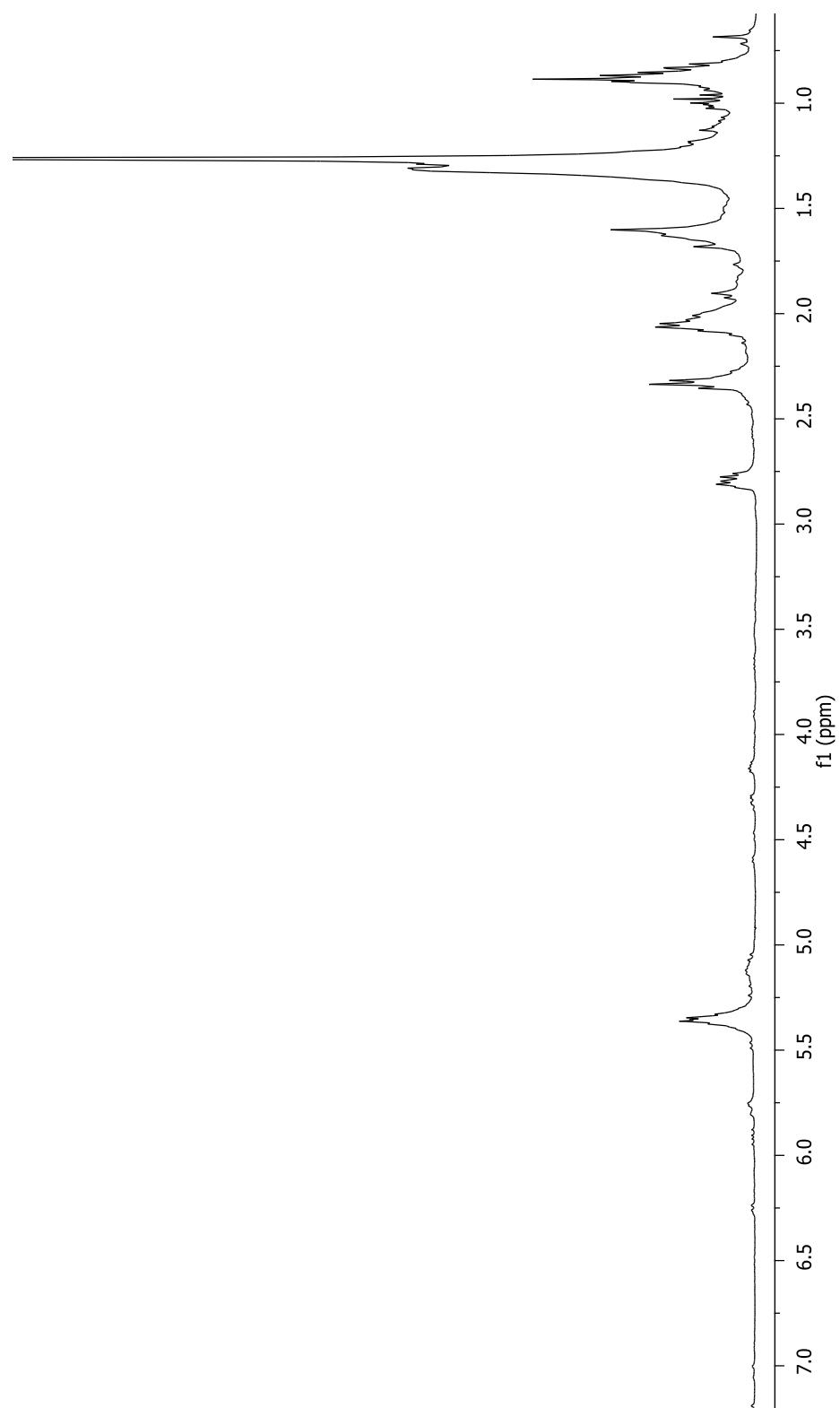


Figura 29. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del extracto en crudo de tallos de *Buddleja* sp.

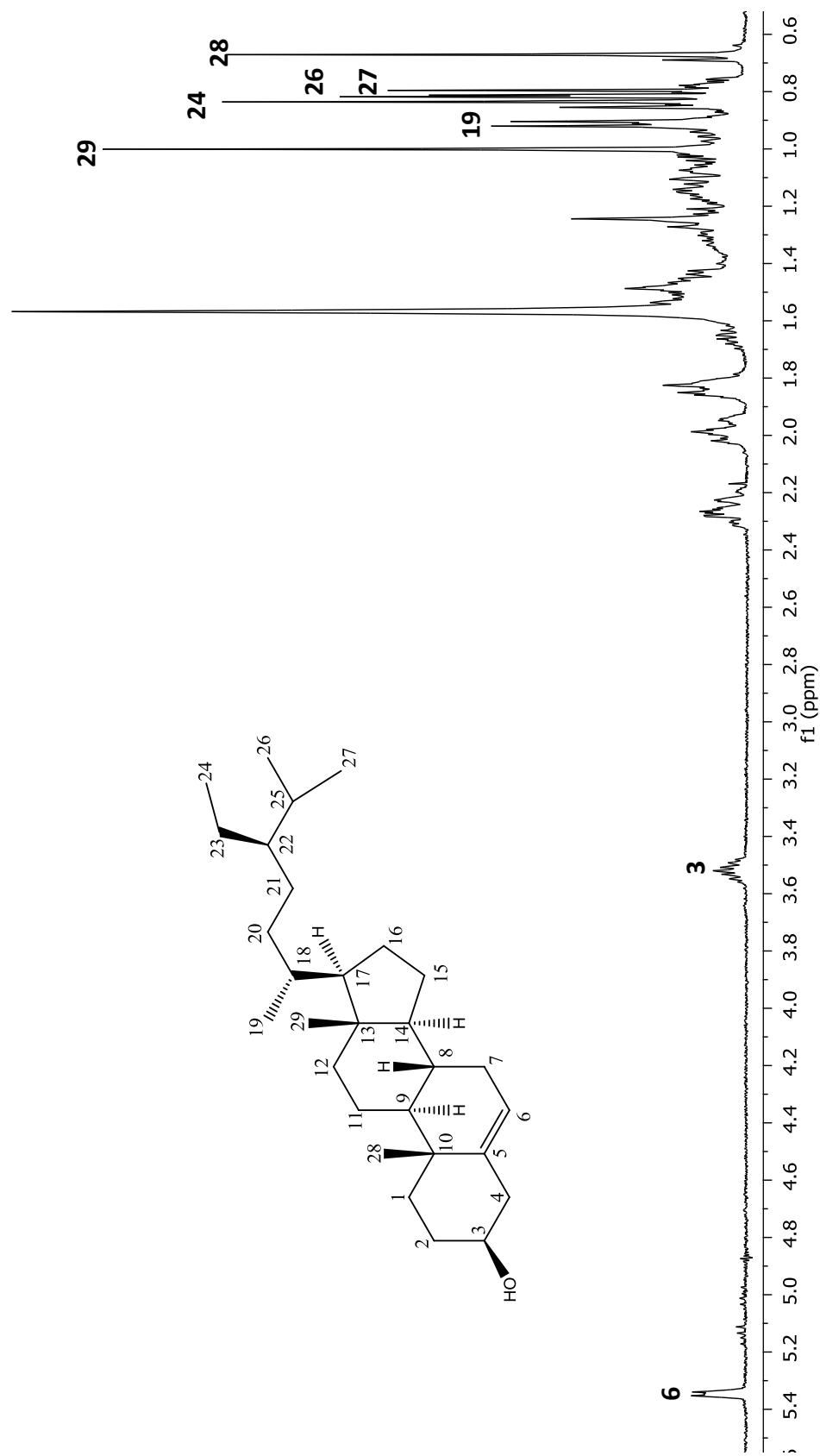


Figura 30. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del β -sitosterol (**10**) aislado de tallos de *Buddleja* sp.

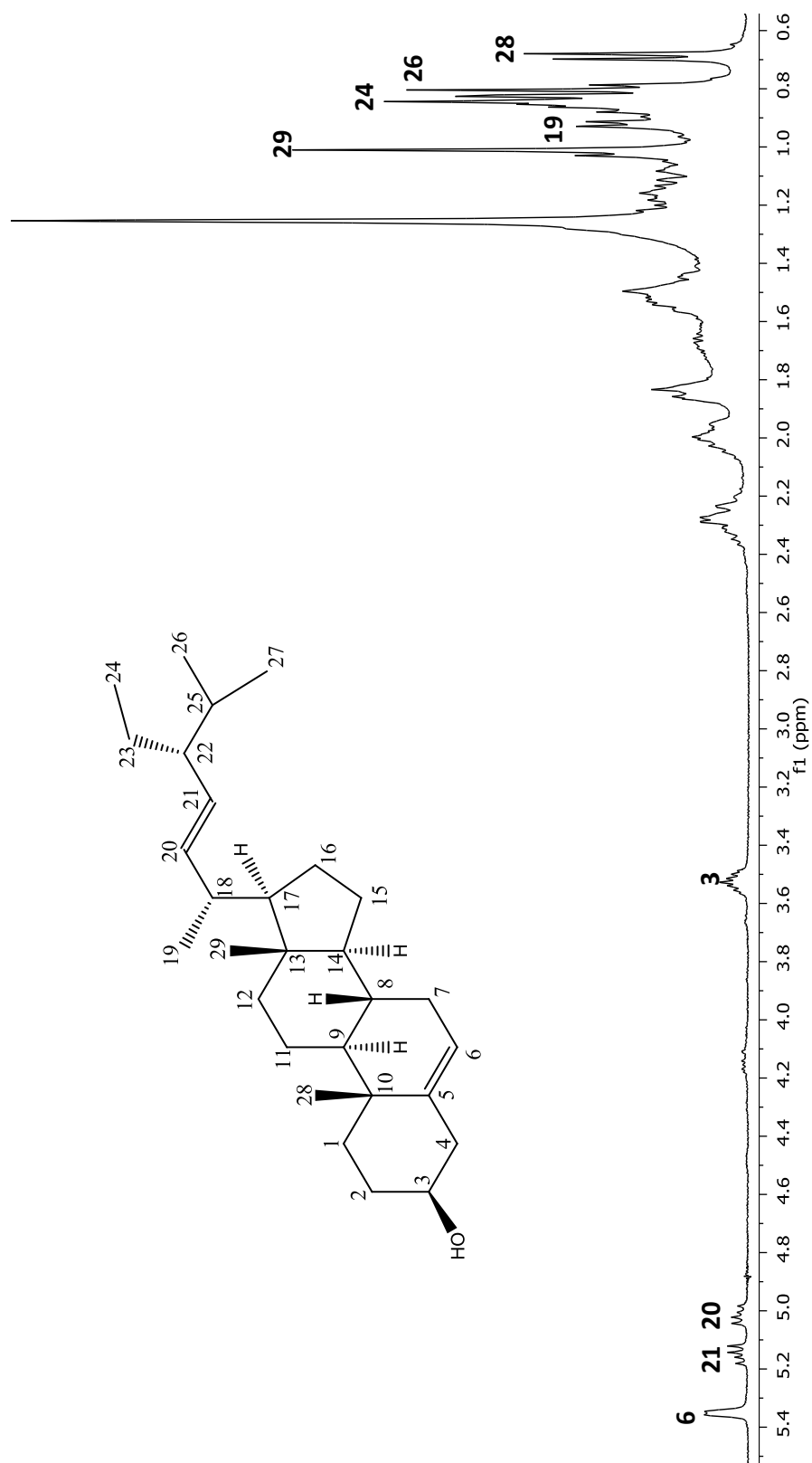


Figura 31. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del estigmasterol (**11**) aislado de tallos de *Buddleja* sp.

Así mismo se realizó el análisis del extracto hexánico crudo de raíz (1870 g) a partir de una muestra de 2.32 g (0.12%) del peso inicial. Mediante RMN de ^1H (Figura 32), se observaron señales en la región de los aromáticos y en la región bases de alcoholes. El extracto hexánico se separó por cromatografía en columna usando mezclas de disolventes Hexano-AcOEt en orden ascendente de polaridad, y se colectaron fracciones gruesas con Hexano-AcOEt 49:1 obteniéndose 44 mg (1.89%) de una mezcla de compuestos, la cual se recromatografió en columna usando como mezcla de disolventes Hexano- CH_2Cl_2 65:35 para la separación de los compuestos mayoritarios; debido a esto se obtuvo un rendimiento menor, donde se obtuvieron 35 mg de la mezcla de compuestos sin apreciar un cambio significativo; en el espectro, de RMN de ^1H (Figura 33) se observó en 3.52 ppm una señal múltiple para protón base de alcohol, así como una señal doble en 5.35 ppm para un protón vinílico concluyendo que podría tratarse de un triterpeno.

Se procedió a enviar la muestra a cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa para la identificación de los componentes, Figura 34.

Una vez más se identificaron los componentes por comparación con datos NIST 2011 de acuerdo con sus patrones de fragmentación. Al realizar el análisis se estableció como constituyentes más abundantes y por su calidad al campesterol (**15**) y al estigmasterol (**11**).



Figura 34. Equipo de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa.

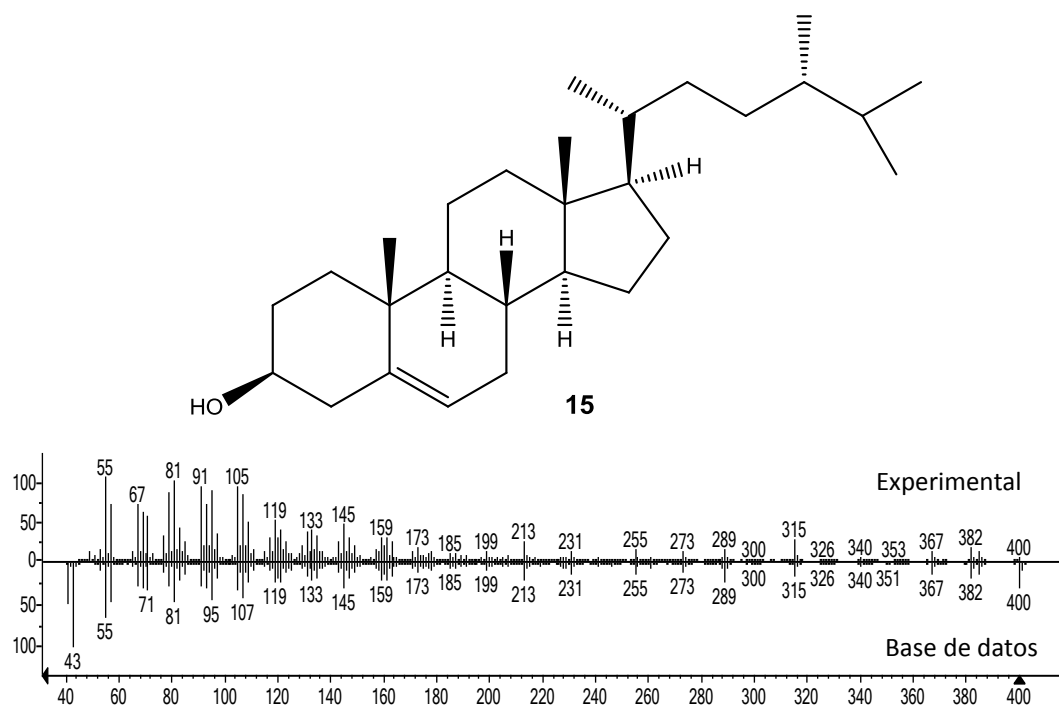


Figura 35. Espectro de masa del Campesterol (15) con un 89% de calidad.

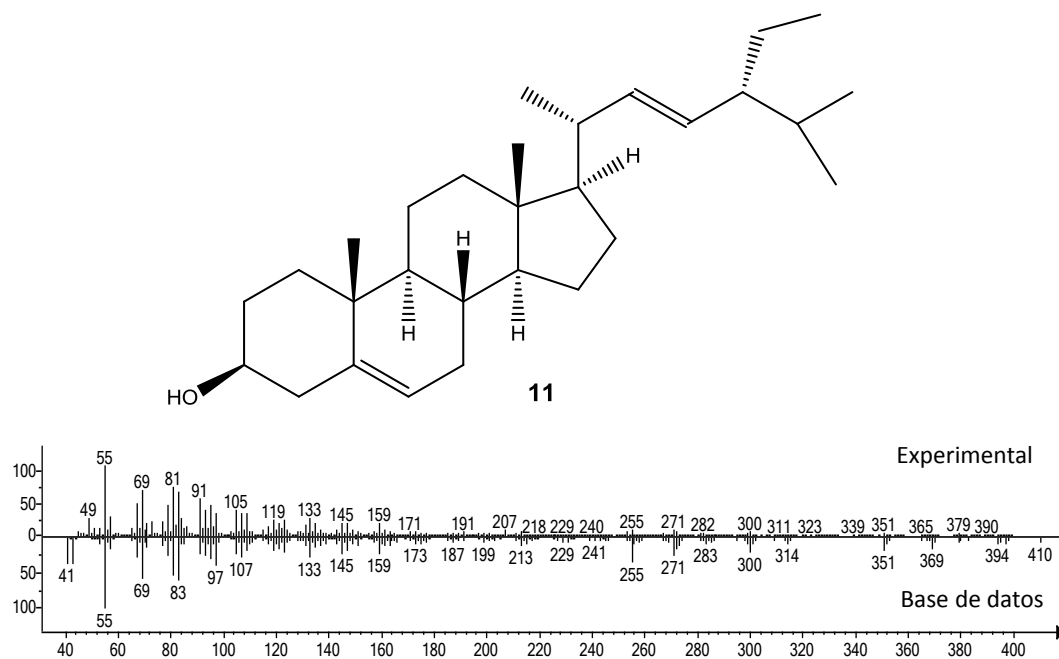


Figura 36. Espectro de masa del estigmasterol (11) con un 70% de calidad.

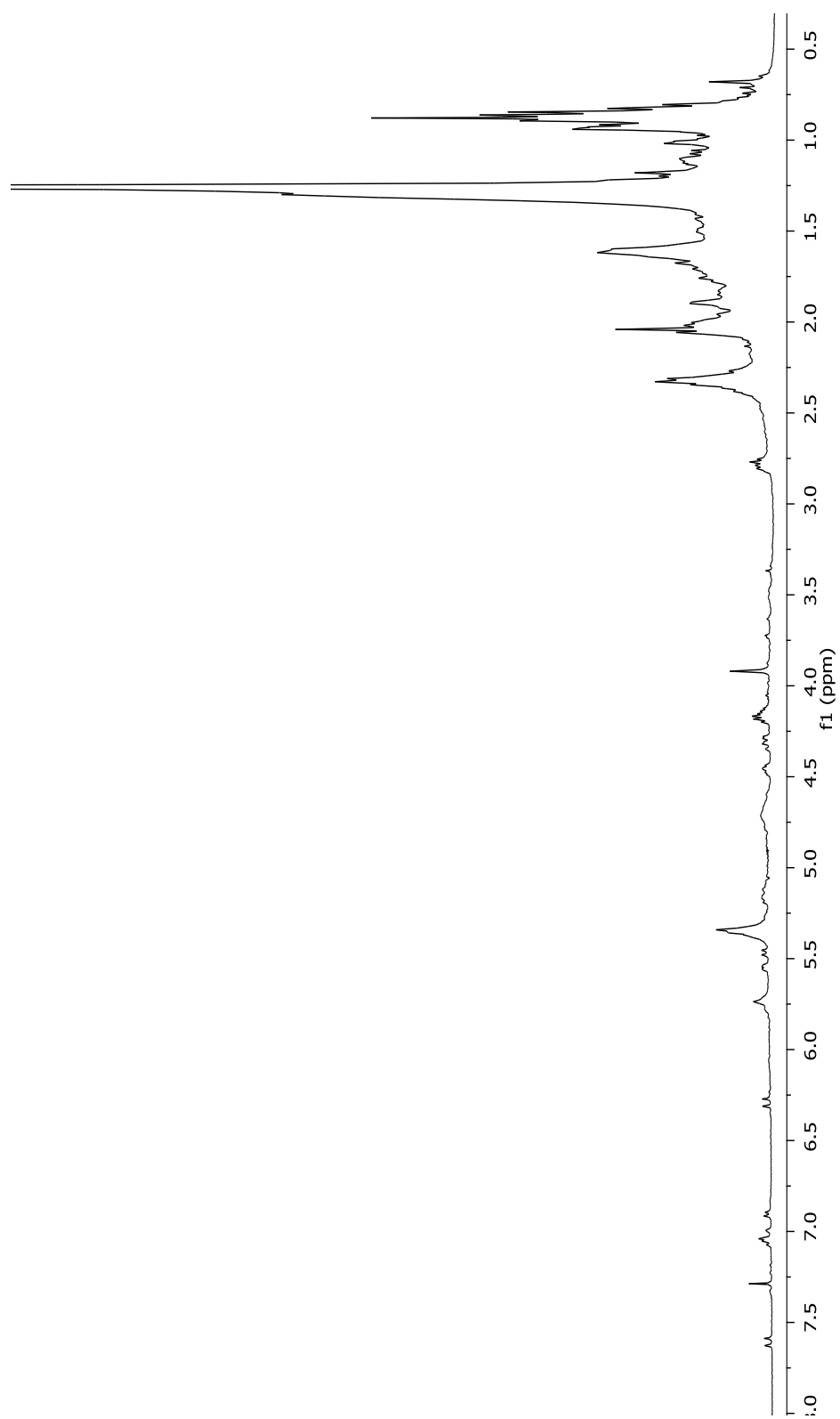


Figura 32. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del extracto en crudo de raíz de *Buddleja* sp.

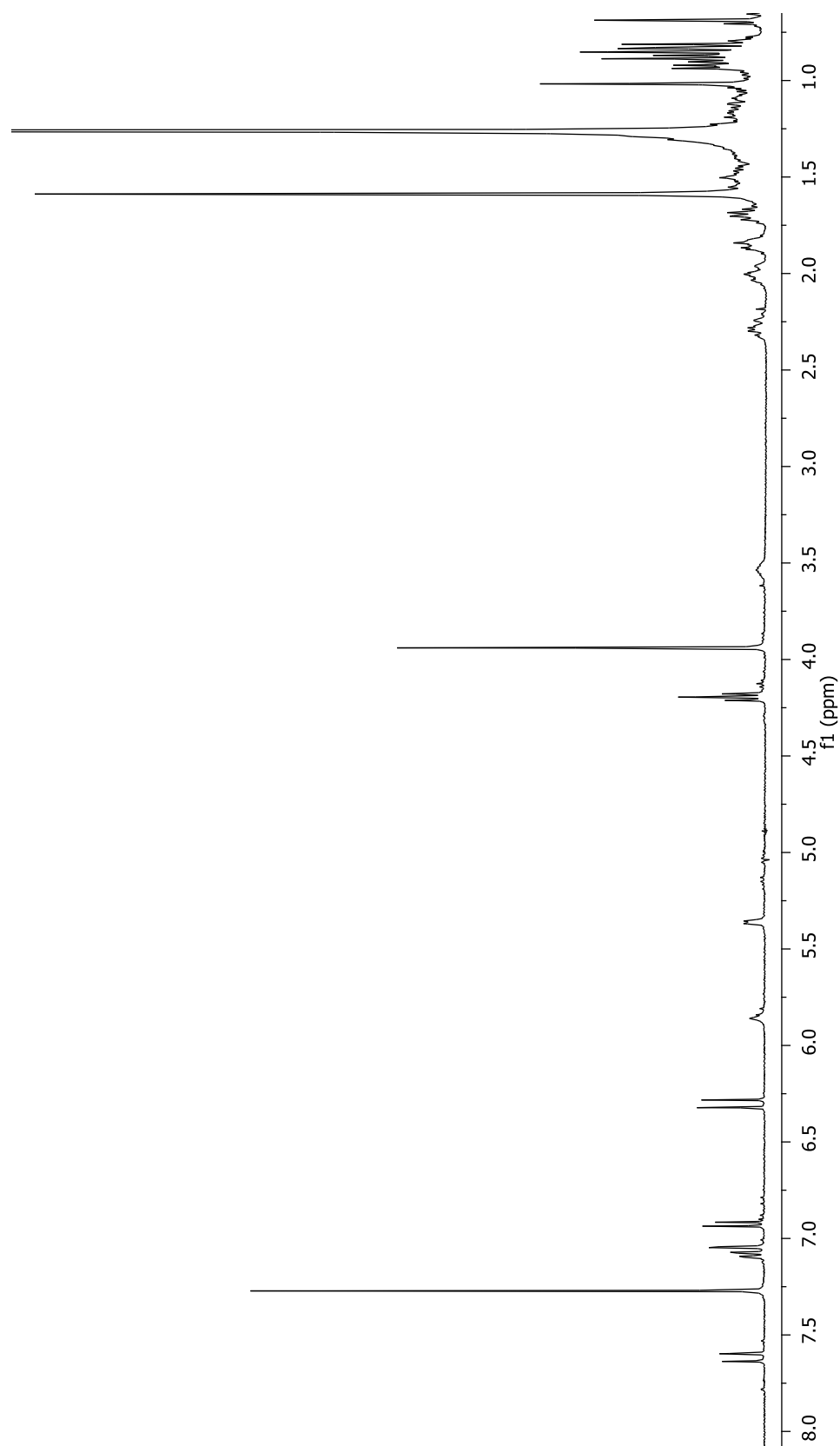


Figura 33. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 de la mezcla de compuestos de raíz de *Buddleja* sp.

Acetilación del β -sitosterol

Para obtener más evidencias sobre este compuesto, se preparó su derivado acetilado del β -sitosterol (**12**) disolviendo 3.1 mg de cristales de β -sitosterol en piridina/anhídrido acético durante 8 h en baño de vapor, (Figura 37). Transcurrido este tiempo se obtuvieron 3.5 mg del crudo de reacción, el cual se analizó mediante RMN de ^1H (Figura 38) se observó en 2.01 ppm la señal típica del metilo de acetilo, además se apreció el desplazamiento de la base de alcohol de 3.52 ppm hacia 4.60 ppm ahora como protón base de éster. Las demás señales no presentaron cambio significativo con respecto al β -sitosterol, Tabla 9.



Figura 37. Preparación del acetato del β -sitosterol.

Tabla 9. Comparación del desplazamiento químico (ppm) de RMN de ^1H del acetato β -sitosterol, en CDCl_3 .

Señales	Experimental	Literatura ¹⁰
H-3	4.60	4.60
H-6	5.35 ($J = 4.8 \text{ Hz}$)	5.38 ($J = 4.8 \text{ Hz}$)
CH_3 -19	0.92 ($J = 6.5 \text{ Hz}$)	0.92 ($J = 6.5 \text{ Hz}$)
CH_3 -24	0.84	0.84
CH_3 -26	0.82 ($J = 2.0 \text{ Hz}$)	0.82 ($J = 2.0 \text{ Hz}$)
CH_3 -27	0.80	0.80
CH_3 -28	0.68	0.67
CH_3 -29	1.01	1.00
OAc	2.01	2.0

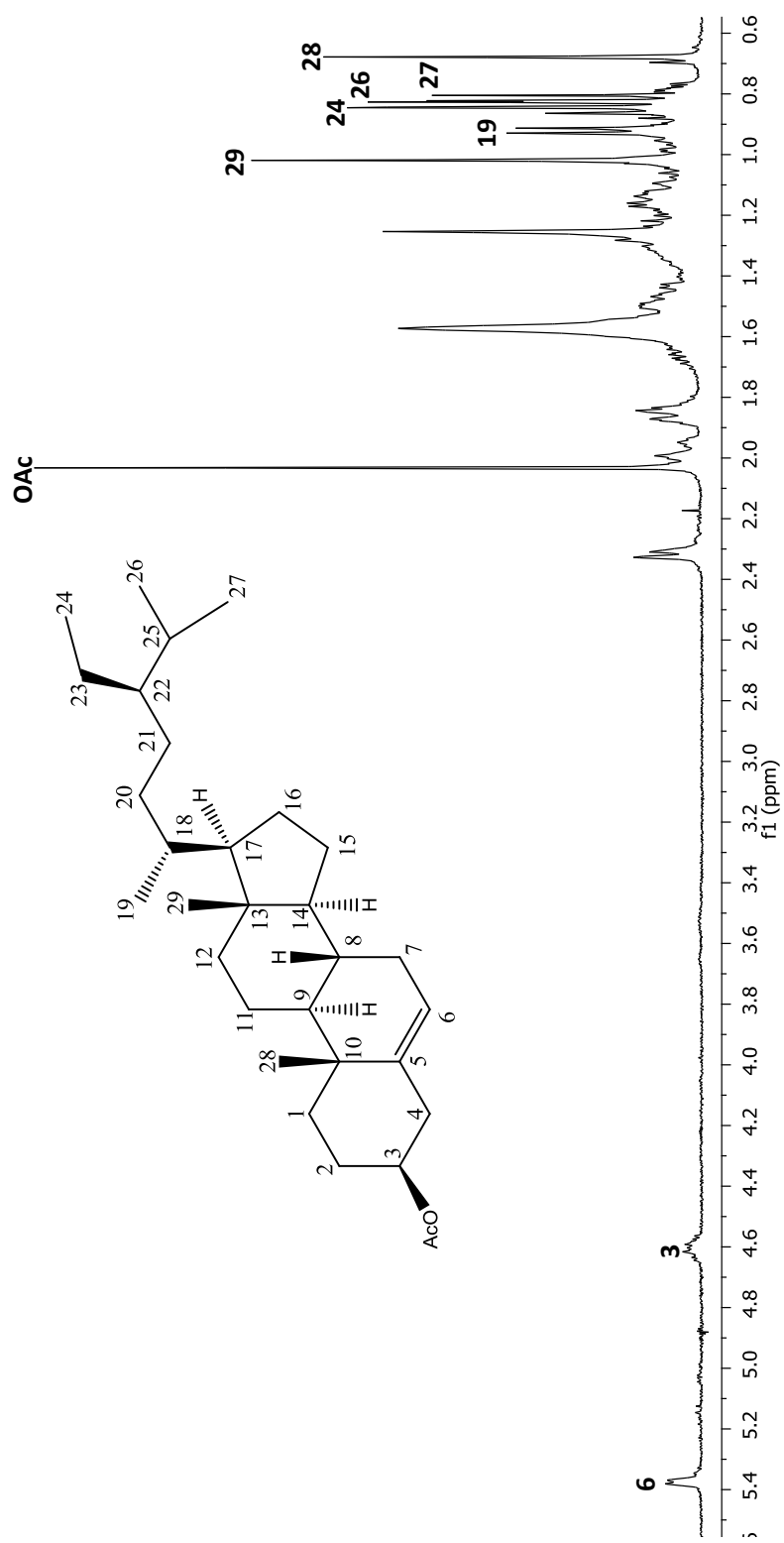


Figura 38. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 del acetato de β -sitosterol del crudo de reacción (12).

Epoxidación del estigmasterol

Una de las reacciones sobre dobles enlaces es la epoxidación y para preparar el epóxido se utilizó el estigmasterol aislado de los tallos de *Buddleja*; empleando ácido *m*-cloroperbenzoico en CH₂Cl₂ y adicionando bicarbonato de sodio y agua en agitación por 4 h a temperatura ambiente, el crudo de reacción fue purificado por cromatografía flash.

En la polaridad Hexano-AcOEt 8:2 se obtuvieron 3.2 mg (ren 80%), como agujas incoloras, las cuales se analizaron por RMN de ¹H; observándose el desplazamiento hacia campo alto del protón vinílico de H-6 de 5.35 ppm a alrededor de 3 ppm; por lo cual el ácido *m*-cloroperbenzoico dio lugar a la oxidación regioselectiva del alqueno Δ⁵⁻⁶ formándose una mezcla con proporción 3.2:1 de los dos isómeros α-epoxiestigmasterol (**13**) y β-epoxiestigmasterol (**14**); siendo mayoritario el α-epoxiestigmasterol. También se observó el desplazamiento de la base de alcohol H-3 de 3.53 ppm a 3.91 ppm. El resto de las señales de los metilos no tuvieron cambios significativos.

La relación que guardan los dos isómeros se puede observar en el espectro de RMN de ¹H (Figura 39), en cuanto al espectro de RMN de ¹³C (Figura 40) se observó el desplazamiento de los carbonos del doble enlace C-5=C-6, para el α- y β-epoxiestigmasterol; al igual que el desplazamiento del carbono base de alcohol C-3 de 72.1 ppm a 69.4 ppm, no observándose cambios significativos en el resto de las señales Tabla 12.

Tabla 10. Comparación de desplazamientos (ppm) de RMN de ¹³C del α- y β-epoxiestigmasterol con el estigmasterol.

	Epoxiestigmasterol	RMN de ¹³ C del estigmasterol ³³
C-3	69.4	72.1
C-5 α	68.7	141.1
C-5 β	65.6	
C-6 α	59.2	121.8
C-6 β	63.6	
C-20	138.1	138.7
C-21	129.3	129.6

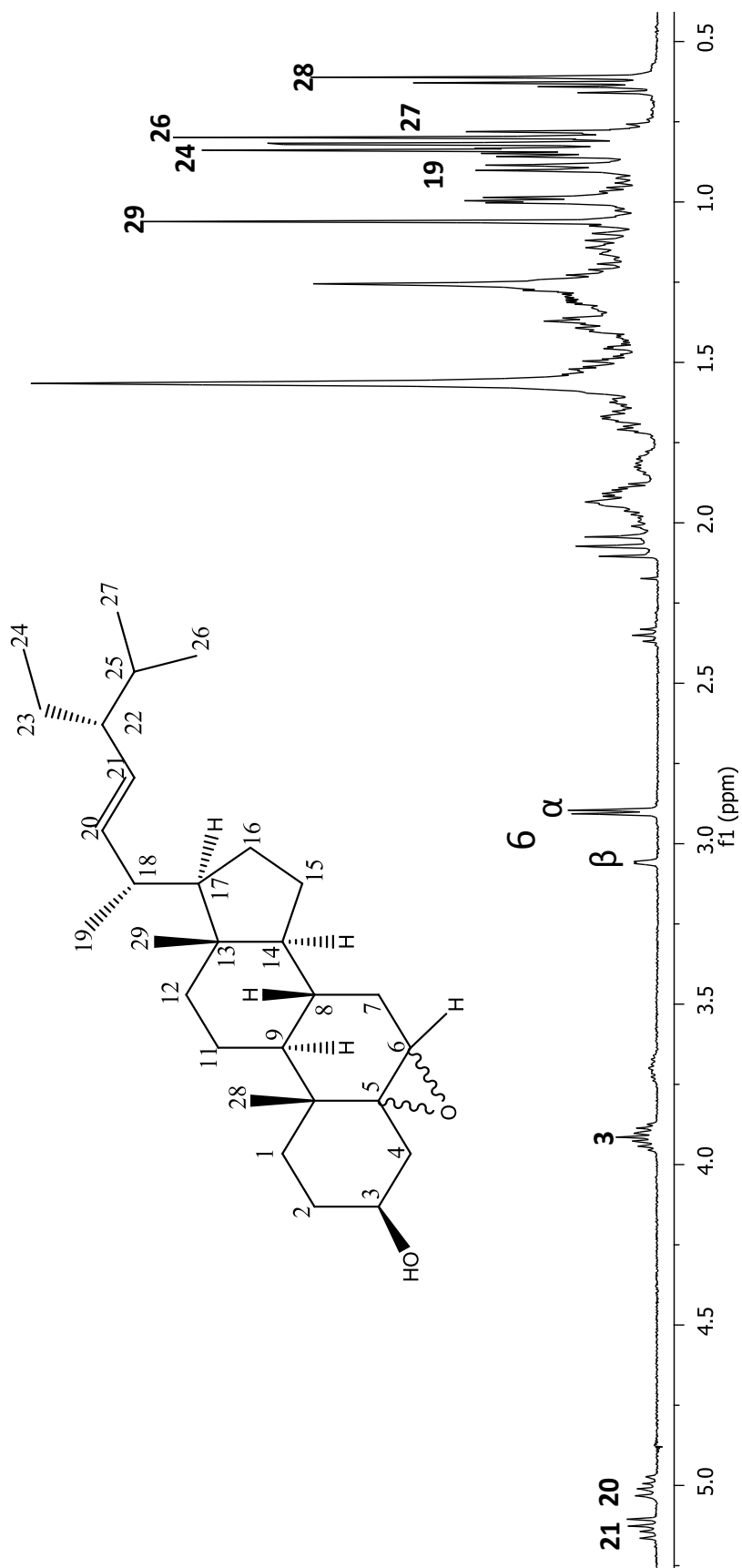


Figura 39. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz en CDCl_3 de los isómeros α - y β -epoxiestigmasterol (**13** y **14**) en relación 3.2:1.

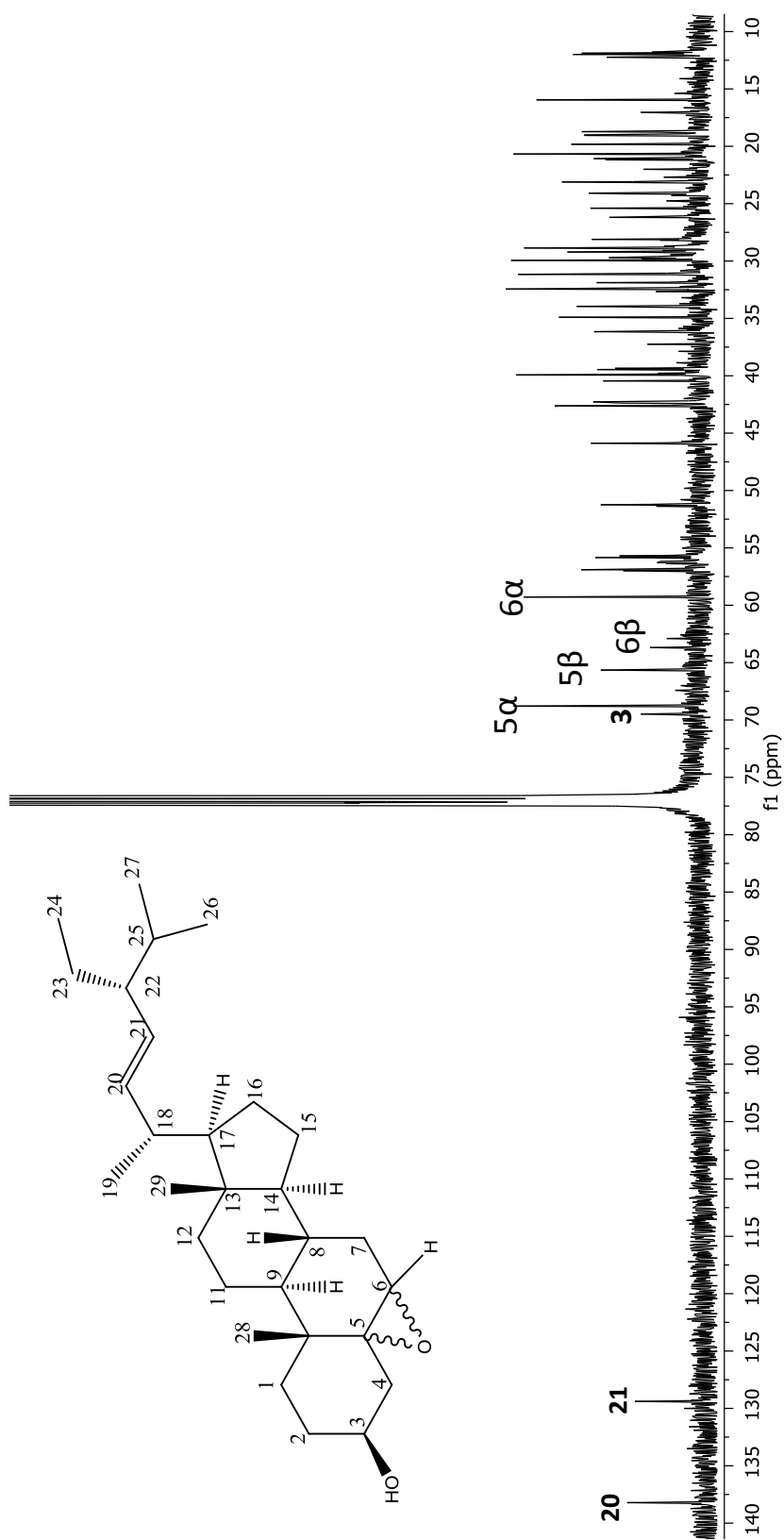
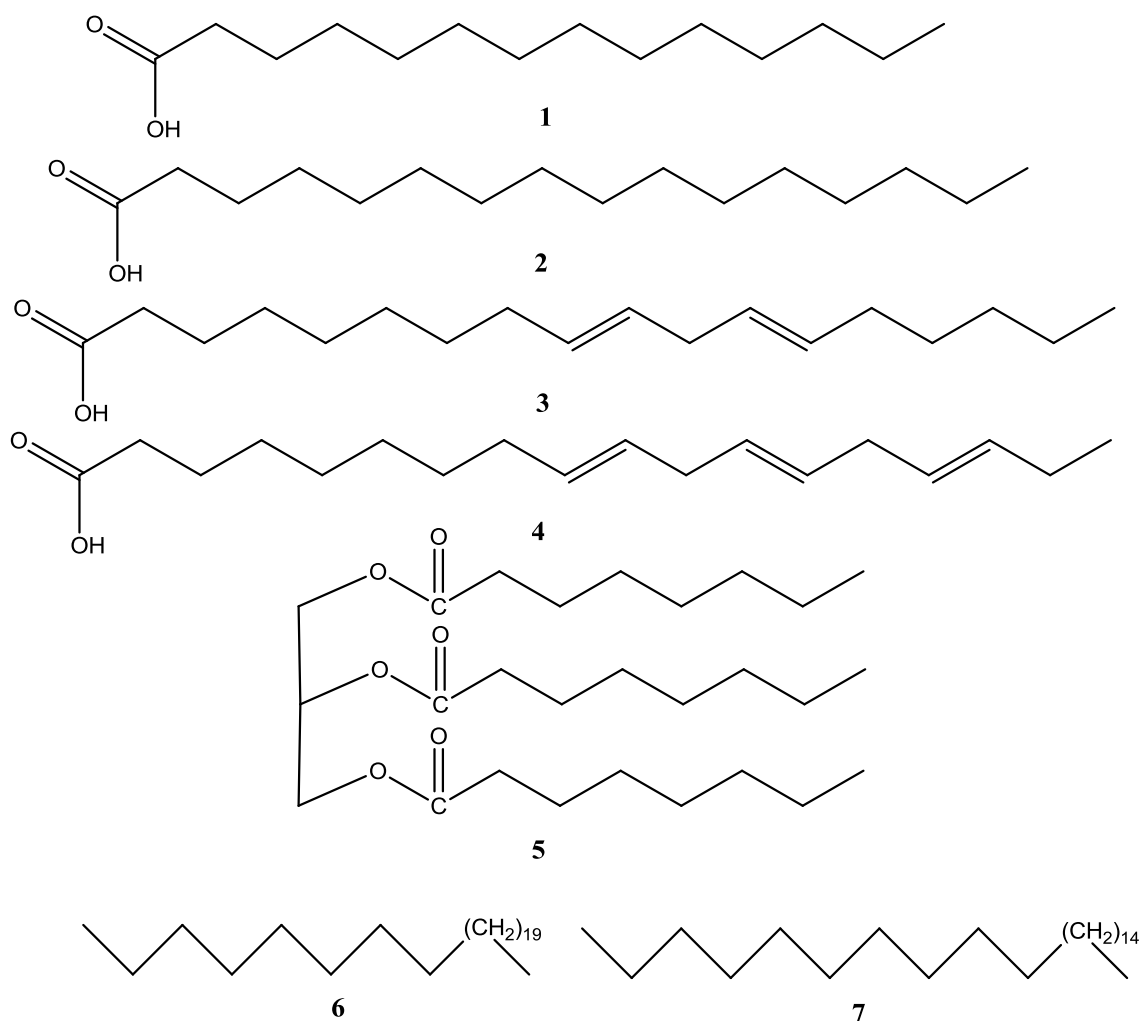


Figura 40. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz en CDCl_3 de la mezcla de α - y β -epoxiestigmasterol (**13** y **14**).

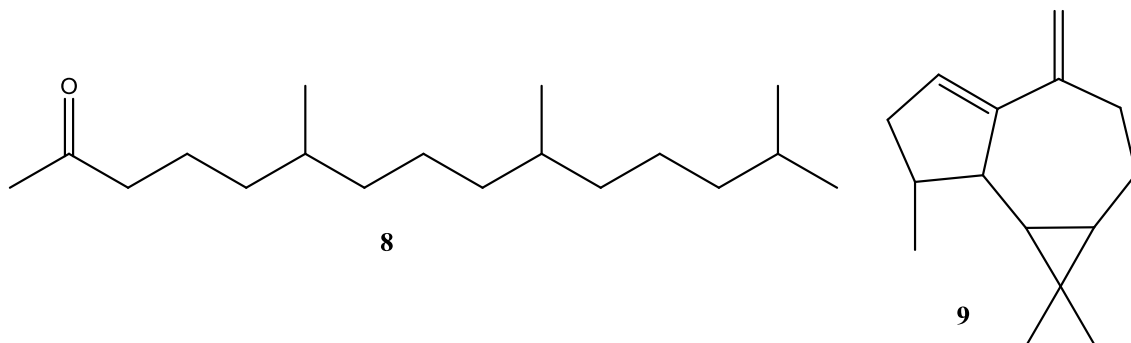
5. CONCLUSIONES

Se obtuvieron los respectivos extractos de raíz, flor, hojas y tallos mediante el uso de solventes en orden ascendente de polaridad, para realizar el análisis e identificación de terpenos de *Buddleja sp.*

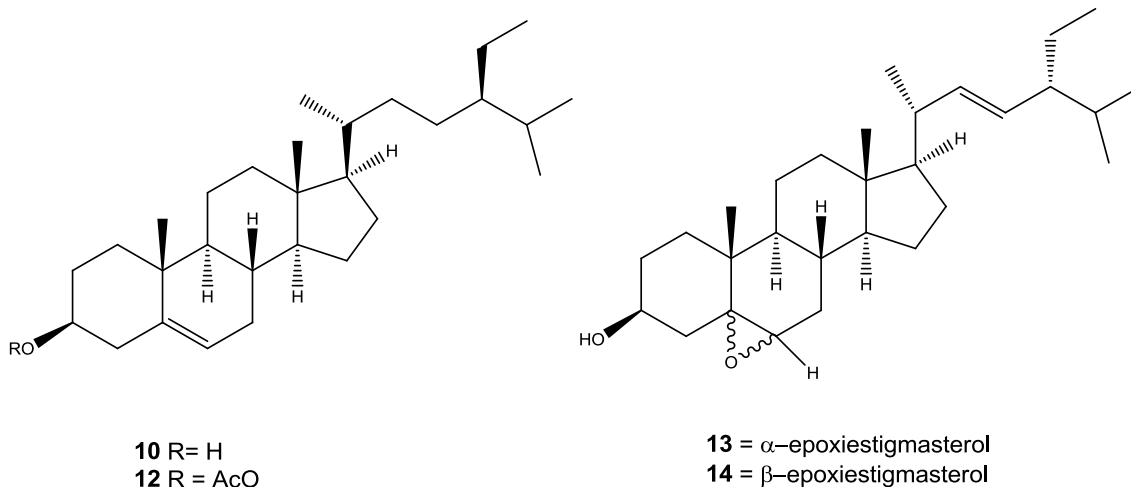
De los extractos hexánicos no polares de raíces, flores, hojas y tallos se identificaron cadenas hidrocarbonadas como el ácido tetradecanoico (**1**), el ácido hexadecanoico (**2**), el ácido 9,12-octadecadienoico (**3**), el ácido 9,12,15-octadecatrienoico (**4**), el triglicérido del ácido octanoico (**5**), el octacosano (**6**) y el tetracosano (**7**) como componentes mayoritarios.



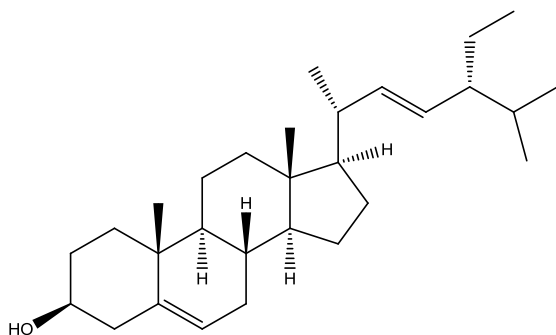
Además se identificaron dos sesquiterpenos, en las partes aéreas la 6,10,14-trimetil-2-pentadecanona (**8**) y en raíces el dehidro-aromadendrano (**9**).



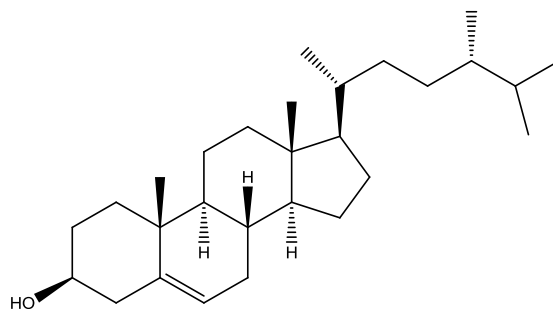
Del extracto hexánico de tallos se aislaron el estigmasterol (**11**), y el triterpeno β -sitosterol (**10**), este último también se aisló del extracto hexánico de flores. Del β -sitosterol se preparó su derivado acetilado correspondiente (**12**) en condiciones estándar de reacción para alcoholes primarios y secundarios; del estigmasterol se realizó su respectiva epoxidación obteniendo los dos isómeros el α -epoxiestigmasterol (**13**) y el β -epoxiestigmasterol (**14**) siendo el mayoritario el α -epoxiestigmasterol, demostrando que el ácido *m*-cloroperbenzoico favorece al isómero α en medio básico, mientras que el isómero β ha sido reportado como mayoritario empleando permanganato de potasio.³⁴



Del extracto hexánico de las raíces se identificó una mezcla de compuestos, entre ellos el campesterol (**15**) y el estigmasterol (**11**).



11



15

Al terminar de realizar el análisis de los extractos no polares, se vio que la planta *Buddleja* *sp* mejor conocida como “peralvillo”, contiene diversos compuestos terpenoides, además de que la abundancia de los metabolitos presentes permiten que se propongan modificaciones estructurales. Ya que resultan importantes en busca de una posible alternativa para el tratamiento de algunos padecimientos.

6. PARTE EXPERIMENTAL

Generalidades

Para las cromatografías en columna abierta se utilizó gel de sílice malla de 230-400 (fase estacionaria) y disolventes en orden ascendente de polaridad (fase móvil). Las fracciones eluidas se analizaron por cromatografía en capa fina, observándose en luz UV y reveladas con sulfato cérico amoniacal. Los puntos de fusión se determinaron en un equipo Fisher-Johns y no están corregidos.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de ^1H 400 MHz y ^{13}C 100 MHz se adquirieron en un equipo Varian Mercury Plus empleando cloroformo deuterado (CDCl_3) como disolvente y tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los espectros de masa se adquirieron por impacto electrónico a 70 eV en un equipo de marca Thermo Scientific, Single Quadrupole Mass Spectrometer and Gas Chromatograph.

Material vegetal

La materia vegetal fue colectada el día 4 de abril del 2015 en Zitácuaro, Michoacán. Cerca del Fraccionamiento Las Rosas (19°44'45.98" N, 100° 14' 35.86" W). La planta se llevó al Herbario del Instituto de Ecología en Pátzcuaro A.C. donde fue identificado el género y se encuentra en estudio para conocer la especie. La planta se separó en sus distintas partes: raíces, flores, tallos y hojas las cuales se secaron a la sombra y posteriormente se obtuvieron sus extractos de hexano, cloruro de metileno, acetato de etilo y metanol.

Obtención de extractos

Por su dureza la raíz fue cortada en astillas y se dejó bajo reflujo con hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol. Mientras hojas tallos y flores se sometieron a maceración a temperatura ambiente empleando los mismos disolventes que en el caso de la raíz.

Obtención del β -sitosterol de flores

Del extracto hexánico de flor 0.870 g se purificaron en cromatografía en columna empleando como fase móvil Hexano-AcOEt en orden ascendente de polaridad, las fracciones eluidas se monitorearon por CCF; en la polaridad Hexano-AcOEt 93:7, donde se obtuvieron 10.6 mg (ren 1.21%) del compuesto caracterizado como β -sitosterol (**10**).

Agujas incoloras, p.f. 142 °C, RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 5.35 (1H, d, J = 5.4 Hz, H-6), 3.52 (1H, m, H-3), 1.01 (3H, s, CH_3 -29), 0.92 (3H, d, J = 6.5 Hz, CH_3 -19), 0.84 (3H, s, CH_3 -24), 0.82 (3H, d, J = 2.1 Hz, CH_3 -26), 0.80 (3H, s, CH_3 -27), 0.68 (3H, s, CH_3 -28).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 140.7 (C, C-5), 121.7 (CH, C-6), 71.8 (CH, C-3), 56.7 (CH, C-14), 56.0 (CH, C-17), 50.1 (CH, C-9), 45.8 (CH, C-22), 45.7 (C, C-13), 42.2 (CH₂, C-4), 39.7 (CH₂, C-12), 37.2 (CH₂, C-1), 36.4 (C, C-10), 36.1 (CH, C-18), 33.9 (CH₂, C-20), 31.8 (CH₂, C-7), 32.0 (CH, C-8), 31.9 (CH₂, C-2), 29.1 (CH, C-25), 28.2 (CH₂, C-16), 26.4 (CH₂, C-15), 26.0 (CH₂, C-21), 23.0 (CH₂, C-23), 21.0 (CH₂, C-11), 19.8 (CH₃, C-26), 19.3 (CH₃, C-27), 19.0 (CH₃, C-19), 18.7 (CH₃, C-28), 11.9 (CH₃, C-24), 11.8 (CH₃, C-29).

Obtención del β -sitosterol de tallos

Del extracto hexánico de tallos 4 g se purificaron en cromatografía en columna como fase móvil Hexano-AcOEt en orden ascendente de polaridad, las fracciones eluidas se monitorearon por CCF; en la polaridad 93:7 Hexano-AcOEt, se obtuvieron 22 mg (rendimiento 0.55%) del compuesto caracterizado como β -sitosterol (**10**).

Agujas incoloras, p.f. 140 °C, RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 5.35 (1H, d, $J = 5.5$ Hz, H-6), 3.53 (1H, m, H-3), 1.01 (3H, s, CH₃-29), 0.92 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, CH₃-19), 0.84 (3H, s, CH₃-24), 0.82 (3H, d, $J = 2.1$ Hz, CH₃-26), 0.80 (3H, s, CH₃-27), 0.68 (3H, s, CH₃-28).

Obtención del estigmasterol de tallos

4 g del extracto hexánico de tallos obtenido fue purificado en cromatografía en columna como fase móvil Hexano-AcOEt en orden ascendente de polaridad, las fracciones eluidas se monitorearon por CCF; con la polaridad 9:1 Hexano-AcOEt, se obtuvieron 4.3 mg (rendimiento 0.1%) del compuesto caracterizado como estigmasterol (**11**).

Agujas incoloras, p.f. 138 °C, RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 5.35 (1H, d, $J = 5.4$ Hz, H-6), 3.53 (1H, m, H-3), 1.01 (3H, s, CH₃-29), 0.91 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, CH₃-19), 5.01 (1H, m, H-20), 5.15 (1H, m, H-21), 0.85 (3H, s, CH₃-24), 0.82 (3H, d, $J = 2.1$ Hz, CH₃-26), 0.80 (3H, s, CH₃-27), 0.66 (3H, s, CH₃-28).

Obtención del acetato de β -sitosterol

A una solución de 3.1 mg de estigmasterol extraído de la parte de tallo de *Buddleja sp* en 0.5 mL de piridina se le adiciona 0.5 mL de anhídrido acético. La mezcla se calentó en baño de vapor por 8 h. Transcurrido este tiempo se vertió sobre hielo y se extrajo con acetato de etilo. Se realizaron lavados con ácido clorhídrico al 10%, solución saturada de bicarbonato de sodio y agua. Posteriormente se secó sobre sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró en rotavapor, obteniendo 3.5 mg del crudo de reacción como un sólido blanco cristalino, con p.f. de 110 °C (**12**).

RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm 5.35 (1H, d, $J = 4.8$ Hz, H-6), 4.60 (1H, m, H-3), 2.01 (3H, s, OAc), 1.01 (3H, s, CH_3 -29), 0.92 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, CH_3 -19), 0.84 (3H, s, CH_3 -24), 0.82 (3H, d, $J = 2.0$ Hz, CH_3 -26), 0.80 (3H, s, CH_3 -27), 0.68 (3H, s, CH_3 -28).

Epoxidación del estigmasterol

Una solución de 4.3 mg de estigmasterol en 2 mL de diclorometano se enfrió en baño de hielo por 10 minutos. Posteriormente, se adicionaron lentamente 4 mg de ácido *m*-cloroperbenzoico y 1 mg de bicarbonato de sodio. La mezcla se agitó en frío durante 10 minutos y después se retiró del baño de hielo, se dejó reaccionar a temperatura ambiente por 4 h. transcurrido este tiempo la reacción se evaporó a sequedad y la mezcla se vertió sobre hielo y se extrajo con acetato de etilo. Se realizaron lavados con solución saturada de bicarbonato de sodio y agua destilada. Posteriormente se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se concentró en rotavapor, obteniendo 4.8 mg del crudo de reacción, que se purificó en columna por cromatografía flash. De las fracciones eluidas con Hexano/ AcOEt 8:2 se obtuvieron 3.2 mg de agujas incoloras, como mezcla de los dos isómeros α -epoxiestigmasterol (**13**) y β -epoxiestigmasterol (**14**).

Agujas incoloras, RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) δ ppm: 3.06 (1H, s, H-6 β), 2.90 (1H, d, $J = 4.42$ Hz, H-6 α), 3.93 (1H, m, H-3), 1.01 (3H, s, CH_3 -29), 0.89 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, CH_3 -19), 0.84 (3H, s, CH_3 -24), 0.82 (3H, d, $J = 1.68$ Hz, CH_3 -26), 0.80 (3H, s, CH_3 -27), 0.63 (3H, s, CH_3 -28).

RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) δ ppm: 69.4 (C, C-5 α), 59.27 (CH, C-6 α), 65.6 (C, C-5 β), 63.7 (CH, C-6 β), 69.46 (CH, C-3), 56.8 (CH, C-14), 55.9.0 (CH, C-17), 51.1 (CH, C-9), 45.8 (CH, C-22), 45.7 (C, C-13), 42.3 (CH_2 , C-4), 39.9 (CH_2 , C-12), 37.2 (CH_2 , C-1), 36.1 (C, C-10), 34.8 (CH, C-18), 33.9 (CH_2 , C-20), 31.8 (CH_2 , C-7), 32.4 (CH, C-8), 31.1 (CH_2 , C-2), 29.2 (CH, C-25), 28.1 (CH_2 , C-16), 26.1 (CH_2 , C-15), 25.3 (CH_2 , C-21), 23.0 (CH_2 , C-23), 21.1 (CH_2 , C-11), 19.8 (CH_3 , C-26), 19.0 (CH_3 , C-27), 18.9 (CH_3 , C-19), 18.7 (CH_3 , C-28), 11.9 (CH_3 , C-24), 11.8 (CH_3 , C-29).

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Petersen, Frank.; Amstutz, René. *Natural compounds as drugs*. Birkhuser Basel; Boston Berlin; **2008**, 1, 65, 3-4, 47-51, 121-122.
2. García Guerrero, C. Jair.; Blanco Dávila, Feliciano. *La cirugía plástica y el Códice De la Cruz-Badiano*; Medicina Universitaria, 6, **2004**, 51.
3. Villar M.; Villavicencio O. Manual de Fitoterapia, OPS/OMS/Es Salud-Programa Nacional de Medicina Complementaria, Lima, Perú; **2001**,41-42.
4. Alonso Torres, de M. G.; Ibarra Martínez C. M.; Martínez Díaz, Salas M. Estudio Fitoquímico Plantas Medicinales Propias del Estado de Querétaro. Memorias del Programa Verano de la Ciencia, **2008**, 1-2.
5. Gutiérrez Ravelo Ángel.; Estévez Braun Ana. *Relevancia de los productos naturales en el descubrimiento de nuevos fármacos en el S. XXI*. Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Madrid, **2009**, 22, 410-411.
6. Arango Acosta Gabriel Jaime. *Metabolitos primarios de interés farmacognóstico*; Universidad de Antioquia, Facultad Química Farmacéutica, Medellín, **2002**, 2, 14-15.
7. Castillo García Encarna.; Martínez Solís Isabel. *Manual de Fitoterapia*; Departamento de Fisiología, Farmacología y Toxicología, Moncada (Valencia), Elsevier MASSON; **2007**, 26- 29.
8. Bruice, Paula Y. Química orgánica, 5^{ta} edición; PEARSON EDUCACIÓN, México, **2008**, 1162-1163.
9. Bruneton Jean. *Farmacognosia: Fitoquímica plantas medicinales*; 2da edición, España, ACRIBIS; **2001**, 187, 778, 788.
10. Leco González, M. Aislamiento e identificación de los metabolitos secundarios de *Cestrum roseum*. Tesis de licenciatura; **2015**, Morelia, Michoacán.

11. Thornton, M. R.; Neilson, B. R. Química Orgánica, ADISON- WESLEY IBEROAMERICANA; **1990**, 1323.
12. Ávalos G. Adolfo.; Pérez Elena Urria C. *Metabolismo secundario de plantas*; Facultad de Biología, Universidad Complutense. Madrid Reduca (Biología); Serie Fisiología Vegetal **2009**, 120, 125 y 129.
13. Lincoln, Taiz.; Zeiger, Eduardo. *Fisiología vegetal*. Volumen I, **2006**, 542- 543, 548-59.
14. Croteau, Rodney. The discovery of terpenes; *Discoveries in Plant Washington*; **2013**, 329-330.
15. Roberts, F. M.; Wink, Michael. Alkaloids, Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications. Springer Science Business Media New York, **1998**, 1-2.
16. Arrázola, Guillermo.; Grané, Nuria.; Martín, L. María.; Dicenta, Federico. Determinación de los compuestos cianogénicos amigdalina y prunasina en semillas de almendras (*Prunus dulcis* L.) mediante cromatografía líquida de alta resolución. *Revista Colombiana de Química*; **2013**, 42, 23-30.
17. Acosta Ocampo Gilberto. *Buddlejaceae*; Flora del bajío y de regiones adyacentes Instituto de Ecología, A.C. Centro Regional del Bajío Pátzcuaro, Mich; **2003**, 1–2.
18. Calderón de Rzedowski G.; Rzedowski J. Flora Fanerogámica del Valle de México. Pátzcuaro: Instituto de Ecología A.C. y Comisión Nacional para el conocimiento y Uso de la Biodiversidad; **2005**, 547, 548.
19. Aguilar, R. Silvia.; Terrazas Teresa. Anatomía de la madera de *Buddleja* L. (Buddlejaceae): análisis fenético Madera y Bosques. Instituto de Ecología, A.C. Xalapa, México; **2001**, 7, 64-65.
20. Camacho, M. Deneb.; Hernández, P. Selene I.; Morfín, L. Lilián. Tepozán *Buddleja cordata*. Proyecto PAPIME PE205907 UNAM; **2009**; 5, 13, 23.
21. Houghton, Peter J.; Mensah, Y. Abraham.; Iessa, N.; Yong Hong, L. Terpenoids in *Buddleja*: relevance to chemosystematics, chemical ecology and biological activity. *Phytochemistry* **2003**, 64, 385-393.

22. Houghton, P. J. Ethnopharmacology of Some *Buddleja* species. *Journal of Ethnopharmacology*, **1984**, *11*, 293-308.
23. Mahlke, J. D.; Boligon, A. A.; Machado, M. M.; Athayde, M. L. Composition of the essential oil of *Buddleja thyrsoides* Lam. leaves from Brazil. *Natural Product Research*, **2013**, *14*, 1319-1322.
24. Mahlke, J. D.; Zanetti, G. D.; Machado, M. M.; Manfron, M. P.; Athayde, M. L. Morphoanatomical and Phytochemical Study of *Buddleja thyrsoides* Lam. (*Scrophulariaceae*) Leaves. *Latin American Journal of Pharmacy*, **2008**, *27*, 505-511.
25. Clarenc Aarland Rayn. Evaluación del contenido del verbascósido, compuestos fenólicos totales y capacidad antioxidante en plantas de *Buddleja cordata* Kunth propagadas *in vitro*. Tesis de Maestría, **2012**, México D.F.
26. Ocampo-Acosta, G. Flora del Valle de Tehuacán-Cuicatlán; Fascículo 39. Buddlejaceae; Departamento de Botánica, Instituto de Biología, UNAM. México D.F.; **2004**, 9.
27. Ávila Acevedo, José Guillermo. Estudio Fitoquímico de *Buddleja perfoliata* y *Buddleja scordioides*. evaluación de la actividad antibacteriana y fotoprotectora de sus principales metabolitos secundarios. Tesis doctoral, **2002**, México D.F.
28. Chukwujekwu, J. C.; Rengasamy, R. R. Kannan.; Kock, A. C.; Smith, J. P.; Slavětinská, P. L.; Van, S. J. Alpha-glucosidase inhibitory and antiplasmodial properties of terpenoids from the leaves of *Buddleja saligna* Willd. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2015**, *6*, 1-4.
29. Pendota, S. C.; Aderogba, M. A.; Ndhlala, A. R.; Van J. S. Antimicrobial and acetylcholinesterase inhibitory activities of *Buddleja salviifolia* (L.) Lam. leaf extracts and isolated compounds. *Journal of Ethnopharmacology*, **2013**, *148*, 515-520.
30. Emam, A. M., Elias, R., Moussa, A. M., Faure, R., Debrauwek, I. L., Balansard, G. Two flavonoid triglycosides from *Buddleja madagascariensis*; Phitochemistry, Cairo University, Egypt; Universite d'Aix-Marseille, France; **1998**, *38*, 739-742.

31. Goñy Vivar, León E. Estudio químico y farmacológico de un extracto activo de *Buddleja globosa* hope, Buddlejaceae, matico y diseño de la metodología analítica. Tesis de licenciatura, **2007**, Santiago, Chile
32. Mensah, A. Y.; Houghton, P J.; Bloomfield, S.; Vlietinck, A.; Vanden, D. Berghe. Known and Novel Terpenes from *Buddleja globosa* Displaying Selective Antifungal Activity Against Dermatophytes. *Journal of Natural Products*, **2000**, 63, 1210-1213.
33. Kamboj, Anjii.; Kumar, S. Ajay. Isolation of Stigmasterol and β -Sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. *International Current Pharmaceutical Journal*, **2012**, 9, 240-242.
34. Hang Jiliang. Synthesis of β -sitosterol and Phytosterol Esters; New Methodology for Singlet Oxygen Generation from 1,1-Dihydroperoxides. Tesis doctoral, **2012**, Lincoln Nebraska.