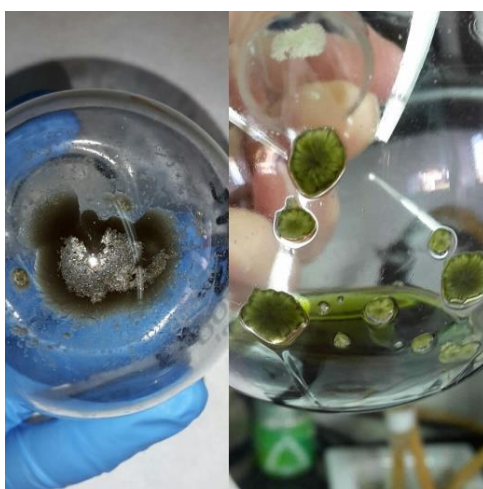




Composición química de *Asteriscus aquaticus*

Estudio del extracto de hexano



Virginia Fonseca Ripoll

Tutores:

Pablo Anselmo García García

M^a Ángeles Castro González

Ángela Patricia Hernández García

JULIO 2018

ÍNDICE

INDICE DE FIGURAS	3
INDICE DE TABLAS	5
LISTA DE ABREVIATURAS	5
1. RESUMEN	6
2. ABSTRACT	7
3. INTRODUCCIÓN	8
3.1 Los productos naturales	8
3.2 <i>Asteriscus aquaticus (L.) Less.</i>	8
4. ANTECEDENTES	12
4.1 Composición química	12
4.1.1 Asteriscunolidas	14
4.2 Propiedades	17
5. OBJETIVOS DEL ESTUDIO	19
6. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS	20
7. CONCLUSIONES	40
8. PARTE EXPERIMENTAL	41
8.1 Instrumentación	41
8.2 Técnicas cromatográficas	42
8.3 Material vegetal	43
8.4 Extracción y aislamiento	43
8.4.1 Descerado del Extracto de Hexano	44
8.4.2 Separación ácido-base	44
8.4.3 Fraccionamiento VLC de la fracción neutra de hexano descerado (HDN)	45
8.5 Ensayos de Bioactividad	47
9. REFERENCIAS	48

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Detalle de los capítulos florales de <i>A. aquaticus</i>	8
Figura 2: Recolección de <i>A. aquaticus</i> por científicos españoles (Anthos, 2012.....	9
Figura 3: Planta completa de <i>A. aquaticus</i> en época de floración.....	10
Figura 4: Detalle de la inflorescencia de <i>A. aquaticus</i> (Flora-on, 2017).....	11
Figura 6: Estructuras de esqueleto de humulano, humuleno y asteriscunolida genérica.	13
Figura 7: <i>Humulus lupulus</i> (Flora-on, 2017).....	13
Figura 8: Monoterpeno derivado de timol aislado en la fracción neutra.....	14
Figura 9: Estructura original descrita para la aquatolida y estructura revisada (tomada de Lodewick <i>et al.</i> , 2012).....	16
Figura 10: Estructura química de la artemisinina.	17
Figura 11: Ciclo de vida de las distintas especies del género <i>Plasmodium</i> (Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library).	18
Figura 12: Detalle de la parte aérea de <i>Artemisia annua</i> (Scott Bauer/USDA-ARS Image Gallery, Royal Society of Chemical).....	18
Figura 14: Extracto de hexano de <i>A. aquaticus</i> (parte superior de los tallos verdes con hojas y flores).	21
Figura 15: Descerado del extracto de hexano.....	22
Figura 16: Extracción líquido-líquido del descerado del extracto de hexano.	21
Figura 17: Esquema de la extracción líquido-líquido del extracto de hexano descerado.	22
Figura 18: Cromatografía de la fracción neutra del descerado de hexano mediante VLC.	22
Figura 19: Fracción HDN4 en la que se observa el precipitado blanco que posteriormente fue identificado como asteriscunolida A.	23
Figura 20: Fraccionamiento de la fracción HDN5C mediante cromatografía de flash en columna.	23
Figura 21: Cromatografía preparativa de la fracción 22-23 obtenida de HDN6.	24
Figura 22: Estructura general triacilglicerol.	24
Figura 23: Espectro de RMN de ¹ H de triacilglicerol aislado mediante cromatografía en columna de una fracción de HDN5C (CDCl ₃ , 200 MHz).	24
Figura 24: Espectro de RMN de ¹ H de fitosteroles (CDCl ₃ , 200MHz).....	26
Figura 25: Espectro de RMN de ¹³ C de la mezcla de fitosteroles (CDCl ₃ , 50 MHz).....	26
Figura 26A: Resultados obtenidos mediante GC-MS para la muestra HDN5C.....	27
Figura 26B: Resultados obtenidos mediante GC-MS para la muestra HDN5C 21-25, estigmasterol, espectro procedente de la biblioteca de espectros	27

Figura 27A: Resultados obtenidos mediante GC-MS para la muestra HDN5C 21-25 ..	28
Figura 27B: Resultados obtenidos mediante GC-MS para la muestra HDN5C 21-25, sitosterol, espectro procedente de la biblioteca de espectros.....	28
Figura 28A: Resultados obtenidos mediante GC-MS para la muestra HDN5C21-25 ...	29
Figura 28B: Resultados obtenidos mediante GC-MS para la muestra HDN5C 21-25, campesterol, espectro proporcionado por la biblioteca de espectros.....	29
Figura 29: Estructura de asteriscunolida A.....	30
s: singlete, d:doblete, sa: singlete ancho, m: multiplete	31
Figura 30: Espectro de RMN de ^1H de asteriscunolida A (200 MHz, CDCl_3).....	31
Figura 31: Espectro de RMN de ^{13}C de asteriscunolida A (50 MHz, CDCl_3).	32
Figura 32: Estructura de asteriscunolida B.....	32
Figura 33: Espectro de RMN de ^1H de asteriscunolida B (200 MHz, CDCl_3).....	33
Figura 34: Estructura de asteriscunolida C.....	33
Figura 35: Espectro de RMN de ^1H de asteriscunolida C.	34
Figura 36: Estructura de asteriscunolida D.....	34
Figura 37: Espectro de RMN de ^1H de asteriscunolida D.	35
Figura 38: Estructura del τ -cadinol.....	35
Figura 39: Espectro de RMN de ^1H del τ -cadinol (CDCl_3 , 200 MHz).	36
s: singlete, d:doblete, sa: singlete ancho, m: multiplete	36
Figura 40A: Resultados obtenidos mediante GC-MS para la muestra Extracto de Hexano para τ -cadinol	37
Figura 40B: Resultados obtenidos mediante GC-MS para la muestra Extracto de Hexano para τ -cadinol, espectro procedente de la biblioteca de espectros.....	37
Figura 41: Espectro de RMN de ^1H del terpeno A (200 MHz, CDCl_3).	38
Figura 42: Espectro de RMN de ^{13}C del terpeno A (50 MHz, CDCl_3).	38
Figura 43: Espectro de RMN de ^1H del terpeno B (200 MHz, CDCl_3).....	39

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Fitoquímicos de naturaleza sesquiterpenoide aislados en <i>A. aquaticus</i> (Aramburu Aizpiri, 1987).....	14
Tabla 2: Desplazamientos más característicos observados en el espectro de RMN ¹ H de triacilglicérols, δ en ppm (<i>J</i> en Hz).....	25
Tabla 3: Desplazamientos ¹ H de las diferentes asteriscunolidas δ en ppm (<i>J</i> en Hz)	31
.....	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 4: Desplazamientos principales de ¹ H de τ-cadinol δ en ppm (<i>J</i> en Hz)	36
Tabla 5: Resultados obtenidos a partir de las maceraciones sucesivas a partir del extracto de sumidad florida de <i>Asteriscus acuaticus</i>	44
Tabla 6: Resultados obtenidos tras la separación de la fracción neutra de hexano mediante VLC con eluyentes de polaridad creciente:	45
Tabla 7: Resultados obtenidos tras la separación de la fracción HDN4 soluble mediante VLC con eluyentes de polaridad creciente:	46

LISTA DE ABREVIATURAS

- *A. aquaticus*: *Asteriscus aquaticus*
- DCM: diclorometano
- MeOH: metanol
- A.E: Acetato de eetilo
- HD: Hexano descerado
- HDN: Hexano descerado neutro
- HDF: Ácidos fuertes
- HDM: Ácidos medios
- HDN1: fracción 1, procedente de la separación por VLC del extracto de hexano
- HDN2: fracción 2, procedente de la separación por VLC del extracto de hexano
- HDN3: fracción 3, procedente de la separación por VLC del extracto de hexano
- HDN4: fracción 4, procedente de la separación por VLC del extracto de hexano
- HDN5: fracción 5, procedente de la separación por VLC del extracto de hexano
- HDN6: fracción 6, procedente de la separación por VLC del extracto de hexano
- HDN7: fracción 7, procedente de la separación por VLC del extracto de hexano
- HDN8: fracción 8, procedente de la separación por VLC del extracto de hexano
- HDN9: fracción 9, procedente de la separación por VLC del extracto de hexano
- HDN10: fracción 10, procedente de la separación por VLC del extracto de hexano

1. RESUMEN

Asteriscus aquaticus (L.) Less. es una planta compuesta, podemos encontrarla en el área Mediterránea, en terrenos calcáreos. En la década de los 80 el grupo de San Feliciano *et al.* comenzó a estudiarla, se hicieron extractos de hexano en soxhlet y se aislaron distintas γ -lactonas insaturadas. Se ha demostrado que los compuestos característicos por poseer esta estructura, poseen diferente bioactividad. Se ha retomado el estudio de esta planta con el objetivo de completar los estudios de composición química y bioactividad de los compuestos aislados.

Con el pulverizado homogéneo de la planta seca, se hicieron maceraciones sucesivas a temperatura ambiente con disolventes de polaridad creciente (desde hexano hasta metanol-agua) y por ultimo una infusión en agua caliente. El extracto de hexano fue descerado y fraccionado con extracción ácido-base, cromatografía líquida a vacío, cromatografía de flash en gel de sílice y cromatografía en capa fina preparativa. Las fracciones fueron analizadas mediante RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , GC-MS y HRMS cuando fue necesario. Se aislaron: triacilgliceroles, estigmasterol, campesterol, sitosterol, asteriscunolidas A-D, τ -cadinol, y dos terpenos cuya estructura no ha sido determinada todavía. Mediante GC-MS se supo que además contenía naftaleno y santonina. Los extractos están siendo evaluados en estudios *in vitro*: citotoxicidad frente a células tumorales, anti-inflamatorio, anti-fúngico y antiparasitario contra *Leishmania*, *Teladorsagia* y frente al virus del Dengue.

2. ABSTRACT

Asteriscus aquaticus (L.) Less. is an odoriferous herbaceous plant from Compositae family distributed through the Mediterranean area growing on calcareous soils. Its soxhlet *n*-hexane extract was chemically studied in the early 80's by San Feliciano *et al.* In that investigation, several sesquiterpenic unsaturated- γ -lactones were isolated. Different bioactive properties have been reported for natural compounds possessing this structural feature. We have recovered our interest for this plant with the aim to complete the phytochemical study and to make a prospection of its bioactive properties.

From powdered dry plant, five room temperature maceration extracts were obtained with increasing polarity solvents (hexane until aqueous methanol) and then an infusion with hot water. The hexane extract was dewaxed and then fractionated using acid-base extraction, vacuum liquid chromatography, preparative chromatography and flash chromatography on silica gel. The different fraction parts obtained were analysed by ^1H NMR, ^{13}C NMR, GC-MS y HRMS. Triacylglycerols, stigmasterol, campesterol, sitosterol, asteriscunolides A-D, τ -cadinol, and two terpenes without determined structure yet, were isolated. GC-MS analysis also shown naftalene and santonina. The compounds that could be purified and the different extracts were prepared to be tested on different *in vitro* bioactivity tests: cytotoxicity against tumour cells, anti-inflammatory, antifungal and antiparasitic against *Leishmania* or *Teladorsagia* and Dengue virus.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Los productos naturales

El uso de productos naturales, bien de origen animal, vegetal o fúngico, ha sido de gran importancia en la alimentación desde la antigüedad, así como para paliar enfermedades o sus síntomas. Se utilizaban los productos completos o sus partes y la transmisión de estos conocimientos tradicionales era principalmente oral. Posteriormente comenzaron a investigarse las propiedades farmacológicas y las de sus componentes aislados. El 50% de los fármacos de uso clínico actual provienen de productos naturales y la naturaleza continúa siendo una fuente de búsqueda de nuevos compuestos bioactivos. Además, actualmente hay un auge de una medicina tradicional que acude al tratamiento de síntomas o problemas leves de salud con productos procedentes directamente de la naturaleza.

Por la necesidad de nuevos fármacos, se busca la caracterización de química de nuevos seres vivos, incluyendo las plantas, y la obtención de productos de posible interés terapéutico a partir de estas, principalmente de interés citotóxico para su uso contra los distintos tipos de cáncer o frente a parásitos humanos y animales (Ferreira et al., 2010).

3.2 *Asteriscus aquaticus* (L.) Less.



Figura 1: Detalle de los capítulos florales de *A. aquaticus*

A. aquaticus (L.) Less. (figura 1) es una planta herbácea de la familia de las compuestas con crecimiento en el área mediterránea. Podemos encontrarla ampliamente distribuida por Grecia, España (península y archipiélagos), el norte de África, Portugal y el sur de Bulgaria (Ledesma-Perez, 1981). En España se ha descrito prácticamente en toda su geografía incluyendo ambos archipiélagos (figura 2), a excepción de Galicia, Asturias y Cantabria (Anthos, 2012). Crece en terrenos calizos y forma parte de herbazales nitrófilos de cunetas y bordes de caminos (Sánchez-Gil, 1982).



Figura 2: Recolección de *A. aquaticus* por científicos españoles (Anthos, 2012).

Respecto a su etimología, “Asteriscus” procede del griego asteriskos, que significa pequeña estrella, y “aquaticus” es un epíteto que hace referencia a uno de los hábitats de la planta, en zonas cercanas al mar (Tutin *et al.*, 2010; Navarro *et al.*, 1981). El nombre común varía, en catalán “capseta”, en castellano “bovas”, “escoba de castañuela”, “margarita de mar” y “ojo de buey”, en portugués “asterisco-da-água”, “pampilho-aquático” y “pampilho-da-água”, en francés “Astérolide aquatique” y en inglés no hay nombre común definido para esta especie.

Existen varias entidades botánicas que han sido aceptadas como sinónimos de *Asteriscus aquaticus* (L.) Less. (The Plant List, 2013):

- *Asteriscus citriodorus* Heldr. & Halácsy
- *Bubonium aquaticum* (L.) Hill
- *Bubonium aquaticum* subsp. *aquaticum*
- *Bupthalmum aquaticum* L.
- *Nauplius aquaticus* (L.) Cass.
- *Odontospermum aquaticum* (L.) Sch.Bip.

Además, se han definido varias subespecies que no llegan a la categoría de nombre aceptado (The Plant List, 2013).

Botánicamente, es una angiosperma que pertenece al orden Asterales, a la familia Asteraceae, subfamilia Asteroidade, a la tribu Inulae, subtribu Inulinae y género *Asteriscus* (The Plant List, 2013; Tutin *et al.*, 2010; Navarro *et al.*, 1981).

A. aquaticus tiene su época de floración de abril a agosto. Su principal forma vital es terófito (figura 3) es decir, son plantas de ciclo anual que durante la estación desfavorable (invierno) se encuentran en forma de semilla.



Figura 3: Planta completa de *A. aquaticus* en época de floración.

Sus inflorescencias están formadas por lígulas muy pequeñas que casi no sobresalen del involucre, las flores externas de los capítulos, son hemiliguladas amarillodoradas, con 3 dientes en el ápice, que es corto y verde, y 5 lóbulos amarillos (figura 4). Los aquenios de las flores hemiliguladas son vilosos miden de 1,5 a 2 mm y el vilano de 0,75 a 1 mm (Tutin *et al.*, 2010; Navarro *et al.*, 1981).



Figura 4: Detalle de la inflorescencia de *A. aquaticus* (Flora-on, 2017).

Las brácteas involucrales externas son más largas que las internas, oblongolanceoladas, planas o conduplicadas. Su limbo posee una banda longitudinal ancha uniformemente serícea en la cara inferior. Sus tallos alcanzan hasta 80 cm, son erectos, simples o ramificados una o dos veces cerca del ápice, con ramas laterales generalmente sobrepasando al eje principal. Las hojas son enteras, presentando formas oblongo-lanceoladas, obovadas o espatuladas, obtusas y enteras (figura 5). Las hojas inferiores son pecioladas y el resto sésiles.



Figura 5: Detalle de tallo y hojas de *A. aquaticus* (Flora-on, 2017).

Su grado de amenaza según el International Union for Conservation of Nature (IUCN) es “Poco preocupante” (Universitat des Illes Balears, 2017).

4. ANTECEDENTES

4.1 Composición química

Los principales compuestos que se han descrito en *A. aquaticus* son de naturaleza terpenoide. Destacan por su singularidad las lactonas sesquiterpénicas, derivadas biogénicamente de tres unidades isoprenoides, es decir, con quince átomos de carbono en su cadena principal y que contienen una función éster dentro de un anillo (Amorim *et al.*, 2013). Son incoloras, amargas y lipofílicas, proceden de modificaciones de esqueletos sesquiterpénicos mediante citocromo P₄₅₀ monoxigenasas y otras enzimas oxireductasas que proporcionan sus propiedades características (Majdi *et al.*, 2016).

Las lactonas sesquiterpénicas son uno de los grupos más grandes y con más homogeneidad biogénica de moléculas de bajo peso molecular. Son metabolitos secundarios que encontramos principalmente en la familia de las compuestas (Asteraceae), aunque también han sido identificadas en otras especies vegetales (Amorim *et al.*, 2013). Son metabolitos secundarios de gran importancia en la interacción con insectos y microorganismos perjudiciales para las plantas.

En *A. aquaticus* se identificó un nuevo tipo de lactonas con una agrupación γ -lactónica α,β -insaturada con el doble enlace endocíclico. Estas lactonas poseen un esqueleto de humulano (figura 6) sesquiterpeno monocíclico que presenta un anillo de once átomos de carbono con cuatro grupos metilo. El humuleno tiene tres dobles enlaces, dos de ellos trisustituidos y uno con dos sustituyentes (Steenackers *et al.*, 2015). De él derivan biosintéticamente, por lo que se conocen como humulanolidas (Ledesma-Perez, 1981).

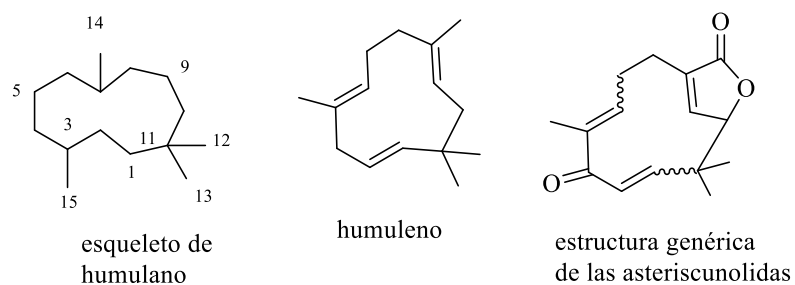


Figura 6: Estructuras de esqueleto de humulano, humuleno y asteriscunolida genérica.

El humuleno es característico del aceite esencial del lúpulo, *Humulus lupulus* (figura 7), planta en la que fue aislado por primera vez y que le da nombre. Es una Cannabaceae del norte de Europa cuya flor femenina sin fecundar se utiliza principalmente en la producción de cerveza. Esta planta además posee efectos sedantes, por lo que ha sido estudiada como posible analgésico (Franco *et al.*, 2012).



Figura 7: *Humulus lupulus* (Flora-on, 2017).

La primera humulanolida natural, asteriscunolida A (figura 6), fue descrita en 1981 y se extrajo a partir de *A. aquaticus* (San Feliciano *et al.*, 1985).

4.1.1 Asteriscunolidas

Las asteriscunolidas son humulanolidas características del género *Asteriscus*, que les da nombre.

El estudio del extracto de hexano (soxhlet) de *A. aquaticus* en 1981 proporcionó la identificación por primera vez de las asteriscunolidas, encontrándose 4 distintas (A, B, C y D), así como de los ácidos carboxílicos relacionados estructuralmente con estas lactonas, los ácidos asteriscunólicos (I y II) (Ledesma-Pérez, 1981).

Se observó el potencial de esta planta, por lo que se continuó estudiando su composición química, aislándose una parte cristalina que contenía asteriscanolida, otra γ -lactona con estructura de humulanolida (San Feliciano *et al.*, 1985).

Posteriormente, debido al interés de estos compuestos, en 1987 se realizó un estudio más exhaustivo (Aramburu-Aizpiri, 1987), a partir del cual se consiguieron aislar numerosos compuestos adicionales (Tabla 1) y analizar y caracterizar los ya aislados. De la fracción neutra del extracto de hexano se consiguieron aislar: τ -cadinol, un derivado de timol (figura 8), almenarolida, aquatolida, metoxiasteriscunolida, oxoasteriscunolida, además de las asteriscunolidas y asteriscanolidas aisladas previamente. De la fracción ácida y tras metilación se aislaron los ésteres metílicos de los ácidos sesquiterpénicos.

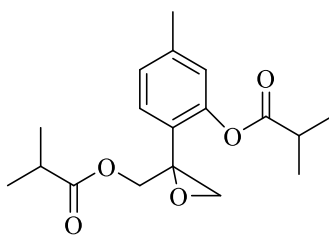
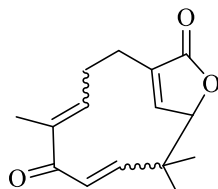


Figura 8: Monoterpeno derivado de timol aislado en la fracción neutra.

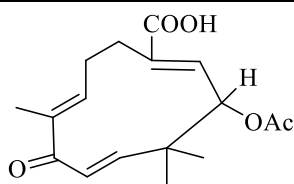
Tabla 1: Fitoquímicos de naturaleza sesquiterpenoide aislados en *A. aquaticus* (Aramburu Aizpiri, 1987).

Estructura genérica de las
asteriscunolidas

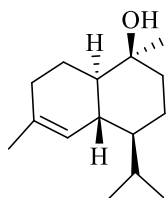


ácido asteriscunólico I

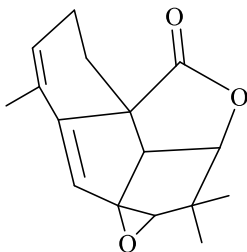
(Ejemplo de ácido
asteriscunólico)



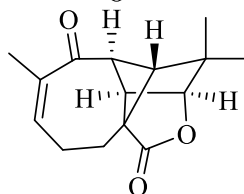
τ -cadinol



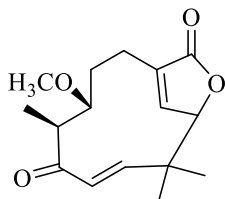
Almenarolida



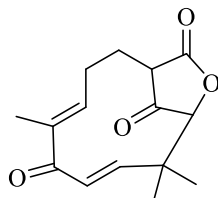
aquatolida (*)



Metoxiasteriscunolida

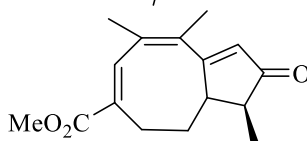


Oxoasteriscunolida



éster XVIII

(Ejemplo de éster
sesquiterpénico)



(*) Estructura revisada para aquatolida por Lodewick *et al.* (2012).

4.2 Propiedades

Las lactonas sesquiterpénicas, en general, poseen distintas actividades biológicas, como pueden ser antitumorales, citotóxicas o antibióticas. Como aspecto negativo destaca su capacidad para producir dermatitis alérgica (Picman *et al.*, 1986).

Además se han descrito propiedades insecticidas y de reducción de la alimentación de insectos, son tóxicas para vertebrados e inhibidoras del crecimiento de plantas o fitotóxicas (Ledesma-Perez, 1981), tienen propiedades antiinflamatorias y hepatoprotectoras (Amorim *et al.*, 2013).

Destaca la artemisinina (figura 10) como antimalárico, se demostró que este compuesto natural es, junto a sus derivados sintéticos, el tratamiento más efectivo contra las cuatro especies de *Plasmodium*. Es el parásito causante de esta enfermedad que se transmite al ser humano mediante la picadura de mosquitos hembra del género *Anopheles* (figura 11). La artemisinina fue aislada de *Artemisia annua* (Asteraceae) (figura 12), planta utilizada en la medicina tradicional China (Brown *et al.*, 2003).

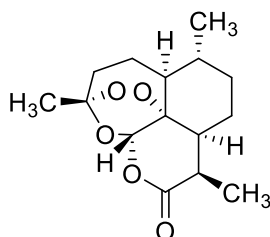


Figura 10: Estructura química de la artemisinina.

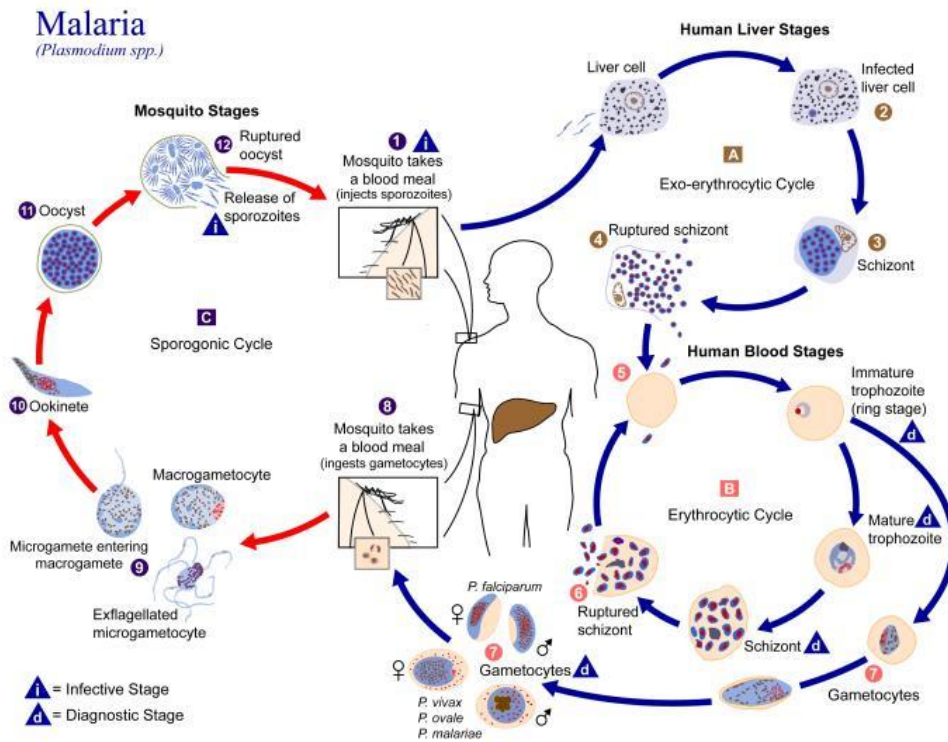


Figura 11: Ciclo de vida de las distintas especies del género *Plasmodium* (Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library).



Figura 12: Detalle de la parte aérea de *Artemisia annua* (Scott Bauer/USDA-ARS Image Gallery, Royal Society of Chemistry).

Se ha demostrado actividad de las asteriscunolidas A, B, C y D, descubiertas en *A. aquaticus*, contra diversas líneas celulares de cáncer (Lodewyk et al., 2012), debido a su capacidad para modular la expresión genética e inhibir la angiogénesis y metástasis (Amorim et al., 2013).

5. OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Determinación de la composición química de la compuesta *Asteriscus aquaticus* y su bioactividad.

Obtención de extractos a partir de *Asteriscus aquaticus*, realizando maceraciones a temperatura ambiente del triturado de la planta para evitar alteraciones, degradaciones y formación de artefactos por temperatura (debido al soxhlet utilizado previamente).

Aislamiento de los compuestos de interés mediante técnicas de fraccionamiento y purificación.

Identificación por técnicas espectroscópicas de los compuestos aislados.

Realización de bioensayos con los extractos y compuestos aislados.

6. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

A partir del pulverizado homogéneo de *A. aquaticus* se realizaron maceraciones a temperatura ambiente obteniéndose extractos de hexano, diclorometano, diclorometano-metanol (1:1), metanol, metanol-agua (8:2) e infusión en agua caliente (Figuras 13 y 14).

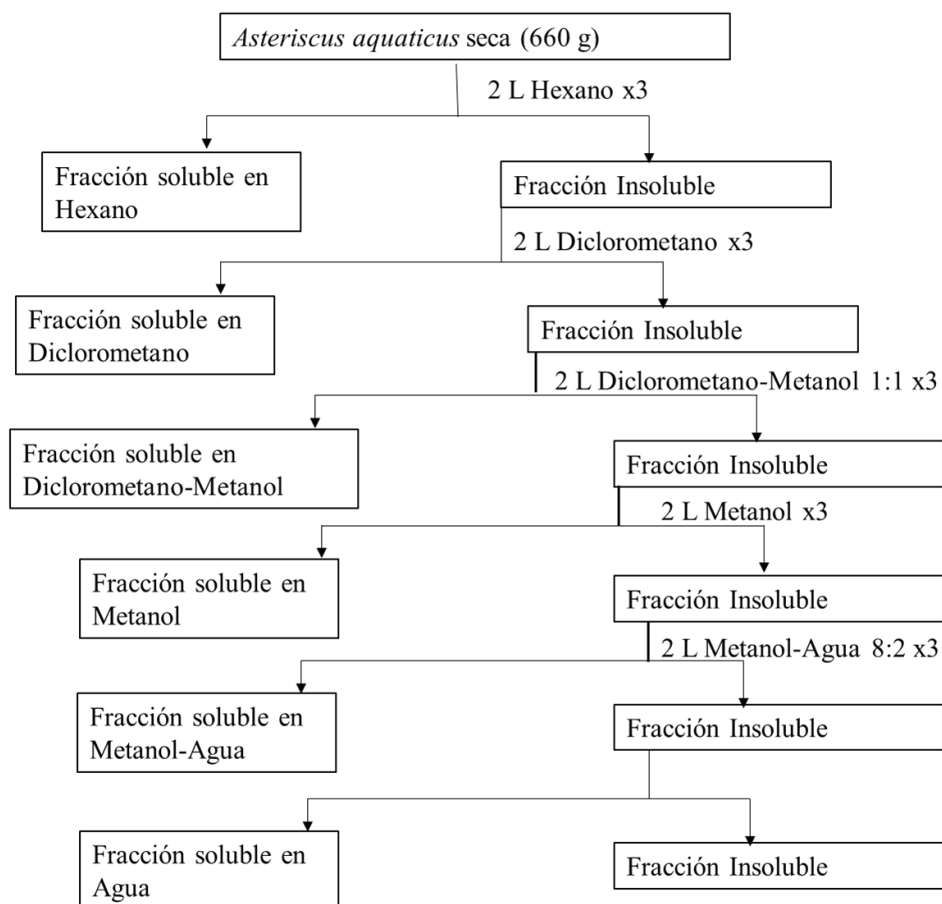


Figura 13: Esquema de extracción de compuestos de *A. aquaticus* (tallos verdes con hojas y flores) mediante disolventes de polaridad progresiva.



Figura 14: Extracto de hexano de *A. aquaticus* (parte superior de los tallos verdes con hojas y flores).

El extracto de hexano fue descerado por solubilidad en metanol caliente y frío (figura 15). Se realizó la extracción ácido-base del descerado (figuras 16 y 17) obteniéndose fracciones de ácidos fuertes, de ácidos medios y fracción neutra. La fracción neutra (HDN) posteriormente fue cromatografiada mediante cromatografía líquida de vacío (VLC) con mezclas de hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol, cuya relación fue cambiando obteniéndose diez fracciones de polaridad creciente (figura 18).

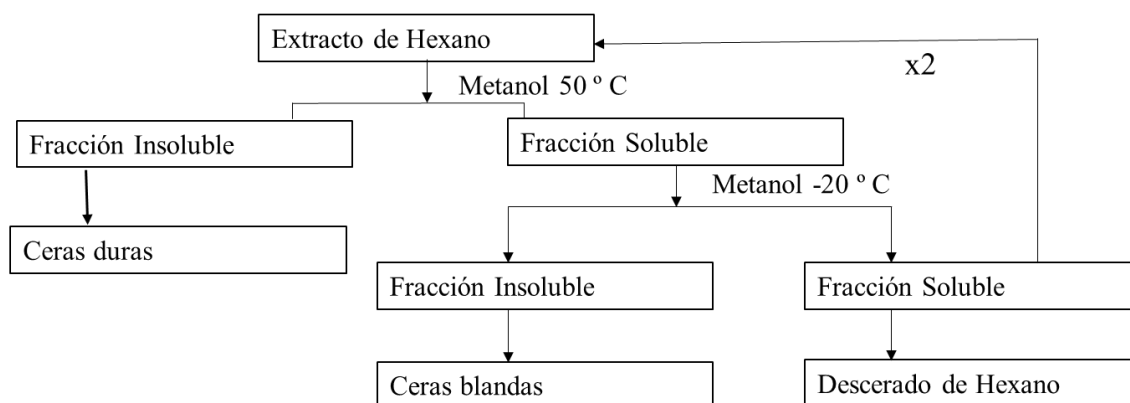


Figura 15: Descerado del extracto de hexano.



Figura 16: Extracción líquido-líquido del descerado del extracto de hexano.

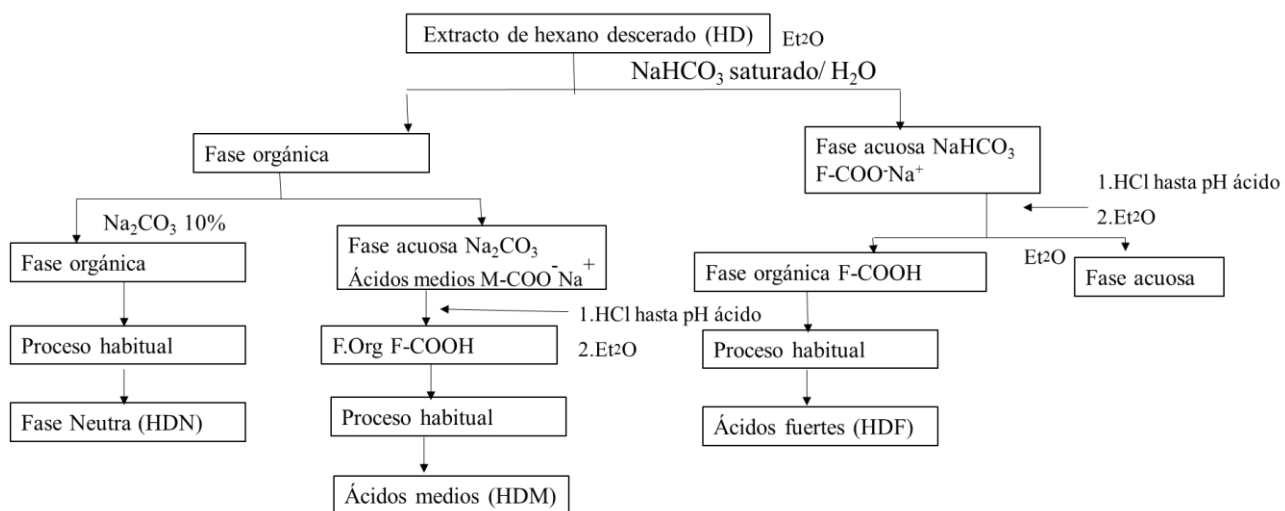


Figura 17: Esquema de la extracción líquido-líquido del extracto de hexano descerado.



Figura 18: Cromatografía de la fracción neutra del descerado de hexano mediante VLC.

Se realizó un seguimiento por RMN de ^1H de los extractos y de las fracciones para decidir los posteriores procesos cromatográficos.

En HDN4 se observó un precipitado insoluble en hexano (figura 19), del cual se cristalizó asteriscunolida A. La fracción soluble de HDN4, además de HDN5 y HDN6

fueron fraccionadas mediante VLCs, cromatografías en columna (figura 20) y cromatografías de capa fina preparativa, obteniéndose los compuestos que se describen a continuación.

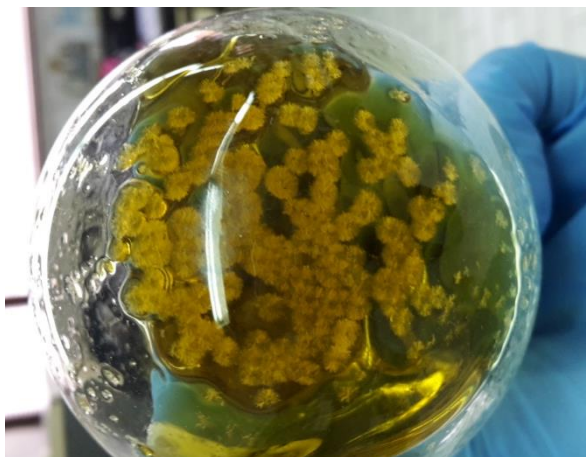


Figura 19: Fracción HDN4 en la que se observa el precipitado blanco que posteriormente fue identificado como asteriscunolida A.



Figura 20: Fraccionamiento de la fracción HDN5C mediante cromatografía de flash en columna.

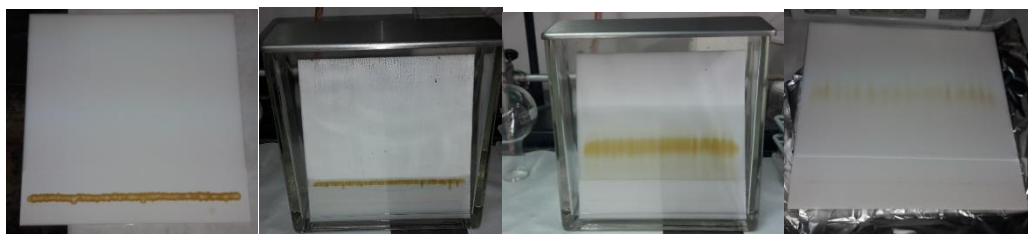


Figura 21: Cromatografía preparativa de la fracción 22-23 obtenida de HDN6.

- Metabolitos primarios

Triacilglicerol

Del estudio de las fracciones HDN4 y HDN5 se obtuvo un triacilglicerol (figura 22) que mostraba en su espectro de RMN de ^1H (figura 23) los desplazamientos químicos característicos de estos compuestos (tabla 5).

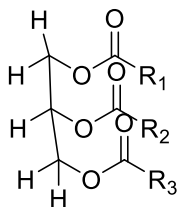


Figura 22: Estructura general triacilglicerol.

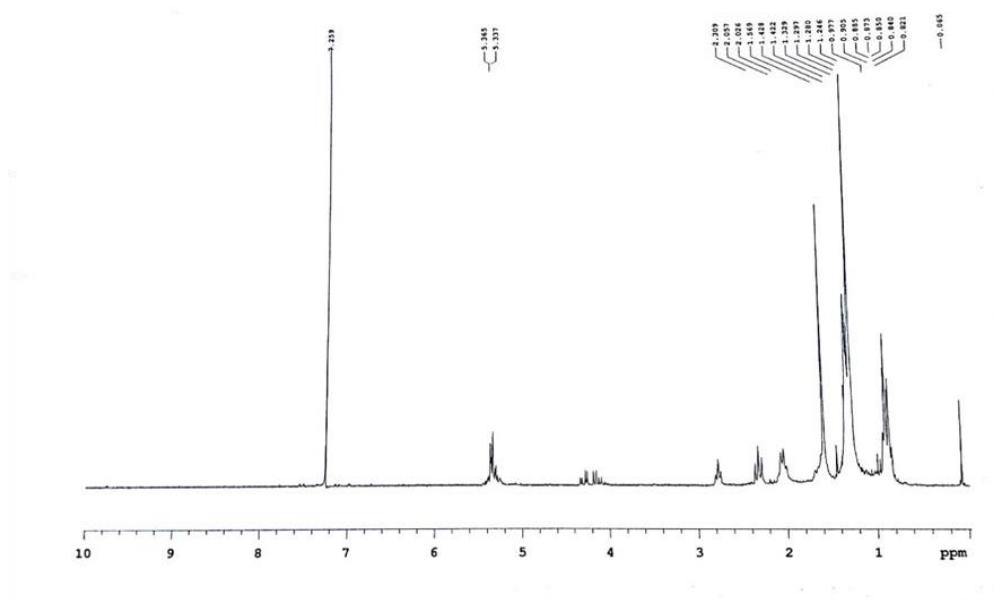
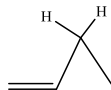
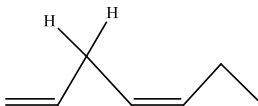


Figura 23: Espectro de RMN de ^1H de triacilglicerol aislado mediante cromatografía en columna de una fracción de HDN5C (CDCl_3 , 200 MHz).

Tabla 2: Desplazamientos más característicos observados en el espectro de RMN de ^1H de triacilglicerolos, δ en ppm (J en Hz).

Desplazamiento (ppm)	Parte del compuesto	Representación
1,9-2,1 m	Protones alílicos (indica insaturaciones)	
2,36 t	Protones del C en α al COOR de los ácidos grasos	$\text{CH}_2\text{-COOR}$
2,78 t	Protones bisalílicos (indica poliinsaturaciones)	
4,10 dd 4,29 dd	Protones de los C1 y C3 del glicerol	$\text{CH}_2\text{-O}$
5,2 m	Protones del C2 del glicerol	CH-O
5,4 m	Protón olefínico (indica insaturaciones)	H-C=

○ Esteroles

En la fracción HDN5C apareció un precipitado blanco cristalino, su espectro de RMN de ^1H (figura 24) indicaba que era una mezcla de fitosteroles, como se observa en los diferentes singletes con desplazamientos de 0,67-0,69 y fue confirmado con su espectro RMN de ^{13}C (figura 25) en los que destacaban las señales de los protones y carbonos olefínicos presentes en estigmasterol.

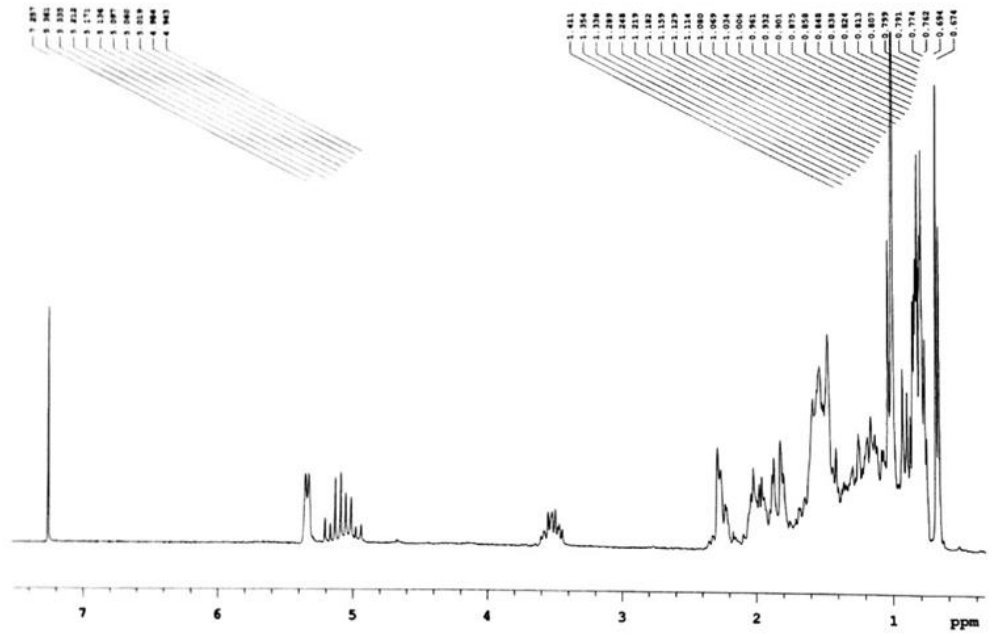


Figura 24: Espectro de RMN de ^1H de fitosteroles (CDCl_3 , 200MHz).

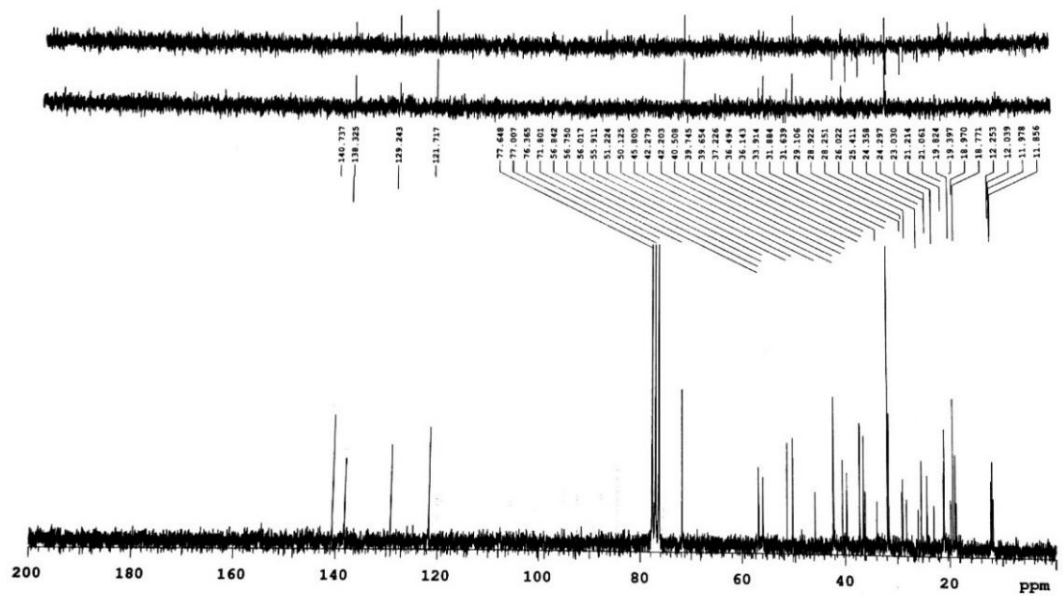


Figura 25: Espectro de RMN de ^{13}C de la mezcla de fitosteroles (CDCl_3 , 50 MHz).

Para determinar de qué esteroides se trataba, la mezcla fue analizada en GC-MS, obteniéndose:

Estigmasterol (61%)

Los resultados obtenidos mediante GC-MS, el espectro real de nuestro compuesto y el que se obtuvo de la bibliografía se muestran en la figura 26 (comparación A y B).

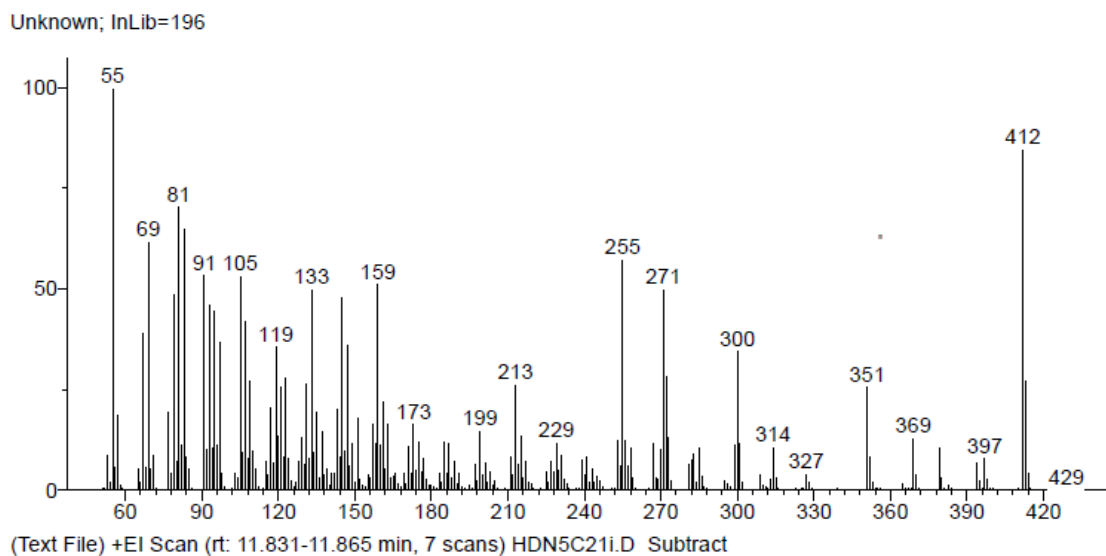


Figura 26A: Resultados obtenidos mediante GC-MS para la muestra HDN5C.

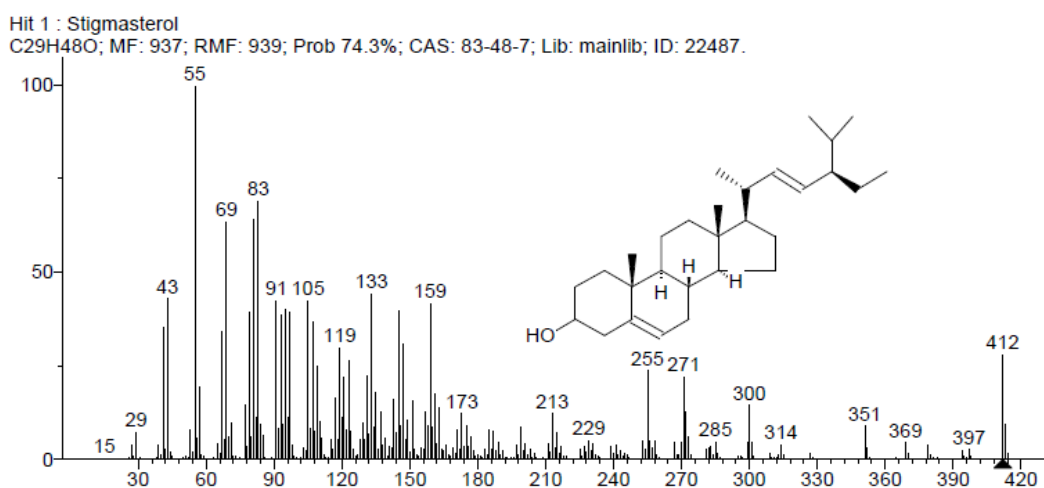


Figura 26B: Resultados obtenidos mediante GC-MS para la muestra HDN5C 21-25, estigmasterol, espectro procedente de la biblioteca de espectros

β -Sitosterol (33%)

Los resultados obtenidos mediante GC-MS, el espectro real de nuestro compuesto y el que se obtuvo de la bibliografía se muestran en la figura 27 (Comparación A y B), además fue comprobado (Nes *et al.*, 1991).

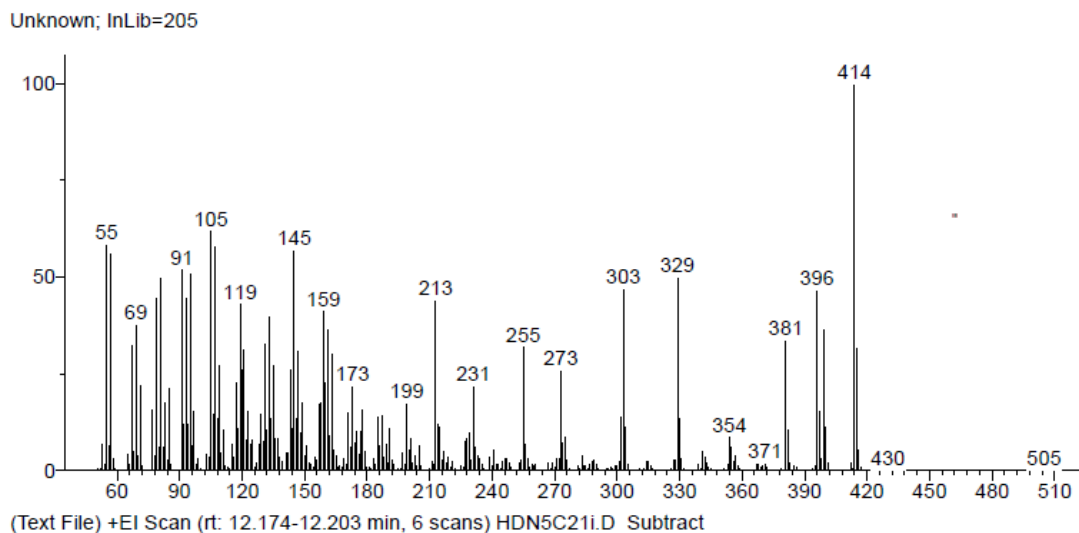


Figura 27A: Resultados obtenidos mediante GC-MS para la muestra HDN5C 21-25

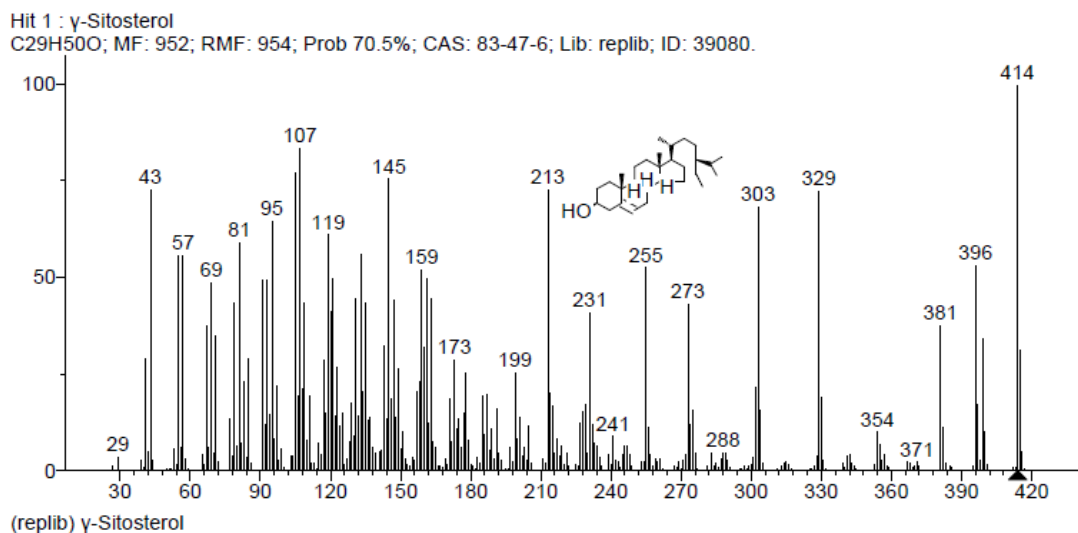


Figura 27B: Resultados obtenidos mediante GC-MS para la muestra HDN5C 21-25, sitosterol, espectro procedente de la biblioteca de espectros.

Campesterol (6%)

Los resultados obtenidos mediante GC-MS, el espectro real de nuestro compuesto y el que se obtuvo de la bibliografía se muestran en la figura 28.

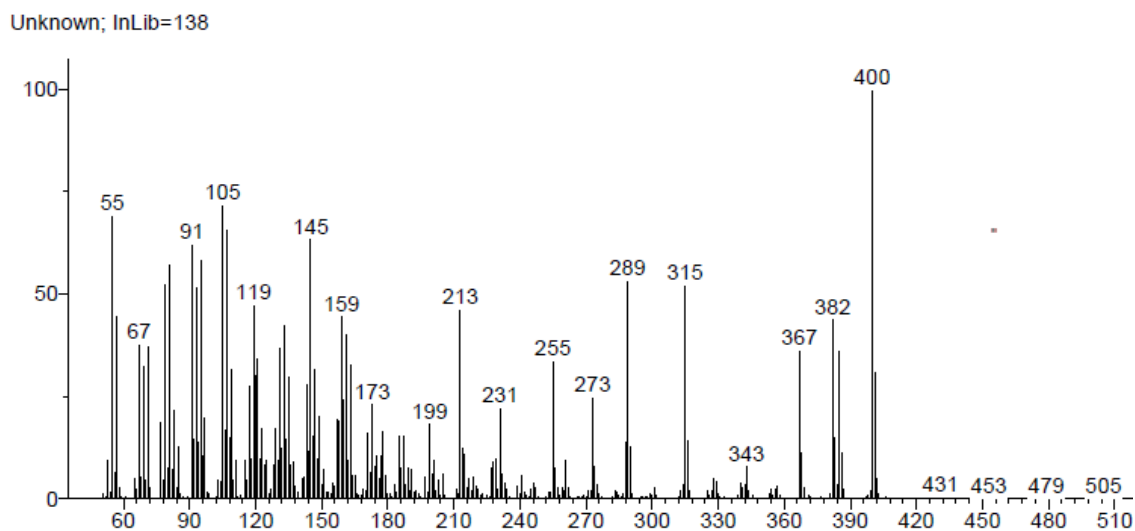


Figura 28A: Resultados obtenidos mediante GC-MS para la muestra HDN5C21-

25

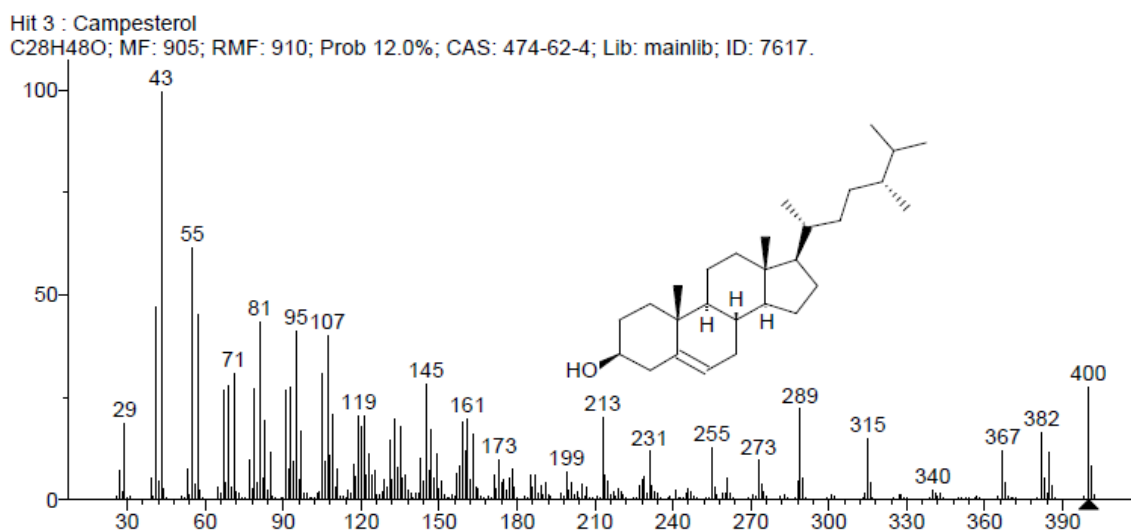


Figura 28B: Resultados obtenidos mediante GC-MS para la muestra HDN5C 21-

25, campesterol, espectro proporcionado por la biblioteca de espectros.

- Metabolitos secundarios
 - Sesquiterpenos

Asteriscunolida A

Se muestra en la figura 29, fue la primera detectada, por su mayor abundancia y su capacidad para cristalizar, se analizó mediante RMN de ^1H (figura 30), sus principales desplazamientos se muestran en la tabla 6, también se analizó en RMN de ^{13}C (figura 31).

Se encontró en las fracciones HDN4, HDN5 y HDN6.

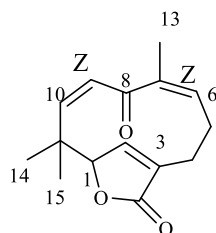


Figura 29: Estructura de asteriscunolida A.

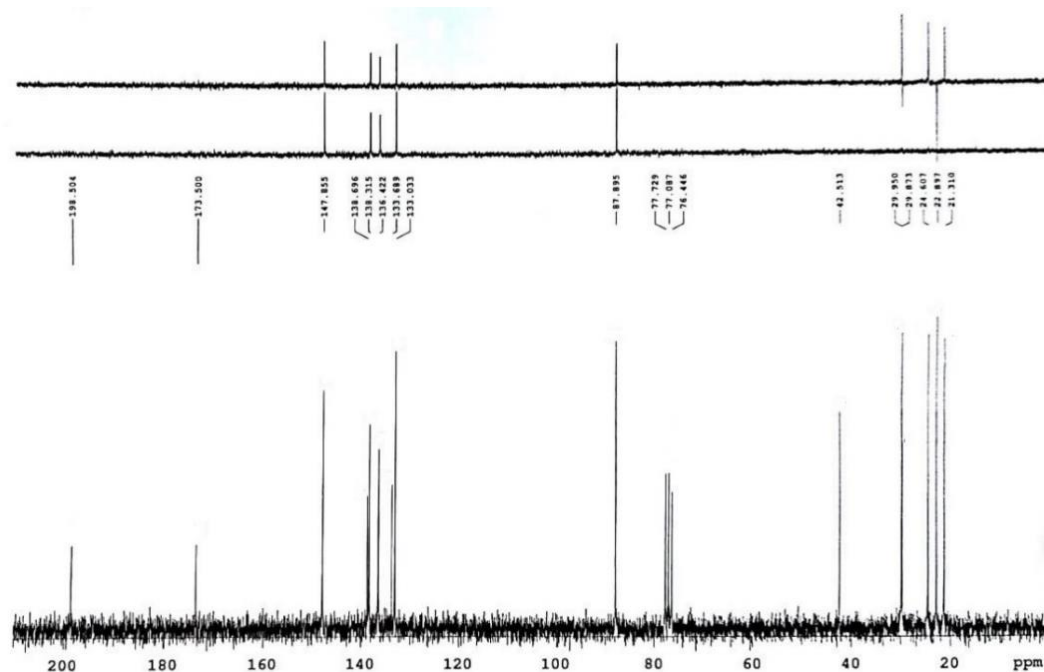


Figura 31: Espectro de RMN de ^{13}C de asteriscunolida A (50 MHz, CDCl_3).

Asteriscunolida B

Se muestra en la figura 32, se analizó mediante RMN de ^1H (figura 33), sus principales desplazamientos se muestran en la tabla 6.

Se encontró en las fracciones HDN4, HDN5 y HDN6.

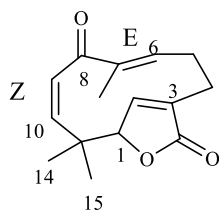


Figura 32: Estructura de asteriscunolida B.

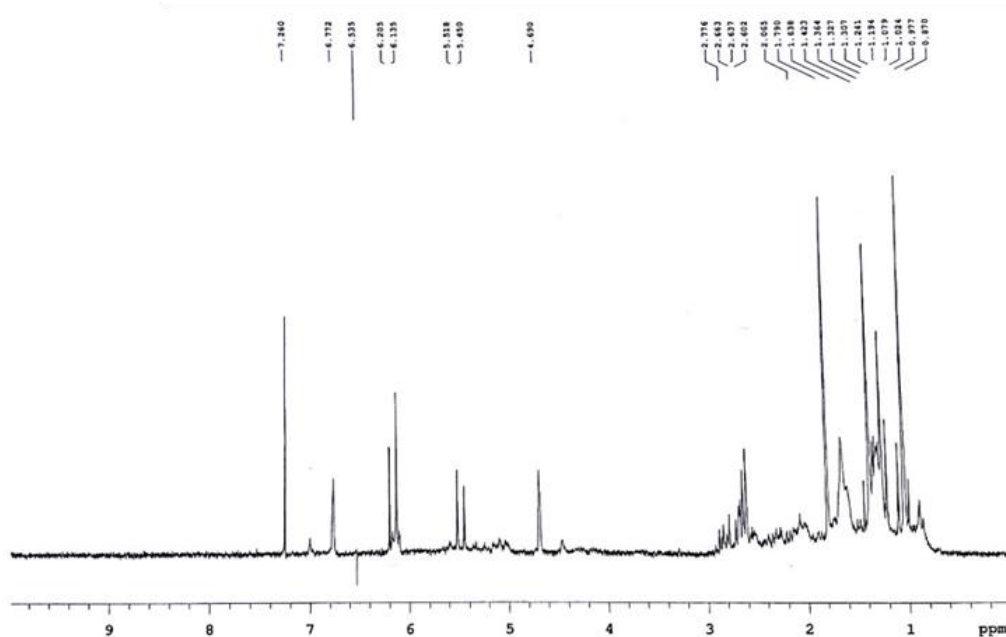


Figura 33: Espectro de RMN de ^1H de asteriscunolida B (200 MHz, CDCl_3).

Asteriscunolida C

Se muestra en la figura 34, se analizó mediante RMN de ^1H (figura 35), sus principales desplazamientos se muestran en la tabla 6.

Se encontró en HDN4, HDN5 y HDN6.

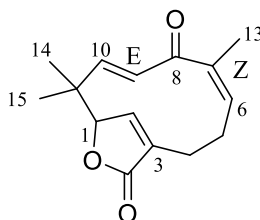


Figura 34: Estructura de asteriscunolida C.

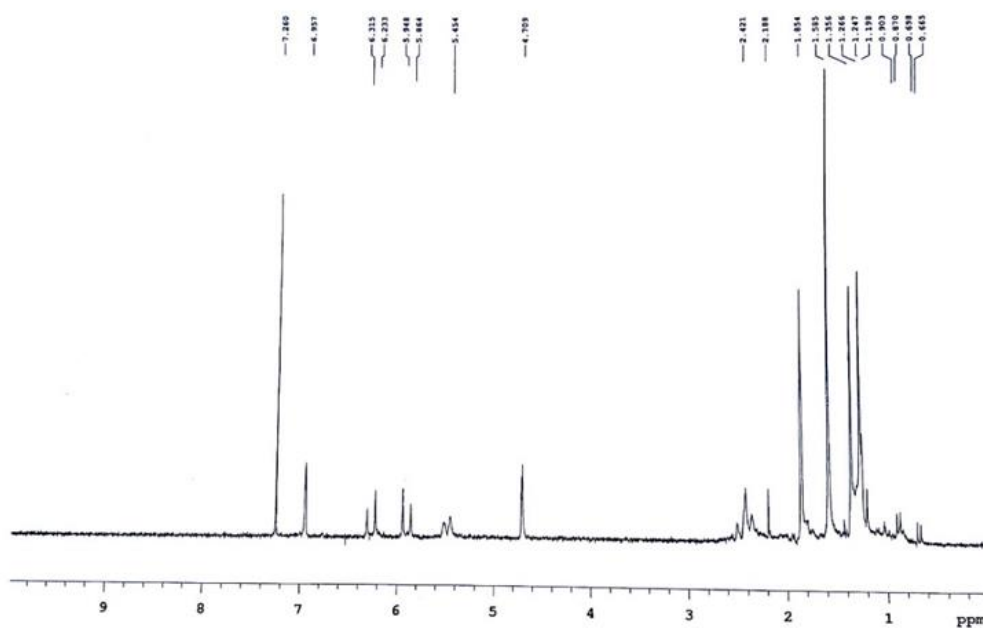


Figura 35: Espectro de RMN de ^1H de asteriscunolida C.

Asteriscunolida D

Se muestra en la figura 36, se analizó mediante RMN de ^1H (figura 37), sus principales desplazamientos se muestran en la tabla 6.

Se encontró en las fracciones HDN4, HDN5 y HDN6.

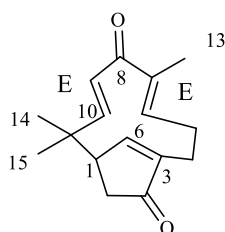


Figura 36: Estructura de asteriscunolida D.

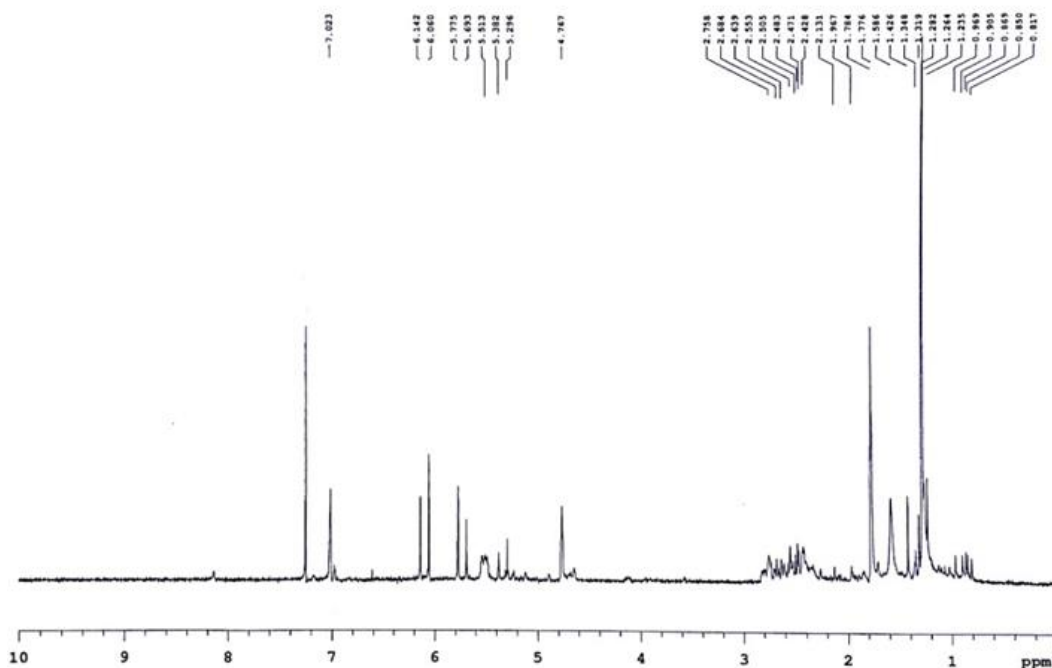


Figura 37: Espectro de RMN de ^1H de asteriscunolida D.

τ -cadinol

El τ -cadinol (figura 38), se encontró en los extractos de hexano, y diclorometano. Tras el fraccionamiento del extracto de hexano, se mantuvo en la fracción de hexano descerado neutro y posteriormente en las fracciones HDN4 y HDN5.

Se analizó mediante RMN de ^1H y se obtuvieron los resultados que se muestran (figura 39).

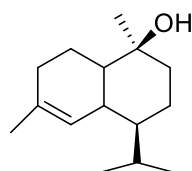


Figura 38: Estructura del τ -cadinol.

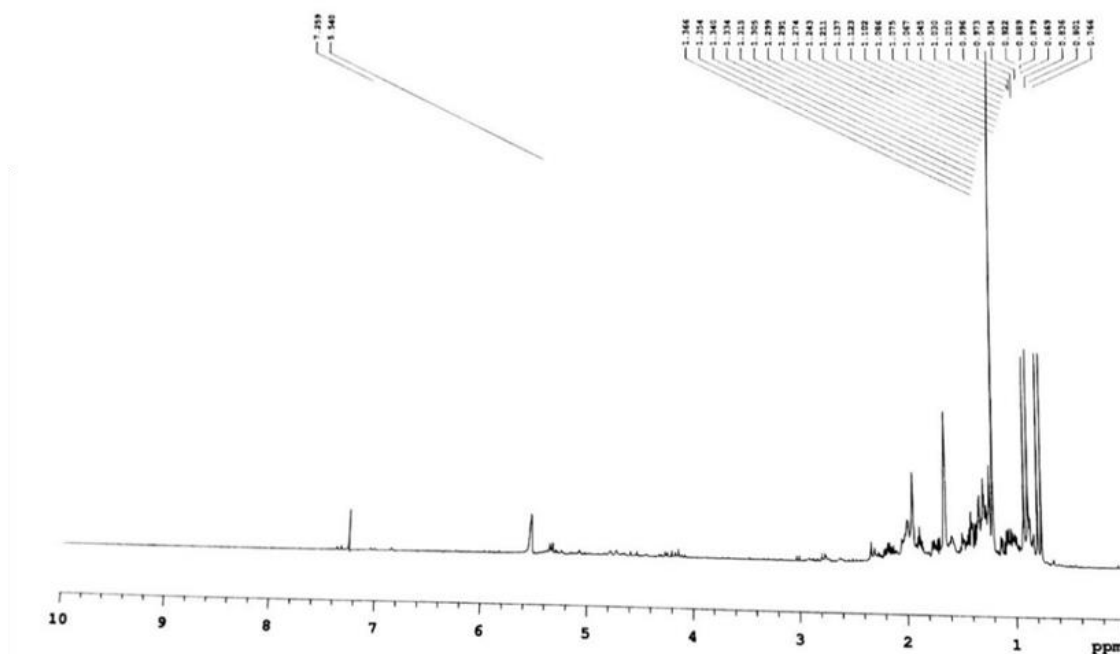


Figura 39: Espectro de RMN de ^1H del τ -cadinol (CDCl_3 , 200 MHz).

Tabla 4: Desplazamientos químicos más característicos en el espectro de RMN de ^1H de τ -cadinol, δ en ppm (J en Hz), (200 MHz, CDCl_3).

^1H	τ -cadinol
5	5,58 sa
10	1,21 s
12	0,91 d $J=13,2$
13	0,85 d $J=13,2$

s: singlete, d:doblete, sa: singlete ancho, m: multiplete

El análisis en GC-MS mostró estos resultados para las muestras analizadas que lo contenían (figura 40), donde se observa el espectro de la muestra real y la obtenida por comparación en la biblioteca de espectros.

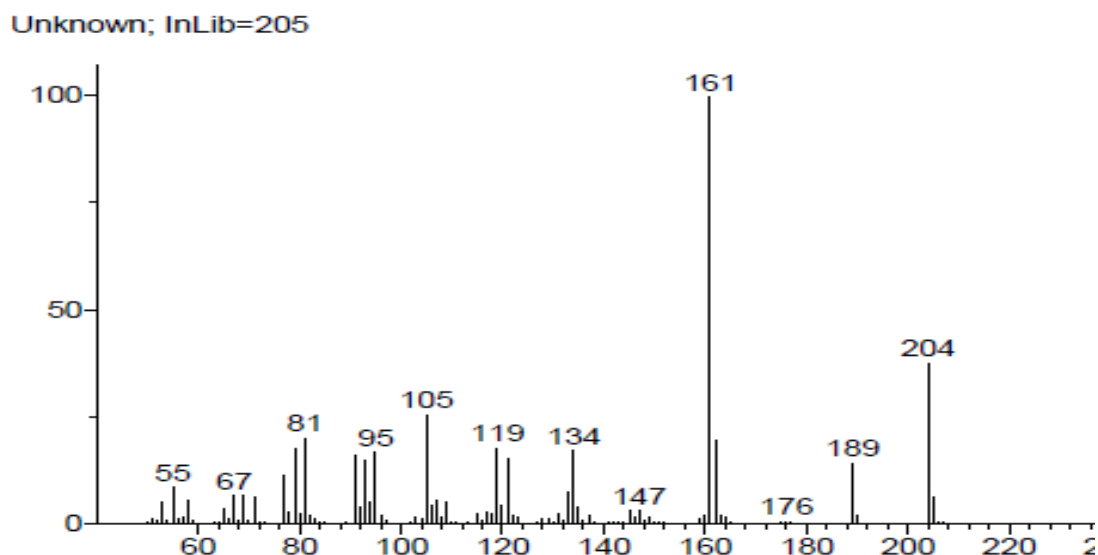


Figura 40A: Resultados obtenidos mediante GC-MS para la muestra Extracto de Hexano para τ -cadinol.

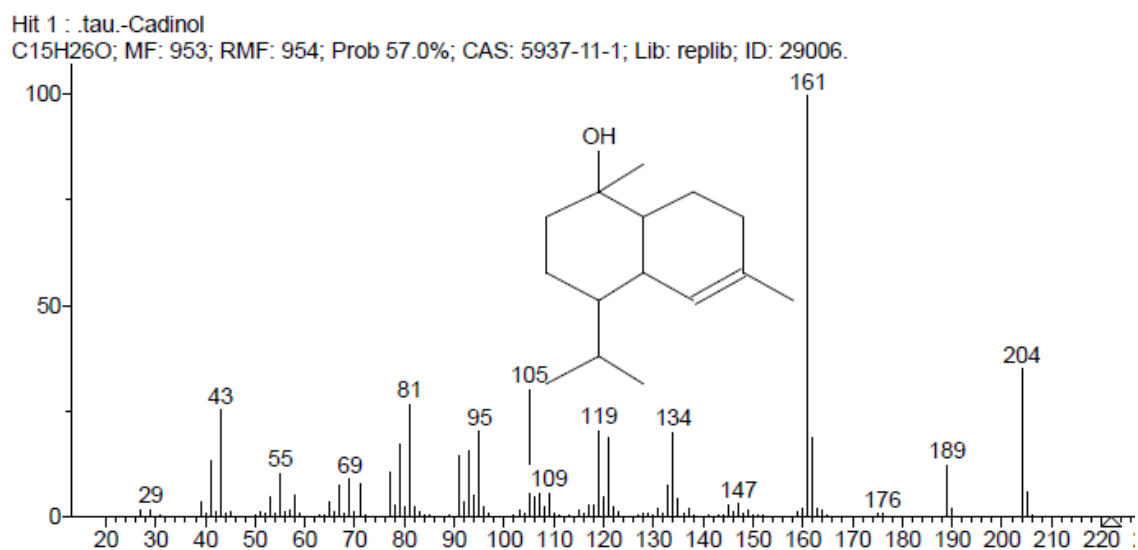


Figura 40B: Resultados obtenidos mediante GC-MS para la muestra Extracto de Hexano para τ -cadinol, espectro procedente de la biblioteca de espectros.

En dos fracciones procedentes de la cromatografía en columna de HDN6 y su posterior separación mediante capa fina preparativa se obtuvieron varios derivados terpénicos, cuya estructura aún es desconocida.

Terpeno A

Se analizó mediante RMN de ^1H (figura 41) y RMN de ^{13}C (figura 42).

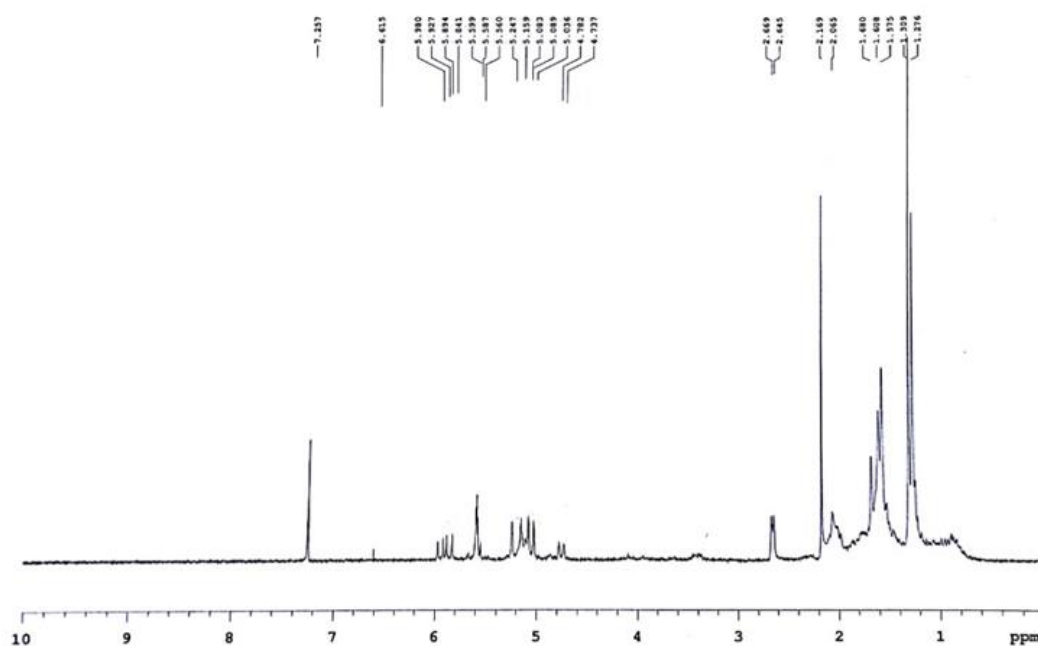


Figura 41: Espectro de RMN de ^1H del terpeno A (200 MHz, CDCl_3).

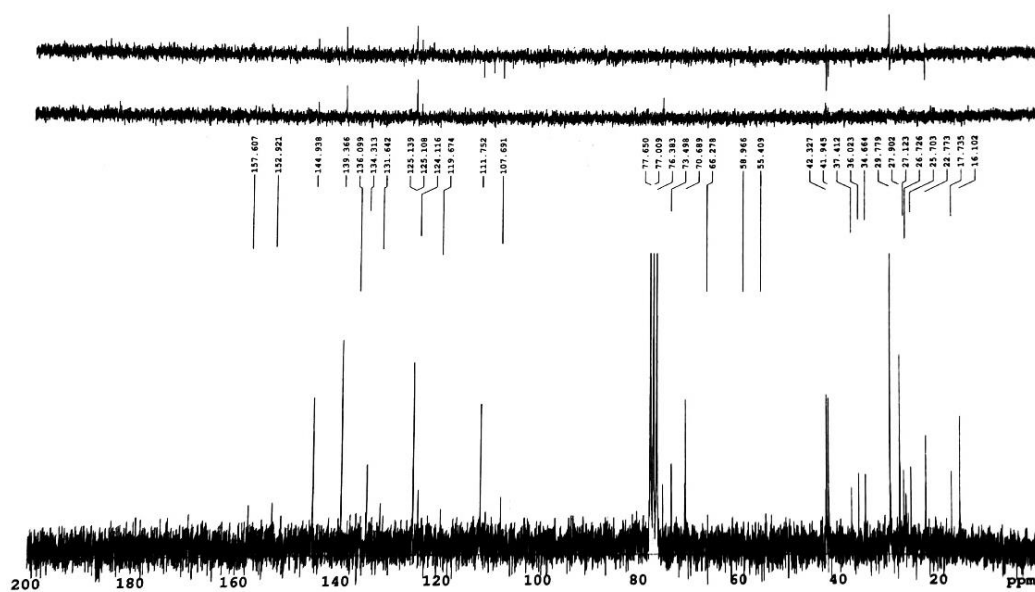


Figura 42: Espectro de RMN de ^{13}C del terpeno A (50 MHz, CDCl_3).

Terpeno B

7. CONCLUSIONES

En este trabajo se continúa con el análisis de la composición química de *Asteriscus aquaticus* (L.) Less. que fue iniciado por la Universidad de Salamanca en los años 80.

A partir de la planta seca se obtuvieron extractos a temperatura ambiente en hexano, diclorometano, diclorometano-metanol (1:1), metanol y metanol-agua (8:2), así como una infusión en agua.

Se obtuvieron las lactonas sesquiterpénicas que habían sido previamente aisladas en *Asteriscus aquaticus*: asteriscunolida A, B, C y D.

Se obtuvieron dos compuestos terpénicos con estructura aún desconocida.

Se obtuvieron tres fitosteroles: estigmasterol, sitosterol y campesterol.

Se obtuvo un triacilglicerol.

Se obtuvo τ -cadinol.

Todos los extractos, así como los productos obtenidos, fueron enviados para realizar bioensayos contra diversas líneas celulares el cáncer, parásitos humanos y animales y el virus del Dengue.

El análisis de los distintos extractos obtenidos y del resto de fracciones permitirá una caracterización química completa de esta compuesta.

8. PARTE EXPERIMENTAL

8.1 Instrumentación

- Las fracciones obtenidas se concentraron a presión reducida a temperatura de 40 °C en un rotavapor (*Buchi R-210*) con baño calefactor (modelo B-491) de la misma marca.
- El agua de la fracción acuosa se eliminó en un liofilizador (*Telstar, modelo LyoQuest*).
- Para la identificación de las moléculas presentes en los extractos se utilizaron los siguientes equipamientos:
 - Espectrómetros de resonancia magnética nuclear
(RMN) *Varian Mercury Vx 400 MHz*, utilizado para la obtención de los espectros de RMN de ^1H (400 MHz) y *Varian Mercury 200 MHz* para la obtención de los espectros de RMN de ^1H (200 MHz para ^1H y 50 MHz para ^{13}C). Las muestras se solubilizaron en cloroformo deuterado (CDCl_3) o en metanol deuterado (CD_3OD) (*Cambridge Isotope Laboratories*). Como referencia interna se utilizó la señal residual del disolvente sin deuterar. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en hercios (Hz).
 - Cromatógrafo de gases (*Agilent Technologies 7820 GC*) acoplado a un detector de masas (*Agilent Technologies 5977B EI MSD*), GC/MS; Columna cromatográfica HP-5ms (Fenilo al 5 % y dimetilpolisiloxano al 95 %) con helio como gas portador. Identificación por comparación de los espectros de masas de los compuestos utilizando la actualización 2017 de la biblioteca de espectros de masas Wiley 11th con NIST2016.
 - Espectroscopía IR
Los ensayos se realizaron en espectrofotómetros Spectrum BX (FT-IR System, PerkinElmer), todos ellos en película sobre cristales de NaCl.

○ Espetroscopía de masas de alta resolución (HRMS)

Los espectros de masas de alta resolución se adquirieron en un espectrómetro QSTAR XL, modelo Applied Biosystems, empleando el electrospray como modo de ionización a 5500 V y un detector híbrido de cuadrupolo-tiempo de vuelo (ESI-Q-TOF), introduciendo las muestras a través de un cromatógrafo HPLC Agilent 1100. Los iones observados se expresan como m/z .

8.2 Técnicas cromatográficas

- Cromatografía en capa fina (analítica): la muestra se depositó sobre láminas de poliéster Polycrom Si F₂₅₄ de 0,25 mm de espesor de capa con recubrimiento de gel de sílice e indicador fluorescente. Tras elución con la mezcla de disolventes adecuada para cada necesidad, se observaron al UV, y en algunos casos se revelaron con ácido fosfomolibdico al 10% calentando a 110 °C unos segundos.

- VLC: Vacuum Liquid Chromatography (Pelletier *et al.*, 1986) es una cromatografía rápida o percolación a vacío. Para ello se utiliza una placa de filtrado sobre la que añadimos silicagel. Se añade la fase estacionaria en forma sólida y se presiona por succión a vacío con la ayuda de un tapón de caucho. Los extractos se depositan en fase sólida adsorbidos sobre sílica gel en una proporción 1:2. El extracto se distribuye sobre el soporte de sílice obteniendo una fina capa homogénea de extracto en la parte superior. Se coloca en la parte superior un papel de filtro con el mismo diámetro que la parte interior de la placa filtrante. Después se añadieron consecutivamente los eluyentes secando a vacío entre cada una de las etapas.

- Cromatografía de flash en columna: Se utilizaron columnas de vidrio rellenas con gel de sílice 40-60 μm con una presión media (2 atm) para la fase estacionaria, se depositó la muestra en la parte superior, disuelta en la mínima cantidad de disolvente o adsorbida en sílice, y se utilizaron eluyentes de polaridad creciente.

- Cromatografía en capa fina: La muestra se depositó sobre láminas de PCL Silica Gel 60 F₂₅₄, 1 mm con zona de concentración 20 x 4 cm con recubrimiento de gel de sílice e indicador fluorescente. Tras la elución con la mezcla de disolventes adecuada, se observó al ultravioleta y se marcaron las bandas a

separar. Cada banda se separó de la placa, se homogeneizó con el mortero, se desactivo mezclando con unas gotas de agua. Después se utilizó columna de preparativa para, pasando acetato de etilo liberar la sustancia de la sílice.

8.3 Material vegetal

La muestra objeto de análisis de *A. aquaticus* fue recogida en el término de Almenara de Tormes, en el paraje conocido como Valcuevo Chico (Salamanca, España), en las coordenadas 41°03'39.23" N y 5°48'44.20" W, a 770 m de altitud sobre el nivel del mar el día 30 de junio de 2016. Identificada como “*Asteriscus aquaticus* (L.) Less.” por el Dr. Cipriano Jesús Valle, que conservó un pliego de referencia en el herbario de la Universidad de Salamanca SALA con el identificador 158955. Fue secada a temperatura ambiente, cortada en tres partes (radícula, tallo inferior sin hojas, y tallo superior con hojas y flores) y triturada la parte superior hasta la obtención de un polvo homogéneo.

8.4 Extracción y aislamiento

Se realizaron maceraciones 660g de planta en 2 x 3 L de cada disolvente respectivamente, con agitación a temperatura ambiente consecutivas con periodos superiores a 20 h cada una, con hexano, diclorometano, diclorometano-metanol (1:1), metanol, metanol-agua (8:2), repitiendo tres veces con cada disolvente antes de cambiar al siguiente. Finalmente se realizó una única infusión con 50 g del residuo vegetal tras las maceraciones, en agua caliente. Se mantiene un testigo de cada extracto para posibles extracciones futuras con otras técnicas. Para la eliminación del disolvente tras la maceración en hexano, diclorometano (DCM), diclorometano-metanol (1:1) y metanol (MeOH), se utilizó rotavapor a 40 ° C. En los extractos de metanol-agua (8:2) y en la infusión, para evaporar el metanol y reducir al máximo el volumen de agua se utilizó rotavapor a 50 ° C, liofilizando posteriormente los extractos.

Tabla 5: Resultados obtenidos a partir de las maceraciones sucesivas a partir del extracto de sumidad florida de *A. aquaticus*.

Disolvente extractor	Obtención (g)				Rendimiento %			
	Día 1	Día 2	Día 3	Total	1	2	3	Total
Hexano	18,77	6,01	1,51	26,81	2,84	0,91	0,22	3,97
DCM	6,39	1,80	0,90	9,20	0,96	0,27	0,13	1,36
DCM-MeOH (1:1)	13,65	8,07	7,66	29,49	2,06	1,22	1,16	4,44
MeOH	10,50	9,16	8,18	27,93	1,59	1,38	1,24	4,21
MeOH-H ₂ O (8:2)	12,01	12,12	10,92	35,05	1,82	1,83	1,65	5,30
Infusión agua caliente	1,35			1,35	2,7			2,7

8.4.1 Descerado del Extracto de Hexano

El extracto de hexano (26,81 g) se descera con metanol, separándose una fracción insoluble en metanol a 50 °C y tras llevar a -20 °C durante al menos 48 h, una fracción insoluble en metanol frío (figura 15). Con la fracción soluble se repite el proceso, reuniendo las partes semejantes resultantes de las dos etapas. Se obtuvieron 10,93 g de descerado (HD) (fracción soluble en metanol caliente y posteriormente en metanol frío), 9,07 g de ceras duras (fracción insoluble en metanol caliente) y 4,17 g de ceras blandas (fracción insoluble en metanol frío).

8.4.2 Separación ácido-base

El descerado del extracto de hexano se separa por extracción líquido-líquido con Et₂O y sucesivas extracciones con disoluciones acuosas de NaHCO₃ saturado (4 veces) y Na₂CO₃ al 10% (4 veces). (Figuras 16 y 17). Se obtuvieron 8,31 g de fracción neutra, 1,28 g de ácidos fuertes extraídos con NaHCO₃ y 161 mg de ácidos medios extraídos con Na₂CO₃.

8.4.3 Fraccionamiento VLC de la fracción neutra de hexano descerado (HDN)

La fracción neutra, 8,31 g, se fracciona mediante la técnica cromatográfica VLC (figura 18), con los extractos depositados en fase sólida adsorbidos sobre sílica gel. Se utilizan 200 mL de mezclas de hexano, diclorometano, acetato de etilo (AE) y metanol, cuya relación fue cambiando para obtener fracciones de polaridad creciente. Se obtuvieron 10 fracciones (tabla 6).

Tabla 6: Resultados obtenidos tras la separación de la fracción neutra de hexano mediante VLC con eluyentes de polaridad creciente:

Fracción	Eluyente	Cantidad de sustancia (g)
HDN1	9 Hex:1 DCM	0,199
HDN2	75 Hex:25 DCM	0,152
HDN3	50 Hex:50 DCM	1,147
HDN4	DCM	2,403
HDN5	75 DCM:25 AE	3,057
HDN6	50 DCM:50 AE	0,775
HDN7	AE	0,261
HDN8	75 AE:25 MeOH	0,140
HDN9	50 AE:50 MeOH	0,066
HDN10	MeOH	0,028

En la fracción 4 (HDN4), 2,40 g, obtenida con diclorometano, se observó la formación de un precipitado de aspecto cristalino (figura 19), por lo que se lavó con hexano, la parte insoluble fue cristalizada con Et₂O, obteniéndose 120 mg de asteriscunolida A (San Feliciano *et al.*, 1984). La parte soluble, 2,18 g, se fraccionó mediante VLC utilizando mezclas de hexano y acetato de etilo, cuya relación fue cambiando para obtener ocho fracciones de polaridad creciente, cinco de ellas con

compuestos de interés para nuestro estudio (Tabla 7). Se identificaron triacilglicerolos, τ -cadinol y mezclas de asteriscunolidas A, B, C, D (tabla 7).

Tabla 7: Resultados obtenidos tras la separación de la fracción HDN4 soluble mediante VLC con eluyentes de polaridad creciente:

Fracción	Eluyente	Cantidad de sustancia (mg)	Sustancia identificada
HDN4B	95 Hex:5 AE	39	TAG y τ -cadinol
HDN4C	9 Hex:1 AE	505	τ -cadinol y TAG
HDN4F	6 Hex:4 AE	375	Asteriscunolidas A, B, C y D
HDN4G	1 Hex: 1 AE	88	Asteriscunolidas B,C y D
HDN4H	AE	4	Asteriscunolidas C y D

La fracción 5 (HDN5, 3,06 g) se fraccionó mediante la técnica VLC utilizando mezclas de hexano y acetato de etilo, cuya relación fue cambiando para obtener seis fracciones de polaridad creciente, cinco con compuestos de interés, que serían cromatografiadas posteriormente, identificándose triacilglicerolos, τ -cadinol y mezclas de asteriscunolidas,

En HDN5C (592 mg) se observó presencia de asteriscunolida A y otras lactonas similares, por lo que se fraccionó mediante cromatografía de flash en columna (figura 20). Las fracciones obtenidas se analizaron en cromatografía y por RMN de ^1H , obteniéndose 8 mg de asteriscunolida A, 10 mg de asteriscunolida B, 3 mg de asteriscunolida C, 39 mg de τ -cadinol, y fracciones con triacilglicerolos y fitoesteroles.

La fracción HDN6, 775 mg se cromatografió en columna eluyéndose con mezclas de Hexano-Acetato de etilo de polaridad creciente. La fracción 22-23 (6 Hex-4 AE) se

cromatografió en una placa de cromatografía en capa fina (Figura 21), obteniéndose diez bandas, de las bandas 6 y 8 fueron aislados compuestos terpénicos de estructura aún desconocida.

8.5 Ensayos de Bioactividad

Tras el análisis de la composición química de *A. aquaticus*, se enviaron a realizar bioensayos de los diferentes extractos iniciales (hexano, diclorometano, diclorometano-metanol, metanol, metanol-agua e infusión), las distintas fracciones de hexano tras el descerado (fracciones con ácidos fuertes, ácidos medios y neutra), y de los compuestos (asteriscunolida A, la mezcla de asteriscunolidas, y la mezcla de τ -cadinol y triacilglicerol) obtenidos por fraccionamiento. Se enviaron a la Universidad de León, a los grupos del Dr. Rafael Balaña Fouce, del Departamento de Ciencias Biomédicas, y de la Dra. María Martínez Valladares, del Instituto de Ganadería de Montaña para el estudio de efectos antiparasitarios como antileishmánicos: frente a *Leishmania infantum* (promastigotes extracelulares y amastigotes intracelulares), junto a esplenocitos de ratón (las células hospedadoras) y líneas celulares humanas; y como antihelmíntico: frente a las tricostrongilidosis ovinas frente al nematodo gastro-intestinal de rumiantes *Teladorsagia circumcincta*. Se enviaron a realizar ensayos antifúngicos y frente al virus del Dengue, al grupo de la Dra. Liliana Betancur, del Grupo de Investigación Dermatológica de la Universidad de Antioquia (Colombia). Y fueron preparadas muestras para enviar al Instituto Politécnico de Bragança para estudiar su citotoxicidad frente a distintas líneas celulares de cáncer, hepatotoxicidad y como anti-inflamatorios y al departamento de Parasitología de la Universidad de Salamanca para estudiar sus efectos frente al nematodo *Strongyloides venezuelensis*.

9. REFERENCIAS

- Akssira, M., Mellouki, F., Salhi, A., Alilou, H., Saouf, A., El-Hanbali, F., Arteaga, J. F., Barrero, A. F., (2006). Naupliolide, a sesquiterpene lactone with a novel tetracyclic skeleton from *Nauplius graveolens* subsp. *Odorus*. *Tetrahedron Letters* 47: 6719–6721
- Amorim, M. R. H., Gil-da-Costa, R. M., Lopes, C., Bastos, M. M. S. M., (2013). Sesquiterpene lactones: Adverse health effects and toxicity mechanisms. *Critical Reviews in Toxicology* 559-579
- Aramburu-Aizpiri, M^a. A., (1982). Ciclohumulánólicas y ácidos sesquiterpénicos de *Asteriscus aquaticus* L. *Memoria de Licenciatura*. Universidad de Salamanca
- Aramburu-Aizpiri, M^a. A., (1987). Estudio de los Componentes de *Asteriscus aquaticus* L.: Lactonas y otros sesquiterpenoides con nuevos esqueletos relacionados con el humulano. *Memoria de Licenciatura*. Universidad de Salamanca
- Brown, G.D., ¹³C-²H correlation NMR spectroscopy studies of the in vivo transformations of natural products from *Artemisia annua* (2003) *Phytochemistry Reviews*. Volume 2, Issue 1-2, 2003, Pages 45-59
- Brown, G.D., Liang, G-Y., Sy, L.K., Terpenoids from seeds of *Artemisia annua* *Phytochemistry* Volume 64, Issue 1, September 2003, Pages 303-323.
- Chaari, A., Jaanet, H. B., Salmons, G., Mighri, Z., (2005). Nauplathizine, a new unusual O-heteroside from *Nauplius aquaticus*. L. *Natural Product Research* 19: 5: 523-528
- Ferreira, I. C. F. R., Vaz, J. a, Vasconcelos, M. H., & Martins, A. (2010). Compounds from wild mushrooms with antitumor potential. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 10, 424–436.
- Flora-On: Flora de Portugal Interactiva. (2014). Sociedade Portuguesa de Botânica. www.flora-on.pt. Consulta efectuada em 6-12-2017
- Franco, L., Sánchez, C., Bravo, R., Rodríguez, A., Barriga, C., Juárez, J. C., (2012). The sedative effects of hops (*Humulus lupulus*), a component of beer, on the activity/rest rhythm. *Acta Physiologica Hungarica* 133-139
- Ledesma-Pérez, E., (1981). Lactonas humulenoides de *Asteriscus aquaticus* L. *Memoria de Licenciatura* Universidad de Salamanca
- Lodewyk, M.W., Soldi, C., Jones, P.B., Olmstead, M. M., Rita, J., Shaw, J. T., Tantillo, D. J., (2012). The Correct Structure of Aquatolide, Experimental Validation of a Theoretically-Predicted Structural. Revision: *Journal of the American Chemical Society*.
- Majdi, M., Ashengroph, M., Abdollahi, M. R., (2016). Sesquiterpene lactone engineering in microbial and plant platforms: parthenolide and artemisinin as case studies. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:1041–1059
- Mapa localización Anthos. [2017]. Sistema de información de las plantas de España. Real Jardín Botánico, CSIC- Fundación Biodiversidad. Recurso electrónico en www.anthos.es. Consulta realizada en [20/02/2017]

- Navarro, F., Ladero, M., Valle, C., (1981) Descripción botánica de *Asteriscus aquaticus* para la tesis de Ledesma-Perez. E., Departamento de Biología Vegetal, Universidad de Salamanca.
- Nes, W. D., Norton, R. A., Benson, M., (1991) Carbon 13 studies on sitosterol biosynthesized from 13C mevalonates. *Phytochemistry* Vol 31, pp, 805-811, 1992.
- Pelletier, S. W., Chokshi, H. P., Desai, H. K., (1986). Separation of Diterpenoid Alkaloid Mixturis Using Vacuum Liquid Chromatography. *Journal of Natural Products* Vol. 49, No. 5, pp. 892-900
- Picman, A. K., (1986). Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochemical Systematics and Ecology*. 14: 3: 255-281
- San Feliciano, A., Barrero, A. F., Medarde, M., Miguel del Corral, J. M., Aramburu-Aizpiri. M^a. A., (1984). Asteriscunolides A, B, C and D, the first humulanolides; Two pairs of conformationally stable stereoisomers. *Tetrahedron* 40:5, 1984:873-878
- San Feliciano, A., Barrero, A.F., Medarde, M., Miguel del Corral, J. M., Aramburu-Aizpiri. M^a. A., Perales, A., Fayos, J., (1985). Asteriscanolide. A sesquiterpene lactone with a new natural skeleton. *Tetrahedron Letters* 26: 19: 2369-2372
- Sánchez-Gil, E., (1982). Nuevos componentes de *Asteriscus aquaticus* L. *Memoria de Licenciatura* Universidad de Salamanca.
- Steenackers, B., De-Cooman, L., De-Vos, D., (2015). Chemical transformations of characteristic hop secondary metabolites in relation to beer properties and the brewing process: A review. *Food Chemistry* 742-756
- *The Plant List* (2013). Version 1.1. Published on the Internet; <http://www.theplantlist.org/> (accessed 1st January)
- Tutin T. G., Heywood, V. H., Burges, N. A., Valentine, D. H., (2010). *Cambridge University Press Flora Europaea Volume 4 Plantagenaceae to Compositae (And Rubiaceae)*
- Universitat des Illes Balears, Universidad de Valencia 17/02/17 Herbario Virtual (2017) <http://herbarivirtual.uib.es/cas-uv/especie/5065.html>