

00570

5

24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**DOS NUEVOS GLICOSIDOS DITERPENICOS DE TIPO ent-ATISENO
DE LAS RAICES DE Stevia salicifolia CAV.
UNA PLANTA MEDICINAL MEXICANA.**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS

(FARMACIA - QUIMICA FARMACEUTICA)

P R E S E N T A:

Q.F.B. VERONICA RODRIGUEZ LOPEZ

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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.

INDICE

| | |
|--|------|
| Lista de abreviaturas..... | viii |
| Introducción..... | 1 |
| I. Antecedentes..... | 3 |
| 1. Generalidades del género <i>Stevia</i> | 3 |
| 1.1 Aspectos botánicos..... | 3 |
| 1.2 Aspectos fitoquímicos..... | 3 |
| 1.3 Aspectos etnobotánicos..... | 6 |
| 1.4 Importancia y usos del género..... | 8 |
| 2. Generalidades sobre <i>Stevia salicifolia</i> Cav..... | 10 |
| 2.1 Aspectos botánicos, importancia y usos..... | 10 |
| 2.2 Fitoquímica..... | 10 |
| 2.3 Generalidades sobre <i>ent-atisenos</i> | 17 |
| II. Justificación y objetivos..... | 24 |
| III. Materiales y métodos..... | 26 |
| 3.1 Determinación de la toxicidad para el crustáceo..... | 26 |
| <i>Artemia salina</i> Leach..... | 26 |
| 3.1.1. Preparación de las muestras..... | 26 |
| 3.1.2. Bioensayo..... | 26 |
| 3.2 Determinación de la actividad potencial alelopática de los compuestos aislados..... | 26 |
| 3.3 Material vegetal..... | 27 |
| 3.4 Métodos de extracción y fraccionamiento preliminar. | |
| 3.5 Aislamiento y purificación de los compuestos... 30 | |
| 3.5.1. Obtención del Dammaran-1 α ,20-diol (40)..... | 30 |
| 3.5.2. Obtención del estigmasterol (41)..... | 30 |
| 3.5.3. Obtención del glicósido de β -sitosterol... 31 | |
| (71)..... | 31 |
| 3.5.4. Obtención del α -L-arabinopiranosil- 2',3'- diacetil- β -D-glucopiranosil-(1" \rightarrow 4')- <i>ent</i> - 11 β -ol-13-oxo-atis-16-en-19-carboxilato (72)..... | 31 |

| | |
|---|----|
| 3.5.5. Obtención del α -L-arabinopiranosil- β -D-glucopiranosil-(1" \rightarrow 4')-ent-11 β -ol-13-oxo-atris-16-en-19-carboxilato (73)..... | 31 |
| 3.6 Caracterización de los compuestos aislados..... | 32 |
| 3.6.1. Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas..... | 32 |
| 3.6.2. Pruebas químicas preliminares para la identificación de glicósidos..... | 33 |
| 3.6.2.1. Prueba de Molish..... | 33 |
| 3.6.2.2. Hidrolisis ácida de (72)..... | 34 |
| 3.6.2.3. Acetilación de (72)..... | 34 |
| IV. Resultados..... | 35 |
| V. Discusión de los resultados..... | 55 |
| VI. Conclusiones..... | 77 |
| VII. Bibliografía..... | 78 |

INTRODUCCION

Mientras que las medicinas tradicionales incluyen millares de plantas medicinales cuyo valor terapéutico nos es desconocido, numerosas especies vegetales desaparecen de nuestro planeta y muchos conocimientos populares se van extinguiendo. En algunos países se están llevando a cabo diversas investigaciones para recoger los conocimientos médicos ancestrales y así preservar este precioso patrimonio. México está integrado por numerosas etnias poseedoras de grandes conocimientos de flora medicinal y en un sentido más amplio de Medicinas Tradicionales. En este contexto, nuestro país posee un vasto potencial, el cual ha quedado demostrado recientemente en la encuesta nacional que sobre plantas medicinales y medicina tradicional realizó la Unidad de Investigación en Medicina Tradicional y Desarrollo de Medicamentos del IMSS y el Programa IMSS-COPLAMAR (Lozoya, et al., 1990).

El estudio de la Medicina Tradicional de México y de las plantas medicinales que configuran su recurso más vasto, entra en una etapa de difundido interés en el medio científico nacional. Este interés obedece principalmente:

i) Al convencimiento provocado por la crisis económica, de que los recursos vegetales del país deben ser estudiados para afrontar carencias y costos de medicamentos que son cada vez más difíciles de adquirir.

ii) Y a la opinión y el sentido que dan a sus investigaciones los países altamente tecnificados, ya que ejercen una influencia sobre el desarrollo de la ciencia nacional. Estos, replantean la utilidad y vigencia de la herbolaria medicinal, pero bajo el enfoque de una nueva biotecnología que augura revolucionar el mundo de los medicamentos provenientes de plantas (Balandrin et al., 1985).

De lo anterior, se desprende la gran importancia médica, económica y social que dichos recursos tienen para México; de manera adicional, estos estudios ofrecen nuevas estrategias para el desarrollo del conocimiento nacional en el campo de la medicina.

Actualmente la Organización Mundial de la Salud recomienda a los países en vías de desarrollo que, por una parte, inicien unos programas centrados en la identificación, la preparación, el cultivo y la conservación de las plantas medicinales, y, que mediante transferencia de tecnología, evalúen la calidad y la experiencia de estas medicinas con la ayuda de técnicas modernas (Akerle, 1988). Para abordar el resurgimiento en nuestro país de este campo de estudio es necesario mejorar la información sobre plantas medicinales para tener un inventario amplio y confiable de los recursos vegetales. A su vez, el estudio en el laboratorio permite evaluar la eficacia terapéutica de los remedios tradicionales. Este doble enfoque contribuye a seleccionar plantas realmente eficaces, pero también podría permitir el descubrimiento de nuevos medicamentos.

I. ANTECEDENTES

1. Generalidades del género *Stevia*

1.1 Aspectos Botánicos:

El género *Stevia* pertenece a la familia Asteraceae [tribu Eupatorieae, subtribu Piqueriinae] y según datos publicados se estima que el género comprende alrededor de 385 especies (King *et al.*, 1980). El taxón es exclusivo de América, y su intervalo de distribución se extiende desde el suroeste de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina, a través de México, América Central, los Andes y las tierras altas brasileñas. De acuerdo con Grashoff (1972, 1974), 70 especies se encuentran en México. Las especies del género comprenden hierbas y arbustos, los cuales habitan generalmente en zonas cuya altitud oscila entre 500 y 3000 m arriba del nivel del mar; usualmente crecen en terrenos montañosos, semisecos; el intervalo de habitat va desde pastizales, bosque bajo, pendientes boscosos, bosque de coníferas a vegetación sub-alpina. Un estudio taxonómico del género *Stevia* de acuerdo a su distribución geográfica permitió proponer tres secciones *Eustevia*, *Breviaristatae* y *Multiaristatae* (Soejarto *et al.*, 1983).

1.2 Aspectos Fitoquímicos:

A la fecha, alrededor de 40 especies de *Stevia*, han sido sujetas a estudios fitoquímicos, y de acuerdo a estas investigaciones los metabolitos más importantes del género son de naturaleza terpenoide, aunque también han sido aisladas algunas flavanonas (Sosa *et al.*, 1985; Amirteswori *et al.*, 1985), flavonas (Amirteswori *et al.*, 1984; 1985; Domínguez *et al.*, 1974; Rajbhandari *et al.*, 1985); derivados del benzofurano (Bohlmann *et al.*, 1985); diversos compuestos volátiles (Montes, 1969;

Domínguez, *et al.*, 1974; Bohlmann *et al.*, 1977; 1979; 1982; Ghisalberti *et al.*, 1979) y esteroides (Domínguez *et al.*, 1974; Bohlman *et al.*, 1979; Quijano *et al.*, 1982).

Los principales tipos de terpenoides descritos en el género se resumen en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Tipos de terpenoides obtenidos del género *Stevia*.*

| <u>TIPO ESTRUCTURAL</u> | <u>REFERENCIA</u> |
|---------------------------|--|
| Bisabolenos | Bohlmann <i>et al.</i> , 1976, 1977, 1979, 1982, 1985, Ghisalberti <i>et al.</i> , 1979; Schemeda-Hirschmann <i>et al.</i> , 1986. |
| Germacranos | De helvania <i>et al.</i> , 1989; Bohlmann <i>et al.</i> , 1977, 1979, 1982; Salmón <i>et al.</i> , 1973, 1975; Schmeda-Hirschmann <i>et al.</i> , 1986. Zdero <i>et al.</i> , 1987, 1991; Quijano <i>et al.</i> , 1982; Calderón <i>et al.</i> , 1987. |
| α -Longipinanos | Bohlmann <i>et al.</i> , 1976, 1977, 1979, 1985; Gil <i>et al.</i> , 1987; Román <i>et al.</i> , 1981, 1983; Zdero <i>et al.</i> , 1991. |
| Guayanos y Pseudoguayanos | Ríos <i>et al.</i> , 1967; Oberti <i>et al.</i> , 1983, 1988; Bohlmann <i>et al.</i> , 1979, 1985, 1986; Zdero <i>et al.</i> , 1991.; Calderón <i>et al.</i> , 1987; Sosa <i>et al.</i> , 1984; 1989; Salmón <i>et al.</i> , 1973, 1977; Gil <i>et al.</i> , 1990. |

Cuadro 1. Tipos de terpenoides obtenidos en el género *Stevia*.
(Continuación).

| SESQUITERPENOIDES | |
|----------------------|--|
| TIPO ESTRUCTURAL | REFERENCIA |
| Humulanos | Bohlmann <i>et al.</i> , 1977, 1979. |
| Eremofilanos | Bohlmann <i>et al.</i> , 1982, 1986. |
| Heliangolidos | Gil <i>et al.</i> , 1990. |
| Eudesmanolidos | Martínez-Vásquez <i>et al.</i> , 1990. |
| DITERPENOIDES | |
| Clerodanos | Bohlmann <i>et al.</i> , 1982; Angeles <i>et al.</i> , 1982. |
| Labdanos | Bohlmann <i>et al.</i> , 1976, 1982, 1985; Quijano <i>et al.</i> , 1982; Ortega <i>et al.</i> , 1980. |
| Hibaanos | Zdero <i>et al.</i> , 1987; Escamilla <i>et al.</i> , 1991. |
| <i>Ent</i> -Kauranos | Bohlmann <i>et al.</i> , 1979, 1982; Quijano <i>et al.</i> , 1982; Ortega <i>et al.</i> , 1985; Kaneda <i>et al.</i> , 1988; Kohda <i>et al.</i> , 1976 c. b; Yamasaki <i>et al.</i> , 1976, 1977; Crammer <i>et al.</i> , 1986. |

Cuadro 1. Tipos de terpenoides obtenidos en el género *Stevia*.^{*}
(Continuación).

| TRITERPENOIDES | |
|-------------------------|--|
| <u>TIPO ESTRUCTURAL</u> | <u>REFERENCIA</u> |
| Taraxantanos | Domínguez <i>et al.</i> , 1974. |
| Dammaranos | Bohlmann <i>et al.</i> , 1979. |
| Lupanos | Sholichin <i>et al.</i> , 1980; Bohlmann <i>et al.</i> , 1979. |
| Oleananos | Bohlmann <i>et al.</i> , 1979. |

^{*} En este cuadro no se incluyen los monoterpenoides, los cuales han sido obtenidos fundamentalmente del aceite esencial de la *S. rebaudiana* (Kinghorn *et al.*, 1985).

1.3 Aspectos etnobotánicos:

Las especies de *Stevia* ofrecen muchas posibilidades en la investigación de productos naturales como fuentes potenciales de principios activos, ya que muchas especies gozan de reputación folclórica como agentes medicinales. En el Cuadro 2 se indican algunas de estas especies.

De las especies del Cuadro 2 la única que ha sido objeto de estudios biológicos es la *S. rebaudiana* los cuales incluyen: (i) Evaluaciones de seguridad para su consumo, como toxicidad aguda, subaguda y crónica, teratogénesis y mutagénesis. (ii) Investigaciones para validar algunas de las propiedades medicinales que se le atribuyen popularmente (hipoglucemiante, anticonceptiva, agente antiinfectivo y antimicótico). (iii) Propiedades alelopáticas (Kinghorn *et al.*, 1989).

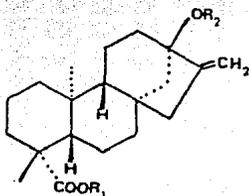
1.4 Importancia y usos del género:

Varias especies de *Stevia* son utilizadas en la medicina tradicional, según se indicó previamente (ver Cuadro 2). Otras como la *S. petiolata* y la *S. rebaudiana* Ber., se emplean como saborizante y edulcorante, respectivamente. Por su importancia económica, la *S. rebaudiana* es la especie del género más estudiada desde el punto de vista fitoquímico; ocho glicósidos de tipo *ent*-kaureno han sido identificados de la especie. Los glicósidos dulces se acumulan en las hojas de la planta en altas concentraciones. El esteviósido, que es el glicósido más abundante y representativo de la especie, se encuentra en una proporción del 10 % p/p. Su poder edulcorante es de 250-300 veces mayor que el de la sacarosa, por lo que se usa en la industria de alimentos procesados en países como Japón y Brasil. En el Cuadro 3 se especifican los glicósidos que contiene esta especie, así como su poder edulcorante (Crammer *et al.*, 1980). La presencia de estos glicósidos dulces en la especie *S. rebaudiana*, ha motivado la realización de estudios conducentes a la evaluación organoléptica de las hojas de otras especies del género, con la intención de encontrar agentes edulcorantes potenciales similares (Soejarto *et al.*, 1982, 1983).

Cuadro 2. Algunas especies de *Stevia* utilizadas en medicina tradicional o de importancia económica. (Soejarto et al., 1983).

| ESPECIE | PAIS DE ORIGEN | USOS POPULARES |
|---|----------------|---|
| <i>S. BALANSAE</i> HIERON (CHARUA CAA) | PARAGUAY | ANTIDIARREICO |
| <i>S. LUCIDA</i> LAG. (GOLONDRINA SABANERA) | COLOMBIA | ANTIINFLAMATORIO |
| <i>S. MAELORIDEI</i> ROBINS (GUALAMOÇO) | PERU | AGUA DE BANO |
| <i>S. ANOMALA</i> ROBINS (GUALAMOCO) | PERU | AGUA DE BANO |
| <i>S. PETIOLATA</i> (CASS) SCH. B.P. (GUARMI- GUARMI) | PERU | SABORIZANTE |
| <i>S. SUBPUBESCENS</i> LAG. VAR. (ZAZAL) | MÉXICO | ANTIRREUMATICO ANTIESPASMODICO |
| <i>S. INTERMEDIA</i> GRASHOF (HIERBA DEL AIRE) | MÉXICO | ANTIRREUMATICO ANTIESPASMODICO |
| <i>S. REBAUDIANA</i> BERT (CAA HE-E) | PARAGUAY | EDULCORANTE ANTIDIABETICO ANTIPARASITARIO ANTICONCEPTIVO |

Cuadro 3. Glicósidos con poder edulcorante aislados de la *S. rebaudiana*.



| Diterpeno | R ₁ | R ₂ | Potencia edulcorante* |
|------------------|-------------------|----------------------------------|-----------------------|
| Esteviósido | β-Glu | β-Glu-β-Glu (2→1) | 250-300 |
| Esteviolbiósido | -H | β-Glu-β-Glu (2→1) | 100-125 |
| Rebaudianósido A | β-Glu | β-Glu-β-Glu (2→1) β-Glu (3→1) | 350-450 |
| Rebaudianósido B | -H | β-Glu-β-Glu (2→1) β-Glu (3→1) | 300-350 |
| Dulcósido A | β-Glu | β-Glu-α-Ram (2→1) β-Glu (3→1) | 50-120 |
| Rebaudianósido D | β-Glu-β-Glu (2→1) | β-Glu-β-Glu (2→1) β-Glu (3→1) | 200-300 |
| Rebaudianósido E | β-Glu-β-Glu (2→1) | β-Glu-β-Glu (2→1) | 250-300 |
| Rebaudianósido C | β-Glu | β-Glu-α-Ram (2→1) | 50-120 |

 Glu= glucosa Ram= ramnosa

* Sacarosa = 1

2. Generalidades sobre *Stevia salicifolia* Cav.

2.1 Aspectos botánicos; importancia y usos.

La *S. salicifolia* Cav. (ver. Figura 1) es una hierba perenne común en las montañas boscosas del norte de México. Los Tarahumaras de Chihuahua llaman a la planta "ronino" o "roniowa" y la emplean en su medicina tradicional. La decocción de las hojas y raíces se utiliza comúnmente en el tratamiento de úlceras, heridas, inflamaciones y mordeduras de animales. La infusión de las raíces se bebe para aliviar dolores gastro-intestinales causados por parásitos, en tanto que la decocción se usa como un purgante. Las raíces y las hojas son astringentes y aplicadas en las caries alivian el dolor de muelas. Las raíces molidas se usan para lavar el barro de las ollas de fermentación utilizadas para la preparación del "tesgüino" (bebida basada en la fermentación del maíz). Después del proceso de fermentación el polvo de las raíces se adiciona a el líquido para hacer una bebida "fuerte" y dulce. (Bennett, Zingg, 1935; Bye, 1985; Pennington, 1963).

Esta planta medicinal se conoce con el nombre de la "hierba del aire", "tonalxihuitl" y "tonalxuitl" en otras regiones geográficas (Díaz, 1976).

2.2 Fitoquímica:

El estudio fitoquímico de la *S. salicifolia* solo se ha realizado desde el punto de vista convencional. El primer estudio (Ortega, et al., 1980) se realizó sobre la variedad típica Robinson, recolectada en el verano de 1975 en Topilejo, D.F., identificándose en esa oportunidad el stevinsol (1) y las flavonas, 7,4'-dimetoxi-naringenina (2); 3',4',5 -trihidroxi-7-



Figura 1. Stevia salicifolia Cav.

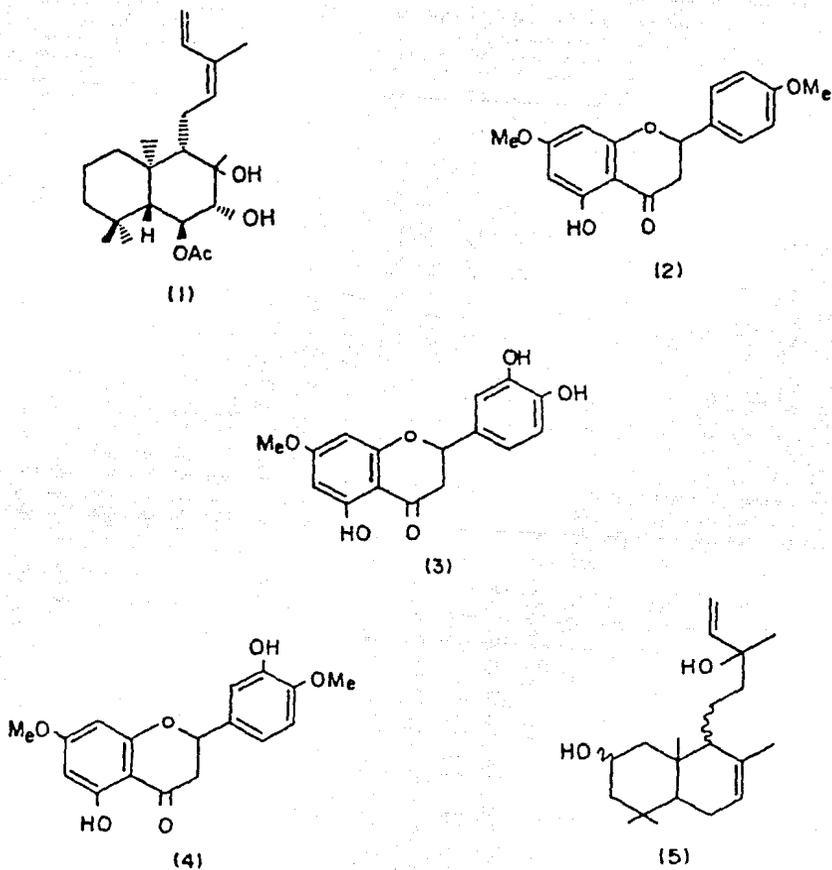


Figura 2. Constituyentes aislados de la variedad típica Robinson y salicifolia de la S. salicifolia.

metoxi flavonona (3) y 5,3'-dihidroxi-7,4'-dimetoxi flavanona (4). De la variedad salicifolia recolectada en el mes de junio de 1976, en los alrededores de El Oro, Edo. de México se caracterizaron el salicifoliol (5) y las mismas flavonas, antes mencionadas (2,3,4). En la figura 2 se ilustran las estructuras de los compuestos aislados en ambos estudios químicos.

Posteriormente, la reinvestigación de la *S. salicifolia* Cav. variedad típica Robinson (Calderón et al., 1984) recolectada en el campus de la UNAM (México, D.F.) en septiembre de 1980, permitió el aislamiento y caracterización de los ácidos 1-hidroxibisabol-15-oico (6) y 1-acetoxibisabol-15-oico (7). Estos compuestos fueron obtenidos bajo la forma de ésteres metílicos. En la Figura 3 se ilustran las estructuras correspondientes.

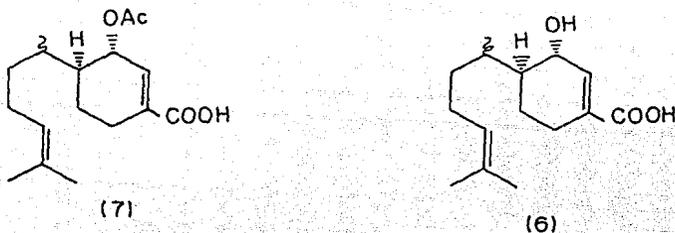
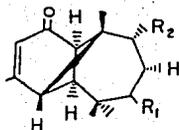
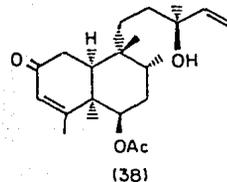
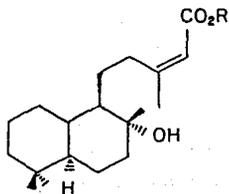
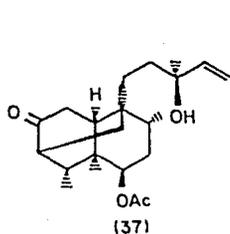


Figura 3. Constituyentes aislados de la *Stevia salicifolia* var. típica Robinson.

Un año después, un grupo alemán (Bohlmann et al., 1985) estudio el material recolectado en el cerro del Gallego en el Cañón del Cobre, Edo. de Chihuahua, México, en abril de 1984. En este caso, se logró el aislamiento y la caracterización de 31 compuestos. La mayoría de los constituyentes obtenidos fueron sesquiterpenoides del tipo longipineno. En la Figura 4 se indican las estructuras de los compuestos identificados en esta



| | <u>19</u> | <u>20</u> | <u>21</u> | <u>22</u> | <u>23</u> | <u>24</u> | <u>25</u> | <u>26</u> | <u>27</u> | <u>28</u> | <u>29</u> | <u>30</u> | <u>31</u> | <u>32</u> |
|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| R ₁ | -OAng | -OAng | -OAng | -OAng | -OMeacr | -OiBu | -OMeacr | -OMeacr | -OAng | -OMeacr | -OAng | -OBpang | -OBpang | -H |
| R ₂ | -OAng | -OiSen | -H | -OiSen | -H | -OiBu | -OAng | -OMeacr | -OMeacr | -OAc | -OAng | -OAng | -OAng | -H |



33 34 35 36*

R -Me -H -Me 13,14-H₂

Figura 4. Constituyentes aislados de *Stevia salicifolia* por Bohlmann y colaboradores (Continuacion).

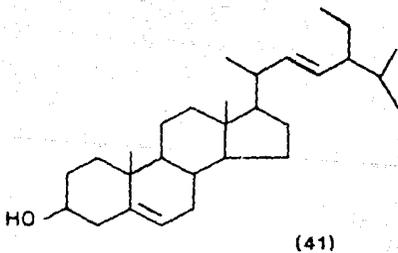
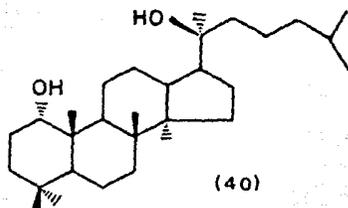
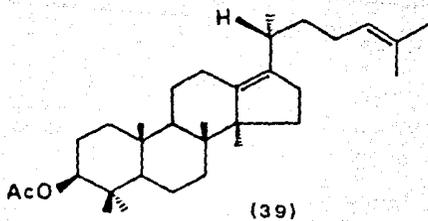


Figura 5. Constituyentes aislados de las raíces de S. salicifolia.

investigación. Cabe destacar que todos los estudios antes mencionados, se realizaron sobre las partes aéreas de la planta.

Finalmente, se realizó un estudio químico y biológico de las raíces de la planta (Rodríguez, 1990) recolectada en el Edo. de Chihuahua, y como resultado de esta investigación fue posible aislar y caracterizar dos triterpenoides del tipo damarano (39) y (40) y el estigmasterol (41) (ver Figura 5).

2.3 Generalidades sobre los *ent*-atisenos:

En virtud de que los metabolitos aislados en la presente investigación fueron glicósidos del tipo *ent*-atiseno, se realizó una revisión bibliográfica detallada acerca de estos productos naturales.

Los atisenos son un grupo de diterpenoides tetracíclicos que poseen como esqueleto base la estructura (42) (ver Figura 6).

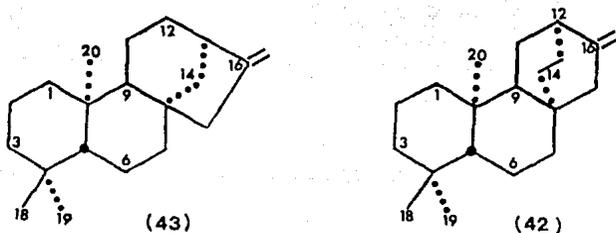


Figura. 6. Estructuras generales de los diterpenoides de los tipos *ent*-atiseno (42) y *ent*-kaureno (43).

Su distribución en la naturaleza es restringida, y a la fecha solo se han aislado de especies pertenecientes a las siguientes familias de plantas: Anonaceae, Euphorbiaceae Umbelliferae y Asteraceae. Además el 3 β , 16 α -atisenediol (45) se aisló de una esponja marina perteneciente a la familia Spongiae (ver Cuadro 4).

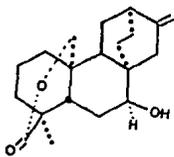
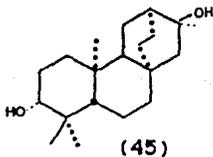
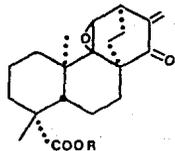
Es importante mencionar que la mayoría de los *ent*-atisenos se han aislado de raíces. En el Cuadro 4 se encuentran los *ent*-atisenos descritos a la fecha, así como sus fuentes naturales. En la mayoría de los *ent*-atisenos el grado de oxidación del metilo 19 en C-4 corresponde a un ácido carboxílico. Otras posiciones que con frecuencia se encuentran oxidadas son las correspondientes a C-3, C-15, C-16 y C-17. De manera general los sustituyentes son grupos hidroxilo aunque a veces se pueden encontrar cetonas o ésteres. En el caso del atisenol (44) (Pelletier, *et al*, 1982) se forma una lactona de seis miembros entre el ácido carboxílico de C-19 y la función alcohólica de C-20 del precursor correspondiente. Por último cabe hacer notar que sólo se ha descrito el aislamiento de un glicósido con esqueleto del tipo *ent*-atiseno, el cual se obtuvo de la especie *Pteris purpueorachis* Copel (Murakami, 1983).

Para la elucidación estructural de los *ent*-atisenos se han utilizado fundamentalmente métodos espectroscópicos, espectrométricos, estudios de difracción de rayos X y correlaciones químicas (ver Cuadro 4).

No se han descrito estudios experimentales acerca de la biosíntesis de estos compuestos. Sin embargo, su coexistencia con *ent*-kaurenos y beyeranos ha permitido formular la hipótesis biogenética que se resume en el Esquema 1 (Manitto, 1981; Geissman, 1969).

Desde el punto de vista biológico sólo se ha determinado la actividad citotóxica del 3 β ,16 α -atisanediol (45) (Schmitz, 1983), y la antimicrobiana y fungicida del atisan-16-ol (Giesbrecht, et al., 1987).

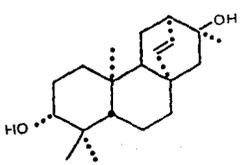
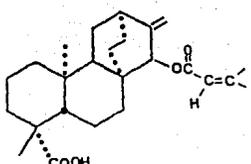
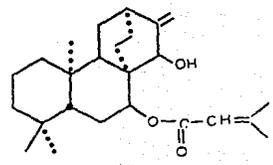
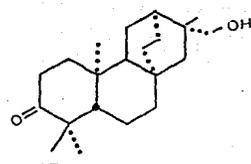
Cuadro 4. *ent*-Atisanos aislados a la fecha.

| <u>Estructura</u> | <u>Fuente Natural</u> | <u>Referencia</u> |
|---|---|--------------------------|
|  <p>(44)</p> | <i>Aconitum heterophyllum</i> (raíces) | Pelletier, et al., 1982. |
|  <p>(45)</p> | <i>Tedania ignis</i> | Schmitz, et al., 1983. |
|  | <i>Pteris purpureorechis</i> | Murakami et al., 1983. |

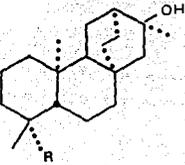
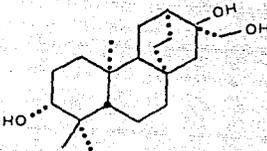
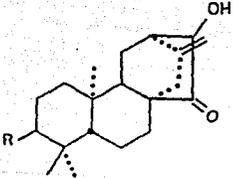
(46) I R = H

(47) II R = β -o-glucosil

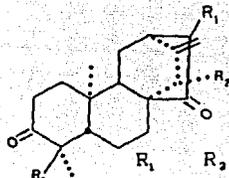
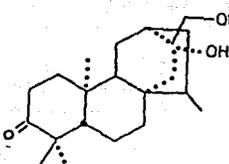
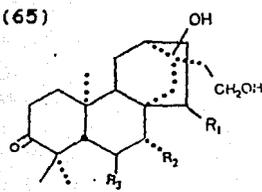
Cuadro 4. *ent*-Atisanos aislados a la fecha. (Continuación).

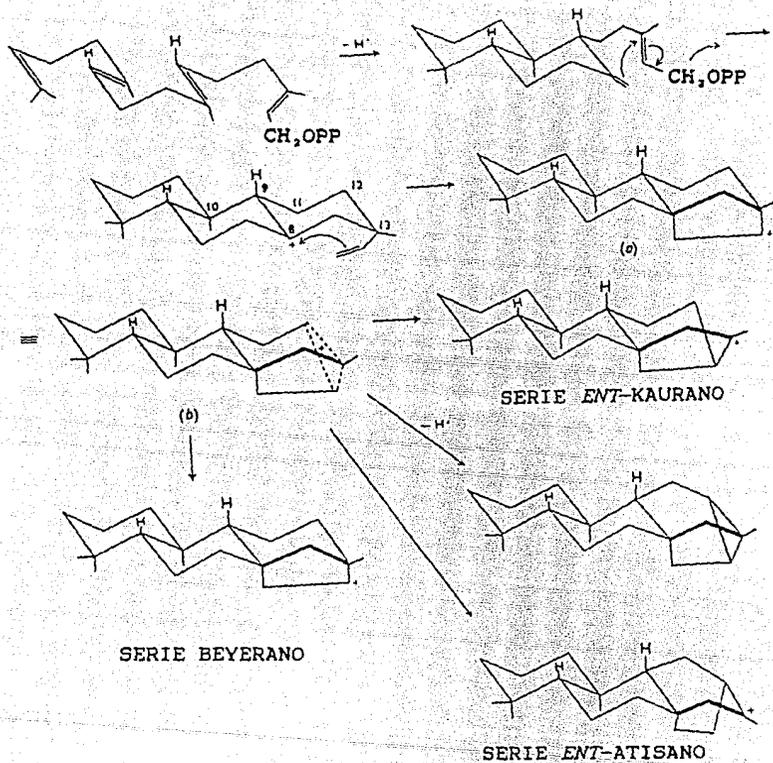
| <u>Estructura</u> | <u>Fuente natural</u> | <u>Referencia</u> |
|---|--|-------------------------|
|  <p>(48)</p> | <i>Viguiera insignis</i> | Delgado et al. 1989. |
|  <p>(49)</p> | <i>Elaeoselinum foetidum</i> (raíces) | Pinar et al. 1984 a. |
|  <p>(50)</p> | <i>Elaeoselinum foetidum</i> (raíces) | Pinar, 1984 b. |
|  <p>(51)</p> | <i>Euphorbia acaulis</i> | Satti et al. 1987. |

Cuadro 4. *ent*-Atisanos aislados a la fecha.

| Estructura | Fuente Natural | Referencia |
|--|--|---|
|  <p>(52) I R = Me (53) II R = CH₂OH (54) III R = COOH</p> | <i>Xilopia aromatica</i> | Moraes et al 1988. |
|  <p>(55)</p> | <i>Euphorbia acaulis</i> (raíces) | Satti et al, 1988. |
|  <p>(56) I R₁ = -O (57) II R₂ = -OH (58) I R = -O Δ^{13,14} (59) II R = -OH Δ^{13,14}</p> | <i>Euphorbia sieboldiana</i> <i>Euphorbia nenifolia</i> (raíces) | Jian Jia et al. 1990. A.S.Ng, 1990. |

Cuadro 4. *ent*-Atisanos aislados a la fecha.

| <u>Estructura</u> | <u>Fuente Natural</u> | | | <u>Referencia</u> |
|--|---------------------------|----------------|--------------------|--------------------------------|
|  | <i>Euphorbia fidjiana</i> | | | Lal <i>et al.</i> , 1990. |
| (60) I | OH | H | Me | |
| (61) II | H | H | Me | |
| (62) III | OH | OH | Me | |
| (63) IV | OH | H | CH ₂ OH | |
| (64) V | H | H | CH ₂ OH | |
|  | <i>Euphorbia fidjiana</i> | | | Cambie, <i>et al.</i> 1991. |
| (65) | | | | |
|  | <i>Euphorbia fidjiana</i> | | | Lal, <i>et al.</i> 1990. |
| | R ₁ | R ₂ | R ₃ | |
| (66) VI | H | H | H | |
| (67) VII | H | OH | H | |
| (68) VIII | OH | H | H | |
| (69) IX | H | H | OH | |



Esquema 1. Formaci3n de diterpenoides tetrac3clicos.

II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS.

El propósito fundamental de la presente investigación es el de realizar el estudio fitoquímico y biológico del extracto acetónico de las raíces de *S. salicifolia*. Cabe hacer mención que este trabajo forma parte de un estudio sistemático de plantas mexicanas utilizadas en medicina tradicional, cuyos objetivos primordiales son: (i) obtener principios activos. (ii) contribuir al conocimiento de la composición química de la flora medicinal mexicana.

Las consideraciones para realizar el estudio de esta planta son las siguientes:

Uno de los principales criterios para descubrir nuevos productos naturales con actividad terapéutica, sin duda alguna ha sido el estudio de plantas que gozan de prestigio como agentes terapéuticos dentro de la denominada medicina tradicional. En México, la práctica de ésta medicina se remonta desde épocas precolombinas hasta nuestros días, encontrándose que el mayor número de usuarios pertenece a las comunidades de más bajos recursos, entre ellas, algunas comunidades indígenas. Así por ejemplo, los Tarahumaras de Chihuahua usan aproximadamente 300 especies vegetales para el alivio de sus enfermedades. La flora medicinal tarahumara ha recibido poca atención, y como parte de ella destaca la *S. salicifolia*, que como ya se menciona previamente es ampliamente utilizada para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales.

Es indudable que de cumplirse satisfactoriamente los objetivos planteados, se contribuiría a la resolución de problemas de salud pública y económicos, ya que se podrían obtener principios activos nuevos o conocidos a partir de materias primas nacionales.

Los objetivos específicos pertinentes para el cumplimiento de las metas propuestas son los siguientes:

- 2.1 Realizar las operaciones preliminares propias de la preparación de extractos vegetales.
- 2.2 Preparar el extracto acetónico de acuerdo a la metodología convencional y fraccionarla mediante los métodos adecuados.
- 2.3 Separar y purificar los constituyentes de las diferentes fracciones.
- 2.4 Identificar mediante métodos químicos y espectroscópicos los compuestos aislados.
- 2.5 Determinar la toxicidad para *Artemia salina* Leach, y las actividades antitumoral y alelopática de los compuestos aislados.

III. MATERIALES Y METODOS.

3.1 Determinación de la toxicidad para el crustáceo *Artemia salina* Leach.

3.1.1. Preparación de las muestras.

Las muestras (compuestos puros, fracciones y/o extractos), se preparan disolviendo 20 mg de material en 2 ml del disolvente apropiado (solución original). Posteriormente se transfieren a tres tubos de muestra en forma independiente y por triplicado 500, 50 y 5 μ l de la solución original. Finalmente se deja evaporar el disolvente de cada una de las soluciones al vacío.

3.1.2. Bioensayo

Después de haber desarrollado durante 48 horas los huevecillos de *A. salina* Leach en un medio salino artificial, se transfieren 10 especímenes a cada uno de los tubos de muestra, conteniendo la muestra a evaluar, y aforando a 5 ml con medio salino, para que corresponda a 1000, 100 y 10 ppm de muestra. 24 horas más tarde se registran el número de organismos sobrevivientes. Los resultados finales se expresan en porcentaje de mortalidad de los crustáceos o calculando la concentración letal media (LC_{50}).

3.2. Determinación de la actividad potencial alelopática de los componentes aislados.

El potencial alelopático del glicosido (45) se probó sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus leucocarpus* y *Echinocloa crussgalli*.

Estos ensayos biológicos se realizaron en el laboratorio de la Dra. Ana Luisa Anaya del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. La metodología seguida es la descrita por Anaya y colaboradores (1990) para este tipo de evaluaciones.

3.3. Material vegetal

La raíz de *S. salicifolia* se recolectó en el municipio de Guachochic, Cusarare, Edo. de Chihuahua en noviembre de 1988 y fué identificada por el Dr. Robert Bye del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM.

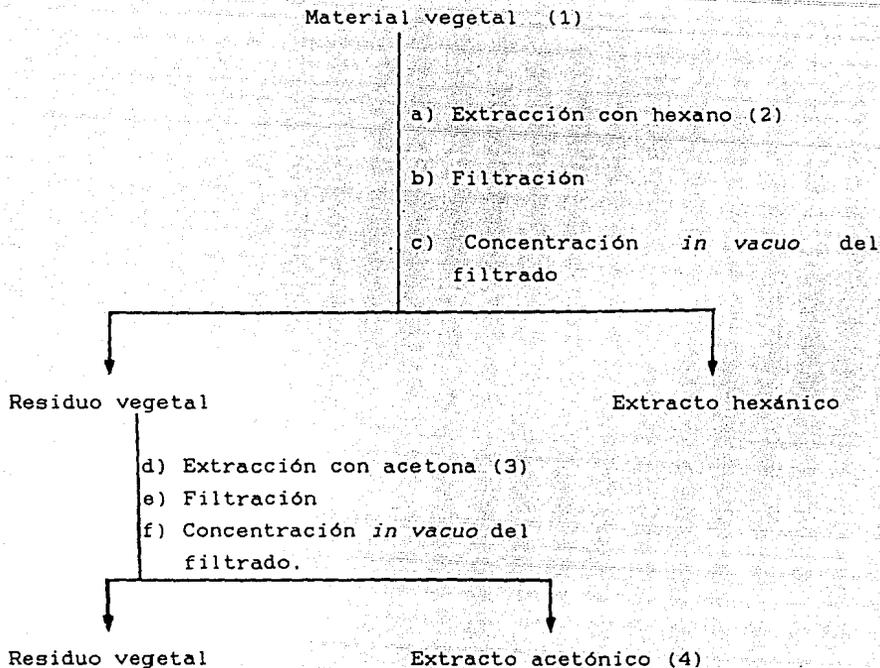
Una muestra de referencia se depositó en la colección de etnobotánica del Herbario Nacional (Voucher R. Bye 16657).

El material vegetal, se secó a temperatura ambiente y se molió, en un molino tipo Wiley 4.

3.4. Métodos de extracción y fraccionamiento preliminar.

El material vegetal se extrajo inicialmente con hexano para desgrasar. Posteriormente, el residuo vegetal se maceró con acetona, mediante el procedimiento señalado en el Esquema 2.

El extracto acetónico (76.11 g) se fraccionó mediante una cromatografía preparativa en columna, utilizando como adsorbente gel de sílice (760 g, sílica gel G 60 Merck, malla 30-70 mm). El proceso de elución se efectuó con hexano, cloroformo y acetona, en diferentes proporciones. Se obtuvieron un total de 379 fracciones de 500 ml cada una. Cada fracción se analizó por cromatografía en capa fina, combinándose aquellas cromatográficamente similares. En el Cuadro 4 se resumen los sistemas de elución empleados, el número de fracciones eluidas con cada uno de ellos, y las fracciones combinadas resultantes.



(1) 2.7 Kg.

(2) Vía maceración (4 veces por períodos de dos días cada vez, 16.5 l . de hexano).

(3) Vía maceración (5 veces por períodos de dos días cada vez, 17 l . de acetona).

(4) 76.11 g.

Esquema 2. Preparación del extracto acetónico de la especie *S. salicifolia* Cav.

=====

Cuadro 5. Resumen del fraccionamiento cromatográfico en columna del extracto acetónico de las raíces de *Stevia salicifolia* (columna I).

| <u>Eluyente</u> | <u>Proporción</u> | <u>No. de fracciones</u> |
|-----------------------------|-------------------|--------------------------|
| Hexano | 100 | 1-7 |
| Hexano: CHCl ₃ | 80:20 | 8-90 |
| " " | 70:30 | 91-129 |
| " " | 60:40 | 130-156 |
| " " | 40:60 | 157-198 |
| " " | 20:80 | 199-219 |
| CHCl ₃ | 100 | 220-224 |
| CHCl ₃ : Acetona | 95:5 | 225-233 |
| " " | 90:10 | 234-240 |
| " " | 80:20 | 241-257 |
| " " | 70:30 | 258-272 |
| " " | 60:40 | 273-293 |
| " " | 50:50 | 294-340 |
| " " | 15:85 | 341-372 |
| Acetona | 100 | 373-375 |
| MeOH | 100 | 376-379 |

=====

Los análisis cromatográficos en capa fina se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales, utilizando placas de vidrio recubiertas de gel de sílice (silica gel 60 GF₂₅₄, Merck), varios sistemas elución y diferentes agentes cromógenos. Los sistemas eluyentes y reactivos reveladores empleados se resumen en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Sistemas de elución y reactivos cromógenos utilizados para los análisis cromatográficos en capa fina.

| <u>Sistemas de eluyentes</u> | <u>Composición</u> | <u>Proporción</u> | <u>Referencia</u> |
|------------------------------|--|-------------------|--------------------|
| I | CHCl ₃ :MeOH | diversas | - |
| II | Acetona: H ₂ O | 9:1 | Anaya, et al, 1990 |
| III | CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O | 60:13:1 | |

| <u>Reactivo</u> | <u>Agente cromogénico</u> <u>Composición</u> | <u>Referencia</u> |
|--------------------|---|-------------------|
| I. Sulfato cérico* | 12g sulfato cérico 22.2ml H ₂ SO ₄ conc. 350g hielo picado | Sthal, 1969 |
| II. Anisaldehído* | 0.5ml anisaldehído 9 ml etanol 0.5ml H ₂ SO ₄ conc. 1 ml ác. acético | Sthal, 1969 |

* Para el desarrollo de color es necesario calentar por dos minutos aproximadamente a 110 °C.

3.5 Aislamiento y Purificación de los compuestos

3.5.1. Obtención del Dammaran - 1α - 20 - diol. (40)

De las fracciones 28 - 37 de la columna I (ver Cuadro 5) se obtuvieron 18.6 mg de un polvo cristalino blanco de p.f. 245-246 °C.

3.5.2. Obtención del estigmasterol. (41)

De las fracciones 87 - 94 de la columna I (ver Cuadro 5) se obtuvieron 52.3 mg de un polvo cristalino blanco de p.f. 145-147 °C.

3.5.3. Obtención del glucósido del β -sitosterol. (71)

De las fracciones 251-293 de la columna I precipitaron 22.6 mg de un polvo blanco de p.f. 243-246 °C.

3.5.4. Obtención del α -L-arabinopiranosil - 2',3'-diacetil- β -D-glucopiranosil (1" \rightarrow 4') -ent-11 β -ol-13-oxo-atis-16-en-19-carboxilato. (72)

De las fracciones 294-340 de la columna I (ver Cuadro 5) cristalizaron espontáneamente 3.217 g de un polvo cristalino blanco de p.f. 164-166 °C.

3.5.5. Obtención del α -L-arabinopiranosil- β -D-glucopiranosil (1" \rightarrow 4')-ent -11 β -ol -13 -oxo -atis -16-en-19 carboxilato (73). Bajo la forma de su acetyl derivado.

Las fracciones 341-379 de la columna I (ver Cuadro 5) se recromatografiaron en una columna (II) utilizando como adsorbente 17 g de gel de sílice G60 Merck malla 230 mm y como eluyentes CHCl_3 , y mezclas de CHCl_3 -MeOH en diferentes proporciones; se recogieron un total de 217 fracciones de 80 ml cada una (ver Cuadro 7), cada fracción fue analizada por cromatografía en capa fina. De las eluatos 102-117, se obtuvieron 500 mg de un polvo color ámbar. Parte de este material se sometió a una cromatografía preparativa en capa fina utilizando el sistema eluyente III (ver Cuadro 6). De la banda con $R_f = 0.4$, que fue la mayoritaria, se obtuvieron 100 mg de un sólido cristalino que consistió fundamentalmente de un solo compuesto (73). Para la purificación 90 mg de la mezcla se sometieron a una reacción de

acetilación (ver 3.6.2.3.): el crudo de la reacción se purificó por cromatografía preparativa en capa fina, obteniéndose 50 mg de un polvo cristalino amarillo palido de p.f. 116-118 °C. (73A)

Cuadro 7. Resumen de la resolución mediante cromatografía en columna de las fracciones 326-379 de la columna original (Columna II).

| <u>Eluyente</u> | <u>Proporción</u> | <u>No. de fracciones</u> |
|-------------------------|-------------------|--------------------------|
| CHCl ₃ | 100 | 1-40 |
| CHCl ₃ :MeOH | 99:1 | 41-62 |
| " " | 98:2 | 63-81 |
| " " | 97:3 | 82-94 |
| " " | 95:5 | 95-118 |
| " " | 90:10 | 119-160 |
| " " | 80:20 | 161-184 |
| " " | 70:30 | 185-210 |
| " " | 60:40 | 211-216 |
| MeOH | 100 | 217-220 |

3.6. Caracterización de los compuestos aislados.

3.6.1. Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas.

- a) Los puntos de fusión fueron medidos en un aparato Fisher-Johnes, se reportan sin corregir.
- b) Los espectros IR, fueron registrados en un espectrofotómetro de rejilla PerKin-Elmer Modelo 549 B en pastilla de KBr.

- c) Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro 241 PerKin-Elmer, tras previa disolución de los productos en MeOH.
- d) Los espectros de masas fueron obtenidos en un aparato Finigan MAT 90 en la Universidad de Illinois de Chicago USA por el Dr. Norito Kaneda.
- e) Los espectros de RMN-¹H y RMN ¹³C se determinaron en un Instrumento Varian VXR-300s (Instituto de Química de la UNAM), utilizando como disolvente Py-d₆ y como referencia interna TMS.
- f) Los espectros NOESY, SINEPT, COSY y de doble resonancia fueron determinados en la Universidad de Illinois de Chicago USA por el Dr. Norito Kaneda, en un aparato Varian XL-300; utilizando como disolvente Py-d₆ y como referencia interna TMS.

3.6.2. Pruebas químicas preliminares para la identificación de glicósidos.

3.6.2.1. Prueba de Molish:

A una pequeña cantidad de cada uno de los compuestos disueltos en 3 ml de agua destilada, se les adicionó un ml de una solución etanólica de α -naftol (10%); Posteriormente se adicionaron por las paredes de los tubos de ensayo dos gotas de ácido sulfúrico concentrado, observándose una coloración violeta en la interfase de los líquidos, lo que es indicativo de la presencia de carbohidratos. Se empleó una solución de glucosa y agua destilada como controles positivos y negativos respectivamente.

3.6.2.2. Hidrólisis ácida de (72).

Por cada 10 mg de compuesto se añadieron dos ml de HCl 2N. La mezcla anterior se sometió a reflujo durante 2 horas. Al cabo de este tiempo, la solución ácida se extrajo con AcOEt y la fase acuosa remanente se pasó por una columna intercambiadora de iones básica (Intercambiador de aniones debilmente alcalino II Merck) con la finalidad de neutralizar la solución. Esta solución neutra fue la utilizada para la detección cromatográfica de los azúcares.

Los azúcares se detectaron mediante una cromatografía comparativa en capa fina (Gel de sílice 60, F-254) previamente rociada con H_2BO_3 0.036M, utilizando el sistema de elución II y el agente cromogénico II del Cuadro 6. En todos los casos se utilizaron patrones de azúcares adquiridos comercialmente de la casa Merck [L(+)-arabinosa, D(-)-fructuosa, D(+)-galactosa, D(+)-glucosa, D(+)-lactosa, D(-)-manitol, D(+)-sacarosa, D(-)-sorbitol, L(-)-sorbosa, D(+)-xilosa, L(+)-ramnosa, D-isoramnosa y D(+)-fucosa.]

3.6.2.3. Acetilación de α -L-arabinopiranosil-2',3'-diacetil- β -D-glucopiranosil (1" \rightarrow 4')-ent-11 β -ol-13-oxo-atís-16-en-19 carboxilato (72).

Para obtener el derivado acetilado del glicósido (72) se utilizaron un ml de piridina y un ml de anhídrido acético por cada 100 mg de muestra. La mezcla de reacción se dejó en reposo durante 24 horas y al término de este tiempo los productos acetilados fueron separados por el método convencional (Shriner, Fuson-Curtin, 1980). Se acetilaron 100 mg del compuesto (72), obteniéndose 83 mg de un compuesto acetilado con un p.f. de 116-118 °C.

IV. RESULTADOS

El extracto acetónico de las raíces de *Stevia salicifolia* Cav. fue sometido a un fraccionamiento preliminar mediante cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice. Como resultado del análisis cromatográfico se obtuvieron tres conjuntos de fracciones, de baja, mediana y alta polaridad respectivamente (ver Cuadro 5.). Las fracciones poco polares 28-37 (Cuadro 5.) contenían el Dammaran-1 α , 20-diol (40). De las fracciones de mediana polaridad 87-94 fue posible aislar el estigmasterol (41). Del conjunto de fracciones de mayor polaridad se aislaron tres glicósidos, dos de tipo *ent*-atiseno y el glucósido del β -sitosterol (71). En el Cuadro 8 se resumen los rendimientos y los puntos de fusión de los compuestos aislados. La Figura 7 incluye las estructuras correspondientes.

Cuadro 8. Rendimientos y puntos de fusión de los compuestos aislados de las raíces *S. salicifolia*.

| <u>Clave</u> | <u>Compuesto</u> | <u>p.f. (°C)</u> | <u>Cantidad (g)</u> |
|--------------|------------------------------|------------------|---------------------|
| 40 | Dammaran-1 α -20-diol | 245-246 | 0.0186 |
| 41 | Estigmasterol | 145-147 | 0.0523 |
| 71 | Glucos- β -sitosterol | 243-246 | 0.0226 |
| 72 | <i>ent</i> -atiseno I* | 164-166 | 3.217 |
| 73A | <i>ent</i> -atiseno II** | 116-118 | 0.015 |

* α -L-arabinopiranosil-2',3'-diacetil- β -D-glucopiranosil (1''-M') - *ent*-11 β -ol-13-oxo-atis-16-en-19-carboxilato (72)

** α -L-arabinopiranosil- β -D-glucopiranosil (1''-M') - *ent*-11 β -ol-13-oxo-atis-16-en-19-carboxilato bajo la forma de su acetil derivado (73 A).

Los glicósidos diterpénicos del tipo *ent*-atiseno fueron caracterizados por métodos químicos y espectroscópicos. Ambos

compuestos representan nuevos productos naturales. Los esteroides y el dammarano se identificaron por comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas con los de muestras auténticas. En los Cuadros 9 al 14 se resumen las constantes físicas y espectroscópicas de los glicósidos de *ent*-atiseno aislados.

El producto natural (72), fue sometido a varias reacciones químicas durante su proceso de caracterización y los resultados fueron los siguientes:

a) La hidrólisis ácida con HCl 2N del compuesto natural (72) permitió detectar mediante análisis cromatográfico a la β -D-glucosa y α -L-arabinosa como únicos carbohidratos presentes. Los diferentes intentos por separar la aglicona correspondiente no fueron exitosos. Cabe hacer mención que también se trato de hidrolizar el glicósido en condiciones básicas y al igual que en el caso anterior los intentos fueron infructuosos.

b) La prueba de Molish para carbohidratos resultó positiva para (72).

c) El tratamiento del producto natural (72) con anhídrido acético y piridina originó el derivado heptacetilado (72A)

Se determinó la toxicidad contra *Artemia salina* Leach del extracto acetónico y los compuestos (72) y (73) como se especifico en la sección experimental, en los tres casos se encontró una dosis letal media (LC_{50}) mayor a 1000 ppm.

El producto natural (72) se evaluó como agente potencial antitumoral en siete sistemas de tumores diferentes: (a) BC 1 (Cáncer humano de mama), (b) Lu 1 (Cáncer humano de pulmón) (c) Co 12 (Cáncer humano de colón), (d) KB (Carcinoma nasofaríngeo humano), (e) P-388 (Leucemia linfoctica), (f) HT (Fibrosarcoma humano), (g) Me 12 (Melanoma humano). En todos los casos las evaluaciones se realizaron por duplicado, a cinco concentraciones

Cuadro 10. Desplazamientos químicos de RMN-¹ H (Py-d) de la α-L-arabinopiranosil-2',3'-diacetil-β-D-glucopiranosil (1" → 4')-ent-11β-ol-13-oxo-atis-16-en-19-carboxilato (72)

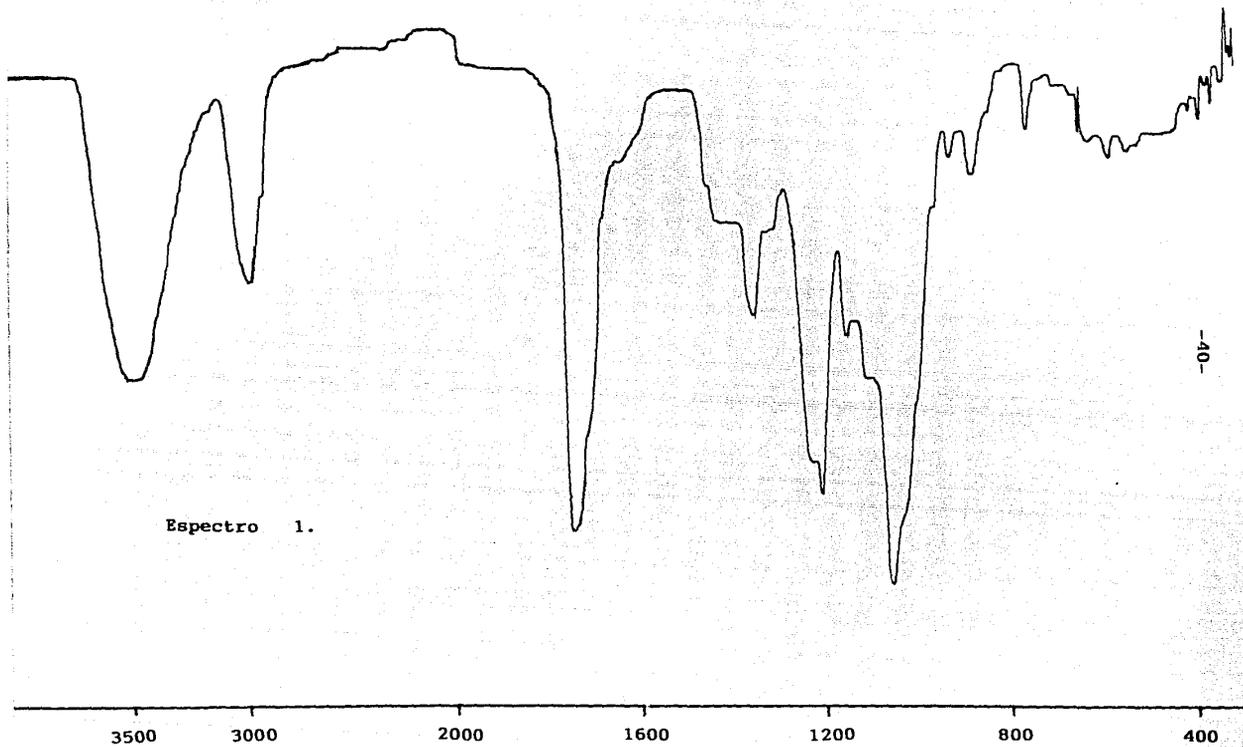
| Hidrogeno | desplazamiento químico | Hidrogeno | desplazamiento químico |
|--------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
| H-9 | 1.45 d (1) | H-3' | 5.85 dd (10, 9) |
| H-11 | 4.20-4.27 m | H-4' | 4.59 dd (10, 9) |
| H-12 | 3.53 d (3) | H-5' | 3.93 dt (9, 3) |
| H-14 _{ax} | 1.91 d (20) | H-6 _a ' | 4.20-4.27 m |
| H-14 _{ax} | 2.77 dd (19, 3) | H-6 _b ' | 4.55 dd (12, 6) |
| H-15 _{ax} | 2.37 dd (15, 2) | H-1" | 4.93 d (7) |
| H-15 _{ax} | 2.27 d (15) | H-2" | 4.35 dd (8, 8) |
| H-17 | 5.06 br s | H-3" | 4.08 dd (9, 3) |
| H-17' | 5.13 br s | H-4" | 4.20-4.27 m |
| H-20 | 0.79 s | H-5 _a " | 3.71 dd (12, 1) |
| H-1' | 6.27 d (8) | H-5 _b " | 4.20-4.27 m |
| H-2' | 5.63 dd (9, 9) | CH ₃ -C=O | 2.16 s, 2.22 s |

^a δ en ppm, J (en parentesis) en Hz. (Espectro 4).

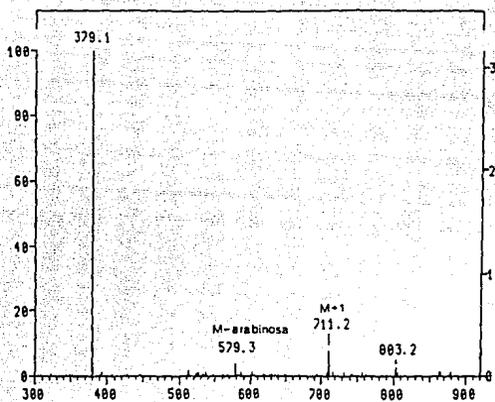
 Cuadro 11. Desplazamientos químicos de RMN-¹³C, (Py-d₅) de la α-L-arabinopiranosil-2',3'-diacetil-β-D-glucopiranosil (1'' → 4')-ent-11β-ol-13-oxo-atis-16-en-19-carboxilato (72).

| Carbono | Desplazamiento químico | Carbono | Desplazamiento químico |
|---------|------------------------|------------------------|------------------------|
| C-1 | 39.6 t | C-18 | 28.4 q |
| C-2 | 18.9 t | C-19 | 175.9 s |
| C-3 | 38.2 t | C-20 | 14.5 q |
| C-4 | 44.4 s | C-1' | 92.1 d |
| C-5 | 56.2 d | C-2' | 71.6 d |
| C-6 | 20.3 t | C-3' | 74.6 d |
| C-7 | 37.8 t | C-4' | 76.8 d |
| C-8 | 36.7 s | C-5' | 77.6 d |
| C-9 | 62.6 d | C-6' | 60.4 t |
| C-10 | 37.9 s | C-1'' | 106.2 d |
| C-11 | 68.5 d | C-2'' | 72.7 d |
| C-12 | 66.1 d | C-3'' | 74.6 d |
| C-13 | 210.5 s | C-4'' | 69.5 d |
| C-14 | 44.9 t | C-5'' | 67.6 t |
| C-15 | 46.2 t | CH ₃ -C = O | 21.0 q |
| C-16 | 139.9 s | CH ₃ -C = O | 170.1 s |
| C-17 | 113.4 t | CH ₃ -C = O | 170.5 s |

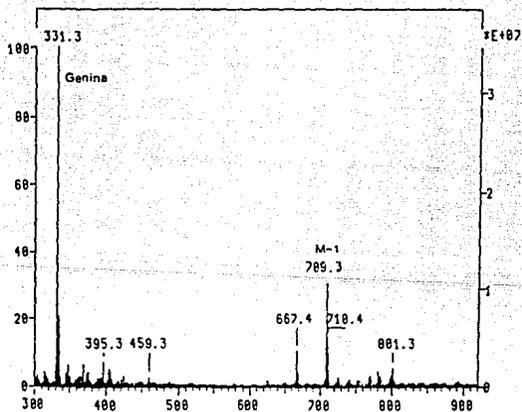
* Los desplazamientos químicos (δ) están en ppa (Espectro 5).



Espectro 2.

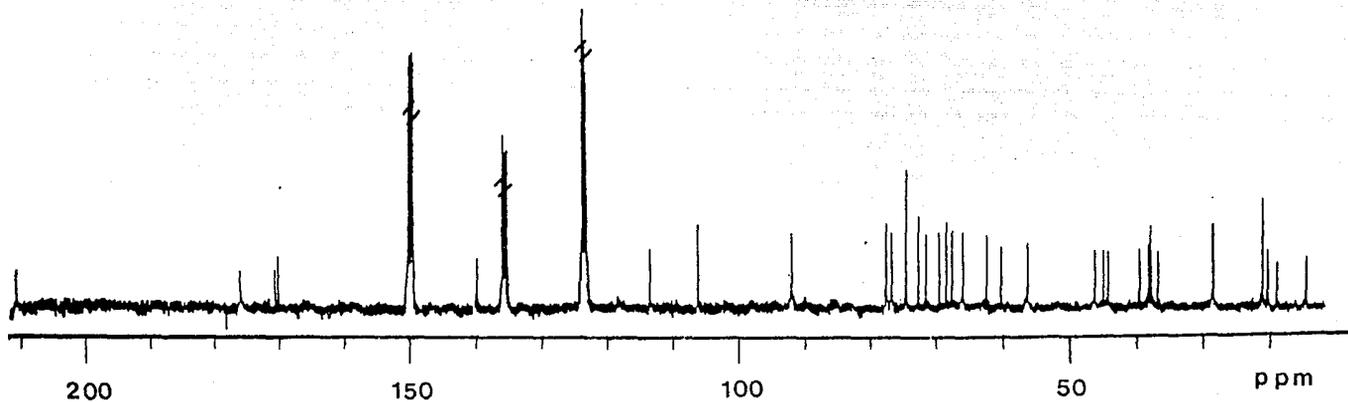
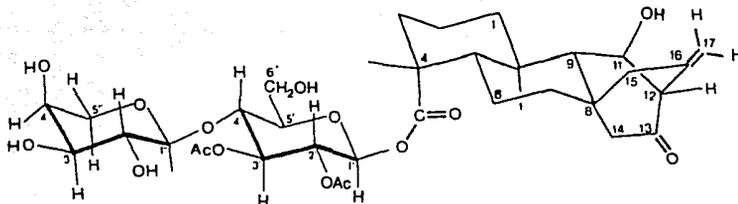


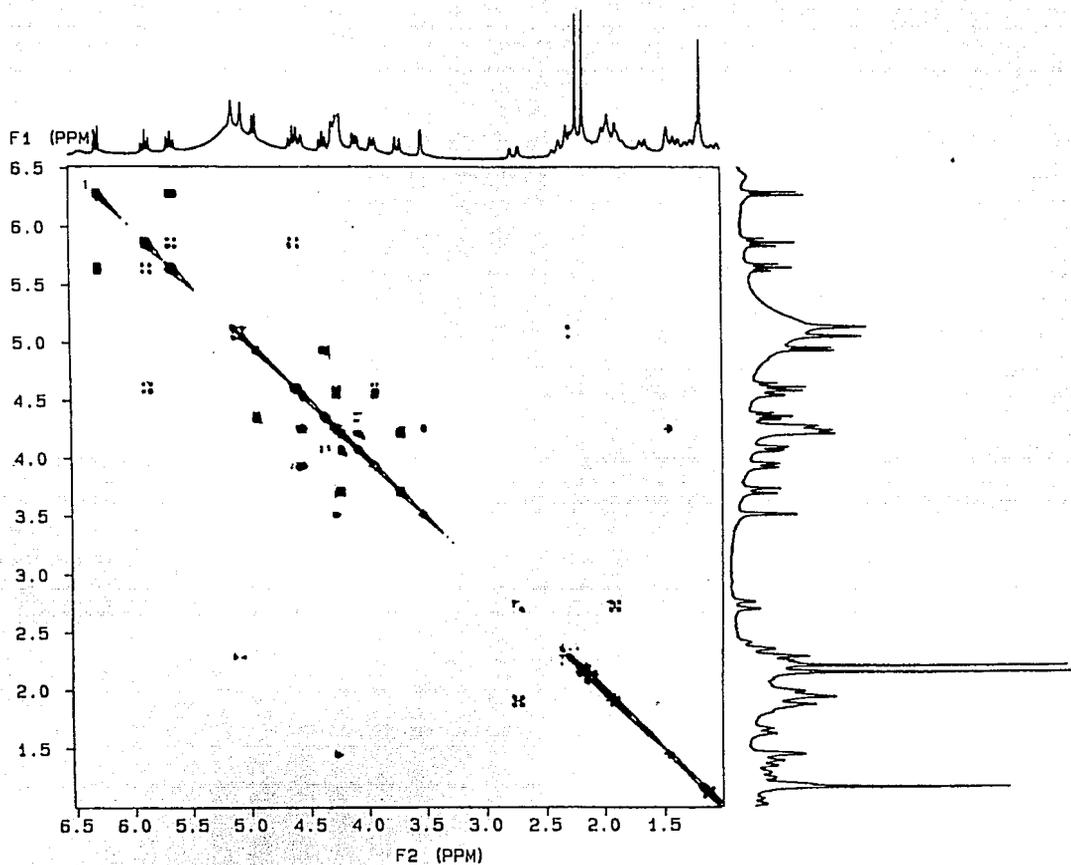
Espectro 3.



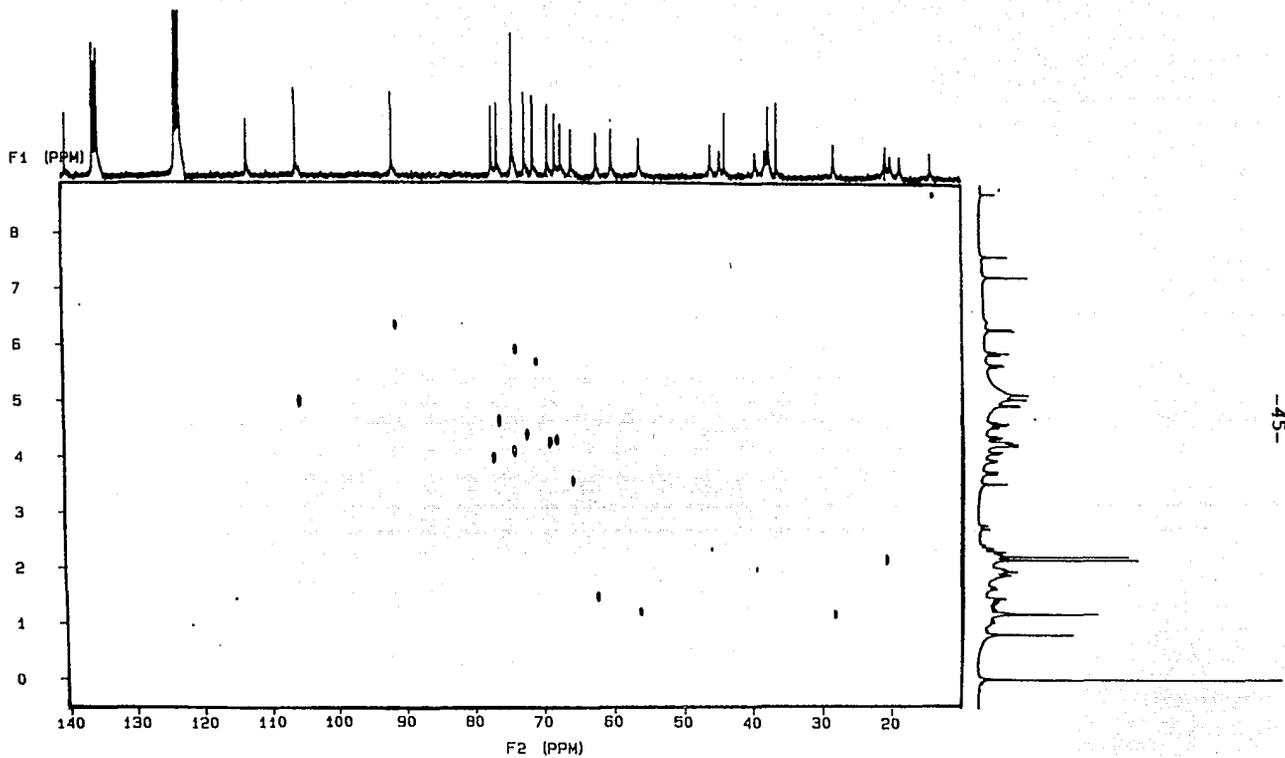
Espectro 5,

* // = Disolvente.





Espectro 7.



Espectro 8.

Cuadro 13. Desplazamientos químicos de RMN-¹H (Py-d,) de la α-L-arabinopiranosil-β-D-glucopiranosil (1" → 4')-ent-11β-ol-13-oxo-atis-16-en-19-carboxilato heptacetilado (73A).

| Hidrogeno | Desplazamiento químico | Hidrogeno | Desplazamiento químico |
|--------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
| H-9 | 1.40 d (2) | H-5' | 4.10-4.25 m |
| H-11 | 5.26 t (2) | H-6' _a | 4.45 dd (12,3) |
| H-12 | 3.65 d (3) | H-6' _b | 4.60 dd (12,6) |
| H-14 _{ax} | 1.92 d (20) | H-1" | 4.92 d (7) |
| H-14 _{ax} | 2.74 dd (20,3) | H-2" | 5.48-5.65 m |
| H-15 _{ax} | ----- | H-3" | 4.10-4.25 m |
| H-15 _{ax} | ----- | H-4" | 5.48-5.65 m |
| H-17 | 4.98 br s | H-5" _a | 3.85 dd (12,1) |
| H-17' | 5.01 br s | H-5" _b | 4.10-4.25 m |
| H-18 | 1.23 s | CH ₃ -C=O | 1.96 s |
| H-20 | 0.78 s | CH ₃ -C=O | 2.04 s |
| H-1' | 6.30 d (8) | CH ₃ -C=O | 2.08 s |
| H-2' | 5.48-5.65 m | CH ₃ -C=O | 2.12 s |
| H-3' | 5.82 dd (10,9) | CH ₃ -C=O | 2.16 s |
| H-4' | 4.10-4.27 m | CH ₃ -C=O | 2.17 s, 2.18 s |

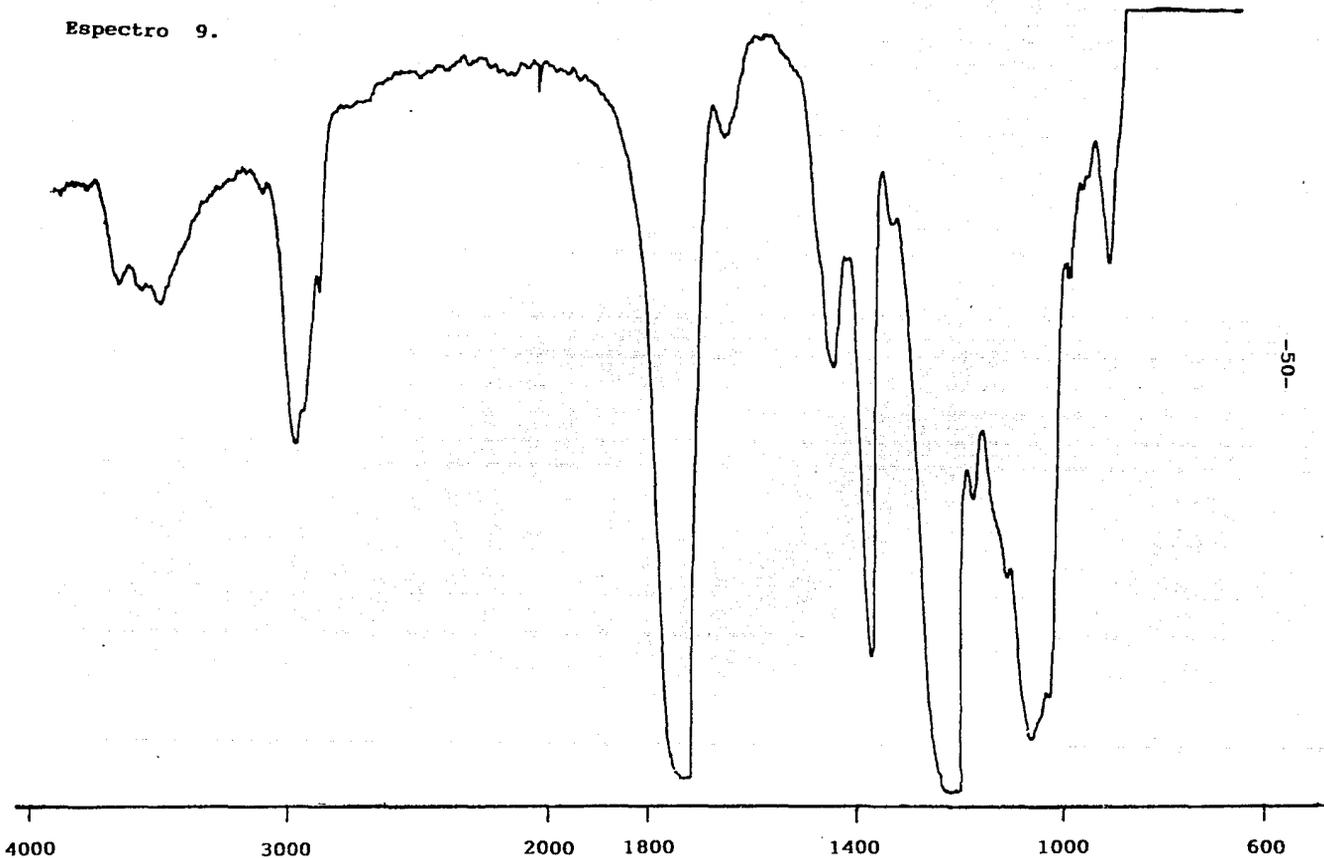
* Los desplazamientos químicos (δ) están en ppm, J (en parentesis) en Hz.

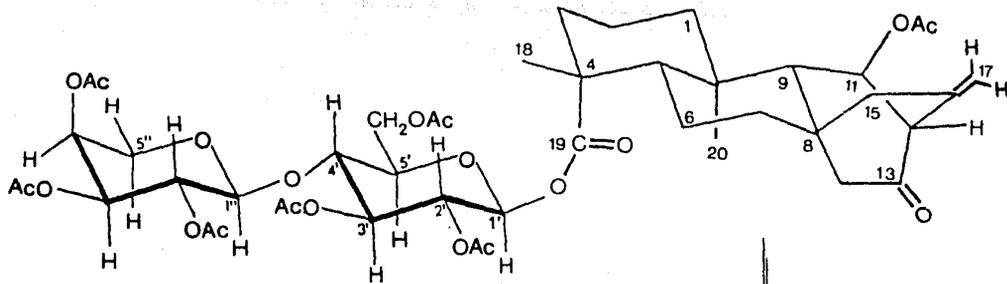
Cuadro 14. Desplazamientos químicos de RMN-¹³C, (Py-d₅) de la α-L-arabinopiranosil-β-D-glucopiranosil (1" → 4')-ent-11β-ol-13-oxo-atis-16-en-19-carboxilato heptacetilado (73A).

| Carbono | Desplazamiento químico | Carbono | Desplazamiento químico |
|---------|------------------------|------------------------|------------------------|
| C-1 | 38.5 t | C-3' | 73.4 ^a d |
| C-2 | 18.7 t | C-4' | 77.5 d |
| C-3 | 37.9 t | C-5' | 73.9 ^a d |
| C-4 | 44.2 s | C-6' | 62.5 t |
| C-5 | 55.8 d | C-1" | 102.0 d |
| C-6 | 20.8 t | C-2" | 71.1 ^a d |
| C-7 | 37.9 t | C-3" | 73.8 ^a d |
| C-8 | 36.4 s | C-4" | 70.1 ^a d |
| C-9 | 62.5 d | C-5" | 68.3 t |
| C-10 | 37.4 s | CH ₃ -C = O | 20.5 q |
| C-11 | 70.5 ^a d | CH ₃ -C = O | 20.6 q |
| C-12 | 63.9 d | CH ₃ -C = O | 20.7 q |
| C-13 | 208.2 s | CH ₃ -C = O | 20.8 q |
| C-14 | 44.9 t | CH ₃ -C = O | 20.9 q |
| C-15 | 45.6 t | CH ₃ -C = O | 21.0 q |
| C-16 | 138.4 s | CH ₃ -C = O | 170.1 s |
| C-17 | 114.0 t | CH ₃ -C = O | 170.2 s |
| C-18 | 28.5 q | CH ₃ -C = O | 170.4 s |
| C-19 | 175.5 s | CH ₃ -C = O | 170.1 s |
| C-20 | 14.3 q | CH ₃ -C = O | 170.2 s |
| C-1' | 91.6 d | CH ₃ -C = O | 169.9 s |
| C-2' | 71.3 ^a d | CH ₃ -C = O | 169.8 s |

^a Los desplazamientos químicos (δ) están en ppm. (señales intercambiables. (Espectro 11).

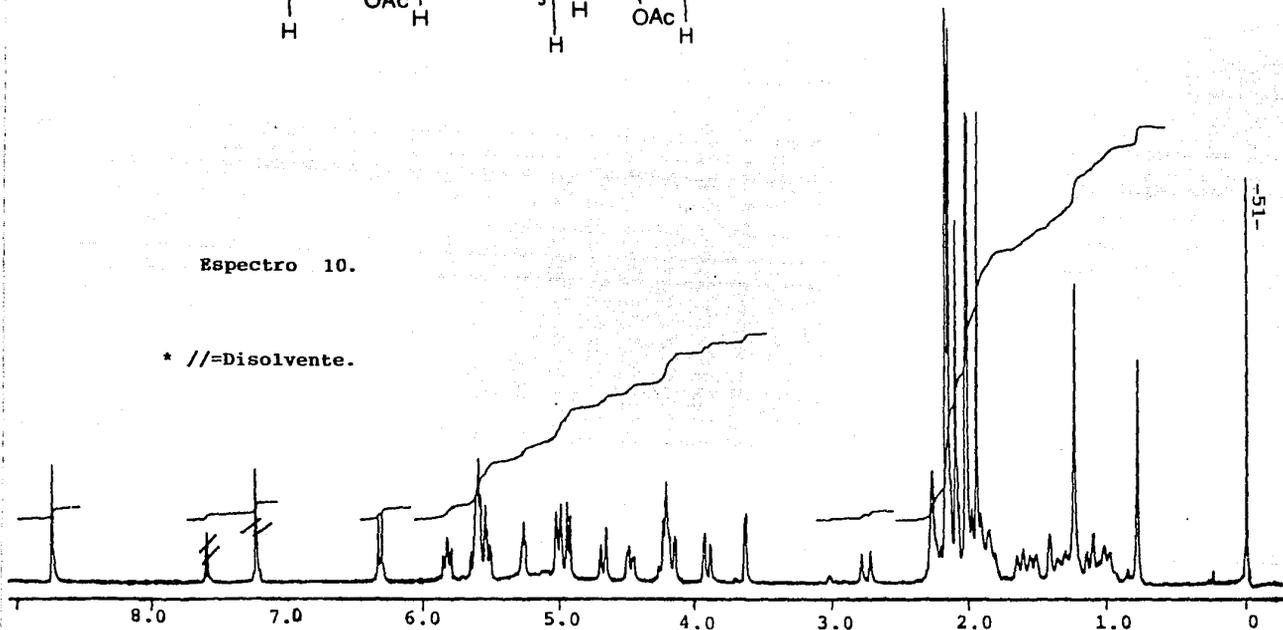
Espectro 9.

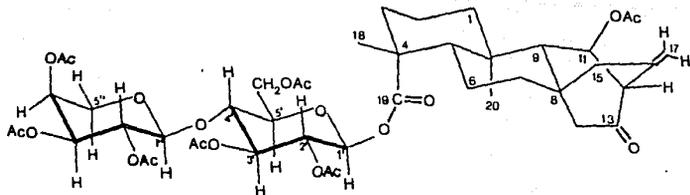




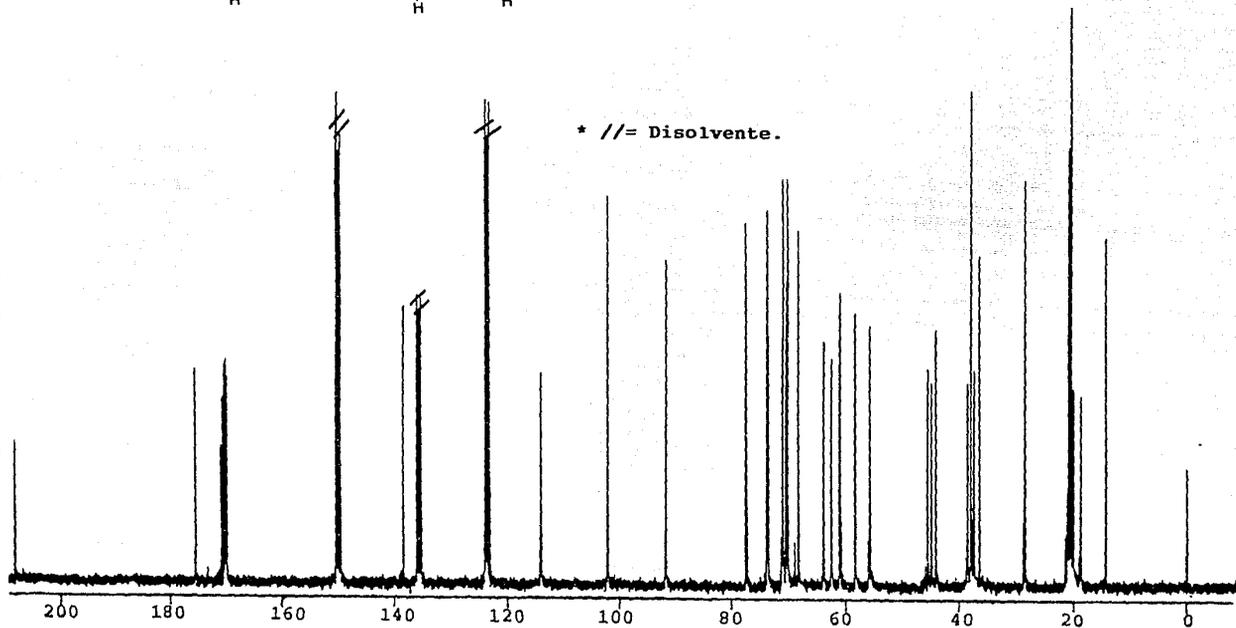
Espectro 10.

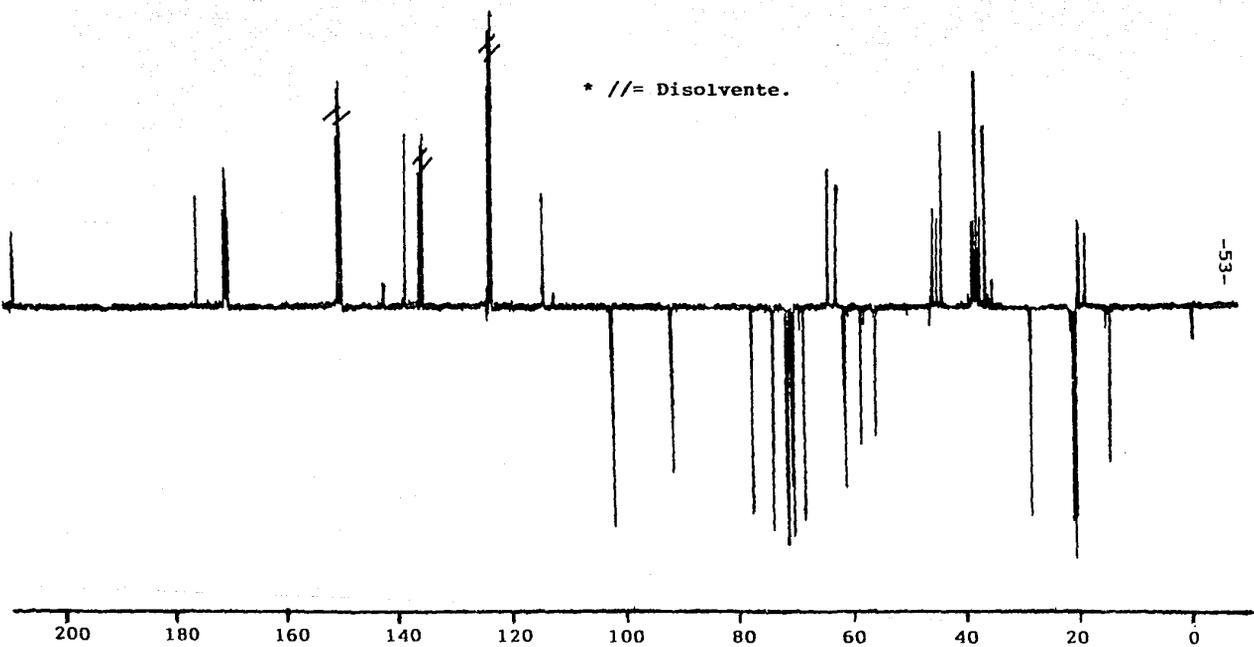
* // = Disolvente.





Espectro 11.





Espectro 12.

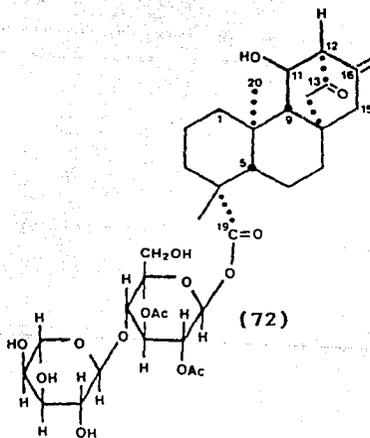
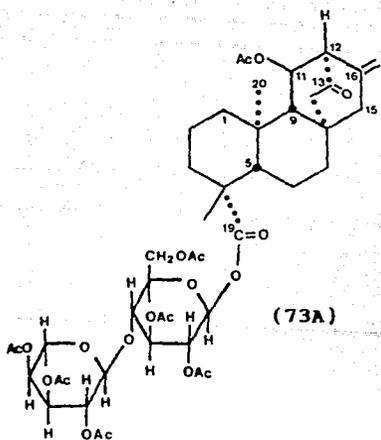
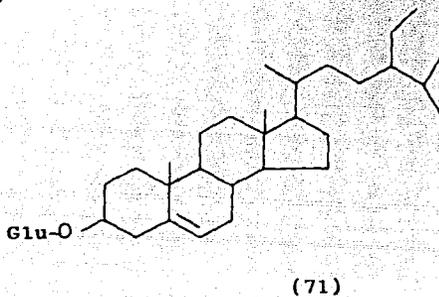
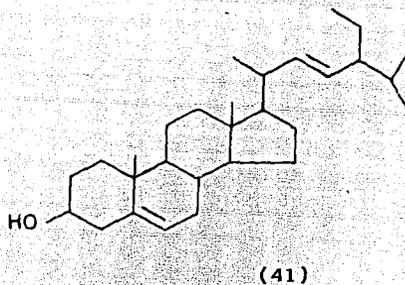
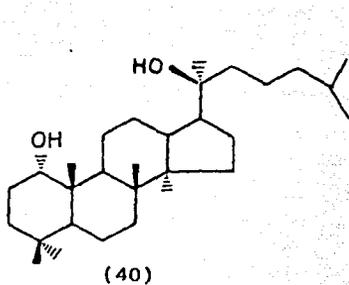


Figura 7. Estructuras correspondientes a los compuestos aislados del extracto acetónico de las raíces de Stevia salicifolia Cav.

V. DISCUSION DE LOS RESULTADOS

El *ent*- atiseno de menor polaridad se obtuvo como un sólido blanco cristalino y de sabor amargo con un p.f. de 164-166 °C; su espectro de IR presentó bandas de absorción características para grupos hidroxilo y acetato. La naturaleza glicosídica del mismo, se verificó de manera preliminar mediante la reacción positiva con el reactivo de Molish. Su fórmula molecular se estableció como $C_{30}H_{40}O_{15}$ por EM-FAB de alta resolución. La hidrólisis del compuesto en condiciones ácidas permitió la detección de glucosa y arabinosa como únicos carbohidratos.

El espectro de $RMN^{-1}H$ (Espectro 4) muestra resonancias para dos metilos (δ 0.79, 1.18) unidos a centros cuaternarios, dos acetatos (δ 2.16, 2.22), catorce hidrógenos unidos a carbonos oxigenados y entre ellos claramente se distinguen dos anoméricos (δ 6.27, 4.93). El desplazamiento paramagnético observado para uno de ellos sugiere, en principio, que el hidroxilo geminal correspondiente se encuentra formando un éster. Finalmente se aprecian señales para dos hidrógenos vinílicos en δ 5.06 y 5.13.

El espectro de $RMN^{-13}C$ (Espectro 5) muestra señales para 34 carbonos lo cual indica que dos de ellos son coincidentes de acuerdo al número de carbonos requeridos por la fórmula molecular. El análisis detallado de los espectros DEPT, APT, y, de acuerdo con las consideraciones de la teoría del desplazamiento químico permitieron discriminar las 34 señales como se muestra en el cuadro 15.

Cuadro 15. RMN - ^{13}C del $\alpha\text{-L-arabinopiranosil-2',3'-diacetil-}\beta\text{-D-glucopiranosil (1'' \rightarrow 4')-ent-11}\beta\text{-ol-13-oxo-at-16-en-19-carboxilato (72)$.

CH_2 (+): Metilenos: 39.6, 18.9, 38.2, 20.3, 37.8, 44.9, 46.2, 67.6, 113.4 ppm.

Metileno oxigenado: 60.4

CH_3 (-): Metilos: 14.5, 20.8, 21.4 y 28.4 ppm.

CH (-): Metinos: 66.1, 62.6, 56.4 ppm.

Metinos oxigenados: 106.2, 92.1, 77.6, 76.8, 74.6, 72.7, 71.6, 69.5 ppm.

-C- (+): Carbonos Cuaternarios: 139.9, 44.2, 37.9 y 36.7 ppm.

-C=O (+): Carbonilos: 210.5 (grupo ceto), 175.9 (éster), 170.5 y 170.1 (éster de acetato) ppm.

A este punto de la discusión, resulta evidente, que la molécula del producto natural corresponde a un glicósido, cuya porción sacárida consiste de dos unidades de azúcares y una de ellas debe formar un éster, con una porción ácida de la aglicona. Además, la molécula debe contener un grupo ceto, cinco grupos hidroxilo (incluidos los de los azúcares), el éster de un ácido carboxílico, dos grupos acetatos y una doble ligadura disustituida. Estos elementos estructurales, satisfacían siete de las once insaturaciones requeridas por la fórmula molecular. Y por lo tanto, la aglicona debe presentar como núcleo base una estructura tetracíclica.

En relación con la porción sacárida, el análisis de las conectividades del espectro homonuclear COSY en la zona donde resuenan los grupos metinos oxigenados permitió establecer

inequívocamente las estructuras parciales A y B, que se indican en la Figura 8.

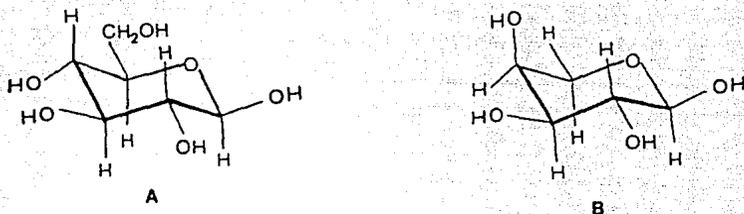


Figura 8. Estructuras parciales de la porción sacárida del compuesto (72).

Las estructuras parciales A y B se dedujeron de las conectividades que se ilustran en la Figura 9 y 10 respectivamente. Como se puede apreciar en la Figura 9 la señal doble en δ 6.77, asignable a uno de los hidrógenos anoméricos, se encuentra acoplada con una señal doble de dobles en δ 5.63, la cual se asignó entonces como el núcleo H-2'; a su vez éste interaccionaba con el doble de dobles en δ 5.85 (H-3') ($J= 10, 9\text{Hz}$), que a su vez se encuentra acoplado con una señal múltiple centrada en δ 4.59 (H-4'); Esta última señal claramente interacciona con una señal doble de triples, centrada en δ 3.93, la cual debe corresponder a H-5'. Finalmente, esta última resonancia correlacionaba con dos hidrógenos adicionales cuyas señales se encuentran, uno en el multiplete ubicado entre δ 4.20-4.27 (H₂-6') y el otro en δ 4.55 (H₁-6'). La magnitud de las constantes de acoplamiento observadas para cada una de las señales, cuya correlación, fue previamente descrita indica claramente la disposición *trans*-diaxial entre los hidrogenos H-1' y H-2', H-2' y H-3', H-3' y H-4', y H-4' y H-5'; en conclusión, el arreglo de los hidrógenos de esta porción, corresponde a los mismos de la β -D-glucosa. Cabe hacer notar que el desplazamiento paramagnético observado para las señales de los hidrógenos H-2' y H-3' indican que en estas posiciones se

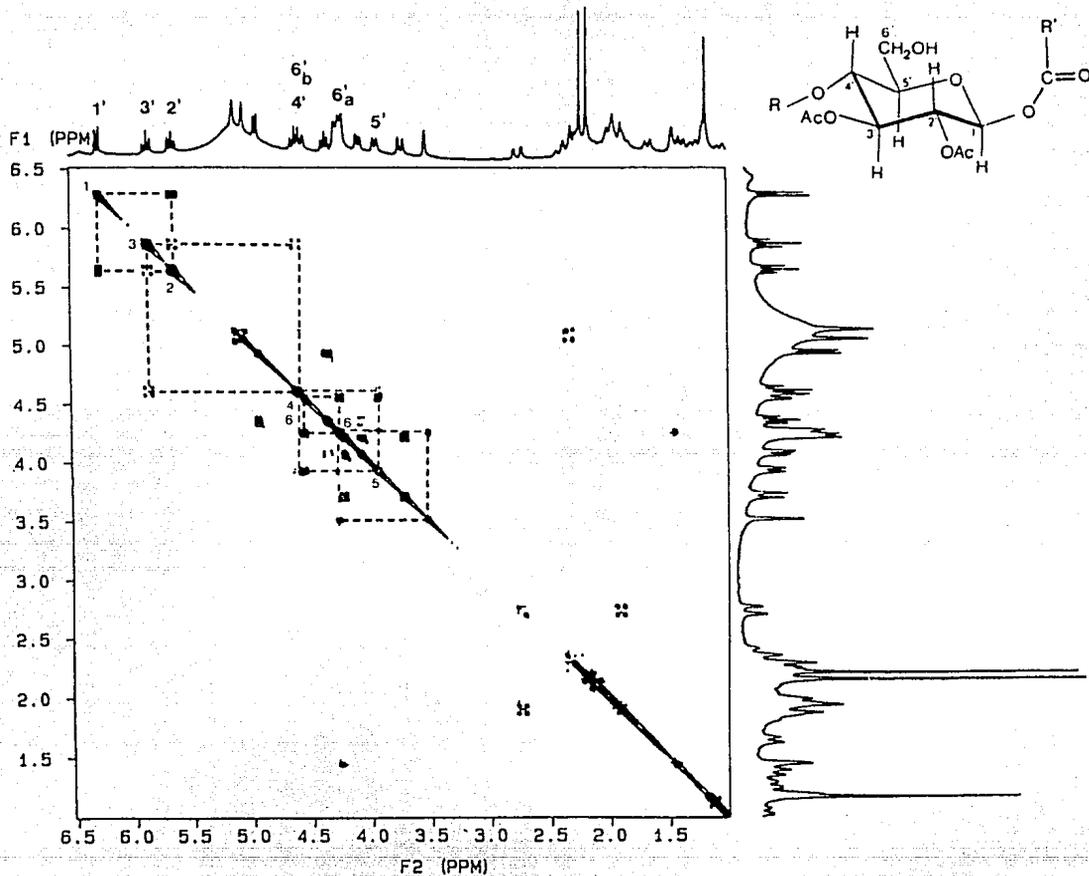


Figura 9. Análisis del espectro COSY correspondiente a la porción estructural 2',3'-diacetil- β -D-glucosa.

encuentran los dos grupos acetatos de la molécula (Yamasaki, *et al*, 1977). Por otra parte la señal asignada a H-4', también se encuentra desplazada paramagnéticamente con una magnitud tal que permitió especular que el hidroxilo de esta posición debía encontrarse comprometido en el enlace glicosídico con la otra porción sacárida de la molécula.

Por último el desplazamiento químico de H-1' (δ 6.55) era consistente con un enlace éster entre el hidroxilo anomérico y una función ácida (Yamasaki, *et al*, 1977).

Continuando con el estudio del espectro bidimensional (ver Figura 10), pero analizando las conectividades a partir del otro hidrógeno anomérico (δ 4.8 H-1'') se determinó que la otra unidad sacarida correspondía a la α -L-arabinosa (estructura parcial B).

Todos los hidrógenos asignados para los dos azúcares en el espectro COSY, pudieron correlacionarse perfectamente con diez de las señales observadas en el espectro de RMN-¹³C, como se ilustra en el espectro HETCOR (Figura 11). Los desplazamientos químicos de los carbonos a 106.2, 72.7, 74.6, 69.5 y 67.6 ppm. que correlacionaban con los hidrógenos H-1'', H-2'', H-3'', H-4'' y H-5'' en a la estructura parcial B, concordaban perfectamente con los previamente descritos para la α -L-arabinosa (Markham, C., 1982). De manera adicional se estableció inequívocamente que la señal correspondiente al C-3'' de la arabinosa era equivalente al C-3' de la glucosa. La equivalencia de estos dos carbonos confirmó que la aglicona contenía 20 átomos de carbono, y explicaba la presencia en el espectro de RMN-¹³C de tan sólo 34 señales.

Con el fin de establecer el punto de unión de los dos azúcares, se realizaron varios experimentos de tipo SINEPT. Este experimento consiste: en irradiar los hidrógenos que se encuentran a dos y tres enlaces de un determinado carbono y observar en el espectro de ¹³C la exaltación de la señal correspondiente a dicho carbono (Derome, A., 1988). En el caso

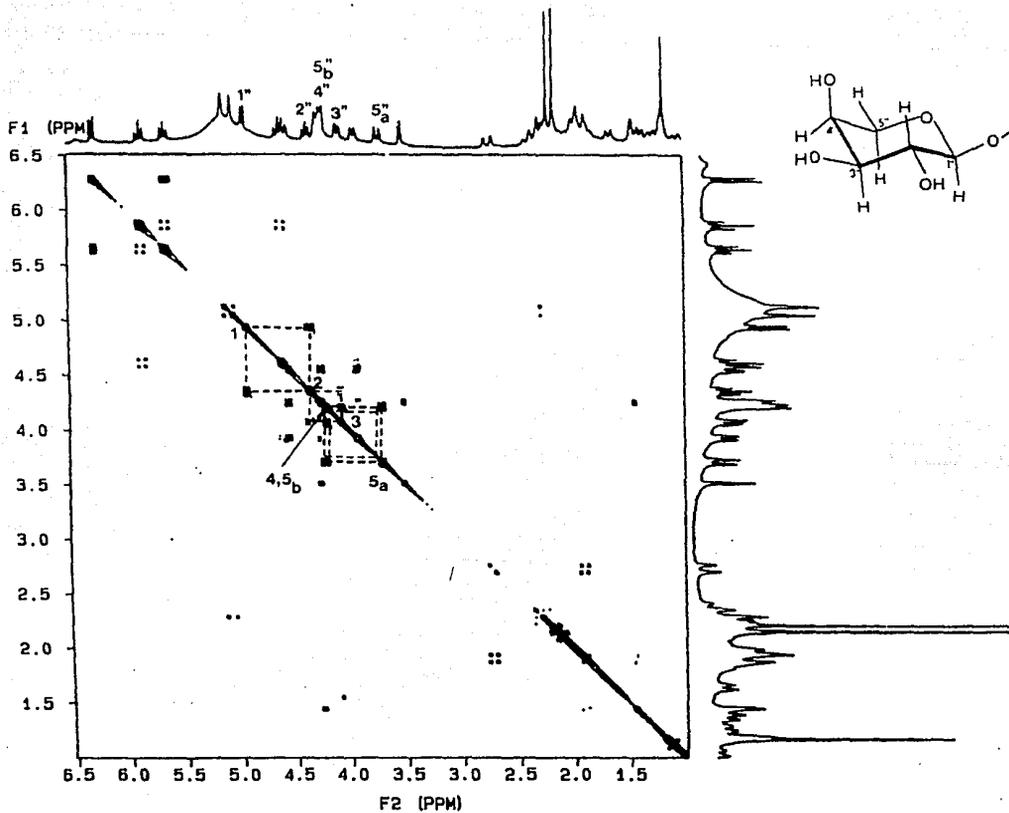


Figura 10. Análisis del espectro COSY correspondiente a la porción estructural de la α -L-arabinosa.

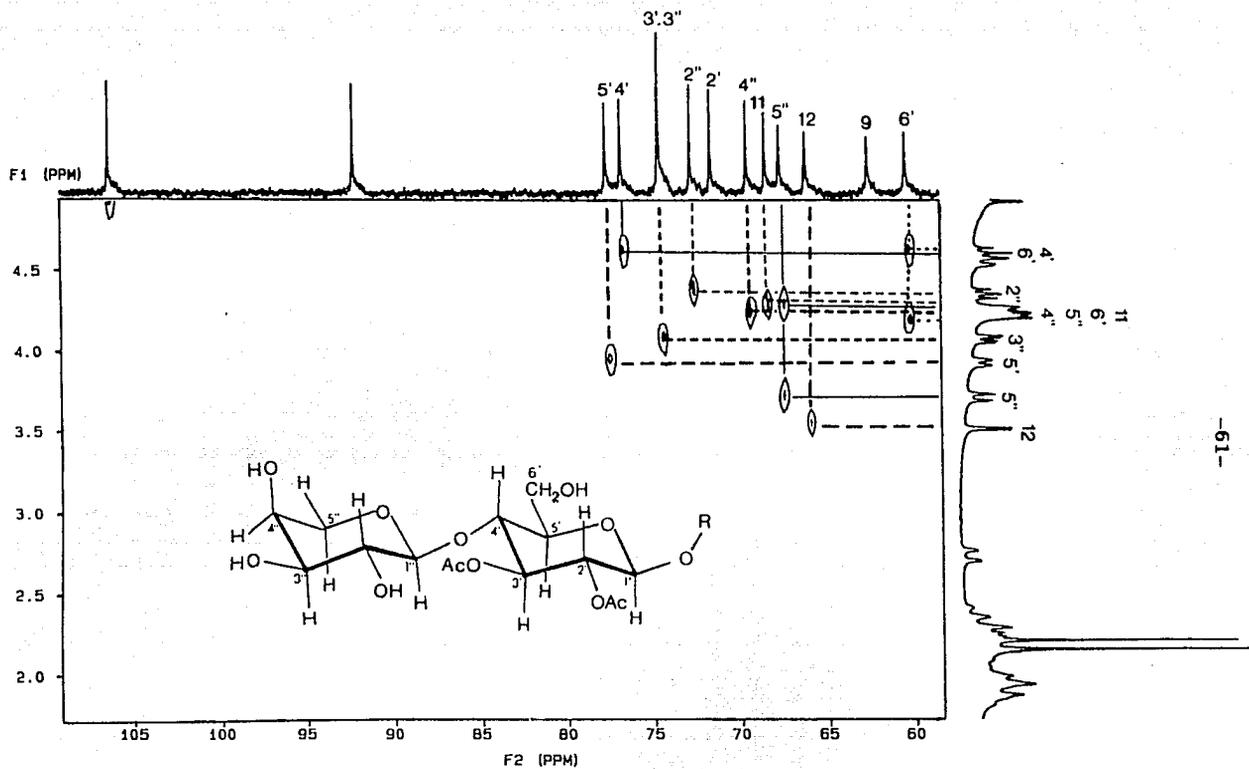


Figura 11. Espectro HETCOR del compuesto (72).

AL IRRADIAR LA SEÑAL EN 4.59 (H-4') SE EXALTO LA RESONANCIA EN 106.2 (C-1'') CORRESPONDIENTE AL CARBONO ANOMERICO DE LA ARABINOSA

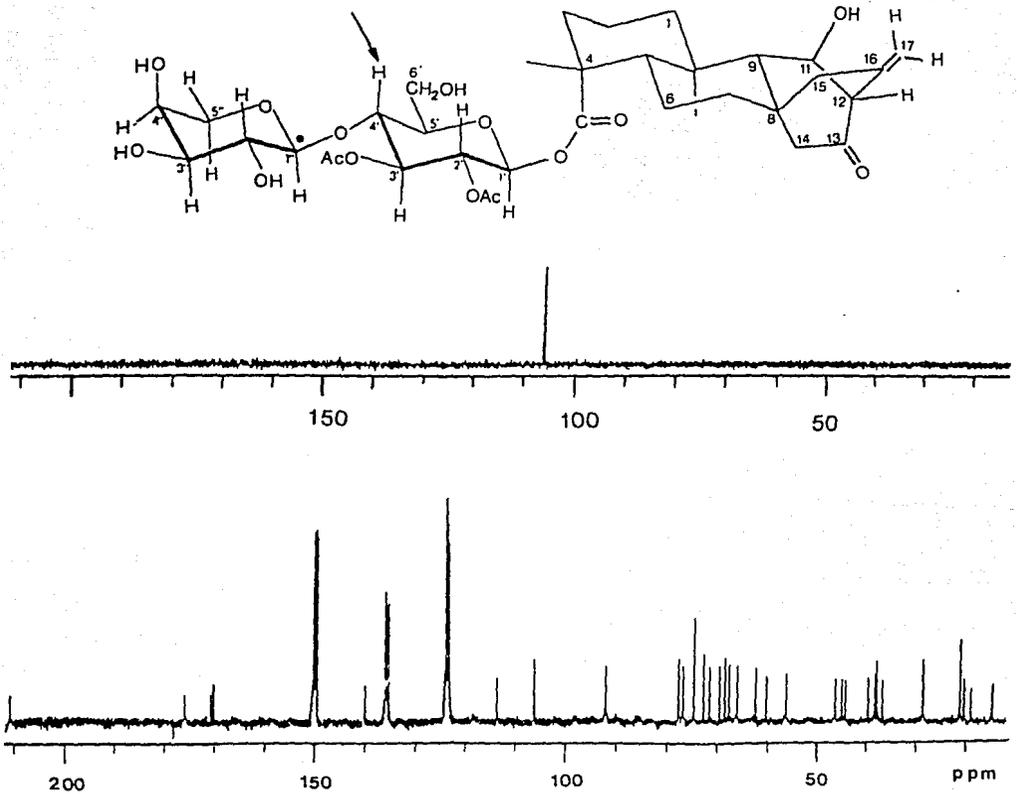


Figura 12. Experimento SINEPT.

del producto natural en estudio, al irradiar el hidrógeno H-4' de la glucosa (ver Figura 12) se observó una clara exaltación de la señal correspondiente al carbono anomérico de la arabinosa, el cual debía encontrarse a tres enlaces de H-4'. Al realizar el experimento contrario, es decir, al irradiar H-1" (δ 6.55), se exaltó la señal de C-4' de la glucosa; de los dos experimentos recién descritos era evidente que los dos azúcares se unían entre sí mediante un enlace O-glicosídico que involucraba el carbón anomérico de la arabinosa y el grupo hidroxilo C-4 de la glucosa.

También mediante el mismo tipo de experimento se comprobó que en la porción 2'y 3' de la glucosa, se encontraban los grupos acetatos ya que al irradiar la señal asignable al H-3' (ver Figura 13), se observó la exaltación del carbonilo a 170.5 asignable al correspondiente de uno de los grupos acetato. Igualmente al irradiar la señal atribuible al H-2' (ver Figura 14), se observa que no sólo se exaltó el carbono anomérico, de la glucosa (C-1') sino que también se exaltó el carbonilo del segundo grupo acetato presente en la molécula.

Finalmente, la espectrometría de masas FAB positiva permitió confirmar que la porción 2', 3'- diacetil - β - D - glucopiranososa era la que se unía directamente a la aglicona, ya que en el espectro apareció un pico a m/z 579 que correspondía al fragmento $[M + 1 - \text{arabinosa}]^+$. También se observó un pico en m/z 379 asignable al fragmento que se ilustra en la Figura 15.

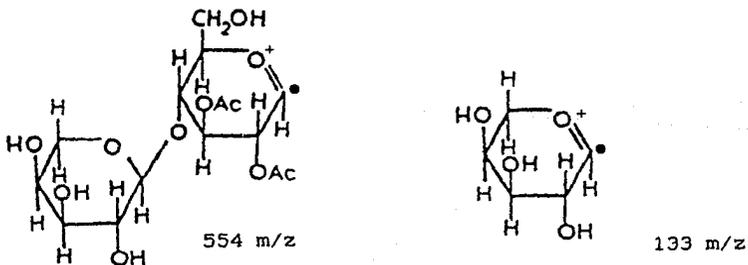


Figura 15. Algunos fragmentos de masa del compuesto (72).

AL IRRADIAR LA SEÑAL EN 5.85 (H-3') SE EXALTO LA RESONANCIA EN 170.5 CORRESPONDIENTE AL CARBONIL DE UNO DE LOS ACETATOS

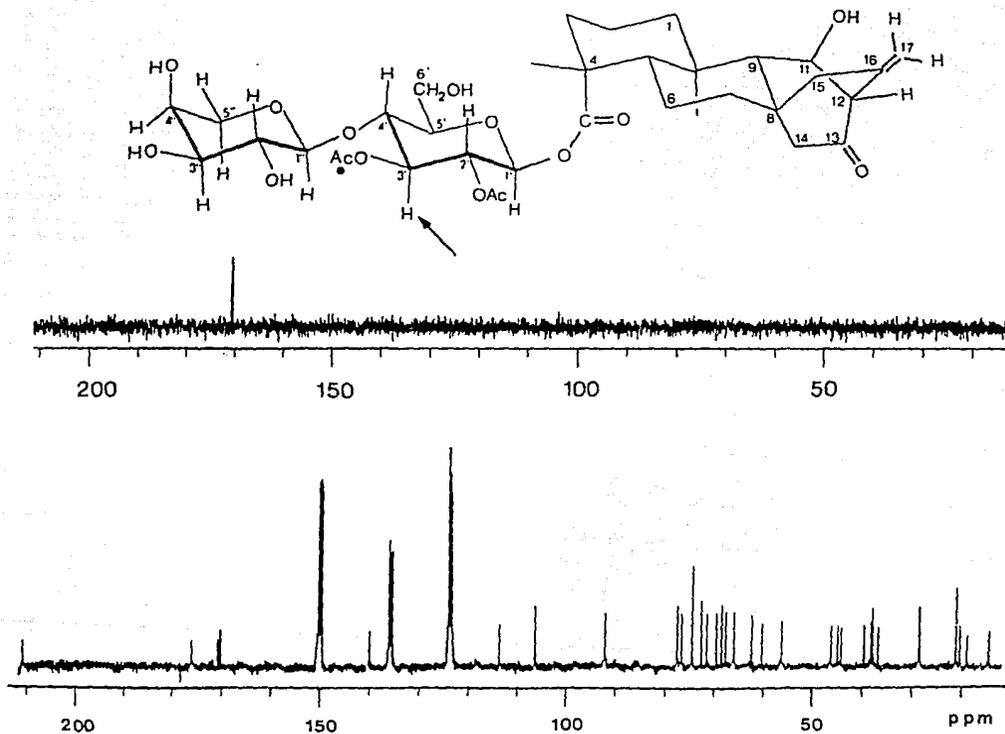


Figura 13. Experimento SINEPT.

AL IRRADIAR LA SEÑAL EN 5.63 (H-2') SE EXALTARON LAS RESONANCIAS EN 170.1 Y 92.1 (C-1') CORRESPONDIENTES AL CARBONILO DE UN ACETATO Y AL CARBONO ANOMERICO DE LA GLUCOSA, RESPECTIVAMENTE.

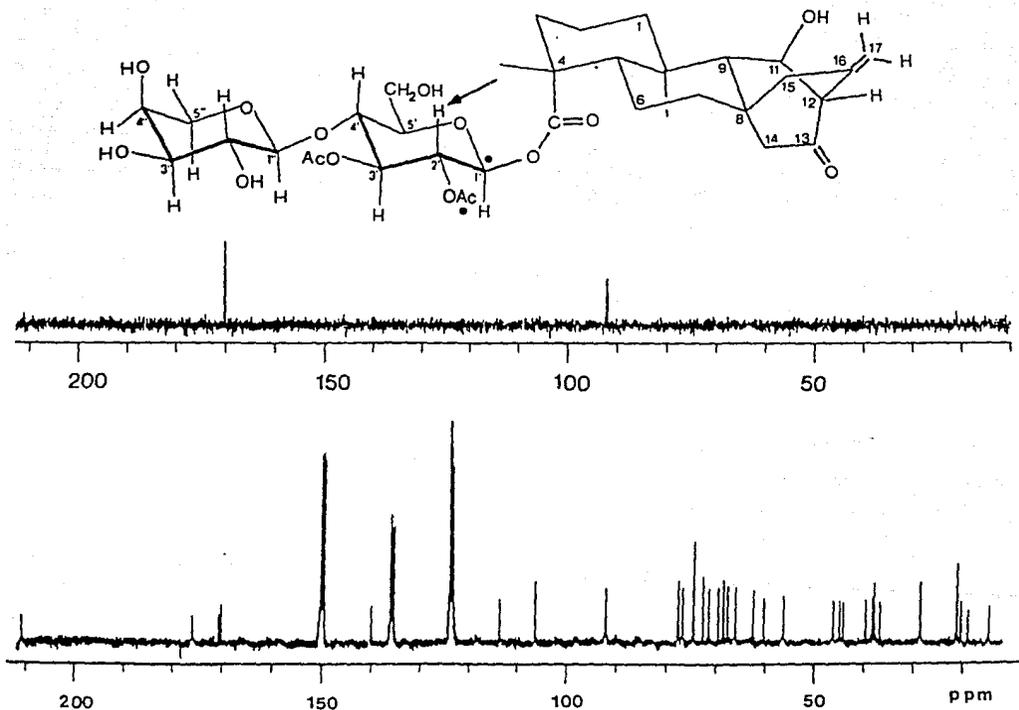


Figura 14. Experimento SINEPT.

Con base en las evidencias presentadas la parte de la glicona del glicósido natural (72) se caracterizó como el 4'-arabinopiranosil-2',3'-diacetilglucopiranososa (ver Figura 16).

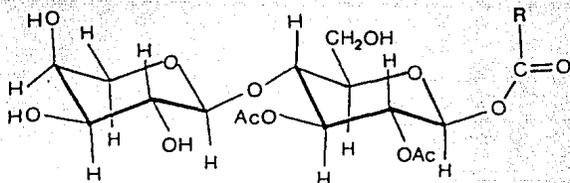


Figura 16. Porción sacárida del compuesto (72).

Con respecto a la estructura base de la aglicona tetracíclica de 20 átomos de carbono, cabe mencionar que consideraciones de tipo quimiotaxonómico sugirieron como hipótesis preliminar un esqueleto de *ent*-kaureno como el de los glicosidos descritos para *S. rebaudiana*. Sin embargo, los sistemas de espín C y D, ilustrados en la figura 17, derivados del análisis del espectro COSY permitieron inferir que el producto natural contenía un núcleo *ent*-atiseno en lugar de un *ent*-kaureno (Lal, et al, 1990).

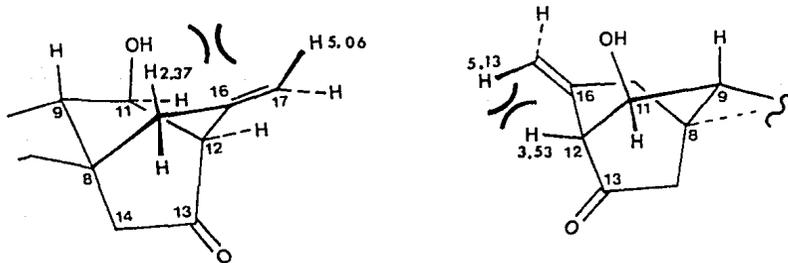


Figura 17. Sistemas espín-espín C, D derivado del análisis de espectro COSY.

Adicionalmente el espectro NOESY (ver Figura 18), que permite establecer proximidades espaciales entre dos núcleos (Lal, *et al.*, 1990), del producto natural proporcionó otra evidencia, para comprobar, la presencia de un esqueleto típico de un *ent*-atiseno. Mediante este experimento se comprobó la esperada interacción entre el H-12 y uno de los hidrógenos de la posición C-17 de un atiseno. También se comprobó que sobre el C-11 se encuentra ubicado el grupo hidroxilo ya que también se observó una interacción entre H-12 y el hidrógeno sobre el carbono de una función carbinólica que cuya señal se encuentra entre δ 4.20 - 4.27 (ver Figura 17) y que debía corresponder entonces a H-11.

Por otra parte, los experimentos de doble resonancia (ver Figura 19), verificaron la disposición vecinal de H-12 y H-11, ya que al irradiar el hidrógeno a δ 3.43 se simplificó el multiplete ubicado a δ 4.20-4.27. Por el contrario al irradiar el multiplete se simplificó el doblete a δ 3.43 y el singulete ancho a δ 1.45, asignable a H-9.

A fin de comprobar la estereoquímica del hidrógeno en el C-11, la apariencia de la señal en H-9 es de gran utilidad. Esta señal aparece como un singulete ancho, en concordancia con la disposición anticlinal ($\phi \approx 90^\circ$ - 120°) de H-9 y H-11 y la estereoquímica β del hidroxilo en C-11. Si el hidroxilo se hubiese encontrado en posición α , es decir, los hidrógenos H-11 y H-9 con una orientación *sin*-periplanar ($\phi \approx 0^\circ$), la apariencia de la señal en H-9 hubiese sido la de un doblete con una constante de acoplamiento mayor de 9 Hz.

Una vez demostrado el núcleo *ent*-atiseno y la presencia del hidroxilo en la posición 11, el siguiente paso fue ubicar la posición de la cetona. Para ello se realizaron varios experimentos de tipo SINEPT que permitieron concluir que el grupo ceto se encuentra localizado en C-13: al irradiar H-12 (δ 3.53)

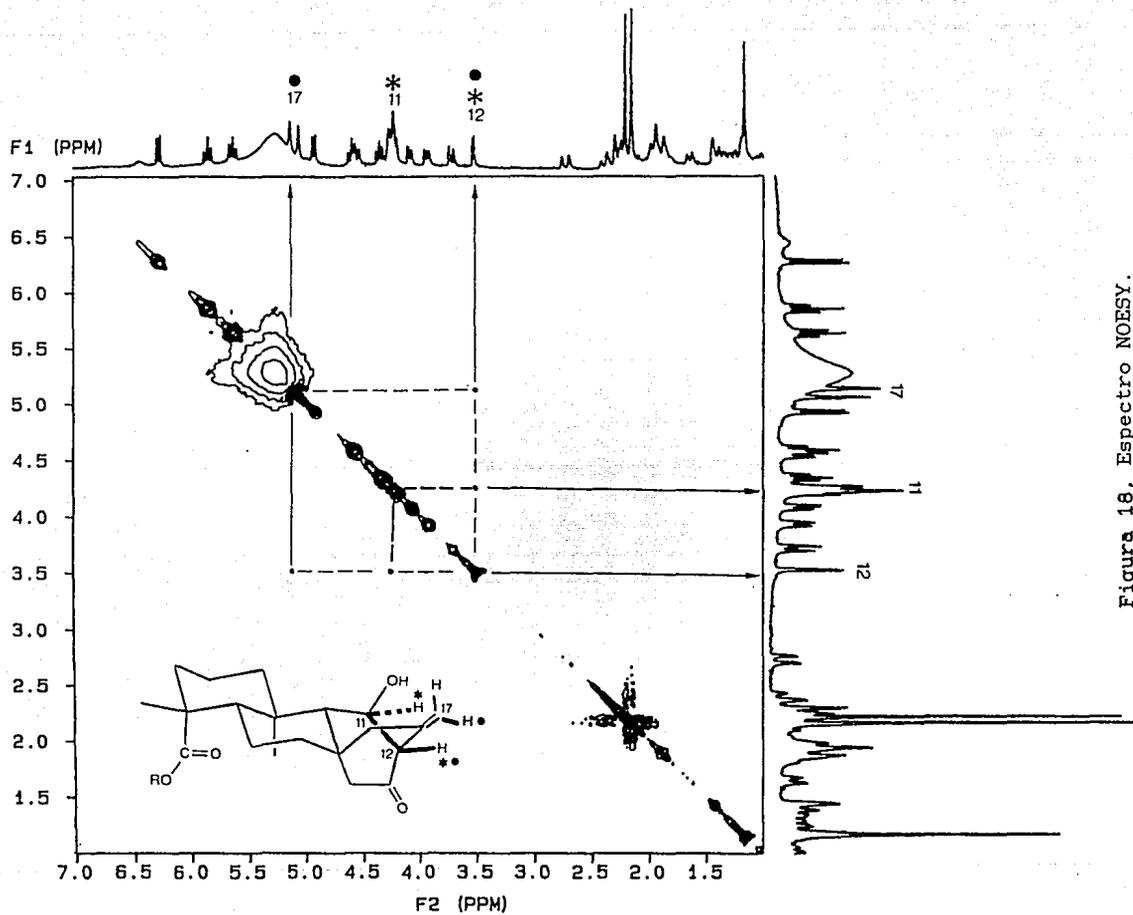
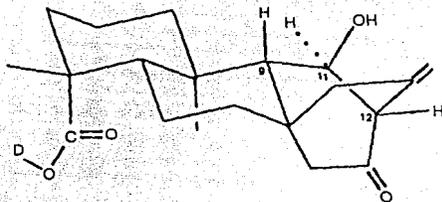
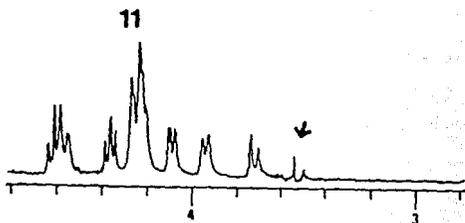
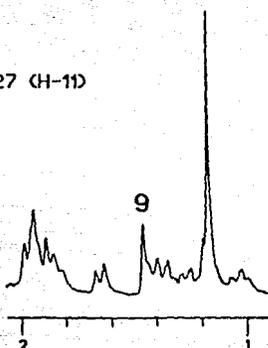
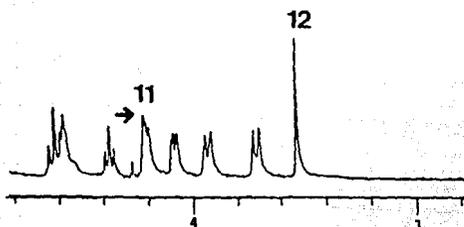


Figura 16. Espectro NOESY.

IRRADIACION DEL DOBLETE EN 3.43 (H-12)



IRRADIACION DEL MULTIPLETE EN 4.20-4.27 (H-11)



ESPECTRO NORMAL

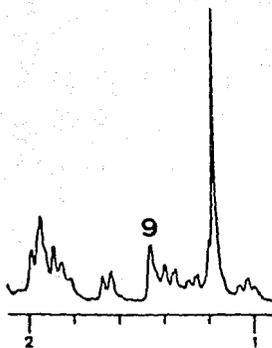
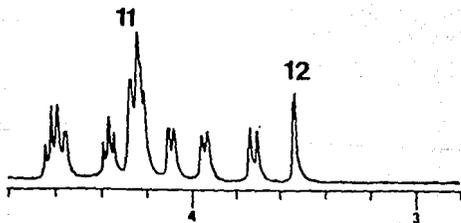


Figura 19. Experimento de doble resonancia.

LA IRRADIACION DEL DOBLETE EN 3.53 (H-12) OCASIONO LA EXALTACION DE LOS CARBONOS EN 68.5 (C-11), 62.9 (C-9) Y 210.5 (C-13).

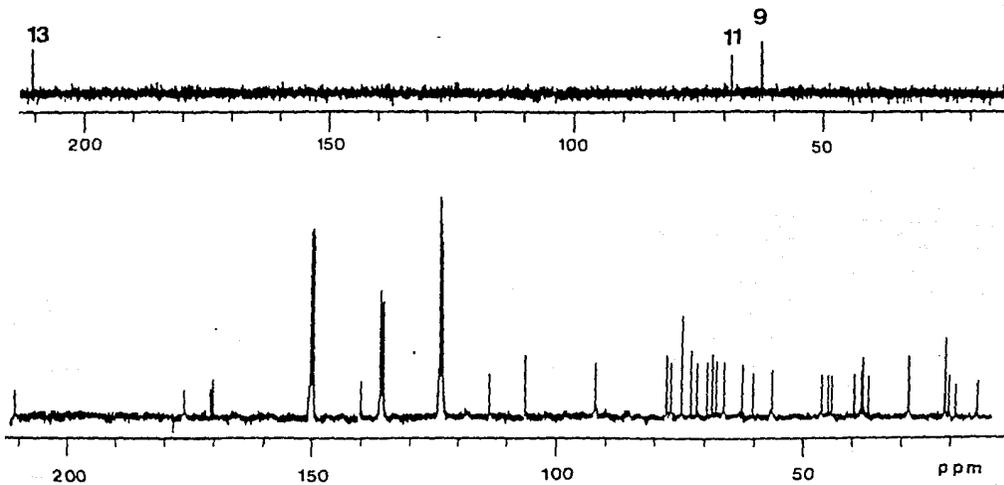
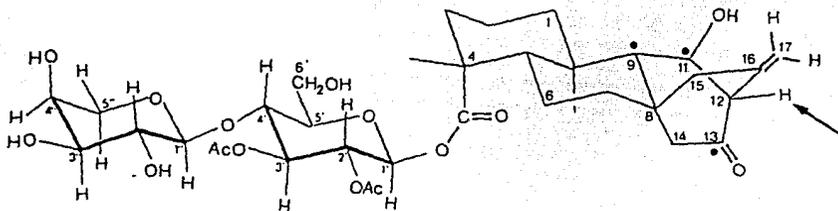


Figura 20. Experimento SINEPT.

LA IRRADIACION DEL DOBLETE CENTRADO EN 2.37 (H-15 AXIAL)
OCASIONA LA EXALTACION DE LAS RESONANCIAS EN 139.9 (C-16). 62.6
(C-9), 44.9 (C-14), 37.8 (C-7) Y 36.7 (C-8).

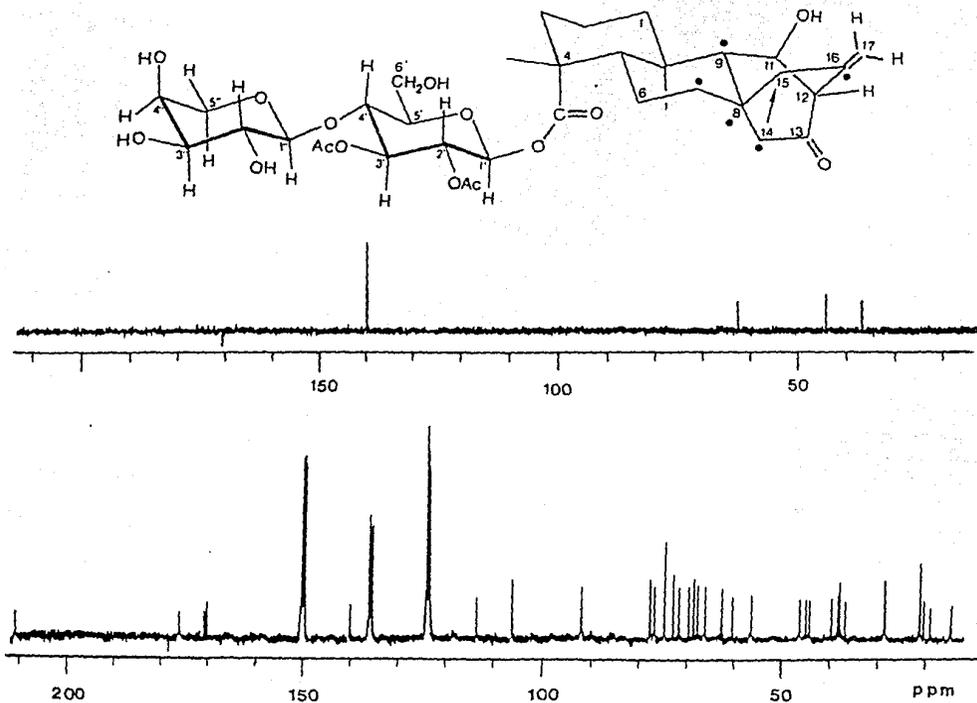


Figura 21. Experimento SINEPT.

(ver Figura 20) se exaltan las señales correspondientes a C-11 (δ 68.5), C-9 (δ 62.9) y C-13 (δ 210.5). La otra alternativa de ubicación del grupo ceto era C-14, sin embargo, esta opción quedará descartada con base en el siguiente experimento: al irradiar H-15, (ver Figura 21), se observa la exaltación de C-9, C-16, C-14, C-7 y C-8 pero no la del carbonilo de la cetona. De manera adicional, el patrón de acoplamiento de H-12 (d, $J = 3\text{Hz}$) es congruente con la presencia del grupo en C-13. Si este no hubiese sido el caso la señal de 12 hubiese aparecido como un cuarteto (Lal, *et al.*, 1990).

La ubicación del grupo carboxilo en C-19 como ya se mencionó se dedujo de los desplazamientos químicos observados en los espectros de RMN para el C-4 (δ 44.2) y el C-18 (δ 28.4), mediante la comparación con modelos estructurales apropiados eran similares a los observados para los mismos en estructuras similares. Con base en todas las evidencias antes presentadas la aglicona corresponde al *ent*-atiseno de la Figura 22 (Pinar, *et al.*, 1984; Murakami, *et al.*, 1983).

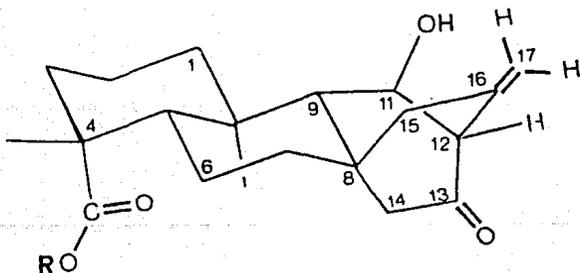


Figura 22. Estructura de la porción aglicona.

ESPECTRO SINEPT

LA IRRADIACION DEL HIDROGENO EN 6.27 (H-1') OCASIONA LA EXALTACION DEL CARBONO EN 175.9 (C-19).

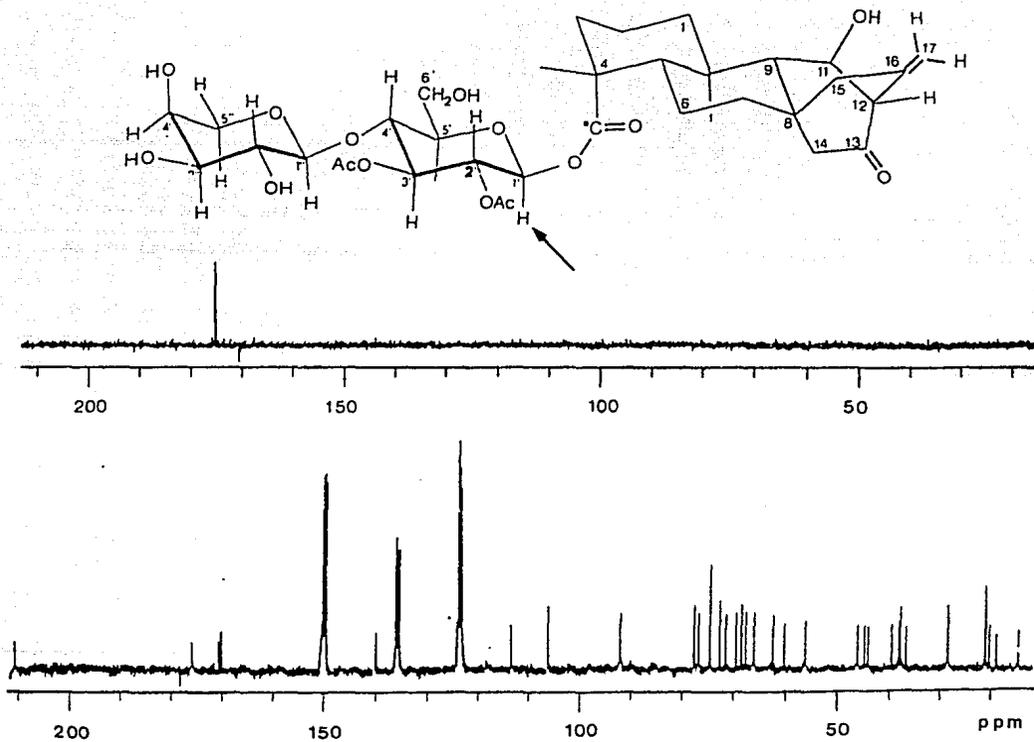


Figura 23. Experimento SINEPT

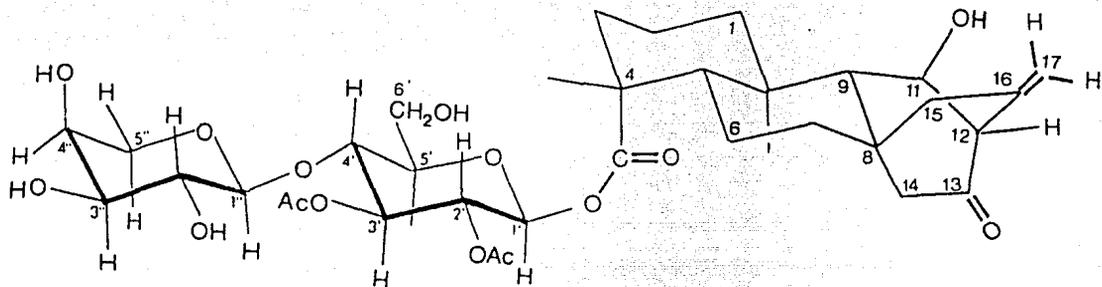


Figura 24. Estructura del α -L-arabinopiranosil-2',3'-diacetil- β -D-glucopiranosil (1'' \rightarrow 4')-*ent*-11 β -ol-13-oxo-atis-16-en-19 carboxilato (72).

Finalmente, se establece mediante un experimento SINEPT que la aglicona y la porción disacarida se encuentra unidas a través de un enlace éster, entre el carboxilo en C-19 y el hidroxilo de la glucosa. La evidencia fundamental que permite llegar a tal conclusión fue la irradiación del hidrógeno anomérico de la glucosa (δ 6.27) y la consecuente exaltación de C-19 (ver Figura 23).

En conclusión, el producto natural es caracterizado como α -L-arabinopiranosil-2',3'-diacetil- β -D-glucopiranosil (1" \rightarrow 4')-*ent*-11 β -01-13-oxo-atis-16-en-19 carboxilato (72) (ver Figura 24) el cual representa un nuevo producto natural. La naturaleza *ent* del compuesto se propone considerando que todos los atisenos aislados a la fecha pertenecen a la serie enantiomérica.

El *ent*-atiseno II (73) constituyente más polar, se obtuvo como el acetil derivado a partir de una mezcla de compuestos que se encontraban en las fracciones 326-381 de la columna original. Es importante señalar, que el compuesto se aisló bajo la forma de acetil derivado, debido a que el espectro de RMN^{-1}H de la fracción cruda indicó la ausencia de grupos acetatos en los componentes de la mezcla. A diferencia de el caso anterior, la caracterización de este segundo compuesto resultó relativamente fácil, ya que el acetil derivado obtenido era idéntico en todos los aspectos al producto de acetilación del *ent*-atiseno previamente analizado (ver figura 25). De esta manera, únicamente sería importante destacar que en el espectro de RMN^{-1}H la señal correspondiente a H-11 aparece como un triplete (J= 2 Hz.) en δ 5.26, confirmando la estereoquímica propuesta para el sustituyente oxigenado en C-11.

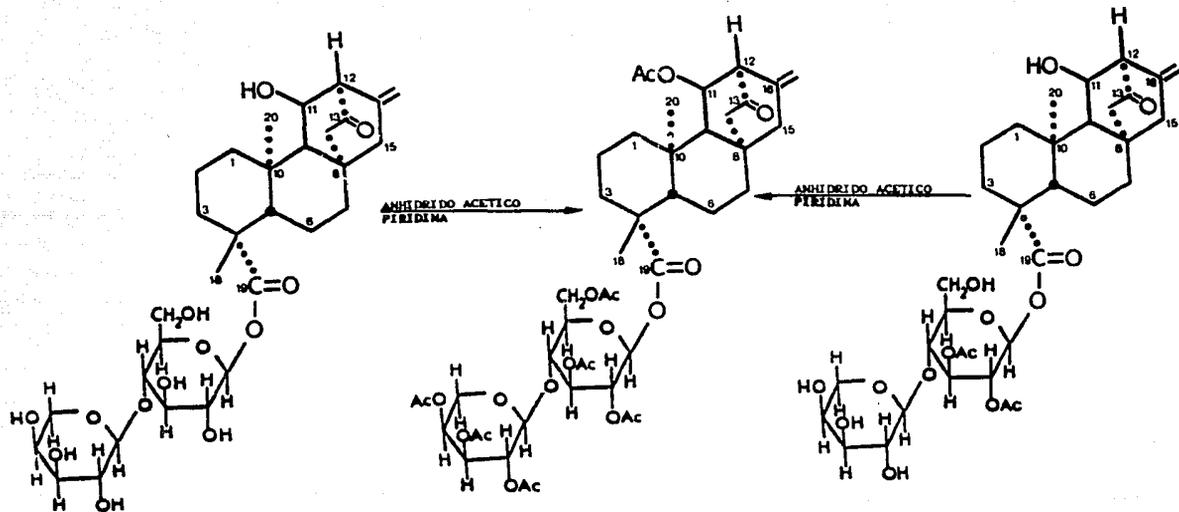


Figura 25. Correlación química.

VII. CONCLUSIONES.

1. El estudio fitoquímico convencional de las fracciones del extracto acetónico de *Stevia salicifolia* Cav. permitió el aislamiento y purificación de dos glicosidos tipo *ent*-atiseno, los cuales fueron identificados como: β -D-arabinopiranosil -2',3'- diacetil- β -D-glucopiranosil (1" \rightarrow 4') - *ent* - 11 β - ol -13- oxo- atis-16- en- 19-carboxilato (72) y el β -D-arabinopiranosil - β -D-glucopiranosil (1" \rightarrow 4') - *ent* - 11 β - ol -13- oxo- atis- 16- en- 19- carboxilato (73). La presencia de *ent*-atisenos en el género *Stevia* resulta sin precedentes.
2. El producto natural β -D-arabinopiranosil -2',3'-diacetil - β -D-glucopiranosil (1" \rightarrow 4') - *ent* - 11 β - ol -13- oxo-atis-16- en- 19- carboxilato (72) no presentó toxicidad contra *Artemia salina* (Leach). Así mismo el compuesto (72) resultó inactivo como agente potencial alelopático y antitumoral.
3. En esta investigación no se encontraron ninguno de los compuestos previamente descritos en la literatura como constituyentes de la planta. la ausencia de los mismos puede atribuirse a variaciones ontogénicas y/o a la diferencia de composición de la parte vegetal objeto de estudio.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Amriteswori, R. y Roberts, M.; *J. of Natural Products*, 46, 194 (1983).
- Amriteswori, R. y Roberts, M.; *J. of Natural Products*, 47, 559 (1984).
- Amriteswori, R. y Roberts, M.; *J. of Natural Products*, 48, 502 (1985).
- Anaya, A.; Calera, M.; Mata, R.; Pereda-Miranda, R.; *J. Chem. Ecol.*, 16(7), 2145 (1990).
- Angeles, E.; Folting, K.; Grieco, P.A.; Hoffman, J.C.; Miranda, R. y Salmón, M.; *Phytochemistry*, 21, 1804 (1982).
- Balandrin, M.; Klocke, J.; Wurtele, S.; Bollinger, H.; *Science*, 228, 1154-1160 (1985).
- Bax, A.; *J. of Magn. Reson.* 57, 314-318 (1984).
- Bennett, W.C. and R.M. Zingg; *The tarahumara—an Indian tribe of northern México*, Chicago, IL: University of Chicago Press, (1935).
- Bohlmann, F.; Zdero, C.; Shoneweiss, S.; *Chem. Ber.*, 109, 3366 (1976).
- Bohlmann, F.; Suwita, A.; Anant Natu, A. Czerson, H. y Suwita, A.; *Chem. Ber.*, 110, 3572 (1977).
- Bohlmann, F.; Dutta, L.N.; Dorner, W.; King, R.M. y Robinson, H.; *Phytochemistry*, 18, 673 (1979).

- Bohlmann, F.; Zdero, C.; King, R. y Robinson, H.; *Phytochemistry*, 21, 2021 (1982).
- Bohlmann, F.; Umemoto, K. y Jakupovic, J.; *Phytochemistry*, 24, 1017 (1985).
- Bohlmann, F.; Zdero, C.; *Liebigs Ann. Chem.*, 1974 (1985).
- Bohlmann, F.; Zdero, C.; King, R. y Harold, R.; *Liebigs Ann. Chem.*, 799 (1986).
- Bye, R.A.; Medicinal plants of the Tarahumara Indians of Chihuahua, México in Two Mummies from Chihuahua: A Multidisciplinary study, R.A. Tyson and D.V. Elerick (Eds.) San Diego, CA: San Diego Museum Paper, No. 19, 1985, pp. 77-104.
- Calderón, J.S.; Angeles, E.; Salmón, M. y García de la Mora, G.A.; *Phytochemistry*, 23, 186 (1984).
- Calderón, J.; Quijano, L.; Gómez, F. y Rios, T.; *J. of Natural Products*, 50, 522 (1986).
- Calderón, J.; Quijano, L.; Gómez-Garibay, F.; Sánchez, D.; Rios, T.; y Fronczek, F.R.; *Phytochemistry*, 26, 1747 (1987).
- Cambie, R.; Lal, A.; Rutledge, P.; Woodgate, P.; *Phytochemistry*, 30(1), 287-292 (1991).
- Crammer, B. e Ikan, R.; *Chem. Bri.*, 22, 915 (1986).
- Darise, M.; Kohda, H.; Mizutani, K.; Kasai, R. y Tanaka, O.; *Agric. Biol. Chem.*, 47, 133 (1983).
- Delgado, G.; Romo de Vivar, A.; Cárdenas, J.; Pereda-Miranda, R.; Huerta, G.; *Phytochemistry*, 23(10), 2285-2288 (1984).

- Derome, A.; Modern NMR techniques for Chemistry Research, Pergamon Press, 1988, USA.
- Díaz, José Luis, Uso de plantas medicinales de México, IMEPLANT, A.C.; México, 1976, pp. 115.
- Domínguez, X.; González, A.; Zamudio, A. y García, A.; *Phytochemistry*, 13, 2001 (1974).
- Duffield, A.M.; Recent Advances in Phytochemistry, 2, 107 (1969).
- Fujita, T.; *New Food Ind.*, 21, 16 (1979).
- Ghisalberti, E.L.; Jefferies, P.R.; y Stuart, A.D.; *Aust. J. Chem.*, 32, 1627 (1979).
- Giesbrecht, A. M.; Davino, S. C.; Barbosa, R. C.; Paula, C. R.; *J. Nat. Prod.*, 50(5), 790 (1987)
- Gil, R.; Oberti, J.; Sosa, V.; Herz, W.; *Phytochemistry*, 26, 1459 (1987).
- Helvani, C.; De Lampasona, M.; Catalán, C.; Goedken, V.; Gutierrez, A. y Herz, W.; *Phytochemistry*, 28, 1931 (1989).
- Jia, Z.; Ding, Y.; Wang, Q.; Liu, Y.; *Phytochemistry*, 29(7), 2343-2345 (1990).
- Kohda, M.; Kasai, R.; Yamasaki, K.; Murakami, K.; and Tanaka, O. *Phytochemistry*, 15, 981 (1976b).
- Kohda, M.; Tanaka, O., and Nishi, K. *Chem. Pharm. bull.* 24, 1040 (1976c).

- Kaneda, N.; Kohda, H.; Yamasaki, K.; Tanaka, O. y Nishi, K.;
Chem. Pharm. Bull., 26, 2266 (1978).
- King, R.M. y Robinson, H., *Phytologia*, 46, 446 (1980).
- Kinghorn, A.D.; Soejarto, D.D.; Nanayakkara, N.P.D.;
Compadre, C.M.; Makapugay, H.C.; Hovanec-Brown, J.M.; Medon,
P.J. y Kamath, S.K.; *J. of Natural Products*, 47, 439 (1984).
- Kinghorn, D. y Soéjarto, D.; *Economic and Medicinal Plant
Research*, Vol. 1, Academic Press Inc.; U.S.A. (1985) pp. 1.
- Kohda, H.; Kasai, R.; Yamasaki, K.; Murakami, K. y Tanaka,
O.; *Phytochemistry*, 15, 981 (1976).
- Lal, A.; Cambie, R.; Rutledge, P.; Woodgate, P.;
Phytochemistry, 29(6), 1925-1935 (1990).
- Lozoya, X.; Agilar, A.; Camacho, R.; *Rev. Méd. IMSS*, 25,
283 (1987).
- Markham, C.R.; *Techniques of flavonoid Identification*;
Academic Press Inc.; Londres, 1982.
- Medon, P.; Pezzuto, J.; Hovanec-Brown, J.; Nanayakkara, N.;
Soejarto, D.; Kamath, S. y Kinghorn, A., *Fed. Proc., Fed.
Proc., Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, 41, 1568 (1982).
- Montes, A.L.; *An. Soc. Cient. Argent*, 187, 21 (1969).
- Moraes, M.; Roque, N.; *Phytochemistry*, 27(10), 3205-3208
(1988)
- Murakami, T.; Tanaka, N.; Komazawa, Y.; Saiki, Y.; Chen,
CH.; *Chem. Pharm. Bull.*, 31(5), 1502-1504 (1983).
- Ng, A.; *Phytochemistry*, 29(2), 662-664 (1990)

- Oberti, J.; Sosa, V.; Herz, W.; Prasad, S. y Goedken, V.; *J. Org. Chem.*; 48, 4038 (1983).
- Oberti, J.; Gil, R.; Sosa, V. y Herz, W.; *Phytochemistry*, 25, 1479 (1986).
- Ortega, A.; Martínez, R.; García, C.; *Rev. Latinoamer. Quím.*, 11, 45 (1980).
- Ortega, A.; Morales, F. y Salmón, M.; *Phytochemistry*, 24, 1850 (1985).
- Pelletier, S.; *J. Nat. Prod.*; 45, 779 (1982).
- Pennington, C.W.; *The Tarahumar of México—Their environment and material culture*; Salt Lake City, UT: University of Utah Press, 1963.
- Pinar, M.; *Phytochemistry*, 23(9), 2075-2076 (1984).
- Pinar, M.; Rico, M.; Rodríguez, B.; Fernández, B.; *Phytochemistry*, 23(1), 195-196 (1984).
- Quijano, L.; Calderón, L.S.; Gómez, F.; Vega, J.L. y Rios, T.; *Phytochemistry*, 21, 1369 (1982).
- Rajbhandari, A. y Roberts, M.; *J. of Natural Products*, 48, 858 (1985).
- Rios, T.; Romo de Vivar, A. y Romo, J.; *Tetrahedron*, 23, 4265 (1967).
- Rodríguez, B.; Alemany, A.; Pinar, M.; *Tetrahedron Letter*, (33), 3069-3070 (1978).

- Román, L.U.; Hernández, J.D.; Castañeda, R.; Cerda, C.M.; y Joseph-Nathan, P.; *Phytochemistry*, 28, 265 (1989).
- Román, L.; Del Río, R.; Hernández, J.; Josep-Nathan, P.; Zabel, V.; Watson, W.; *Tetrahedron*, 37, 2769 (1981).
- Salmón, M.; Díaz, E.; y Ortega, A.; *J. Org. Chem.*, 38, 1759 (1973).
- Salmón, M.; Ortega, A. y Díaz, E.; *Rev. Latinoamer. Quím.*, 6, 45 (1975).
- Salmón, M.; Díaz, E.; y Ortega, A.; *Rev. Latinoamer. Quím.*, 8, 173 (1977).
- Salmón, M.; Ortega, A.; García de la Mora, G. y Angeles, E.; *Phytochemistry*, 22, 1512 (1983).
- Satti, N.; Suri, O.; Dhar, K.; *J. of Nat. Prod.*, 50(5), 790-793 (1987).
- Satti, N.; Suri, O.; Thaper, R. Kachroo, P.; *Phytochemistry*, 27(5), 1530-1531 (1988).
- Schmeda-Hirschmann, G.; Zedero, C. y Bohlmann, F.; *Phytochemistry*, 25, 1755 (1986).
- Shriner-Fusor-Curtin, Identificación Sistemática de Compuestos Orgánicos, Limusa, México (1980).
- Sholichin, M.; Yamasaki, K.; Miyama, R.; Yahara, S. y Tonaka, O.; *Phytochemistry*, 19, 326 (1980).
- Soejarto, D.; Kinghorn, D. y Farnsworth, N.; *J. of Natural Products*, 45, 590 (1982).

- Soejarto, D.; Compadre, C.; Medon, P.; Kamath, S.; Kinghorn, A.; *Economic Botany*, 37, 71 (1983).
- Schmitz, F.; Vanderah, D.; Hollenbeak, K.; Enwall, C.; Gopin Chad, Y.; *J. Org. Chem.*, 48, 3941-3945 (1983).
- Sosa, V.E.; Oberti, J.C.; Prasad, S. y Herz, W.; *Phytochemistry*, 23, 1515 (1984).
- Gil, R.; Oberti, J.; Gutiérrez, A.; Herz, W.; *Phytochemistry*, 29(12), 3881-3884 (1990).
- Martínez-Vázquez, M.; Gallegos, R.; Joseph-Nathan, P.; *Phytochemistry*, 29(5), 1689-1690 (1990).
- Escamilla, E.; Ortega, A.; *Phytochemistry*, 30(2), 599-602 (1991).
- Sosa, V.; Gil, R.; Oberti, J.; Kulanthaivel, P. y Herz, W.; *J. of Natural Products*, 48, 340 (1985).
- Sosa, V.; Oberti, J.; Gil, R.; Rúveda, E.; Goedken, V.; Gutiérrez, A. y Herz, W.; *Phytochemistry*, 28, 1925 (1989).
- Sthal, E.; *Thin Layer Chromatography*, Ed. Bollinger, G., Berlin (1969).
- Yamasaki, K.; Kohda, H.; Kobayashi, T.; Kasai, R. y Tanaka, O.; *Tetrahedron Letters*, (13), 1005 (1976).
- Yamasaki, K.; Kohda, H.; Kobayashi, T.; Kaneda, N.; Kasai, R.; Tanaka, O. y Nishi, K.; *Chem. Pharm. Bull.*, 25, 2895 (1977).

- Soejarto, D.; Compadre, C.; Medon, P.; kamath, S.;
Kingham, A.; *Economic Botany*, 37, 71 (1983).
- Schmitz, F.; Vanderah, D.; Hollenbeak, K.; Enwall, C.;
Gopinchad, Y.; *J. Org. Chem.*, 48, 3941-3945 (1983).
- Sosa, V.; Gil, R.; Oberti, J.; Kulanthaivel, P. y Herz, W.;
los *J. of Natural Products*, 48, 340 (1985).
- Sosa, V.; Oberti, J.; Gil, R.; Rúveda, E.; Goedken, V.;
Gutiérrez, A. y Herz, W.; *Phytochemistry*, 28, 1925 (1989).
- Sthal, E.; *Thin Layer Chromatography.*, Ed. Bollinger, G.,
Berlin (1969).
- Sosa, V.E.; Oberti, J.C.; Prasad, S. y Herz, W.;
Phytochemistry, 23, 1515 (1984).
- Yamasaki, K.; Kohda, H.; Kobayashi, T.; Kasai, R. y
Tanaka, O.; *Tetrahedron Letters*, (13), 1005 (1976).
- Yamasaki, K.; Kohda, H.; Kobayashi, T.; Kaneda, N.; Kasai,
R.; Tanaka, O. y Nishi, K.; *Chem. Pharm. Bull.*, 25, 2895
(1977).
- Zdero, C.; Bohlmann, F. y Schmeda-Hirschmann, G.;
Phytochemistry, 26, 463 (1987).
- Zdero, C.; Bohlmann, F.; Niemeyer, H.; *Phytochemistry*,
30(2), 693-695 (1991).
- Zhi-Da, M.; Bing, W.; Qi-Tai, Z.; Mizuno, M.; Iinuma, M.;
Tanaka, T.; *Phytochemistry*, 29(12), 3952-3953 (1990).

ADDENDUM BIBLIOGRAFICO

- Blaskó, G.; Shieh, H.; Pezzuto, J.; Cordell, G.; *J. Nat. Prod.*, **52**, 1363 (1989).
- Escamilla, E.; Ortega, A.; *Phytochemistry*, **30**(2), 599-602 (1991).
- Geran, R.; Greenberg, Mc. Donala, M. Schumacher, A. Abbot, B.; *Cancer Chemother.*, **3**(3), 1 (1972).
- Gil, R.; Oberti, J.; Gutiérrez, A.; Herz, W.; *Phytochemistry*, **29**(12), 3881-3884 (1990).
- Martínez-Vázquez, M.; Gallegos, R.; Joseph-Nathan, P.; *Phytochemistry*, **29**(5), 1689-1690 (1990).