

124  
2ci



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**FALLA DE ORIGEN**

**ESTUDIO FITOQUIMICO DEL EXTRACTO HEXANICO  
DE LAS RAICES DE Stevia salicifolia CAV.**



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO  
P R E S E N T A  
**VERONICA RODRIGUEZ LOPEZ**



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.

# I N D I C E

	Página
I. ANTECEDENTES -----	1
1. Generalidades del género <u>Stevia</u> -----	1
2. Generalidades de <u>Stevia salicifolia</u> Cav. -	7
2.1 Aspectos botánicos, importancia y usos -----	7
2.2 Fitoquímica de la <u>S. salicifolia</u> ----	8
II. JUSTIFICACION Y OBJETIVOS -----	13
III. MATERIALES Y METODOS -----	16
3.1 Determinación de la toxicidad para el crustáceo <u>Artemia salina</u> Leach -----	16
3.1.1 Preparación de las muestras ----	16
3.1.2 Bioensayo -----	16
3.2 Material vegetal -----	17
3.3 Métodos de extracción y fraccionamiento preliminar -----	17
3.4 Aislamiento y purificación de los compues tos -----	20
3.4.1 Obtención del Dammaran-13(17),24- dien-3 $\beta$ -ol acetato (39) -----	20
3.4.2 Obtención del Dammaran-1 $\alpha$ ,20-diol (40) -----	20

	Página
3.4.3 Obtención del Estigmasterol ( <u>41</u> ) -	21
3.5 Caracterización de los compuestos aislados -----	23
3.5.1 Determinación de las constantes físicas y espectroscópicas -----	23
3.5.2 Pruebas químicas preliminares para identificación de triterpenos ----	23
3.5.2.1 Prueba de Lieberman-Buchard ----	23
3.5.2.2 Prueba de tetranitrometano ----	24
3.5.3 Obtención del acetyl derivado del Estigmasterol ( <u>41a</u> ) -----	24
3.5.4 Obtención del derivado desacetilado del Dammaran-13(17),24-dien-3 $\beta$ -ol acetato ( <u>39a</u> ) -----	24
3.5.5 Obtención del Dammaran-13(17),24-dien-3-ona ( <u>39b</u> ) y del Dammaran-20-ol-1-ona ( <u>40a</u> ) -----	24
IV. RESULTADOS Y DISCUSION -----	27
4.1 Identificación de los compuestos aislados -----	28
4.1.1 Identificación del Dammaran-13(17),24-dien-3 $\beta$ -ol acetato ( <u>39</u> ) -----	28
4.1.2 Identificación del Dammaran-1 $\alpha$ ,20-diol ( <u>40</u> ) -----	37

	Página
V. RESUMEN Y CONCLUSIONES -----	42
VI. RECOMENDACIONES -----	43
VII. ESPECTROS -----	45
VIII. BIBLIOGRAFIA -----	63

## I. ANTECEDENTES

1. Generalidades del género Stevia.

El género Stevia pertenece a la familia Asteraceae [tribu Eupatorieae, subtribu Piqueriinae] (King et al., 1980), e incluye aproximadamente 385 especies, de las cuales cerca de 70 se encuentran solamente en México. Se trata de un taxón exclusivo de América, y su rango de distribución se extiende desde el suroeste de los E.U.A. hasta el norte de Argentina, a través de México, América Central, los Andes y las tierras altas brasileñas. A la fecha no se han descrito especies del género en las Indias occidentales y en la Amazonia (King et al., 1980; Kinghorn et al., 1985).

Muchas especies de Stevia (40 a la fecha) 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 al., 1985); flavonas (Amirteswori et al., 1984; 1985; Domínguez et al., 1974; Rajbhandari et al., 1985); derivados del benzofurano (Bohlmann et al., 1985); derivados volátiles misceláneos (Montes, 1969; Domínguez, et al., 1974; Bohlmann et al., 1977; 1979; 1982; Ghisalberti et al., 1979) y esteroles (Domínguez et al., 1974; Bohlmann 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 de especies del género Stevia\*.

SESQUITERPENOIDES	
Tipo estructural	Referencia
Bisabolenos	Bohlmann <u>et al.</u> , 1976, 1977, 1979, 1982, 1985 Ghisalberti <u>et al.</u> , 1979 Schemeda-Hirschmann <u>et al.</u> , 1986
Germacranos	Bohlmann <u>et al.</u> , 1977, 1979, 1982 Salmón <u>et al.</u> , 1973, 1975, 1977 De helvania <u>et al.</u> , 1989 Schmeda-Hirschmann <u>et al.</u> , 1986 Zdero <u>et al.</u> , 1987; Quijano <u>et al.</u> , 1982; Calderón <u>et al.</u> , 1987
$\alpha$ -longipinanos	Bohlmann <u>et al.</u> , 1976, 1977, 1979, 1985; Gil <u>et al.</u> , 1987; Román <u>et al.</u> , 1981, 1989
Guayanos y Pseudoguayanos	Rios <u>et al.</u> , 1967; Oberti <u>et al.</u> , 1983, 1986 Bohlmann <u>et al.</u> , 1979, 1985, 1986 Calderón <u>et al.</u> , 1987 Sosa <u>et al.</u> , 1984, 1989; Salmón <u>et al.</u> , 1973, 1977
Humulanos	Bohlmann <u>et al.</u> , 1977, 1979
Eremofilanos	Bohlmann <u>et al.</u> , 1982, 1986

Cuadro 1. Tipos de terpenoides obtenidos de especies del género Stevia\*. (Continuación).

DITERPENOIDES	
Tipo estructural	Referencia
Clerodanos	Bohlmann <u>et al.</u> , 1982; Angeles <u>et al.</u> , 1982
Labdanos	Bohlmann <u>et al.</u> , 1976, 1982, 1985 Quijano <u>et al.</u> , 1982; Ortega <u>et al.</u> , 1980
Hibaanos	Zdero <u>et al.</u> , 1987
<u>Ent</u> -Kauranos	Bohlmann <u>et al.</u> , 1979, 1982; Quijano <u>et al.</u> , 1982; Ortega <u>et al.</u> , 1985; Kaneda <u>et al.</u> , 1988; Kohda <u>et al.</u> , 1976, 1976c, 1986b; Yamasaki <u>et al.</u> , 1976, 1977; Cramer <u>et al.</u> , 1986
Taraxantanos	Domínguez <u>et al.</u> , 1974
Dammaranos	Bohlmann <u>et al.</u> , 1979
Lupanos	Sholichin <u>et al.</u> , 1980; Bohlmann <u>et al.</u> , 1979
Oleananos	Bohlmann <u>et al.</u> , 1979

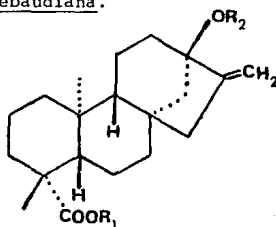
En comparación con otras especies la S. rebaudiana ha recibido una particular atención debido a sus propiedades edulco-

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



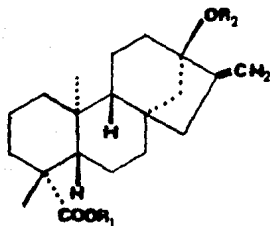
rantes y por lo tanto a su importancia económica. El esteviosido es el principal constituyente encontrado en las hojas de esta planta y tiene un poder edulcorante de 250 a 300 veces mayor que la sacarosa, por lo que se usa en la industria de alimentos procesados en países como Japón y Brasil. El Cuadro 2 indica los glucósidos que contienen esta especie, así como su poder edulcorante (Cramer et al, 1980).

Cuadro 2. Glicósidos con poder edulcorante aislados de la S. rebaudiana.



Diterpeno	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Potencia edulcorante Sacarosa=1
Esteviosido	$\beta$ -Glu	$\beta$ -Glu- $\beta$ -Glu (2+1)	250-300
Esteviolbiosido	-H	$\beta$ -Glu- $\beta$ -Glu (2+1)	100-125
Rebaudianosido A	$\beta$ -Glu	$\beta$ -Glu- $\beta$ -Glu (2+1)   $\beta$ -Glu (3+1)	350-450
Rebaudianosido B	-H	$\beta$ -Glu- $\beta$ -Glu (2+1)   $\beta$ -Glu (3+1)	300-350
Dulcosido A	$\beta$ -Glu	$\beta$ -Glu-u-Rha (2+1)   $\beta$ -Glu (3+1)	50-120

Cuadro 2. Glicósidos con poder edulcorante aislados de la S. rebaudiana. (Continuación).



Diterpeno	$R_1$	$R_2$	Potencia edulcorante Sacarosa=1
Rebaudiosido D	$\beta$ -Glu- $\beta$ -Glu (2+1)	$\beta$ -Glu- $\beta$ -Glu (2+1)   $\beta$ -Glu (3+1)	200-300
Rebaudiosido E	$\beta$ -Glu- $\beta$ -Glu (2+1)	$\beta$ -Glu- $\beta$ -Glu (2+1) 	250-300
Rebaudiosido C (Dulcosido B)	$\beta$ -Glu	$\beta$ -Glu- $\alpha$ -Rha (2+1)	50-120
Glu=glucosa, Rha=ramnosa			

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 folklórica como agentes medicinales. En el Cuadro 3 se indican algunas de estas especies (Soejarto et al., 1983).

Cuadro 3. Algunas especies de Stevia usadas en medicina tradicional y/o de importancia económica.

Especie	País de origen	Nombre común	Usos e importancia económica
<u>S. balansae</u> Hieron	Paraguay	Charúa caí	La decocción de las raíces se usa como antidiarreico.
<u>S. lucida</u> Lag.	Colombia	Colondrina sabanera	La decocción de las partes aéreas se emplea como agente antiinflamatorio.
<u>S. maeloridei</u> B.L. Robins	Perú	Gualamoco	La decocción de la planta es usada como agua de baño.
<u>S. arcuata</u> B.L. Robins			
<u>S. petiolata</u> (Cass.) Sch. B.P.	Perú	Guarmí-guarmí	Agente de sabor
<u>S. subpubescens</u> Lag. var.	México	Zazal, Hierba del aire	La decocción de las partes aéreas se emplea para el tratamiento del reumatismo, dolores abdominales y como baño para las mujeres después del parto.
<u>S. intermedia</u> Grashoff			
<u>S. rebaudiana</u> Bert	Paraguay	Caá Hó-é	Las hojas son usadas como edulcorantes, contra la diabetes, parasitos y como anticonceptivo. Industrialmente se usa como edulcorante.

Cuadro 3. Algunas especies de Stevia usadas en medicina tradicional y/o de importancia económica.

Especie	País de origen	Nombre común	Usos e importancia económica
<u>S. balansae</u> Hieron	Paraguay	Charúa caí	La decocción de las raíces se usa como antidiarreico.
<u>S. lucida</u> Lag.	Colombia	Golondrina sabanera	La decocción de las partes aéreas se emplea como agente antiinflamatorio.
<u>S. maeloridei</u> B.L. Robins	Perú	Gualencoco	La decocción de la planta es usada como agua de baño.
<u>S. anomala</u> B.L. Robins			
<u>S. petiolata</u> (Cass.) Sch. B.P.	Perú	Guami-guami	Agente de sabor
<u>S. subpubescens</u> Lag. var.	México	Zazal, Hierba del aire	La decocción de las partes aéreas se emplea para el tratamiento del reumatismo, dolores abdominales y como baño para las mujeres después del parto.
<u>S. intermedia</u> Grashoff			
<u>S. rebaudiana</u> Bert	Paraguay	Café H-C-é	Las hojas son usadas como edulcorantes, contra la diabetes, parasitos y como anticonceptivo. Industrialmente se usa como edulcorante.

De las especies del Cuadro 3 la única que ha sido objeto de estudios biológicos es la S. rebaudiana (Sakaguchi et al., 1982; Crammer et al., 1986, 1987; Fujita et al., 1979; Okazaki et al., 1977; Yamada et al., 1985; Morita et al. 1977; Kinghorn et al., 1985; Planas, y Kué, 1968; Soejarto et al., 1983; Medon et al., 1982).

## 2. Generalidades de Stevia salicifolia. Cav.

### 2.1 Aspectos botánicos, importancia y usos.

La S. salicifolia Cav. 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 (Bennett, Zingg, 1935; Bye, 1985; Pennington, 1963). La decocción de las hojas y raíces es comúnmente usada para el tratamiento de úlceras, heridas, inflamaciones y mordeduras de animales. La infusión de las raíces se bebe para aliviar dolores gastrointestinales causados por parásitos, en tanto que la decocción es usada como purgante. Las raíces y las hojas son astringentes y aplicadas en las caries alivian el dolor de muelas. Las raíces molidas son usadas para lavar el barro de las ollas de fermentación usadas para hacer "tesgüino" (bebida basada en la fermentación de maíz). Después del proceso de fermentación el polvo de las raíces se adiciona a el líquido para hacer una bebida "fuerte" y dulce.

Otros nombres con los que se conoce a la planta en otras regiones geográficas son "hierba del aire", "tonalxihuitl" y "tonalxuitl" (Díaz, 1976).

## 2.2 Fitoquímica de la S. salicifolia.

La S. salicifolia ha sido previamente estudiada desde el punto de vista fitoquímico convencional. El primer estudio (Ortega, *et al.*, 1980) se realizó sobre las variedades típica Robinson y salicifolia. De la variedad típica Robinson, recolectada en el verano de 1975 en Topilejo, D.F., se aislaron e identificaron stevinsol (1) y las flavonas, 7,4'-dimetoxi naringenina (2); 3',4',5-trihidroxi-7-metoxi flavanona (3) y la 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, estado de México se caracterizaron el salicifoliol (5) y las flavonas antes mencionadas (2,3,4). En la Figura 1 se ilustran las estructuras de los compuestos aislados de ambas variedades.

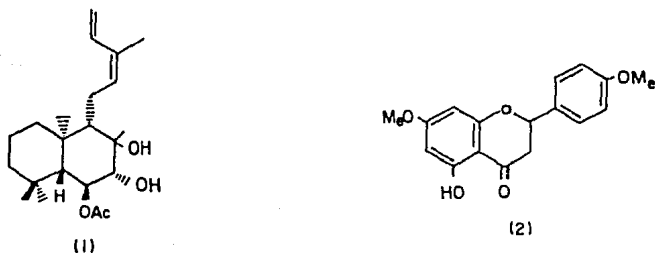


Figura 1. Constituyentes aislados de las variedades típica Robinson y salicifolia de la S. salicifolia.

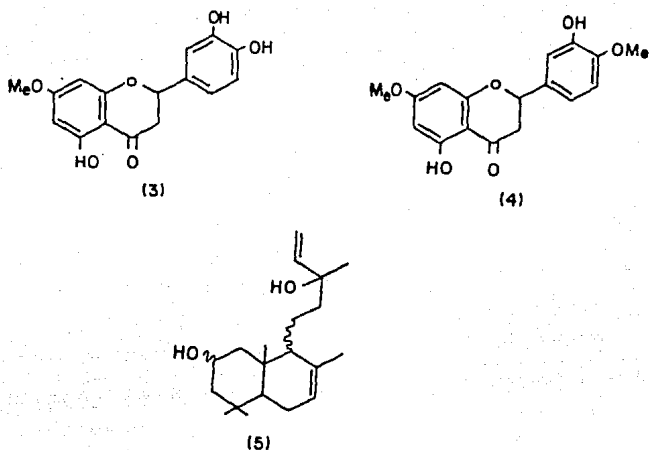


Figura 1. Constituyentes aislados de la variedad típica Robinson de la S. salicifolia (continuación).

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). Ambos compuestos fueron obtenidos como ésteres metílicos. En la Figura 2. se ilustran sus estructuras respectivas.

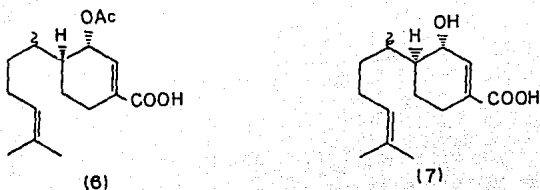
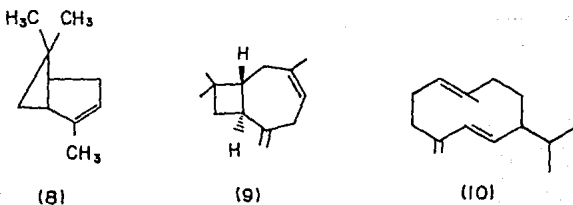
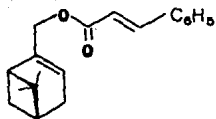


Figura 2. Constituyentes aislados de la variedad típica Robinson de la *S. salicifolia*

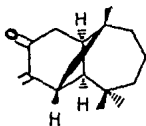
Finalmente un grupo alemán (Bohlmann et al., 1985) estudió el material recolectado en el Cerro del Gallego en el Cañón del Cobre, Estado de Chihuahua, México, en abril de 1984. En este caso, se logró el aislamiento y caracterización de 31 compuestos. La mayoría de los constituyentes obtenidos son sesquiterpenoides del tipo longipineno. En la Figura 3. se resumen las estructuras de los compuestos identificados en esta investigación.



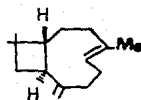




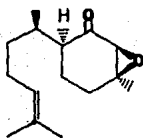
(11)



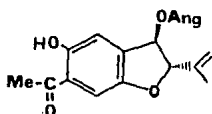
(12)



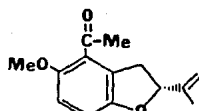
(13)



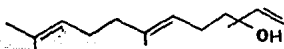
(14)



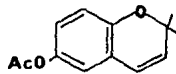
(15)



(16)

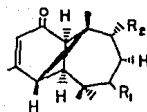


(17)



(18)

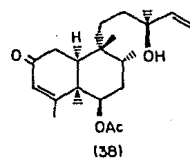
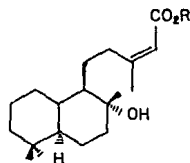
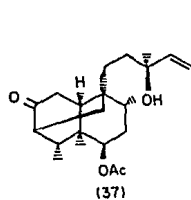
Figura 3. Constituyentes de *S. salicifolia* aislados por Bohlmann y colaboradores (continuación).



19   20   21   22   23   24   25   26   27   28   29   30   31   32

R<sub>1</sub> -OAng -OAng -OAng -OAng -OMeacr -OIBu -OMeacr -OMeacr -OAng -OMeacr -OAng -OEpang -OEpang -H

R<sub>2</sub> -OAng -OIsen -H -OIsen -H -OIBu -OAng -OMeacr -OMeacr -OAc -OAng -OAng -OAng -H



33   34   35   36\*

R -Me -H -Me 13,14-H<sub>2</sub>

Figura 3. Constituyentes de *S. salicifolia* aislados por Bohlmann y colaboradores (continuación).

## II. JUSTIFICACION Y OBJETIVO

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 (Farnsworth y Bigel, 1977; Farkas, 1980; Farnsworth, 1980; Bingel, 1977; Graleffi, 1980; Fairbairn, 1980; Salemink, 1980; inter alia). En México, la práctica de este tipo de medicina se remonta desde épocas precolombinas hasta nuestros días, encontrándose que el mayor número de usuarios, pertenece a comunidades de bajos recursos económicos y determinados grupos étnicos; así por ejemplo, los indígenas tarahumaras usan aproximadamente 300 especies vegetales diferentes para el alivio de sus enfermedades (Bye, 1985). Entre esas plantas se encuentra la S. salicifolia que, como ya se especificó previamente, es ampliamente utilizada para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales.

Considerando lo antes expuesto, el propósito del presente trabajo es el de realizar el estudio fitoquímico preliminar de la S. salicifolia como parte de un estudio sistemático de plantas mexicanas usadas en la medicina vernácula (García, 1987; Albor, 1988; Castañeda, 1987; Camacho, 1989 inter alia).

Como ya se ha señalado en múltiples ocasiones los objetivos fundamentales de ese estudio sistemático son: contribuir al conocimiento de la flora medicinal mexicana y aislar compuestos bioactivos. Es indudable que de cumplirse satisfactoriamente los objetivos planteados se contribuiría a la resolución de problemas sanitarios y económicos, ya que, se podrían obtener principios activos nuevos o conocidos a partir de materias primas nacionales.

Los objetivos específicos pertinentes para el logro 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 hexánico de acuerdo a la metodología convencional y fraccionarlo 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 de los extractos, fracciones y compuestos aislados para la Artemia salina Leach, considerando, que este bioensayo permite detectar en forma preliminar actividades biológicas más complejas (Meyer, et al., 1982).

- 2.6 Correlacionar los resultados obtenidos sobre la composición química de las especies relacionadas con la información previamente descrita en la literatura.

### 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 viales en forma independiente 500, 50 y 5  $\mu$ l de la solución original. Como las pruebas se hacen por triplicado se utilizan un total de nueve viales (tres con una concentración de 1000  $\mu$ g, tres con una concentración de 100  $\mu$ g y los últimos tres con una concentración de 10  $\mu$ g). 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 viales, conteniendo la muestra a evaluar, más 5 ml de medio salino, 24 horas más tarde se registran el número de organismos sobrevivientes. Los resultados finales se expresan en porcentaje de muerte de los crustáceos o calculando la dosis letal media ( $LD_{50}$ ).

### 3.2 Material vegetal.

La raíz de S. salicifolia fue recolectada en el municipio 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.

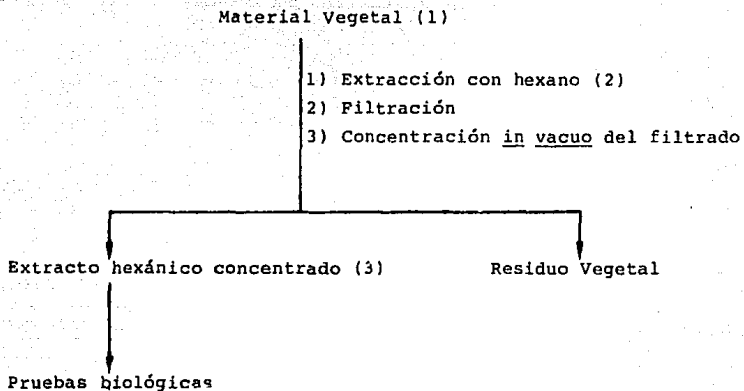
Una muestra de referencia se depositó en la colección etnobotánica del Herbario Nacional (Voucher R. Bye 16657).

El material vegetal (raíces tipo dendríticas, color café y sabor amargo) se secó a temperatura ambiente y se molturó en un molino tipo Wiley 4.

### 3.3 Métodos de extracción y fraccionamiento preliminar.

El material vegetal se extrajo según el procedimiento señalado en el Esquema 1.

Una parte del extracto hexánico (200 g) se fraccionó mediante una cromatografía preparativa en columna, utilizando como adsorbente gel de sílice (1 Kg, sílica gel G 60 Merck, malla 0.2-0.5 y 1 Kg de sílica gel G 60 Merck malla 0.063). El proceso de elución se efectuó con hexano y hexano-acetato de etilo, en diferentes proporciones. Se recogieron un total de 190 fracciones de 500 ml cada una. Cada fracción fué analizada por cromatografía en capa fina, combinándose aquellas cromatográficamente similares. A su vez cada una de las fracciones fué evaluada biológicamente utilizando la prueba de toxicidad antes mencionada. En el



1) 2.7 Kg

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

3) 215.44 g.

Esquema 1. Preparación del extracto hexánico de S. salici-  
folia Cav.



Cuadro 4 se resumen los sistemas eluyentes empleados, el número de fracciones eluidas con cada uno de ellos, las fracciones combinadas y los resultados obtenidos de la prueba biológica.

Cuadro 4. Resumen del fraccionamiento vía cromatografía en columna del extracto hexánico de las raíces de S. salicifolia Cav. (Columna 1).

Eluyente	Proporción	No. de fracciones	Combinación de fracciones	Resultado del bioensayo*
Hexano	100	1- 69	1	inactiva
			2- 7	activa
			8- 13	inactiva
			14- 41	inactiva
			42- 70	activa
Hexano:AcOEt	9:1	70- 93	71- 93	activa
Hexano:AcOEt	8:2	94-117	94-112	inactiva
Hexano:AcOEt	7:3	118-130	113-162	inactiva
Hexano:AcOEt	6:4	131-143		
Hexano:AcOEt	1:1	147-162		
Hexano:AcOEt	25:75	163-177	163-192	inactiva
AcOEt	100	178-186		
Acetona	100	187-192		

\*A una concentración de las fracciones de 1000 ppm.

Los análisis cromatográficos en capa fina se efectuaron siguiendo las técnicas convencionales, utilizando placas de vidrio recubiertas de gel de sílice (silica gel 60 GF<sub>254</sub>, Merck), varios sistemas eluyentes y como agente cromogénico se utilizó una solución reactivo de sulfato cérico en ácido sulfúrico concentrado, y para lograr el desarrollo de color era necesario calentar por dos minutos a 110°C (Stahl, 1969). En todos los casos antes de revelar con el agente cromogénico se procedió a visualizar las placas de U.V. (onda corta y larga). Como fase móvil se utilizaron varios sistemas de disolventes, hexano:acetato de etilo; cloroformo; cloroformo:acetato de etilo; benceno:acetato de etilo y hexano:cloroformo en diversas proporciones.

### 3.4 Aislamiento y Purificación de los compuestos.

#### 3.4.1 Obtención del Dammaran-13(17),24-dien-3 $\beta$ -ol acetato (39).

De las fracciones 14-41 de la columna I (ver Cuadro 4) se obtuvieron 867.4 mg de un polvo cristalino blanco de pf. 56-58°C.

#### 3.4.2 Obtención del Dammaran-14,20-diol (40).

De las fracciones 42-48 de la columna I (ver Cuadro 4) se obtuvieron 171.7 mg de un polvo cristalino blanco de pf. 245-246°C.

### 3.4.3 Obtención del Estigmasterol (41).

Las fracciones 71-93 (33.34 g) de la columna I se re-cromatografiaron mediante una cromatografía preparativa en columna (III) utilizando como adsorbente 334 g de gel de sílice G 60 Merck malla 0.063, y como eluyentes benceno, benceno-AcOEt, en diferentes proporciones. Se recogieron un total de 125 fracciones de 100 ml cada una (ver Cuadro 5). Cada fracción fue analizada por cromatografía en capa fina y evaluada contra A. salina Leach.

De las fracciones 26-30 de la columna III (ver Cuadro 5) se obtuvieron 29.2 mg de un polvo cristalino blanco con pf 107-108°C.

Cuadro 5. Resumen del fraccionamiento vía cromatografía en columna de las fracciones 71-93 de las raíces de S. salicifolia Cav. (Columna III).

Eluyente	Proporción	No. de fracciones	Fracciones combinadas	Ensayo biológico
Benceno	100	1- 4	1- 4	inactiva
			5	inactiva
			6	inactiva
			7- 8	inactiva
			9- 11	inactiva
			12- 25	inactiva
			26- 30	activa

Cuadro 5. Resumen del fraccionamiento vía cromatografía en columna de las fracciones 71-93 de las raíces de S. salicifolia Cav. (Columna III). Continuación.

Eluyente	Proporción	Nb. de fracciones	Fracciones combinadas	Ensayo biológico
			31- 35	activa
Benceno:AcOEt	95:5	43- 68	36- 48	activa
			49	inactiva
			40- 62	inactiva
			63- 67	activa
Benceno:AcOEt	9:1	69- 90	68- 69	inactiva
Benceno:AcOEt	85:15	91- 95	70- 95	inactiva
Benceno:AcOEt	1:1	96-108	96-102	inactiva
			103	inactiva
			104-108	inactiva
AcOEt	100	109-114	109	inactiva
			110	inactiva
			111	inactiva
			112	inactiva
			113	inactiva
			114	inactiva
MeOH	100	115-125	115-125	inactiva

### 3.5 Caracterización de los compuestos aislados.

#### 3.5.1 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 I.R., fueron registrados en un espectrofotómetro de rejilla Perkin-Elmer Modelo 549B en pastilla de KBr.
- c) Las rotaciones ópticas se midieron en un polarímetro 241 Perkin-Elmer, tras previa disolución de los productos en  $\text{CHCl}_3$ .
- d) Los espectros de masas fueron obtenidos en un aparato Hitachi-Perkin Elmer RMU-6<sub>D</sub> en el Instituto de Química de la UNAM.
- e) Los espectros de RMNP y  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  se determinaron en un instrumento Varian EM 390 (Facultad de Química, UNAM); y Varian VXR-300S (Instituto de Química de la UNAM), utilizando como disolventes  $\text{CDCl}_3$  y/o  $\text{DMSO-d}_6$  y como referencia interna TMS.

#### 3.5.2 Pruebas químicas preliminares para identificación de triterpenos.

- 3.5.2.1 Prueba de Liebermann-Burchard: 1 ml de anhídrido acético y uno de cloroformo, se enfrían a  $0^\circ\text{C}$  y se le añade 1 gota de ácido sulfúrico.

3.5.2.2 Prueba de tetranitrometano: la sustancia (0.5 mg) disuelta en 1 ml de cloroformo o tetracloruro de carbono da con una gota de trinitrometano (solución clorofórmica al 10%), colores de amarillo a rojo.

### 3.5.3 Obtención del acetyl derivado del estigmasterol (41a).

Para formar el derivado acetylado del estigmasterol se empleo 1 ml de anhídrido acético y 1 ml de piridina por cada 100 mg de producto. La mezcla de reacción se dejó por 12 hrs. a temperatura ambiente y al cabo del tiempo señalado se proceso de manera habitual (Shriner, Fuson-Curtin, 1980). Se acetylaron 20 mg de estigmasterol, obteniéndose 17 mg de compuesto acetylado con un p.f. de 58-60°C.

### 3.5.4 Obtención del derivado desacetylado de Dammaran-13(17),24-dien-3 $\beta$ -ol acetato (39a).

A 80 mg de (39) se le adicionaron 5 ml de NaOH 2N, la mezcla resultante se hirvió a reflujo durante 6 hrs. Al cabo de este tiempo se adicionaron 5 ml de EtOH y luego de eliminar el disolvente se obtuvo un sólido cristalino el cual fué recrystalizado en EtOH para originar 40 mg de Dammaran-13(17),24-dien-3 $\beta$ -ol (39a) con p.f. 96-98°C.

### 3.5.5 Obtención del Dammaran-13(17),24-dien-3-ona (39b) y del Dammaran-20-ol-1-ona (40a).

A 35 mg del compuesto a oxidar, previamente disuelto

en acetona, se le adicionaron 0.5 ml del reactivo de Jones\*. La mezcla de reacción se mantuvo con agitación continua a temperatura ambiente. Al cabo de cinco minutos, toda la materia prima se había agotado. La solución fue diluida con 5 ml de agua y se extrajo tres veces con volúmenes de 5 ml de cloroformo en cada ocasión. La fase orgánica se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se llevó a sequedad a presión reducida. Los rendimientos se muestran en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Rendimientos y puntos de fusión de los productos oxidados.

Clave	Compuesto	Cantidad obtenida (mg)
<u>39b</u>	Dammaran-13(17),24-dien-3-ona	29.8
<u>40a</u>	Dammaran-20-ol-1-ona	26.2

\*Reactivo de Jones: 2.6 g de  $\text{CrO}_3$  se disuelven en 2.5 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y 4 ml de agua. Esta solución se afora a 10 ml.

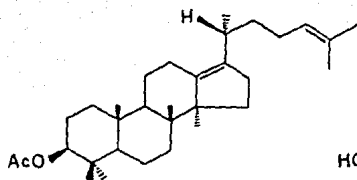
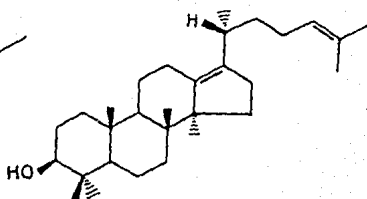
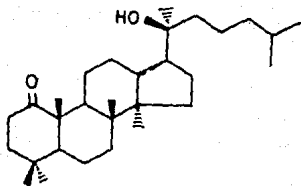
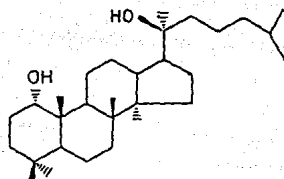
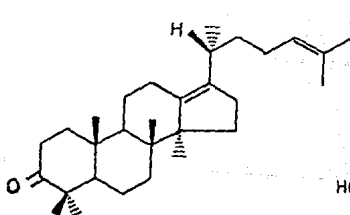
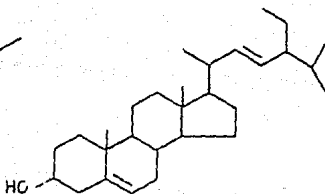
3939a40a4039b41

Figura 4. Estructuras de los compuestos y sus derivados, aislados del extracto hexánico de S. salicifolia



## IV. RESULTADOS Y DISCUSION

La determinación de la toxicidad para A. salina Leach del extracto hexánico de las raíces de la S. salicifolia, de acuerdo al procedimiento de Meyer y colaboradores (Meyer et al, 1982) arrojó resultados poco halagadores - la  $LC_{50}$  del extracto fué mayor superior a 1000 ppm-. Según los autores mencionados la expectativa de encontrar sustancias bioactivas es superior cuando las dosis letales medias de los extractos vegetales son menor o igual a 1000 ppm (Meyer et al, 1982). A pesar de estos resultados y ante la posibilidad de que la baja actividad se debiera a la presencia de compuestos con efectos antagónicos, en la planta, se consideró pertinente evaluar las fracciones resultantes de la cromatografía del extracto hexánico. Como se puede apreciar en el Cuadro 4 solo las fracciones 2-7, 42-70 y 71-93 presentaron moderada toxicidad para A. salina Leach, en todos los casos la evaluación se realizó a 1000 ppm dada la baja toxicidad del extracto original. Estas fracciones presentaron la inconveniencia de ser mezclas muy complejas. Además, la cantidad obtenida, fue mínima. Considerando lo anterior, se decidió entonces proceder al estudio fitoquímico convencional de las diferentes fracciones.

Como resultado de este proceso se aislaron dos triterpenos tetracíclicos del tipo dammarano y un esteroide del tipo estigmastano. Los triterpenos fueron identificados mediante

métodos químicos y espectroscópicos como: Dammaran-13(17), 24-dien-3 $\beta$ -ol acetato (39) y Dammaran-1 $\alpha$ ,20-diol (40). Ambos, nuevos productos naturales. El esteroide se identificó como estigmasterol (41), mediante la comparación de sus constantes físicas y espectroscópicas con el de una muestra auténtica. En el Cuadro 7 se resumen los rendimientos de los compuestos aislados.

Cuadro 7. Rendimientos de los compuestos aislados del extracto hexánico de las raíces de S. salicifolia.

Nombre	Cantidad obtenida (mg)	% en relación a planta seca
<u>39</u> Dammaran-13(17),24-dien-3-ol acetato	867.4	0.032
<u>40</u> Dammaran-1,20-diol	171.7	0.0033
<u>41</u> Estigmasterol	29.2	0.0011

La elucidación estructural de los mismos será el objetivo primordial de la siguiente discusión.

#### 4.1 Identificación de los compuestos aislados.

##### 4.1.1 Identificación del Dammaran-13(17),24-dien-3 $\beta$ -ol acetato (39).

El componente de menor polaridad obtenido del extracto hexánico de S. salicifolia corresponde a un sólido blanco

crystalino de p.f. 56-58°C, ópticamente activo. Su fórmula molecular se determinó como  $C_{32}H_{52}O_2$  mediante espectrometría de masas.

La naturaleza triterpénica del mismo se verificó a priori al reaccionar positivamente frente a los reactivos de Liebermann Burchard (Domínguez, 1973) y trinitrometano (Domínguez, 1973).

Las constantes físicas y espectroscópicas empleadas para su caracterización se resumen en los Cuadros 8, 9 y 10.

Su espectro de IR (ver Cuadro 8 y Espectro 1) presentó absorciones características para grupos carbonilo de acetato ( $1740$  y  $1250\text{ cm}^{-1}$ ) y para gem-dimetilo ( $1370\text{ cm}^{-1}$ ). La saponificación de (39) con NaOH generó el alcohol (39a), en tanto que la oxidación de este último con el reactivo de Jones originó la cetona (39b), confirmándose químicamente la presencia de una función éster en el producto natural y de una función carbinólica secundaria en el producto de saponificación, respectivamente. En el espectro IR de (39a) (Cuadro 8) se observó la desaparición de la banda del grupo carbonilo y la aparición de una banda asignable a un hidroxilo de alcohol ( $3500\text{ cm}^{-1}$ ).

Cuadro 8. Constantes físicas y espectroscópicas de Dammaran-13(17)-dien-3<sup>o</sup>-ol acetato (39) y su derivado desacetilado correspondiente (39a).

		I.R. (cm <sup>-1</sup> )		E.M. (m/z, rel. int.)		
	39	39a	39	39a	39	39a
			3025	3350	468 (M <sup>+</sup> , 9.3)	426 (M <sup>+</sup> , 4.1)
P.M.	C <sub>32</sub> H <sub>52</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O	2950	2950	452 (M-15, 25)	411 (M-15, 10)
			2925	-	408 (M-60, 1)	393 (M-15, 18, 7)
p.f. (°C)	56-58	117-118	2850	-	393 (M-15, 60, 22)	355 (M-69-2, 1)
			1740	-	373 (1), 241 (5)	342 (1)
CHCl <sub>3</sub>	+32.0°	+19.44°	1465	1460	243 (1), 227 (4)	339 (M-69-18, 1)
			1455	1455	119 (15), 111 (10)	325 (M-83-18, 1)
			1370	1380	109 (25, 83 (30)	229 (5), 205 (3)
			1250	1200	55 (403), 41 (50)	83 (25), 69 (100)
					69 (76), 43 (100)	41 (56)

Los espectros de masas de los compuestos (39) y (39a) presentaron iones moleculares de m/z 468 y 426 congruentes con las fórmulas moleculares C<sub>32</sub>H<sub>52</sub>O<sub>2</sub> y C<sub>30</sub>H<sub>50</sub>O, respectivamente. También se observaron fragmentos indicativos de un triterpeno tetracíclico con una cadena lateral idéntica a las del lanosterol y zimosterol (Duffield, 1969). Los fragmentos más importantes para ambos compuestos se resumen en el Cuadro 8 y en la Figura 5.

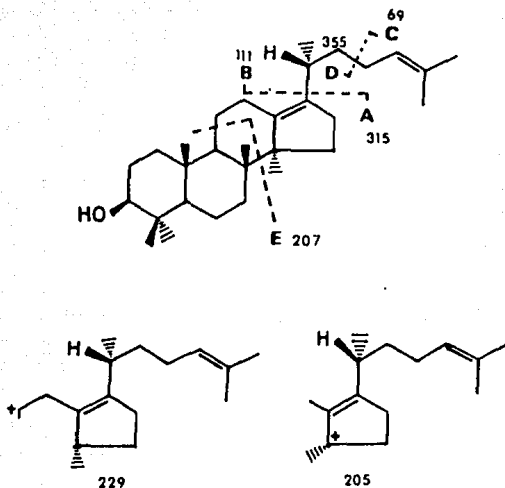


Figura 5. Principales fragmentos observados en el espectro de masas del alcohol (39a).

Los espectros de RMN<sup>1</sup>H (Cuadro 9) del producto natural (39) (Espectros 2 y 3) y sus derivados (39a) (Espectros 6 y 7) y (39b) (Espectro 10) fueron muy similares. En todos los casos se observaron señales para ocho metilos y para un multiplete que integraba para un hidrógeno a  $\delta$  5.09, atribuible al hidrógeno vinílico de una doble ligadura trisustituida. De acuerdo con la teoría del desplazamiento químico y la multiplicidad de las señales, dos de los ocho metilos debían estar ubicados sobre una doble ligadura, [ $\delta$  1.68 y 1.60 en (39),  $\delta$  1.68 y 1.62 en (39a) y  $\delta$  1.60 y 1.65 en (39b)], y un tercero debía ser geminal a un metino ( $\delta$  0.85, d, J= 6 Hz, en los tres casos).

Además de las señales antes indicadas, el espectro del triterpeno natural (39) mostró un singulete característico para el metilo de un grupo acetato a  $\delta$  2.05 y un doblete de dobletes ( $J=10,6$  Hz) a  $\delta$  4.5 asignable al hidrógeno secundario geminal a una función éster. Esta última señal se encontraba diamagnéticamente desplazada a  $\delta$  3.15 en el alcohol (39a) y ausente en la cetona (39b).

Cuadro 9. Datos de RMN<sup>1</sup>H para el Dammaran-13(17),24-dien-3 $\beta$ -ol acetato (39), sus derivados (39a) y (39b) y para protostanol (42).

Compuesto (disolvente)	H-3	H-24	H-26, H-27	H-21	H-18, H-19, H-28, H-30
<u>39</u> (CDCl <sub>3</sub> )	4.55 dd (10,6 Hz)	6.09 t	1.68 s 1.60 s	0.85 d (6 Hz)	0.75 s 0.90 s 0.89 s 0.98 s
<u>39a</u> (CDCl <sub>3</sub> )	3.15 dd (10,6 Hz)	5.09 t	1.68 s 1.62 s	0.85 d (6 Hz)	0.75 s 0.96 s 0.87 s 1.02 s
<u>39b</u> (CDCl <sub>3</sub> )	-	5.09 t	1.65 s 1.60 s	0.85 d (6 Hz)	0.78 s 0.90 s 1.04 s 1.05 s 1.10 s
<u>42</u> (CCl <sub>4</sub> )	3.10 m	4.98 m	1.51 s 1.62 s	0.95 d (6 Hz)	0.75 s (6H) 0.92 0.95 1.05

Los espectros de  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  de los productos (39-39b) (Espectros 4,8,11 y Cuadro 10) presentaron el perfil típico de un triterpeno tetracíclico del tipo dammarano o protostano (Figura 6) (Tori *et al.*, 1988, Poehland *et al.*, 1987, Asakawa *et al.*, 1977).

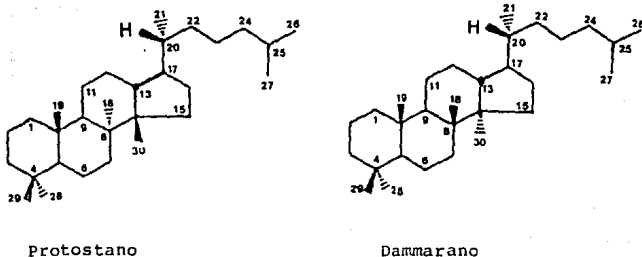


Figura 6. Esqueletos de triterpenos de los tipos protostano y dammarano.

El análisis de los espectros APT del triterpeno (39) y sus derivados permitieron establecer claramente la presencia en las moléculas de dos dobles ligaduras (una trisustituida y otra tetrasustituida), ocho metilos, diez metilenos, cuatro centros cuaternarios, cuatro metinos (uno de ellos unido a una función oxigenada en (39) y (39a); en

(39b) una de estas señales se encontraba sustituida por una absorción para cetona en anillo de seis miembros a (218.23) y de un grupo acetato en el caso del producto natural (39) (6178.9i y 21.30). [Ver Espectros 5, 9 y 12].

Cuadro 10. Datos de RMN<sup>13</sup>C\* para el Dammaran-13(17),24-dien-3-ol-acetato 39 y sus derivados 39a y 39b.

C	<u>39</u>	<u>39a</u>	<u>39b</u>
1	37.80 (+)	38.89 (+)	37.11 (+)
2	24.20 (+)	27.61 (+)	34.57 (+)
3	80.89 (-)	78.84 (-)	218.23 (+)
4	37.80 (+)	38.87 (+)	47.26 (+)
5	51.00 (-)	50.89 (-)	51.45 (-)
6	18.77 (+)	18.01 (+)	20.24 (+)
7	34.88 (+)	35.19 (+)	35.53 (+)
8	44.05 (+)	44.05 (+)	44.07 (+)
9	49.59 (-)	49.55 (-)	49.65 (-)
10	37.08 (+)	37.20 (+)	37.11 (+)
11	21.50 (+)	21.50 (+)	21.41 (+)
12	27.48 (+)	27.81 (+)	27.46 (+)
13	133.81 (+)	133.95 (+)	132.05 (+)
14	49.97 (+)	49.98 (+)	50.09 (+)
15	30.81 (+)	30.83 (+)	30.79 (+)



Cuadro 10. Datos de RMN<sup>13</sup>C\* para el Dammaran-13(17),24-dien-3 $\beta$ -ol acetato 34 y sus Derivados 39a y 39b.  
(Continuación).

C	<u>39</u>	<u>39a</u>	<u>39b</u>
16	28.12 (+)	28.13 (+)	28.13 (+)
17	133.59 (-)	133.48 (-)	134.07 (-)
18	20.18 (-)	20.11 (-)	19.76 (-)
19	15.49 (-)	15.50 (-)	15.70 (-)
20	35.84 (-)	35.85 (-)	35.85 (-)
21	24.42 (+)	24.44 (+)	24.28 (+)
22	35.37 (+)	35.35 (+)	35.36 (+)
23	24.72 (+)	24.70 (+)	24.75 (+)
24	125.16 (-)	125.16 (-)	125.09 (-)
25	130.81 (+)	130.86 (+)	130.86 (+)
26	25.72 (-)	25.73 (-)	25.75 (-)
27	17.67 (-)	17.67 (-)	17.69 (-)
28	27.95 (-)	28.01 (-)	26.67 (-)
29	16.58 (-)	15.57 (-)	21.10 (-)
30	18.89 (-)	18.89 (-)	18.89 (-)
31	21.30 (-)	-	-
32	170.99 (+)	-	-

El signo entre parentesis indica resonancia (+) ó (-) en los espectros APT.

Que la doble ligadura trisustituida se encontraba en las posiciones 24 y 25 de un núcleo de dammarano o protosano se dedujo fácilmente del fragmento de  $m/z$  69 del espectro de masas de los tres productos (39, 39a y 39b) (Figura 5) y de la presencia de dos señales para metilos vinílicos en los espectros de RMN [RMN<sup>13</sup>C:  $\delta$  25.72 y 17.67 en 39;  $\delta$  25.73 y 17.67 en 39a;  $\delta$  25.75 y 17.69 en 39b. RMN<sup>1</sup>H: 1.68 y 1.60 en 39; 1.68 y 1.62 en 39a; 1.60 y 1.65 en 39b]. Como la otra doble ligadura era tetrasustituida se ubicó en las posiciones 13(17), (la ausencia de un tercer metilo vinílico, descarto la posibilidad de ubicar la segunda doble ligadura entre las posiciones 17 y 20 que era la otra alternativa posible).

La presencia en el espectro de masas de (39a) de los fragmentos  $m/z$  205 y 207 (Figura 5) atribuibles a una ruptura de tipo alílica y de retroDiels-Alder, respectivamente, indicaron con claridad que el grupo hidroxilo, (y en consecuencia los grupos acetoxi y ceto de 39 y 39b se localizaban en los anillos A y B de la estructura tipo. El desplazamiento químico observado para los metilos a  $\delta$  16.58 (C-29) y  $\delta$  27.95 (C-28) en (39) y a  $\delta$  15.57 (C-29) y  $\delta$  28.01 (C-28) en (39a), característicos para los gem-dimetilos en el carbono cuatro de numerosos triterpenos era consistente con la presencia de la función oxigenada en la posición C-3 (Lee-Juain *et al*, 1989, Tori *et al*, 1988

inter alia). Congruente con esta proposición fue el cambio de desplazamiento químico observado para C-28 ( $\delta$  26.67) y C-29 ( $\delta$  21.10) en el producto de oxidación (39b) (Tori et al, 1988; Lin et al, 1989). Así mismo, el patrón de acoplamiento (dd,  $J=11.5$  Hz) observado para los hidrógenos geminales del éster (39) y del alcohol (39a) era consistente con la disposición  $\alpha$  de los mismos (Baker et al, 1976).

La diferencia de los desplazamientos químicos observados en el espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$  del alcohol (39a) con respecto a los previamente descritos para el 3-hidroxi-protosta-13(17),24-dieno (Hattori et al, 1969) permitieron establecer claramente que el núcleo del producto de saponificación debía ser un dammarano. En el Cuadro 9 se indican de manera comparativa los desplazamientos químicos del (39a) y del 3 $\beta$ -hidroxi-protosta-13(17),24-dieno y como se puede apreciar las diferencias más significativas se encuentran en los desplazamientos químicos de los metilos.

Por último, la estereoquímica S del centro quiral en el carbono veinte se estableció por comparación de los desplazamientos químicos observados para C-20 y C-21 en el espectro de C-13 con aquellos previamente descritos para una serie de compuestos similares (Baker, et al, 1976 ; Asakawa et al, 1977).

Con base en la discusión anterior, el nuevo producto natural fue identificado como el dammaran-13(17),24-dien-3 $\beta$ -ol acetato.

#### 4.1.2 Identificación del Dammaran-1 $\alpha$ -20-diol (40).

El segundo compuesto obtenido de las fracciones de mayor polaridad del extracto hexánico de S. salicifolia se obtuvo como un sólido blanco de PF=254°-246°. Su fórmula molecular se estableció como C<sub>30</sub>H<sub>54</sub>O<sub>2</sub> por espectrometría de masas y al igual que el compuesto (39) reaccionó positivamente frente a los reactivos de Lieberman-Burchard y tetranitrometano. Las constantes físicas y espectroscópicas utilizadas para su identificación se resumen en los Cuadros 11 y 12.

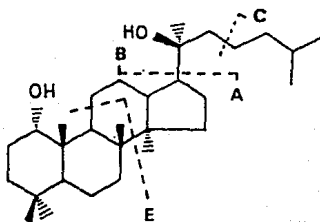
El espectro de I.R. (Cuadro 11, Espectro 13) presentó bandas de absorción para hidroxilo (3470 cm<sup>-1</sup>) y gem-dimetilo (1440 y 1380 cm<sup>-1</sup>). Su espectro de RMN<sup>1</sup>H mostró resonancias para ocho metilos ( $\delta$  0.85, 0.87, 0.92, 0.94, 0.96 y 0.98), el hidrógeno geminal de un alcohol secundario ( $\delta$  3.72 m, 1H) y para dos hidrógenos de funciones hidroxílicas ( $\delta$  3.72 y 1.25). El tratamiento de (40) con reactivo de Jones permitió la obtención de la cetona (40a). El espectro de RMN<sup>1</sup>H (Cuadro 12 Espectros 16 y 17) de la cetona fue similar al del producto natural difiriendo principalmente en la ausencia de la señal carbinólica secundaria y en los desplazamientos químicos de las resonancias de los metilos. Este espectro también mostró una señal para hidroxilo de alcohol, confirmandose la presencia de un alcohol terciario en (40) y (40a).

Cuadro 11. Constantes físicas y espectroscópicas del Dammarano, 20-diol (40) y su cetona correspondiente (40a).

		I.R. (cm <sup>-1</sup> )		E.M. (m/z, rel. int.)		
	<u>40</u>	<u>40a</u>	<u>40</u>	<u>40a</u>	<u>40</u>	<u>40a</u>
			3470	3400	428 (M-H <sub>2</sub> O, 10)	426 (M-H <sub>2</sub> O, 4.7)
F.M.	C <sub>30</sub> H <sub>54</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>30</sub> H <sub>52</sub> O <sub>2</sub>	2900	1700	413 (M-H <sub>2</sub> O-15, 12)	411 (M-H <sub>2</sub> O-15, 5)
			2850	2900	395 (M-2H <sub>2</sub> O-15, 5)	302 (5), 273 (6)
P.F.	245-246°C	aceite	1440	2850	304 (6), 275 (12)	205 (19), 123 (58)
			1380	1441	207 (10), 206 (8)	111 (20), 109 (73)
[α] <sub>D</sub> <sup>20</sup>	-4.79	+5.72	1170	1385	165 (48), 125 (55)	96 (77.1), 95 (100)
				1170	111 (20), 109 (73)	81 (70), 69 (88)
					96 (77.1), 95 (100)	
					81 (70), 69 (88)	

El espectro de masas presentó fragmentos característicos para un triterpeno del tipo dammarano. Los fragmentos de masas resultantes se resumen en el Cuadro 11 y en la Figura 7. Los fragmentos a m/z 206 y 207 en el producto natural indican claramente la presencia de un alcohol secundario en los anillos A ó B del esqueleto base. Estos fragmentos se observaron en la cetona a m/z 205 y 204 y los mismos resultan de una ruptura de tipo retro Diels-Alder. Por otra parte los fragmentos a m/z 111, 109 y 69 (Figura 7) eran consisten-

tes con la presencia en la molécula de una cadena lateral idéntica a la de una serie de dammaranos con un grupo hidroxilo en C-20 (Tori *et al*, 1986). La estructura parcial de la cadena lateral se indica en la Figura 7.



A	= 315
B-H <sub>2</sub> O	= 111
C-2	= 69
E	= 207

Figura 7. Algunos fragmentos de masas del compuesto 40

La multiplicidad observada en el espectro de RMN<sup>1</sup>H (Cuadro 12, Espectro 15) para la función secundaria era consistente con su ubicación en las posiciones 1, 3 y 7 del núcleo dammarano, con una disposición  $\alpha$ . La comparación de las constantes físicas y espectroscópicas de los productos de oxidación del dammaran-3 $\alpha$ -20-diol y del

Dammaran-7 $\alpha$ -20-diol con los del producto de oxidación (40a), permitieron descartar las dos últimas posibilidades (Tori *et al*, 1986; Kasai *et al*, 1976). En concordancia con la disposición del hidróxilo en la posición uno fue el desplazamiento diamagnético ( $\Delta\delta=0.20$ ) observado para la señal correspondiente a H-19 en la cetona (Tori *et al*, 1988).

Cuadro 12. Datos de RMN<sup>1</sup>H para el Dammaran-1,20-diol (40) y su derivado oxidado (40a) (CDCl<sub>3</sub>).

40 (Espectros 14 y 15)	40a (Espectros 16 y 17)
0.85 (s, 3H, H-30)	0.72 (s, 3H, H-19)
0.87 (d, 6H, H-26, 27)	0.85 (s, 3H, H-30)
0.92 (s, 3H, H-19)	0.87 (d, 3H, H-26)
0.94 (s, 3H)	0.88 (d, 3H, H-27)
0.96 (s, 3H)	0.98 (d, 3H, H-18)
0.98 (s, 3H)	1.01 (s, 3H, H-29)
1.15 (s, 3H, H-21)	1.08 (s, 3H, H-28)
3.72 (m, 1H, H-1)	1.19 (s, 3H, H-21)
3.72 (m, OH)	0.95 (m, OH)
1.25 (m, OH)	

Con base a la discusión anterior se puede proponer que el alcohol (40) responde a la estructura del dammaran-1 $\alpha$ ,20-diol, el cual representa un nuevo producto natural.

## V. RESUMEN y CONCLUSIONES

- 5.1 El extracto hexánico de las raíces de Stevia salicifolia Cav. no presentó toxicidad para Artemia salina Leach ( $LC_{50} > 1000$  ppm). Así mismo las fracciones obtenidas resultaron inactivas para el crustáceo.
- 5.2 El estudio fitoquímico convencional de las fracciones inactivas del extracto hexánico permitió el aislamiento y caracterización del estigmasterol y dos triterpenos del tipo dammarano. Estos dos compuestos fueron identificados como: Dammaran-13(17),24-dien-3<sup>8</sup>-ol acetato y Dammaran-1<sub>a</sub>,20-diol ambos, nuevos productos naturales.
- 5.3 El presente trabajo constituye el segundo reporte de aislamiento de triterpenoides del tipo dammarano en el género Stevia. Previamente Bohlmann reportó el aislamiento y caracterización del Dammaran-20(21),24-dien-3<sup>8</sup>-ol acetato en Stevia boliviensis Sch. Bip.
- 5.4 Los dos triterpenos fueron no tóxicos para la A. salina ( $LC_{50} > 1000$  ppm).
- 5.5 En el presente estudio no se aislaron los metabolitos secundarios obtenidos previamente de las partes aéreas de la planta (Ortega et al, 1980; Calderón et al, 1984; Bohlmann et al, 1985). Esta diferencia del metabolismo



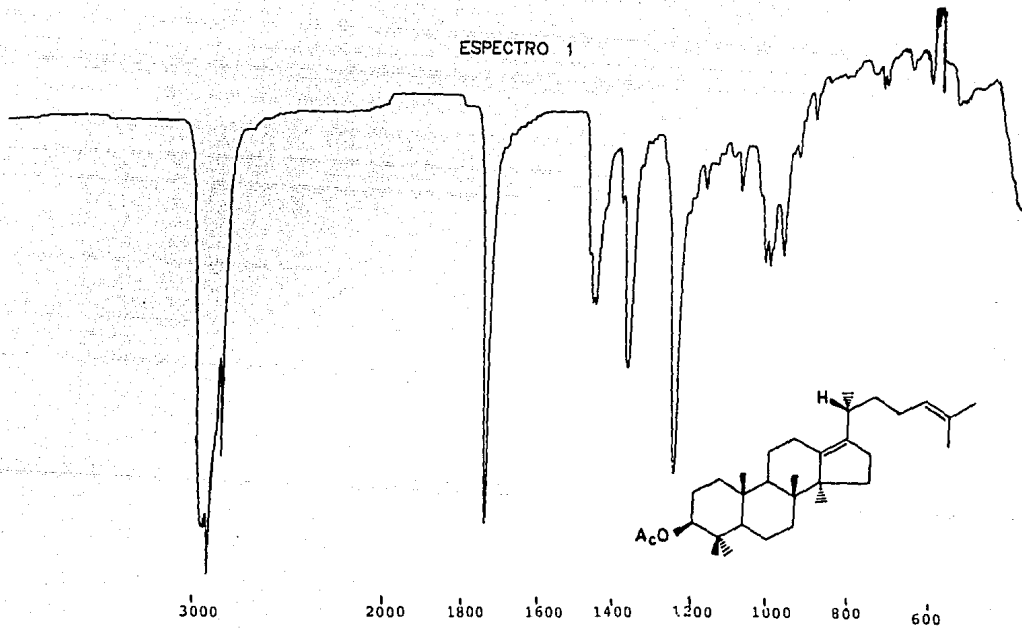
secundario puede ser atribuida, por una parte, a variaciones ontogénicas y por la otra, a la naturaleza de la parte vegetal, objeto de los diferentes estudios.

## VI. RECOMENDACIONES

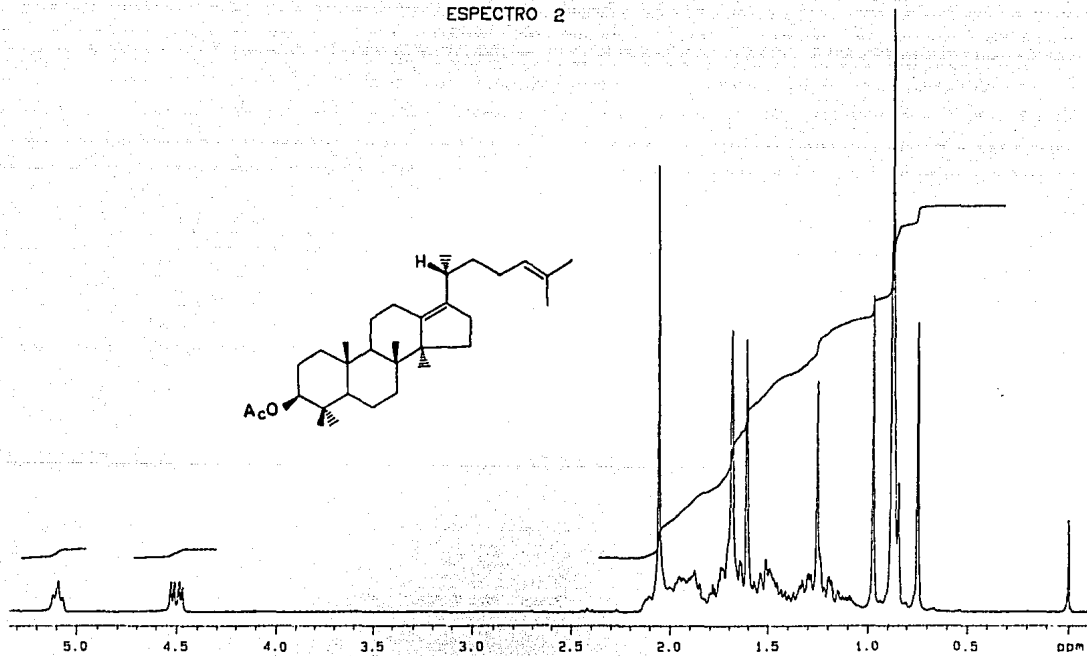
- 6.1 Considerando por una parte el uso popular de la planta y por la otra, que recientemente se ha descubierto actividad antiviral para una serie de compuestos de tipo dammarano (Poehland et al, 1987) sería conveniente evaluar los productos (39) y (40) como posibles agentes antivirales contra virus Herpes simplex de los tipos I y II.
- 6.2 Continuar el estudio químico y biológico del extracto acetónico.

## VII. ESPECTROS

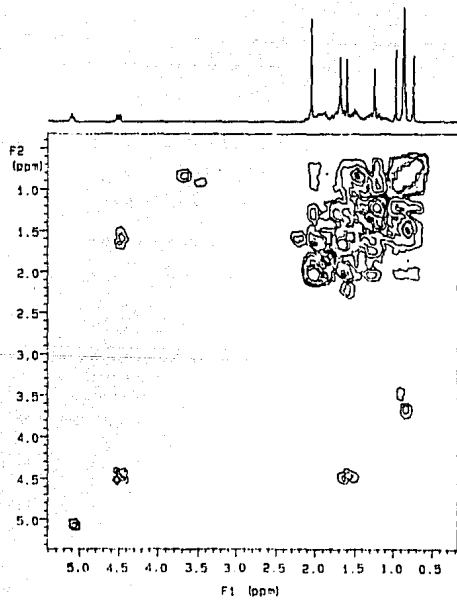
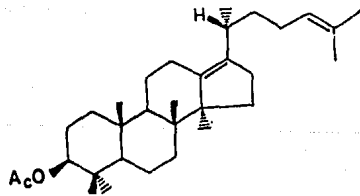
ESPECTRO 1



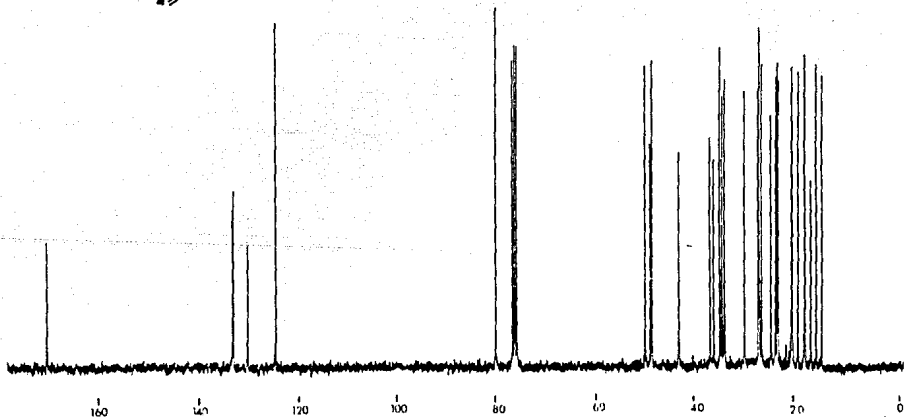
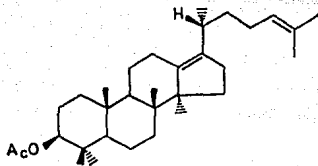
ESPECTRO 2

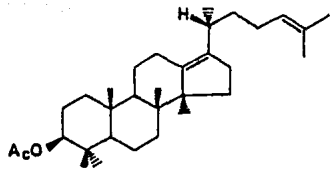


ESPECTRO 3

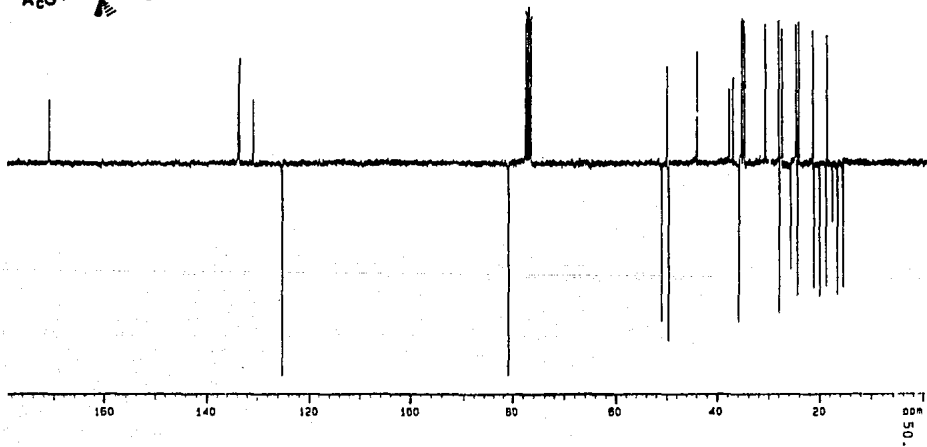


ESPECTRO 4



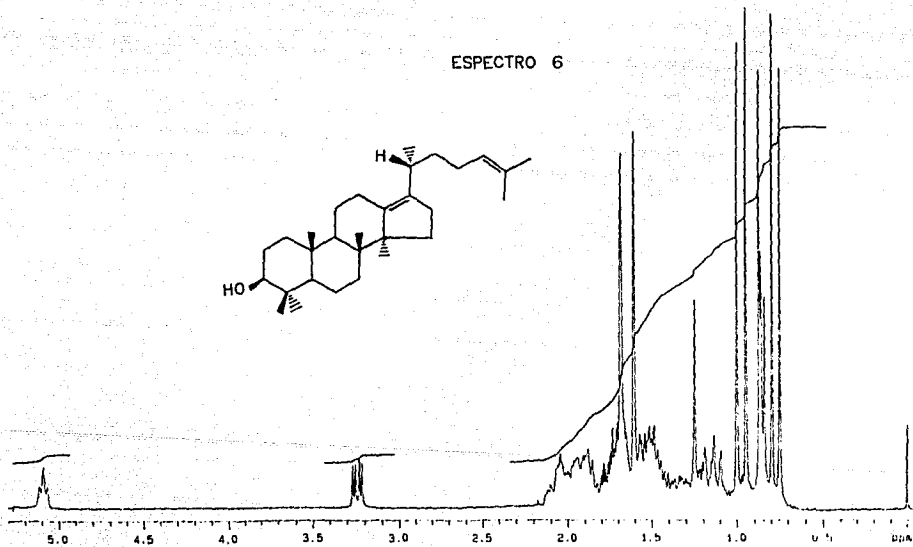
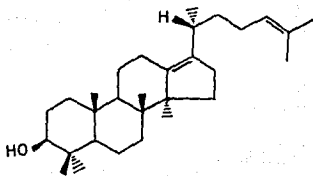


ESPECTRO 5

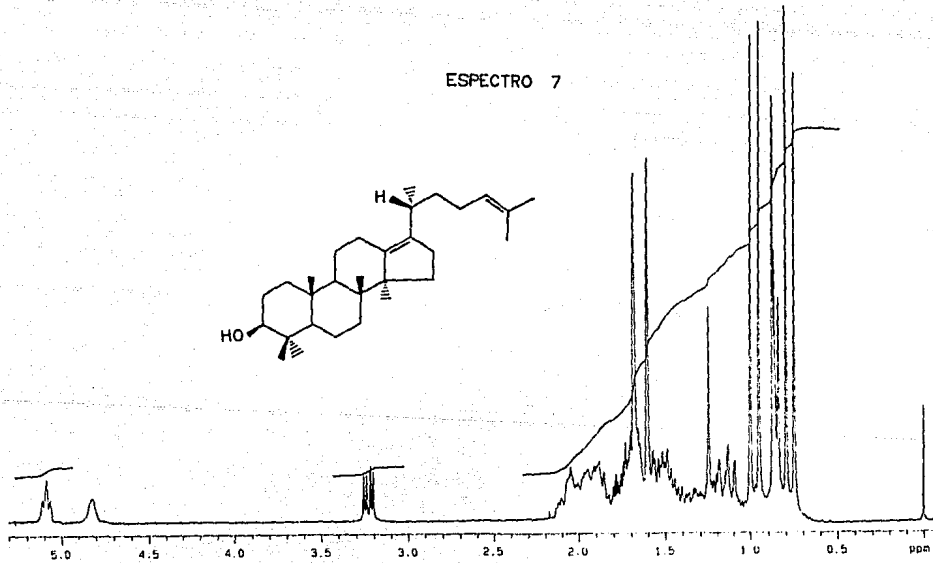
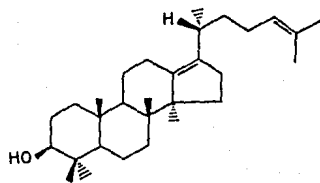




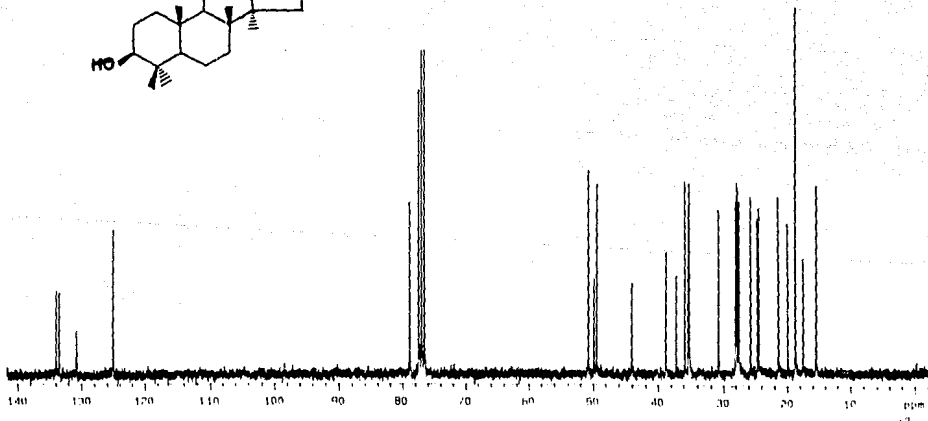
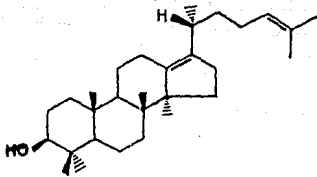
ESPECTRO 6



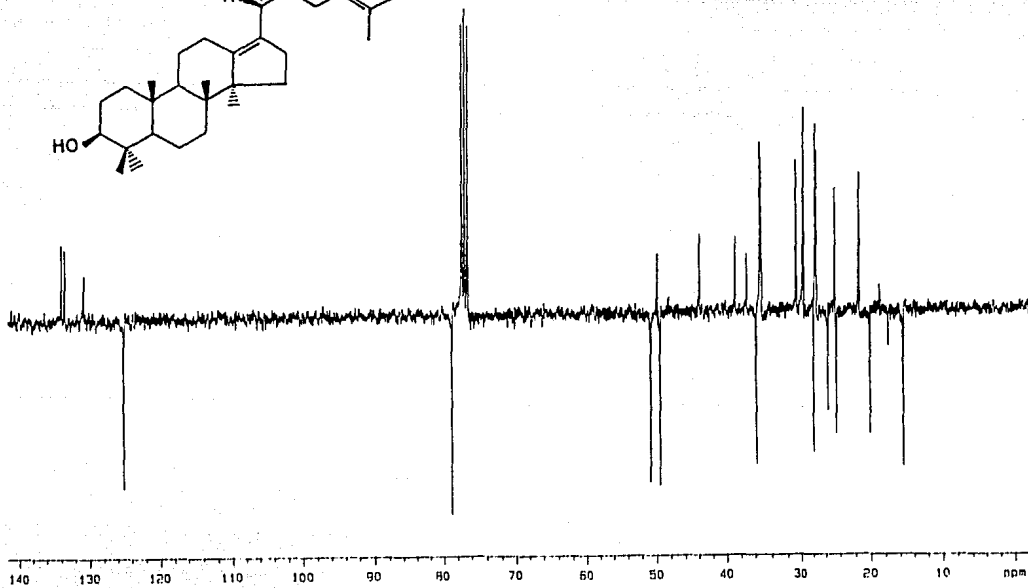
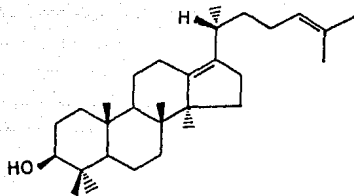
ESPECTRO 7



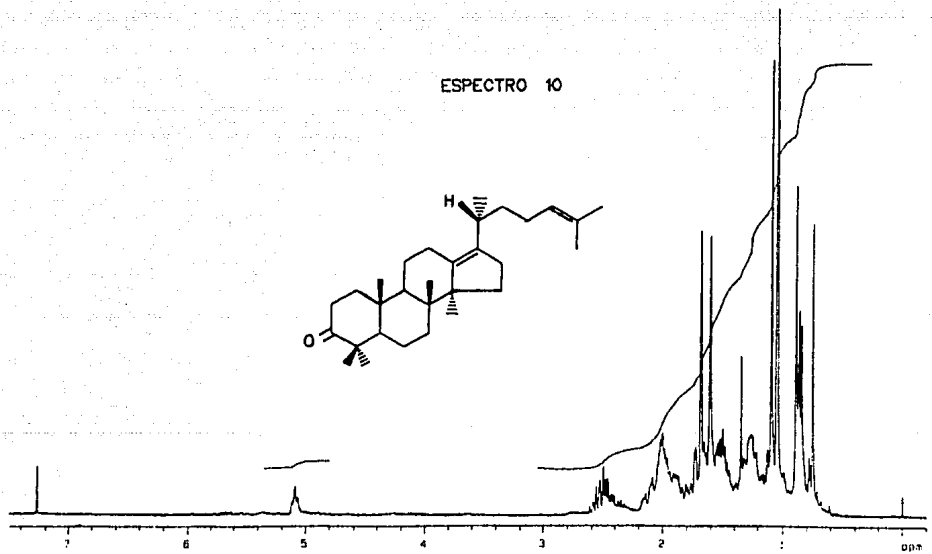
ESPECTRO 8



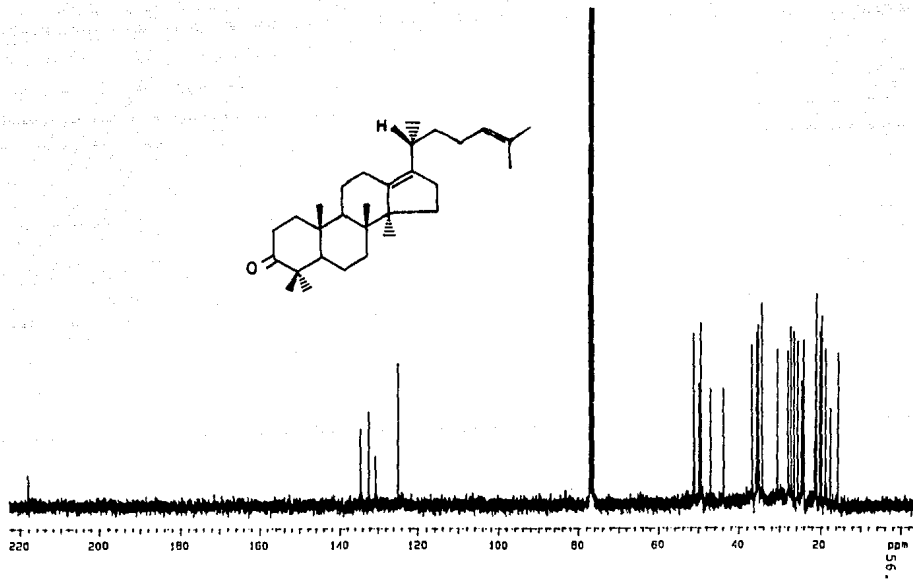
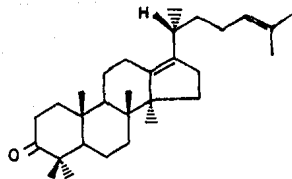
ESPECTRO 9



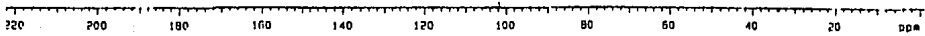
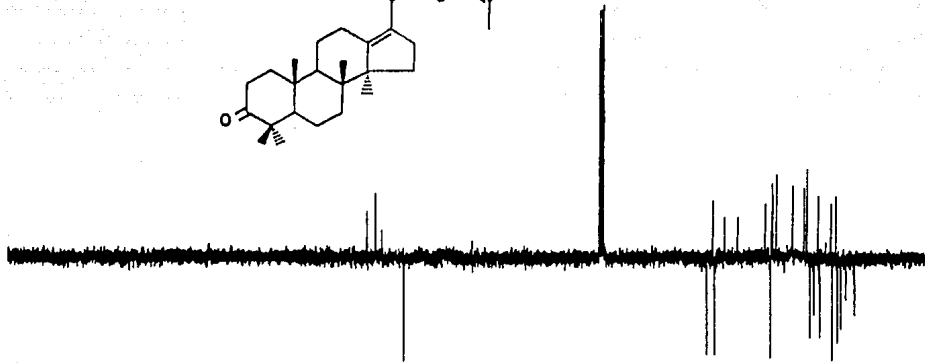
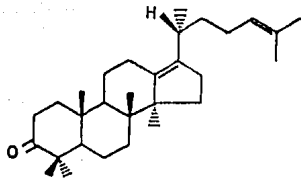
ESPECTRO 10



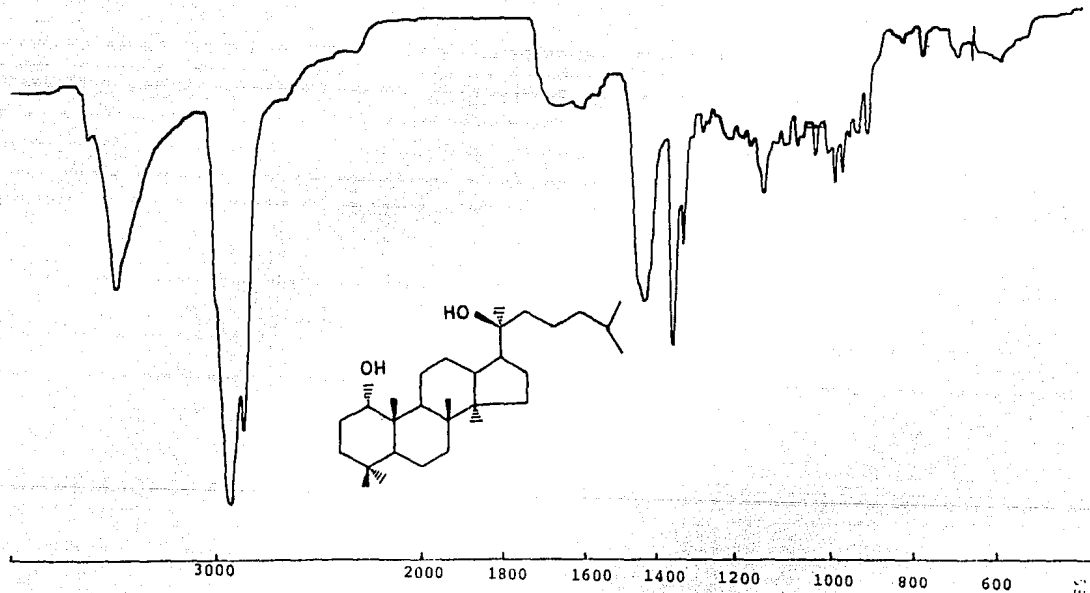
ESPECTRO 11



ESPECTRO 12

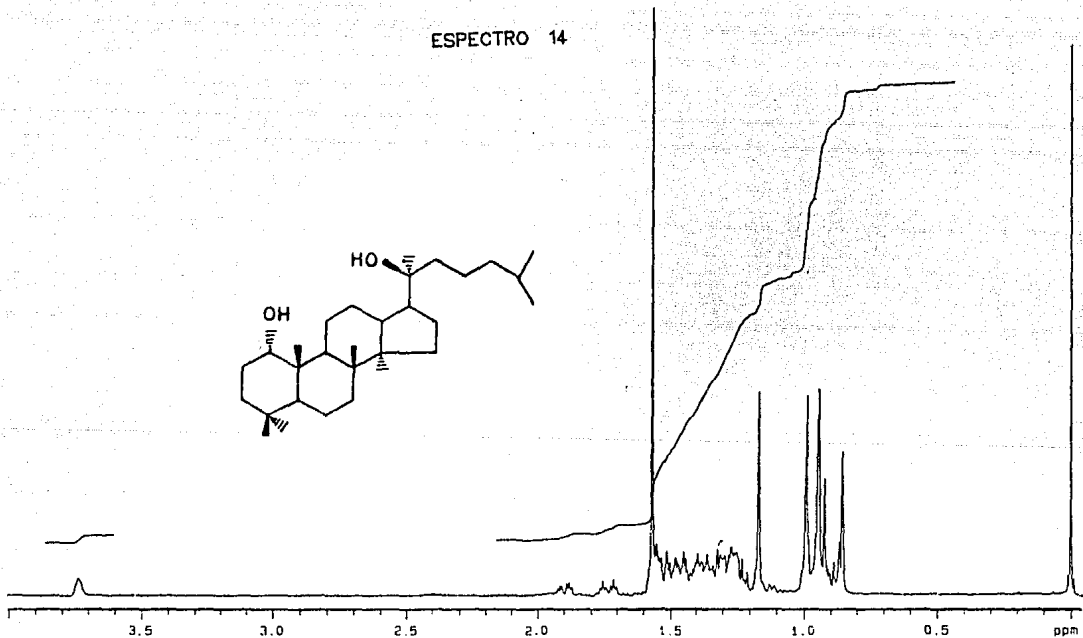
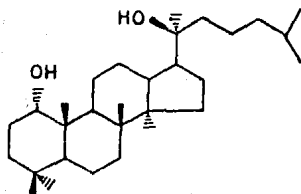


ESPECTRO 13

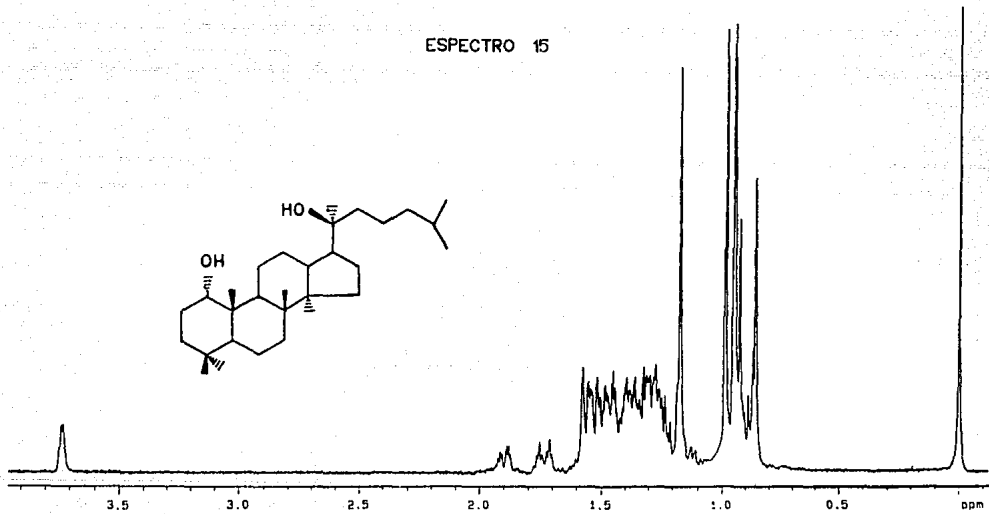
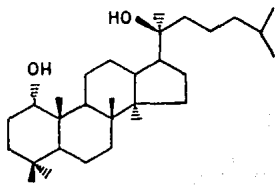




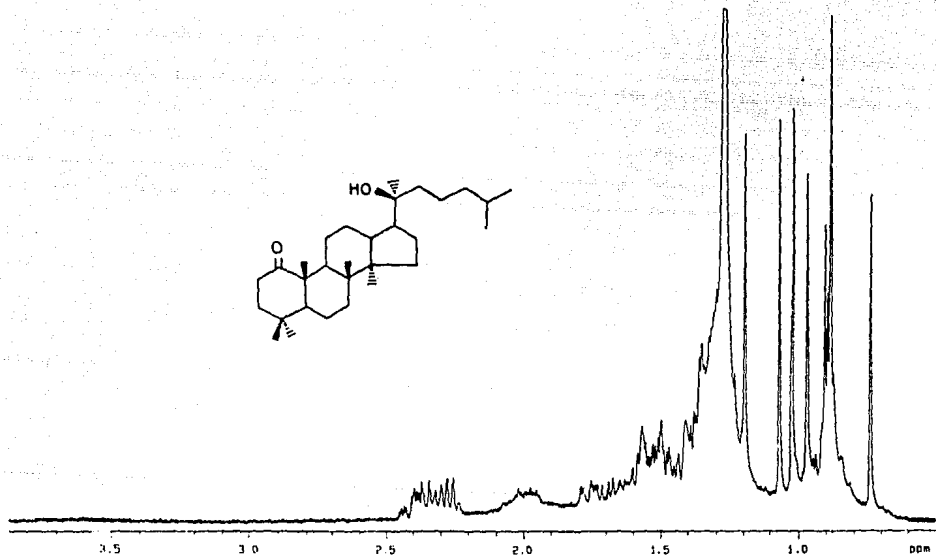
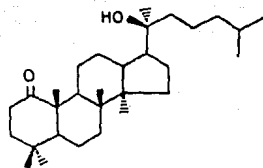
ESPECTRO 14



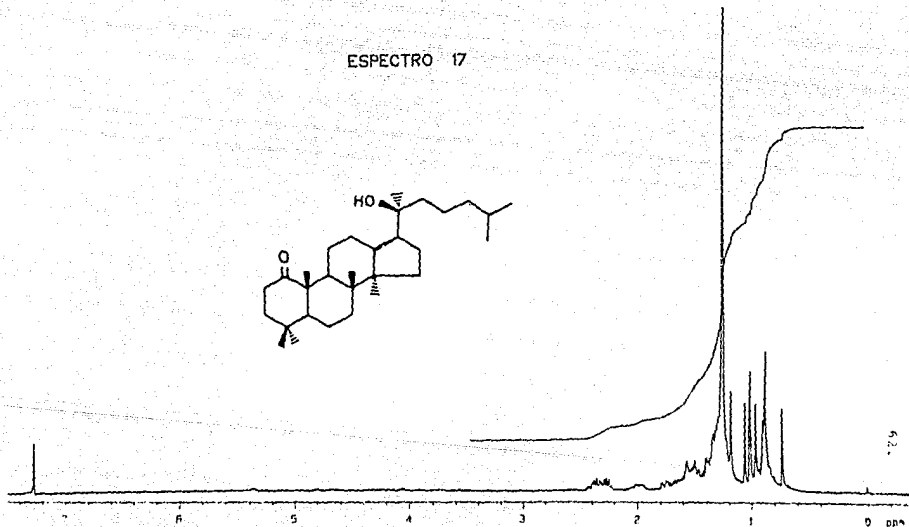
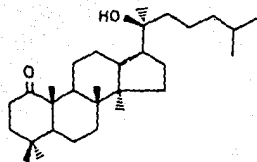
ESPECTRO 15



ESPECTRO 1G



ESPECTRO 17



## VIII. BIBLIOGRAFIA

- Albor, C., Estudio Fitoquímico de tres rubiáceas usadas en medicina tradicional: Randia echinocarpa, Exostema mexicanum y Simira mexicana.
- 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).
- Angeles, E.; Foltz, K.; Grieco, P.A.; Hoffman, J.C.; Miranda, R. y Salmón, M.; Phytochemistry, 21, 1804 (1982).
- Asakawa, J.; Kasai, R.; Yamasaki, K. y Tanaka, O.; Tetrahedron, 33, 1935 (1977).
- Baker, P.; Eliezer, J.; Barreiro, L.; Gilbert, B.; Phytochemistry, 15, 785 (1976).
- Bingel, A.S.; New Natural Products and Plants Drugs with Pharmacological Biological or Therapeutical Activity, Springer-Verlag, New York, (1977).
- Bennett, W.C. and R.M. Zingg; The tarahumara-an Indian tribe of northern México, Chicago, IL: University of Chicago Press, (1935).
- Bollmann, 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., 1764 (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).
- Camacho, C. y Rios, P., Estudio Fitoquímico de la Cigarrilla mexicana, Tesis, UNAM, 1987.

- Camacho C., Nuevos metabolitos secundarios de la Hintonia latiflora Bullock y aislamiento de compuestos bioactivos de Teloxys graveolens Willd., Tesis, UNAM, 1989.
- Crammer, B. e Ikan, R.; Chem. Bri., 22, 915 (1986).
- Castañeda L., Constituyentes de la Cigarrilla mexicana Parte II., Tesis, UNAM, 1989.
- Darise, M.; Kohda, H.; Mizutani, K.; Kasai, R. y Tanaka, O.; Agric. Biol. Chem., 47, 133 (1983).
- 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).
- Farkas, L., Journal of Ethnopharmacology, 2, 145 (1988).
- Fairbairn, J.W., Journal of Ethnopharmacology, 2, 173 (1980).
- Farnsworth, N. y Bingel, S.; New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutic Activity, Springer Verlag, New York, Berlin, 1977, pp. 1.
- Farnsworth, N.; Journal of Ethnopharmacology, 2, 173 (1980).
- Fujita, T.; New Food Ind., 21, 16 (1979).

- García, M.; 4-arilcoumarinas de la Exostema caribaeum Jacq, Tesis, UNAM, 1987.
- Ghisalberti, E.L.; Jefferies, P.R.; y Stuart, A.D.; Aust. J. Chem., 32, 1627 (1979).
- Gil, R.; Oberti, J.; Sosa, V.; Herz, W.; Phytochemistry, 26, 1459 (1987).
- Gómez, F.; Quijano, L.; Calderón, J.S.; Perales, A. y Rios, T.; Phytochemistry, 22, 197 (1983).
- Graleffi, C., Journal of Ethnopharmacology, 2, 129 (1980).
- Hattori, T.; Igarashi, H.; Iwasak, S. y Okuda, S.; Tetrahedron Letters, 13, 1023 (1969).
- Helvani, C.; De Lampasona, M.; Catalán, C.; Goedken, V.; Gutiérrez, A. y Herz, W.; Phytochemistry, 28, 1931 (1989).
- Hernández, P.; Historia de las plantas de la Nueva España, publicado por el Inst. de Biología, UNAM, Imprenta Universitaria, México; Vol. 1, 1942.
- Kasai, R.; Kaneda, N.; Karaka, O.; Yamasaki, K., Sakamoto, I.; Morimoto, K.; Okada, S.; Kitahara, S. y Furukawa, M. Nippon Kagaku Kaishi, 5, 726; Chem. Abstr. 95, 1696w (1981).
- 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 Soejarto, D.; Economic and Medicinal Plant Research, Vol. 1, Academic Press Inc.; U.S.A. (1985) pp.1.
- Kabayashi, M.; Harikawa, S.; Degrandi, I.; Veno, J. y Mitsuhashi, H.; Phytochemistry, 16, 1405 (1977).
- Kohda, H.; Tanaka, O. y Nishi, K.; Chem. Pharm. Bull., 24, 1040 (1976).
- Kohda, H.; Kasai, R.; Yamasaki, K.; Murakami, K. y Tanaka, O.; Phytochemistry, 15, 981 (1976).
- Lee-Juain, L.; Ming-S.; Rong K.; J. of Natural Products, 52, 595 (1989).
- 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, 1566 (1982).
- Meyer, B.N.; Ferrigni, N.R.; Putnam, J.E.; Jacobsen, L.B.; Nichols, D.E. y McLaughlin, J.L.; Planta Médica, 45, 31 (1982).

- Montes, A.L.; An. Soc. Cient. Argent, 187, 21 (1969).
- Morita, E., Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 77, 125, 640; Chem. Abstr., 88, 118021c (1978).
- Nabeta, K.; Kasai, T. y Sugisawa, H.; Agr. Biol. Chem., 40, 2103 (1976).
- Nanayakkara, N.P.; Klocke, J.A.; Compadre, C.M.; Hussain, R.A.; Pezzuto, J.M. y Kinghorn, A.D.; J. of Natural Products, 50, 434 (1987).
- 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).
- Okasaki, K., Nikayama, Y; y Owada, K., Seikatsu Eisei, 21, 185 (1977).
- Ortega, A.; Martínez, R.; García, C.; Rev. Latinoamer. Quím., 11, 45 (1980).
- Ortega, A.; Morales, F. y Salmón, M.; Phytochemistry, 24, 1850 (1985).
- Oshima, Y.; Saito, J.; y Hikina, H.; Tetrahedron, 42, 6443 (1986).
- Planas, G.; Kué, J.; Science, 162, 1007 (1968).
- Pennington, C.W.; The Tarahumar of México-Their environment and material culture; Salt Lake City, UT: University of Utah Press, 1963.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Poehland, B.; Corté, B.; Francis, L.; Hyland, H.; Allaudeen, y Troupe; J. of Natural Products, 50, 706 (1987).
- 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).
- Román, L.U.; Del Rio, R.E.; Hernández, J.D.; Joseph-Nathan, P.; Zabel, V.; y Watson, W.H.; Tetrahedron, 37, 2769 (1981).
- Román, L.U.; Hernández, J.D.; Castañeda, R.; Cerda, C.M.; y Joseph-Nathan, P.; Phytochemistry, 28, 265 (1989).
- Salemink, C.A.; J. of Ethnopharmacology, 2, 135 (1980).
- Sakaguchi, M.; Kan, F. Cienc. Cult., 34, 235 (1982).
- 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).

- Schmieda-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).
- Sociedad Farmacéutica de México, Nueva Farmacopea Mexicana, Oficina tipográfica de la Secretaría de Fomento, México, 1904.
- Soejarto, D.; Kinghorn, D. y Farnsworth, N.; J. of Natural Products, 45, 590 (1982).
- Soejarto, D.; Compadre, C.; Medon, P.; Kamath, S. y Kinghorn, A.; Economic Botany, 37, 71 (1983).
- Sosa, V.E.; Oberti, J.C.; Prasad, S. y Herz, W.; Phytochemistry, 23, 1515 (1984).
- 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).
- Tori, M.; Matsuda, R.; y Asakawa, Y.; Tetrahedron, 42, 1275 (1986).

- Tori, M.; Matsuda, R.; Sono, M.; Asakawa, Y.; Magnetic Resonance in Chemistry, 26, 581 (1988).
- Yamada, S., y Kajima, S.; Jpn. Kokai Tokkyo Koho, 80, 162, 953; Chem Abstr., 94, 101656q (1981).
- 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).