



## **DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS**

### **QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA**

**Proyecto Genérico Correspondiente:** Obtención de materias primas, principios activos, medicamentos y productos biológicos.

#### **Tesis de Servicio Social**

Estudio Fitoquímico de los Extractos de  
*Chenopodium graveolens*

**Asesora interna:** Dra. Julia Cassani Hernández

**Asesora externa:** Dra. Rosa Estrada Reyes

**Lugar de realización:** Instituto Nacional de Psiquiatría  
Ramón de la Fuente Muñiz

**Periodo de realización:** 23 de enero a 26 de  
noviembre de 2018

**Nombre del alumno:** Diego Mostalac Buentello

**Matrícula:** 2142028717

## Índice

1. Resumen .....	1
2. Introducción .....	1
3. Antecedentes .....	2
3.1 Familia Amaranthaceae .....	2
3.2 Género <i>Chenopodium</i> .....	2
3.3 Especie <i>Chenopodium graveolens</i> .....	2
3.3.1 Botánica y ecología .....	2
3.3.2 Descripción técnica .....	3
3.3.3 Etnomedicina .....	3
3.3.4 Origen y distribución geográfica .....	4
3.3.5 Taxonomía .....	4
3.3.6 Estudios fitoquímicos previos .....	4
4. Objetivos .....	7
4.1 General .....	7
4.2 Específicos .....	7
5. Parte experimental .....	7
5.1 Material vegetal: recolección, clasificación y pre-tratamiento .....	7
5.2 Materiales y métodos .....	7
5.2.1 Condiciones generales .....	7
5.2.2 Procedimientos de extracción, fraccionamiento y aislamiento .....	8
5.2.3 Caracterización espectroscópica .....	8
6. Resultados y discusión .....	9
6.1 Productos del extracto hexánico .....	9
6.1.1 Elucidación estructural de la pinostrobinina .....	9
6.1.2 Elucidación estructural del estigmasterol/ $\beta$ -sitoesterol .....	11
6.2 Productos del extracto de AcOEt .....	13
6.3 Productos del extracto hidro-etanólico .....	14
7. Conclusiones .....	15
8. Anexos .....	16
9. Referencias .....	24

## 1. Resumen

**INTRODUCCIÓN:** *C. graveolens* es una especie tropical y perenne con abundante presencia en México perteneciente a la familia Amaranthaceae con vastos registros en la medicina tradicional, sin embargo, son pocos los estudios centrados en la identificación de los compuestos con acción biológica. Esta misma, es una especie floral con un estigma cultural fuertemente arraigado a la tradición mexicana desde tiempos prehispánicos. Con la finalidad de ahondar en el conocimiento de especies carentemente estudiadas, profundizar en la composición química de plantas se constituye como un requisito para la identificación de metabolitos activos presentes, y así, verificar si existe una utilidad medicinal. Un análisis fitoquímico permite un primer avistamiento acerca de los principales metabolitos con actividad biológica. **METODOLOGÍA:** Las partes aéreas (500 g) fueron macerados en serie con hexano, acetato de etilo y metanol. De manera independiente, otra cantidad igual de material vegetal se trató con una mezcla hidroetanólica (EtOH/H<sub>2</sub>O [7:3]) para obtener cuatro extractos crudos, los cuales fueron separados en sus componentes mediante cromatografía en columna. Mediante precipitación de las fracciones obtenidas mediante la cromatografía, se obtuvieron los sólidos estudiados en este trabajo. Los experimentos de RMN permitieron la elucidación estructural de los compuestos obtenidos. **RESULTADOS:** Se logró la aislación, la purificación y la identificación de tres flavonoides: crisina, pinostrobrina y pinocembrina, la chalcona de pinocembrina y dos esteroides: estigmasterol y  $\beta$ -sitoesterol. **CONCLUSIONES:** Se lograron aislar e identificar cinco productos sólidos: pinostrobrina, estigmasterol/ $\beta$ -sitoesterol, crisina, pinocembrina y chalcona de pinocembrina. La presencia de metabolitos biológicamente activos en *C. graveolens* hace necesario un mayor estudio dirigido a dicha especie vegetal y justifica el uso medicinal tradicional acuñado por *C. graveolens*.

**Palabras Clave:** *C. graveolens*, susto, ansiedad, metabolito, flavonoide.

## 2. Introducción

Las especies vegetales, además de poseer metabolitos primarios e intermediarios metabólicos de las vías anabólicas y catabólicas, también se encargan de producir metabolitos secundarios los cuales no participan directamente en el crecimiento o desarrollo, sino que aportan una ventaja en cuanto a la respuesta de diversos estímulos del entorno. Debido a la especificidad de las especies al producir moléculas determinadas, aunado al efecto metabólico propio, se encuentra que generalmente producen efectos biológicos en otras especies, particularmente en mamíferos, incluido el hombre [1].

El uso de las plantas con propósitos medicinales se ha efectuado desde tiempos prehistóricos y hasta el día de hoy, son un papel clave en el tratamiento de la salud en la mayor parte del mundo. La preparación de decocciones e infusiones en zonas rurales, el uso de productos fitoterapéuticos y la obtención de principios activos en países desarrollados para la elaboración de medicamentos son algunas de las técnicas empleadas en el ámbito de la salud.

Tanto la determinación de la composición química de las plantas medicinales como el conocimiento de los constituyentes biológicamente activos en una especie

vegetal permiten hacer una discriminación de las plantas a estudiar en términos de su composición química, con el fin de seleccionar únicamente aquellas más interesantes para posteriores estudios sistemáticos. Dado que cada uno de estos grupos de compuestos está relacionado con actividades biológicas específicas, partiendo de los resultados obtenidos en el estudio fitoquímico es posible orientar investigaciones posteriores para determinar la actividad biológica de *Chenopodium graveolens* y los principios activos involucrados en la misma.

### **3. Antecedentes**

#### 3.1 Familia Amaranthaceae

La familia Amaranthaceae Juss. corresponde al orden Caryophyllales (angiospermas), fue descrita en 1789 por el médico y botánico francés Antoine-Laurent de Jussieu, quien propuso su nombre. Está se compone por cerca de 65 géneros y 900 especies [2], sin embargo, análisis filogenéticos más recientes proponen que la familia Chenopodiaceae debe incluirse en Amarantáceas, con lo cual pasaría a estar compuesta por 169 géneros y 2360 especies distribuidas en el todo el mundo. [3, 4, 5]. La importancia económica de la familia radica principalmente en su valor ornamental con hojas, tallos e inflorescencias vistosas, (Celosia, Iresine, Gomphrena, Alternanthera ficoidea), sin embargo, algunas especies de *Amaranthus* se cultivan como hortalizas por sus semillas ricas en almidón, con un alto valor proteico comparable al de otros granos como el trigo y el arroz. De igual manera, especies como *Beta vulgaris* L. (acelga), *Spinacia oleracea* L. (espinaca) y *Chenopodium quinoa* Willd. han sido ampliamente cultivadas con fines alimenticios a lo largo de los últimos siglos. [6].

#### 3.2 Género *Chenopodium*

Según el sistema de *Cronquist*, Amaranthaceae es una familia separada de Chenopodiaceae por los tépalos y brácteas suculentas y los estambres libres entre sí. Sin embargo, estudios filogenéticos moleculares soportan la unión de ambos bajo la misma familia. Se sabe que no existe diferencia alguna en cuanto a caracteres polínicos. Aunque existen diferencias entre los numerosos géneros de Amaranthaceae con respecto a Chenopodiaceae, *Amaranthus* y Chenopodiaceae son comúnmente tratados como un complejo por su similitud en los granos de polen multiporados [7, 8]. Así mismo, se han logrado aislar e identificar diferentes metabolitos: antocianinas, isoflavonas [9], alcaloides, esteroides, flavonoides, fenoles, saponinas [10], C-glicoflavonas, flavonoles, flavonas [11], y betalaína [12]. Algunos de los flavonoides son: miricetina, quercetina o campferol; 5'-*O*-metil flavonoles; sulfatos de flavonoles; 5'-*O*-metilflavonas; flavonoles C-glicosilados; isoflavonas y bencil/alil flavonoides [13].

#### 3.3 Especie *Graveolens*

##### 3.3.1 Botánica y ecología

*C. graveolens*, originaria de México habitando en climas cálido, semi-cálido, semi-seco, seco y templado (arvense y ruderal), entre los 20 y los 2900 msnm, cuenta con distintos nombramientos (epazote del zorrillo, epazote de perro, hierba de perro, epazote morado, entre otros) es una hierba perenne, erecta, a veces muy ramificada, usualmente rojiza o verde y de característica olorosa marcada. En sus ramas presenta

un gran número de flores, con frutos pequeños y números y de semillas color café. Sus hojas son más largas que anchas, de color verde a púrpura, presentan lóbulos o hendiduras y son pegajosas [14].

### 3.3.2 Descripción técnica

**Tabla 1. Descripción de *Chenopodium graveolens* [14, 15, 16].**

Hábito y forma de vida	Planta erguida, glandulosa
Tamaño	De 20 a 80 cm de alto
Tallo	Simple o ramificado, a veces rojizo y con rayas a todo lo largo
Hojas	Ovadas u oblongas, de 2 a 6 cm de largo por 1 a 3 cm de ancho, sinuado-pinatífidas, con los lóbulos oblongos o deltoides, sin pelos o con una cubierta pegajosa (vísidas) en el haz, cubierta de glándulas amarillas en el envés; peciolo delgado
Inflorescencia	Flojamente dicótoma, de numerosas cimas axilares, dispuestas en largas panículas, con flores sésiles y pediceladas
Flores	Estériles en la bifurcación de las ramas laterales y una sola terminal en el extremo de cada una de las ramas laterales, flores pediceladas generalmente abortivas, caedizas, sus pedicelos espiciformes; perianto de menos de 1 mm de largo, con una estructura en forma de cuerno (cornículo) en el ápice de los lóbulos, cubierto de glándulas
Frutos y semillas	El perianto envuelve incompletamente el fruto (un utrículo), el cual es pequeño con pared delgada, de alrededor de 0.10 cm de diámetro; semilla horizontal de 0.5 mm de diámetro, de color café oscuro o negro y con el pericarpio adherente
Plántulas	Hipocótilo cilíndrico, de hasta 22 mm; cotiledones de lámina aovada a elíptica de 2 a 4 mm de largo y 1.3 a 2 mm de ancho, sin pelos; epicótilo de 1.5 a 9 mm de largo, cuadrangular; hojas opuestas
Características especiales	De olor intenso muy característico

### 3.3.3 Etnomedicina

Uno de sus usos principales en estados como; Distrito Federal, Estado de México, Puebla, Tlaxcala y Veracruz es para tratar malestares estomacales y diversos trastornos digestivos (debido a la relajación del músculo liso) no obstante, se recomienda en enfermedades respiratorias como tos, pulmonía, resfrío, dolor de pecho, de espalda y escalofríos. Otros usos mencionados son: acelerar el parto, limpiar la matriz y para resolver algunos problemas de lactancia [14]. En la medicina tradicional, *C. graveolens* posee diversas actividades sobre el TGI: anestésico (dolor de estómago), antiparasitario, antidiarreico, antiemético y ayuda contra la indigestión, el empacho y el insulto (disgusto después de comer). Se recomienda con frecuencia para enfermedades respiratorias como la tos, gripa, pulmonía, “dolor del aire” (afección en pecho, espalda y cintura como consecuencia de exponerse al frío). Incluso se menciona

para aliviar los “calambres”, el susto (síndrome de filiación cultural), dolores menstruales, problemas de lactancia y para acelerar el parto [17].

En el contexto tradicional y cultural, se ha empleado para tratar el “espanto”, “susto” o “pérdida del alma”, expresión psicósomática originada por una fuerte y repentina impresión. Este padecimiento puede afectar la integridad psicológica de una persona sin distinción en el sexo o en la edad, mostrando una sintomatología base como cualquier otro tipo de aflicción [18]. Sin embargo, no se cuentan con registros científicos que validen las propiedades biológicas atribuidas a esta especie.

### 3.3.4 Origen y distribución geográfica

Aunque cuenta con un origen americano, *C. graveolens* se desarrolla apropiadamente en ambientes tropicales, desde el sur de Estados Unidos hasta Argentina y también se ha registrado en el continente africano. Su distribución en México es abundante; desde Baja California Norte, Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila, Aguascalientes, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luís Potosí, Sonora, Tlaxcala, Veracruz, Zacatecas y Chiapas [16].

### 3.3.5 Taxonomía

**Tabla 2. Taxonomía de *Chenopodium graveolens* [19].**

Reino	Plantae	Clase	Equisepsida	Familia	Amaranthaceae
Subreino	Traqueobionta	Subclase	Magnoliidae	Género	Chenopodium
División	Magnoliofita	Orden	Caryophyllales	Especie	Graveolens
Subdivisión	Espermatofita	Superorden	Caryophyllanae		

### 3.3.6 Estudios fitoquímicos previos

Se han reportado: betacianinas en *C. botrys* y *C. urbicum*, esteroides en *C. album* y *C. bonus-Henricus*, glucósidos triterpénicos en *C. antihelmiticum* y *C. ambrosioides*, y sesquiterpenos polioxigenados en *C. botrys* [16]. Otros metabolitos como; antocianinas, isoflavonas, alcaloides, esteroides, flavonoides, flavonas y betalaína también se han logrado identificar en miembros de la familia *Chenopodiaceae* [20, 21, 22]. En cuanto a *C. graveolens*, se ha demostrado el efecto antihelmíntico, carminativo, antipirético, antialérgico, sedante y narcoléptico, además es efectivo contra fiebres, malestares estomacales y dolores de cabeza [25, 26], a su vez, se han logrado identificar distintos compuestos, entre ellos: tres esteroides y un derivado glicosilado; estigmasterol, estigmas-22-ter-3-ol, daucoesterol y 3 $\beta$ -sitoesterol-glucósido, tres flavonoides; pinostroquina, crisina y pinocembrina, tres sesquiterpenos; (+)-8 $\alpha$ -hidroxielemol, criptomeridiol y (+)-8 $\alpha$ -acetoxiptomeridiol, un terpeno; acetato de geranilo, [24, 25]. De igual manera se han reportado: flavonas, compuestos monohidroxilados en el anillo B, un derivado 7-O-glicosilado y tres 3-O-glicosilados, flavonoles como campferol, quercetina, isoramnetina y campferitrina (der. glicosilado), taninos, un triterpeno hidrofóbico y ascaridol [26].

Entre los metabolitos secundarios aislados de *C. graveolens* se han descrito:

**Pinostrobin:** Estudios centrados demuestran múltiples actividades biológicas importantes [27]; antiviral [28], antimutagénica [29], actividad antipalúdica [30], antioxidante [31], efectos antifúngicos para *Cytospora personii* [32], actividad gastroprotectora (antiúlceras) [33] que podría ser indirectamente un resultado de su mecanismo antioxidante, actividad inhibitoria sobre las citoquinas inflamatorias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en ratas Sprague Dawley [34] y sobre la actividad de la aromatasa y disminuye el crecimiento de las células de cáncer de mama humano (MCF-7) inducidas por DHEAS y el receptor de estrógeno (E2) del 17 $\beta$ -estradiol [35]. Aunado a esto, se demostró la citotoxicidad en líneas celulares HeLa y HepG2 [36].

**Crisina:** Los primeros resultados obtenidos mediante el estudio de la crisina –y en sí en anillo flavonónico- indican que posee propiedades ansiolíticas en modelos murinos. Posee carente actividad miorelajante y sedante, aunque presenta alta y mediana afinidad por el sitio de unión a las benzodiazepinas en estudios *in vitro* [37]. Se ha reportado su actividad antimicrobiana [38] y sus efectos miolíticos sobre las contracciones del íleon de rata aislado [39]. Siendo flavonoide, interactúan de manera directa y/o indirecta con los sistemas esenciales de neurotransmisión cerebral, modulan la actividad de diversas enzimas en las cascadas de señalización de procesos como la memoria y el aprendizaje, promoviendo un mejor funcionamiento neuronal [37].

**Estigmasterol:** Se han reportado propiedades inmuno-modulatorias en respuestas alérgicas cutáneas [40] y respiratorias [41]. ya sea de manera individual o en mezclas con otros esteroides: atenúa tanto a la respuesta inmune innata como a la adaptativa, posee efectos inhibitorios [41, 43] sobre el reclutamiento de células inflamatorias y ante el estrés oxidativo. Además, estimula la expresión de IgE y de la molécula de adhesión de células vasculares tipo 1 (VCAM-1). Suprime los cambios de la permeabilidad vascular inducida por la anafilaxis cutánea, reduce la picazón y reduce los niveles de TNF-alfa. [40, 41]. Actúa como agente anticancerígeno; suprimiendo la angiogénesis tumoral e inhibiendo el reclutamiento de macrófagos en el colangiocarcinoma, aumenta el contenido estromal y reduce la expresión de citocinas tales como IL-6 y IL-12 [41]. Ante la inducción alérgica con ovoalbúmina, el estigmasterol adquiere importantes propiedades antiasmáticas; redujo la proliferación de eosinófilos, linfocitos y monocitos a la vez que disminuyó la infiltración peribroncolar, perivascular y alveolar de las células inflamatorias. Mantuvo la arquitectura pulmonar y revirtió la deposición de colágeno. La sobreexpresión de la molécula de adhesión de células vasculares en suero-1 (VCAM-1) e IgE -específica de ovoalbúmina- fue controlada mediante el tratamiento con estigmasterol.

Se demostró su actividad quimiopreventiva, gracias a sus propiedades antigenotóxicas y a su relación con el estrés oxidativo [43]. Además, posee propiedades gastroprotectoras; inhibe el acortamiento del colon, reduce el contenido de hemoglobinas en las heces y reduce la severidad de la colitis. De igual manera, suprime la activación de NF- $\kappa$  $\beta$ , de la ciclo-oxigenasa 2 y del factor estimulante de colonias tipo 1 (CSF-1) [43]. Aunado, se han reportado diversas propiedades farmacológicas; antiosteoartrítico, hipoglucemiante, antimutagénico, antioxidante, antiinflamatorio y

reduce la actividad de enzimas como; aminotransferasa, alanina-aminotransferasa, alcalin-fosfatasa y la bilirrubina. Aunado, inhibe los elevados niveles de la peroxidasa lipídica y de daño en el ADN [44].

Pinocembrina: Ha sido ampliamente estudiada y conocida por sus efectos anti-inflamatorios y neuroprotectores: *in vivo*, inhibe la expresión de TLR-4, alivia defectos cognitivos y decrece la activación y polarización de la microglia, así mismo, la producción de citocinas pro-inflamatorias es reducida [45, 46]. *In vitro*, inhibe la producción de citocinas pro-inflamatorias mediante inducción con LPS, de la microglia primaria y reduce el daño y la degeneración neuronal [46, 47]. Además, posee la habilidad de reducir las especies reactivas de oxígeno, protege la barrera hematoencefálica, modula la función mitocondrial y regula la apoptosis neuronal [47].

De hecho, la metabolización de este compuesto es tan eficiente que puede atravesar la barrera hematoencefálica mediante transporte pasivo mediado en parte por la glucoproteína P [46]. Todas estas propiedades lo convierten en candidato para el tratamiento de alteraciones en el sistema nervioso central como en el daño producido por derrame cerebral y Alzheimer, así como en enfermedades cardiovasculares, arterioesclerosis y tratamientos para cáncer. Reduce la hinchazón cerebral, mejora el comportamiento, alivia el edema de pie y la deformación de capilares y de células endoteliales. Reduce los niveles de citocinas pro-inflamatorias; TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , quimiocinas; ICAM-1 y VCAM-1, de NO y iNOS y de la acuaporina-4. Inhibe a la proteína RAGE y a su señalización intracelular [47].



## 4. Objetivos

### 4.1 General

- ❖ Aislar, purificar e identificar los distintos metabolitos secundarios presentes en los extractos orgánicos de las partes aéreas de la especie *C. graveolens*.

### 4.2 Específicos

- ✓ Obtener cuatro extractos orgánicos; de hexano, acetato de etilo, metanol y un extracto hidroetanólico (etanol/agua; 70:30).
- ✓ Separar los componentes cada extracto mediante métodos cromatográficos convencionales.
- ✓ Aislar y purificar los metabolitos secundarios de los diferentes extractos.
- ✓ Identificar estructuralmente los metabolitos obtenidos, mediante la caracterización de sus propiedades físicas (punto de fusión), espectroscópicas (RMN) y espectrométricas (EM).

## 5. Parte Experimental

### 5.1 Material Vegetal: recolección, clasificación y pre-tratamiento

El Epazote del Zorrillo (*Chenopodium graveolens*) se recolectó en el pueblo de San Pablo, en el municipio de Ecatepec del Edo. de México y se identificó en el Herbario de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco por la botánica Beatriz Gonzales Hidalgo, con núm. de voucher: 13057. La totalidad de las partes aéreas de la planta se mantuvieron intactas y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 20 días antes de su tratamiento.

### 5.2 Materiales y Métodos

#### 5.2.1 Condiciones Generales

- Las fracciones obtenidas mediante cromatografía en columna que presentaron mayor cantidad de producto, se precipitaron mediante la exposición a disolventes de polaridad contraria a la polaridad del disolvente con el que se obtuvo el extracto correspondiente. Cada fracción precipitada se filtró a través de un embudo Büchner y las aguas madres correspondientes fueron recolectadas. Tanto el sólido precipitado y las aguas madres fueron analizadas mediante CCF. Los puntos de fusión de los sólidos determinados con un aparato Fisher-Johns, no fueron corregidos.
- La identidad de los productos obtenidos se determinó mediante la interpretación de sus características físicas como el punto de fusión y espectroscópicas como RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C. Esta caracterización se utilizó para los siguientes productos sólidos; Fracción 15.2 del epazote del zorrillo eluida con hexano (EZH 15.2), fracción 29-31 del epazote del zorrillo eluida con hexano (EZH 29-31) y la fracción 18 del epazote del zorrillo eluida con acetato de etilo (EZA 18).
- Los experimentos de RMN fueron realizados en un equipo de 600MHz marca Agilent con una sonda OneProbe. Las muestras se disolvieron en CDCl<sub>3</sub> o DMSO-

d<sub>6</sub> de acuerdo a la solubilidad de cada muestra. Se usó TMS como estándar interno.

## 5.2.2 Procedimientos de extracción, fraccionamiento y aislamiento

Las partes aéreas de *C. graveolens* (500 g) fueron extraídas con hexano, AcOEt y metanol sucesivamente. 500 g adicionales fueron macerados directamente con H<sub>2</sub>O/EtOH (7:3). Ambos tratamientos tuvieron una duración de una semana. La evaporación de los solventes fue con temperatura y presión reducida proporcionando los extractos semisólidos (Diagrama 1a y 1b). Se obtuvieron 9.86 g del extracto hexánico (EZH) (1.97 % p/p con respecto al material vegetal seco), 12.17 g del extracto de AcOEt (EZA) (2.43 % p/p), 35.11 del extracto metanólico (EZM) (2.43 % p/p) y 37.32 g del extracto hidroalcohólico (EZHA) (7.46 % p/p).

Los cuatro extractos fueron separados en sus componentes (fracciones) mediante cromatografía en columna (CC) usando una columna abierta empacada con sílica-gel 60 GF<sub>254</sub> Merck. En todos los casos, la elución inicio con la adición gradual de n-hexano para remover grasas, ceras e inclusive restos de clorofila [49]. La polaridad fue aumentada mediante de adición de AcOEt (0% - 100%), mezclas de AcOEt-MeOH y finalmente con MeOH. Las columnas cromatográficas fueron monitoreadas mediante cromatografía de capa fina (CCF) en placas (4x5 cm) de sílica gel. Se recolectaron fracciones de entre 50 a 200 mL. Un total de 113 fracciones fueron obtenidas con el tratamiento de n-hexano, 67 con el tratamiento de AcOEt, 68 con el metanólico y 56 para el hidroalcohólico, dejándolas secar a temperatura ambiente. Las fracciones fueron unidas de acuerdo a los resultados obtenidos en la CCF. Cada placa fue revelada inicialmente con luz UV a distintas longitudes; 254 y 366 nm, y a continuación fueron reveladas con revelador universal (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/Ce<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)).

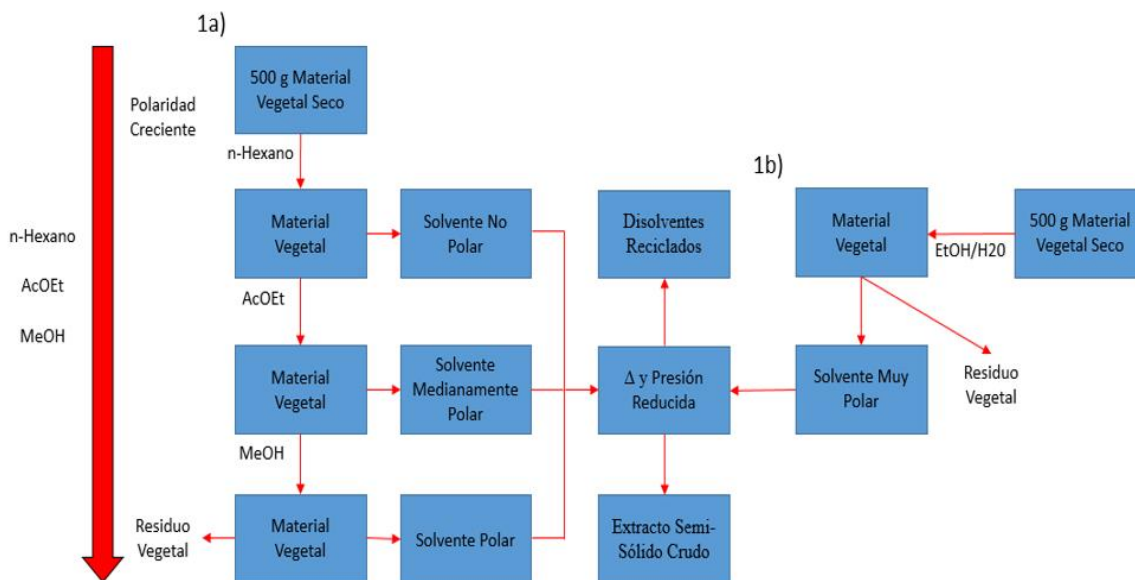


Diagrama 1a: Procedimiento para la obtención de los extractos hexánico, de acetato de etilo y metanólico de *C. graveolens*.

Diagrama 1b: Procedimiento para la obtención del extracto hidroalcohólico de *C. graveolens*.

## 6. Resultados y Discusión

### 6.1 Extracto hexánico. Productos sólidos

Se obtuvieron 29 sólidos mediante precipitación con mezclas de MeOH-AcoEt y filtración a presión reducida. Las características de los productos se describen en la tabla 5.

**Tabla 5: Características de los sólidos precipitados de las fracciones del extracto hexánico.**

Sólidos EZH	Cant. Recuperada (mg)	Apariencia	Color	P. de Fusión (°C)
15.1	82.9	Brilloso cristalino	Blanco ligeramente amarillo	68 - 71
15.2	109.2	Opaco amorfo	Blanco ligeramente amarillo	94 - 95
17	89.9	Opaco amorfo	Blanco-Café	63 - 75
18	76	Opaco amorfo	Gris	128 - 132
20	61.2	Opaco amorfo	Amarillo	N. D.
21-24	242	Opaco amorfo	Negro	N. D.
25	12	Opaco amorfo	Blanco ligeramente gris	N. D.
26-27	24.4	Opaco amorfo	Blanco	95 - 125
28	55.3	Opaco amorfo	Blanco-Café-Amarillo	N. D.
29-31	21.9	Opaco amorfo	Blanco ligeramente gris	140 - 142

N. D.: No Determinado.

#### 6.1.1 Elucidación estructural de la pinostrobin

De la fracción EZH 15.2, obtenida mediante una elución Hexano/AcoEt 8:2 en CC, se logró precipitar mediante exposición directa a MeOH un sólido amarillo blanquecino, fino y levemente terroso. El polvo blanco cremoso EZH 15.2 fue analizada mediante CCF usando distintas combinaciones de hexano-AcoEt y se mostró como un compuesto homogéneo con un rango de p.f. = 94 - 95° C. Este rango, se aproxima bastante a los estudios citados con anterioridad (100 - 101° C) [24, 35, 36, 48].

Del espectro  $^1\text{H}$  se puede concluir la presencia de dos anillos aromáticos gracias a las señales múltiples apreciadas de  $\delta$  7.37 a 7.41 y de  $\delta$  7.42 a 7.49, correspondientes a los anillos A y B (típicos en flavonoides) respectivamente. Únicamente dos señales fueron evidentes tanto en el espectro  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , siendo un grupo metóxido y un grupo hidroxilo. La señal del grupo metóxido aparece a  $\delta$  3.81 y corresponde al C-11 ( $\delta$  55.71), mientras que el protón del grupo hidroxilo en  $\delta$  12.02 no presenta correlaciones HSQC. Ambos están unidos al anillo A en C-5 ( $\delta$  164.19) -OH y en C-7 ( $\delta$  168.03) -OMe. El protón del grupo -OH es capaz de formar un puente de hidrógeno intramolecular con el carbonilo en la posición C-4 del anillo C, lo cual explica la débil correlación HMBC con el carbono carbonílico en  $\delta$  195.78. Además del grupo ceto (C-4), el anillo C está unido al anillo B en la posición C-2 ( $\delta$  79.26).

Consistente con el análisis espectral de  $^1\text{H}$ , el espectro  $^{13}\text{C}$  demostró la presencia de dos grupos, metileno (C-3) y metino (C-2) a  $\delta$  43.03 y  $\delta$  79.44 respectivamente, un

grupo metóxido (C-11) en  $\delta$  55.71 y una acetona conjugada (C-4) a  $\delta$  195.78. La localización del grupo metóxido (C-7) fue asignada con base en su nula correlación HMBC. La posición del protón del grupo -OH ( $\delta$  12.02) se determinó al observar sus relaciones débiles con  $\delta$  168.03 (C-7),  $\delta$  164.19 (C-5),  $\delta$  103.18 (C-10) y  $\delta$  95.12 (C-6).

Otra señal determinante viene del carbono resonante a  $\delta$  79.258 (C-2) y su correspondiente protón en  $\delta$  5.43, el cual muestra correlaciones con los protones adyacentes H-3ax. y H-3eq. a  $\delta$  2.08 y  $\delta$  3.09 los cuales son protones unidos a C-3 ( $\delta$  43.42). Dichos protones aparecen con una multiplicidad *dd* y a distinta  $\delta$  a pesar de estar unidos al mismo carbono (C-3) y de solo tener un protón adyacente a ellos (H-2). Esto se debe a la presencia del grupo -C=O en C-4 y al oxígeno en la posición 1 adyacentes a C-3 y a C-2, los cuales desprotegen a los protones H-3 de manera distinta y específica hacia cada uno de los protones. Esto origina un acoplamiento entre los protones H-3 del mismo carbono (C-3), volviéndolos no-equivalentes y generando así dos señales *dd* próximas entre ellas: H-3ax. y H-3eq., que se acoplan entre ellos y de manera individual con H-2. Debido al mismo fenómeno, H2 aparece como un *dd*. Correlaciones débiles entre C-2 a  $\delta$  79.26 y H2'-H6' en el anillo bencílico confirman la sustitución del anillo C en la posición C-2. La ausencia de correlaciones HSQC de los carbonos C-4, C-5, C-7, C-9, C-10 y 1' los exponen como carbonos cuaternarios. Las correlaciones entre HSQC y HMBC observadas, corresponden con la estructura de 5-hidroxi-7-metóxi-flavonona (pinostrobina). Además, C-2, como carbono quiral unido al anillo B mediante un enlace simple, le brinda propiedades ópticas a la pinostrobina. Esto se confirmó mediante la evaluación de la refracción óptica casi nula (negativa)  $\theta = -0.09$ . Este valor casi se debe a la proporción de la mezcla azotrópica entre los isómeros S y R. Los espectros  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC y HMBC se muestran en Anexos 8.2.a, 8.2.b, 8.2.c y 8.2.d respectivamente.

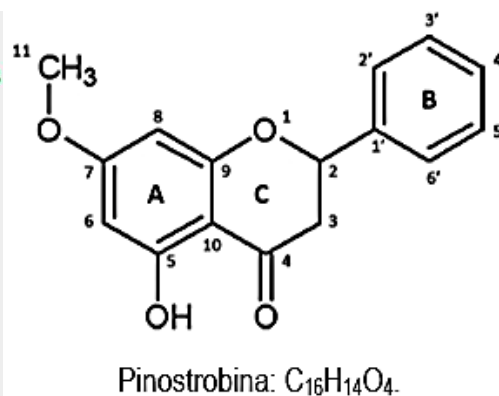
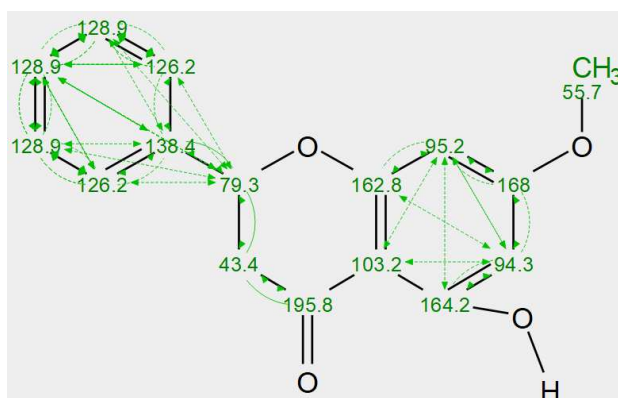


Figura 5: Correlaciones HMBC de la pinostrobina.

Figura 6: Numeración de la pinostrobina.

**Tabla 6. Data espectral  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del compuesto 15-2 aislado del extracto EZH. 600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ .**

Posición	EZH 15-2 $\delta$ $^1\text{H}$ [ppm] Hz (nH, m, J)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ [ppm]	HSQC	HMBC	Naturaleza del C
C-2	5.43 (1H, dd, 13.06, 3.01)	79.26	5.39	C3 43.42, C2' - C6' 126.15, 128.90 (c.d.)	-CH
C-3	2.83 (1H, dd, 17.2, 3.1) 3.09 (1H, dd, 17.2, 3.1)	43.42	2.72, 3.01	--	-CH <sub>2</sub>
C-4	--	195.78	--	C3 43.42, -OH (c.d.)	-C=O
C-5	--	164.19	--	-OH (c.d.), C6 94.30 (c.d.), C8 95.12 (c.d.)	-C-OH
C-6*	6.08 (1H, d, 2.3)	94.30	6.08	-OH (c.d.), C5 164.19 (c.d.), C7 168.03 (c.d.), C8 95.12 (c.d.), C9 162.82 (c.d.), C10 103.18 (c.d.)	-CH
C-7	--	168.03	--	-OH (c.d.), C6 94.30 (c.d.), C8 95.12 (c.d.), C11 55.71 (c.m.d.)	-C-OCH <sub>3</sub>
C-8*	6.08 (1H, d, 2.3)	95.12	6.07	C5 164.19 (c.d.), C6 94.30 (c.d.), C7 168.03 (c.d.), C9 162.82 (c.d.), C10 103.18 (c.d.)	-CH
C-9	--	162.82	--	C6 94.30 (c.d.), C8 95.12 (c.d.)	-C-C
C-10	--	103.18	--	-OH (c.d.), C6 94.30 (c.d.), C8 95.12 (c.d.)	-C-C
C-11	3.82 (3H, s)	55.71	3.81	--	-C-OCH <sub>3</sub>
C-1'	--	138.41	--	C2 79.26, C2' - C6' 126.15 (c.d.)	-C-C
C-2', 6'	7.45 (2H, m)	126.15	7.45	C2 79.26, H1' 138.41 (c.d.), C3' - C5' 128.90 (c.d.)	-CH
C-3', 4', 5'	7.44 (3H, m)	128.90	7.44	C2 79.26 (c.d.), H1' - C6' 126.15 (c.d.)	-CH
HC-OH	12.02 (1H, s)	--	--	C4 195.78, C5 164.19, C6 94.30, C7 168.03, C10 103.18	--

C-n\* = Señales intercambiables. c.d. = Correlación Débil. c.m.d. = Correlación Muy Débil.

### 6.1.2 Elucidación estructural del estigmasterol/ $\beta$ -sitoesterol

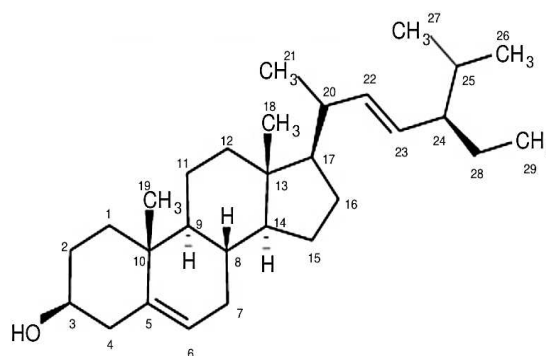
De la fracción EZH 29-31, obtenida mediante una elución hexano/AcOEt 6:4 en CC, se logró precipitar mediante exposición directa a MeOH un sólido blanquecino grisáceo, fino y con apariencia terrosa-cristalina. Los espectros  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , HSQC y HMBC obtenidos se muestran en Anexos 8.3.a, 8.3.b, 8.3.c y 8.3.d respectivamente.

El espectro  $^1\text{H}$  varía de  $\delta$  0.54 – 5.18 ppm (región de protones  $\text{sp}^3$ ) y una señal simple característica para el protón del  $-\text{OH}$  en  $\delta = 7.26$  ppm sobre el C-3 ( $\delta$  71.06 ppm). Así mismo, muestra la presencia de 6 señales intensas indicando la presencia de seis grupos metilo en:  $\delta$  0.54, 0.80, 0.83, 0.85, 1.03 y 1.25 ppm. Desplazamientos de  $\delta$  5.03 ppm (C-22,  $\delta$  138.18), 5.16 ppm (C-10,  $\delta$  43.31) y 5.35 ppm (C-23,  $\delta$  129.47 ppm) sugieren la presencia de tres de protones  $\text{sp}^2$ . El espectro  $^{13}\text{C}$  arroja dos señales, una a  $\delta$  19.011 y 12.257 ppm, las cuales corresponden a los grupos metilos de C18 ( $\delta$  0.93, 0.82) y C19 ( $\delta$  0.54). El protón correspondiente al C-3 ( $\alpha$  a  $-\text{OH}$ ) se muestra como un dt a  $\delta$  3.594 ppm.

De acuerdo con la literatura [49, 50, 51], el estigmasterol casi siempre se encuentran en una mezcla con otros esteroides. En el caso del estigmasterol y el  $\beta$ -sitoesterol, la única diferencia entre ambas moléculas radica en la presencia del doble enlace C=C entre los carbonos C-22 y C-23 en el estigmasterol, característica que el  $\beta$ -sitoesterol no posee. Sin embargo, los datos obtenidos de los espectros no son diferentes de los reportados en la literatura [49, 52]. Por lo tanto, el compuesto aislado EZH 15.2 es una mezcla de estigmasterol y  $\beta$ -sitoesterol. El estigmasterol y el  $\beta$ -sitoesterol poseen p.f. de 174 - 176° C [53] y 147 - 149° C [49] respectivamente. El sólido EZH 15.2 posee un p.f. de 140 - 142° C.

**Tabla 7. Data espectral  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de los compuestos aislados del extracto EZH. 600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ .**

Estigmasterol  
 $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}$



Posición	EZH 29-31			Posición	EZH 29-31		
	$\delta$ $^1\text{H}$ [ppm] (nH, m)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ [ppm]	Naturaleza del C		$\delta$ $^1\text{H}$ [ppm] (nH, m)	$\delta$ $^{13}\text{C}$ [ppm]	Naturaleza del C
C-1	1.72 (H, m) 1.27 (H, m)	37.98	$-\text{CH}_2$	C-16	1.77 (H, m) 1.27 (H, m)	29.68	$-\text{CH}_2$
C-2	1.80 (H, m) 1.08 (H, m)	37.13	$-\text{CH}_2$	C-17	1.81 (H, m)	55.11	$-\text{CH}$
C-3	3.60 (H, sep.)	71.05	$\alpha$ to $\text{HC}-\text{OH}$	C-18	0.81 (3H, m)	12.22	$-\text{CH}_3$
C-4	1.03 (H, m)	34.21	$-\text{CH}_2$	C-19	1.09 (3H, m)	21.35	$-\text{CH}_3$
C-5	--	139.55	$-\text{C}=\text{CH}$	C-20	2.01 (H, m)	40.80	$-\text{CH}$
C-6	5.16 (H, dd)	117.44	$-\text{C}=\text{CH}$	C-21	1.58 (3H, s)	21.53	$-\text{CH}_3$
C-7	1.81 (H, m)	31.47	$-\text{CH}_2$	C-22	5.16 (H, dd)	138.13	$\text{HC}=\text{CH}$
C-8	1.39 (H, m)	40.25	$-\text{CH}$	C-23	5.03 (H, dd)	129.43	$\text{HC}=\text{CH}$
C-9	1.64 (H, m)	49.44	$-\text{CH}$	C-24	1.53 (H, m)	51.23	$-\text{CH}$

C-10	--	28.48	R <sub>4</sub> -C	C-25	1.53 (H, m)	31.86	-CH
C-11	0.85 (H, m)	21.06	-CH <sub>2</sub>	C-26	0.93 (3H, m)	18.97	-CH <sub>3</sub>
C-12	2.01 (H, m) 1.27 (H, m)	39.45	-CH <sub>2</sub>	C-27	0.85 (3H, m)	13.02	-CH <sub>3</sub>
C-13	--	43.27	R <sub>4</sub> -C	C-28	1.17 (H, m) 1.43 (H, m)	25.37	-CH <sub>2</sub>
C-14	1.27 (H, m)	55.89	-CH	C-29	0.54 (3H, d)	12.03	-CH <sub>3</sub>
C-15	1.39 (H, m) 1.53 (H, m)	23.00	-CH <sub>2</sub>	HC-OH	3.52 (H, )	--	--

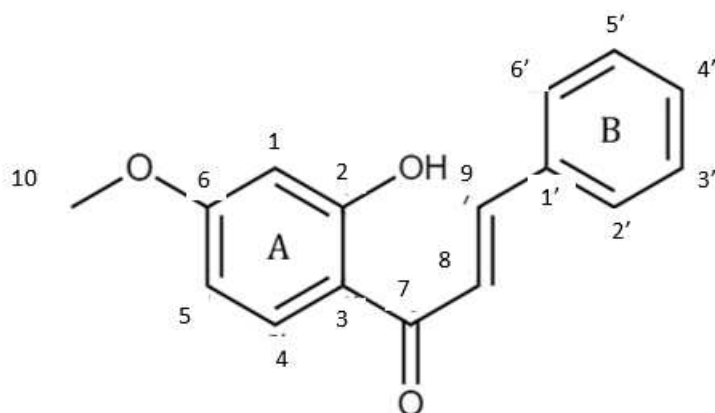
## 6.2 Extracto de AcOEt. Productos sólidos

Mediante exposición con n-hexano, se lograron precipitar tres sólidos correspondientes al extracto con AcOEt. Las características de los productos se describen en la tabla 8.

**Tabla 8: Características de los sólidos precipitados de las fracciones del extracto de AcOEt.**

Sólidos EZA	Cant. Recuperada (mg)	Apariencia	Color	P. de Fusión (°C)
18	29	Opaco amorfo	Ligeramente dorado	142 – 144°
19-25	2.5	Opaco amorfo	Negro	--
35-41	633.5	Brillante amorfo	Negro ligeramente verde aceituna	--

De las fracciones eluidas con hexano/AcOEt: 8:2 se obtuvieron 29 mg de chalcona de pinostrobinina (EZA 18), en forma de agujas incoloras con un punto de fusión de 142 – 144° C (lit.: 145° C). Los datos espectroscópicos obtenidos se muestran a continuación: <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm) 8.1 (1H, *d*, J=15.5 Hz), 7.9 (1H, *d*, J=15.5Hz, H-β), 7.7 (d, J=15.5Hz, H-α), 7.62 (1H, *d*, J=8 Hz, H-2), 7.3-7.4 (3H, *m*, H-2), 7.3-7.4 (6.0 (1H, *d*, J=2.4 Hz; H-3'), 5.9 (1H, *d*, J=2.4 Hz, H-5'), 3.68 (3H, *s*, CH<sub>3</sub>O-). <sup>3</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm), <sup>13</sup>C-NMR (150MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm), 192.1 (C=O), 165.8 (C-4'), 164.1 (C-2', C-6'), 141.8 141.8 (C-7), 134 (C-1), 139 (C-3, C-4, C-5), 128.2 (C-6), 127.3 (C-8), 93.3 (C-3', C-5'), 55.3 (CH<sub>3</sub>O).



Chalcona de pinostrobinina:  
C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>

### 6.3 Extracto hidroetanólico. Productos sólidos

Mezclas de n-hexano/AcOEt/MeOH fueron útiles en la precipitación de las fracciones hidroalcohólicas. Un total de siete sólidos fueron recolectados. Las características de los productos sólidos se describen en la tabla 10.

**Tabla 10: Características de los sólidos precipitados de las fracciones del extracto de Hidroalcohólico.**

Sólidos EZHA	Cant. Recuperada (mg)	Apariencia	Color	P. de Fusión (°C)
2.1	95.3	Brilloso amorfo	Durazno	205 - 210
2.2	1.8	Opaco amorfo	Blanco	
2.3	337	Brilloso amorfo	Verde crema	174 - 180
3	18.4	Brilloso amorfo	Gris ligeramente color café	N. D.
11	259.2	Polvo fino, opaco y ligeramente brillante	Gris Oxford	45 - 58
21-24.1	83.6	Terrones opacos	Gris ligeramente color café y blanco	N. D.
21-24.2	10.5	Terrones opacos con aspecto humedecido	Gris	N. D.

N. D.: No Determinado.



## 7. Conclusiones

El estudio fitoquímico realizado a la especie *Chenopodium graveolens* (Epazote del Zorrillo) brindó la oportunidad de aislar e identificar: los esteroides; estigmasterol y  $\beta$ -sitosterol, las flavanonas pinostrobin y pinocembrina, la chalcona de pinocembrina y la flavona crisina.

La estructura de dichos compuestos fue determinada con base en métodos espectroscópicos y comparando sus propiedades físicas reportadas previamente. Los ensayos espectroscópicos de RMN  $^1\text{H}$   $^{13}\text{C}$  de los sólidos aislados se basaron en la información de experimentos bidimensionales de HSQC y HMBC. Por otro lado, el método utilizado para el aislamiento de estos productos, con la cantidad utilizada de material crudo (500 g), superpone un rendimiento aceptable tratándose de técnicas y procedimientos fitoquímicos.

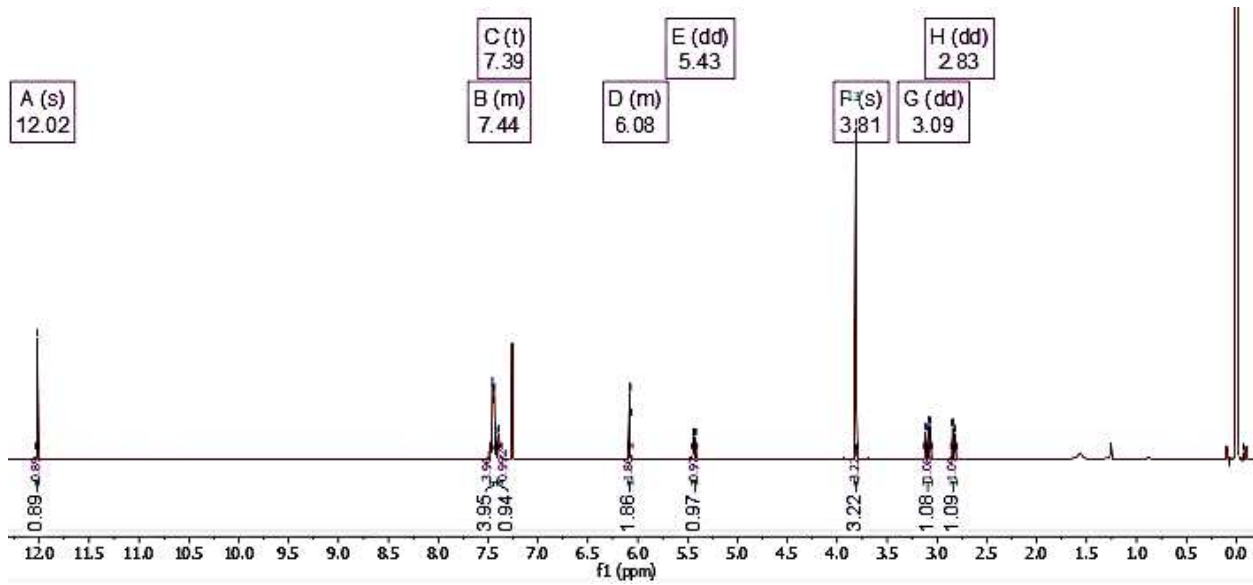
Verificar la presencia de metabolitos farmacológicamente activos supone una presunción de las posibles propiedades medicinales que se podrían obtener mediante el uso de *C. graveolens*. Los estudios farmacológicos de dichos metabolitos son necesarios para lograr visualizar el campo de estudio donde se podría aplicar el uso de *C. graveolens*. Así mismo, la presencia de dichos metabolitos justifica el uso tradicional que se le ha atribuido a *C. graveolens* desde tiempos prehispánicos.

Este trabajo abre las puertas a estudios posteriores enfocados a mejorar las técnicas utilizadas para el aislamiento de metabolitos fitoquímicos y a probar los posibles efectos farmacológicos que posee *C. graveolens* debido a su composición química.

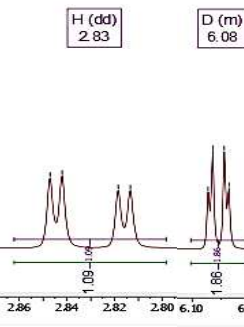
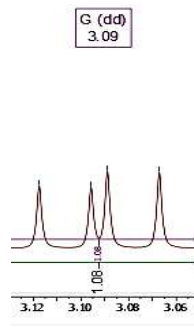
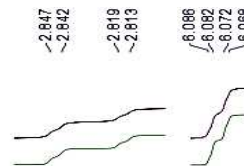
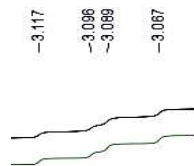
## 8. Anexos

### 8.1) Espectros $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ . Pinostrobin.

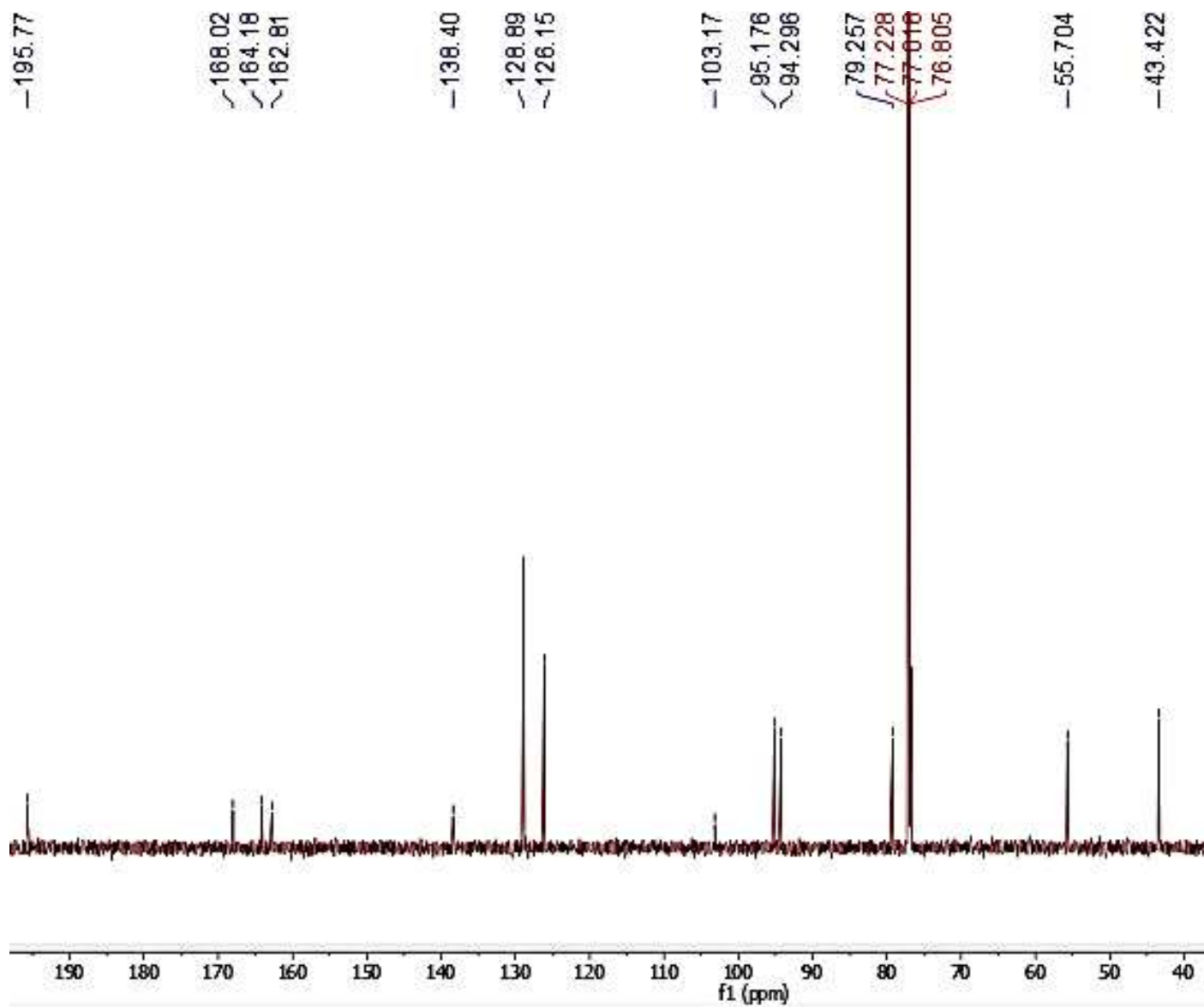
a)



Espectro 1.  
RMN  $^1\text{H}$  de la  
pinostrobin  
(EZH-15.2).

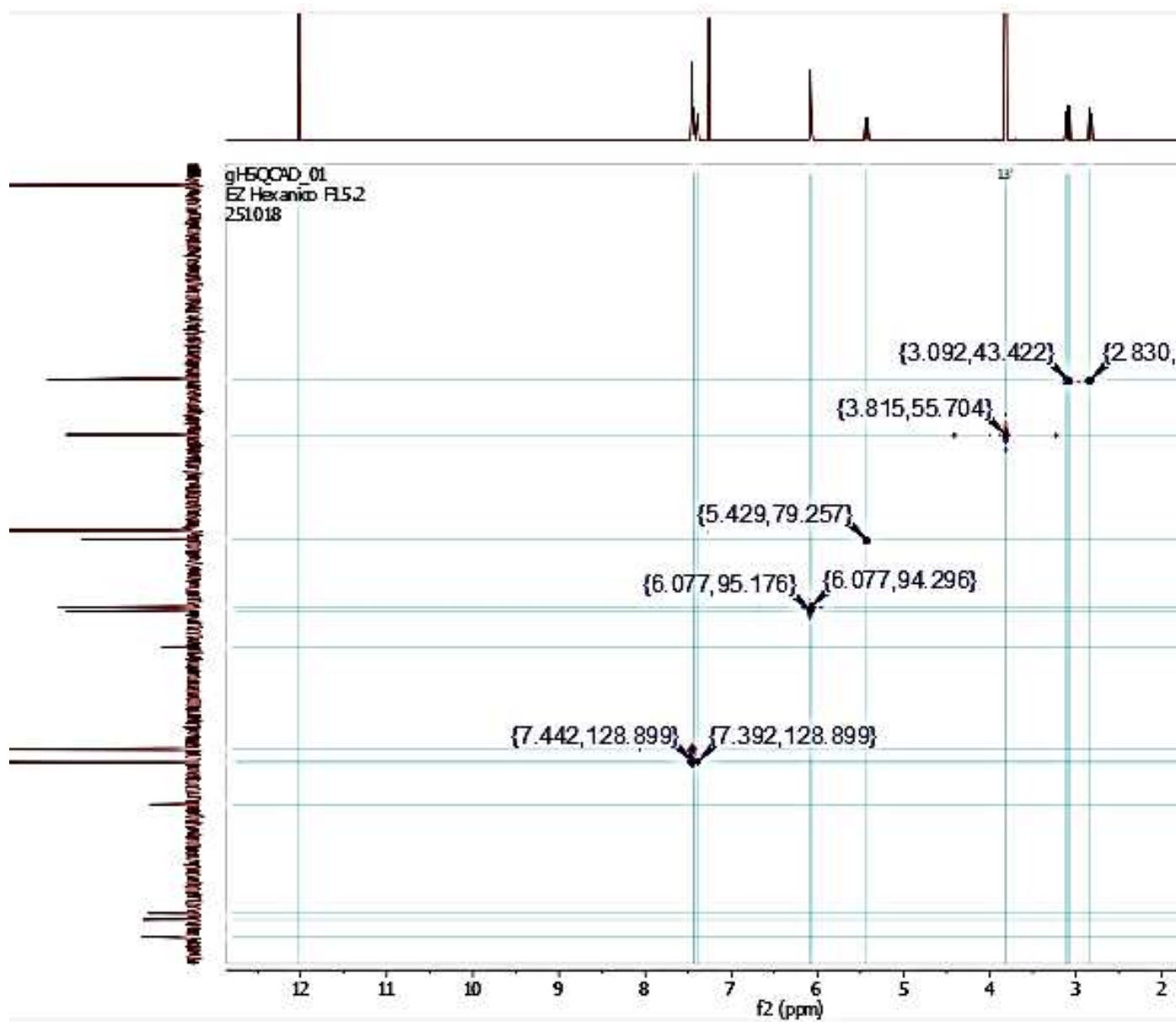


b)



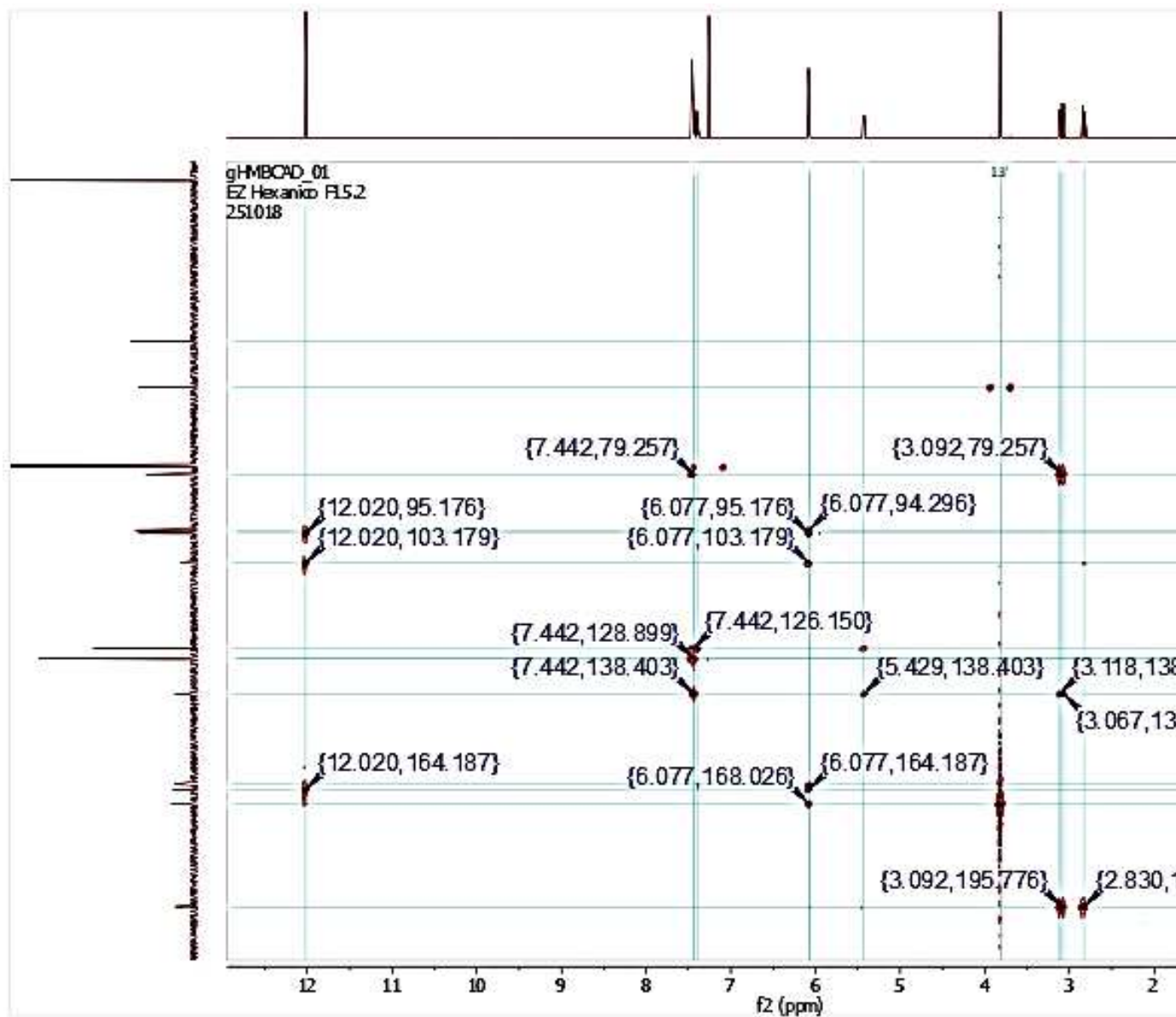
Espectro 2. RMN <sup>13</sup>C de la pinostrobin (EZH-15.2).

c)



Espectro 3. HSQC de la pinostrobin (EZ-15.2).

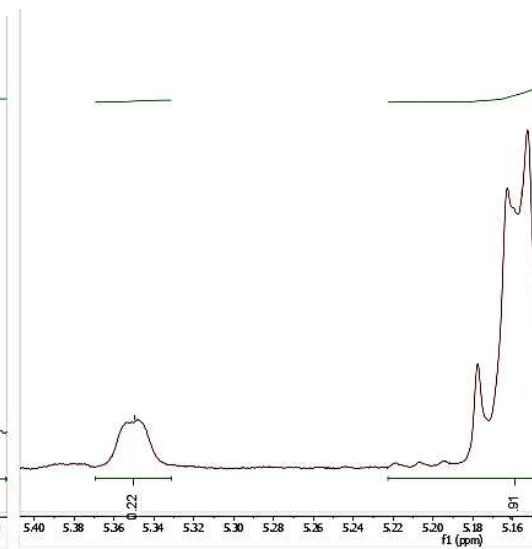
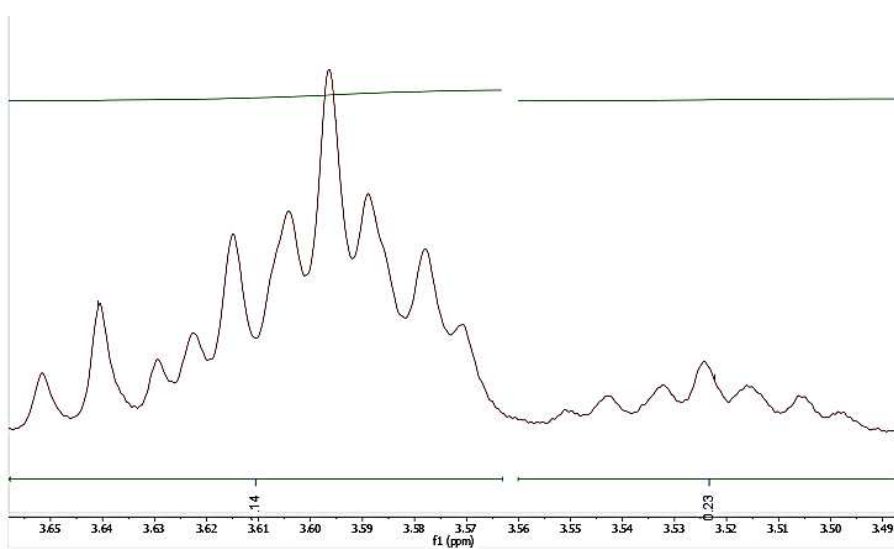
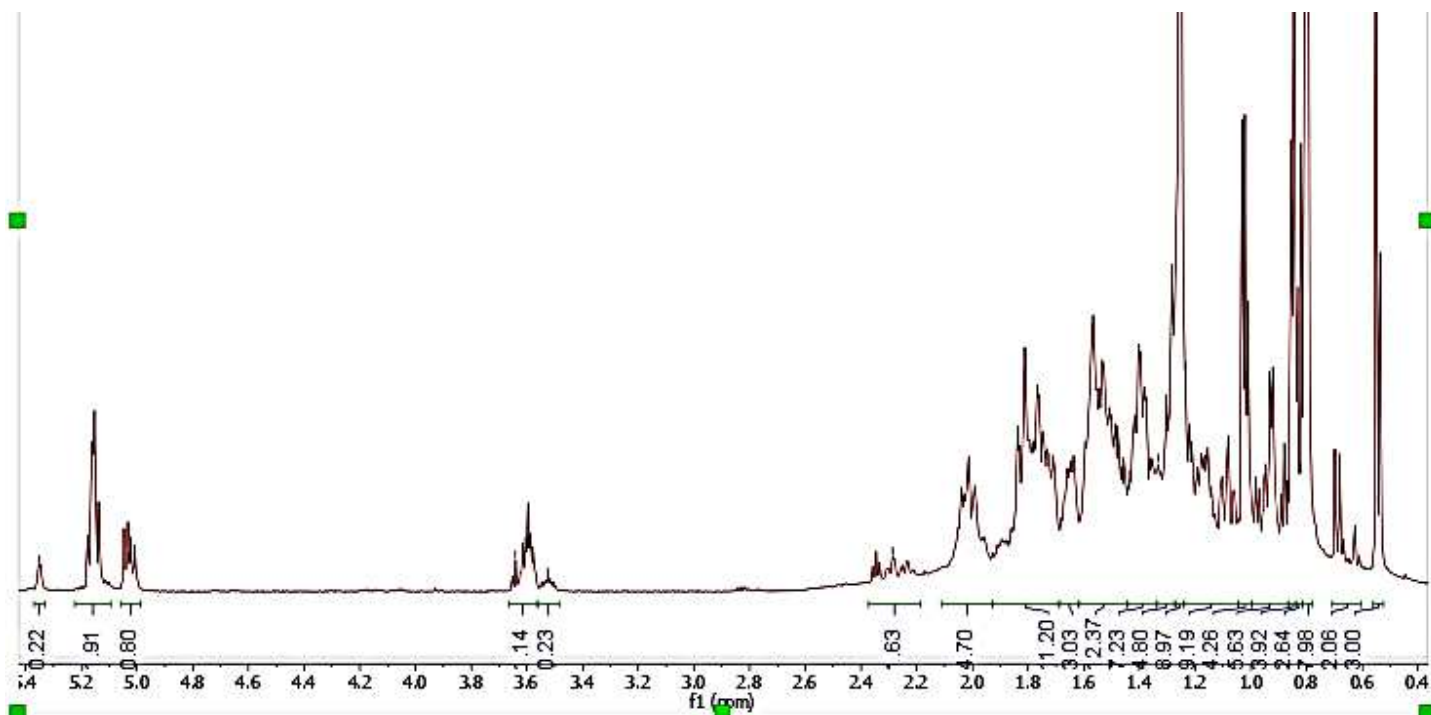
d)



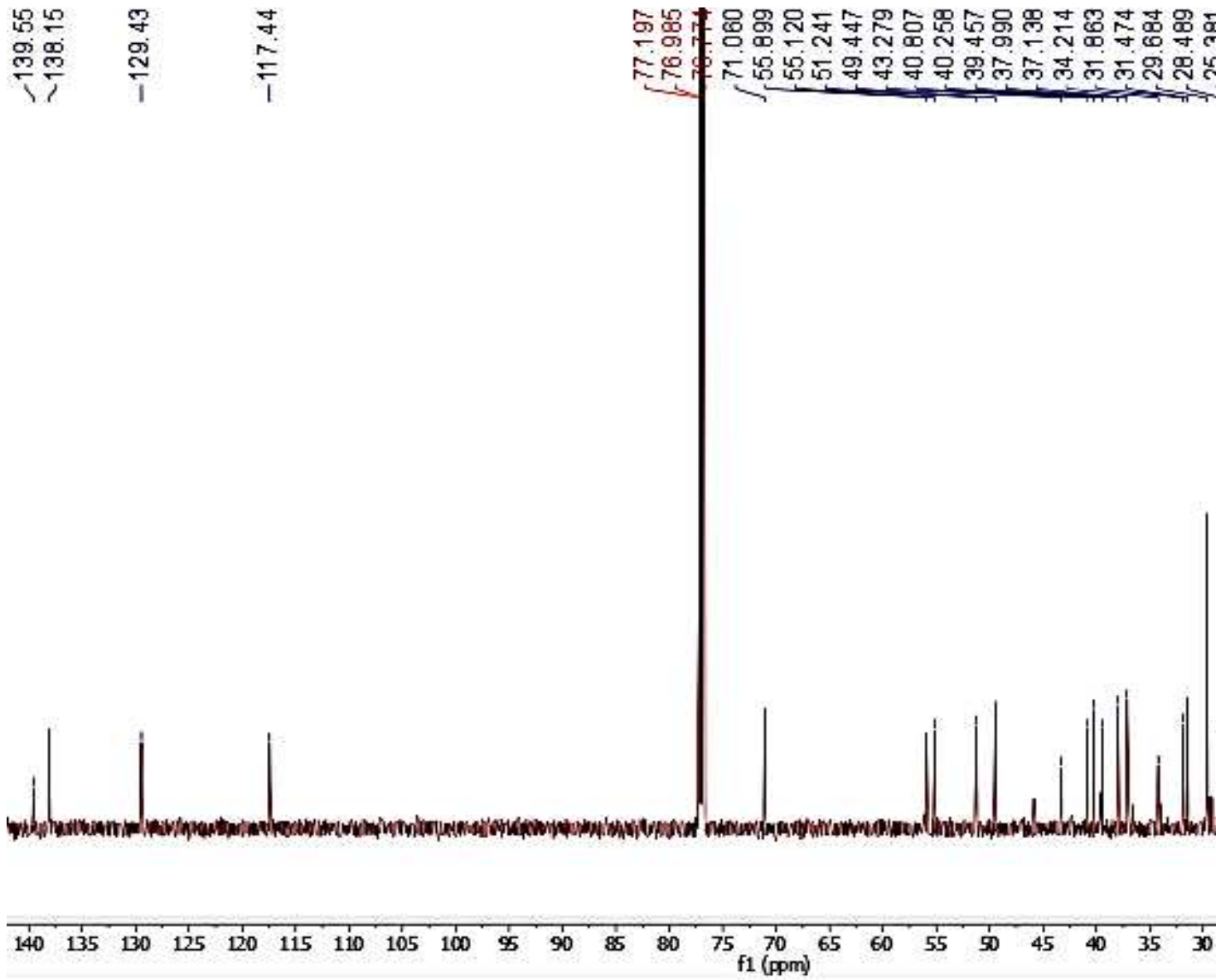
Espectro 4. HMBC de la pinostrobin (EZH-15.2).

## 8.2) Espectros $^1\text{H}$ $^{13}\text{C}$ . Estigmasterol.

a)

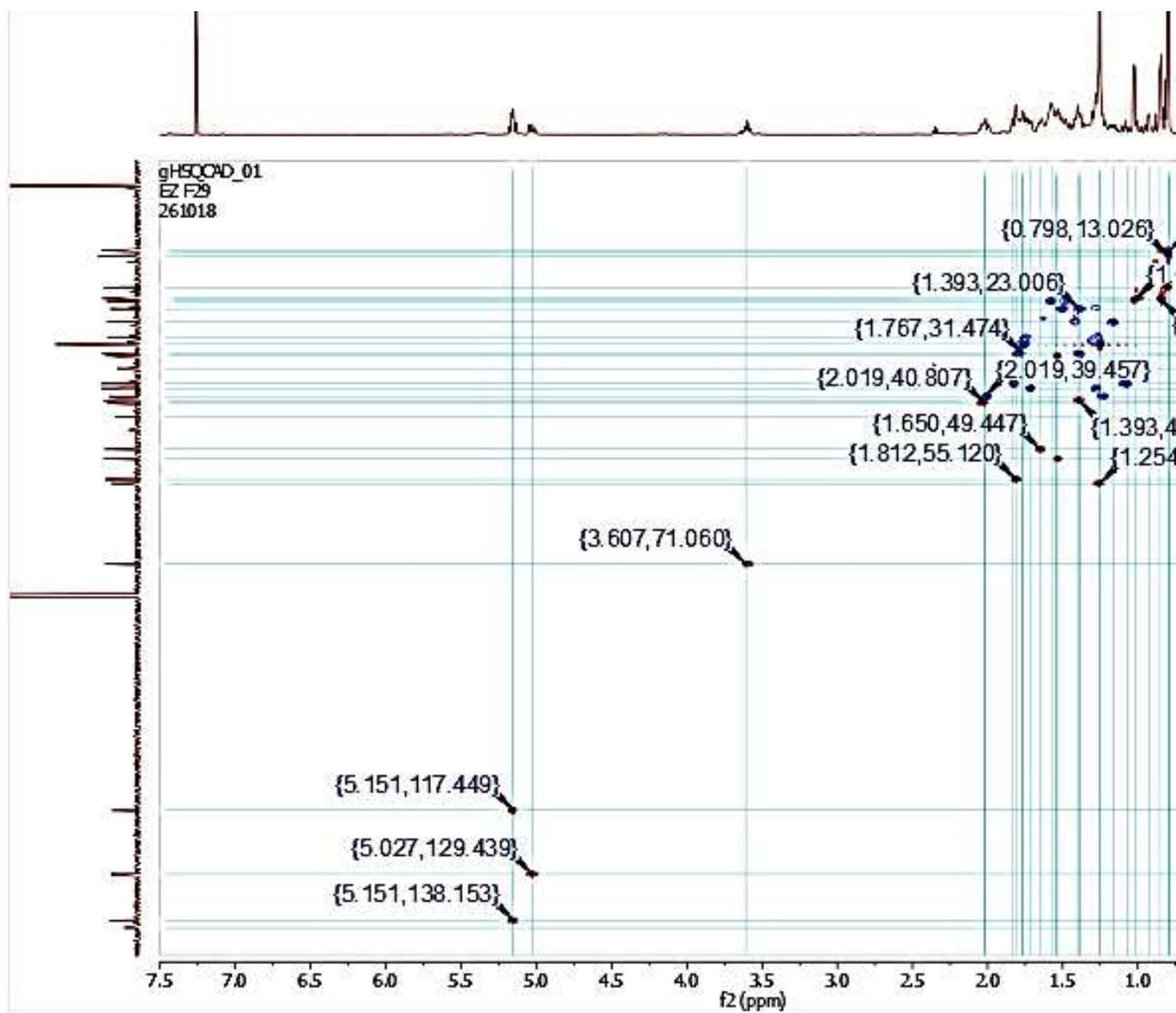


b)



Espectro 6. RMN  $^{13}\text{C}$  del estigmasterol (EZH 29-31).

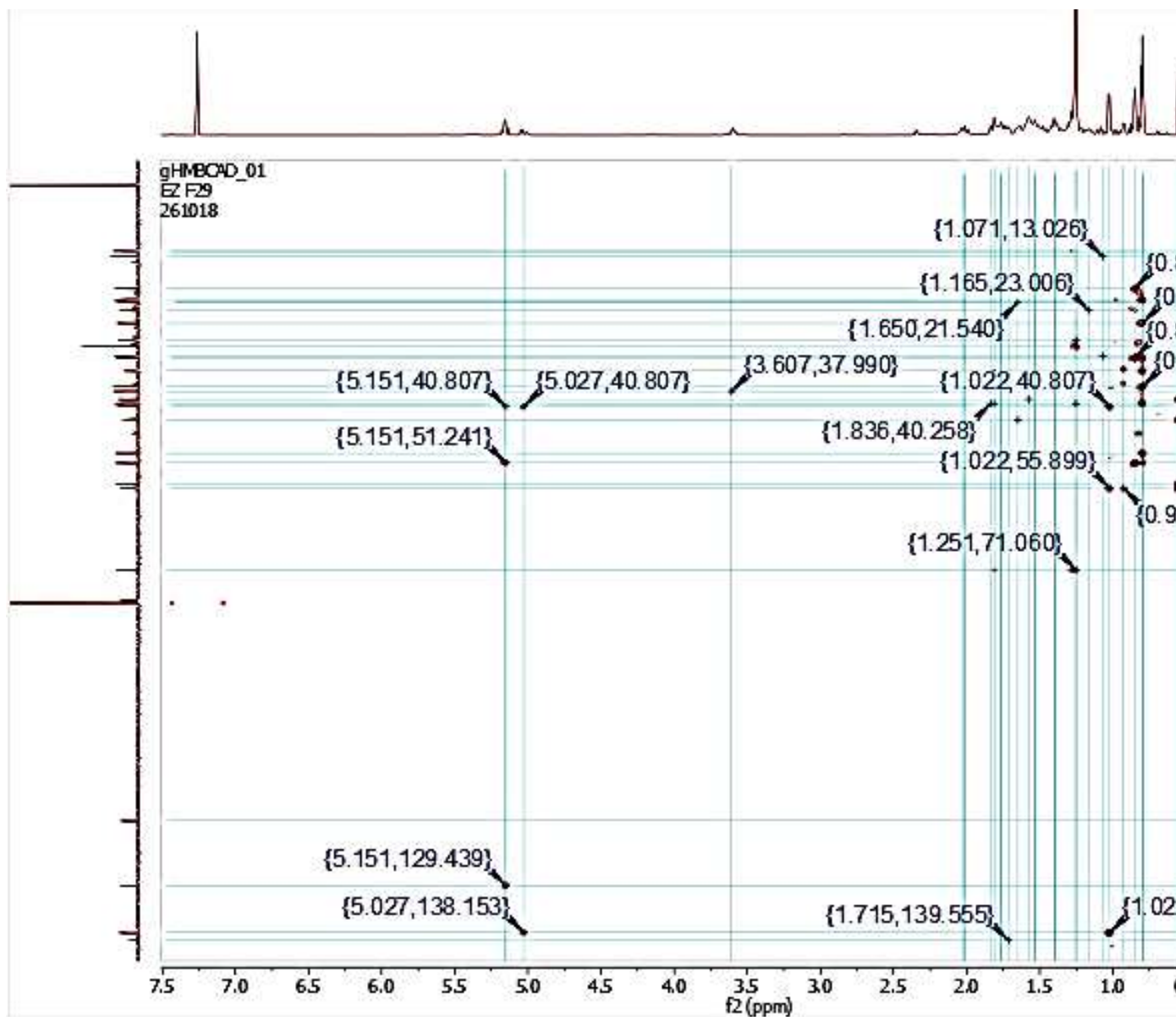
c)



Espectro 7. HSQC del estigmasterol (EZH 29-31).



d)



Espectro 8. HMBC del stigmasterol (EZH 29-31).

## 9. Referencias

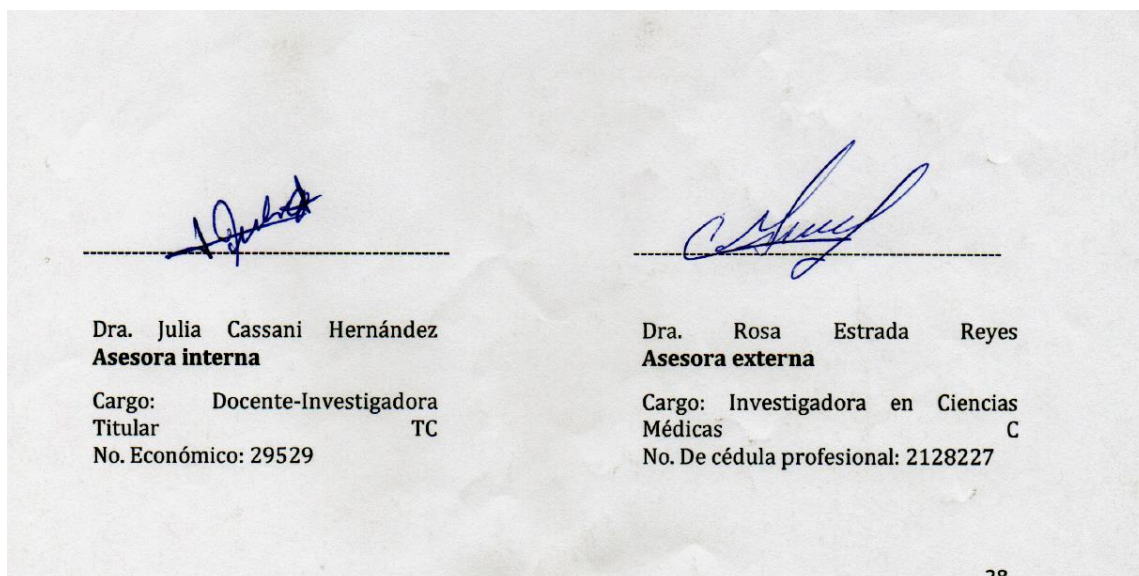
1. Villacres E., Cuadrado L., Falconí F. Los granos andinos: Chocho (*Lupinus mutabilis* Sweet), Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd), Amaranto (*Amaranthus caudatus* L.) y Sangorache (*Amaranthus hybridus* L.), fuente de metabolitos secundarios y fibra dietética. Departamento de Nutrición y Calidad, INIAP, Facultad de Ciencias de la Salud, UNACH.
2. Cronquist, A. (1981). An integrated system of classification of flowering plants. New York, Columbia University Press.
3. The angiosperm phylogeny group. (2003). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*, pp. 399–436.
4. Müller K., Borsch T. (2005). Phylogenetics of Amaranthaceae Based on matK/trnK Sequence Data: Evidence from Parsimony, Likelihood, and Bayesian Analyses. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, Vol. 92, No. 1, pp. 66-102.
5. Judd, W.S., Campbell C.S., Kellogg E.A., Stevens P.F., Donoghue M.J. (2002). *Plant Systematics –A Phylogenetic Approach*, Second edition. Sunderland, Massachusetts: Sinauer.
6. Milena Bonilla A. (2017). Estudio de las propiedades farmacológicas y análisis fitoquímico de los extractos de *Gomphrena perennis* L. (Amaranthaceae). Universidad Nacional de la Plata. Facultad de Ciencias Exactas., 8 Guía de Consultas Botánica II. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura (UNNE) Caryophyllidae-Amaranthaceae.
7. Diversidad Vegetal- Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura (UNNE) Core Eudicotiledóneas.
8. Beato A., Cuadrado R., Prada L., Aljón J. (1984). Características Histológicas de Especies del Género *Chenopodium* L., Dpto. de Citología e Histología Vegetal y Animal. Fac. de Biología. Salamanca. *STVDIA Botánica* 3, pp. 287-293.
9. Hernández, N., Tereschuk, M. L., Abdala, L. R., 2000. Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Taff del Valle (Tucumán, Argentina). *Journal of Ethnopharmacology* 73; 17–322.
10. Vázquez-Covarrubias, D. A., Jiménez-Pérez, A., Castrejón-Ayala, F., Figueroa-Brito R., Montes, R., 2015. Effects of five species of Chenopodiaceae on the development and reproductive potential of *Copitarsia decolora* (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomologist*; 98, No. 1.
11. Richardson, M. 1978. Flavonols and C-glycosylflavonoids o the Caryophyllales. *Bioche. Syst. & Ecol.* 6: 283-286.
12. Gornall, R.J., Bohm, B. A. & Dahlgren, R.M.T. 1979. The distribution of flavonoids in the angiosperms. *Bot. Notiser* 132: 1-30.
13. Woldu, Y. & Abegaz, B. 1990. Isoflavonoids from *Salsola somalensis*. *Phytochemistry.* 29: 2013-2015.
14. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. (2009). Ciudad de México, Distrito Federal. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Recuperado de; <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Cchenopodium%20graveolens&id=7647>

15. Mondragón J., Vibrans H. y Tenorio P. (2004-2009). Chenopodiaceae. *Chenopodium graveolens* Willd. Epazote de zorrillo. Conabio. Recuperado de; <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/chenopodiaceae/chenopodium-graveolens/fichas/pagina1.htm>
16. Rzedowski, G. C. de y J. Rzedowski. (2001). Flora fanerogámica del Valle de México. 2ª ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.
17. UNAM. 2009. Epazote de zorrillo. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Consultado el 15 de Enero 2017 en <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=C henopodium%20graveolens&id=7647>
18. Diccionario Enciclopédico de la Medicina Tradicional Mexicana. Ciudad de México, Distrito Federal. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Recuperado de; <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/termino.php?l=1&t=sust o>
19. Richardson, M. 1978. Flavonols and C-glycosylflavonoids o the Caryophyllales. *Bioche. Syst. & Ecol.* 6: 283-286.
20. Hernández, N., Tereschuk, M. L., Abdala, L. R., 2000. Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tañá del Valle (Tucumán, Argentina). *Journal of Ethnopharmacology* 73; 17-322.
21. Vázquez-Covarrubias, D. A., Jiménez-Pérez, A., Castrejón-Ayala, F., Figueroa-Brito R., Montes, R., 2015. Effects of five species of Chenopodiaceae on the development and reproductive potential of *Copitarsia decolora* (Lepidoptera: Noctuidae). *Florida Entomologist*; 98, No. 1.
22. Richardson, M. 1978. Flavonols and C-glycosylflavonoids o the Caryophyllales. *Bioche. Syst. & Ecol.* 6: 283-286., 20 Gornall, R.J., Bohm, B. A. & Dahlgren, R.M.T. 1979. The distribution of flavonoids in the angiosperms. *Bot. Notiser* 132: 1-30.
23. Tereschuk M., Quarenghi M., González M., Baigorí M. (2007). Actividad Antimicrobiana De Flavonoides Aislados de Tagetes del NOA. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 6 (6), 364-366. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85617472026>.
24. Mata R., Navarrete A., Álvarez L., Pereda-Miranda R., Delgado G. y Romo de Vivari A. (1987). Flavonoids and terpenoids of *Chenopodium graveolens*. *Fac. de Química, UNAM. Phytochemistry Vol. 26. No 1*, pp. 191-193.
25. UNAM. 2009. Epazote de zorrillo. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Consultado el 15 de Enero 2017 en <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=C henopodium%20graveolens&id=7647>
26. Bye, R.A., 1986. Medicinal plants of the Sierra Madre: Comparative study of tarahumara and Mexican market plants. *Econ Bot* (1986) 40: 103.
27. Kicuntod J., Sangpheak K., Mueller M., Wolschann P., Viernstein H., Yanaka S., Kato K., Chavasiri W., Pongsawasdi P., Kungwan, N., Rungrotmongkol T. (2018). Theoretical and Experimental Studies on Inclusion Complexes of Pinostrobin and  $\beta$ -Cyclodextrins. *Scientia pharmaceutica*, 86(1), 5. doi: 10.3390/scipharm86010005.

28. Wu, N., Kong, Y., Zu, Y., Fu, Y., Liu, Z., Meng, R., Liu, X., Efferth, T. (2011). Activity investigation of pinostrobin towards herpes simplex virus-1 as determined by atomic force microscopy. *Phytomedicine*, 18(2-3), 110–118. doi:10.1016/j.phymed.2010.07.001.
29. Atun, S., Arianingrum, R., Sulistyowati, E., & Aznam, N. (2013). Isolation and antimutagenic activity of some flavanone compounds from *Kaempferia rotunda*. *International Journal of Chemical and Analytical Science*, 4(1), 3–8. doi:10.1016/j.ijcas.2013.03.004
30. Kaur, K., Jain, M., Kaur, T., & Jain, R. (2009). Antimalarials from nature. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17(9), 3229–3256. doi: 10.1016/j.bmc.2009.02.050.
31. Wu, N., Fu, K., Fu, Y.-J., Zu, Y.-G., Chang, F.-R., Chen, Y.-H., Liu X.-L., Kong Y., Liu W., Gu C.-B. (2009). Antioxidant Activities of Extracts and Main Components of Pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] Leaves. *Molecules*, 14(3), 1032–1043. doi:10.3390/molecules14031032.
32. Geibel M. (1995). Sensitivity of the fungus *Cytospora personii* to the flavonoids of *Prunus cerasus*. *Phytochemistry*. 599–601. doi: 10.1016/0031-9422(94)00525-X.
33. Abdelwahab, S. I., Mohan, S., Abdulla, M. A., Sukari, M. A., Abdul, A. B., Taha, M. M. E., Syam S., Ahmad S., Lee K.H. (2011). The methanolic extract of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. and its major compound pinostrobin induces anti-ulcerogenic property in vivo: Possible involvement of indirect antioxidant action. *Journal of Ethnopharmacology*, 137(2), 963–970. doi: 10.1016/j.jep.2011.07.010.
34. Patel, N. K., & Bhutani, K. K. (2014). Pinostrobin and *Cajanus* lactone isolated from *Cajanus cajan* (L.) leaves inhibits TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  production: In vitro and in vivo experimentation. *Phytomedicine*, 21(7), 946–953. doi: 10.1016/j.phymed.2014.02.011.
35. Le Bail, J.-C., Aubourg, L., & Habrioux, G. (2000). Effects of pinostrobin on estrogen metabolism and estrogen receptor transactivation. *Cancer Letters*, 156(1), 37–44. doi: 10.1016/s0304-3835(00)00435-3
36. Cao X.D., Ding Z.S., Jiang F.S., Ding X.H., Chen J.Z., Chen S.H., Lv G.Y. (2012). Antitumor constituents from the leaves of *Carya cathayensis*. *Nat. Prod. Res.* 2089–2094. doi: 10.1080/147864419.2011.628174.
37. Jesus, R. S., Piana, M., Freitas, R. B., Brum, T. F., Alves, C. F. S., Belke, B. V., ... Bauermann, L. de F. (2018). In vitro antimicrobial and antimycobacterial activity and HPLC–DAD screening of phenolics from *Chenopodium ambrosioides* L. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(2), 296–302. doi:10.1016/j.bjm.2017.02.012
38. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0185-33252012000500004](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33252012000500004)
39. <https://cerac.unlpam.edu.ar/index.php/veterinaria/article/view/1963/0>
40. Antwi, A. O., Obiri, D. D., Osafo, N., Essel, L. B., Forkuo, A. D., & Atobiga, C. (2018). *Stigmasterol Alleviates Cutaneous Allergic Responses in Rodents*. *BioMed Research International*, 2018, 1–13. doi:10.1155/2018/3984068
41. Kangsamaksin, T., Chaithongyot, S., Wootthichairangsan, C., Hanchaina, R., Tangshewinsirikul, C., & Svasti, J. (2017). *Lupeol and stigmasterol suppress*

- tumor angiogenesis and inhibit cholangiocarcinoma growth in mice via downregulation of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *PLOS ONE*, 12(12), e0189628. doi:10.1371/journal.pone.0189628
42. Feng, S., Dai, Z., Liu, A., Wang, H., Chen, J., Luo, Z., & Yang, C. S. (2017).  $\beta$ -Sitosterol and stigmaterol ameliorate dextran sulfate sodium-induced colitis in mice fed a high fat Western-style diet. *Food & Function*, 8(11), 4179–4186. doi:10.1039/c7fo00375g
  43. Ali, H., Dixit, S., Alqahtani, S., Ali, D., Alkahtani, S., & Alarifi, S. (2015). Isolation and evaluation of anticancer efficacy of stigmaterol in a mouse model of DMBA-induced skin carcinoma. *Drug Design, Development and Therapy*, 2793. doi:10.2147/dddt.s83514
  44. Antwi, A. O., Obiri, D. D., & Osafo, N. (2017). Stigmaterol Modulates Allergic Airway Inflammation in Guinea Pig Model of Ovalbumin-Induced Asthma. *Mediators of Inflammation*, 2017, 1–11. doi:10.1155/2017/2953930
  45. Lan, X., Wang, W., Li, Q., & Wang, J. (2015). The Natural Flavonoid Pinocembrin: Molecular Targets and Potential Therapeutic Applications. *Molecular Neurobiology*, 53(3), 1794–1801. doi:10.1007/s12035-015-9125-2
  46. Liu, R., Wu, C., Zhou, D., Yang, F., Tian, S., Zhang, L., ... Du, G. (2012). Pinocembrin protects against  $\beta$ -amyloid-induced toxicity in neurons through inhibiting receptor for advanced glycation end products (RAGE)-independent signaling pathways and regulating mitochondrion-mediated apoptosis. *BMC Medicine*, 10(1). doi:10.1186/1741-7015-10-105
  47. Lan, X., Han, X., Li, Q., Li, Q., Gao, Y., Cheng, T., ... Wang, J. (2017). Pinocembrin protects hemorrhagic brain primarily by inhibiting toll-like receptor 4 and reducing M1 phenotype microglia. *Brain, Behavior, and Immunity*, 61, 326–339. doi:10.1016/j.bbi.2016.12.012
  48. Smolarz H. D., Mendyk E., Bogucka-Kocka A., & Kockic J. (2006). Pinostrobin – An Anti-Leukemic Flavonoid from Polygonum lapathifolium L. ssp. nodosum (Pers.) Dans. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 61(1-2), 64–68. doi:10.1515/znc-2006-1-212.
  49. Luhata L. P., Munkombwe, N. M., (2015). Isolation and Characterisation of Stigmaterol and B-Sitosterol from *Odontonema Strictum* (Acanthaceae). *JIPBS*, Vol 2 (1), 88-95. Recuperado de [http://www.jipbs.com/VolumeArticles/FullTextPDF/51\\_JIPBSV21113.pdf?fbclid=IwAR1ola0tzSW8r\\_Shzh5s\\_rUMC2EvGGOxymLthScyY0wEmRgX7\\_c4yUeL\\_Xtk](http://www.jipbs.com/VolumeArticles/FullTextPDF/51_JIPBSV21113.pdf?fbclid=IwAR1ola0tzSW8r_Shzh5s_rUMC2EvGGOxymLthScyY0wEmRgX7_c4yUeL_Xtk)
  50. Kuropatnicki, A. K., Szliszka, E., & Krol, W. (2013). Historical aspects of propolis research in modern times. Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM, 2013, 964149. Recuperado de [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3655583/?fbclid=IwAR01HsSh6jgUdV34VWyeXEx6y1o0C5sSguUizxNGVVso\\_OxPVAxuTKNF8xI](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3655583/?fbclid=IwAR01HsSh6jgUdV34VWyeXEx6y1o0C5sSguUizxNGVVso_OxPVAxuTKNF8xI)
  51. Kamboj, A., Kumar Saluja A. (2011). Isolation of stigmaterol and b-sitosterol from petroleum ether extract of aerial parts of *Ageratum conyzoides* (Asteraceae). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3: 94-96.

52. Forgo, P., Kövér, KE. (2004). Gradient enhanced selective experiments in the  $^1\text{H}$  NMR chemical shift assignment of the skeleton and side-chain resonances of stigmasterol, a phytosterol derivative. *Steroids*. 69(1):43-50. Recuperado de [http://www.academia.edu/18296557/Gradient\\_enhanced\\_selective\\_experiments\\_in\\_the\\_1H\\_NMR\\_chemical\\_shift\\_assignment\\_of\\_the\\_skeleton\\_and\\_side-chain\\_resonances\\_of\\_stigmasterol\\_a\\_phytosterol\\_derivative?fbclid=IwAR3q2MnWYrGOBwypM8nwIAAp1JvtVDBxG9w-Vrd82alnxLZ0APL6AxZN69c](http://www.academia.edu/18296557/Gradient_enhanced_selective_experiments_in_the_1H_NMR_chemical_shift_assignment_of_the_skeleton_and_side-chain_resonances_of_stigmasterol_a_phytosterol_derivative?fbclid=IwAR3q2MnWYrGOBwypM8nwIAAp1JvtVDBxG9w-Vrd82alnxLZ0APL6AxZN69c)
53. Chaturvedula V.S., & Prakash I. (2012). Isolation of Stigmasterol and  $\beta$ -Sitosterol from the dichloromethane extract of *Rubus suavissimus*. *International Current Pharmaceutical Journal*, 1(9): 239-242. Recuperado de <http://www.icpjonline.com/documents/Vol1Issue9/03.pdf>



---

Dra. Julia Cassani Hernández  
**Asesora interna**

Cargo: Docente-Investigadora  
Titular TC  
No. Económico: 29529

---

Dra. Rosa Estrada Reyes  
**Asesora externa**

Cargo: Investigadora en Ciencias  
Médicas C  
No. De cédula profesional: 2128227