

Nº 105
2ES.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



CARRERAS PROFESIONALES
DE LA FACULTAD DE QUIMICA

"ESTUDIO QUIMICO DE STEVIA LAXIFLORA"

T E S I S

Que para obtener el Titulo de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a
PATRICIA MONDRAGON ROBLES

México, D.F. Agosto de 1992

FALLA DE ORIGEN



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.

I N D I C E

	Página
INTRODUCCION	1
GENERALIDADES	4
RESULTADOS Y DISCUSION	13
PARTE EXPERIMENTAL	29
BIBLIOGRAFIA	38
ESPECTROS	45

INTRODUCCION

No sólo en la alimentación las plantas y las flores han jugado un papel importante en la vida de los mexicanos, desde los tiempos prehispánicos hasta el presente, ya los conquistadores españoles escribían sobre sus valores y magnificencias, tentando a los botánicos del viejo mundo a estudiar yerbas y plantas ¹. Actualmente es innegable la existencia de una medicina popular eminentemente herbolaria como una realidad cultural que requiere ser estudiada y valorada. La respuesta a tal circunstancia ha sido un "retorno" a los aspectos naturales del hábitat; por lo que las grandes industrias farmacéuticas han desviado recursos destinados a la obtención de fármacos sintéticos, para dedicarlos a iniciar una "nueva era", la de los medicamentos naturales; promoviendo un adecuado desarrollo de los estudios científicos tendientes a impulsar un nuevo y diferente aprovechamiento de nuestros recursos. Por lo que no es raro que los ya olvidados curanderos, brujos y herbolarios, vuelvan a recibir la visita de los exploradores científicos que hurgan en sus costumbres y tradiciones, colectando científicamente la flora medicinal de los pueblos "atrasados".

Hoy en día no menos de 100 principios activos de estructura definida derivados de plantas, son usados en el mundo; menos de la mitad de estos son aceptados como fármacos de uso generalizado y aún es más importante que menos de 10 de estas drogas, como la atropina, digitoxina, morfina, etc., son producidas comercialmente por síntesis ².

Así, las plantas permanecen como fuente potencial innagotable de componentes activos, cuyo estudio además puede ayudar a comprender los procesos químicos y

biológicos que ocurren en ellas. Esto requerirá sin embargo una colaboración multidisciplinaria, buena planeación, creatividad, dedicación, tacto y una gran paciencia.

En sí, el presente trabajo: "Estudio químico de *Stevia laxiflora* " pretende contribuir al conocimiento de los metabolitos secundarios presentes en la vegetación de nuestro país, recurriendo al uso de métodos químicos, espectroscópicos y espectrométricos.

GENERALIDADES

La familia Compositae o Asteraceae ha atraído la atención por su abundancia y diversidad, ya que alberga cerca de 20 000 especies. Debido a ello ha tenido que ser dividida en trece tribus, para así facilitar su estudio.

Dentro de estas, la tribu Eupatorieae se divide en 19 grupos o subtribus, abarcando 2 000 especies dentro de 160 géneros ³. En especial la subtribu que nos interesa es la Piqueriinae, pues dentro de ella se encuentra el género *Stevia*, típicamente americano. A su vez éste presenta tres subdivisiones de acuerdo a su situación geográfica (Podocephalae, Corymbosae y Fruticosae). Este género se aloja en los climas tropicales y subtropicales de América, albergando entre 150 y 300 especies, siendo aproximadamente 70 de estas originarias de México ⁴.

Uno de los procedimientos que ayuda a la clasificación de las especies y que va tomando mayor importancia es la quimiotaxonomía, la cual se basa en la presencia de ciertos metabolitos secundarios como posibles marcadores para caracterizar tribus, géneros y en ocasiones hasta especies.

No podían quedar exentas las compuestas, las que producen una amplia gama de metabolitos secundarios entre los que se encuentran sustancias terpenoides, particularmente lactonas sesquiterpénicas cuyo aislamiento ha contribuido a esclarecer su taxonomía ⁵.

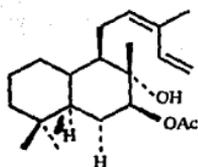
Estas moléculas constan de quince átomos de carbono y se ha propuesto un esquema biosintético para su formación a través de la condensación de tres unidades de isopreno con subsecuentes ciclizaciones y transformaciones oxidativas para formar un

anillo de lactona cis o trans ⁶. Estas sustancias han despertado interés debido a que gran número de ellas presenta cierta actividad biológica como anticancerígenos, inhibidoras del crecimiento microbiano y vegetal, etc. ⁷.

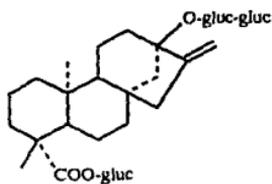
Con el descubrimiento de glucósidos diterpénicos con intenso poder edulcorante en *Stevia rebaudiana* Bertoni (Paraguay) se intensificó el estudio de otros representantes de este género americano, que aunque se encuentra bien definido morfológicamente, químicamente es completamente heterogéneo, como lo demuestra la gran variedad de sustancias que han aparecido desde entonces en diversas especies, como los diterpenos del tipo labdano (1) ¹⁹, kaurano (2) ³⁹ y clerodano (3) ¹⁷; lactonas sesquiterpénicas del tipo guayano (4) ¹¹, germacrano (5,6,7) ^{12,13,14}, pseudoguayano (8) ¹⁶, xanthano (9) ¹⁶, eudesmano (10) ²⁷, elemmano (11) ²⁷ y cremofilano (12) ²⁷; así como sesquiterpenos derivados del longipineno (13) ¹⁸ y del bisaboleno (14) ¹⁹; además de derivados del cromeno (15) ¹⁰ y flavonoides (16) ²⁰.

Siendo las lactonas sesquiterpénicas los característicos metabolitos secundarios de muchos géneros de la tribu Eupatorieae, se ha encontrado que están presentes en sólo 16 de las 42 especies de *Stevia* estudiadas. Las del tipo guayano se encuentran en sólo 13 de estas. (Tabla 1)

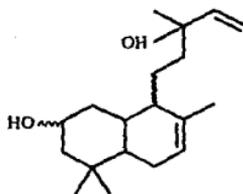
DITERPENOS



(1)¹⁹
(tipo labdano)

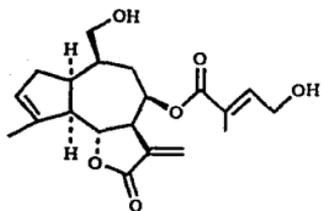


Steviósido (2)³⁹
(tipo kaureno)

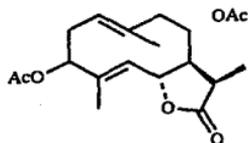


Salicifoliol (3)¹⁷
(tipo clerodano)

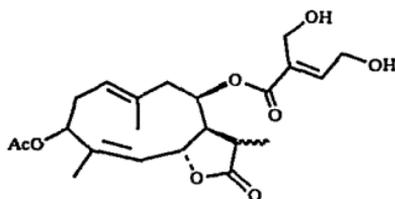
LACTONAS SESQUITERPENICAS



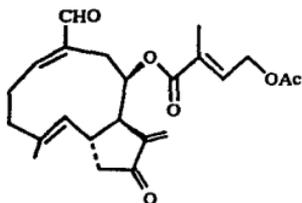
Breviarólida (4)¹¹
(tipo guayano)



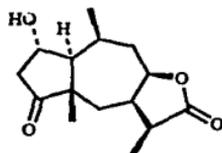
Carmelina (5)¹²
(tipo germacrano)



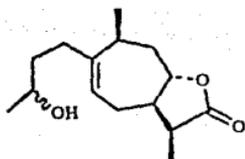
(6)¹³
(tipo heliangólida)



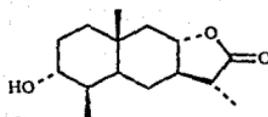
(7)¹⁴
(tipo melampólida)



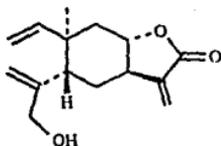
Stevina (8)¹⁶
(tipo pseudoguayano)



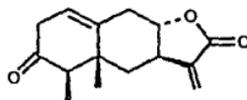
(9)¹⁶
(tipo xanthano)



(10)²⁷
(tipo cudesmano)

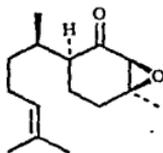


(11)²⁷
(tipo clemano)

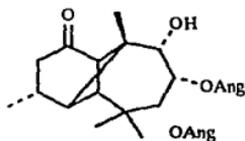


(12)²⁷
(tipo cremofilano)

SESQUITERPENOS

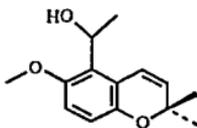


(14)¹⁹
(tipo bisabolano)

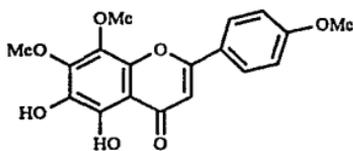


Rastviona (13)¹⁸
(tipo longipinano)

DERIVADOS DEL CROMENO

(15)²⁷

FLAVONAS

(16)²⁰

RESULTADOS

Y

DISCUSION

Sucesivas separaciones por cromatografía en columna de los extractos hexánico y acetónico de *Stevia laxiflora* dieron como resultado el aislamiento de siete metabolitos secundarios, siendo caracterizados como: un esteroles, dos flavonas y cuatro lactonas sesquiterpénicas. Tres de las lactonas sesquiterpénicas representan nuevos productos naturales.

Todos los compuestos aislados de esta planta fueron identificados por análisis espectroscópicos como Ultravioleta, Infrarrojo, Resonancia Magnética Nuclear y Espectrometría de Masas. Los compuestos ya descritos fueron identificados por comparación de sus datos físicos y espectroscópicos con los ya existentes en la literatura química. A continuación se describe la determinación estructural de estas sustancias.

El primer compuesto que se aisló de las fracciones menos polares de ambos extractos fue un esteroles. Se le aisló como cristales blancos con pf. 137-138°C al recrystalizar de AcOEt. Las placas cromatográficas cluidas en diferentes sistemas de disolventes muestran una mancha color gris oscuro característico al revelar con sulfato cérico, lo que nos hizo presuponer que se trataba de un esteroles. Sus datos espectroscópicos permitieron establecer que se trataba de la mezcla de β -sitosterol y estigmasterol. Esto se corroboró por la determinación de un punto de fusión triple y la comparación directa mediante cromatografía en capa fina con una muestra auténtica. Estos esteroides son compuestos de amplia distribución en el reino vegetal y han sido descritos un sinnúmero de veces en la literatura.

Hay que hacer notar que de las fracciones donde se aisló el β -sitosterol, se logró aislar una mínima cantidad de cristales blancos con pf. 219-221°C, los cuáles

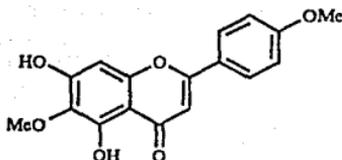
desarrollaron un color morado-azuloso en la cromatoplaaca analítica al revelarse con sulfato cérico. Su espectro de RMN¹H mostró que se trataba de una compleja mezcla que no pudo ser resuelta.

De las siguientes fracciones de mediana polaridad del extracto hexánico (13-39), se aisló una pequeña cantidad de un polvo amarillo que al recrystalizar de hexano-AcOEt (8:2) produjo unas agujas amarillas con pf. 205-208 °C, las cuales se analizaron espectroscópicamente y correspondieron con la siguiente descripción.

El espectro de IR muestra una banda ancha entre 3200 y 3600 cm⁻¹ correspondiente a grupos hidroxilo, una banda en 1659 cm⁻¹ que corresponde al grupo carbonilo de γ -pirona, así como otra banda en 1246 cm⁻¹ asignable a metoxilo aromático.

La espectroscopía de RMN¹H (Espectro # 1) muestra un típico sistema A₂B₂ constituido por dos dobletes centrados en δ 7.82 y 6.89 con una constante de acoplamiento de 8 Hz, que integra para cuatro protones que corresponden a los hidrógenos 2',6' y 3',5' del anillo B p-sustituido de una flavona. En δ 6.57 y 6.54 se observan dos singuletes asignables a los protones H-8 y H-3. Un par de singuletes en δ 4.06 y 3.9, que integran para seis protones, se asignan a los metoxilos sobre C-4' y C-6. La señal para hidroxilo quelatado se localiza fuera de campo. En base a lo anteriormente descrito se propone la estructura I.

En espectrometría de masas se observa un ión molecular de 314 que corresponde a fórmula molecular propuesta (C₁₇H₁₄O₆); éste se encuentra como el pico base. Otros fragmentos de interés, tales como 271 [M⁺ - C₇H₁₁O], 167 [M⁺ - C₁₀H₁₀O₃] coinciden con el esquema general de fragmentación de flavonas^{3a}.



I

Al revisar la literatura se encuentra que los datos físicos y espectroscópicos de nuestra flavona coinciden con los reportados para el compuesto I, para el cual describen dos puntos de fusión [pf. 206-208°C (benceno) y 217°C (MeOH)]⁴⁷, hecho que coincide con el presente trabajo, pues al recrystalar de MeOH se observó un pf. de 220-222°C. De esta forma se establece la estructura de esta flavona como 5,7-dihidroxi-6,4'-dimetoxiflavona, ya descrita como pectolinarigenina⁴⁷.

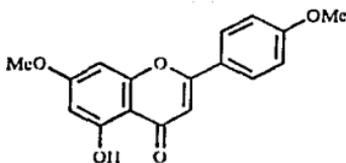
De las fracciones menos polares del extracto acetónico (16'-29') se obtuvo, al purificar la pectolinarigenina (I) por cromatografía en columna, un tercer compuesto que cristaliza en forma de agujas amarillas, que funden a 174-175°C, comportándose espectroscópicamente de la siguiente manera.

En el espectro de RMN¹H (Espectro # 2) se aprecia un sistema A₂B₂ cuyas ramas están centradas en δ 7.82 y 7.0 con una constante de acoplamiento de 9 Hz y que integra para cuatro hidrógenos, asignables a los protones localizados sobre los carbonos 2',6' y 3',5' de un anillo B p-sustituido de una flavona. En δ 6.56 aparece un singlete que integra

para un protón de tipo vinílico que se encuentra adjunto a un grupo electroatrayente y que es asignable al hidrógeno que se encuentra en el C-3. El par de dobletes centrados en δ 6.47 y 6.34 con una constante de acoplamiento de 3 Hz y que integran para dos hidrógenos son asignados a los protones H-8 y H-6, respectivamente. Asimismo se observa un singlete en δ 3.89 que integra para seis protones que corresponden a los metoxilos sobre C-7 y C-4'.

Por espectrometría de masas se establece un peso molecular de 298 que corresponde a la fórmula molecular propuesta ($C_{17}H_{14}O_5$). Se observan otros fragmentos característicos de m/z 283 [$M^+ - CH_3$], así como de m/z 132 [$M^+ - C_8H_6O_4$].

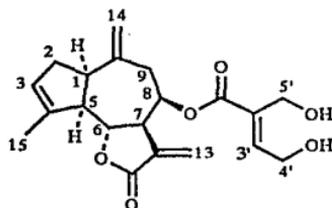
De esta manera se propone para este compuesto la estructura de 5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona, la cual ya habfa sido descrita como 7, 4'-dimetil apigenina ^{48, 49} pues los datos físicos y espectroscópicos de esta sustancia concuerdan con los del compuesto II.



II

El cuarto producto aislado es el que se presentó en mayor abundancia en la planta. Se aisló un aceite incoloro, luego de extremar cuidados en las condiciones de aislamiento por ser un producto lábil. Este compuesto se aisló de las fracciones medianamente polares

(55'-76') del extracto acetónico y se le asignó la estructura de una guayanólida (III) con base en los siguientes datos espectroscópicos.



III

Su peso molecular es de 360 una obtenido por espectrometría de masas por impacto electrónico y esta de acuerdo para la fórmula molecular $C_{20}H_{24}O_6$.

Su espectro en el IR presenta una banda de absorción en 3610 cm^{-1} característica de grupos hidroxilo, así como bandas en 1761 y 1709 cm^{-1} debidas a la absorción del grupo carbonilo de una γ -lactona α,β -insaturada y de un éster insaturado, respectivamente. En el ultravioleta presenta una fuerte absorción en 210 nm ($\epsilon = 18\ 695$).

El espectro de RMN^1H (Espectro # 3) (Tabla II) exhibe un par de dobletes centrados en $\delta 6.26$ ($J = 3.8\text{ Hz}$) y 5.54 ($J = 3\text{ Hz}$) característicos de los protones vinylicos de un metileno exocíclico conjugado con el carbonilo de una γ -lactona α,β -insaturada y que deben corresponder a los protones sobre el C-13 de una lactona sesquiterpénica, a su vez estos se encuentran acoplados con el protón alílico H-7, cuya

señal aparece en δ 3.24 como un multiplete. Se observa una señal parcialmente sobrepuesta en δ 4.42 que es asignable, por su desplazamiento químico, al hidrógeno base de lactona. La multiplicidad de esta señal indica un cierre lactónico hacia C-6. De las constantes de acoplamiento $J_{5,6} = 9$ Hz, $J_{6,7} = 9$ Hz, se infiere una relación trans-diaxial entre H-6 y los protones en C-5 y C-7. Ya que biogénicamente H-7 tiene una orientación α , H-6 debe ser β y H-5 α .

En δ 5.66 aparece una señal doble, de doble, de doble que se asigna por su desplazamiento al protón H-8 base de éster. El par de singuletes anchos que se observan en δ 5.02 y 4.89 corresponden al metileno exocéfalo sobre el C-10. En δ 1.91 se aprecia un singulete ancho que integra para tres protones, correspondientes a un metilo unido a un carbono vinílico y que debe corresponder a los hidrógenos sobre C-15. La señal del protón vinílico aparece sobrepuesta con las de H-8 y H-13 en δ 5.53.

Se caracterizó el grupo éster unido a C-8 como un dihidroxitigolato por la señal triple en δ 6.84 ($J = 6$ Hz) correspondiente al protón vinílico H-3' y dos señales más, un doblete en δ 4.92 ($J = 6$ Hz: 2H) y un singulete en δ 4.34 (2 H) asignables a los protones alílicos H-4' y H-5' geminales a grupos hidróxilo. De esta manera se estableció la estructura de la guayanólida como III.

En el espectro de masas de III, se observan tres fragmentos que comprueban la presencia del éster descrito. El primero de m/z 115 corresponde al acilo del éster $[C_5H_7O_3]^+$, el segundo de m/z 97 corresponde a la pérdida de H_2O a partir del fragmento anterior $[C_5H_5O_2]$ y el tercero de m/z 69 $[C_4H_5O]^+$ que corresponde a la pérdida de CO a partir de m/z 97.

Una revisión de la literatura nos permite aseverar que las constantes físicas y espectroscópicas del compuesto III aislado de *Stevia laxiflora* coinciden con las encontradas para una sustancia llamada eupahakonenina-B. Esta sustancia fué aislada por primera vez de *Stevia setifera* ²³ y descrita entonces como guayanólida-1 β H. Posteriormente un grupo japonés aisló la eupahakonenina-B de *Eupatorium chinense* ⁵⁰. Mediante correlación de está sustancia con la cumambрина-A, un producto aislado de *Crysanthemum ornatum* ⁵¹, demuestran que la orientación de H-8 y H-1 en eupahakonenina-B es α . Recientemente está guaianólida ha sido aislada de *Stevia satureiaefolia* ⁴⁰ y de *Stevia mercedensis* ²⁷. Los autores de estos trabajos corroboran la estereoquímica asignada por el grupo japonés.

Por otro lado se procedió a la obtención de derivados del compuesto III para confirmar la estructura propuesta.

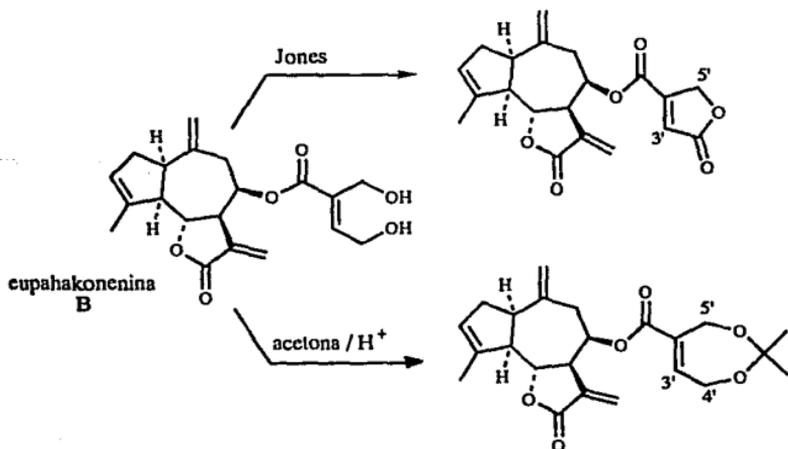
De la oxidación del compuesto III con el Reactivo de Jones, se obtiene un producto III-A (Esquema 1) como un aceite incoloro, que se analizó espectroscópicamente.

En el espectro de RMN¹H de III-A, (Espectro # 4) (Tabla II) se observó un triplete en δ 6.74 (J = 2.5 Hz) y un doblete en δ 4.93 (J = 2.5 Hz; 2H). Estas señales evidenciaron la formación de una butenólida β -sustituída, y se atribuyeron a los protones en C-3' y C-5', respectivamente. El desplazamiento químico de la señal triple (H-3'), permitió establecer que el carbonilo de la nueva lactona está en C-4' ^{27,52,53,54}, ya que cuando está en C-5' dicha señal aparece a campo más bajo ^{55,56,57}.

De esta manera se establece para el producto oxidado la estructura III-A. Este compuesto también fué obtenido de eupahakonemina-B. Los datos espectroscópicos de III-A coinciden con los reportados.

La formación del acetónido III-B, se produjo al agregar acetona y ácido p-toluensulfónico a una muestra de eupahakonemina-B (III). De la mezcla de reacción se aisló un compuesto cristalino, al que se asignó la estructura III-B (Esquema 1), con base en su análisis espectroscópico.

Esquema 1



La espectroscopía IR muestra señales en 1762 y 1707 cm^{-1} debidas a las señales del carbonilo de una γ -lactona α,β -insaturada y de un éster conjugado, respectivamente.

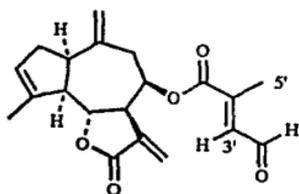
El espectro de masas señala un peso de 400 que corresponde a la fórmula molecular $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_6$. Este además, muestra entre otros fragmentos, el correspondiente a la pérdida de acetona.

El espectro de RMN^1H de III-B (Espectro # 5) (Tabla II) presenta parámetros similares a los de III. Exhibe además un singulete agudo en $\delta 1.43$ que integra para seis protones y que debe corresponder a los dos metilos geminales, característicos de un acetónido. Además se aprecian dos multipletes, uno en $\delta 6.74$ asignable al protón vinílico H-3' y otro en $\delta 4.25-4.50$ que debe corresponder a los protones C-4' y C-5'.

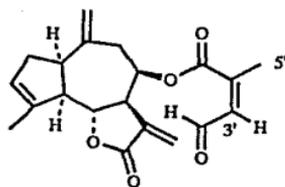
Se ha descrito en la literatura ⁵⁰ la formación de acetónidos en presencia de $\text{Me}_2\text{CO}/p\text{-TsOH}$ a partir de dihidroxitiglatos presentes en guayanólidas. El análisis espectroscópico de estos compuestos cetálicos concuerda con los datos encontrados para el acetónido III-B. La formación del derivado III-B de la cupahakononina-B no se ha descrito anteriormente.

De las fracciones 30'-35' del extracto acetónico, se aísla un aceite incoloro que mostró ser homogéneo en cromatografía en capa fina. Sin embargo su análisis espectroscópico reveló que se trataba de una mezcla de dos sustancias para las que se proponen las estructuras IV y V, así como los nombres de laxifloridas A y B, respectivamente.

La labilidad de estos compuestos y la poca cantidad que de ellos se aisló, no permitió su separación por lo que su elucidación estructural se hizo en base a los datos espectrales de la mezcla.



IV



V

El espectro de IR presenta absorciones en 1770, 1730 y 1692 cm^{-1} debidas a la presencia de los grupos carbonilos de una γ -lactona α,β -insaturada, de un éster insaturado y de un aldehído. La señal en 1645 cm^{-1} se debe a las dobles ligaduras.

El espectro de RMN^1H de IV y V (Espectro # 6) (Tabla II) muestra señales similares a las del compuesto III, a excepción de aquellas correspondientes al grupo éster sobre C-8, mostrando además, que ambos productos difieren entre sí, sólo en la geometría en el doble enlace del éster. Las señales correspondientes al éster del compuesto IV (el más abundante) son: un doblete en $\delta 10.15$ ($J = 7$ Hz) asignable al protón de un aldehído sobre C-4', un doblete de cuarteto en $\delta 6.64$ ($J = 7, 2$ Hz) que corresponde al protón

vinílico H-3' y una señal más en δ 2.25 como un doblete ($J = 2 \text{ Hz}$) que se asigna a los protones del metilo vinílico sobre C-2'.

La caracterización de la cadena lateral del compuesto V se hizo de igual manera, en base a tres señales que aparecen en δ 10.05 en forma de doblete ($J = 7 \text{ Hz}$) para el protón H-4', en δ 6.11 como un doblete de cuarteto ($J = 7, 2 \text{ Hz}$) que se asigna a H-3' y en δ 2.03 una señal doble debida a los tres protones sobre C-5'.

Por el desplazamiento a campo más alto de las señales del éster de V, a éste se le asigna la configuración **Z** y al de IV la **E**.

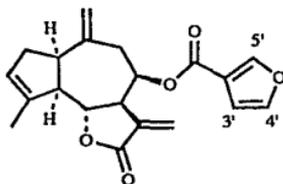
En la literatura se describe a la 4'-dehidrochromolaénida, una heliangólida aislada de *Chromolaena glaberrima*⁵⁸ que contiene en su estructura al éster con geometría **E**. Este tipo de ésteres son poco usuales en la naturaleza. De hecho sólo se ha descrito el de chromolaénida y ahora los presentes en laxifloridas A(IV) y B(V), siendo ésta la primera vez que se aísla el éster con geometría **Z**.

Finalmente, en las fracciones más polares 55'-76' del extracto acetónico se encuentra un producto más, que se aisló y purificó quedando como un aceite incoloro.

Subsecuentes análisis espectroscópicos nos permiten proponer la estructura VI, para este compuesto al que se nombró laxiflorida C.

El espectro IR exhibe señales de absorción en 1762 y 1721 cm^{-1} debidas a la presencia del grupo carbonilo de una γ -lactona α,β -insaturada y de un éster insaturado respectivamente. Las bandas en 1667 y 1640 cm^{-1} se deben a las dobles ligaduras, además

se aprecian bandas en 1575, 1508 y 874 cm^{-1} originadas por la presencia de un anillo heterocíclico de furano.



VI

El espectro de RMN^1H de VI (Espectro # 7) (Tabla II) muestra bastante similitud con el de III, diferenciándose de éste por las señales correspondientes al sustituyente sobre C-8, que para el compuesto VI es un β -furoiloxi, caracterizado por las señales en $\delta 7.91$ como un doble de doble ($J = 1, 1.5 \text{ Hz}$) que se asigna a H-5', un triplete en $\delta 7.39$ ($J = 1.5 \text{ Hz}$) que corresponde al protón H-4' y un doble de doble en $\delta 6.64$ ($J = 1.5, 1 \text{ Hz}$) asignable a H-3'.

La estereoquímica del compuesto VI se estableció tomando en consideración que sus constantes de acoplamiento son muy similares a los de III.

Se ha descrito un compuesto de estructura muy similar a VI. Este compuesto llamado bahifolina-C y aislado de *Bahia oppositifolia*⁵⁹, sólo difiere de VI en poseer

un espiro epóxido en C-10. Las señales correspondientes al furofio en ambos compuestos resultaron casi idénticas.

Por los análisis espectroscópicos y teniendo en cuenta la estrecha relación biógenética entre III y VI, proponemos la estructura VI para la laxiflórida C, que viene a ser un nuevo producto natural y que puede formarse por una reacción de ciclización y deshidratación del éster presente en III.

TABLA II

Datos de RMN¹H de los compuestos III-VI (CDCl₃, 80 MHz, TMS como referencia interna)

	III	III-A	III-B	IV	V	VI
H - 1	3.24 *	3.26 *	3.16 *	3.15 *	3.15 *	3.16 *
H - 2	2.4 m	2.47 m	2.45 m	2.48 m	2.48 m	2.48 m
H - 3	5.53 *	5.53 *	5.55 *	5.5 *	5.5 *	5.5 *
H - 5	2.82 t (°) (9)	2.84 t (°) (9)	2.81 t (°) (9)	2.82 t (°) (9)	2.82 t (°) (9)	2.83 t (°) (9)
H - 6	4.51 dd (9)	4.44 dd (9)	4.38 dd (9)	4.47 dd (9)	4.47 dd (9)	4.53 dd (9)
H - 7	3.24 m	3.26 m	3.16 m	3.15 m	3.15 m	3.16 m
H - 8	5.66 ddd (5, 3, 3)	5.71 ddd (5, 3, 3)	5.55 *	5.68 ddd (5, 3, 3)	5.68 ddd (5, 3, 3)	5.7 ddd (5, 3, 3)
H - 9	2.58 d (5)	2.63 d (5)	2.55 d (5)	2.58 d (5)	2.58 d (5)	2.62 d (5)
H - 13	6.26 d (3.8)	6.31 d (3.8)	6.28 d (3.8)	6.27 d (3.8)	6.27 d (3.8)	6.28 d (3.8)
H - 13'	5.54 d (3)	5.56 d (3)	5.51 d (3)	5.51 d (3)	5.51 d (3)	5.58 d (3)
H - 14	5.02 s (°)	5.05 s (°)	4.99 s (°)	5.01 s (°)	5.01 s (°)	5.02 s (°)

TABLA II

Datos de RMN¹H de los compuestos III-VI (CDCl₃, 80 MHz, TMS como referencia interna)

	III	III-A	III-B	IV	V	VI
H - 14'	4.88 s (*)	4.89 s (*)	4.86 s (*)	4.85 s (*)	4.85 s (*)	4.88 s (*)
H - 15	1.87 s (*)	1.89 s (*)	1.88 s (*)	1.87 s (*)	1.87 s (*)	1.89 s (*)
- O C O R						
H - 3'	6.84 t (6)	6.65 t (2.5)	6.74 m	6.64 dq (7, 2)	6.11 dq (7, 2)	6.64 dd (1.5, 1)
H - 4'	4.42 d (6)	—		10.15 d (7)	10.05 d (7)	7.39 t (1.5)
			4.25 - 4.5 m			
H - 5'	4.34 s	4.93 d (2.5)		2.25 d (2)	2.03 d (2)	7.91 dd (1.5, 1)

Desplazamientos químicos están dados en ppm
 Números en paréntesis son constantes de acoplamiento en Hz
 (*) Señales sobrepuestas
 (') Señales anchas

PARTE EXPERIMENTAL

Las muestras de referencia del espécimen en estudio se depositaron en el Herbario del Instituto de Biología de la UNAM, número de registro: AOH-209. La identificación corrió a cargo del M. en C. Osvaldo Téllez del Departamento de Botánica del mismo Instituto, a quién expresamos nuestro agradecimiento.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fischer-Johns y no están corregidos. Las cromatografías en columna se efectuaron con sílica-gel. La pureza de los productos, así como el desarrollo de las reacciones se siguió por cromatoplaques de sílica-gel Merck F-254 (4 x 5 cm, 0.25 mm de espesor), usando como revelador sulfato cátrico al 1% en ácido sulfúrico 2N y/o luz ultravioleta.

Los espectros de UV se determinaron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer, Modelo 202. La rotación óptica se efectuó en un polarímetro digital Perkin-Elmer, Modelo 241. Los espectros de IR se determinaron en espectrofotómetros Perkin-Elmer, Modelos 283 y Nicolet FT-5-SX, recurriendo a técnicas de pastilla de KBr o solución cloroformica. Los espectros de RMN¹H se determinaron en el aparato Varian FT-80A, usando tetrametil silano como referencia interna. Los espectros de masas se determinaron en un espectrofotómetro HP-5985-B, usando técnicas de impacto electrónico (IE) y/o ionización química (IQ).

La planta *Stevia laxiflora* D.C., fué recolectada en Septiembre de 1988, en las cercanías de la Ciudad de Cuernavaca, Morelos.

1.12 kg de las partes aéreas de la planta, completamente seca y molida, se sometieron a extracción por percolación en frío, con hexano y posteriormente con acetona hasta agotar la planta. Después se eliminó el disolvente por destilación a presión reducida; se obtuvieron dos extractos: hexánico y de acetona, con un peso de 36.8 g y 56.32 g, respectivamente.

Cada uno de los extractos fué adsorbido en celita para luego fraccionarlo por cromatografía en columna empacada con sílica-gel en una relación 1:20 con respecto al extracto. La elución se inició con hexano al 100% aumentando la polaridad gradualmente con AcOEt hasta llegar al 100% de éste. Se recolectaron eluatos de 500 ml, los que una vez concentrados y analizados por CCF, se reunieron en fracciones de composición semejante, como se indica en la Tabla III.

De la cromatografía en columna de las fracciones de menor polaridad de ambos extractos 1-12 y 1'-15', en un sistema de elución hexano-AcOEt (95:05) se aisló un polvo blanco que al recristalizarlo con acetato de etilo forma unas agujas blancas de pf. 137-138°C. Esta sustancia se identificó como β -sitosterol mediante punto de fusión triple y por comparación directa por CCF con una muestra auténtica en varios sistema de elución.

De las fracciones de mayor polaridad (hexano-AcOEt 7:3) de ambos extractos 1-12 y 1'-15' de la columna anterior, se aisló un polvo blanco amorfo, que recristalizado de AcOEt, forma agujas blancas de pf. 219-221°C. Estos cristales se supusieron puros de

TABLA III

85 : 15	0' - 27'	
80 : 20	28' - 38'	
75 : 25	39' - 49'	
65 : 35	50' - 65'	16' - 29'
50 : 50	66' - 76'	
40 : 60	77' - 88'	30' - 36'
30 : 70	89' - 94'	
0 : 100	95' - 107'	

Las fracciones 13-39 del extracto hexánico se separan por cromatografía en columna y esta se eluyó con un sistema hexano-acetona (9:1). Por cristalización espontánea se obtuvieron unas agujas amarillas con p.f. de 205-208°C, desarrollando en la cromatoplaaca una mancha amarilla homogénea, después de revelar con sulfato cérico. Esta sustancia se identificó como pectolinarigenina (I) por sus datos físicos y espectroscópicos.

IR (CHCl_3) cm^{-1} : 3498, 1659, 1623, 1759, 1510, 1467, 1372, 1305, 1159, 1102. RMN^1H (CDCl_3 , espectro # 1): δ 7.82 (d, $J = 8$ Hz, H-2' y H-6'), δ 6.98 (d, $J = 8$ Hz, H-3' y H-5'), δ 6.57 (s, H-8), δ 6.54 (s, H-3), δ 4.06 (s, 3H, -OMe), δ 3.9 (s, 3H, -OMe). EM I.E., 70 ev m/z (%): 314 [M^+] (100); 299 [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$] (71); 296 [$\text{M}^+ - \text{H}_2\text{O}$] (9); 286 [$\text{M}^+ - \text{CO}$] (3); 271 [$\text{M}^+ - \text{CO} - \text{CH}_3$] (61); 182 [$\text{M}^+ - \text{C}_8\text{H}_6\text{O}_5$] (1); 167 [$\text{M}^+ - \text{C}_8\text{H}_6\text{O}_5 - \text{CH}_3$] (16); 69 [$\text{M}^+ - \text{C}_9\text{H}_7\text{O}_7 - \text{H}_2\text{O}$] (67).

Al fraccionarse por cromatografía en columna las fracciones 16'-29' del extracto de acetona en un sistema de elución hexano-AcOEt (6:4), se aisló una sustancia amorfa que al purificarse por cromatografía en columna, dió un polvo amarillo que al ser recristalizado de MeOH en frío, formó agujas amarillas con pf. 220-222°C. La CCF reveló una mancha homogénea con r_f idéntico al del compuesto I, por lo que la sustancia se identificó como pectolinarigenina (I).

Al purificar por cromatografía en columna con un sistema de elución hexano-AcOEt (8:2), las aguas madres de pectolinarigenina (I) aislada del extracto de acetona 16'-29', se obtuvo por cristalización fraccionada del producto, 8 mg de una segunda sustancia que formó cristales amarillos que fundieron a 174-175°C. Está sustancia se identificó como 5-hidroxi-7,4'-dimetilflavona ^{48,49}.

RMN^1H (CDCl_3 , espectro # 2): δ 7.82 (d, H-6' y H-2'), δ 7.0 (dHH, $J = 9$ Hz, H-3' y H-5'), δ 6.56 (s, H-3), δ 6.47 (d, $J = 3$ Hz, H-8), δ 6.34 (d, $J = 3$ Hz, H-6), δ 3.89 (s, 6H, -OMe). EM I.E. 70ev (%): 298 [M^+] (100); 283 [$\text{M}^+ - \text{CH}_3$] (3); 270 [$\text{M}^+ - \text{CO}$] (8); 269 [$\text{M}^+ - \text{CO} - \text{H}$] (28); 166 [$\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_4$] (13); 132 [$\text{C}_9\text{H}_8\text{O}$] (15); 117 [$\text{C}_9\text{H}_8\text{O} - \text{CH}_3$]⁺ (11); 89 [$\text{M}^+ - \text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2 - \text{OCH}_3$] (16).

Las fracciones 30'-35' del extracto de acetona, se sometieron a un proceso de decoloración a través de una columna de carbón activado. Las fracciones decoloradas se concentraron y se volvieron a fraccionar en columna empacada con sílica-gel en un sistema de elución hexano-AcOEt (9:1).

De estas cromatografías se reunieron las fracciones que presentaron una mancha color púrpura en CCF. Estas fracciones se purificaron por cromatografías sucesivas, hasta obtener 21 mg de la mezcla de laxifloridas A (IV) y B (V) como un aceite incoloro.

IR (CHCl_3) cm^{-1} : 2950, 1760, 1690, 1645, 1445, 1380, 1325, 1205, 1050, 1015, 950, 915. RMN¹H (CDCl_3 , espectro # 6): ver Tabla II.

Las fracciones 55'-76' del extracto de acetona, se volvieron a fraccionar en una columna cromatográfica empacada con sílica-gel, usando hexano como eluyente inicial y aumentando la polaridad con acetona.

De las fracciones eluidas con hexano-acetona (8:2), se obtuvo un compuesto que se purificó por cromatografías sucesivas con un sistema de elución hexano-AcOEt (9:1), hasta obtener 15 mg de VI como un aceite incoloro, que en CCF revelada con sulfato cérico, presentó una coloración café oscuro.

IR (CHCl_3) cm^{-1} : 3037, 2927, 2855, 1762, 1721, 1667, 1640, 1575, 1508, 1161, 874. RMN¹H (CDCl_3 , espectro # 7): ver Tabla II.

Las fracciones 21-34 eluidas con hexano-acetona (75:25) de esta cromatografía presentaron una mancha homogénea al ser analizadas por CCF, por lo que se juntaron y

concentraron (20g). Se tomó 1g y se hizo pasar por una columna empacada con carbón activado para decolorarla. La sustancia se purificó por cromatografías sucesivas en sistemas de elución hexano-acetona (8:2), teniendo cuidado de no usar temperaturas altas para concentrar los eluatos. El compuesto puro (0.42g) es un aceite incoloro que reveló con sulfato cérico como una mancha homogénea de color púrpura. Por sus datos físicos y espectroscópicos la sustancia aislada se identificó como eupahakonena-B (III): $[\alpha]_D^{+23}$ (0.27 mg/100 ml, MeOH). UV (MeOH): 210 nm ($\epsilon = 18\ 695$). IR (CHCl_3) cm^{-1} : 3610, 1454, 1761, 1709, 1643, 1444, 1376, 1244, 1018. RMN^1H (CDCl_3 , espectro # 3): ver Tabla II. EM I.E. 70 ev m/z (%): 360 $[\text{M}]^+$ (3); 348 $[\text{M} - \text{H}_2\text{O}]^+$ (0.7); 228 $[\text{M}^+ - \text{C}_5\text{H}_8\text{O}_4]$ (67); 213 $[\text{M} - \text{C}_5\text{H}_8\text{O}_4 - \text{CH}_3]^+$ (18); 210 $[\text{M}^+ - \text{C}_5\text{H}_8\text{O}_4 - \text{H}_2\text{O}]$ (15); 183 $[\text{M}^+ - \text{C}_5\text{H}_8\text{O}_4 - \text{CO}_2\text{H}]$ (35); 115 $[\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_3]^+$ (31); 97 $[\text{C}_5\text{H}_5\text{O}_2]^+$ (88); 91 (51); 69 $[\text{C}_4\text{H}_5\text{O}]^+$ (100); 41 $[\text{C}_3\text{H}_5]^+$ (74).

Oxidación de eupahakonena (III)

Se disolvieron 100 mg de eupahakonena-B en acetona. La solución se enfrió a 0°C y se agregó Reactivo de Jones gota a gota hasta persistencia del color naranja del reactivo. El producto de reacción se pasó por una columna empacada con tonsil y se lavó con una mezcla hexano-AcOEt (7:3). Se concentró y se purificó por sucesivas re-cromatografías en columna sílica-gel, hexano-AcOEt (8:2). Se obtuvieron 68 mg de un aceite incoloro que correspondió al compuesto con estructura III-A.

RMNH (CDCl_3 , espectro # 4): ver Tabla II.

Acetalización de eupahakononina-B (III)

A una solución de 100 mg de Eupahakononina-B (III) en acetona (10 ml) se agregaron 10 mg de ácido p-toluensulfónico; la solución se tornó de color verde. Cuando la reacción se completó, la solución colorida se neutralizó con NaHCO_3 y se filtró. El producto se purificó por columna cromatográfica en sílica gel; se obtuvieron eluatos de 25 ml de acetona-hexano (5:95). Se reunieron las fracciones afines y se concentran para obtener 51 mg de cristales blancos, que recrystalizaron de acetona con pf. 185-188°C.

IR (CHCl_3) cm^{-1} : 2993, 2945, 1762, 1707, 1659, 1449, 1378, 1251, 1045.
RMN¹H (CDCl_3 , espectro # 5) : ver tabla II. EM I.E. 70 cv m/z (%): 400 [M⁺] (1); 385 [M⁺ - CH₃] (0.4); 342 [M⁺ - C₃H₆O] (1); 97 [C₅H₅O₂]⁺ (100); 69 [C₄H₅O]⁺ (57); 69 [C₄H₅O]⁺ (57); 43 [C₃H₇]⁺ (89); 41 [C₃H₅]⁺ (81).

BIBLIOGRAFIA

- 1.- O'Gorman Helen, *Plantas y Flores de México*. Dirección General de Publicaciones, México 1963
- 2.- Krogsgaard, L.P. y Kofod N. (Editores), *Natural Products and Drugs Development*. Foundation Alfred Benzon, Copcnhagen 1984.
- 3.- Heywood V.H., Turner B.L. y Harborne J.B. (Editores), *The Biology and Chemistry of the Compositae*. Vol. I, Academic Press, London 1977.
- 3a.- Mabry T.J., Markha, K.R. y Thomas M.B., *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer-Verlag New York Inc., Germany 1970.
- 4.- Soejarto D., Kinghorn D. y Farnsworth N., (1982) *J. Nat. Prod.* 45, 590.
- 5.- Romo de Vivar A., *Productos Naturales de la Flora Mexicana*. Editorial Limusa, 1a. Edición, México 1985.
- 6.- Richard H.J. y Hendrickson B.J., *The Biosintesis the Terpenes, Steroides and Acetogeninas*. W.Z. Benjamin Inc., New York 1964.
- 7.- Rodríguez E., (1977) *Rev. Latinoamer. Quim.* 8, 56.
- 8.- Rajbhandari A. y Roberts M.F., (1985) *J. Nat. Prod.* 48, 858.
- 9.- Bennett R.D., Heftmann E y Lieber E.R., (1967) *Phytochemistry* 6, 1107.
- 10.- Kohda H., Yamasaki K. y Tanaka O., (1976) *Phytochemistry* 15, 846.
- 11.- Oberti J.C., Gil R.R., Herz W. y Sosa E.V., (1986) *Phytochemistry* 25, 1479.

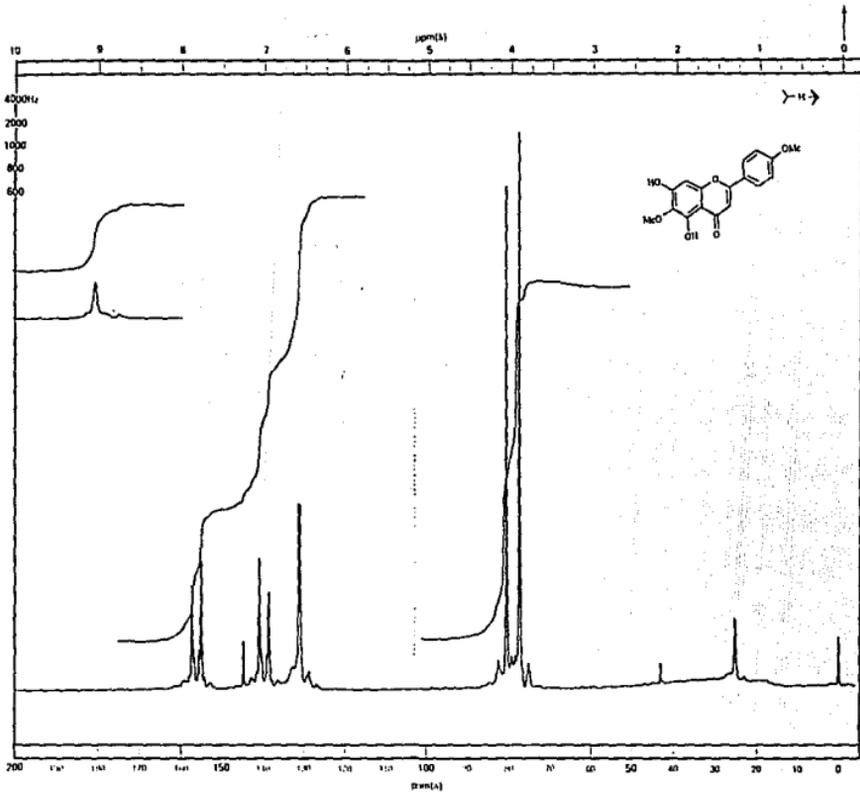
- 12.- Salmón M., Ortega A. y Dfáz E., (1975) *Rev. Latinoamer. Quím.* **6**, 45.
- 13.- Gómez F.G., Quijano L., Calderón J.S., Perales A y Rios T., (1983) *Phytochemistry* **22**, 197.
- 14.- Zdero C., Schmeda-Hirschmann G. y Bohlman F., (1986) *Phytochemistry* **25**, 1755.
- 15.- Sosa E.V., Gil R.,Kulanthaivel P.,Herz W. y Oberti C., (1985) *J. Nat. Prod.* **48**, 340
- 16.- Bohlmann F., Umemoto K. y Jakupovic J., (1985) *Phytochemistry* **24**, 1017.
- 17.- Ortega A., Martínez R. y García L.C., (1980) *Rev. Latinoamer. Quím.* **11**, 45.
- 18.- Joseph-Nathan P., Roman L.U., del Río R.E., Hernández J.D., Zabel V. y Watson W.H, (1981) *Tetrahedron* **37**, 2769.
- 19.- Bohlman F. y Zdero C., (1985) *Justus Lieb. Ann. Chem.*, 1764.
- 20.- Domínguez X. A., Gonzalez A., Zamudio M.A. y Garza A., (1974) *Phytochemistry* **13**, 2001.
- 21.- Oberti J. C., Herz W., Prasad J.S., Goodken V.L. y Sosa V.E., (1983) *J. Org. Chem.* **48**, 4038.
- 22.- Zdero C., Bohlmann F. y Schmeda-Hirschmann G., (1987) *Phytochemistry* **26**, 463.

- 23.- Bohlmann F., Dutta N. L., Dorner W., King R.M. y Robinson H., (1979) *Phytochemistry* **18**, 673.
- 24.- Kinghorn A. D., Soejarto D. D., Nanayakkara N.P.D., Compadre C.M., Makapugay K., Hovanec-Brown J.M., Medon P.J., y Kamath S.K., (1984) *J. Nat. Prod.* **47**, 439.
- 25.- Ortega A., Morales F. J. y Salmón M., (1985) *Phytochemistry* **24**, 1850.
- 26.- Salmón M., Ortega A., García de la Mora G. y Angeles E., (1983) *Phytochemistry* **22**, 1512.
- 27.- Bohlmann F., Zdero C., King R.M., y Robinson H., (1986) *Justus Lieb. Ann. Chem.*, 799.
- 28.- Rajbhandari A. y Roberts M. F., (1985) *J. Nat. Prod.* **48**, 502.
- 29.- Bohlmann F., Zdero C., King R.M., y Robinson H., (1982) *Phytochemistry* **21**, 2021.
- 30.- Martínez R. (1979) *Tesis de Maestría*. UNAM 19.
- 31.- Rajbhandari A. y Roberts M. F., (1984) *J. Nat. Prod.* **47**, 559.
- 32.- Kaneda N., Kohda H., Yamasaki K., Tanaka O., Kosaburo N., (1978) *Chem. Pharm. Bull.* **26**, 2266.
- 33.- Kohda H., Tanaka O. y Kosaburo N., (1976) *Chem. Pharm. Bull.* **24**, 1040.

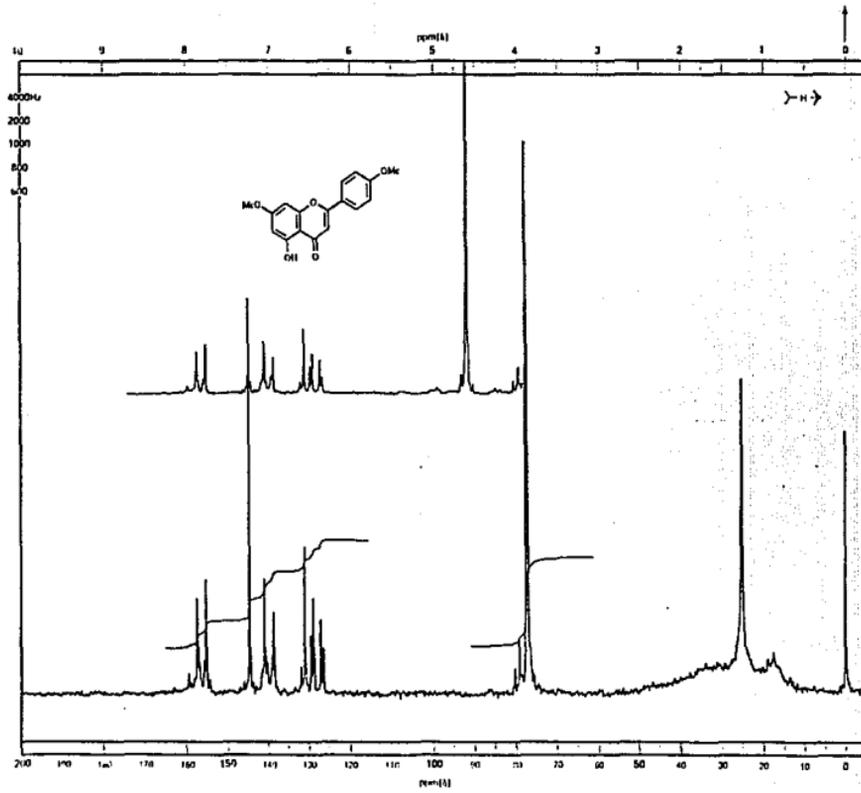
- 34.- Yamasaki K., Kohda H., Kobayashi T., Kasai R. y Tanaka O., (1976) *Tetrahedron Lett.* **13**, 1005.
- 35.- Martínez M.V., Joseph-Nathan P. y Muñoz Z.A., (1988) *J. Nat. Prod.* **51**, 221.
- 36.- Angeles E., Folting K., Grieco P.A., Huffman J.C., Miranda R. y Salmón M., (1982) *Phytochemistry* **21**, 1804.
- 37.- Zdero C., Bohlmann F., King R.M., Robinson H., (1988) *Phytochemistry* **27**, 2835.
- 38.- Ghisalberti E.L., Jefferies P. R. y Stuart A. D.,(1979) *Aust. J. Chem.* **32**, 1627.
- 39.- Kohda H., Kasai R., Yamasaki K., Murakami K., Tanaka O., (1976) *Phytochemistry* **15**, 981.
- 40.- Rajbhandari A. y Roberts M. F., (1983) *J. Nat. Prod.* **46**, 194.
- 41.- Rios T., Romo de Vivar A. y Romo J., (1967) *Tetrahedron* **23**, 4265.
- 42.- Calderon J. S., Angeles E., Salmón M., y García de la Mora G.A., (1984) *Phytochemistry* **23**, 186.
- 43.- Salmón M., Díaz E. y Ortega A. (1977) *Rev. Latinoamer. Quím.* **8**, 172.
- 44.- Quijano L., Calderon J. S., Gómez F.G., Vega J.L. y Ríos T., (1982) *Phytochemistry* **21**, 1364.
- 45.- Salmón M., Díaz E. y Ortega A., (1973) *J. Org. Chem.* **38**, 1759.

- 46.- Amaro J. M., Adrian M., Cerda C.M. y Joseph-Nathan P., (1988) *Phytochemistry* **27**, 409.
- 47.- Farkas L., Nogradi M., Sudarsanam V. y Hcrz W., (1966) *J. Org. Chem.* **31**, 3228.
- 48.- Bauer K. H. y Dietrich H., (1933) *Chem. Ber.* **66**,1053.
- 49.- Silva M. y Mundaca J.M. y Sammes P.G., (1971) *Phytochemistry* **10**, 1942.
- 50.- Ito K., Sakakibara Y. y Haruna M., (1982) *Phytochemistry* **21**, 715.
- 51.- Haruna M., Kato M., Ito K., Nikai T., Sugihara H. y Murata H., (1981) *Phytochemistry* **20**, 2583.
- 52.- Bohlmann F., Jakupovic J., y Schuster A., (1983) *Phytochemistry* **22**, 1637.
- 53.- Dreyer D. y Park K., (1975) *Phytochemistry* **14**,1617.
- 54.- Henrick C. y Jefferies P., (1965) *Tetrahedron* **21**, 3219.
- 55.- Rojas E. y Rodríguez-Hahn L., (1978) *Phytochemistry* **17**, 574.
- 56.- Balmain A. y Connolly J., (1973) *J. Chem. Soc. Perkin I*, 1247.
- 57.- Balawant J., Venkatesh K., Tuticorin G., Ramachandra P., Gopinath K. y Kuan T., (1974) *J. Chem. Soc. Perkin I*, 2517.
- 58.- Ahmed A.A., Whittemore A.T. y Mabry T.J., (1985) *Phytochemistry* **24**, 605.

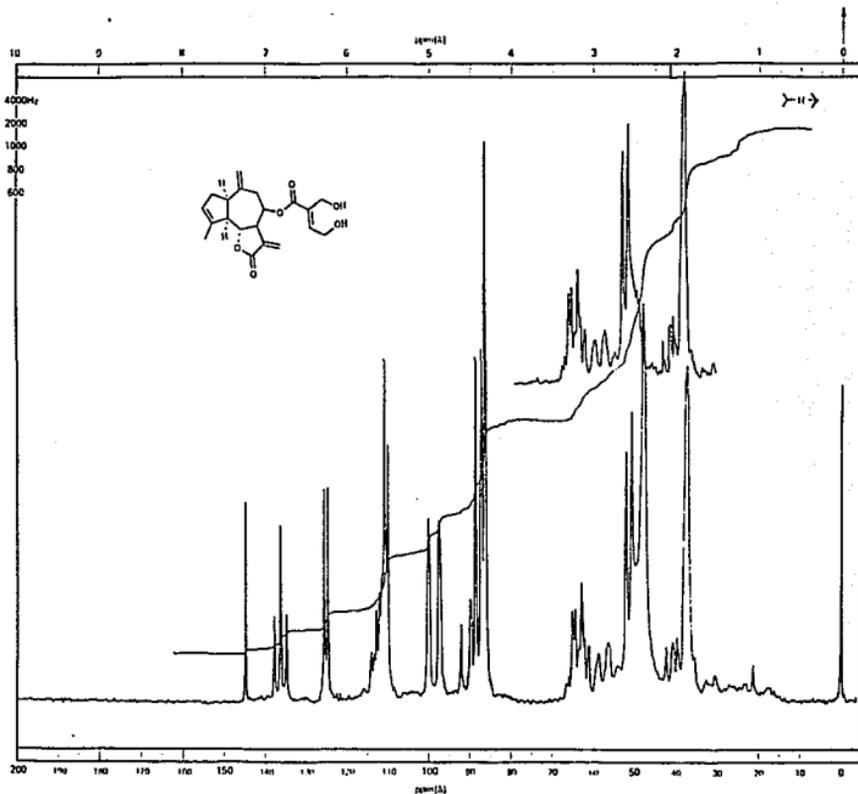
- 59.- Wagner H., Maurer G , Werner H., Bhat S.V., Crawford H. y Farkas L, (1972)
Phytochemistry **11**, 371.



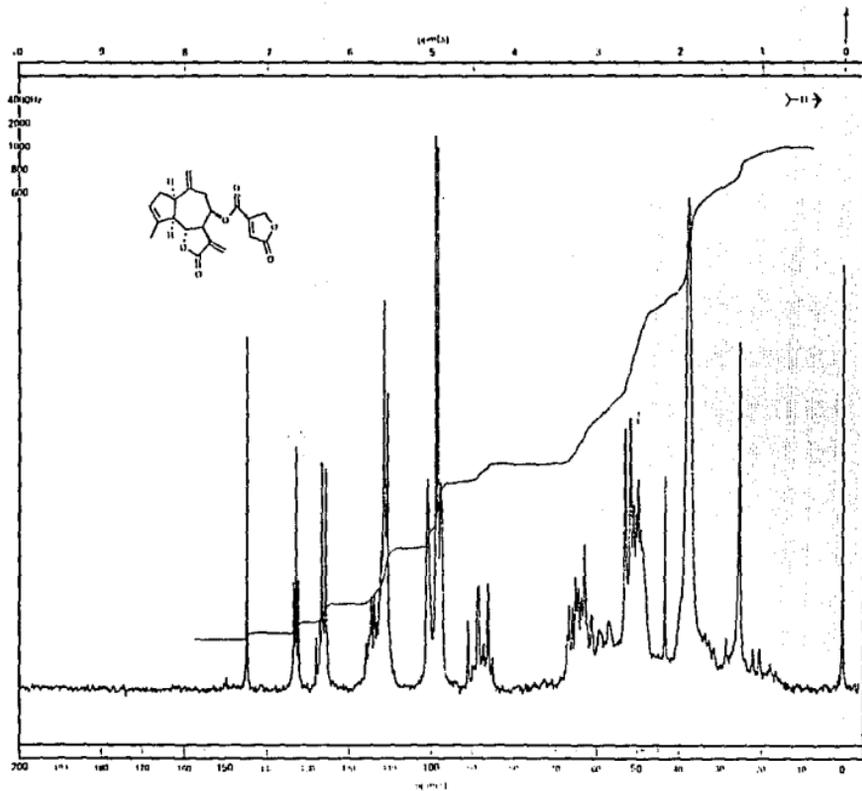
Espectro # 1.- PECTOLINARIGENINA



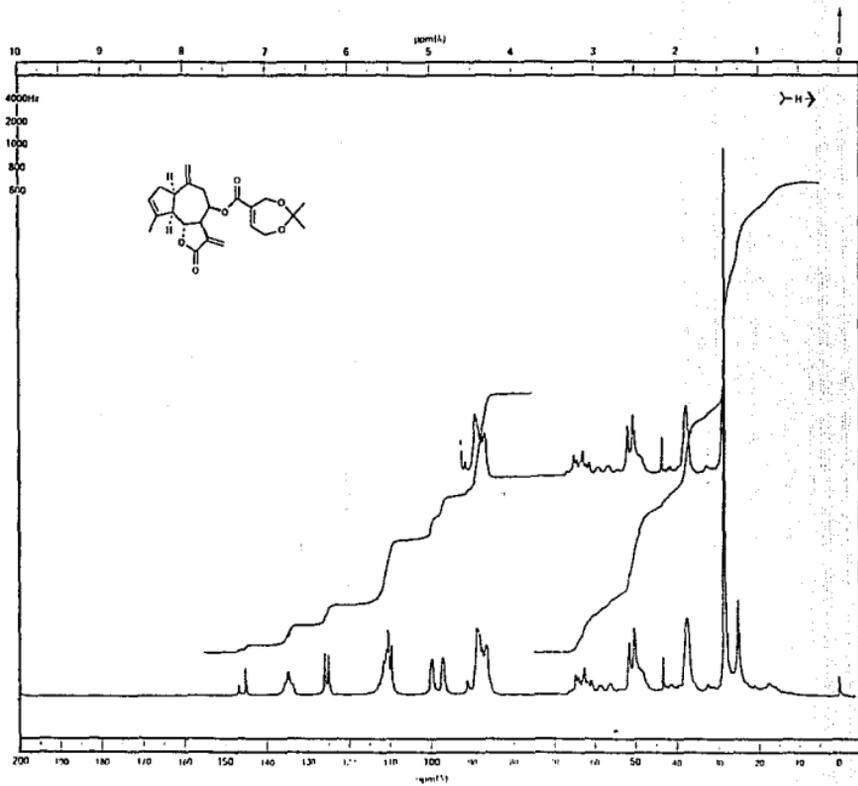
Espectro # 2.- 7,4'- dimetil Anigenina



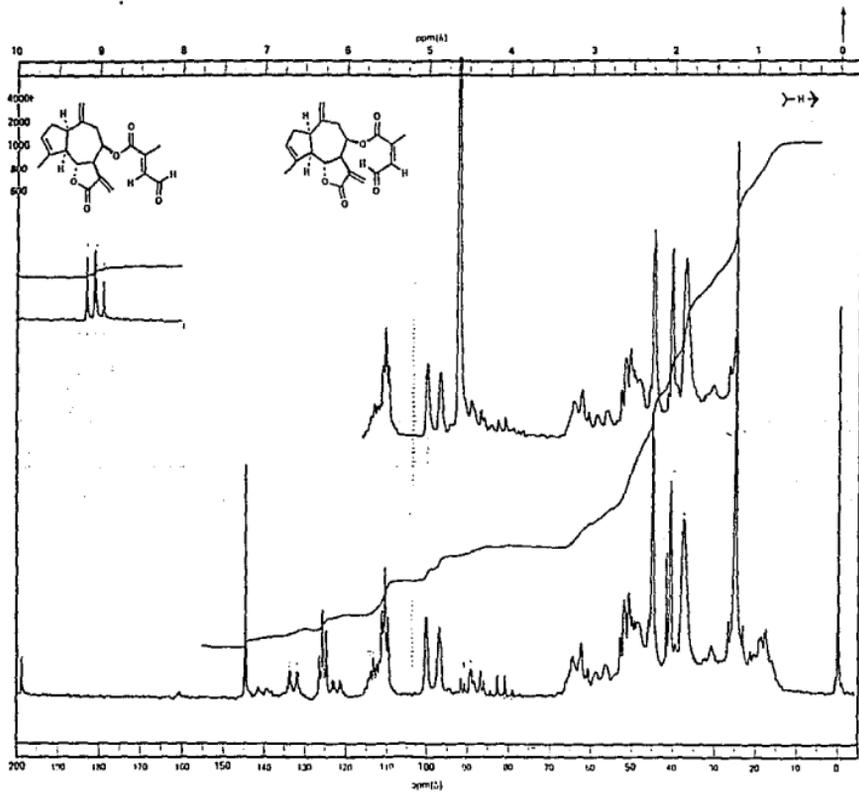
Espectro # 3.- EUPAHAKONININA B



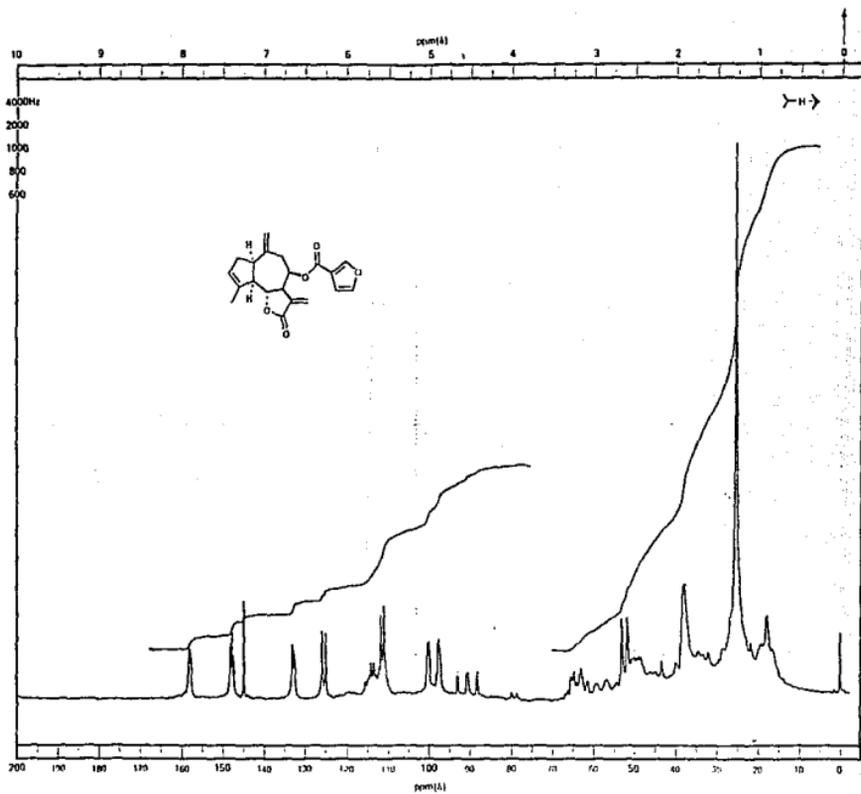
Espetro # 4



Espectro # 5



Espectro # 6.- LAXIFLORIDAS A y B



Espectro # 7.- LAXIFLORINA C