



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

NUEVA FULVENOLACTONA DE
STEVIA SERRATA CAV.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
Q U I M I C O
P R E S E N T A :
E L E N O H E R N A N D E Z R O M E R O



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

México, D. F.

1993



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.

CONTENIDO

	pág
Introducción.....	1
I.-Generalidades.	
1.1.-El género <i>Stevia</i>	4
1.2.-Productos Naturales aislados del género <i>Stevia</i>	5
1.3.-Lactonas sesquiterpénicas.....	6
1.4.-Actividad biológica de las lactonas sesquiterpénicas.....	9
1.5.-La especie <i>S. serrata</i> Cav.....	10
1.6.-Chamazuleno.....	12
1.7.-Fulvenolactonas.....	15
II.-Parte teórica.	
2.1.-Elucidación estructural de la Estevifulvenólida.....	19
2.2.-Estereoquímica de la Estevifulvenólida.....	25
2.3.-Identificación de la Esteviserrólida.....	29
2.4.-Identificación de Cristinina III.....	32
Conclusiones.....	33
III.-Parte experimental.	
3.1.-Aislamiento de la Estevifulvenólida.....	34
3.2.-Aislamiento de la Esteviserrólida A.....	37
3.3.-Aislamiento de Cristinina III.....	38
3.4.-Productos de hidrólisis.	
3.4.1.-Acido chamazuleno-carboxílico.....	39
3.4.2.-Chamazuleno.....	40
Espectros.....	42
Referencias bibliográficas.....	55

INTRODUCCION

En un esfuerzo dirigido a descubrir nuevas estructuras químicas potencialmente útiles en las áreas de farmacología, agricultura, o quimiotaxonomía, los investigadores realizan un continuo y extenso estudio fitoquímico de diversas especies de plantas. El máximo impacto de esta actividad es apreciada mejor, cuando uno considera el estado actual del conocimiento de los productos naturales, sobre todo en el área de los sesquiterpenoides, donde se ha aislado una rica variedad de estructuras químicas,^{1,2} reportadas en diversas publicaciones periódicas, a lo largo de varios años. Estas investigaciones han enriquecido el conocimiento de los metabolitos secundarios.

Muchas son las especies de la familia Compositae que se han analizado en sus constituyentes químicos, encontrando como componente común a las lactonas sesquiterpénicas. Estas substancias son consideradas por los investigadores como los metabolitos secundarios característicos de esta familia,^{3,4} aunque, esporádicamente, se han encontrado en otras.^{2,4}

Las lactonas sesquiterpénicas constituyen un amplio grupo de substancias terpenoides con diferentes arreglos estructurales y se derivan biogenéticamente del pirofosfato de farnesilo o nerolidilo.⁵

La variedad de esqueletos ciclocarbonados que pueden ser generados a partir del grupo residual pirofosfato y de los tres dobles enlaces del pirofosfato de farnesilo, es sorprendente y le confiere a la categoría de los sesquiterpenoides la variación estructural que probablemente sea la más diversa que cualquier otra clase de terpenos. Este hecho es estimulante para iniciar investigaciones buscando nuevas variantes estructurales.

Entre las lactonas sesquiterpénicas aisladas de las especies de la familia Compositae, están las guayanólidas y de las cuales sólo algunas^{d-p} poseen la característica especial de un arreglo estructural tipo fulveno.

La Stevia serrata Cav. es una planta que crece abundantemente en el suelo de México; forma parte de la tribu Eupatorieae, una de las trece tribus en que ha sido dividida la familia Compositae. Esta especie ha sido objeto de diversos análisis¹⁰⁻¹⁸ para determinar sus constituyentes químicos, en uno de dichos estudios se obtuvieron dos nuevas lactonas sesquiterpénicas tipo guayanólidas y como derivado de una de ellas, se produjo una fulvenolactona sesquiterpénica.

El presente trabajo hace un análisis químico del extracto polar de la Stevia serrata Cav. recolectada al noreste de la ciudad de Cuernavaca, estado de Morelos. En él estudia y se determina la estructura de una nueva fulvenolactona, además de

otras guayanólidas ya reportadas, contribuyendo de esta manera a establecer el cuadro completo de estructuras que de esta especie se pueden aislar.

GENERALIDADES

1.1.-El género Steuía

El género Steuía pertenece a la tribu Eupatorieae, una de las trece tribus en que ha sido dividida la familia Compositae para su mejor estudio. Cuenta con alrededor de 200 especies de plantas^{1P} que crecen en el norte, centro y sur del continente americano, restringiéndose a áreas de clima tropical y subtropical.³

La región Mesoamericana de Montaña presenta en general una distribución geográfica discontinua ya que corresponde a los macizos montañosos de nuestro país. Hay muchas zonas vegetales diseminadas en todos los estados y territorios de la República con una flora rica en general. El género Steuía y algunos otros géneros presentan aquí un importante centro de diversificación.²⁰

Al género Steuía se le reconoce, entre otras características morfológicas, por su involucre de 5-6 brácteas y cabezuelas de 5 flores;²¹ raramente 4 ó 6. Sus especies son principalmente arbustivas y herbáceas y la participación cuantitativa de algunas de ellas en la vegetación natural es muy significativa en diversas zonas de México. En realidad, se trata de un género morfológicamente bien delimitado²² y es fácil de reconocer en la tribu Eupatorieae.

De las diversas especies del género Stevia, la S. serrata Cav. es la más común y crece abundantemente en el suelo de México. En el valle de México y sus alrededores crece entre los 2300 y 2800 metros de altitud.

1.2.-Productos naturales aislados del género Stevia.

Mediante los estudios fitoquímicos de las especies del género Stevia, se han aislado diferentes metabolitos secundarios, algunos interesantes, los más comunes son sesquiterpenos, principalmente del tipo longipineno (la mayoría aislados de raíces) y entre las lactonas sesquiterpénicas, las guayanólidas son abundantes con 6,12-lactonas siendo trans y las 8,12-lactonas por lo general cis. Sin embargo, otro tipo de lactonas sesquiterpénicas también han sido reportadas.

Otras clases de constituyentes químicos hallados en las especies del género Stevia son flavonas y diferentes tipos de diterpenos.

El género Stevia no es muy homogéneo en su composición química por lo que se requieren más investigaciones taxonómicas que posiblemente conduzcan a una separación dentro del mismo género.²³

1.3-Lactonas sesquiterpénicas.

Las lactonas sesquiterpénicas son metabolitos secundarios comúnmente encontrados en plantas pertenecientes a la familia Compositae^{3,4} y parece ser la característica más común en la mayoría de los géneros de esta familia; sin embargo, se les ha encontrado con menor frecuencia en otras^{2,4}

La familia Compositae se compone de aproximadamente 20000 especies;²¹ su estudio requiere el uso de una lente de aumento ya que las diferencias morfológicas son muy pequeñas entre diferentes especies y con frecuencia crean confusión. Es aquí, donde los metabolitos secundarios están cobrando una creciente importancia debido a que algunos de estos son característicos de tribus, géneros e incluso especies;⁴ proporcionando a los botánicos criterios adicionales para una mejor clasificación.

Los metabolitos secundarios tienden a parecerse el uno al otro cuando las plantas están estrechamente relacionadas. La Quimiotaxonomía es una disciplina que lleva a cabo la organización jerárquica de las plantas del reino vegetal basada en la distribución de los metabolitos secundarios.

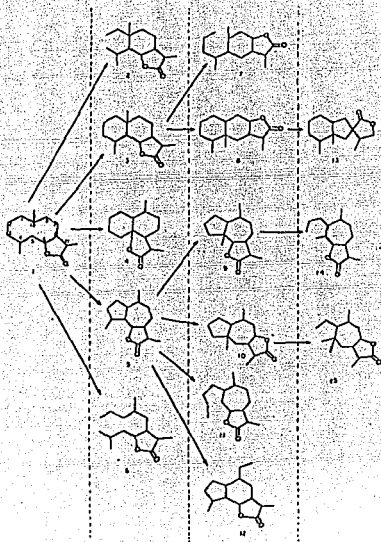
Los metabolitos más útiles para clasificar las plantas de la familia Compositae son los sesquiterpenos, y en particular las lactonas sesquiterpénicas²⁴ especialmente aquellas biogenéticamente más complicadas.

Las lactonas sesquiterpénicas son constituyentes relativamente estables e incoloros. Desde que se establecieron las primeras estructuras de estos productos naturales, se han aislado alrededor de 1000 diferentes sustancias de este tipo.²⁵ Se clasifican,²⁶ basándose en su esqueleto carbocíclico, en germacranólidas, guayanólidas, pseudoguayanólidas, eudesmanólidas, eremofilanólidas y xantanólidas. El grupo lactónico generalmente es α, β insaturado con fusión *cis* o *trans* en las posiciones C₆-C₇ o C₇-C₈ del esqueleto ciclocarbonado.

Con base en la teoría biogenética, ahora se acepta generalmente que los sesquiterpenos con un grupo lactónico son derivados del pirofosfato de farnesilo o nerolidilo⁵ que tras una ciclización inicial sufren una subsecuente serie de oxidaciones produciendo diferentes sistemas carbocíclicos básicos,^{26,27} con modificaciones estructurales que incorporan anillos oxiránicos, grupos hidroxilo, generalmente esterificados con ácidos tales como ácido isobutírico, angélico, epoxiangélico y tíglico.²⁸

La Figura 1, muestra los tipos de esqueleto y las relaciones biogenéticas de las lactonas sesquiterpénicas a partir de las germacranólidas, primer metabolito lactónico derivado del pirofosfato de farnesilo.

Fig.1. Tipos de esqueleto y relaciones biogenéticas de las lactonas sesquiterpénicas.



- | | | |
|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| 1. Germacranólidas. | 2. Elemanólidas. | 3. Eudesmanólidas. |
| 4. Cadinanólidas. | 5. Guayanólidas. | 6. Seco-germacranólidas. |
| 7. Seco-eudesmanólidas. | 8. Eremofilanólidas. | 9. Ambrosanólidas. |
| 10. Helenanólidas. | 11. Xantanólidas. | 12. Crimoranólidas. |
| 13. Bakkenólidas. | 14. Seco-ambrosanólidas. | 15. Seco-helenanólidas. |

1.4-Actividad biológica de las lactonas sesquiterpénicas.

Las lactonas sesquiterpénicas han despertado un gran interés por las propiedades que presentan; no solo contribuyen desde el punto de vista quimiotaxómico, si no también en el aspecto farmacológico.²

Pruebas farmacológicas aplicadas a las lactonas sesquiterpénicas aisladas de diferentes géneros de plantas, en el que se determinan los componentes activos, indican que algunas tienen actividad antileucémica y citotóxica; propiedades bactericida, fungicida o antihelmíntica. Otras son repelentes de insectos; regulan el crecimiento de vegetales; envenenan al ganado; y algunas más, producen dermatitis por contacto en el hombre.

Todas estas propiedades están relacionadas con la presencia de grupos funcionales en la molécula; con frecuencia el grupo funcional es un metileno exocíclico conjugado con la gamma lactona, más aún, la presencia de un grupo funcional tal como epóxido, hidroxilo, clorhidrina, cetona insaturada o de O-acilos adyacentes a la α -CH₂ de la gamma lactona pueden aumentar la reactividad de la lactona conjugada frente a los nucleófilos biológicos.²

Las propiedades de estos productos naturales tienen un significativo potencial de beneficio al hombre ya sea porque se

puedan usar directamente como agentes terapéuticos, o como material de partida para la síntesis de drogas, o porque sirvan como modelos de compuestos farmacológicamente activos en la síntesis de drogas. O bien, porque puedan ser usados como agentes biodegradables en insecticidas.

1.5.-La especie serrata Cav.

La Steugia serrata Cav. es una planta que crece abundantemente en el suelo de México; se caracteriza por producir en las partes aéreas lactonas sesquiterpénicas, principalmente de tipo guayano, que es un metabolito de segundo paso biogenético. Su estudio químico comienza en 1973 y hasta la fecha hay nueve reportes sobre ella. Algunos de estos análisis químicos se han realizado en raíces^{1a, 1^a} y otros en partes aéreas^{10-12,14,16-18} de la S. serrata. En aquéllos se aislaron derivados del longipineno, mientras que en éstos se hallaron lactonas sesquiterpénicas, flavonas, chamazuleno y un cromeno.

Entre los sesquiterpenos con un grupo lactónico hallados en esta especie, se encuentra una germacranólida, denominada Carmelina.¹¹ Esta substancia, que es un sólido - p.f. 176°-177° (sin corregir)- posee un esqueleto formado en el primer paso biogenético (Fig.1) con una fusión trans de la gamma lactona y dos ésteres en las posiciones 3 y 8. Por otro lado, esta lactona es un epimero en C-8 del acetato sintético de dihidrochihuahuina.^{2p}

Tres epoxiguayanólidas nombradas Cristininas I, II, y III, también se han obtenido^{10,14} de esta planta; se diferencian por la distinta naturaleza de los ésteres situados en C-2 y C-8 (Fig.2). Todas ellas contienen una trans γ -lactona en el esqueleto guayano y no poseen grupo metileno en la posición C-13, por lo que son 11,13-dihidroguyanólidas. De estas tres sustancias, solo la primera, Cristinina I, fue aislada en estado sólido.

Otras lactonas halladas en la *S. serrata* lo constituyen los isómeros (prochamazulenos) Esteviserrólidas A y B (17) Estas sustancias aisladas como aceites incoloros, son también 11,13-dihidroguyanólidas y sus espectros de RMN-H¹ muestran una diferencia, de una respecto de la otra, en la señal protónica en C-2, C-15 y C-6 indicando que ambas substancias son epimeros en C-4.

En el asignamiento estructural de compuestos hidroxilados, se llega hacer uso de reacciones "in situ" con isocianato de tricloroacetilo en el tubo de muestras de R.M.N. Este método (método T.A.I.)²⁰ se aplicó a la Esteviserrólida B, produciendo la eliminación del grupo hidroxilo y formándose una fulvenolactona. Los datos de RMN-H¹ de esta estructura indican una desprotección de H-2 y H-3 que aparecen a campo bajo y que, junto con el desplazamiento químico, también a campo bajo, de H-14 y H-15, indican la formación de un sistema de dobles enlaces

conjugados. La constante de acoplamiento $J_{2-3} = 6.0$, coloca este sistema en un anillo de cinco miembros.

La Figura 2, muestra la estructura de estos compuestos.

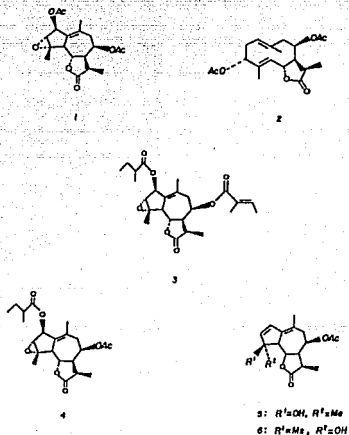
1.6.-Chamazuleno

Algunos grupos de estructuras de tipo guayanólidas y pseudoguayanólidas, se les conoce porque de ellas pueden ser formados azulenos, en alto y bajo rendimiento, respectivamente.

Los derivados del azuleno son sustancias que presentan un color azul intenso o púrpura debido a la alta insaturación. Se pueden producir durante el proceso de separación de metabolitos de su extracto-vegetal en columnas o placas preparativas para cromatografías en capa fina de sílica gel o pueden producirse por tratamiento directo de las mismas pseudo- y guayanólidas³¹. Las primeras, por reducción con LiAlH_4 y deshidrogenadas por tratamiento con Se o Pd, frecuentemente producen chamazuleno o dihidroazulenos, pero también pueden dar guayazulenos o furanoazulenos; los segundos, reducidos por hidrogenación catalítica y luego tratados con Se o Pd, producen, por lo general, chamazulenos o dihidroazulenos.

En algunos géneros de la familia Compositae han sido aisladas estructuras precursoras de algún azuleno, por lo que se les denomina en general proazulenos. Así, en el género Tanacetum

Fig.2. Lactonas sesquiterpénicas aisladas de la Stevia serrata Cav.



- 1) 4,7-bis(acetiloxi)-3a,4,5,7,7a,8a,8b,8c-octahidro-3,6,8a-trimetil-oxirano[2,3]azuleno[4,5-b]-furan-2(3H)-ona. (Cristinina I).
- 2) 4,9-bis(acetiloxi)-3a,4,5,8,9,11a-hexahidro-3,6,10-trimetil-clodeca[b]furan-2(3H)-ona. (Carmelina).
- 3) Acido-2,3,3a,4,5,7,7a,8a,8b,8c-decahidro-3,6,8a-trimetil-7-(2-metil-1-oxo-butoxi)-2-oxooxirano(2,3)azuleno(4,5-b)furan-4-il-2-Butenoico, 2-metil éster. (Cristinina II).

4)Acido-4-(acetiloxi)-2,3,3a,4,5,7,7a,8a,8b,8c-decahidro-3,6,8a-trimetil-2-oxirano[2,3]azuleno[4,5-b]furan-7-il-Butanoico, 2-metil éster. (Cristinina III).

5)[3R-(3 α ,3 $\alpha\beta$,4 α ,9 α ,9 $\alpha\beta$,9 $\alpha\alpha$)]-4-(acetiloxi)-3a,4,5,9,9a,9b-hexahidro-9-hidroxi-3,6,9-trimetil-azuleno[4,5,b]furan-2(3H)-ona.
(Esteviserrólida A).

6)[3R-(3 α ,3 $\alpha\beta$,4 α ,9 β ,9 $\alpha\beta$,9 $\beta\alpha$)]-4-(acetiloxi)-3a,4,5,9,9a,9b-hexahidro-9-hidroxi-3,6,9-trimetil-azuleno[4,5,b]furan-2(3H)-ona.
(Esteviserrólida B).

Annuun⁶ se aislaron los proazulenos Tannunólidas A y B, que son responsables de la formación de chamazulenógenos; o bien los proazulenos^{32,33,34} de Artemisia arborescens y A. absinthin : artabsina, matricina y 4-epimatricina, que dan origen a chamazuleno.

Entre los compuestos aislados de la Stevia serrata Cav., se han obtenido los isómeros Esteviserrólidas que son dos guayanólidas que producen chamazuleno, compuesto que posee propiedades antiinflamatorias,³⁵ antimitióticas³⁶ y antiasmáticas.³⁷

La Stevia serrata Cav. es una planta que es considerada una fuente de chamazuleno¹⁸ ya que la planta es abundante en México y de ella se puede obtener chamazuleno en un 0.18% que se forma por la destilación de sus flores, principalmente, y de sus hojas. El chamazuleno ya ha sido obtenido previamente en alto rendimiento de Achillea sibirica³⁸ y Artemisia arborescens.³⁹

1.7.-Fulvenolactonas.

Las fulvenolactonas son sesquiterpenos lactónicos tipo guayano. Se distinguen por tener una disposición de tres dobles enlaces conjugados de tal manera que dos de éstos están dentro de un anillo de cinco miembros y el tercer doble enlace es exocíclico a este ciclo, pero endocíclico al anillo de diez

miembros. La distribución de los dobles enlaces con respecto al ciclopentano, es análoga a la estructura del fulveno, de ahí el nombre de "fulveno", isómero estructural e isoelectrónico, no alternante y muy inestable del benceno.^{40,41}

Los compuestos fulvénicos se caracterizan por tener un dipolo permanente con el anillo negativo y el átomo de carbono exocíclico positivo, esto está de acuerdo con las bandas de absorción⁴² en la región de 1600 cm^{-1} (1592-1642) en el espectro infrarrojo, debiéndose las variaciones a los sustituyentes, principalmente en el átomo de carbono exocíclico. Esta absorción va acompañada por otra banda en la región de 1360 cm^{-1} (1340-1370) debida a las bandas vibracionales características de un anillo de cinco miembros, especialmente en fulvenos.

En varios géneros de la familia Compositae se han aislado^{d-p} fulvenolactonas; su cierre lactónico puede ser en C-6 ó C-8. La mayoría de estas estructuras se caracterizan por ser 11,13-dihidroguayanólidas; la excepción la constituyen los isómeros Pentziafulvenólidas, quienes tienen un grupo metileno exocíclico conjugado con la gamma-lactona en aquella posición.

Otro rasgo que se puede observar en casi todas las fulvenolactonas es la estereoquímica cis del grupo éster cíclico, que es la más común entre las guayanólidas, ya sean 12-6 ó 12-8-ólidas.

Una característica particular que llama la atención de la Geigeriafulvenólida es la estereoquímica de sus dobles enlaces : $\Delta^{1,9,5}$, diferenciando del común de las fulvenólidas : $\Delta^{2,4,10}$

Los tres dobles enlaces le confieren el color a estas substancias, que van del amarillo al anaranjado-rojo, distinguiéndose entre las guayanólidas, que son incoloras.

Las estructuras de las fulvenolactonas aisladas se ilustran en la Figura 3.

Fig.3. Fulvenolactonas de los géneros de la familia Compositae.

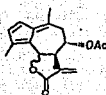


1: $R^1=Me, R^2=H$
2: $R^1=H, R^2=Me$

I



II



1: 6-β H
2: 6-α H

III



IV

I) 1 y 2 Tannunólidas A y B, respetivamente (ambas de Tanacetum annunm).

II) Estevisamólida (Stevia samaipatensis).

III) 1 : Pentziafulvenólida y 2 : 6-epi-Pentziafulvenólida (ambas de Pentzia eonii).

IV) Geigeriafulvenólida (Geigeria ornativa).

II.- PARTE TEORICA

Lactonas sesquiterpénicas aisladas de Stevia serrata Cav.

La Stevia serrata Cav., especie comúnmente encontrada en el sur y norte de América, pertenece a la tribu Eupatorieae de la familia Compositae.

La S. serrata estudiada fue recolectada en el kilómetro 64 de la carretera México-Cuernavaca en agosto de 1989. De su extracto-diclorometano se aislaron cuatro sustancias; una nueva lactona sesquiterpénica, cuya característica es su arreglo fulveno; un isómero de la Esteviserrólida, sustancia aislada en otro estudio de esta misma especie¹⁷; Cristinina, reportada¹⁴ en 1977; y una molécula compleja cuya estructura falta por establecerse completamente, por lo que su análisis sigue en pie.

2.1.-Elucidación estructural de la Estevifulvenólida

En las primeras fracciones del cromatograma del extracto-diclorometano de la Stevia serrata Cav., se aisló una sustancia como cristales amarillos, p.f. 158^o-159^oC. A esta sustancia se le denominó Estevifulvenólida.

El espectro infrarrojo de esta sustancia (espectro n^o 1),

indica una banda intensa a 1760 cm^{-1} , correspondiente a una lactona de cinco miembros.^{4b} Otra banda de casi igual intensidad a 1735 cm^{-1} , corresponde a un acetato. El espectro, claramente indica insaturación (bandas a 1635 y 1495 cm^{-1}) en la estructura de la molécula.

El espectro de masas (espectro n° 2) presenta un ion M^+ m/z 288 que está de acuerdo con la fórmula molecular $C_{17}H_{20}O_4$. Además, muestra dos picos a m/z 43, pico base, y 245 correspondientes a los fragmentos $[MeCO]^+$ y $[M-43]^+$, respectivamente. El espectro también exhibe una señal de un ion a m/z 228, interpretado para $[M-HOAc]$.

En el espectro de RMN- H^1 a 80 MHz en $CDCl_3$ (espectro n° 3), se observan señales para tres metilos, un doblete centrado a 1.31 ppm ($J=7\text{ Hz}$) atribuido a metilo secundario; un singulete a 2.11 ppm y otro a 2.19 ppm, corresponden a dos grupos metilos olefínicos.

El singulete que aparece a 2.0 ppm corresponde a los protones de un grupo acetato. La señal a campo bajo, en 5.55 ppm, es asignada a un protón base de una lactona. Esta última señal y la de los metilos, son señales de tipo encontrado en derivado fulvénico de la Esteviserrólida.¹⁷

Los datos precedentes del compuesto, así como la formación de ácido chamazulen-carboxílico (espectro n° 10) en su

hidrólisis, sugieren que la estructura química del nuevo compuesto, presenta un esqueleto tipo guayano y que contiene los grupos funcionales indicados.

A campo bajo, también aparecen las siguientes señales que integran, cada una de ellas, para un protón : un multiplete centrado a 5.12 ppm asignado al protón base de un acetato en C-8 de la estructura de la molécula; un duplete a 6.22 ppm y otro a 6.49 ppm corresponden al protón vinílico en C-3 y en C-2, respectivamente. Estas dos últimas dos señales, sugieren un sistema de dobles enlaces conjugados,⁴⁴ y la constante de acoplamiento que presentan, $J=5.3$ Hz, sitúa⁴⁵ este sistema en un anillo de cinco miembros

Esta disposición olefínica dentro de un anillo de cinco miembros es confirmada en el espectro infrarrojo por las bandas ya indicadas, acompañadas por una banda mediana a 1370 cm^{-1} ; estas bandas vibracionales corresponden a un arreglo fulveno.⁴²

El espectro de RMN- H^1 a 300 MHz en benceno deuterado para esta misma sustancia (espectro n^o 4), muestra los siguientes cambios : centrado a 1.96 ppm, aparece un doblete asignado a un protón en la posición C-9; la señal (quinteto) que integra para un protón a 2.26 ppm, corresponde al protón en la posición C-11; Otra señal a 2.79 ppm (dd) es asignada a un segundo protón en la posición C-9. Finalmente, la señal que fue asignada a H-8 en el espectro anterior, aquí aparece como un doble de doble de dobles

desplazada a 5.0 ppm.

La asignación de las señales de cada protón se confirmó por espectroscopia de correlación homonuclear H^1/H^1 , COSY.

Al irradiar una de los protones en C-9 (irradiación a 1.9 ppm), la señal de H-8 se simplifica pasando de un ddd a un doble dobleteado. esto comprueba que la señal asignada a H-8 es correcta.

El desplazamiento químico de H-8 en cloroformo deuterado para la Estevifulvenólida es similar a la de aquellas guayanólidas^{10,14,17} que presentan un acetato β en C-8 y diferente de las estructuras^{7,8} que en vez de presentar un acetato en esa posición, muestran un cierre lactónico con estereoquímica cis.

Por otra parte, el cierre lactónico en C-6 en la Estevifulvenólida en presencia del arreglo fulveno, produce un desplazamiento químico de H-6 a 5.55 ppm. Fulvenolactonas^{6,9} con cierre lactónico en C-6 (siendo la lactona de estereoquímica cis), muestran una señal dobleteada con desplazamiento químico similar para H-6.

Estos factores reducen las dos posibles estructuras para la Estevifulvenólida a una : la guayanólida con cierre lactónico en C-6.

El espectro de RMN-C¹³ a 75 MHz para la Estevifulvenólida (espectro n^o 5) muestra siete señales en la zona comprendida para carbonos con hibridación sp³: las señales a 11.00, 13.75, 21.06, y 24.18 ppm son asignadas a los carbonos de los metilos 13, 15, carbono del metilo en el grupo acetato y 14, respectivamente; la señal a 38.95 ppm es asignada a C-11, mientras que la señal a 44.47 ppm se asigna a C-7; a 39.5 ppm se localiza una señal que corresponde al carbono de un metileno, C-9, y que en la prueba de protones unidos, APT, se presenta como la única señal con dos protones (espectro n^o 6).

En la región comprendida entre 50-80 ppm caen los desplazamientos químicos (observados en terpenoides^{4d}) de carbonos con hibridación sp³ y que contienen un enlace con un oxígeno; en esta región aparecen, para la substancia encontrada, dos señales, una a 71.65 ppm, correspondiente a C-8 y otra a 74.85 ppm asignada a C-6.

Seis señales desplazadas a campo bajo, cuatro como singuletes y dos dupletes, aparecen en la región en la que se han observado señales de carbonos con hibridación sp² en terpenos^{4d}; las señales tienen el siguiente desplazamiento químico y asignamiento: 121.1 ppm (C-5,q); 123.65 ppm (C-2,d); 132.39 ppm (C-3,d); 141.37 ppm (C-1,s); 146.23 ppm (C-4,s) y 147.42 ppm (C-10,s).

los datos son corroborados en APT ("Attached Proton Test") de RMN-C¹³ a 75.42 MHz.

El espectro de RMN-C¹³, por último, muestra dos señales a campo bajo en la zona de los carbonilos, sin embargo, una de estas resonancias, la de 170.08 ppm, es asignada al carbonilo del grupo acetato. Tanto la sustitución α al carbonilo como la naturaleza del grupo R en R'COOR tienen un efecto sobre el desplazamiento químico del carbono que forma el carbonilo. En los ésteres cíclicos este efecto se traduce en un desplazamiento químico a campo más bajo que los ésteres de cadena abierta.⁴⁷ La resonancia observada a 178.25 ppm es atribuida al carbonilo de la γ -lactona.

Por los datos precedentes, se deduce que esta substancia posee un esqueleto guayano, tiene una lactona que cierra en C-6 y contiene un arreglo fulveno. A continuación se discutirá la estereoquímica de esta lactona sesquiterpénica.

2.2.-Estereoquímica de la Estevifulvenólida

La estructura química de las moléculas de un producto natural requiere de una determinada distribución espacial que se manifiesta en sus propiedades espectroscópicas, entre otras. La estereoquímica de la Estevifulvenólida se estableció con base a los desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento observados en sus espectros de rnm; así como por consideraciones biogenéticas.

La configuración para el protón en C-7 de la Estevifulvenólida se ha considerado como $7\alpha\text{-H}$. De acuerdo con la biogénesis de las lactonas sesquiterpénicas, la estereoquímica del protón unido a C-7 de las guayanólidas es α .²⁴ Dicha orientación se ha considerado en toda lactona sesquiterpénica aisladas de plantas superiores²⁵ y ha estado de acuerdo con datos y estereoquímica establecidos para estos compuestos. Esta estereoquímica se ha propuesto para Cristinina I, II y III, Carmelina y Esteviserrólicas A y B aisladas de Stevia serrata.

Basándose en la orientación α del H-7 y observando el valor de la constante de acoplamiento de H-6 con H-7 ($J = 5.5$ Hz en CDCl_3) que sugiere una interacción $\alpha\text{-}\alpha$, se asignó la configuración $6\alpha\text{-H}$. La constante de acoplamiento y el desplazamiento químico de H-6 son casi idénticos a los reportados para los isómeros Tannunólidas, fulvenolactonas aisladas de

Tanacetum Annum⁶

Por otra parte, el valor que presenta la constante J_{6-7} , permite pensar en una fusión lactónica 6,7- β -cis al anillo mayor del esqueleto guayano y que se ha establecido en las Tannunólidas⁶ A y B y en 6-epi-Pentziafulvenólidas⁹.

El doblete metílico a 1.20 ppm (en C_6D_6) produce un quinteto a 2.26 ppm correspondiente a H-11. Al desacoplar el doblete metílico se originó colapsamiento del quinteto a un doblete con una constante $J_{7-11} = 7.5$ Hz. Esto es indicativo de una estereoquímica 11 α -H. Un quinteto con estas características ha sido observado^{10,49,49} en compuestos con configuración α del H-11 y un ángulo dihédrico $H_{11}-H_7$ de 30 $^\circ$.

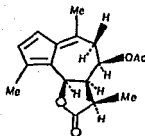
Como las lactonas con un grupo 11 α -Me normalmente indican una constante de acoplamiento J_{7-11} en el intervalo de 10-12 Hz, se infiere que la orientación de grupo metilo en C-11 de Estevifulvenólida es β ; este hecho está de acuerdo con la relación cis de los protones unidos a C-7 y C-11 y es consistente con el ángulo dihédrico de alrededor de 30 $^\circ$.

El desplazamiento químico a campo bajo del protón H-8 ($\delta = 5.0$ ppm en C_6D_6) sugiere una configuración β del grupo acetato en C-8. Estos datos son muy similares a aquellas 11,13-dihidroguayanólidas^{10,50} con orientación β del grupo acetato y marcadamente diferentes de las 11,13-dihidroguayanólidas^{32,51}

con orientación α del grupo éster.

Por otro lado, la constante de acoplamiento, $J_{8-D} = 8.1$ Hz, indica una interacción trans diaxial de H-9 con H-8, mientras que $J_{8-P} = 3.0$ Hz, refiere la interacción cis de H-8 con H-9'.

Basados en la evidencia precedente podemos proponer la estructura siguiente para la Estevifulvenólida.



Comparando la Estevifulvenólida con el derivado fulvénico de la Esteviserrólida, la diferencia la marca la esteoquímica del grupo lactónico, siendo de fusión trans para esta última. No hay una evidencia contundente para afirmar que la Estevifulvenólida sea un producto de descomposición como ocurre con el derivado fulvénico de la Esteviserrólida¹⁷ o el derivado de Matricina y

4-epimatricina⁵². Sin embargo, existen algunos datos que dan cierta posibilidad a este hecho. Entre ellos está el antecedente de las fulvenólidas conocidas : de los cuatro géneros en que se han aislado estos compuestos, en tres de ellos,^{5,9,52} se ha encontrado un probable precursor que por reducción y eliminación de agua produciría la fulvenolactona correspondiente. En la S. serrata, la Esteviserrólida podría ser un probable precursor de la Estevifulvenólida.

Por otra parte, las lactonas sesquiterpénicas son incoloras, pero la descomposición de algunas de ellas producen sustancias coloridas tal como los azulenos. La Esteviserrólida es incolora, pero si pierde su grupo hidroxilo, podría formar un doble enlace que en conjunción con dos que posee previamente constituiría el sistema fulvénico de la Estevifulvenólida que refleja el color amarillo.

Recientemente en el estudio de una lactona sesquiterpénica,⁵² se encontró que ésta se puede degradar a una fulvenolactona con estereoquímica trans del anillo lactónico y que, posteriormente, pasa a tener una orientación cis, siendo ésta la más estable. La Estevifulvenólida, por su parte, tiene la γ -lactona con estereoquímica cis y podría ser posible que, por ser muy reactiva la sustancia, no se haya podido aislar la Estevifulvenólida con estereoquímica trans de la γ -lactona como ocurre con el derivado de la Esteviserrólida que fue posible obtener su espectro por una reacción "in situ" con isocianato de tricloroacetilo en el tubo de muestras de RMN.

2.3.-Identificación de Esteviserrólida

La sustancia fue separada de extracto-diclorometano como cristales incoloros p.f.147°-148°C. El espectro infrarrojo presenta una banda a 1773 cm^{-1} típica de una γ -lactona. Además, la fuerte absorción a 3696, 3577 y 1736 cm^{-1} indica la presencia de un grupo funcional hidroxilo y éster, respectivamente.

El espectro de RMN- ^1H a 80 MHz en CDCl_3 para esta sustancia (espectro n° 7), muestra, a campo alto, señales para tres metilos, un doblete a 1.23 ppm ($J = 7.0$ Hz) corresponde a un metilo secundario; la señal a 1.61 ppm (singulete) corresponde a un metilo terciario y el singulete a 1.82 ppm es asignada a un metilo olefínico. También se observa a 2.03 ppm una señal correspondiente a los protones de un grupo acetato.

La señal tripleteada y centrada a 4.84 ppm ($J = 10$ Hz) es asignada a un protón base de una lactona. Una señal dupleteada a 5.29 ppm es asignada a un protón base de un de acetato. La señal a 5.90 ppm corresponde a un protón vinílico, lo mismo que la señal a 6.45 ppm y su constante de acoplamiento los ubica en un anillo de cinco miembros.

Por los datos precedentes, se infiere que esta sustancia es una lactona sesquiterpénica con esqueleto de guayano.

El espectro de RMN-H¹ a 300 MHz en benceno deuterado de esta sustancia (espectro n^o 8), confirma las señales anteriores y resuelve otras : a 1.79 y 2.42 ppm se observan señales que son asignadas a dos protones en C-9. Un quinteto a 2.16 ppm es asignada al protón H-11, mientras que la señal dobleteada y ancha a 2.27 ppm es asignada a H-5.

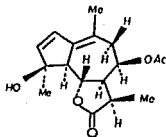
los valores de las constantes $J_{5-6} = 11$ Hz y $J_{6-7} = 11$ Hz permiten asignar una estereoquímica trans diaxial entre los protones H-5 y H-6 y H-6 y H-7 y basándose en la biogénesis de las lactonas sesquiterpénicas,²⁰ se puede asignar, por tanto, una configuración α para H-7 y H-5 y en consecuencia, H-6 debe ser β . Adicionalmente, el valor de las constantes de acoplamiento confirman una fusión trans de la γ -lactona.

El desplazamiento químico de H-13, 0.83 ppm en C₆D₆ (1.23 ppm en CDCl₃) y su constante de acoplamiento, $J_{11-13} = 7.0$ Hz, son los mismos valores encontrados¹⁷ en los isómeros de la Esteviserrólida en los que se asignó una orientación β al metilo en C-11. Así mismo, el desplazamiento químico del protón H-8, $\delta = 4.81$ ppm, y los protones del metilo del grupo acetato, 1.43 ppm, son casi idénticos a los hallados en las Esteviserrólidas en las que se estableció una estereoquímica β del grupo acetato.

También la configuración a C-4 puede ser propuesta por los desplazamientos químicos de los protones H-15, 1.45 ppm (1.82 ppm en CDCl_3), que parece estar influido por el oxígeno de la lactona, y por H-6, 4.75 ppm (4.84 ppm en CDCl_3) que son muy similares a las guayanólidas hidróxi-epímeras en C-4^(32,33) y al isómero de la Esteviserrólida A.¹⁷

La hidrólisis de la sustancia produjo un compuesto azul intenso, cuyas señales espectroscópicas de RMN- ^1H (espectro n^o 11) corresponden al chamazuleno.¹⁷

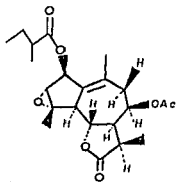
Todos los datos anteriores sugieren que la sustancia analizada espectroscópicamente es una Esteviserrólida y los desplazamientos químicos de las señales en C-2, C-15 y C-6, señalan al isómero A de la Esteviserrólida como la estructura más probable.



2.4.-Identificación de Cristinina

La substancia identificada como una Cristinina, se aisló como un aceite viscoso del extracto de cloruro de metileno. Su RMN- H^1 a 80 MHz en $CDCl_3$ (espectro n^o 9), indica señales para seis metilos : dos de un grupo 2-metil-butirilo (Me en C-3', 0.91 ppm, triplete; 1.24 ppm Me en C-2', duplete), un metilo olefinico (1.61 ppm, Me-C-10, singulete), un metilo de un grupo acetato (2.03 ppm, singulete), un metilo secundario (Me-C-11, 1.13 ppm) y un metilo terciario (Me-C-4, 1.61 ppm, singulete). Un protón base de una lactona (4.13 ppm, H-6) se presenta como un triplete ($J= 9.8$ Hz). Una señal dobleteada a 3.63 ppm ($J= 2$ Hz) integrante para un protón, un doblete a 5.28 ppm ($J= 7.0$ Hz) y un singulete ancho a 5.80 ppm, corresponden a H-3, H-8 y H-2, respectivamente, son señales idénticas a las halladas en las Cristininas I y III.

La presencia de un grupo 2-metil-butirilo en el compuesto aislado indica a la Cristinina III como la estructura a la que corresponden señales precedentes. Esta molécula se reportó¹⁴ previamente con una estereoquímica β -Me-C-11, β -AcO-C-8, β -(2-metil-butirilo)-C-2, β -Metil-C-4, H-5, H-7 α y H-6 β . Así como una fusión lactónica 6,7-trans.



CONCLUSIONES

-De la Stevia serrata Cav. se aisló una nueva guayanólida a la cual denominamos Estevifulvenólida y cuya característica relevante es su arreglo fulveno.

-La estructura y estereoquímica de la nueva lactona se estableció con base al análisis espectroscópico de la sustancia y a la biogénesis de guayanólidas propuesta por Hendrickson.

-La nueva guayanólida presenta una γ -lactona 7,6- β -cis, constituyendo la primera fulveno 11,13-dihidrolactona con este cierre lactónico y estereoquímica dentro del género Stevia.

-Es probable que la Esteviserrólida sea el precursor de la Estevifulvenólida.

-De la Stevia serrata Cav. se aislaron las conocidas Esteviserrólida A y Cristinina III y se identificaron por análisis espectroscópico.

-La hidrólisis de Esteviserrólida produjo chamazuleno.

3.-PARTE EXPERIMENTAL*

3.1.-Aislamiento de Estevifulvenólida

La planta Stevia serrata Cav. fue recolectada en el kilómetro 64 de la carretera México-Cuernavaca en agosto de 1989. Después de su recolección, la Stevia se dejó secar a temperatura ambiente. Las hojas y flores fueron removidas y molidas por separado. 670g de hojas molidas fueron dispuestas para ser extraídas con 3 litros de éter de petróleo produciendo un extracto amarillo que, concentrado, originó un peso de 16g. Posteriormente, del mismo material molido se extrajo 27g (verde intenso) empleando un litro de diclorometano.

El extracto-diclorometano se clarificó al eluirlo con metanol a través de una columna de vidrio empacada con carbón activado-celita (50:50). El extracto recuperado fue de 15g.

8g del extracto-diclorometano clarificado se separó en sus componentes por medio de una cromatografía en columna empacada con 240g de sílica-gel, eluyendo con una mezcla de éter de petróleo-acetato de etilo (80:20). El desarrollo de la cromatografía se rastreó empleando cromatoplasmas de sílica-gel de 0.25 mm.

De las fracciones cromatográficas 2 y 3 cristalizó un compuesto amarillo (695 mg) que se purificó por recristalización de una solución de éter. El compuesto presentó un punto de fusión de 158°-159° C.

-I.R., $\nu_{\text{max}}^{\text{CHCl}_3}$, (espectro n° 1) : 1760 cm^{-1} (γ -lactona), 1735 y 1200 cm^{-1} (función éster), 1635 y 1370 cm^{-1} (arreglo fulveno).

E.M. (70 eV), m/z (Int. rel.) (espectro n° 2) : 288 (1.4%) $[\text{M}^+]$; 228 (13.8%) $[\text{M}-\text{HOAc}]^+$; 2.45 (1.1%), 43 (100%) $[\text{MeCO}]^+$

-RMN- ^1H : 300 MHz, C_6D_6 , δ (espectro n° 4) : 6.43 ppm (H-2), (1 H, d, J= 6.0 Hz); 6.20 ppm (H-3), (1 H, d, J= 6.0 Hz); 5.10 ppm (H-6), (1 H, d.a., J= 5.7 Hz); 5.0 ppm (H-8), (1 H, ddd, J= 8.1, J= 3.0, J= 1.5 Hz); 2.79 ppm (H-9), (1 H, dd, J= 17.1, J= 6.9 Hz); 2.26 ppm (H-11), (1 H, quint.); 2.16 ppm (H-7), (1 H, s.a.); 1.96 ppm (H-9'), (1 H, d, J= 17.1 Hz); 1.92 ppm (Me en C-10), (3 H, s); 1.68 ppm (Me en C-4), (3 H, s); 1.56 ppm (Me del acetato), (3 H, s); 1.20 ppm (Me en C-11), (3 H, d, J= 6.3 Hz).

La asignación de las señales de cada protón se confirmó por espectroscopía de correlación homonuclear $^1\text{H}/^1\text{H}$, COSY.

RMN-C¹³, 75.4 MHz, CDCl₃, δ (espectro n^o 5) : 141.37 ppm (C-1, s); 123.65 ppm (C-2, d); 132.39 ppm (C-3, d); 146.23 ppm (C-4 s); 121.10 ppm (C-5, s); 74.85 ppm (C-6, d); 44.47 ppm (C-7, d); 71.65 ppm (C-8, d); 39.50 ppm (C-9, t); 147.42 ppm (C-10, s); 38.95 ppm (C-11, d); 178.25 ppm (C-12, s); 11.00 ppm (C-13, q); 13.75 ppm (C-15, q); 24.18 ppm (C-14, q); 170.08 ppm (s), 21.06 ppm (q) (OAc).

Datos corroborados en APT ("Attached Proton Test") de RMN-C¹³ a 75.42 MHz (espectro n^o 6).

Aislamiento de Esteviserrólida A y de Cristinina III.

3.2.-Esteviserrólida A

La fracción n^o6 de la misma columna cromatográfica de la que se aisló la fulvenolactona, produjo, como segunda fracción (la más abundante) de tres resultantes de una separación por cromatografía en capa fina preparativa de alúmina eluida con una mezcla de diclorometano-acetona (5%) 44.8 mg de un sólido cristalino (agujas transparentes). P.f. 147^o-148^oC.

RMN-H¹, 300 MHz, C₆D₆, δ (espectro n^o 8) : 0.83 ppm (Me en C-11), (3 H, d, J= 7.0 Hz); 1.43 ppm (Me del acetato), (3 H, s); 1.45 ppm (Me en C-4), (3 H, s); 1.52 ppm (Me en C-10), (3 H, s); 1.79 ppm (H-9'), (1 H, d.a, J= 14 Hz); 2.16 ppm (H-11), (1 H, q, J= 7.0 Hz); 2.27 ppm (H-5), (1 H, d.a, J= 11 Hz); 2.42 ppm (H-9), (1 H, dd, J= 5.6, J= 14 Hz); 4.75 ppm (H-6), (1 H, t, J= 11 Hz); 4.81 ppm (H-8), (1 H, d, J= 5.1 Hz); 5.8 ppm (H-3), (1 H, d, J= 5.4 Hz); 6.14 ppm (H-2), (1 H, d, J= 5.4 Hz).

La misma substancia fue encontrada y aislada en la fracciones cromatográficas del extracto diclorometano proveniente de las flores de la Stevia serrata.

3.3.-Cristinina III.

306g de flor molida de la Stevia serrata se extrajo, primero, con dos litros de éter de petróleo (3 veces) obteniéndose 13.6g de extracto etéreo una vez evaporado el disolvente, y segundo, con dos litros de diclorometano. (2 veces) produciéndose 13.4g de extracto-diclorometano.

Una cromatografía en columna de 5.3g del concentrado de cloruro de metileno rindió 12 fracciones. La columna constituida por sílica-gel como fase estacionaria (30g), se le dio elución por la mezcla hexano-acetato de etilo (80:20). En la fracción nº 4, se presentó una sustancia que por cromatografía en capa fina de sílica-gel eluida con diclorometano-acetona (5%) se purificó y dió 56 mg.

-RMN- H^1 , 80 MHz, $CDCl_3$, δ (espectro nº9) : 0.91 ppm (Me en C-3'), (3 H, t, J= 7.5 Hz); 1.13 ppm (Me en C-11), (3 H); 1.24 ppm (Me en C-2'), (3 H, d, J= 7.5 Hz); 1.61 ppm (Me en C-4), (3 H, s.a.); 1.61 ppm (Me en C-10), (3 H, s.a.); 2.03 ppm (Me del acetato), (3 H, s); 3.17 ppm (H-5), (1 H, d.a, J= 10 Hz); 3.63 ppm (H-3), (1 H, d, J= 2 Hz); 4.13 ppm (H-6), (1 H, t, J= 9.8 Hz); 5.28 ppm (H-8), (1 H, d, J= 7.0 Hz); 5.80 ppm (H-2), (1 H, s.a).

3.4.-Productos de hidrólisis

3.4.1.-Guaiazuleno ácido (ácido chamazulen-carboxílico)

La adición de CDCl_3 a la muestra de Estevifulvenólida en el tubo de muestras de RMN, produjo un compuesto azul identificado como ácido chamazulen-carboxílico.

-RMN- ^1H , 300 MHz, CDCl_3 , δ (espectro n $^\circ$ 10) : 1.63 ppm (Me del ácido isopropiónico), (3 H, d, J= 7.5 Hz); 2.65 ppm (Me en C-1), (3 H, s); 2.83 ppm (Me en C-4), (3 H, s); 3.88 ppm (-CH- del ácido propionil), (1 H, q, J= 7.5 Hz); 7.02 ppm (H-5), (1 H, d, J= 11.3 Hz); 7.27 ppm (H-3), (1 H, d, J= 3.7 Hz); 7.46 ppm (H-6), (1 H, d, J= 11.3 Hz); 7.65 ppm (H-2), (1 H, d, J= 3.7 Hz); 8.22 ppm (H-8), (1 H, s).

3.4.2.-Chamazuleno

A 25 mg. de Esteviserrólida aislada se adicionaron 30 mg. KHCO_3 disueltos en 10 ml de etanol agregando 1 ml de agua; se agitó por espacio de 6 horas. El residuo se purificó en placa de sílica gel produciendo 9.9 mg. de Chamazuleno.

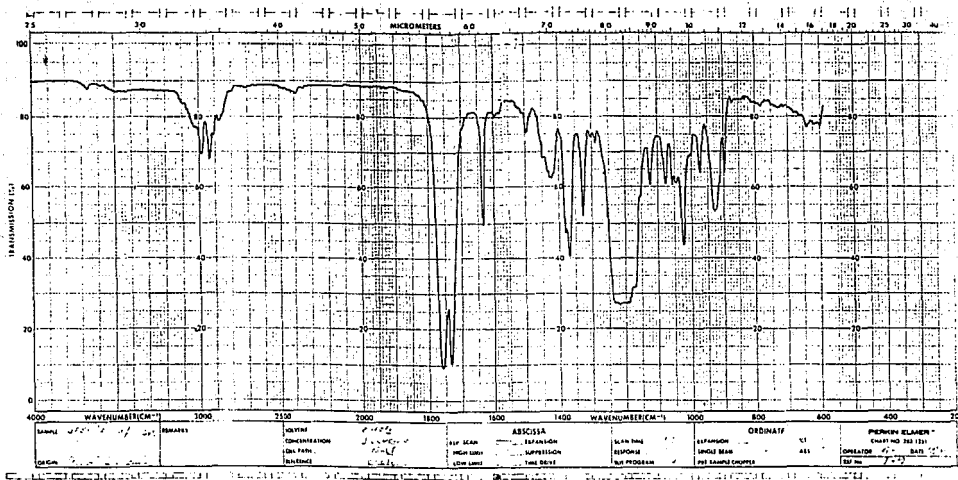
-RMN- ^1H , 80 MHz, CDCl_3 , δ (espectro n° 11) : 1.31 ppm (Me del Etil), (3 H, t, $J= 7.0$ Hz); 2.63 ppm (Me en C-1), (3 H, s); 2.80 ppm (metileno del etilo), (2 H, q, $J= 7.0$ Hz); 6.9 ppm (H-5), (1 H, d, $J= 11$ Hz); 7.17 ppm (H-3), (1 H, d, $J= 4$ Hz); 7.35 ppm (H-6), (1 H, dd, $J= 11$, $J= 1.5$ Hz); 7.68 ppm (H-2), (1 H, d, $J= 4$ Hz); 8.12 ppm (H-8), (1 H, d, $J= 1.5$ Hz).

E.M. (70 eV), m/z (Int. rel.) (espectro n° 12) : 184 (75.4%) $[\text{M}^+]$; 169 (100%) $[\text{M}-\text{Me}]^+$; 155 (33.1%) $[\text{M}-\text{Et}]^+$.

*Los puntos de fusión se determinaron en el aparato Fisher-Jones y no están corregidos. En las cromatografías en columna se utilizó sílica-gel 60 GF. 250 Merck. Para la pureza de

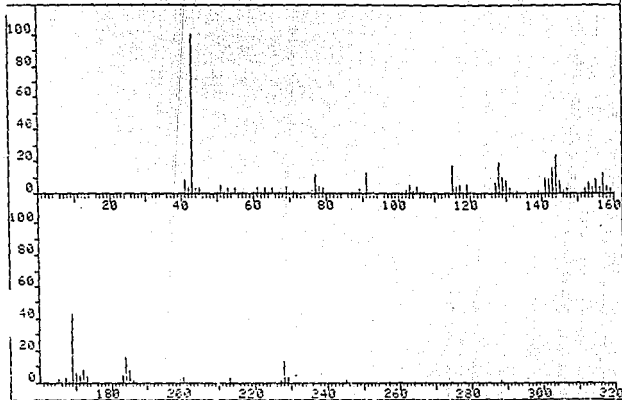
los productos se hizo uso de cromatoplasmas para cromatografía en capa fina preparativa con espesor de capa de 1 mm de sílica-gel 60 F₂₅₄ S Merck; y cromatoplasmas de óxido de aluminio F-254 clasificación T Merck. Se emplearon como reveladores, sulfato cármico al 1% en ácido sulfúrico 2N y luz ultravioleta. Los espectros de resonancia magnética nuclear fueron registrados usando un espectrómetro analítico Varian FT-80A y Varian VXR-900 S para soluciones de C₆D₆ y de CDCl₃ empleando tetrametilsilano como referencia interna. El espectro de RMN-C¹³ fue registrado a 75.4 MHz en CDCl₃. Los espectros de infrarrojo fueron corridos en cloroformo en espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 228B-B y un espectrofotómetro Nicolet FTIR modelo 5 SX. los espectros de masas determinaron en un espectrómetro Hewlett Packard modelo 5985-B, operando a 70 eV, a una temperatura de 250^o C.

ESPECTROS

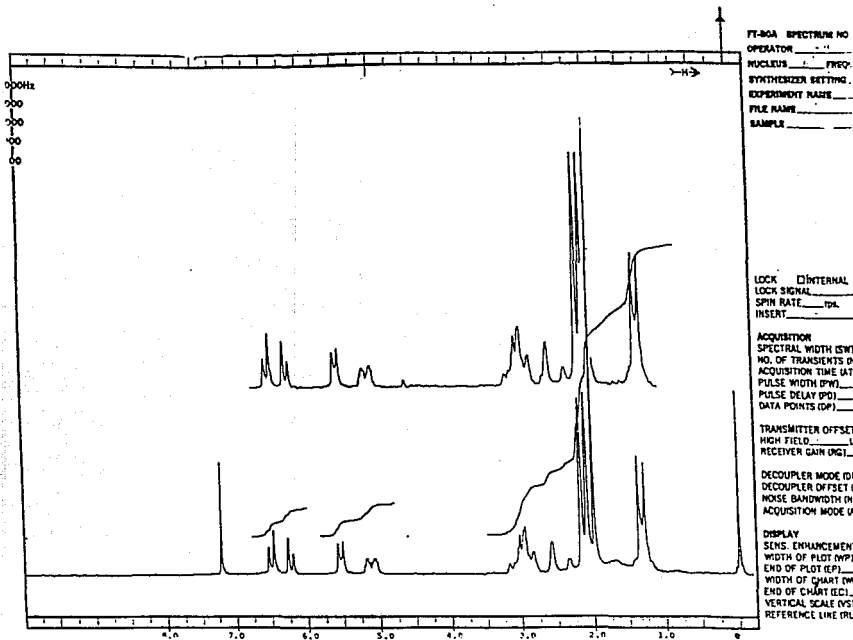


ESPECTRO No 1

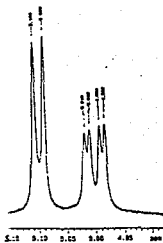
PRN 5719	SPECTRUM 50		RETENTION TIME 2.4	
LARGST 4:	43.1, 100.0	169.2, 43.3	144.2, 24.2	128.2, 19.3
LAST 4:	228.2, 13.8	229.2, 3.1	245.3, 1.1	288.3, 1.4
PAGE 1 Y = 1.00				



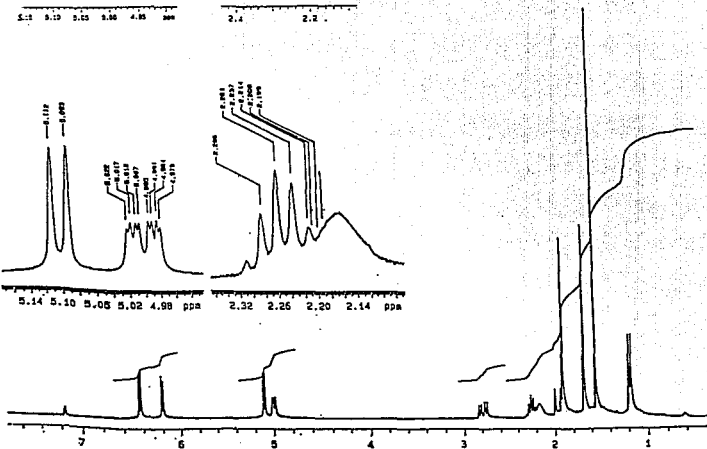
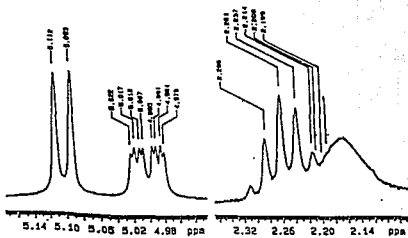
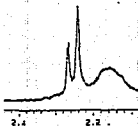
ESPECTRO No. 2



irradiación
a 1.9 ppm.

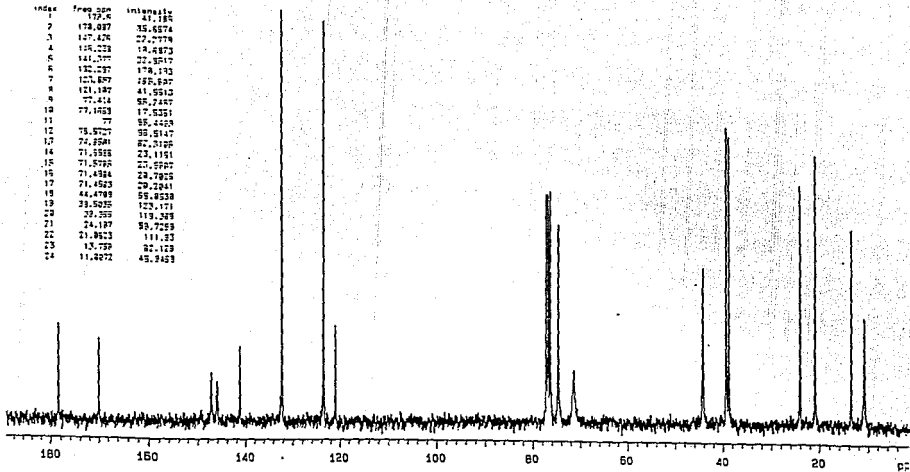


irradiación
a 1.2 ppm.



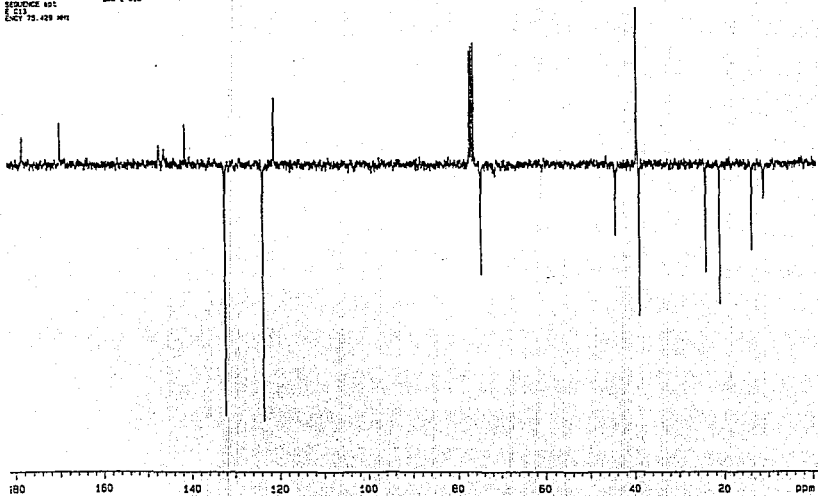
U.M.A.M. Instituto de Química
 OMSPEC C13 ASD-2-C13
 FREQUENCY 75,429 Mc
 SPECTRAL WIDTH 18501.7 Hz

index	freq_cpm	intensity
1	172.4	41.185
2	170.897	35.6574
3	147.426	27.2778
4	145.228	18.4873
5	141.207	27.8517
6	132.297	178.153
7	127.897	288.607
8	121.197	41.5513
9	77.414	58.7257
10	77.1529	17.5251
11	77	58.4428
12	75.5727	58.5147
13	74.9591	82.5198
14	71.5558	23.1151
15	71.5795	25.5907
16	71.4984	24.7925
17	71.4523	29.2941
18	44.4789	58.8538
19	39.5285	123.171
20	29.595	119.348
21	24.197	59.7259
22	21.9623	111.23
23	19.799	82.129
24	11.2272	45.9459

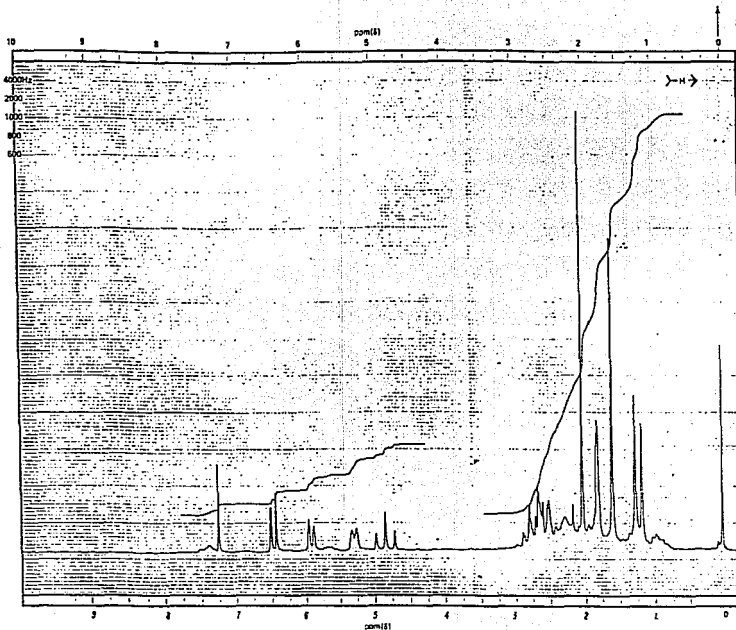


ESPECTRO No. 5

U. Instituto de Químico 350-2-113
SERVICIO SOC
E 311
E-CT 75.429 1971



ESPECTRO No. 6



CFT-20
 SPECTRUM NO. 3701
 OPERATOR EG DATE 2-1-72
 SAMPLE ACETONE
 TUBE OD: 5mm 8mm 10mm

NUCLEI: ¹H ¹³C ¹⁹F ³¹P

LOCK INTERNAL EXTERNAL

LOCK SIGNAL: 100%

SPIN RATE: _____ rps. TEMP: _____ °C

ACQUISITION
 SPECTRAL WIDTH (SW) _____ Hz
 NO. OF TRANSIENTS (NT) _____
 ACQUISITION TIME (AT) _____ sec
 PULSE WIDTH (PW) _____ sec
 PULSE DELAY (PD) _____ sec
 DATA POINTS (DP) _____

TRANSMITTER OFFSET (TOL) _____
 HIGH FIELD _____ LOW FIELD _____
 RECEIVER GAIN (RG) _____

DECOUPLER MODE (DM) _____
 DECOUPLER OFFSET (DO) _____
 NOISE BANDWIDTH (NB) _____ kHz
 ACQUISITION MODE (AM) _____

DISPLAY
 SENS ENHANCEMENT (SE) _____ sec
 WIDTH OF PLOT (WP) _____ Hz
 END OF PLOT (EP) _____ Hz
 WIDTH OF CHART (WC) _____ Hz
 END OF CHART (EC) _____ Hz
 VERTICAL SCALE (VS) _____
 REFERENCE LINE (RL) _____

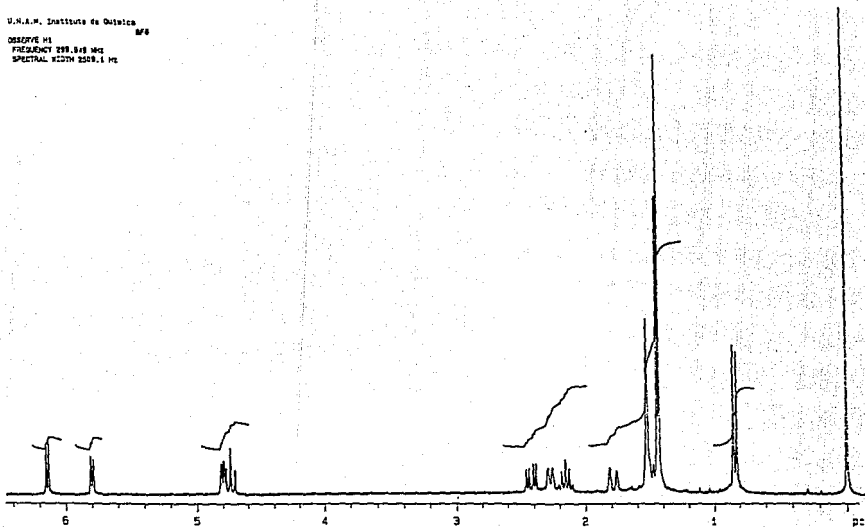
© 1972 WILMAD GLASS CO., INC.
 1000 WILMAD DRIVE, WILMINGTON, DE 19801

ESPECTRO No. 7

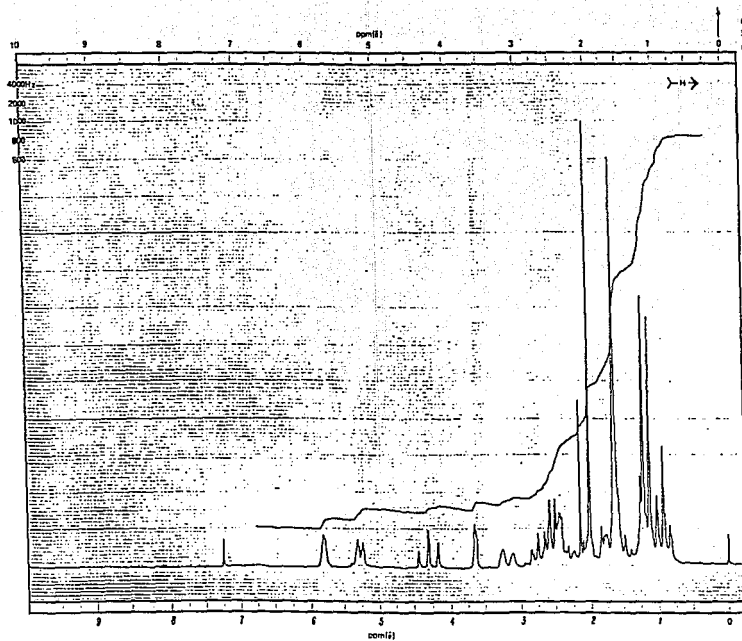
ESTA TESIS NO DEBE
 SALIR DE LA BIBLIOTECA

U.N.I.M. Instituto de Químico

OBSERVÉ Nº
FREQUENCY 229.818 MC
SPECTRAL WIDTH 2500.1 MC



ESPECTRO No. 8



CFT-20
 SPECTRUM NO. 330
 OPERATOR CC DATE: 11/11
 SAMPLE CCl₄
 TUBE OD: 5mm = 8mm = 10mm =

NUCLEI: 1H 13C 15N 31P C
 LOCK: INTERNAL EXTERNAL
 LOCK SIGNAL: 13C
 SPIN RATE: _____ RPM TEMP: _____ °C

ACQUISITION
 SPECTRAL WIDTH (SW) _____ Hz
 NO. OF TRANSIENTS (NT) _____
 ACQUISITION TIME (AT) _____ SEC
 PULSE WIDTH (PW) _____ μSEC
 PULSE DELAY (PD) _____ SEC
 DATA POINTS (DP) _____

TRANSMITTER OFFSET (TO) _____
 HIGH FIELD _____ LOW FIELD _____
 RECEIVER GAIN (RG) _____

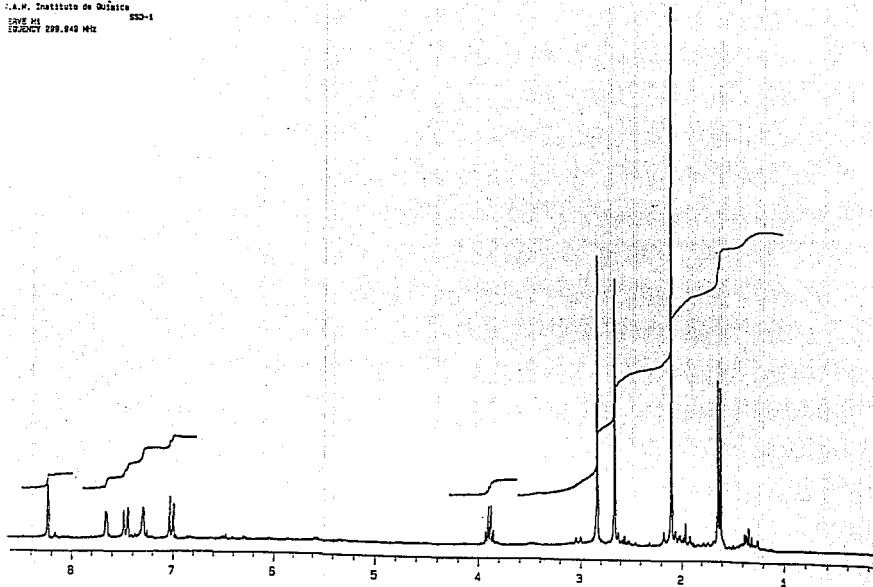
DECOUPLER MODE (DM) _____
 DECOUPLER OFFSET (DO) _____
 NOISE BANDWIDTH (NB) _____ MHz
 ACQUISITION MODE (AM) _____

DISPLAY
 SENS. ENHANCEMENT (SE) _____ INC.
 WIDTH OF PLOT (WP) _____ Hz
 END OF PLOT (EP) _____ Hz
 WIDTH OF CHART (WC) _____ Hz
 END OF CHART (EC) _____ Hz
 VERTICAL SCALE (VS) _____
 REFERENCE LINE (RL) _____

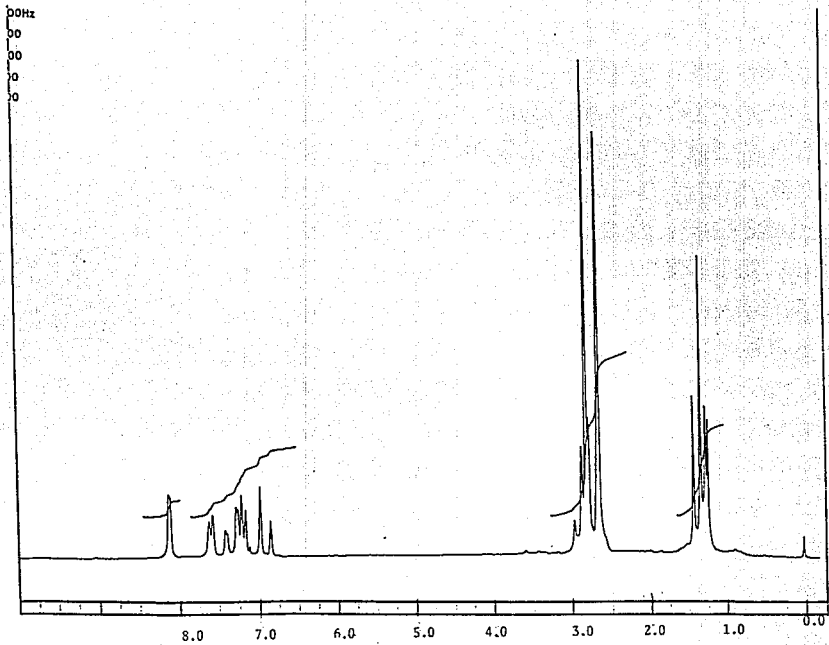
PERKINELMER GLASS CO., INC.
 U.S. Pat. & Off. Des. Reg. U.S. Pat. & Off. Reg.
 1974

ESPECTRO No. 9

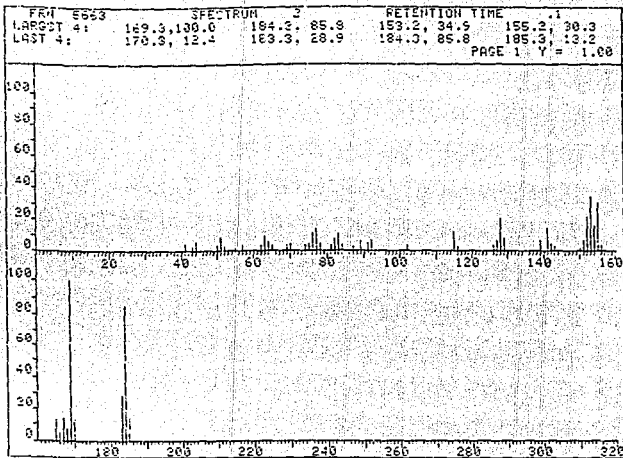
I.A.M. Instituto de Química 532-1
EJE M
FRECUENCIA 299.848 Mcz



ESPECTRO No. 10



ESPECTRO No. 11



ESPECTRO No. 12

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- 1.-Miller, L.P.; *Phytochemistry*, Vol.II., *Organic Metabolites*. 1ed. ed.; Van Nostrand Reinhold C., N.Y. (1973).
- 2.-Rodríguez, E., Tower, G.H.N. and Mitchel, J.C.; *Phytochemistry* 15, 1573 (1976).
- 3.-Herz, W. in : *The biology and Chemistry of the Compositae*. Ed.by Heywood, V.H., Harbone, J.B. and Turner, B.L.. Vol.1 Academic Press, London (1977).
- 4.-Romo de Vivar, A.; *Rev. Latinoamer. Quim.* 181, 63 (1977).
- 5.-Fischer, N.H., Olivier, E.J. and Fischer, H.D.; *The biogenesis and chemistry of sesquiterpene lactones*. Department of chemistry Louisiana State University. Baton Rouge, Louisiana 70803 U.S.A.
- 6.-Barrero, A.F., Sánchez, J.F., Zafra, M.J., Barrón, A. and San Feliciano, A.; *Phytochemistry* 26, 1531 (1987).
- 7.-Zdero, C., Bohlmann, F., King, R.M. and Robinson, H.; *Phytochemistry* 27, 2835 (1988).
- 8.-Zdero, C. and Bohlmann, F.; *Phytochemistry* 28, 3105 (1989).
- 9.-Zdero, C. and Bohlmann, F.; *Phytochemistry* 29, 189 (1990).
- 10.-Salmón, M., Díaz, E., Ortega, A.; *J. Org. Chem.* 38, 1759 (1973).
- 11.-Salmón, M., Ortega, A. and Díaz, E.; *Rev. Latinoamer. Quim.* [6] , 45 (1975).
- 12.-Kohda, H., Yamazaki, K., Tanaka, O. and Nishi, K.; *Phytochemistry* 15, 846 (1976).

- 13.-Bohlmann, F., Suwita, A., Natu, A.A., Czerson, A. ; Chem. Ber. 110, 3572 (1977).
- 14.-Salmón, M., Diaz, E. y Ortega, A.; Rev. Latinoamer. Quím. [B] 172 (1977).
- 15.-Román, L.U., Del Río, R.E., Hernández, J.D., Joseph-Nathan, P., Zabel, V., Watson, W.H.; Tetrahedron 37, 2769 (1981).
- 16.-Rajbhandari, A. and Margaret, F.R.; J. Nat. Prod. 48, 858 (1985).
- 17.-Calderón, J.S., Quijano, L., Gómez, F. and Ríos, T.; Phytochemistry 28, 3526 (1989).
- 18.-Román, L.U., Mora, J.D., Hernández, J.D.; Fitoterapia LXI, 84 (1990).
- 19.-King, R.M. and Robinson, H.; Sida 3, 165 (1967).
- 20.-Rzedowski, J.; Vegetación de México. 1a. ed, Edt. Limusa, México (1978).
- 21.-Oscar, S.S.; La flora del Valle de México. Edt. Herrero. México (1976).
- 22.-King, R.M. and Robinson, H.; Phytologia 46, 446 (1980).
- 23.-King, R.M. and Robinson, H.; Sida 3, 257 (1968).
- 24.-Romo de Vivar, A.; Ciencia 32, 163 (1981).
- 25.-Fischer, N., Oliver, E. and Fischer, H.; Prog. Chem. Nat. Prod. 38, 48 (1979).
- 26.-Hendrickson, J.B.; Tetrahedron 7, 82 (1959).
- 27.-Parker, W., Roberts, J.S. and Ramage, R.; Quart. Rev. 21, 331 (1967).
- 28.-Thomson, R.H.; The Chemistry of Natural Products. 1a. ed. Edt. Blackie & Son, G.B.(1985).

- 29.-Renold, W., Yoshioka, H. and Mabry, T.J.; *J. Org. Chem.* 35, 4264 (1970).
- 30.-Samek, Z. and Budesinsky, M.; *Collect. Czech. Chem. Commun* 44, 558 (1979).
- 31.-Yoshioka, H., Mabry, T.J., Timmermann, B.N.; *Sesquiterpenelactones Chemistry, NMR and Plant Distribution*. University of Tokyo Press. (1973).
- 32.-Appedino, G. and Gariboldi, P.; *Phytochemistry* 21, 2555 (1982).
- 33.-Cekan, Z., Herout, V. and Sorm, F.; *Chem. Ind.* 1234 (1956).
- 34.-Vokác, K., Samek, Z., Herout, V. and Sorm, F.; *Collect. Czech Chem. Commun.* 34, 2288 (1969).
- 35.-Versar-Petry, G., Szegi, J., Marczal, G.; *Acta Pharm. Hung.* 49, 13 (1979).
- 36.-Szalontai, M., Versar-Petry, G. and Florian, E.; *Partuem Kosmet.* 58, 121 (1977).
- 37.-Boldina, I.G., Nazarenko, M.V.; *Rast. Resur.* 3, 67 (1967).
- 38.-Kaneko, H., Naruto, S. and Takahashi, S.; *Phytochemistry* 10, 3305 (1971).
- 39.-Sacco, T., Frattini, C., Bicchi, C.; *Planta Med.* 47, 49 (1983).
- 40.-Sharp, D.W.A.; *Miall Diccionario de Química*. 1ed. Edt. Alhambra. España (1989).
- 41.-*Dictionary of Organic Compounds*. 4Th ed. Tenth and Comulative Supplement. Eyre & Spottiswoode Publisher LTD E & FN. Spon LTD. (1974).

- 42.-Wood, J.C., Elofson, R.M. and Saunders, D.M.; *Analyt. Chem.* 30, 1339 (1958).
- 43.-Silverstein, R.M. and Bassler, G.C. *Spectrometric Identification of Organic Compound*. 2nd. Ed. John Wiley & Sons, Inc. N.Y. (1963).
- 44.-Neuenschwander, M. and Isell, R.; *Helv. Chem. Acta.* 60, 1061 (1977).
- 45.-Pasto, D.J. y Johnson, C.R.; *Determinación de estructuras orgánicas*. Edt. Reverté. España (1974).
- 46.-Moss, G.P.; *Pure & Appl. Chem.*; 47, 97 (1976).
- 47.-Levy, G.C., Nelson, G.L.; *Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13*. Ediciones Ballaterra. John Wiley & Sons Inc. España (1972).
- 48.-Bachelor, F.W., Paralihar, A.B. and Itó, S.; *Can. J. Chem.* 50, 333 (1972).
- 49.-Pinhey, J.T. and Sternhell, S.; *Aust. J. Chem.* 18, 543 (1965).
- 50.-Bohlmann, F. and Zdero, C.; *Liebigs Ann. Chem.* 1764 (1985).
- 51.-Bohlmann, F., Borthakur, N., Jakupovic, J. and Pickard, J.; *Phytochemistry* 21, 1357 (1982).
- 52.-Barrero, A. F., Sánchez J.F., Molina, J., Barrón, A. and Del Mar Salas, Ma.; *Phytochemistry* 29, 3575 (1990).
- 53.-Bohlmann, F. and Knoll, K.H.; *Phytochemistry* 18, 995 (1979).