

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN



ESTUDIO QUIMICO DE Stevia lucida

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES-CUAUTITLAN



SECCION DE EXAMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
ENRIQUE RAMON ANGELES ANGUIANO
MEXICO, D. F. 1982



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

I.-	INTRODUCCION	1
II.-	PARTE TEORICA	5
III.-	PARTE EXPERIMENTAL	14
IV.-	RESULTADOS Y DISCUSION	20
V.-	CONCLUSIONES	38
VI.-	BIBLIOGRAFIA	39

1.- INTRODUCCION.

Los procesos biosintético (1) en las plantas se llevan a cabo por medio de la fotosíntesis, donde se utiliza la energía solar para la elaboración de compuestos orgánicos a partir de CO_2 . Los productos iniciales de la fotosíntesis son carbohidratos, los cuales serán incorporados al complejo enzimático para la formación de materiales que son universalmente distribuidos como son aminoácidos, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos, este proceso es conocido como metabolismo secundario al mecanismo en los cuales se biosintetizan compuestos complejos a partir de materiales primarios y -- que involucran complejos enzimáticos controlados genéticamente por lo tanto característico de género y especie. De esta manera los productos naturales son catalogados por los investigadores como metabolitos secundarios, en base a la siguiente clasificación:

Metabolitos Primarios.- Sustancia química distribuidas uniformemente en los organismos vivos y que de alguna manera participan en forma directa con la actividad celular, por ejemplo los azúcares, ácidos carboxílicos y aminoácidos.

Metabolitos Secundarios.- Componentes característicos de un género, familia ó especie cuya estructura son generalmente complejas; no intervienen en forma directa en el metabolismo celular, se desconoce de la mayoría su función en los organismos de donde han sido aislados, por esto se les ha llamado "Productos Terminales del Metabolismo "

Fue hasta el siglo XIX cuando el interés por la investigación en los productos naturales se inicia, motivado por el desarrollo de las ciencias empíricas, por ejemplo el estudio de los Terpenoides se origina por la curiosidad de los científicos de aquella época por conocer la composición química de algunos aceites naturales de uso común entre la población. Hoy en día gracias al avance tecnológico, es posible estudiar con mayor profundidad y detalle las características físicas, químicas y biológicas de los metabolitos secundarios.

El género Stevia (2) se encuentra clasificado como uno de los más abundantes en el Continente Americano y en especial la zona central de México, de este se han aislado una serie de componentes de interés químico como son la "Stevina" (4) de la Stevia rhombifolia H.B.K. en 1967. De la Stevia serrata Cav se han aislado varios componentes, llamados "Cristininas" I, II, III (5,6), la "Carmelina" (7). En 1974 de la S. berlandieri (8) se aisló el triacotano, taraxasterol, sitosterol y la 5,6 dihidroxi, 7,8,4 trimetoxiflavona. De la S. rebaudiana Bertoni (9-15) se aisló un glucósido diterpénico conocido como "Steviósido" cuya característica principal es que posee un poder edulcorante 300 veces más que la sacarosa.

La planta en estudio fue clasificada botánicamente de la siguiente manera

Reino Vegetal
División Spermathopyta
Subdivisión Angiospermal
Clase Dicotyledonal
Orden Synandrales
Familia Compuestas.
Tribu Eupatoriai
Género Stevia
Especie Lucida

El objeto de este trabajo es aislar algunos de los productos naturales principales presentes en la planta, purificarlos y determinar su estructura química por métodos químicos y espectroscópicos que incluyen a la resonancia magnética nuclear de Hidrógeno (^1H , -RMN). Espectroscopía de Infrarrojo (I.R); Espectroscopía de Masas (E.M); Ultravioleta y Visible (UV, Vis.); Rotación Óptica ($[\alpha]$).

DIAGRAMA I. ESQUEMA GENERAL DEL ORIGEN DE LOS PRODUCTOS NATURALES.

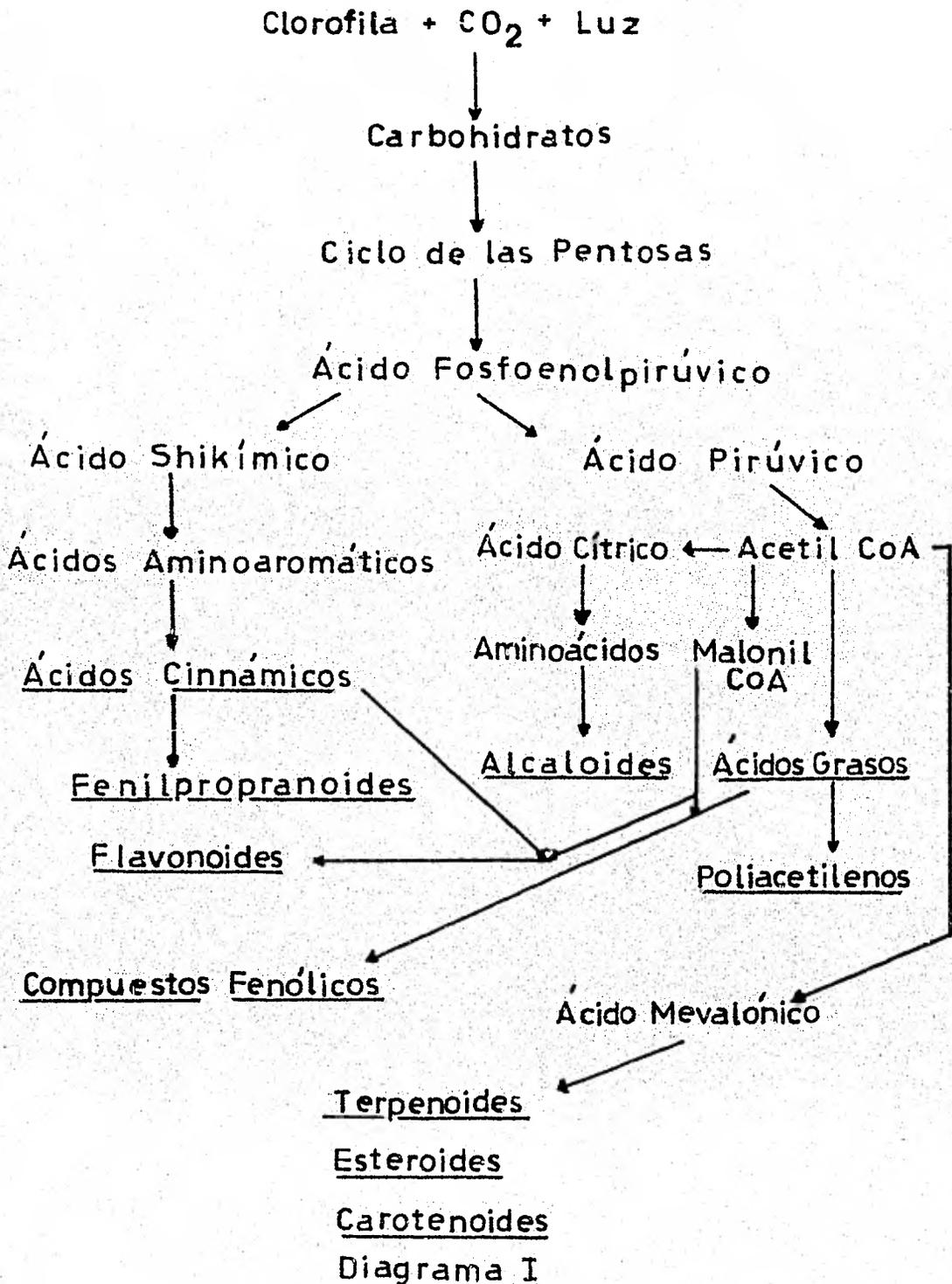
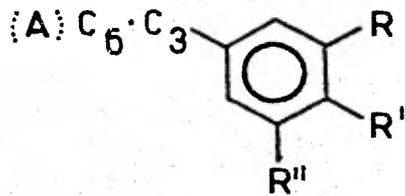
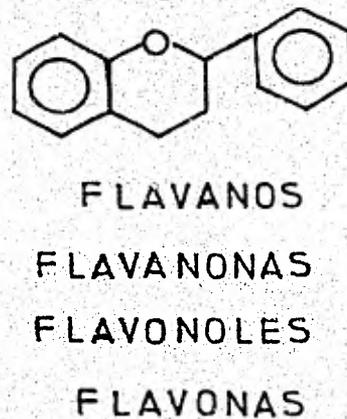
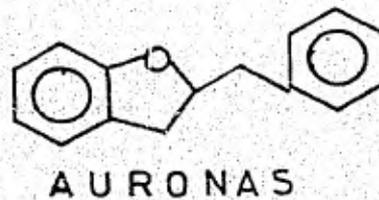
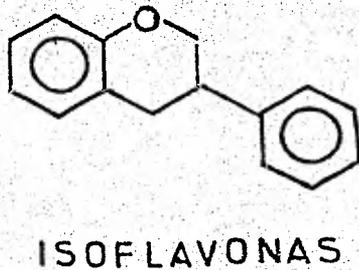


Diagrama I



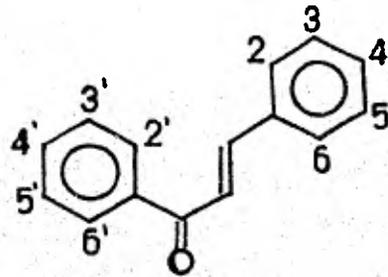
R=R''=H , R'=OH
R'=R''=OH, R=H
R=R'=R''=OG
R=R'=R''=H

La clasificación de este tipo de productos naturales, es de acuerdo a la disposición de la cadena que une a los anillos A y B así tenemos:



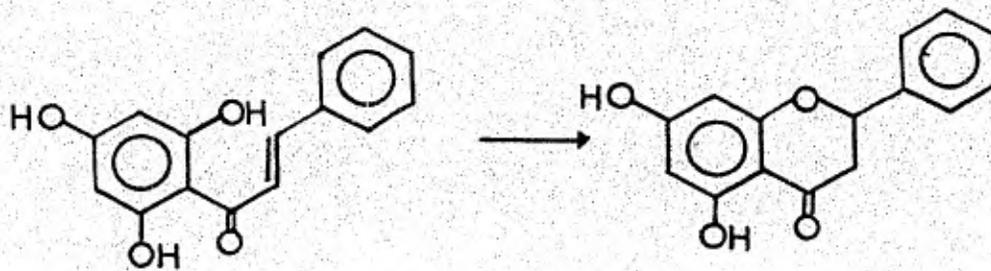
CHALCONAS

Las polihidrochalconas son encontradas en numerosas plantas, pero su distribución natural es poco común, entre estas encontramos:



- Mareína -2',3',4',3,4 Pentahidroxi; (4'-glucósido) -
- Coregosina -2',4',3,4 Tetrahidroxi; (4'-glucósido) -
- Stillopsina -2',4',5',3,4 Pentahidroxi; (? -glucósido) -
- Lancedina -2',4',3,4. Tetrahidroxi; 3 Metoxi (?-glucósido)

La razón por la cual son ocasionalmente encontrados es debido a que sufren un rearrreglo a flavanonas entidades mucho más estables .

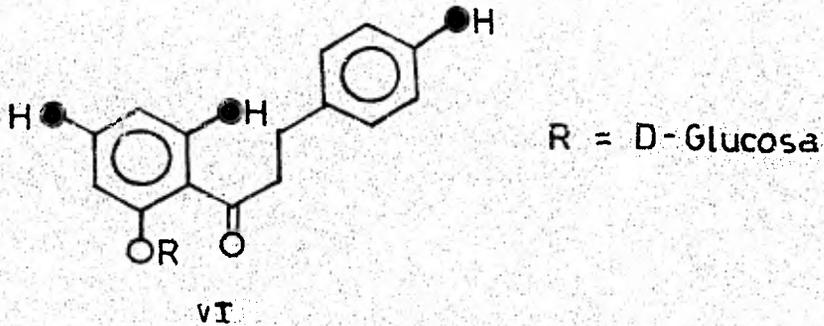


2',4',6'4 Tetrahidroxi chalcona
Inestable

Naringenina
Estable

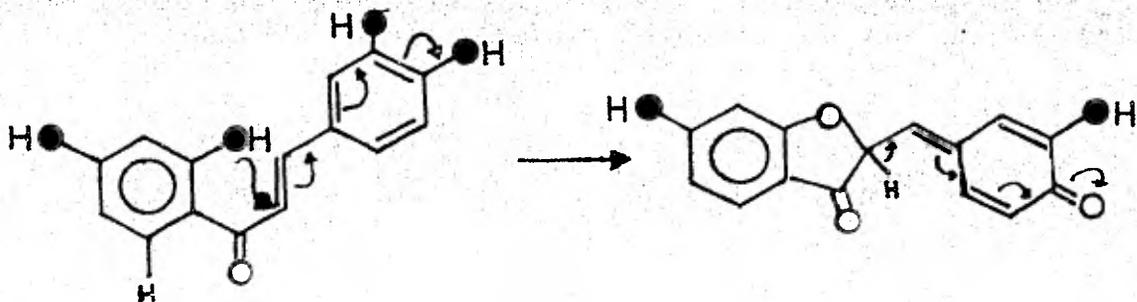
DIHIDRO CHALCONAS

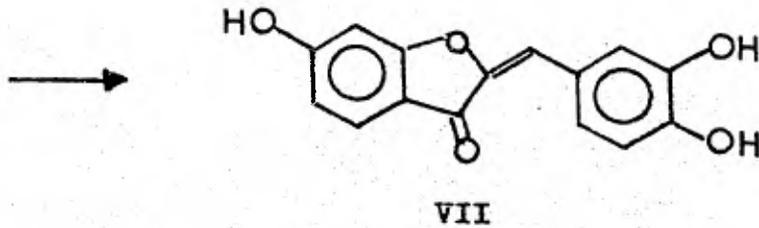
Compuestos raros de encontrar en la naturaleza siéndolo el más importante de este grupo la Forizina (VI) que se aisló de las raíces de la quina y de la cual se han hecho estudios farmacológicos encontrándose que provoca glucosuria, como una consecuencia de una inhibición en la reabsorción de glucosa en los túbulos renales.



AURONAS

Son llamadas también 2-benzal-cumaran-3-onas. Estas son productos de una oxidación natural de las chalconas. Formando un anillo de 5 miembros. El ejemplo representativo de este grupo es la Sulfuretina (VII).

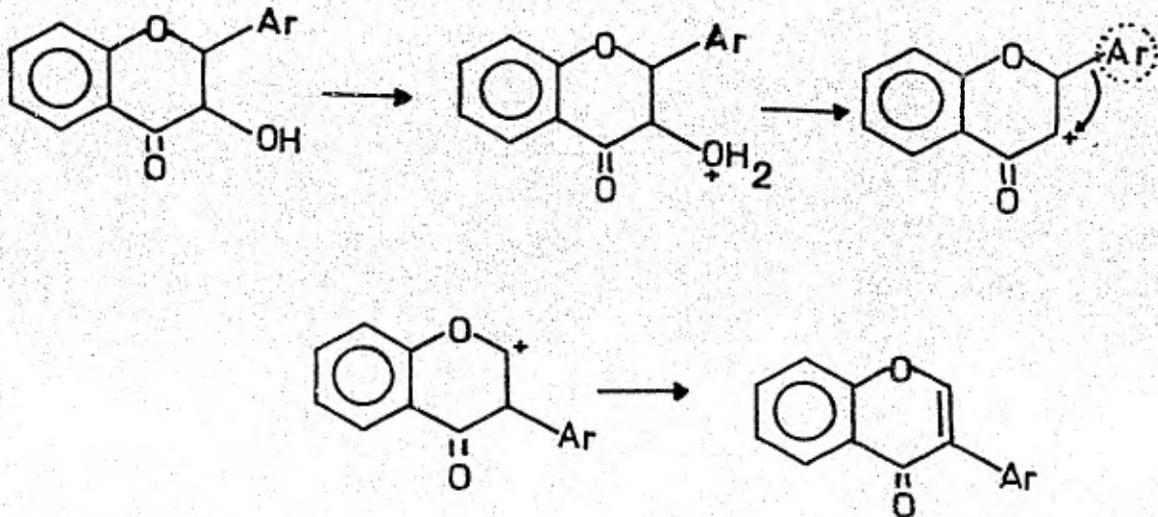




Esta reacción puede ser inhibida *in vitro* mediante la adición de cianuro.

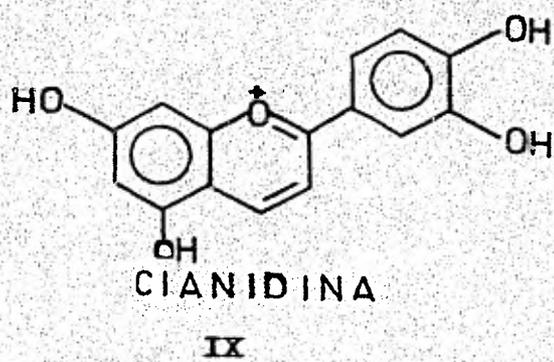
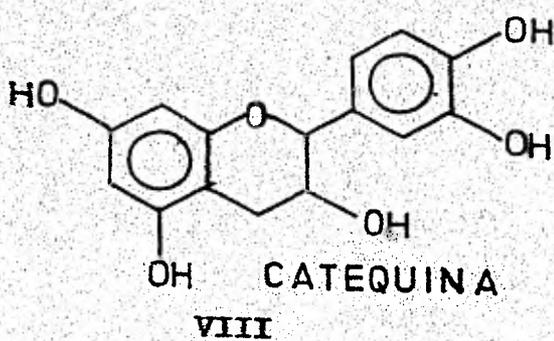
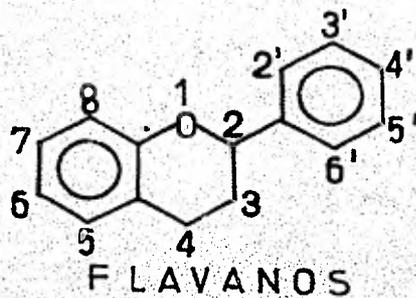
ISOFLAVONAS

Forman parte de los compuestos del tipo de los flavonoides de mayor abundancia en vegetales; los cuales poseen como característica particular la de tener el anillo B unido por el carbono tres, esto como consecuencia de un rearrreglo durante su biosíntesis.

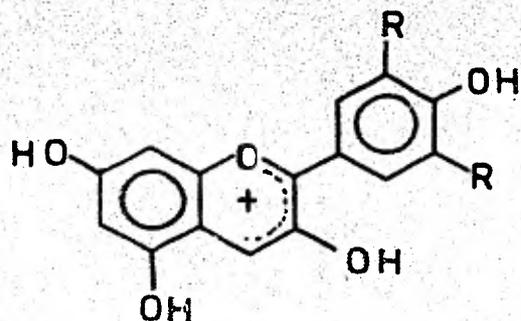


FLAVANOS

En este grupo encontramos incluidos a los Flavanoles (catequinas VIII, antocianinas IX) y a los Flavanos - 3, - 4, - dioles.



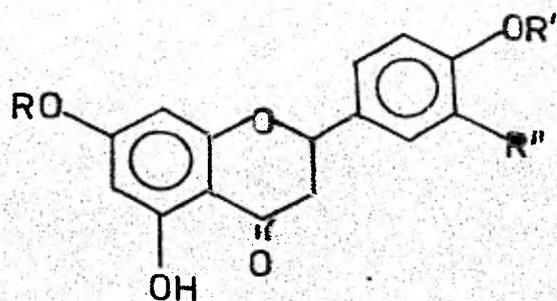
Los más importantes son las antocianinas que son los constituyentes principales de los pigmentos azul, rojo ó violeta de algunas plantas.



- X - R=R'=H Pelargonidina
- XI - R=H R'=OH Cianidina
- XII - R=R'=OH Delfinina
- XIII - R=H R'=OME Peonidina
- XIV - R=R'=OME Malvidina
- XV - R=OH R'=OME Petunidina

FLAVANONAS

Grupo en donde encontramos a la Hesperetina (XVI) y a la Naringenina (XVII) como los más importantes que han sido aislados de la uva y la naranja respectivamente.

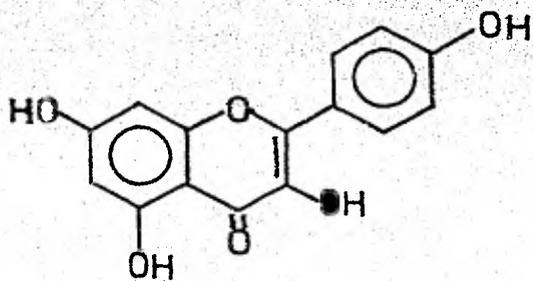


XVI - $R'=R''=H$ R= Rutinosa

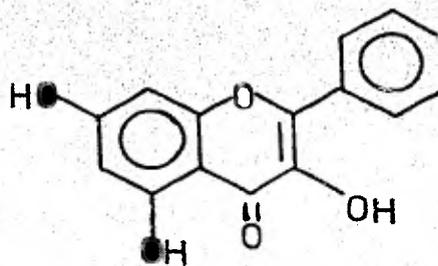
XVII - $R=R'=R''=H$

FLAVONOLES

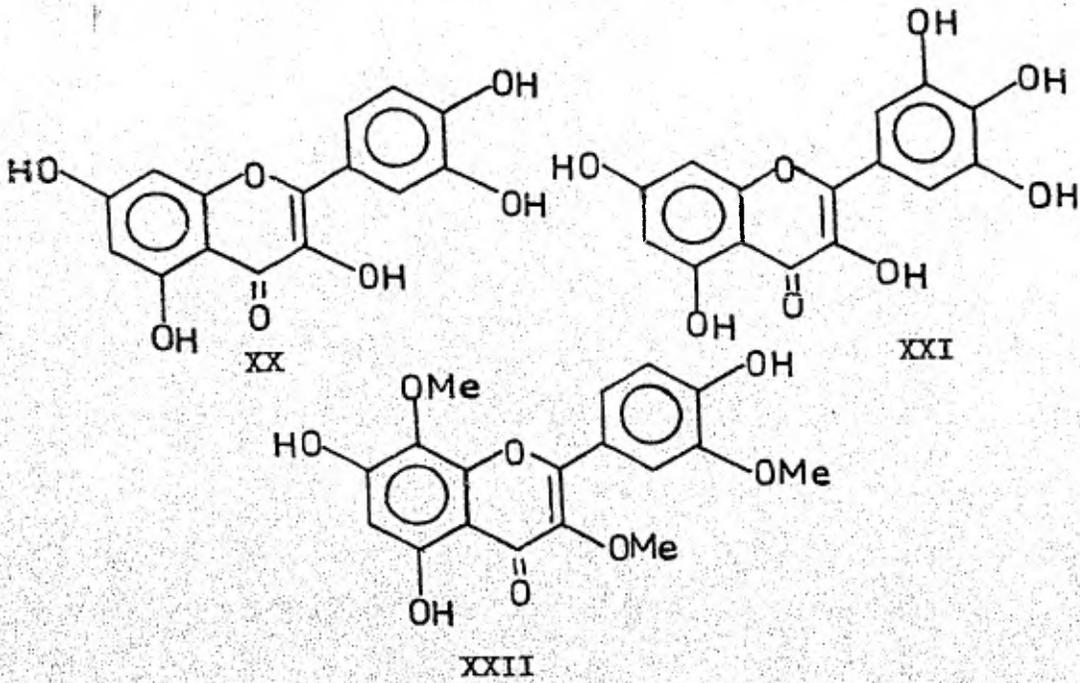
Son flavón - 3 - oles cuya característica es precisamente la sustitución en el carbono número tres de un hidrógeno por un radical hidroxilo ó metoxilo. Entre estos tenemos a el Kampferol (XVIII), Galangina (XIX), Quercetina (XX), Mirecetina (XXI), Terwantina (XXII).



XVIII

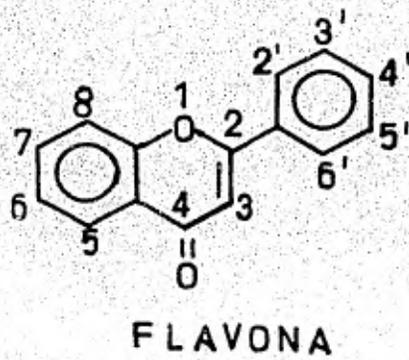


XIX



FLAVONAS

Son Flayonoïdes de mayor distribución en la naturaleza de los cuales gran cantidad de ellos han sido descritos ampliamente en la literatura.



III.- PARTE EXPERIMENTAL

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fischer-Jones y no están corregidos. La pureza de los productos y el desarrollo de las reacciones se siguió por medio de cromatoplasmas de sílica gel F-54; utilizando como reveladores sulfato cérico al 1% en H_2SO_4 2N y vapores de Iodo. Los microanálisis fueron efectuados por la Dra. Pascher en Bonn, Alemania. Los espectros de U.V. se determinaron en etanol al 95% en un espectrofotómetro Perkin Elmer mod. 337 utilizando cloroformo como disolvente, KBr si fue en pastilla. Los espectros de masas se determinaron en un espectrofotómetro Hitachi Perkin Elmer mod. RMU-7H. Los espectros de RMN- 1H se determinaron en espectrómetros Varian A-60, Varian HA-100 y Hitachi Perkin Elmer mod R 24 B. Los desplazamientos químicos están dados en ppm, referidos al tetrametilsilano como referencia interna. La determinación de la Rotación Óptica se realizó en un Polarímetro Digital Perkin Elmer mod. 241.

La planta Stevia lúcida fue recolectada en Sinaxtla, Estado de Oaxaca el mes de agosto de 1979.

2 Kg de la planta seca y molida se sometieron a extracción utilizando cloroformo como disolvente durante un lapso de 8 hr, resultando de esta operación 200 gr de extracto crudo. Este fue disuelto en una mezcla de hexano-cloroformo 80:20 y cromatografiado en columna utilizando Tonsil (3) como fase estacionaria, aumentando gradualmente la polaridad hasta usar un sistema cloroformo 100%, obteniéndose de esta forma tres fracciones I, II y III de menor a mayor polaridad.

La fracción menos polar (I) la cual consistía en 20 gr fue recromatografiada en 500 gr de sílica gel iniciando la elución con benceno 100%, aumentando la polaridad hasta finalizar con acetato de etilo al 100%. Las fracciones obtenidas con la elución 85:25 benceno-acetato de etilo fueron a su vez recromatografiadas en placa preparativa de sílica gel, utilizando como fase móvil hexano-acetona 90:10, obteniendo 150 mg de un aceite ligeramente amarillo, el cual se observó su inestabilidad a condiciones normales de temperatura, humedad y luz, por lo que su manejo se efectuó en frío y evitando el contacto con la luz; este compuesto fué nombrado como Acido Cuautitlanoico .

Espectroscopía - IR (Espectro 1) $3500-3200\text{ cm}^{-1}$ (O-H ν); 2950 cm^{-1} y 2910 cm^{-1} (C-H ν_{as} de metilo y metileno respectivamente); 1690 cm^{-1} (C=O ν_{s} , de carbonilo); 1460 cm^{-1} y 1390 cm^{-1} (C-H δ_{as} , de metileno y metilo respectivamente); 1440 cm^{-1} , 1020 cm^{-1} y 870 cm^{-1} (furano). RMN⁻¹ (Espectro 2): 7.30 ppm (m, 1-H₁₅); 7.17 (1-H₁₆); 6.25 (1-H₁₄); 5.39 ppm (s, H₇); 1.70 ppm (s, Me₁₇); 1.20 ppm (s, Me₁₈); 0.79 ppm (s, Me₂₀). Masas (Espectro 3), ión molecular de m/e=316 (24.-5%); m/e=234.5 (70%) (-C₅H₅O); pico base de m/e=133.5.

Ester metílico del Acido Cuautitlanoico,- A 100 mg del Acido Cuautitlanoico disueltos en éter etílico se adicionó una solución etérea de diazometano, la mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 1 hr a temperatura ambiente; el disolvente fue evaporado a presión reducida, obteniendose 70 mg de una aceite, el éster derivado II (67% de rendimiento).

Espectroscopía - $[\alpha]_D = -36.97^\circ$ (C=1.19 mg/ml); UV (Espectro 4); $\lambda_{\max} = 215 \text{ nm}$ ($\epsilon = 4633.1$); IR (Espectro 5); 1730 cm^{-1} (C-O ν , carbono de éster); RMN- ^1H (Espectro 6); 3.61 ppm (s, metilo de éster); 1.70 ppm (s, Me $_{17}$); 1.20 ppm (s, Me $_{18}$); 0.79 ppm (s, Me $_{20}$). Masas (Espectro 7) ión molecular M^+ de m/e=330 (10.3%); pico base de m/e=82 (C $_2$ H $_6$ O); m/e=81 (73.6%) (C $_5$ H $_5$ O).

Reducción del éster metílico.- A 60 mg del éster II, disueltos en dioxano anhidro se adicionó 100 mg de LiAlH $_4$ poco a poco con agitación continua y a temperatura ambiente. Una vez terminada la reacción se agregó lentamente una solución de NaOH al 1%, se filtró y se extrajo con éter etílico; el disolvente fue removido a presión reducida, obteniéndose 50 mg de un aceite, el alcohol derivado III (91% de rendimiento)

Espectroscopía - $[\alpha]_D = -15.46^\circ$; IR (Espectro 8); $3640-3200 \text{ cm}^{-1}$ (O-H ν s alcohol primario); 1240 cm^{-1} (O-H δ en el plano); 1050 cm^{-1} (C-OH ν s). RMN- ^1H (Espectro 9) 3.20 ppm (Sistema AB; J=11 Hz; 2H); 1.50 (s, OH); 1.70 ppm (s, Me $_{17}$); 0.83 ppm (s, Me $_{18}$); 0.80 ppm (s, Me $_{20}$). Masas (Espectro 10) ión molecular M^+ de m/e=302 (5.5%); pico base de m/e=81.2 (C $_5$ H $_5$ O); m/e=221 (8%) (-C $_5$ H $_5$ O).

Acetilación del alcohol III.- A 40 mg del alcohol III, disueltos en 15 ml de acetato de isopropenilo, se adicionaron aproximadamente 2 mg de ácido paratoluen-sulfónico manteniéndose en agitación durante 5 hr a temperatura am-

biente; transcurrido el tiempo se agregó agua y se extrajo con acetato de etilo; el disolvente se evaporó a presión reducida, obteniendo 32 mg de un aceite, el acetato IV correspondiente (70.21% de rendimiento)

Espectroscopía - IR (Espectro 11) 1735 cm^{-1} (C-O ν_s carbonilo); 1235 cm^{-1} (C-O-C, ν_{as}) RMN- ^1H (Espectro 12); 3.75 ppm (cuarteto AB, para 2H de $\text{CH}_2\text{-OAc}$); 2.01 ppm (s, Me-C=O); 1.71 ppm (s, Me $_{17}$); 0.89 ppm (s, Me $_{18}$); 0.79 ppm (s, Me $_{20}$). Masas (Espectro 12) ión molecular M^+ de $m/e=344.4$ (8.0%); $m/e=263$ ($-\text{C}_5\text{H}_5\text{O}$); $m/e=262$ ($-\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$); pico base de $m/e=82.1$ ($\text{C}_5\text{H}_6\text{O}$); $m/e=81.2$ (81.4%) ($\text{C}_5\text{H}_5\text{O}$).

Oxidación del acetato IV con tetróxido de osmio.- A 30 mg del acetato IV, disueltos en dioxano se adicionó 1 ml de una solución de 10 mg/ml de tetróxido de osmio en dioxano manteniéndose en agitación continua a temperatura ambiente durante 48 hr. Una vez terminada la reacción, se hizo burbujear ácido sulfúrico, filtrando el precipitado y extrayendo el filtrado con acetato de etilo el cual fue lavado con 3 porciones de 15 ml de una solución de Na_2CO_3 al 1% y posteriormente con agua hasta pH neutro, obteniendo de esta manera 10 mg del diol V correspondiente en forma líquida (22.7% de rendimiento).

Espectroscopía - IR (Espectro 13) 3670 cm^{-1} (O-H, δ_s formando puente de hidrógeno intramolecular); 1250 cm^{-1} y 1200 cm^{-1} (O-H ν^-) RMN- ^1H (Espectro 14) 7.27 ppm (s, 1-H); 7.20 ppm (s, 1-H); 6.24 ppm (s, 1-H); 3.70 ppm (c, AB no

simétrico, CH₂-O); 2.05 ppm (s, O-Ac); 1.51 ppm y 1.43 ppm (s, 1-H, OH del diol formado); 1.11 ppm (s, Me₁₇); 0.82 ppm (s, Me₁₈); 0.79 ppm (s, Me₂₀). Masas (Espectro 15); ión molecular de m/e=378 (2%); m/e=360 (12%) (-H₂O); m/e=342 (-H₂O) (3%); pico base de m/e=82.2 (C₅H₆O); m/e=81.2 (59.7%) (C₅H₅O).

De la fracción más polar, cristalizó un sólido de color amarillo, los cuales fueron recristalizados en varias ocasiones consecutivas en metanol, observándose la presencia de una impureza, que fue posible su eliminación hasta la formación de su derivado acetilado y posteriormente su hidrólisis. El p.f. de los cristales amarillos (Flavona) es de 139-141°C.

Análisis Elemental calculado para C₁₇H₁₄O₇

C, 61.8%; H, 4.24%; O, 33.95% (99.35%)

Análisis Elemental encontrado: C, 62.44%; H, 4.31%; O, 33.5% (100.25%)

Espectroscopía - U.V (Espectro 16) λ max = 218 m μ (ϵ = 35360). IR (Espectro 17) 3640 cm⁻¹, 3400 cm⁻¹, 3400 cm⁻¹ (O-H δ_s aromático); 3090 (C-H, aromático); 2940 cm⁻¹, 2860 cm⁻¹ (C-H ν_{as} , metilo y metileno); 1655 cm⁻¹ (C=O, carbonilo α, β no saturado); 1629 cm⁻¹ y 1580 (C=C, δ_s característico de γ - pirona); 849 cm⁻¹ y 830 cm⁻¹ (C=C ν , fuera del plano para insaturación trisustituida). RMN-H (Espectro 18) 12.91 ppm (s, 1-H₅, fenólico formando puente de hidrógeno) 9.82 ppm y 9.22 ppm (s, 1-H fenólicos) 7.40 ppm a 6.50 ppm m, 4-H aromáticos); 6.50 ppm (s, H₂); 3.98 ppm y 3.85 (s, 6-H, metoxilos). Masas (Espectro 19) ión molecular M⁺ de m/e=330.5 (100%); m/e=312.5 (-H₂O) (84.2%); m/e=315.5

(-Me) (66.5%).

Acetilación de la Flavona.- A 100 mg de la flavona disueltos en 60 ml de anhídrido acético, adicionando 0.5 ml aproximadamente de piridina; se mantuvo a reflujo durante 5 hr; transcurrido el tiempo se disolvió en acetato de etilo y se lavó con una solución de HCl 1N, hasta pH ácido y posteriormente con agua. Se removió el disolvente a presión reducida, obteniéndose 40 mg de un sólido blanco (29% de rendimiento) que fue recristalizado de hexano-cloroformo con p.f. de 207-209°C.

Análisis Elemental calculado para $C_{23}H_{20}O_{10}$

C, 60.52%; H, 4.38%; O, 35.08%; (99.98%)

Análisis Elemental encontrado: C, 60.54%; H, 4.49%; O, 35.10 (100.13%)

Espectroscopía.- IR (Espectro 20) 1770 cm^{-1} (C=O ν_{as} carbonilo éster);

1268 cm^{-1} (=C-O-C=, ν_{as}); 1030 cm^{-1} (=C-O-C=, ν_s); RMN-¹H (Espectro 21)

7.45 ppm a 7.10 ppm (m, 4-H aromáticos); 6.56 ppm (s, H₃); 3.88 ppm y 3.86 ppm

(s, 3-H c/u, de metoxilos); 2.47 ppm, 2.36 ppm y 2.34 ppm (s, 3-H c/u, de acetato).

Masas (Espectro 22) ión molecular M⁺ de m/e=456.5 (8%); m/e=414 (100%)

(-C₂H₂O); m/e=372.4 (42.1%) (-C₂H₂O); m/e=330 (40%) (-C₂H₂O); m/e=312.4 (49.3%)

(-H₂O).

IV.- RESULTADOS Y DISCUSION

De la cromatografía en sílica gel del extracto clorofórmico de la Stevia lúcida, eluída con Hexano/Cloroformo se obtuvieron 3 fracciones de diferente polaridad que fueron analizadas por separado.

Al recromatografiar la fracción menos polar se aisló un aceite I ligeramente amarillo que mostró en IRⁱ una banda ancha intensa de 3 400-2 700 característica de un grupo oxihidrilo que aunado con una banda intensa en 1 700 aseguran la presencia de un grupo carboxilo (26,27). En 870 presentó una banda fina muy característica de un anillo furánico (28). El espectro de RMNⁱⁱ comprueba parte de lo asignado en el espectro de IR al presentar este compuesto señales a 7.30, 7.17 y 6.25 con una multiplicidad no bien definida, pero que integran para un protón cada una y se asignaron a 2 protones α y uno β del anillo furánico. En 5.39 aparece una señal simple que integra para un protón, asignada a un hidrógeno de tipo vinílico. En 1.7 se observa una señal simple y ancha que integra para tres protones que fue asignada a un metilo vinílico, en 1.20 y 0.79 presenta señales simples intensas, que integran para tres protones cada uno y que fueron asignadas a metilos sobre carbonos cuaternarios. El espectro de masas presenta un ión molecular de $m/e=316$.

El aceite I se trató con una solución etérea de diazometano, obteniéndose el derivado metilado II también en forma de aceite. El espectro de I. R. muestra la desaparición de la banda en 3 400 - 2 700 del oxihidrilo y el

-----o-----

i.- Las unidades están dadas en cm^{-1}

ii.- Los desplazamientos químicos están dados en δ en ppm

desplazamiento de la banda del grupo carbonilo a 1 725. El espectro de RMN de este compuesto muestra a 3.61 una nueva señal simple que integra para tres protones la que se asignó al metilo del éster. Con el objeto de probar si el metilo en 1.7 está sobre la misma doble ligadura que el protón vinílico en 5.39 y no en otra insaturación, se obtuvo el espectro de doble resonancia irradiando la señal del protón, observando que la señal del metilo a 1.70 se afina debido a la eliminación del pequeño acoplamiento con el protón vinílico. El espectro de U.V. muestra una absorción a 216 nm que afirma la presencia de un anillo furanólico β sustituido (29). En Espectrometría de masas este compuesto presenta un ión molecular de $m/e=330$.

El éster II se trató con $LiAlH_4$, obteniéndose el correspondiente alcohol III. El espectro de IR de este compuesto muestra la aparición de una banda en 3385 debida a un grupo oxihidrilo desapareciendo la banda asignada al grupo carbonilo en 1721. El espectro de RMN muestra la desaparición del metilo del éster y la aparición de dos dobletes típicos de un sistema AB ($J=11$ Hz) en 3.08 y 3.39 que integran para un protón cada uno y que corresponden al metileno del alcohol primario formado; la señal del protón del alcohol se observa a 1.51 y se comprueba por su desaparición cuando se adiciona D_2O . Finalmente la señal del metilo en 1.20 aparece desplazada hasta 0.83. El espectro de masas presenta un ión molecular de $m/e=302$.

El alcohol III se trató con una solución de acetato de isopropenilo y ácido para-toluensulfónico, obteniéndose el acetato IV en forma de aceite.

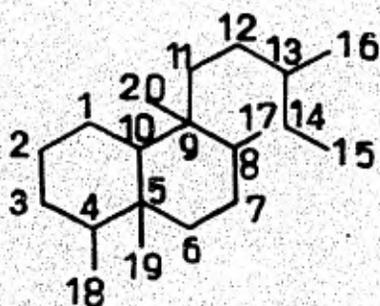
El I.R. muestra la aparición de una banda en 1735 asignada al grupo carbonilo del acetato. El RMN presenta una señal múltiple centrada en 3.71 debida a los protones base del acetato; aparece además una nueva señal en 2.03 asignada al metilo del acetato; la señal del metilo que aparecía en 0.83 se desplaza ligeramente a 0.90. El espectro de masas de este compuesto presenta un ión molecular de $m/e=344.4$.

El acetato IV fue tratado con una solución de tetróxido de Osmio en Dioxano obteniéndose el diol correspondiente V. El espectro de I.R. presenta bandas características de grupos oxihidrilos de 3680 a 3540. La RMN muestra la desaparición de la señal de la doble ligadura a 5.4 ppm, la apertura del sistema AB debido al acetato el cual ahora se encuentra centrado a 4.65 y 3.42 ppm, además 2 señales debidas a los protones del diol formado a 1.56 y 1.43 ppm. Por último el espectro de masas de este compuesto presenta un ión molecular de $m/e=378$.

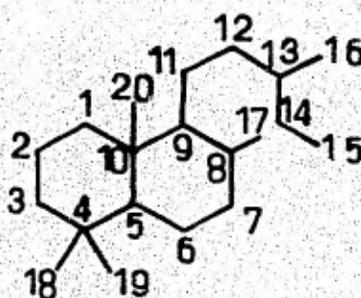
En base a lo encontrado experimentalmente se puede establecer la existencia de un ácido carboxílico, una doble ligadura trisustituída, tres metilos y un anillo furánico β sustituido. Con estos antecedentes y datos encontrados en la literatura (30,31), se puede proponer estructuras con esqueleto diterpénico del tipo Cloredano (A) o del Labdano (B) para el aceite I.

Se ha observado que en la mayoría de los compuestos que tienen estos esqueletos, los carbonos 15 y 16 son los más sensibles a ser modificados por

oxidaciones, debido a esto y apoyados en la literatura (32) se propone que dichos carbonos se encuentran formando parte del anillo furánico en el compuesto en estudio.



A



B

Las únicas posiciones que pueden contener la doble ligadura trisustituida en el esqueleto de A son entre C_3-C_4 y C_7-C_8 . Suponiendo que la insaturación se encontrará en C_3-C_4 (Figura I) el ácido debería estar sobre el carbono No. 17 para que de esta manera C_{19} y C_{20} produzcan señales simples en RMN y se explique así lo encontrado; de forma análoga, si la doble ligadura se encontrara en C_7-C_8 el ácido debería estar sobre C_{18} (Figura II). Sin embargo cuando se obtuvo el éster II y se hizo la reducción al alcohol III, en el espec

tro de RMN de este último no se observa ningún acoplamiento entre el metileno formado y cualesquiera otro protón, lo que debería ocurrir si el esqueleto del aceite I fuese del tipo A; además las posibilidades de que el ácido se encuentre sobre C_9 ó C_5 se elimina porque los metilos 17 ó 18 deberían producir una señal doble en RMN.

Con esto, se descarta la posibilidad que el compuesto en estudio posea el esqueleto básico del Cloredano (A). En el esqueleto (B) solamente existe una posición para contener la doble ligadura trisustituida dentro del sistema de anillos, siendo esta entre C_7-C_8 , soportando a un metilo. Si el ácido se encontrara sobre C_4 presentarían desplazamientos químicos muy semejantes, lo cual no ocurre, además no explicaría el desplazamiento a campo alto de uno de los metilos cuando el éster II se reduce hasta el alcohol III quedando como única posibilidad que dicho carboxilo esté sobre el C_4 , que explica lo encontrado experimentalmente.

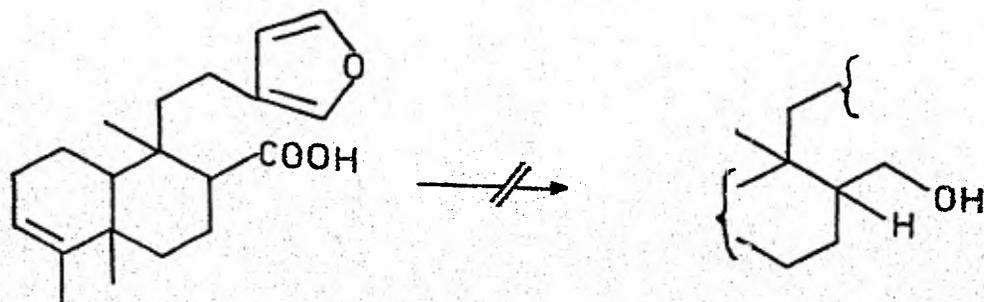


FIG I

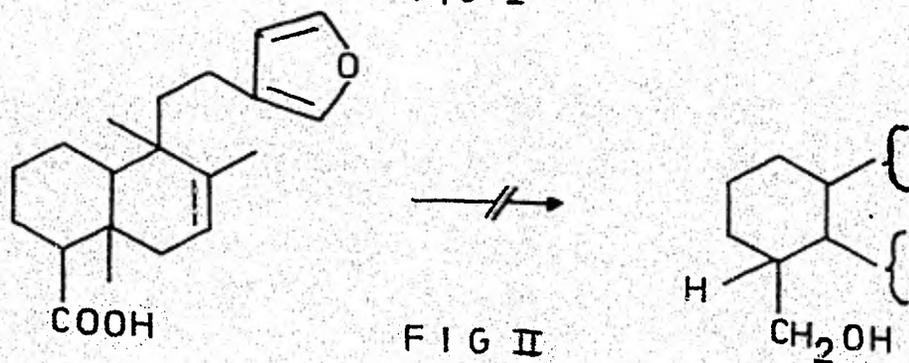
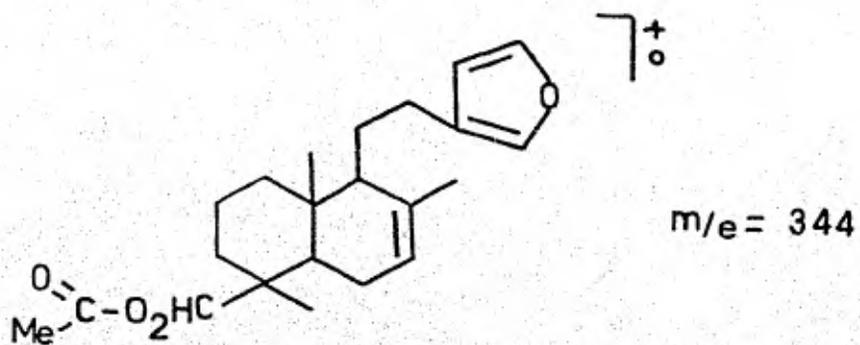
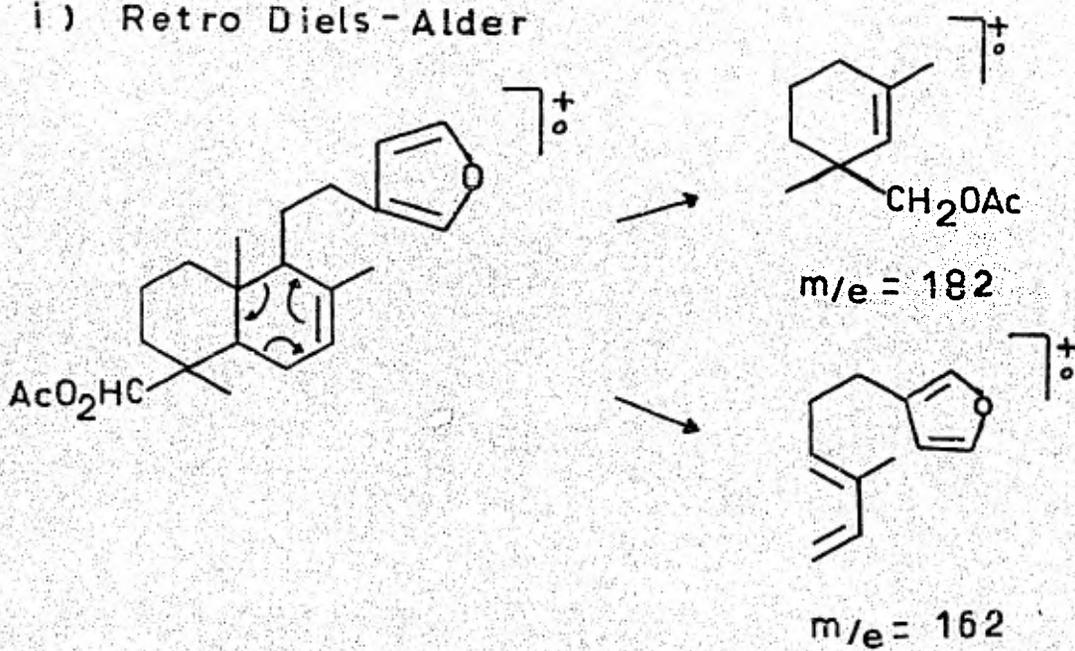


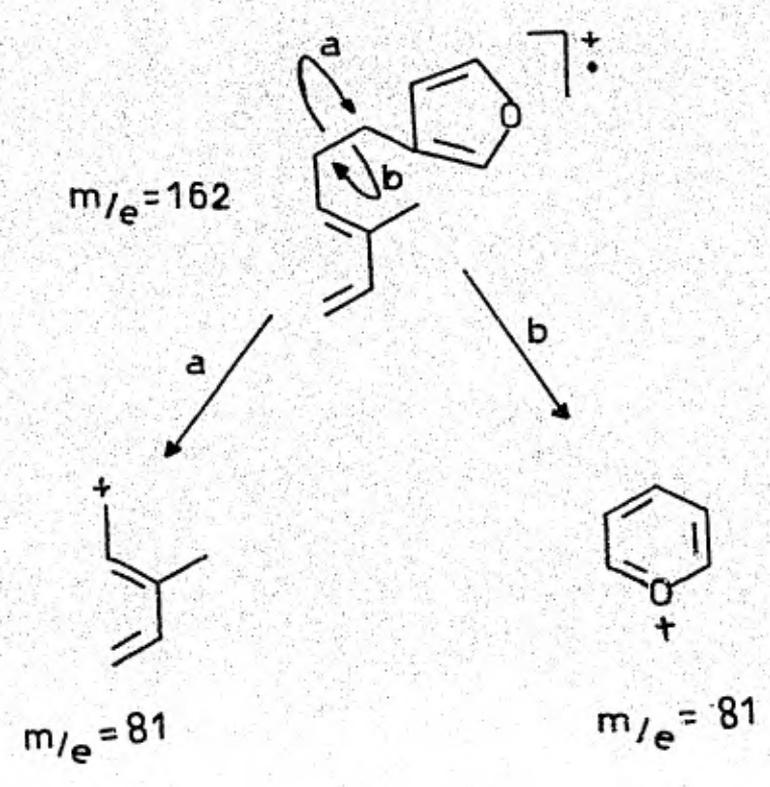
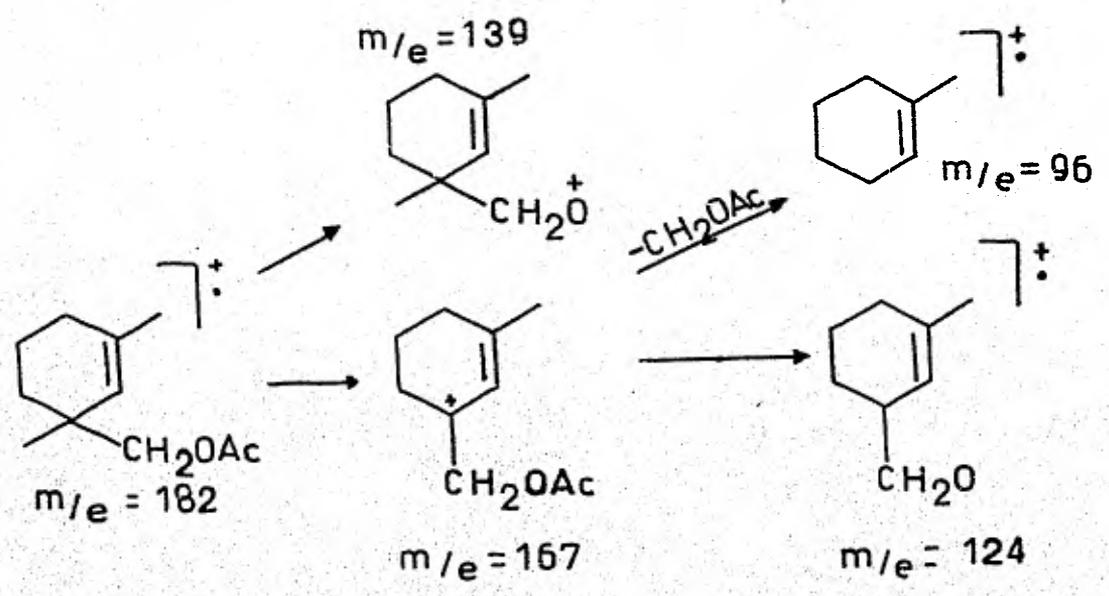
FIG II

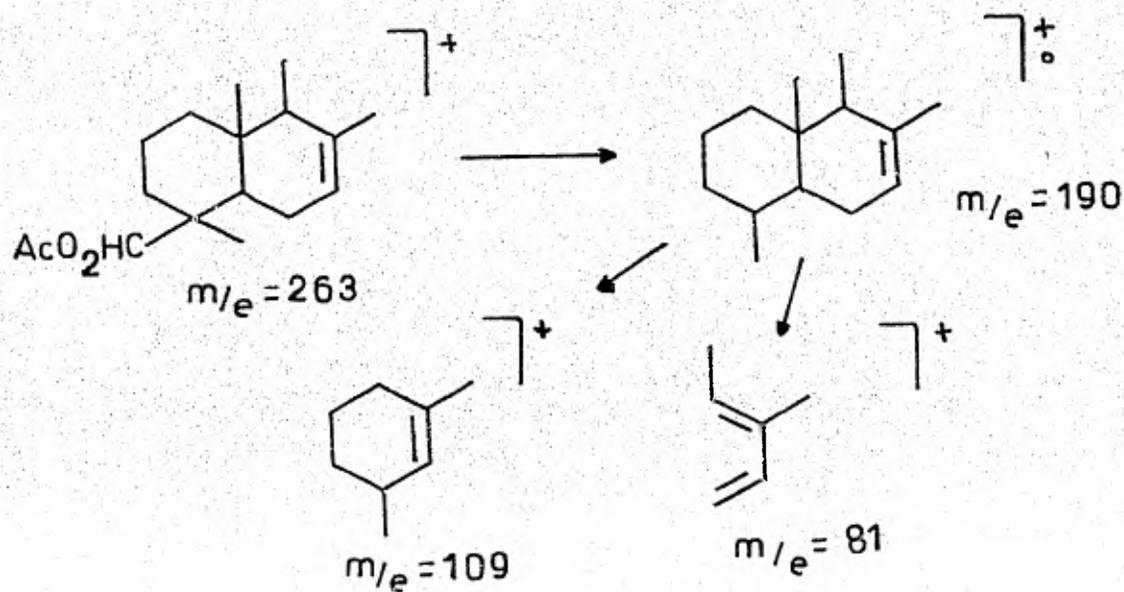
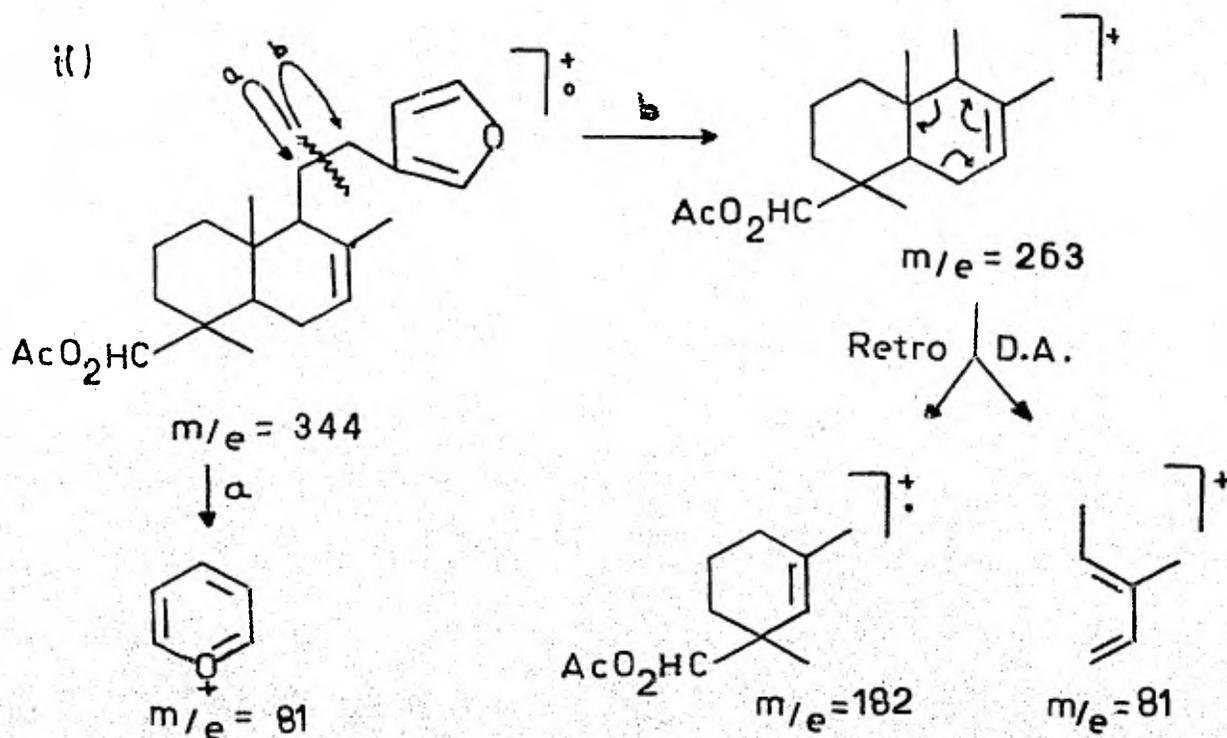
Se encuentra reportado en la literatura (33) que los diterpenos bicyclicos que soportan una doble ligadura en los C₇-C₈ sufren una fragmentación por impacto electrónico tipo Retro Diels-Alder; además que las entidades que poseen un anillo furánico presentan una señal intensa de m/e=81. De esta manera se propone como ejemplo representativo la fragmentación del acetato IV.



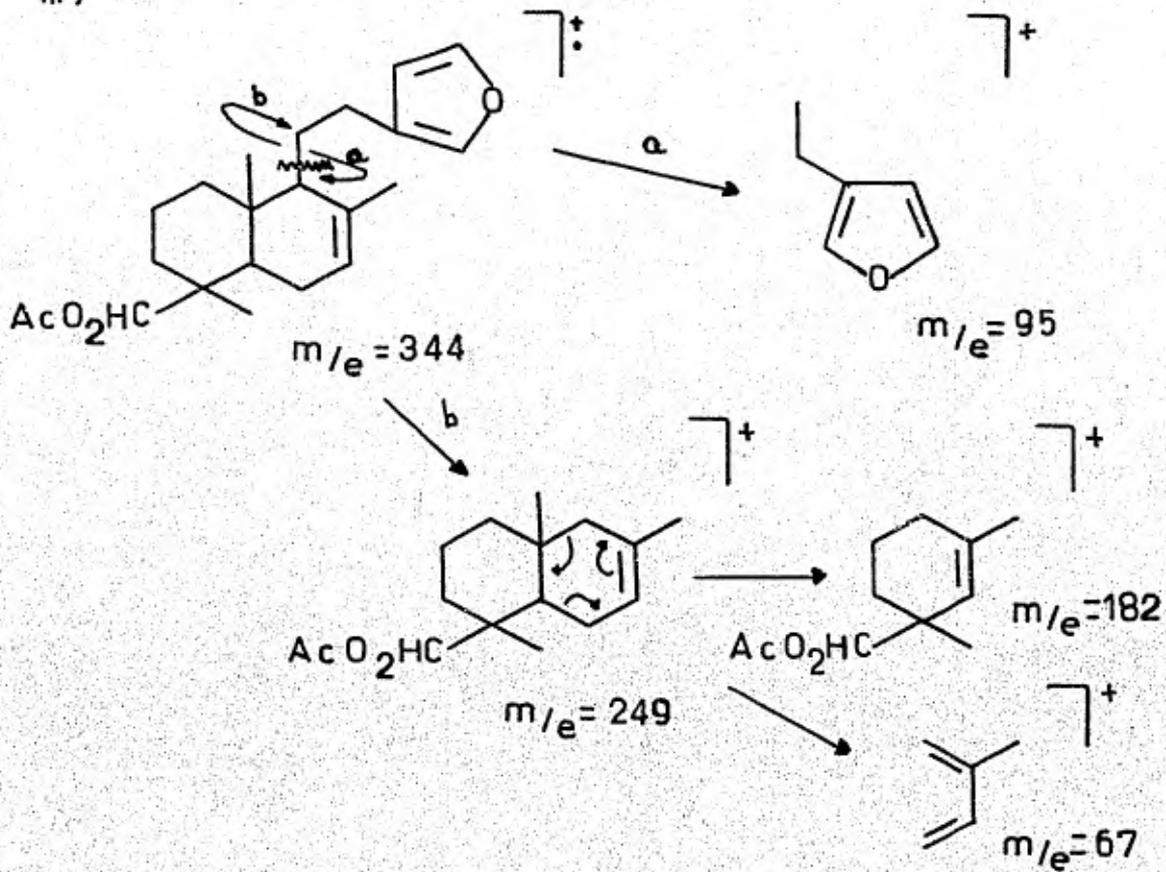
i) Retro Diels-Alder



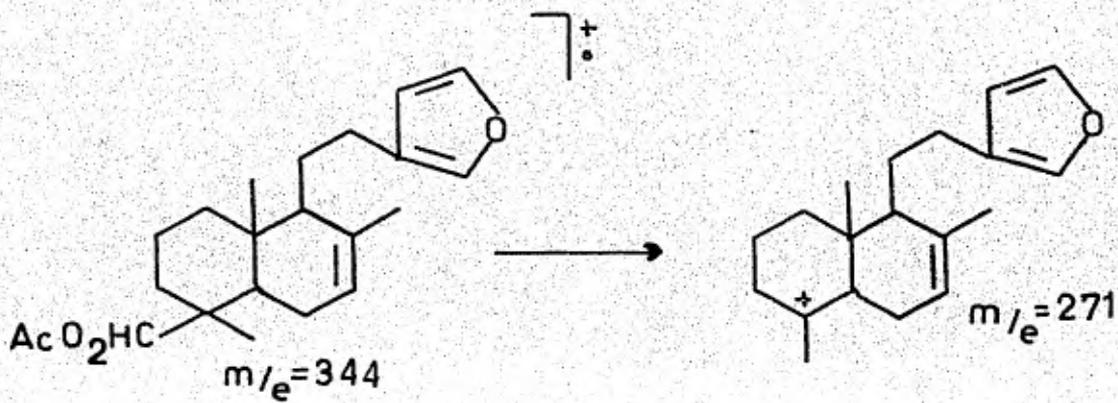




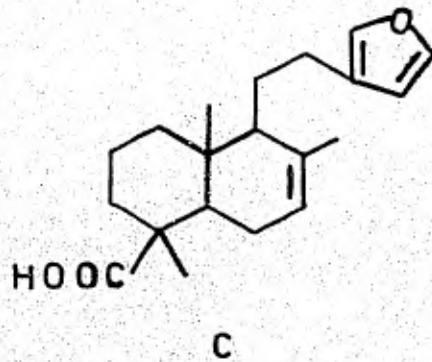
iii)



iv)

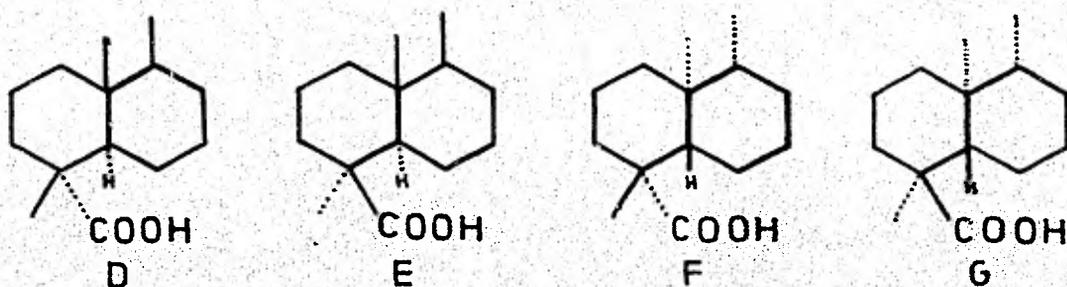


Dado el análisis antes expuesto y considerando que lo encontrado experimentalmente concuerda con el estudio mencionado se propone como (C) la estructura del Acido Cuautitlanoico.



Estereoquímica

Una vez determinada la estructura del aceite I, solo queda por analizar la estereoquímica, de los centros asimétricos. Las posibilidades que pueden existir en este tipo de estructuras son las siguientes:



Por datos reportados en la literatura (34) donde se analiza la configuración de ésteres de di y triterpenos muestra que el espectro de I.R para compuestos que contienen el grupo carboxilo en posición axial (E y F) existe una banda de absorción intensa a $1155 \pm 4 \text{ cm}^{-1}$ mientras que los carboxilos que se encuentran ecuatoriales (D y G) la absorción se desplaza a $1245 \pm 4 \text{ cm}^{-1}$. Por otra parte E. Wenkert et al (35,36) indican que para grupos hidroximetileno en posición axial presentan en RMN, cuartetos de tipo A B centrados en 3.60 y 3.70 ppm mientras que para los ecuatoriales las señales se encuentran

H	J	K	I
Poliáltico	Maleopimarico	Lambertianico	Cuautilanico
C ₄			
Acido	1.15	1.10	1.20
C ₁₀			
	0.72	0.60	0.79
C ₄			
Ester	1.14	1.13	1.20
C ₁₀			
	0.71	0.48	0.79
C ₄			
Alcohol	0.74	0.92	0.83
C ₁₀			
	0.74	0.65	0.80
C ₄			
Acetato	—	0.85	0.90
C ₁₀			
	—	0.61	0.80

TABLA II

centrados de 3.2 a 3.3 ppm.

De forma similar los acetatos correspondientes a los hidroximetil-
nos desplazan sus señales de 4.1 a 4.5 ppm y 3.70 a 4.0 ppm cuando se encuen-
tran en posiciones axiales y ecuatoriales respectivamente. C.A. Henrick y P.R.
Jefferies (20) indican que experimentalmente se ha observado en R M N que el
metilo sobre el carbono diez se ve afectado cuando se esterifica sobre el car-
boxilo cuando este es axial (relación cis), mientras que si es ecuatorial (re-
lación trans) tal metilo permanece casi constante.

La tabla II muestra los desplazamientos de R M N en ppm de los meti-
los sobre los carbonos 4 y 10 para los ácidos Poliáltico (H) (13), Maleopimári-
co (J) (21,22) y el Lamertiánico (K) (13). Se puede observar que no es muy sig-
nificativo el desplazamiento del metilo sobre el carbono 10 cuando son esterifi-
cados H e I (0.01 y 0.03 ppm), mientras que en K el desplazamiento es conside-
rable (0.12) comparandolo con los anteriores. Efecto semejante se observa cuan-
do se lleva a cabo la reducción al correspondiente alcohol.

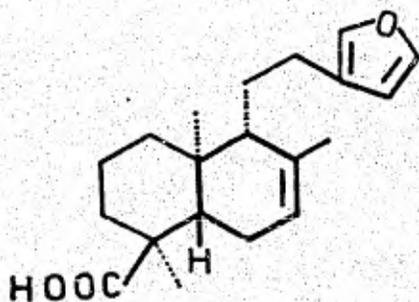
Por otro lado las constantes espectroscópicas del Acido Cuautitlanoico
presentan lo sig:

IR; Banda intensa en 1245 cm^{-1}

RMN; El alcohol III cuarteto de tipo A B centrado a 3.23 ppm

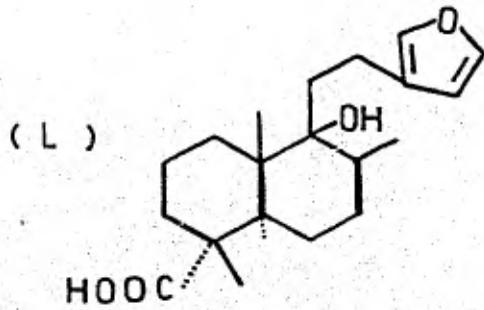
El acetato IV cuarteto A B centrado a 3.71 ppm

Analizando lo anteriormente expuesto se puede proponer que la relación metilo en el carbono diez y el carboxilo sobre el carbono cuatro es de tipo ecuatorial, restando por determinar a cual D ó su enantiómero G corresponde de la configuración. Para esto se correlaciona (tabla III) la de algunos diterpenos de la serie del Labdano, como son la Marrubina (L) (18) Acido Pinifólico (M) (40), ácido Ozico (N) (41) y el Acido Poliáltico (H) (42) proponiéndose de esta manera que el Acido Cuautitlanoico posee una configuración de tipo G.

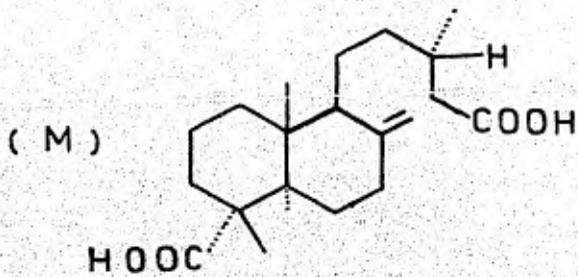


Al recromatografiar la fracción más polar se obtienen unos cristales amarillos con pf de 139-141 C, que analizan para $C_{17}H_{14}O_7$, el espectro de masas presenta un M^+ de $m/e=330$. El espectro de IR presenta una banda ancha en 3650-3200 características de grupos oxihidrilo aromático, en 1650 una banda asignada al grupo carbonilo. En UV presenta una $\lambda_{MAX} = 218 \text{ nm}$ ($\epsilon = 35360$).

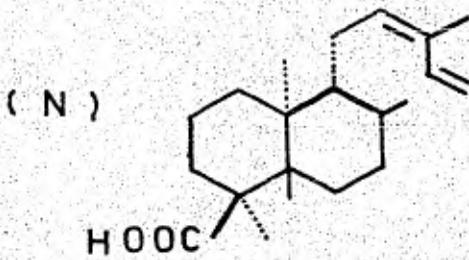
El espectro de RMN presenta tres señales a campo bajo en 12.98, 9.82



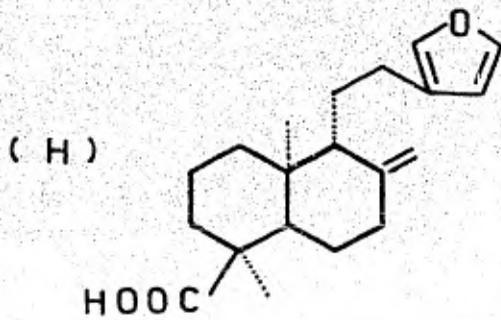
$[\alpha] = (+)$



$[\alpha] = (+)$



$[\alpha] = (-)$



$[\alpha] = (-)$

TABLA III

y 9.24 así que integran para un protón c/u los cuales desaparecen al adicionar D_2O y que se asignaron a 3 protones de hidroxilo; señales múltiples de 7.4 a 6.5 que integran para 2: 1: 2 protones, que se asignaron a 4 protones aromáticos y a uno vinílico este α a un heteroátomo; 2 señales simples intensas a 3.97 y 3.85 ppm que integran para 3 protones cada uno y que son asignadas a metilos del tipo fenoximetiléter.

Los cristales amarillos se trataron con anhídrido acético a reflujo durante 24 hrs, obteniéndose unos cristales blancos con pf, de 172-174°C que analizan para $C_{23}H_{20}O_{10}$ cuyo peso molecular por impacto electrónico concuerda para un M^+ de $m/e=456$. El espectro de I.R muestra la desaparición de la banda debida a oxihidroxilos, hay una banda intensa a 1770 cm^{-1} debida al grupo carbonilo. El espectro de RMN muestra, señales múltiples de 7.5 a 7.2 ppm que integran para 4 protones asignadas a hidrógenos de tipo aromático, en 6.56 ppm una señal simple que integra para un protón, asignado a uno de tipo vinílico α a un heteroátomo; en 3.9 y 3.86 ppm 2 señales intensas que integran para 3 protones cada uno asignadas a hidrógenos de tipo fenoximetiléter y por último 3 señales simples intensas a 4.7, 3.6 y 3.2 que integran para 3 protones cada una y que son asignadas a hidrógenos del éster formado.

En base a lo encontrado en literatura (43) en donde se hace referencia a las características físicas y espectroscópicas de Flavonoides, se puede proponer inicialmente un esqueleto básico de una flavona. Por otro lado anali-

zando la espectroscopía de este compuesto se observa la presencia de 2 grupos metoxi y 3 grupos oxihidroxilo, uno de estos en posición 5 ya que presenta señal característica en RMN, a campo bajo.

Dada la carencia de materia prima y tiempo para continuarse el estudio, se puede proponer que los cristales amarillos pertenecen al grupo de las trihidroxi, dimetoxi flavonas, sustituida por un hidroxilo en la posición 5.

V.- CONCLUSIONES

1.- De la fracción menos polar del extracto de Stevia lúcida se aisló un nuevo diterpeno bicíclico, primero en su tipo aislado en el género Stevia (3) y al que se denominó como Acido Cuautitlanoico.

2.- Las características químicas y espectroscópicas de tal componente, en relación a los datos descritos en literatura, permitieron la elucidación de su estructura así como de la estereoquímica.

3.- De la fracción más polar del mismo extracto, se aisló una trihidroxí, dimetoxi flavona y que su estudio continua, con fin de determinar las posiciones de los sustituyentes en los anillos aromáticos.

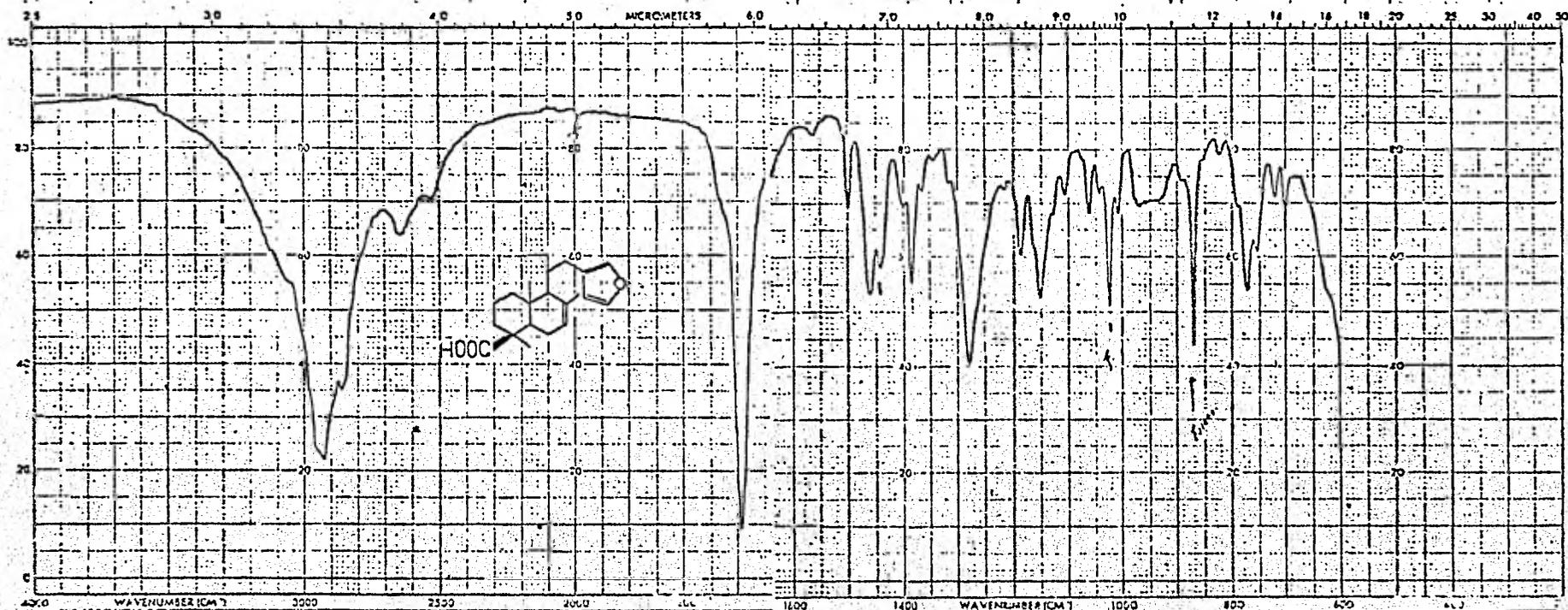
VI.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- GOODWIN T.W.; MERCER, E.I.- " Introduction to plant Biochemistry "
N. York. Pergamon Press 1972
- 2.- MATUDA EIZI.- Boletín de la Sociedad Botánica de México No. 23
55-83 (1958)
- 3.- PENIERES, G.- "Estudio Químico de la Stevia serrata Robinson"
Tesis Licenciatura UNAM (1979)
- 4.- RIOS, T.; ROMO DE VIVAR, A. ROMO, J. Tet 23, 4265 (1967)
- 5.- SALMON, M.; DIAZ, E. ORTEGA, A.- J. Org. Chem. 38, 1759 (1973)
- 6.- SALMON, M.; DIAZ, E. ORTEGA, A. Rev. Lat. Quím. 8, 172 (1977)
- 7.- SALMON, M.; ORTEGA, A.; DIAZ, E.- Rev. Lat. Quím. 6, 45 (1975)
- 8.- DOMINGUEZ, X.; GONZALEZ, A.; ZAMUDIO, M.; GARZA, A.- Phytochem. 13,
2001 (1974)
- 9.- WOOD, H.; ALLERTON, R. DIEHL, H.; FLETCHER, H.- J. Org. Chem. 20,
875 (1955)
- 10.- MATSUMI, S.- Chem. Abstr., 81, 150346 d (1974)
- 11.- MORITA, T.; MORITA, E.; FUJITA, I. - Chem. Abstr 87, 132256 t (1977)

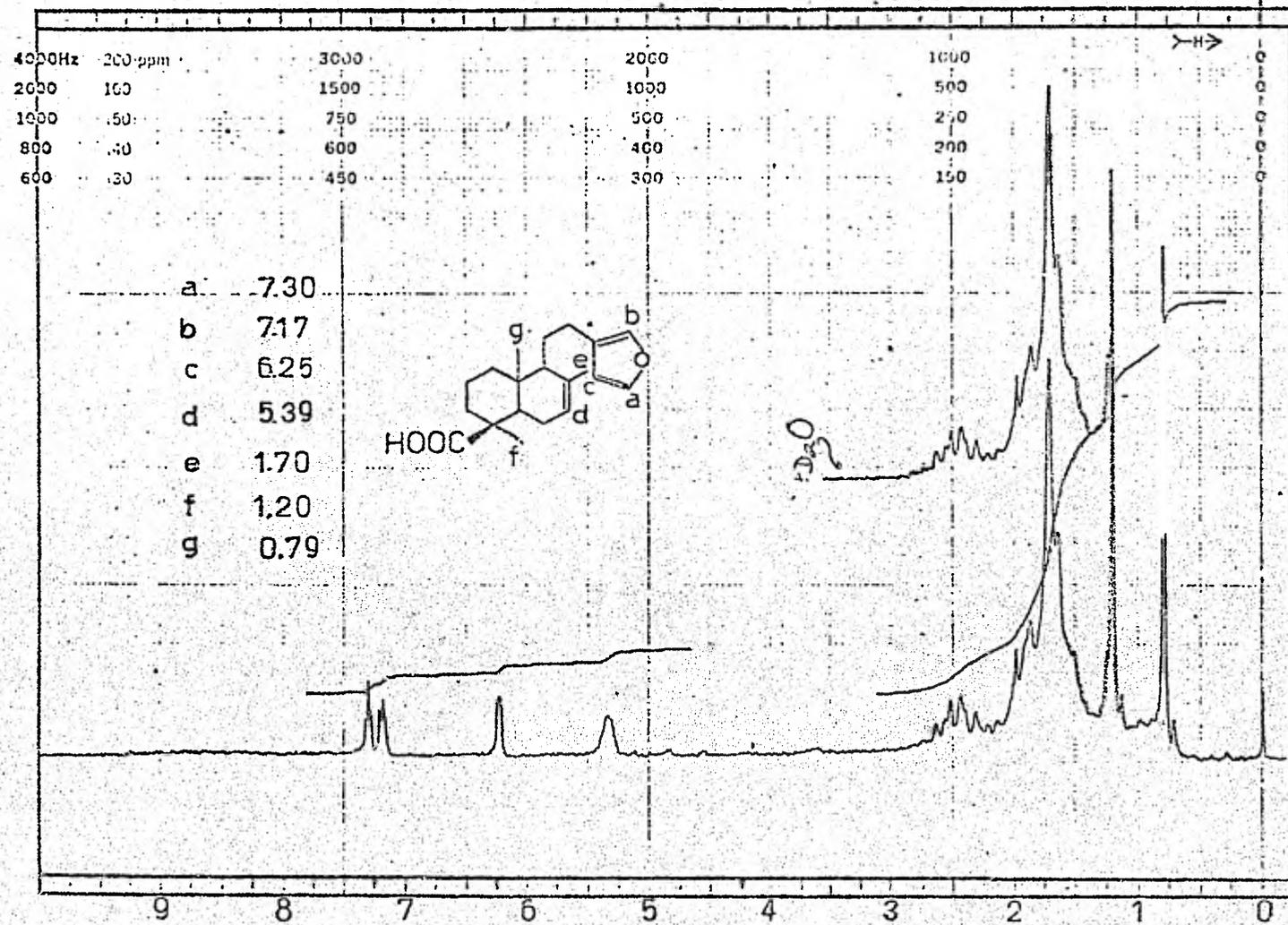
- 12.- SAKAMOTO, I.; KOHDA, H.; MURAKAMI, K.; TANADA, O.- Chem. Abstr, 84, 101729 j (1976)
- 13.- MITSUHASHI, H.; VENO, J.; SUMITA, T.- Chem Abstr. 84, 86764w (1976)
- 14.- AKASHI, H.; YOKOYAMA, Y.; OSADA, M.- Chem. Abstr. 83, 5377 b (1973)
- 15.- AKASHI, H.; YOKOYAMA, Y.- Chem. Abstr 84, 42114 e (1976)
- 16.- ROBERTS and CASERIO. "The Chemistry of Natural Products in Basic Principles of Organic Chemistry" W.A Benjamin, Inc N.Y.(1964)
- 17.- FRANCIS S. STERRET.- J. Chem. Ed., 39, 203 (1962)
- 18.- FRANCIS, S. STERRET.- J. Chem. Ed. 39, 246 (1962)
- 19.- GEISMANN, T.A.; CROUT, D.- "Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism", Freeman, Cooper and Co (1969)
- 20.- PINDER, A.R.- "The Chemistry of the Terpenes", New York, Willey and Sons Inc (1960)
- 21.- RUZICKA, L.- Chem. Soc. 341 (1959)
- 22.- RIVERA, P.A.- "Terpenoids de Parthenium Tomentosum". Tesis licenciatura UNAM (1979)
- 23.- MABRY, J.T.- "The Flavonoids", Chapman and Hall, London (1975)

- 24.- KOUKOL and CONN, J. Biol.- Chem. 236, 2692 (1961)
- 25.- BIRCH and DONOVAN, Aust. J. Chem. 6, 360 (1953)
- 26.- NAKANISHI, K.; SOLOMON, P.H.- "Infrared Absorption Spectroscopy",
Holden Day Inc. (1977)
- 27.- CABALLERO, Y.; WAALS, F.- Bol. Inst. de Quím. UNAM 22, 79 (1970)
- 28.- KUBOTA, T.- Tett. 4, 68 (1958)
- 29.- NEWMAN.- "Chemistry of Terpenes and Terpenoids" Acad. Press, (1972)
- 30.- DAUBEN, W.G.; GERMAN, V.F.- Tett. 22, 679 (1966)
- 31.- HUGEL, G.; LODS, L.; MELORR, J.M. et OURISSON, G. Mem. Proc. Soc.
Chim. 22, 82 (1965)
- 32.- ANTHONSEN, T.; HENDERSON, M.S.- Act. Chem. Scand. 22, (1968)
- 33.- ENZELL, C.R.; RYHAGE, R.- Arkiv for Kemi 23, band 33 367 (1965)
- 34.- BORY, S.; FETIZON, M.; Bull. Soc. Chim. 570 (1964)
- 35.- GAUDEMER, A.; POLONSKY, J.; WENKERT, E. Bull. Soc. Chim. 407 (1964)
- 36.- WENKERT, E.; BEAK, P.- Tett. lett 358 (1961)
- 37.- HENRICK, C.A.; JEFFERIES, P.R.- Aust. J. Chem. 17, 915 (1964)

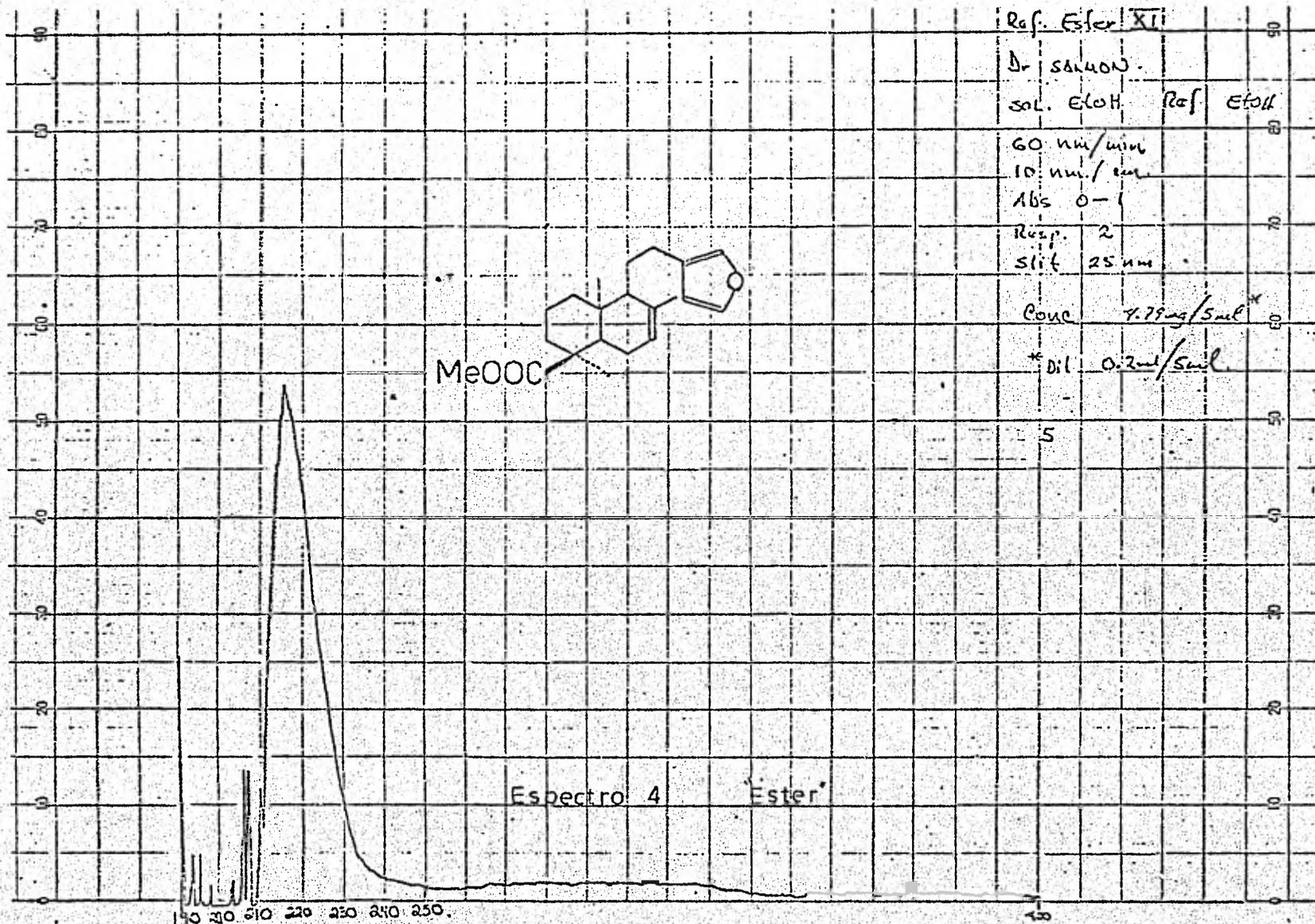
- 38.- AYER, W.A.; McDONALD, C.E.; STOTHERS, J.B.- *Can. J. Chem.* 41, 1113
(1963)
- 39.- CARMAN, R.M.; DENNIS, N.- *Aust. J. Chem.*
- 40.- ENZELL, C.; THEANDER, O.- *Act. Chem. Scand* 16, 607 (1962)
- 41.- BEVAN, C.W.L.; EKONG, D.E.U., OKOGUN, J.I. *J. Chem. Soc.* 1063 (1968)
- 42.- GOPINATH, K.W.; GOVINDACHRI, T.R.; PARTHASARATY, P.C. *Helv. Chim. Acta* 1040 (1961)
- 43.- MABRY, T.J.; MARKMAN, K.R.; THOMAS, M.B.- "Systematic Identification of Flavonoids", Springer-Verlag (1970)



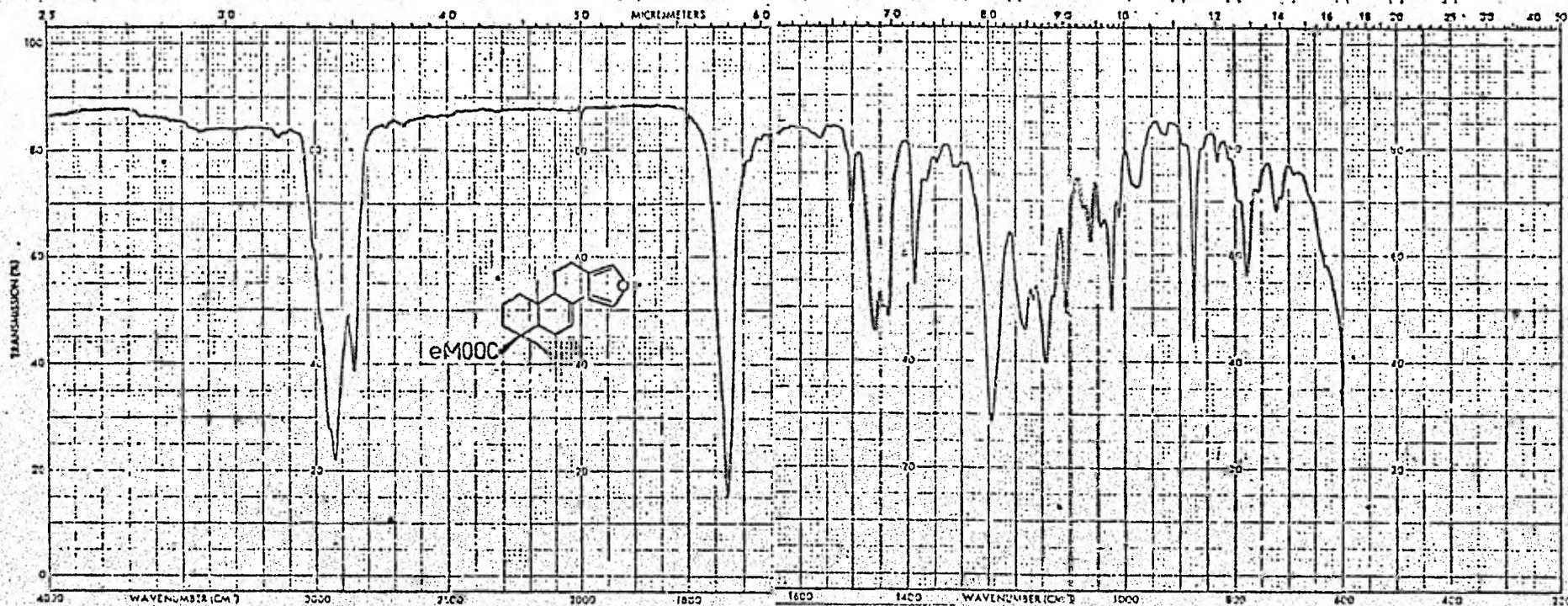
Espectro No. 1.- Espectro de Infrarojo del Acido Cuautitlanoico
 Disolvente: Cloroformo (CHCl₃).



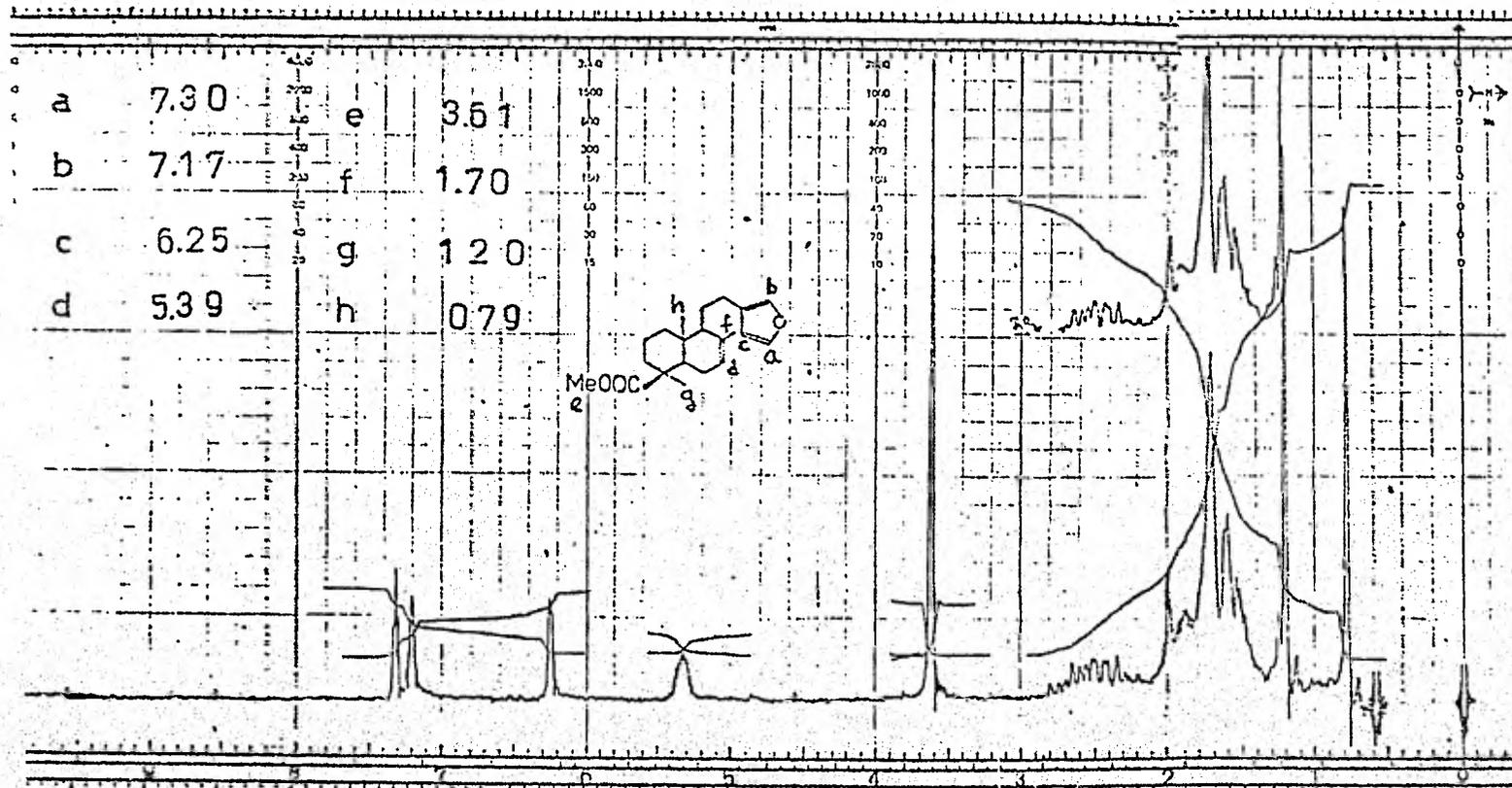
Espectro No. 2.- Resonancia Magnética Nuclear de Hidrogeno del Acido Cuatrecasianoico. Disolvente: Cloroformo deuterado (CDCl₃).



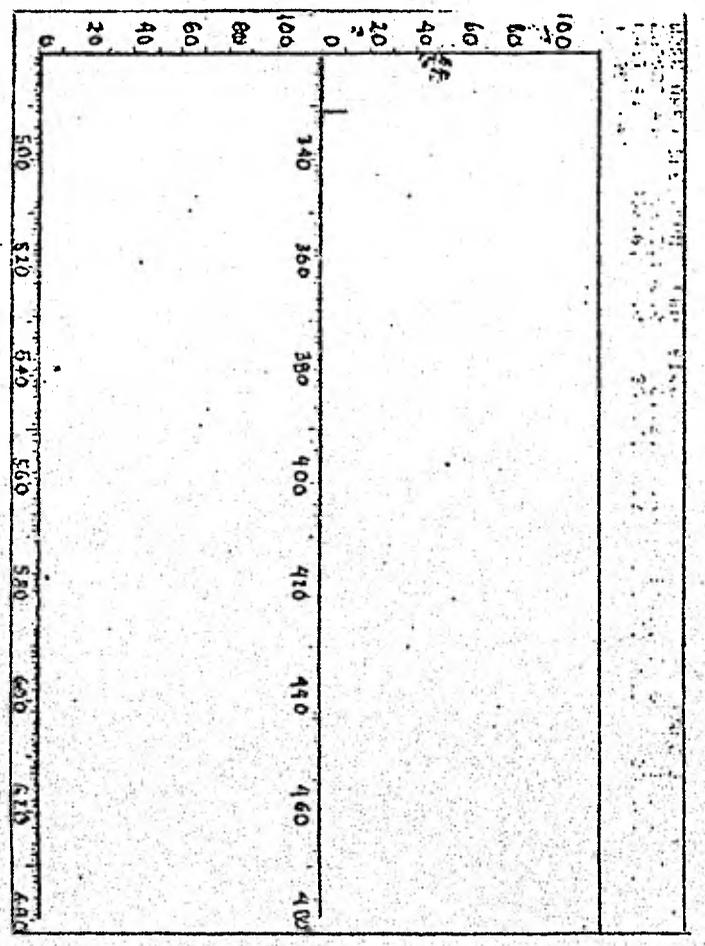
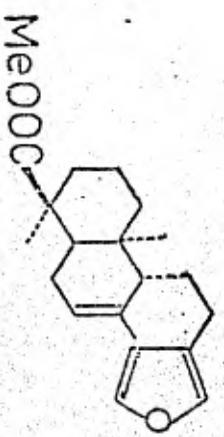
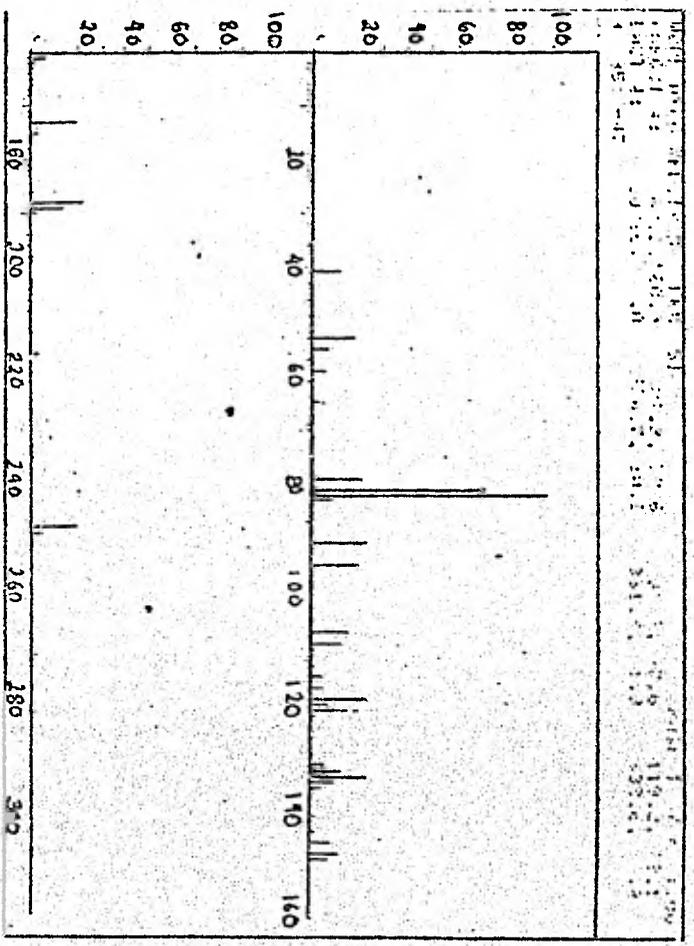
Espectro No. 4.- Ultravioleta del éster del Acido Cuautitlanoico
 Disolvente: Etanol.



Espectro No. 5.- Espectro de Infrarojo del éster del
 Acido Cuatitlanico.
 Disolvente: Cloroformo.

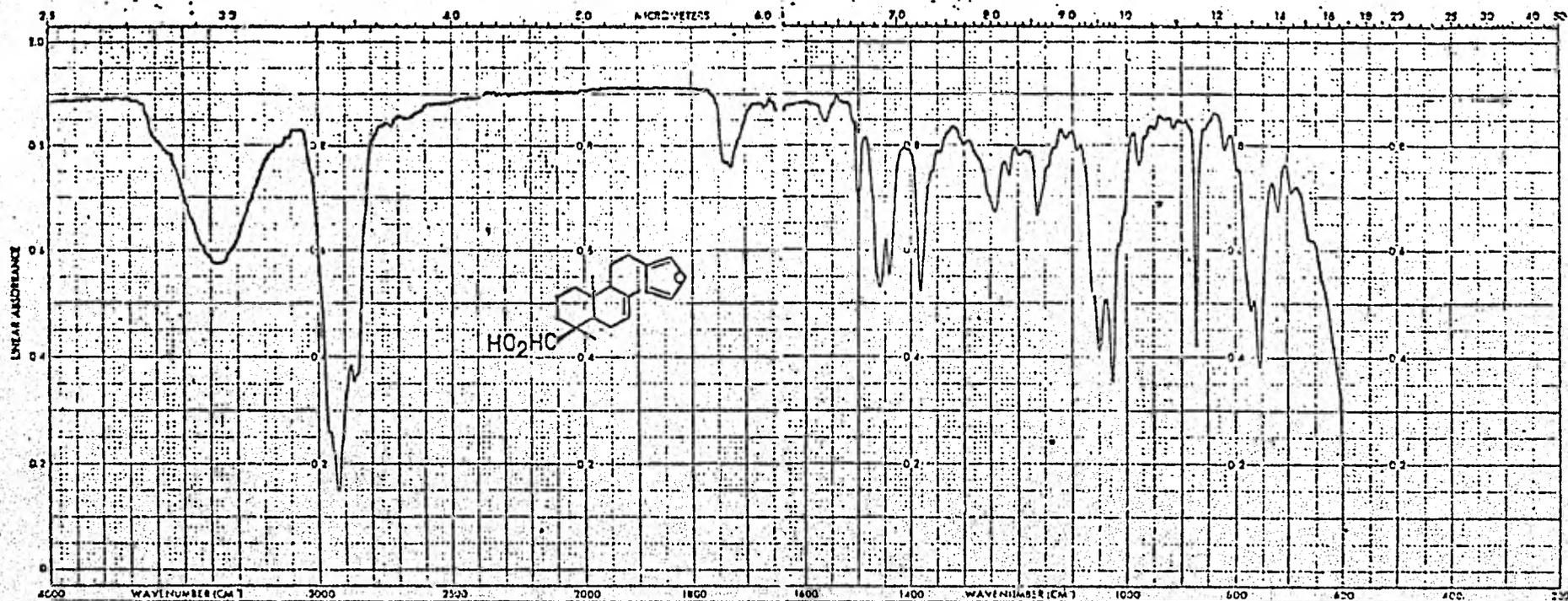


Espectro No. 6.- Espectro de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno del éster del ácido Cuaticanoico.
Disolvente: Cloroformo deuterado (CDCl_3).



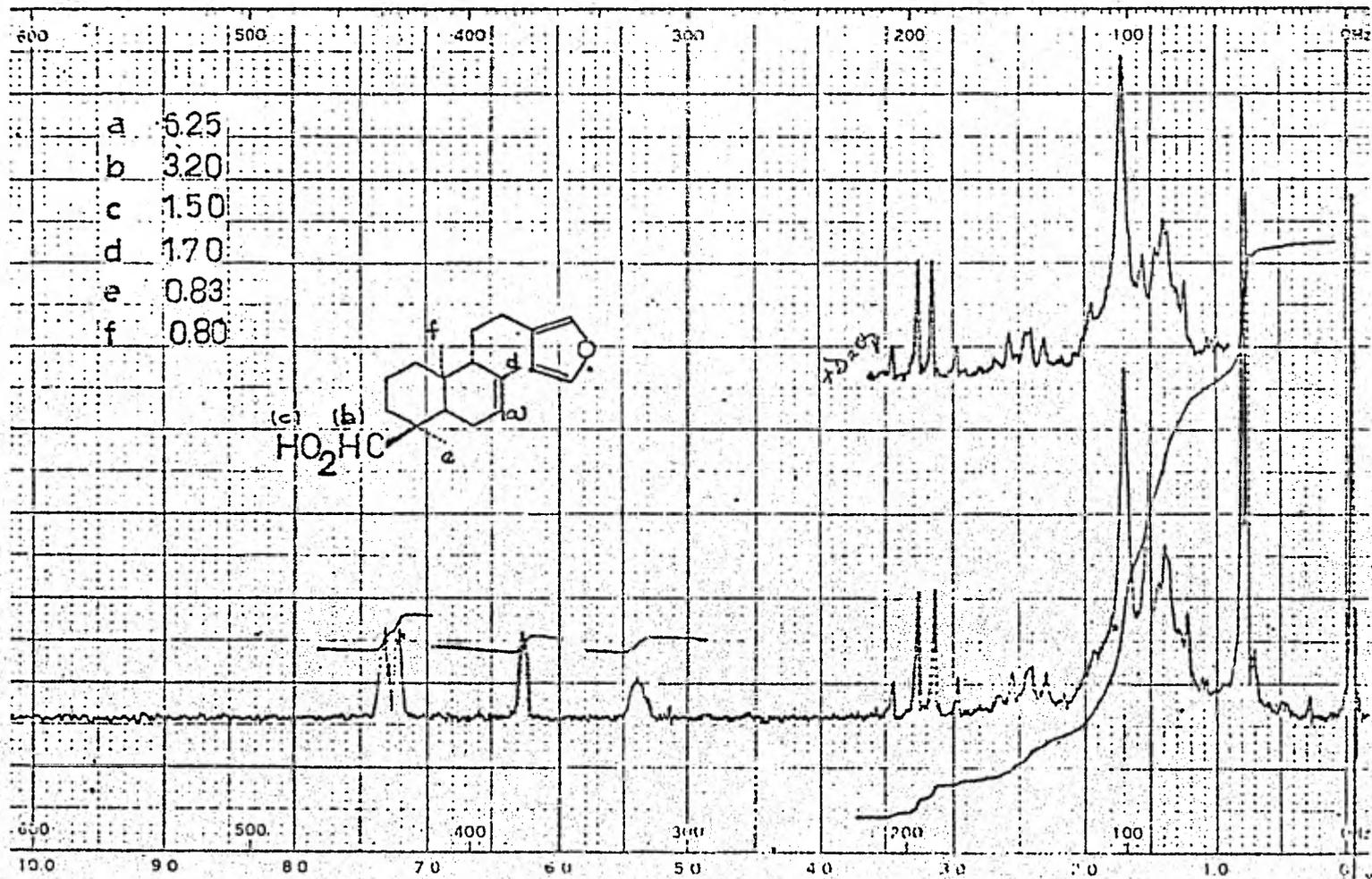
Espectro No. 7.-

Espectrometría de impacto electrónico del éster del ácido Cuauhtitlanoico.



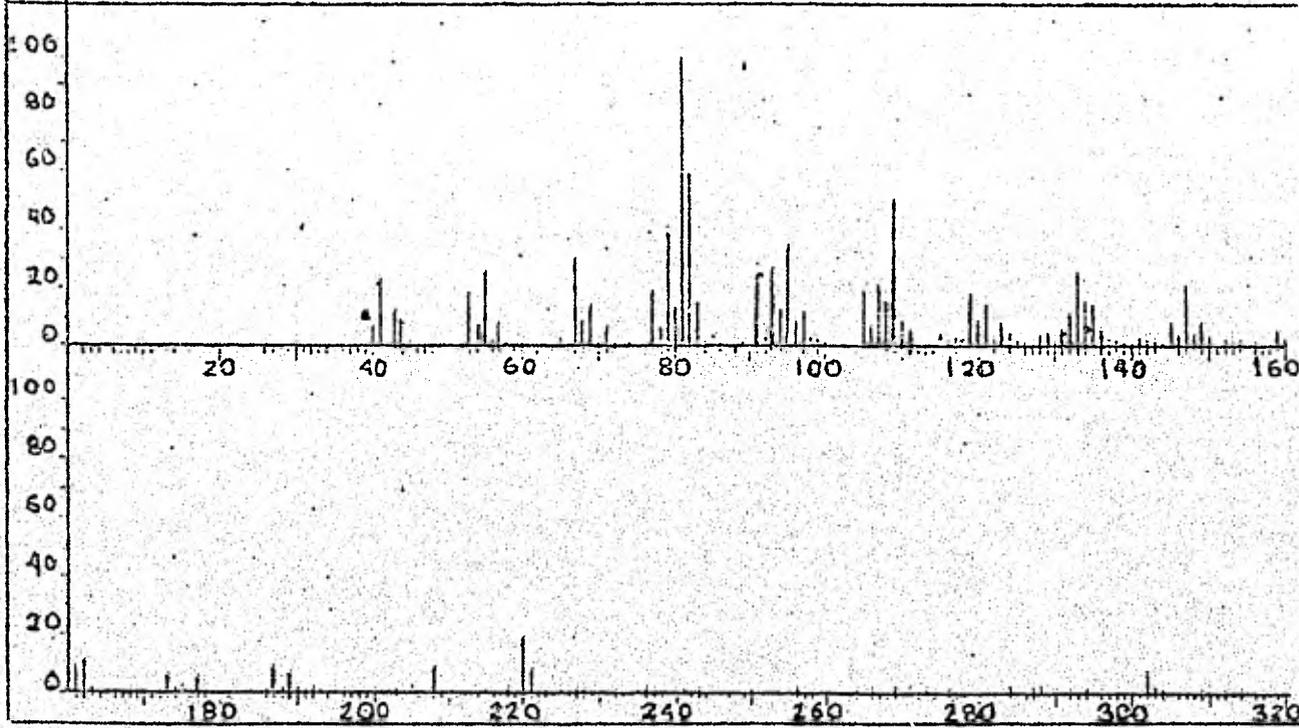
Espectro No. 8.-

Espectro de Infrarojo del alcohol derivado
del Acido Cuatitlanoico.
Disolvente: Cloroformo.

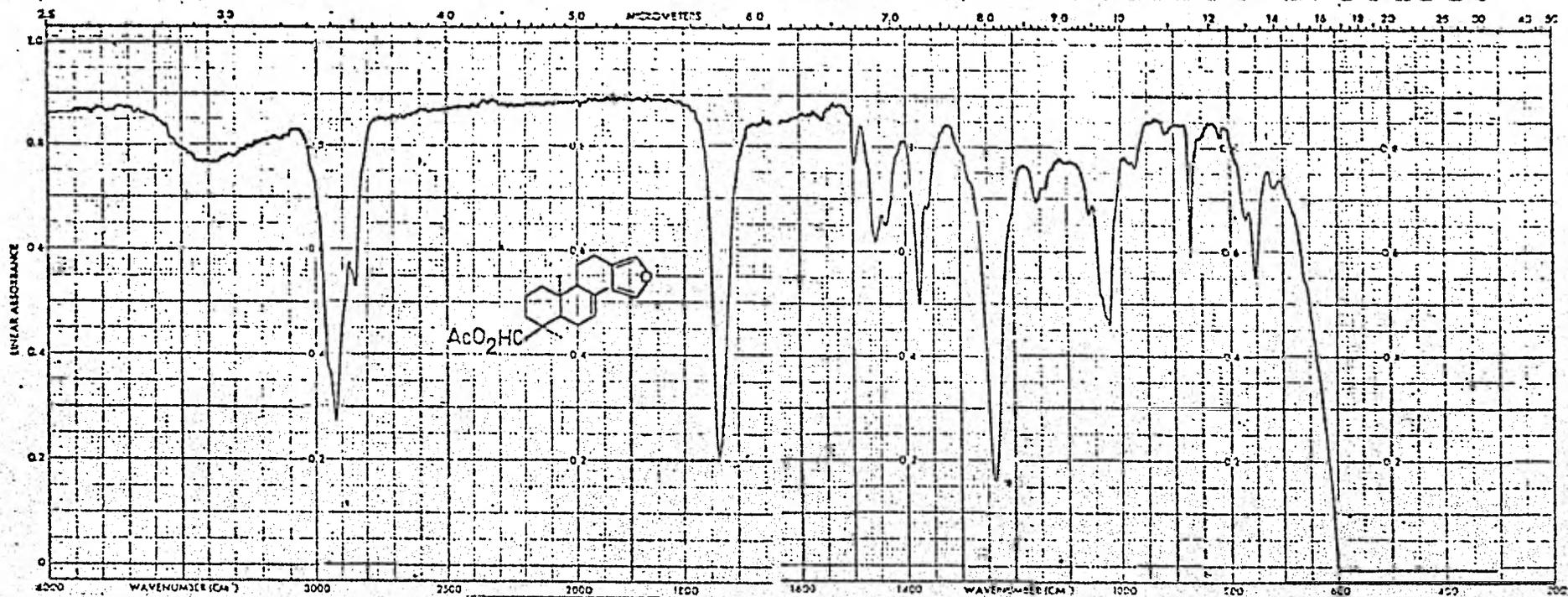


Espectro No. 9.- Resonancia Magnética Nuclear del Hidrógeno del alcohol derivado del Acido Cuautitlanoico. Disolvente: Cloroformo deuterado (CDCl₃).

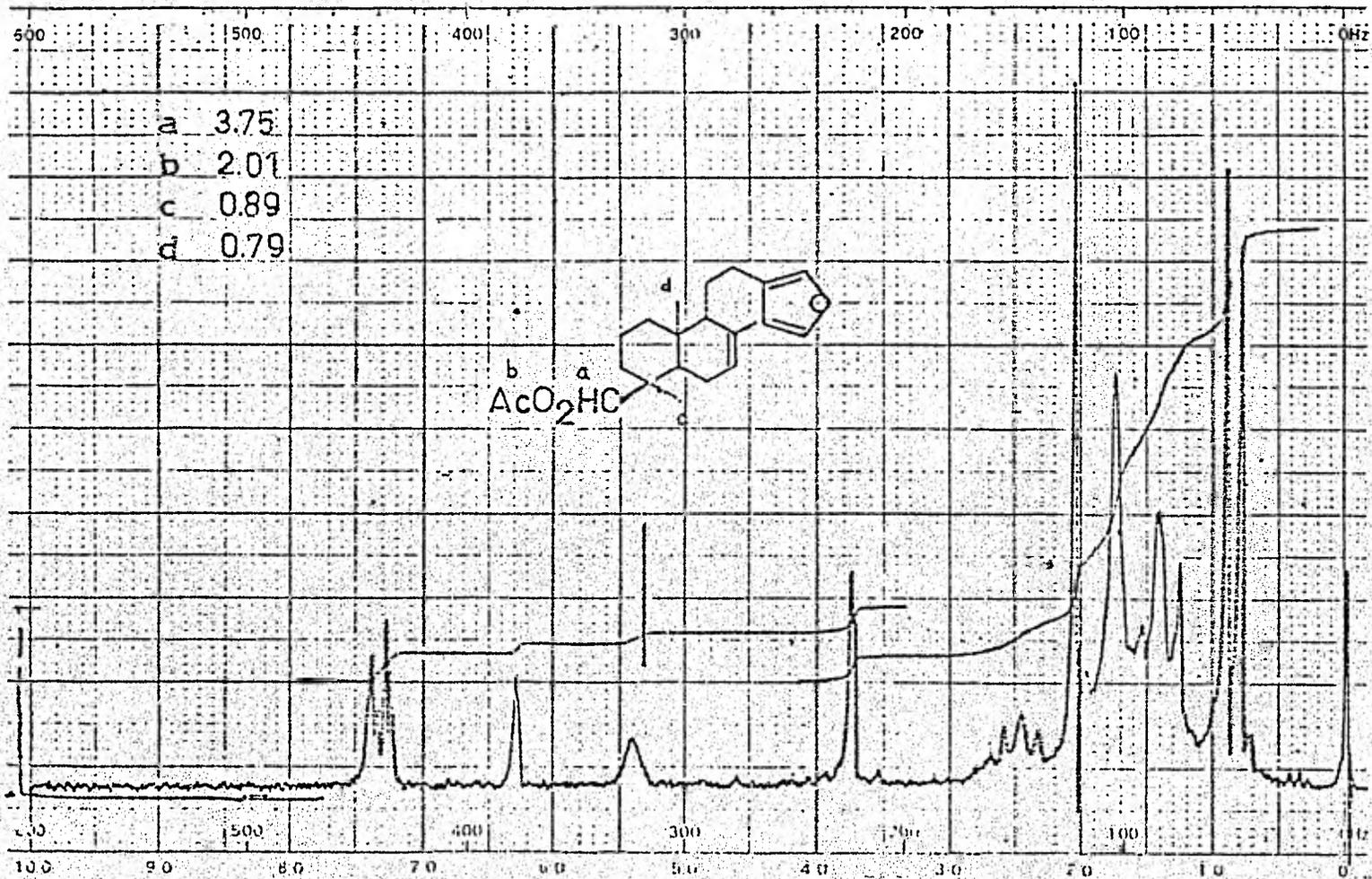
Page No. 9	SPECTRUM: 24	PRECISE TIME: 1.7
1.2.1.1.1	81.2, 100.0	100.0, 41.6
1.2.1.4	288.5, 1.1	304.6, .1
		PAGE 1 4 = 1.09



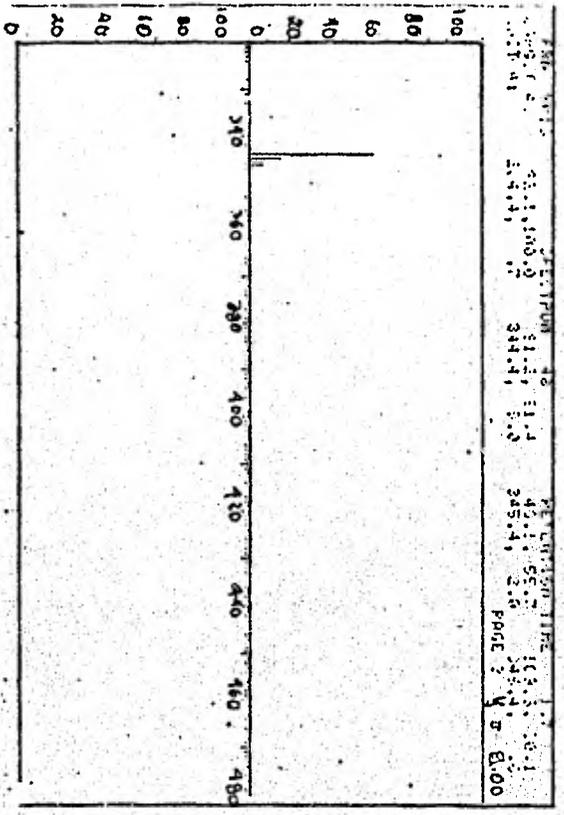
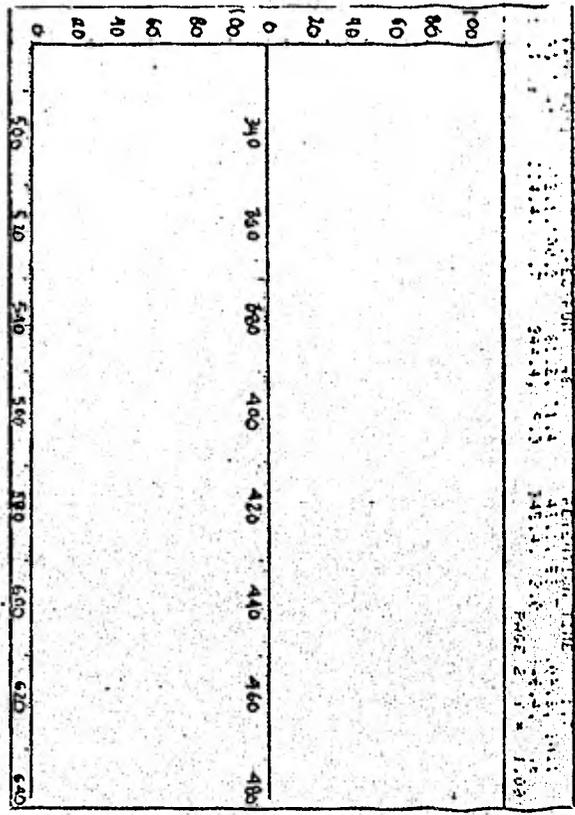
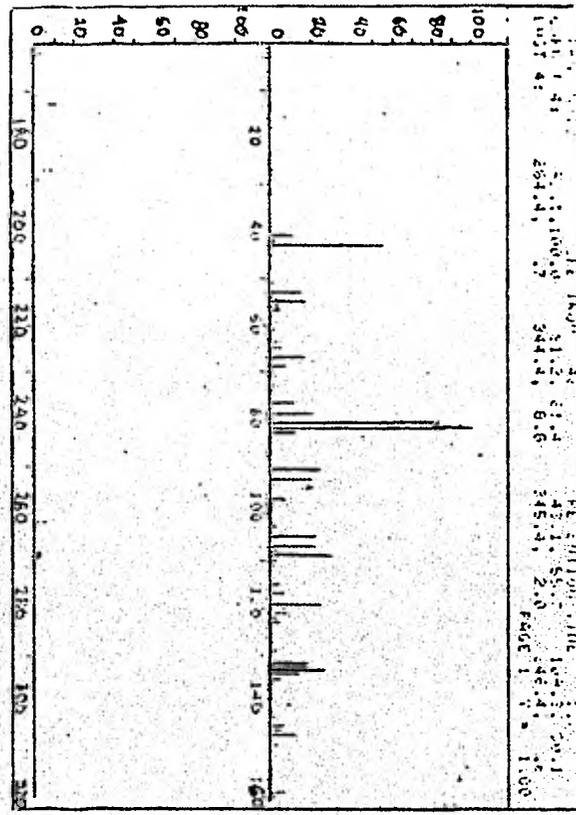
Espectro No. 10.- Espectrometría de Impacto Electrónico del alcohol derivado del Acido Cuauhtlianoico.



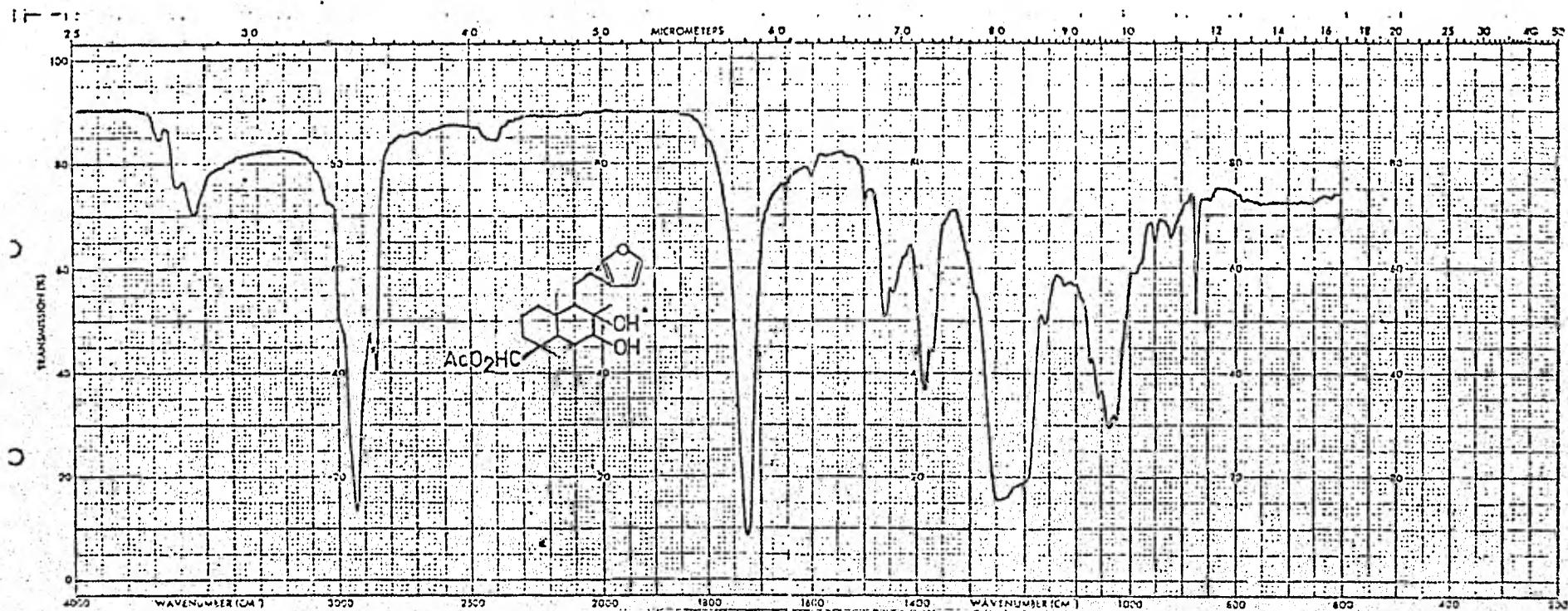
Espectro No. 11.- Espectro de Infrarojo del acetato derivado
del Acido Cuatitlanico.
Disolvente: Cloroformo (CHCl₃).



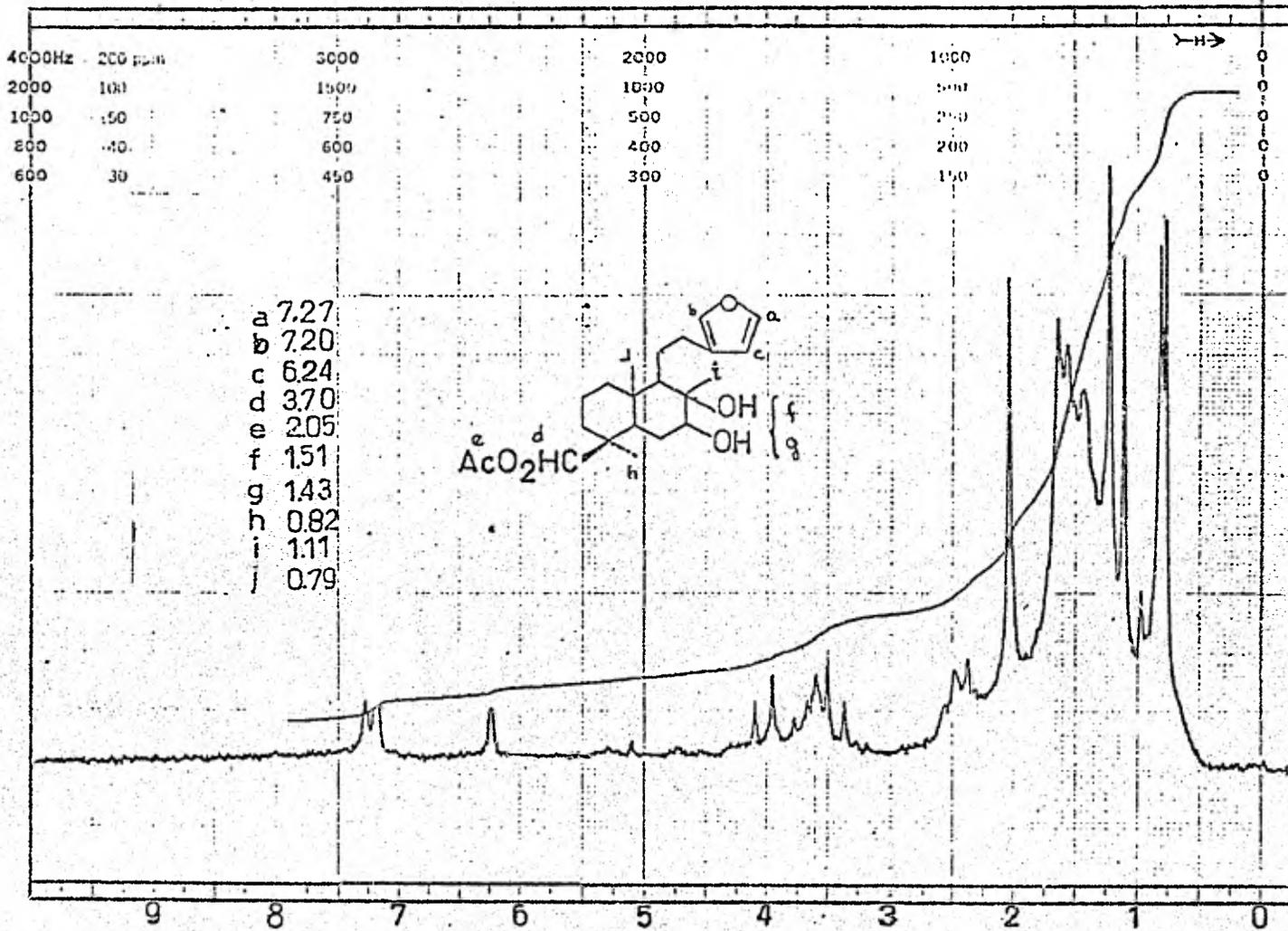
Espectro No. 12. - Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
 del acetato derivado del Acido Cautitlanico.
 Disolvente: Cloroformo deuterado ($CDCl_3$)



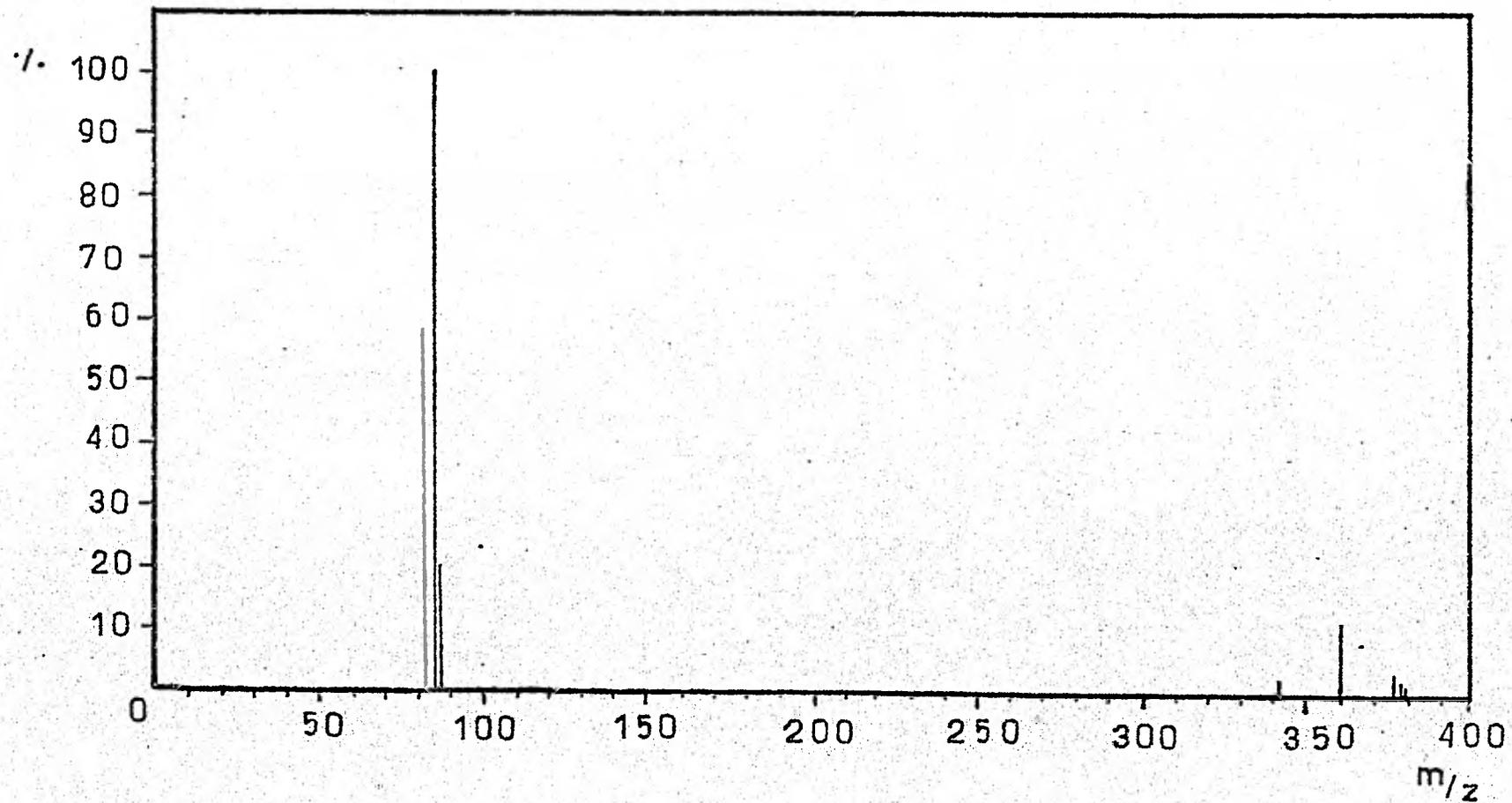
Espectro 12 (B). - Espectrometría de Impacto Electrónico del acetato derivado del Acido Cuautitlanoico.



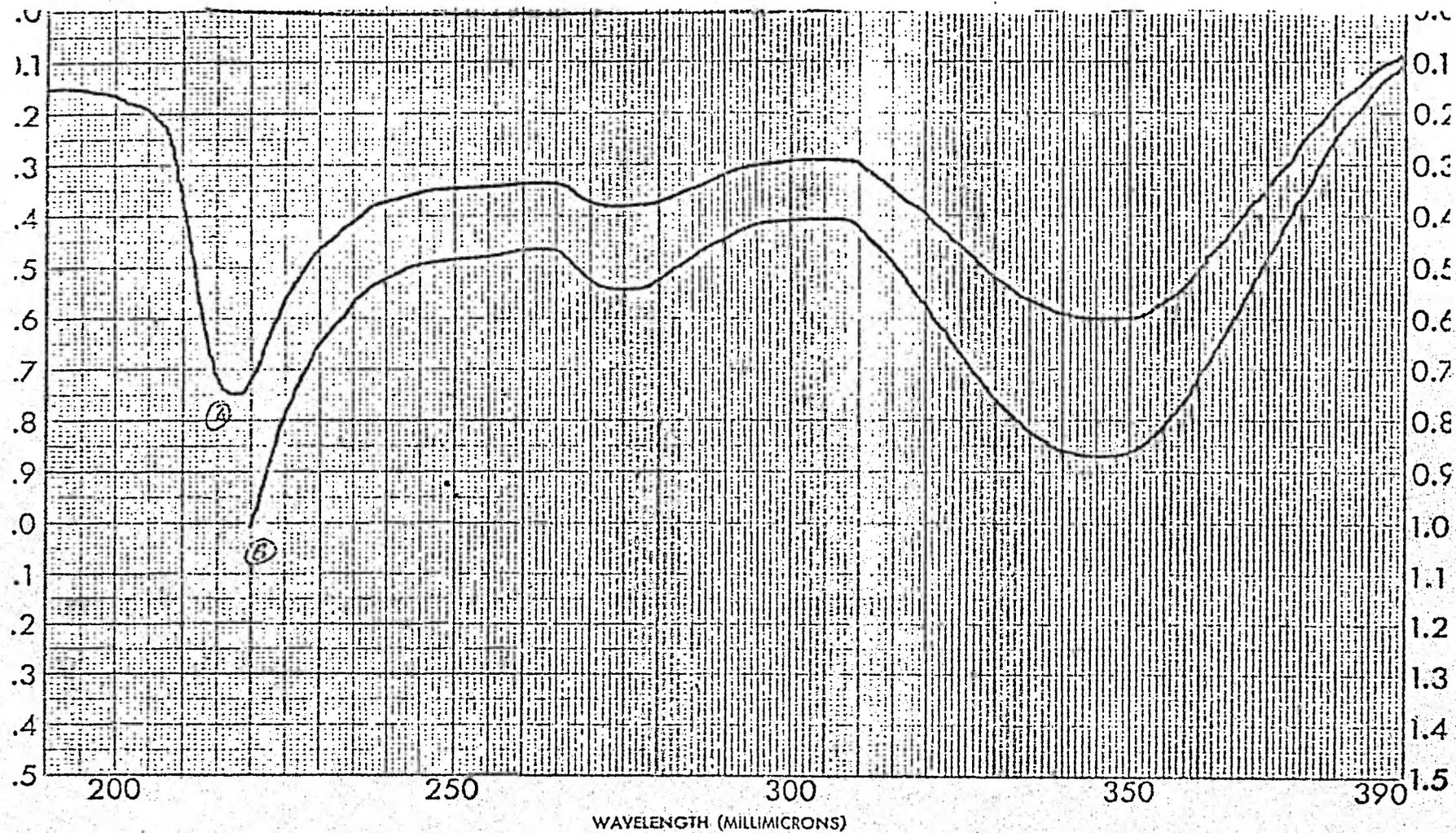
Espectro NO. 13.- Infrarojo del Diol derivado del Acido Cuauti-
tlanolco.
Disolvente: Cloroformo



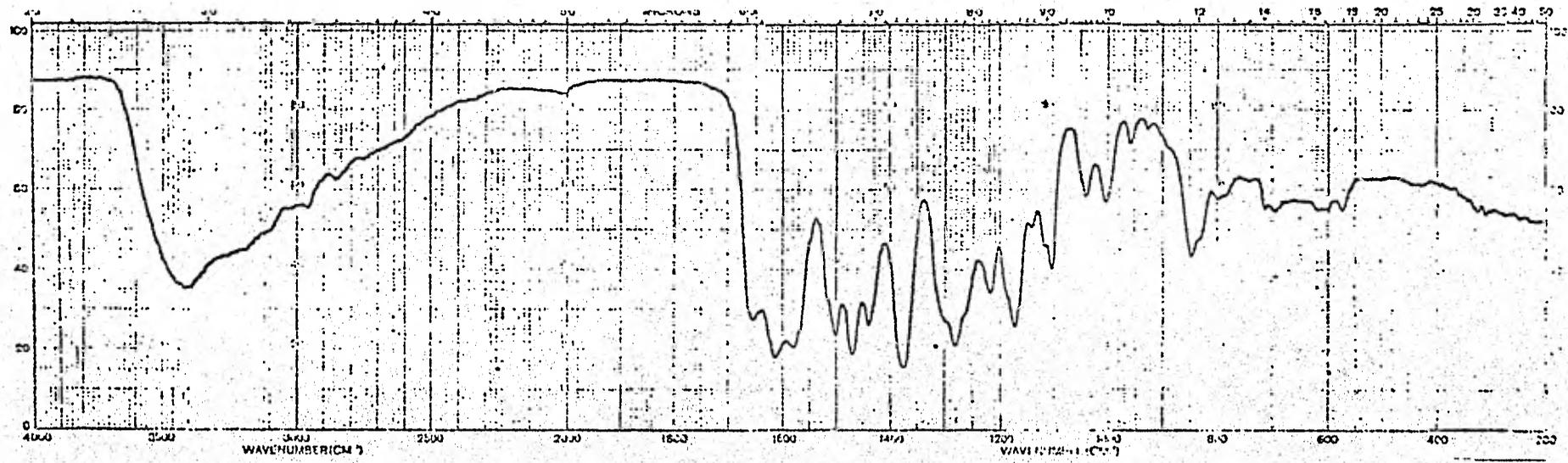
Espectro No.14.- Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno del Díol correspondiente.
 Disolvente: Cloroformo deuterado (CDCl₃).



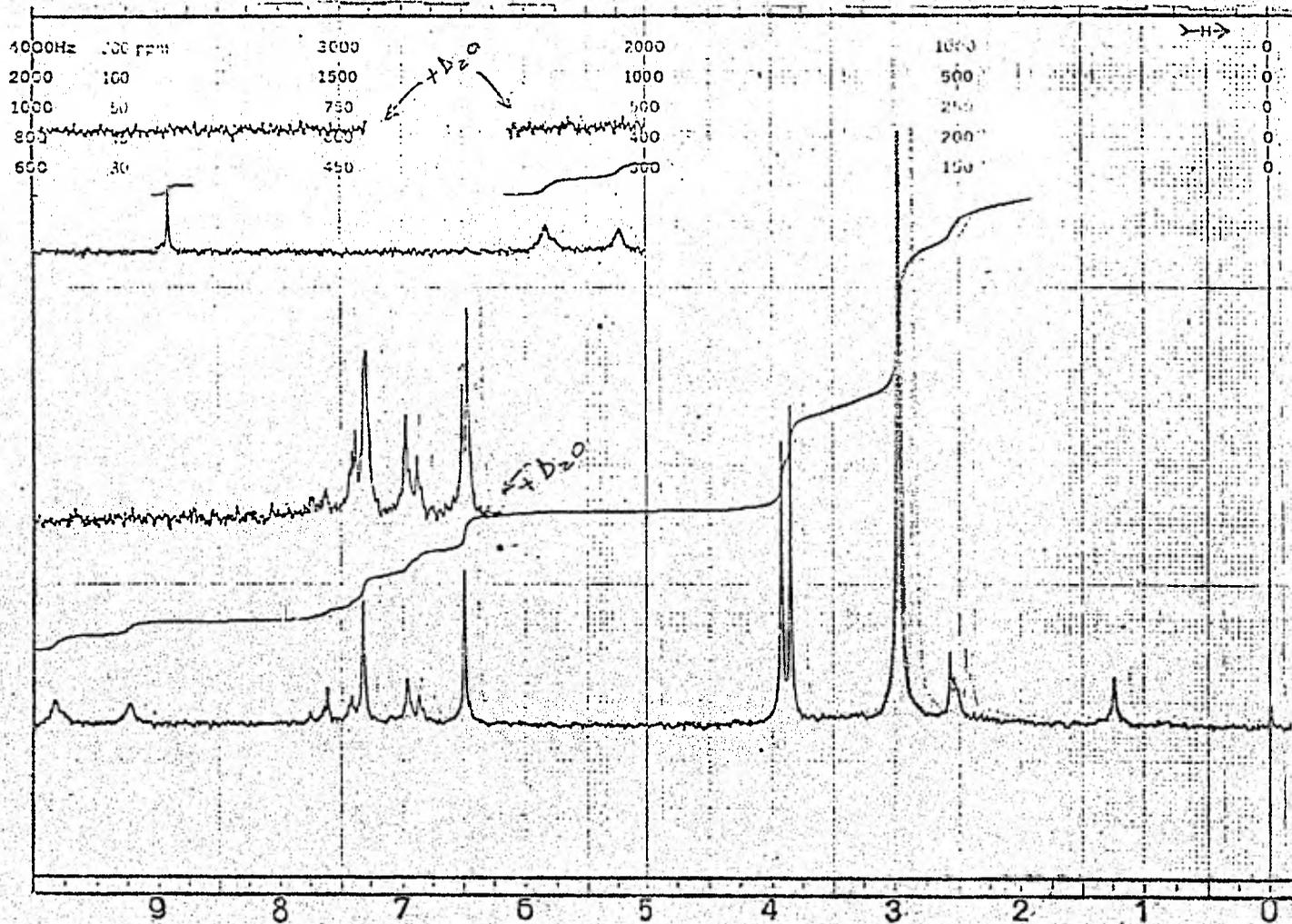
Espectro No. 15.- Espectrometría de Masas del Diol derivado del Acido Cuautitlanoico.



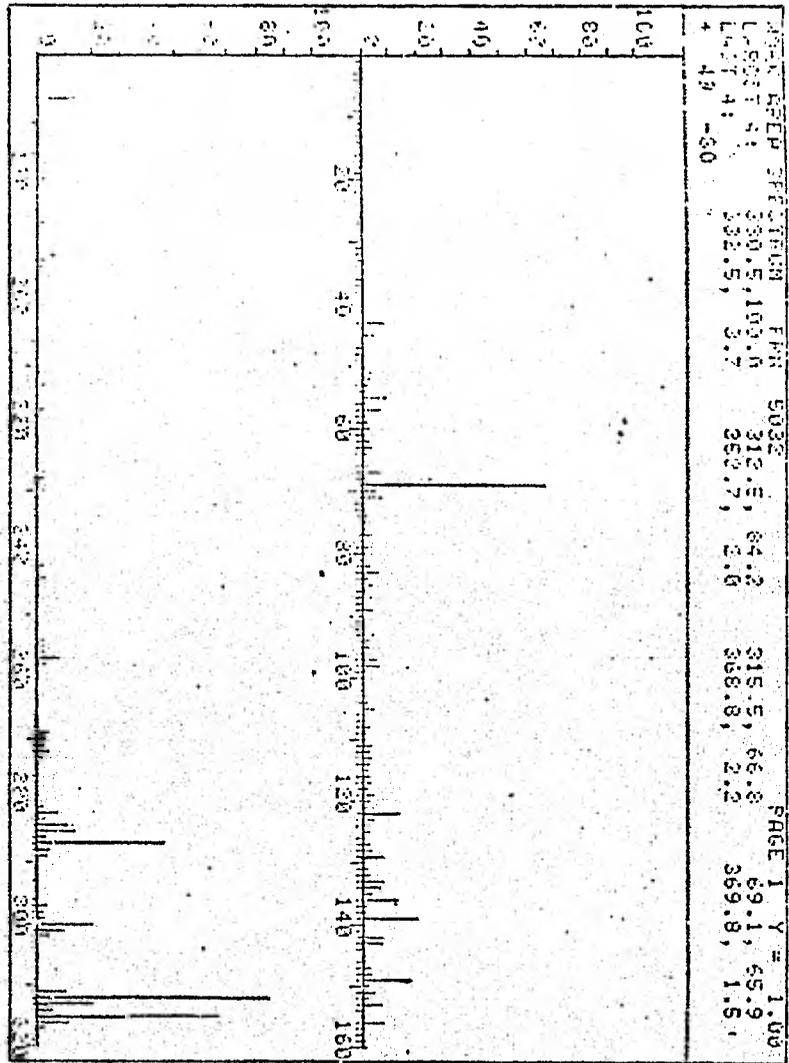
Espectro No. 16.- Espectro de Ultravioleta de la Flavona.
 Disolvente: Etanol



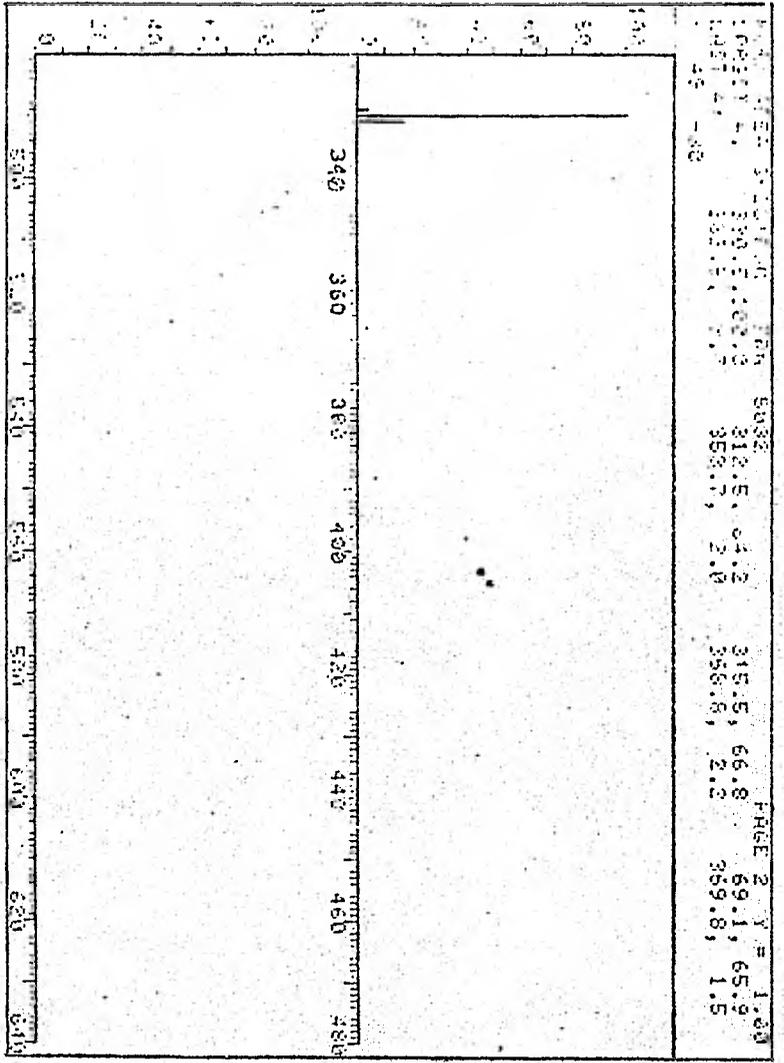
Espectro No. 17.- Espectro de Infrarojo de la Flavona
Disolvente: KBr (pastilla).



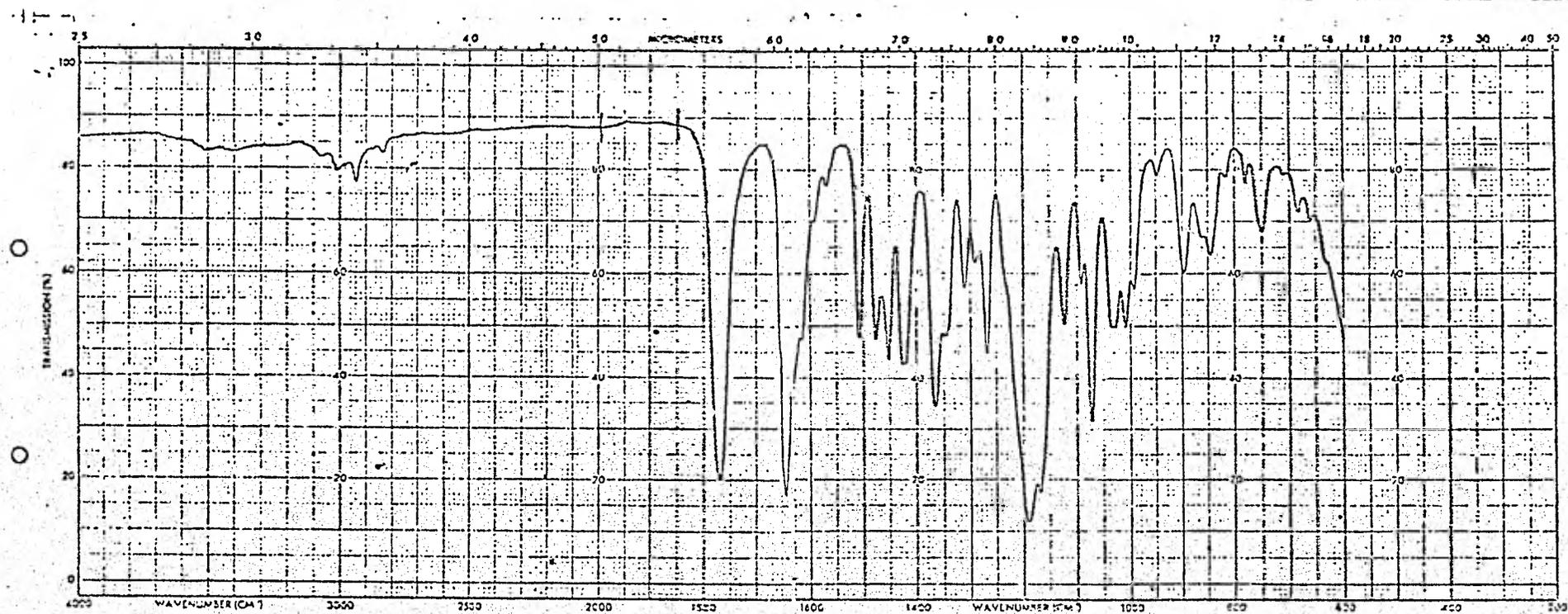
Espectro No. 18.- Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno de la Flavona.
 Disolvente: Cloroformo deuterado más dimetil sulfóxido (CDCl₃ + DMSO).



"Flavona"



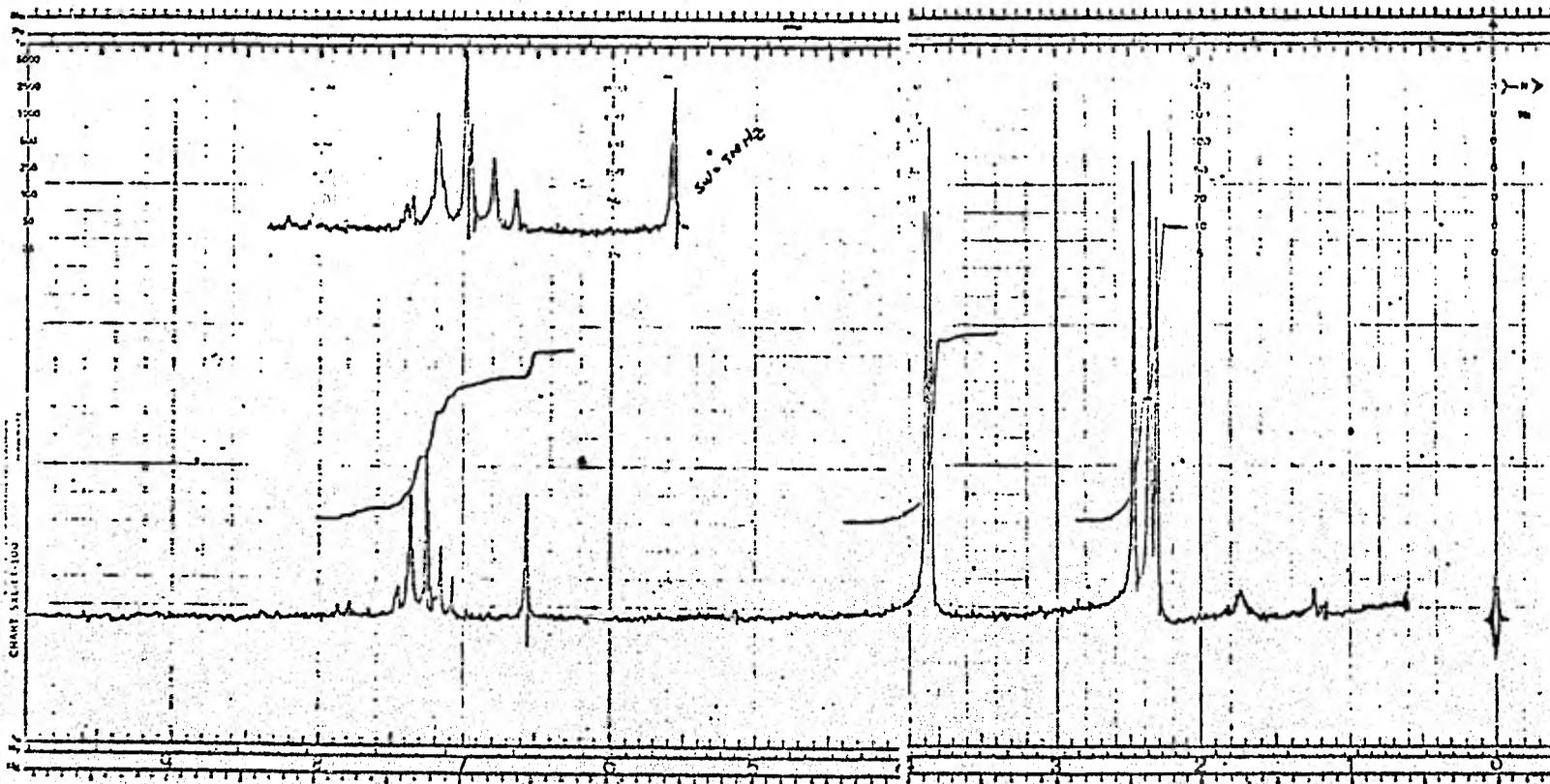
Espectro No. 19.- Espectrometría de Masas de la Flavona.



Espectro no. 20.-

Espectro Infrarojo del Acetato derivado de la Flavona.

Disolvente: Cloroformo (CHCl_3).



Espectro No. 21.- Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
del Acetato derivado de la Flavona.
Disolvente: Cloroformo deuterado (CDCl_3).