



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
CENTRO DE INVESTIGACIONES QUÍMICAS

Estudio estereoquímico y conformacional de
algunos metabolitos secundarios aislados de
Stevia pilosa y *Stevia tomentosa*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

DOCTOR EN QUÍMICA

PRESENTA:

Q. F. B. ROCÍO ÁLVAREZ GARCÍA

ASESORES: DR. J. JESÚS MARTÍN TORRES VALENCIA

DR. CARLOS M. CERDA GARCIA ROJAS

Dedico el presente trabajo a mis padres Joel Álvarez Rebollo y Eva García Pérez por el apoyo incondicional que me han brindado en todo momento. También a mis hermanos Joel y Ernesto por todos los momentos compartidos a través de cada etapa de nuestras vidas.

Agradezco a todas aquellas personas que me brindaron su amistad y apoyo durante el desarrollo del presente trabajo.

Mi sincero agradecimiento a los Doctores J. Jesús Martín Torres Valencia y Carlos M. Cerda García Rojas por el asesoramiento y dirección de esta tesis.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y en el Departamento de Química del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, bajo la dirección de los Doctores J. Jesús Martín Torres Valencia (CIQ-UAEH) y Carlos M. Cerda García Rojas (CINVESTAV-IPN), con una beca del proyecto apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) "Búsqueda de nuevos productos naturales con actividad biológica en especies de los géneros *Mimosa* y *Stevia*" (Referencia: 37574-E).

Esta Tesis Doctoral generó las siguientes publicaciones:

1. Absolute configuraron of the α -methylbutyryl residue in longipinene derivatives from *Stevia pilosa*.

Rocío Álvarez-García, J. Martín Torres-Valencia, Luisa U. Román, Juan D. Hernández, Carlos M. Cerda-García-Rojas y Pedro Joseph-Nathan. *Phytochemistry* **2005**, 66, 639-642.

2. DFT and NMR parameterized conformation of valeranone.

J. Martín Torres-Valencia, Myriam Meléndez-Rodríguez, Rocío Álvarez-García, Carlos M. Cerda-García-Rojas y Pedro Joseph-Nathan. *Magn. Reson. Chem.* **2004**, 42, 898-902.

Esta Tesis Doctoral generó las siguientes participaciones en Congresos:

1. Derivados del longipineno de *Stevia pilosa* Lag.

Rocío Álvarez-García, Iván Mera-Moreno, J. Martín Torres-Valencia, Julio Rodríguez-Baños, Luisa U. Román, Juan D. Hernández, Carlos M. Cerda-García-Rojas y Pedro Joseph-Nathan.

Presentado en el XXXVII Congreso Mexicano de Química, del 22 al 26 de septiembre de 2002, Cancún, Quintana Roo.

Rev. Soc. Quím. Méx. **2002**, 46, 101, resumen No. 2.

2. Un nuevo bisabolenol aislado de *Stevia tomentosa* H.B.K.

Rocío Álvarez-García, Ana S. López, J. Martín Torres-Valencia, Mindre Y. González, Armida Zúñiga-Estrada, J. Roberto Villagómez-Ibarra, Osear R. Suárez-Castillo, Luisa U. Román, Juan D. Hernández, Carlos M. Cerda-García-Rojas y Pedro Joseph-Nathan.

Presentado en el XXXVIII Congreso Mexicano de Química, del 21 al 25 de septiembre de 2003, Ixtapa, Guerrero.

Rev. Soc. Quím. Méx. **2003**, 47, 105, resumen No. 80.

3. Configuración absoluta del residuo 2-metilbutanoico en derivados del longipineno aislados de *Stevia pilosa*.

Rocío Álvarez-García, J. Martín Torres-Valencia, Luisa U. Román, Juan D. Hernández, Carlos M. Cerda-García-Rojas y Pedro Joseph-Nathan.

Presentado en el XXXIX Congreso Mexicano de Química, del 3 al 7 de octubre de 2004, Mérida, Yucatán.

Rev. Soc. Quím. Méx. **2004**, 48, 91, resumen No. 10.

4. Estudio conformacional de valeranona mediante RMN y teoría de funcionales de la densidad.

J. Martín Torres-Valencia, Myriam Meléndez-Rodríguez, Rocío Álvarez-García, Carlos M. Cerda-García-Rojas y Pedro Joseph-Nathan.

Presentado en el XXXIX Congreso Mexicano de Química, del 3 al 7 de octubre de 2004, Mérida, Yucatán.

Rev. Soc. Quím. Méx. **2004**, 48, 91, resumen No. 11.

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

[α]	Rotación específica
Å	Angstrom
Ac	Acetato
Ang	Angelato
AcOEt	Acetato de etilo
δ	Desplazamiento químico
c	Concentración
°C	Grados Celsius
CDCl ₃	Cloroformo deuterado
cm	Centímetro
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
cm	Centímetros
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
d	Doble
<i>dd</i>	Doble de dobles
<i>ddd</i>	Doble de dobles de dobles
<i>dsext</i>	Doble de séxtuples
DCC	<i>N,N</i> -Diciclohexilcarbodiimida
DFT	Density Functional Theory
d.i.	Diámetro interno
DMAP	4- <i>N,N</i> -dimetilaminopiridina
Epang	Epoxiangelato
EtOH	Etanol
g	Gramos
Glc	Glucosa
HETCOR	Heteronuclear Correlation
HMBC	Heteronuclear Múltiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Múltiple Quantum Coherence

HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
kg	Kilogramo
Hz	Hertz
IsoBu	Isobutirato
Isoval	Isovalerato
nm	Nanómetro
Meacr	Metilacrilato
MeBu	Metilbutirato
mg	Miligramos
ml	Mililitros
MHz	Megahertz
MeOH	Metanol
ppm	Partes por millón
p.f.	Punto de fusión
R _f	Relación de frente
R _t	Tiempo de retención
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN de ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RMN de ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono-13
Sen	Senecioato
Tigl	Tiglato
TMS	Tetrametilsilano

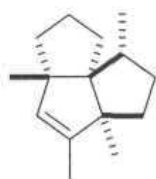
ÍNDICE

ABSTRACT	<i>i</i>
1. INTRODUCCIÓN	
1.1 Productos naturales.	1
1.2 La medicina tradicional.	2
1.3 La medicina moderna y los productos naturales.	4
1.4 El organismo humano y los productos naturales.	7
1.5 Análisis conformacional, modelado molecular y cálculos teóricos.	8
2 ANTECEDENTES	
2.1 El género <i>Stevia</i> .	11
2.2 Composición química de <i>Stevia</i> .	12
2.3 Distribución de metabolitos secundarios en <i>Stevia</i>	20
2.4 <i>Stevia pilosa</i> Lag.	22
2.5 <i>Stevia tomentosa</i> H.B.K.	22
2.6 Actividad antibacteriana de los extractos de <i>S. pilosa</i> Lag. y <i>S. tomentosa</i> H.B.K.	24
3. OBJETIVOS	27
4. JUSTIFICACIÓN	28
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
5.1 Aislamiento y caracterización de los metabolitos de <i>Stevia pilosa</i> Lag. ..	31
5.2 Determinación de la configuración absoluta del residuo a-metilbutiroílo en derivados del longipineno.	78
5.2.1 Síntesis parcial de derivados del longipineno con el residuo (S)-(+)- α -metilbutiroílo	78

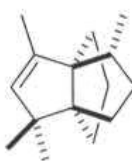
5.2.2 Correlación química con el (S)-(+)- α -metilbutanoato de bencilo.	112
5.3 Análisis conformacional de compuestos selectos aislados de <i>Stevia</i> .	124
5.3.1 Análisis conformacional de (-)-valeranona aislada de <i>S. tomentosa</i> H.B.K.	127
5.3.2 Análisis conformacional de (4R,5S,7R,10R,11R)-7-angeloiloxilongipin-2-en-1 -ona.	135
5.3.3 Análisis conformacional del α -isocomeno	139
5.3.4 Análisis conformacional del γ -cadineno	143
6. CONCLUSIONES	147
7. PARTE EXPERIMENTAL	
7.1 Generalidades.	149
7.2 Obtención y separación cromatográfica del extracto hexánico de las raíces de <i>Stevia pilosa</i> Lag.	151
7.3 Determinación de la configuración absoluta del residuo (S)-(+)- α -metilbutiroílo.	154
7.3.1 Síntesis parcial de derivados del longipineno con el residuo (S)-(+)- α -metilbutiroílo.	154
7.3.2 Correlación química con el (S)-(+)- α -metilbutanoato de bencilo.	158
7.4 Cálculos de modelado molecular de sesquiterpenos aislados de <i>Stevia pilosa</i> Lag. y <i>S. tomentosa</i> H.B.K.	160
8 REFERENCIAS	167

ABSTRACT

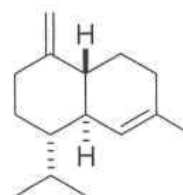
Chromatographic separation of the hexane extracts from the roots of *Stevia pilosa* allowed the isolation of natural products 47, 48, 52-59 and 63-64, which were characterized by their ^1H and ^{13}C NMR spectroscopic data. Compound 56 is a new natural product, whereas compounds 52, 53 and 55 have not been isolated from *Stevia* species before.



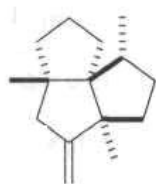
52



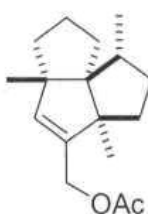
53



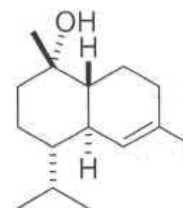
54



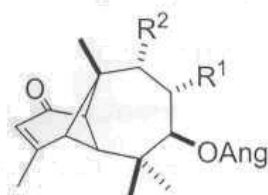
55



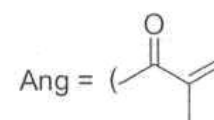
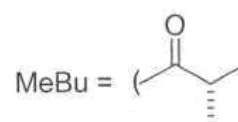
56



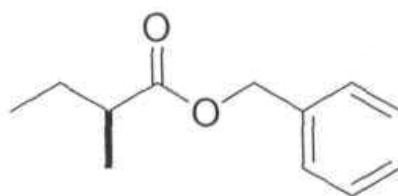
57



	R ¹	R ²
58	H	H
59	OAng	H
63	OMeBu	H
64	OAc	OAng
47	OAng	OH
48	OMeBu	OH



Chiral ester moieties derived from short-chain-length fatty acids are commonly found in terpenoids. In most cases, reports on the structure of these substances focus on the stereochemical assignment of the main framework, but lack information about the absolute configuration of ester residues. As a continuation of a research line devoted to establish the stereochemistry of such esters, we describe herein the chirality of the α -methylbutyryl residues found in longipinene derivatives 48 and 63 as S by means of Chemical correlation with (S)-(+)-benzyl α -methylbutyrate (82) prepared from commercially available (S)-(+)- α -methylbutyric acid. This is the first time that the absolute configuration of the α -methylbutyryl residues of natural products is elucidated by chemical correlation.

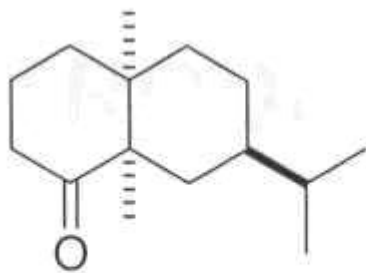


82

on the other hand, the phytochemical study of *Stevia tomentosa* H.B.K. allowed the isolation of the antispasmodic compound (-)-valeranone (44), which is a rearranged sesquiterpene with a cis-decalone framework and two vicinal stereogenic quaternary carbon atoms. It is known that this substance causes suppression of rhythmic contractions and relaxed potassium stimulated contractures in guinea-pig ileum. The structure of 44 was established by Hikino *et al.* and further confirmed by total syntheses. Since then, there have been several other synthetic constructions of 44 conducted to secure its stereochemistry, which was once a focus of dispute. Up to date, the ^1H and ^{13}C NMR assignment of this important sesquiterpene has not gone beyond the methyl group assignments, and no conformational evaluation based on NMR data is known.

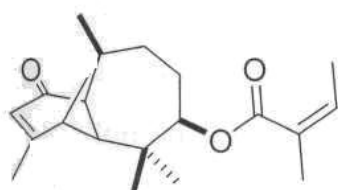
Therefore, we decided to study, theoretically and experimentally, the conformational behavior of this sesquiterpene, as well as to complete the ^1H

and ^{13}C NMR assignment by the combined use of DFT calculations, spectral simulation and 2D NMR spectroscopy.

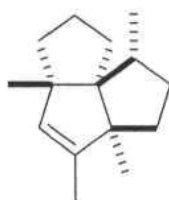


44

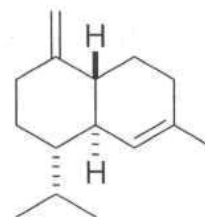
Also, in continuation of our studies on the conformation of natural products, we describe the DFT molecular models and conformational behavior of three representative sesquiterpenes of *Stevia pilosa*: (4*R*,5*S*,7*R*,10*R*,11*R*)-7-angeloyloxylongipin-2-en-1-one (58), α -isocomene (52) and γ -cadinene (54).



58



52



54

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Productos Naturales

Un producto natural es todo compuesto de origen orgánico o inorgánico, que se halle en la naturaleza y que pueda ser procesado por el hombre.¹ Generalmente, en el área de química orgánica, se consideran como productos naturales a aquellos provenientes principalmente de plantas, hongos, bacterias y organismos marinos, los cuales llevan a cabo dos tipos de metabolismo, el primario y el secundario. El metabolismo primario es aquél en el cual los organismos sintetizan y convierten sustancias para sobrevivir a partir de compuestos simples como el CO₂, H₂O, N₂ y algunos metales, que son transformados en polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos, los cuales son considerados los bloques fundamentales de la materia viva. Este tipo de metabolismo lo llevan a cabo todos los organismos vivos. Otro proceso que se lleva a cabo en las plantas, dando diferentes productos de acuerdo al tipo de especie, es el llamado metabolismo secundario. Los productos formados por este metabolismo se conocen como productos naturales y como ejemplos se pueden mencionar a los terpenos, los alcaloides y los pigmentos. Aunque estos metabolitos no parecen ser esenciales para la existencia del organismo, juegan un rol importante en la supervivencia o prevalencia de unas especies sobre otras, ya que se piensa que son utilizados para la defensa, como atrayentes sexuales, marcadores territoriales, etc.²

1.2 La medicina tradicional

El uso de la Medicina Tradicional es ancestral y data desde que el hombre tuvo conciencia de que podía emplear los recursos que le rodeaban para curar sus enfermedades. Dicha información ha sido transmitida de generación en generación en forma oral o a través de códices y otros escritos.³



Por esta razón, se conoce que las plantas contienen principios activos de acción terapéutica definida, que pueden emplearse para modificar favorablemente los trastornos patológicos originados por las enfermedades y recuperar la salud.



Existen algunos principios activos que actúan generalmente sobre las funciones orgánicas como la circulación, la respiración, etc., o bien sobre el sistema nervioso y entonces su acción es más general, obrando sobre el organismo por entero. Estos principios activos pueden ser dañinos si no se conoce su actividad o no se manejan con cuidado y precaución, de allí el peligro de emplear una planta

empíricamente. Esto nos indica también la importancia del estudio químico para conocer las estructuras de los compuestos presentes en los vegetales.⁴

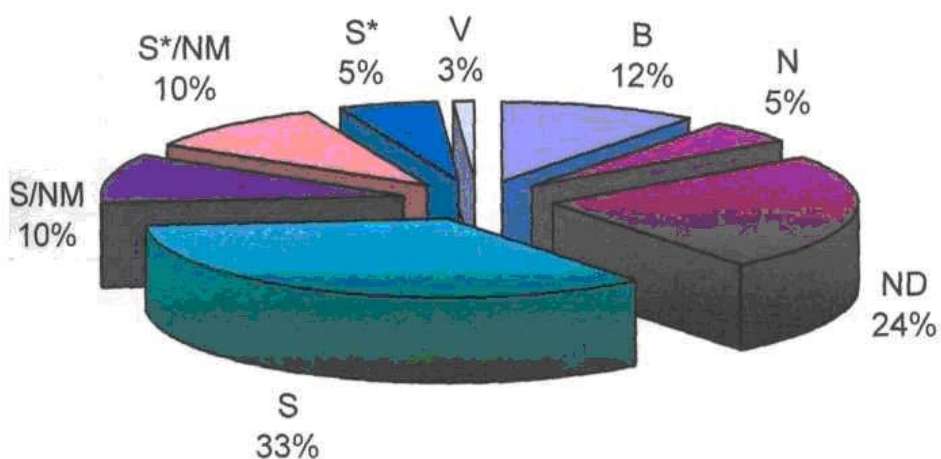


En las últimas dos décadas se han aislado una infinidad de compuestos nuevos y activos, pero son contados los compuestos que han llegado a constituir fármacos y a utilizarse con fines terapéuticos. En la actualidad, en la gran mayoría de los casos el uso de la flora se lleva a cabo de manera empírica, y se considera que existe aún un número considerable de especies sin explotar.³

1.3 La medicina moderna y los productos naturales

Los compuestos naturales juegan tres papeles significativos en la medicina moderna: en primer lugar, proveen un gran número de drogas empleadas con fines medicinales, que son de difícil producción comercial por rutas sintéticas. Esto incluye diversos grupos de compuestos como los alcaloides, provenientes del opio, ergot y plantas solanáceas, los glicósidos cardiotónicos o digitálicos, la mayoría de los antibióticos, y todos los sueros, vacunas y productos relacionados. En segundo lugar, proveen compuestos básicos que pueden ser modificados para hacerlos más efectivos o menos tóxicos, como ejemplo se encuentran numerosas variaciones de la morfina, el taxol y la diosgenina.⁵ Y un tercer papel de los productos naturales es su utilidad como prototipos o modelos para la síntesis de drogas que poseen actividades fisiológicas similares a los originales. La procaína y anestésicos locales son ejemplos representativos de esta categoría.

Lo anterior se ve reflejado principalmente en las áreas del cáncer y enfermedades infecciosas donde cerca del 70% de los fármacos empleados son de origen natural (Gráfica 1 y Tabla 1).⁶



Gráfica 1. Medicamentos reportados en el período 1981-2002.

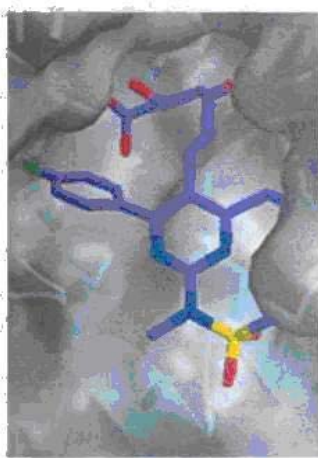
"B": Biológico: Péptidos o proteínas que fueron aisladas de un organismo o línea celular, o que son producidas por mecanismos biotecnológicos. "N": Producto Natural. "ND": Derivado de un producto natural y usualmente tiene una modificación semisintética. "S": Totalmente sintético, frecuentemente se obtienen de la modificación de algún fármaco ya existente. "S*": Obtenido por síntesis total, pero el prototipo fue un producto natural. "V": Vacuna. "NM": Producto que se obtiene del conocimiento adquirido del comportamiento de un producto natural

Tabla 1. Origen de nuevos medicamentos empleados para el tratamiento de enfermedades durante los años 1981 a 2002

Indicación	Origen de los medicamentos							Indicación	Origen de los medicamentos						
	total	B	N	ND	S	S*	V		total	B	N	ND	S	S*	V
Analgésico	15				13	2		Broncodilatador	8			2		6	
Anestésico	5				5			Inhibidor del metabolismo de calcio	17			8	9		
Ansiolítico	10				10			Cardiotónico	13			3	5	5	
Anti-Alzheimer	4		1		3			Cicatrizante	5	2		2	1		
Anti-Parkinson	10			2	4	4		Diurético	4				4		
Antialergénico	15		1	3	11			Quelatante y antídoto	5				5		
Antianginoso	4				4			Gastroprocinético	4				3	1	
Antiarrítmico	15		1		12	2		Hematopoyético	5	5					
Antiarrítmico	12	2		1	9			Hemofílico	9	9					
Antiasmático	12			2	8	2		Hepatitis	17	7				1	9
Antibacteriano	90		9	61	19	1		Hipnótico	11				11		
Anticancerígeno	79	12	9	21	25	10	2	Hipocolesterolémico	9		3	1	2	3	
Anticoagulante	16	3		12		1		Hipolipidémico	8		1		7		
Anticonceptivo	6			6				Hormonal	20	10		10			
Antidepresivo	21				19	2		Hipertrofia prostática benigna	4		1	2	1		
Antidiabético	23	12	1	2	7	1		Inhibidor de la agregación protoplásmica	4			3	1		
Antiemético	7				1	6		Inmunoestimulante	10	4	3	2	1		
Antiepiléptico	10			1	6	3		Inmunosupresor	10	4	5	1			
Antifúngico	24	1		2	21			Insuficiencia respiratoria	6	3	1		2		
Antiglaucoma	13			4	5	4		Neuroléptico	10				8	2	
Antihemofílico	9	9						Nootrópico	8			3	5		
Antihistamínico	12				12			Relajante muscular	10			4	3	3	
Antihiperprolactémico	4			4				Terapia del remplazamiento de hormonas	4			4			
Antihipertensivo	75			1	40	34		Vasodilatador	6			3	3		
Antiinflamatorio	50	1		13	36			Total	868	91	40	209	386	131	11
Antimigrañoso	10				3	7									
Antiparasitario	13		2	5	4	2									
Antipsoriático	4			3		1									
Antipsicótico	7				5	2									
Antitrombótico	28	13	1	5	7	2									
Antiulceroso	32	1	1	12	18										
Antiviral	35	2		1	8	24									
Ansiolítico	10				10										

1.4 El organismo humano y los productos naturales

En la mayoría de los casos, los compuestos aislados de las plantas son quirales, encontrándose sólo uno de los enantiómeros. Como algunas de estas sustancias presentan actividad biológica, resulta relevante determinar su estereoquímica y configuración absoluta debido a la implicación en el contexto de la actividad farmacológica.



Los organismos presentan sitios activos quirales (parte de una membrana celular o una macromolécula tal como una proteína o ácido nucleico), los cuales son receptores con alta afinidad para estas sustancias. La unión de éstas con el sitio activo desencadena una serie de reacciones que se traducen en una respuesta biológica. Esta respuesta depende del acoplamiento efectivo de la sustancia con el receptor, siendo diferente para cada enantiómero (Figura 1).⁷ De ahí la importancia de

determinar la configuración absoluta de un producto natural, ya que si en un futuro se conociera que dicho compuesto tiene alguna actividad farmacológica y se llevara a cabo su síntesis, el compuesto sintetizado debe de tener exactamente la misma configuración que la presentada por el producto natural para que el compuesto sea farmacológicamente activo, dado que la estereoquímica contraria de uno sólo de los centros estereogénicos modificará la respuesta biológica de la molécula.

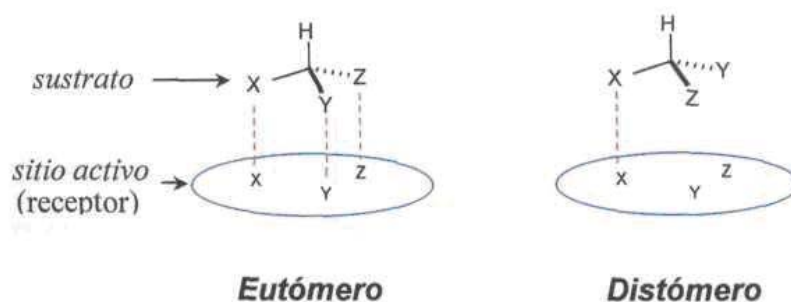


Figura 1. Acoplamiento sustrato-receptor

1.5 Análisis conformacional, modelo molecular y cálculos teóricos.

El análisis conformacional se refiere a la evaluación de los atributos físicos y químicos de los conformeros de una molécula. Como los átomos de una molécula pueden ordenarse espacialmente por medio de la rotación de uno o más enlaces sencillos, esto gracias a que en la mayoría de los casos la energía que se requiere es muy baja (menor de 3-5 kcal/mol a temperatura ambiente), se pueden tener diferentes conformaciones de una misma molécula, algunas de las cuales son más estables que otras. Para simplificar el estudio conformacional de un compuesto, se analizan únicamente los conformeros predominantes. El análisis conformacional completa el análisis estructural de una molécula; esto es, la descripción de la conectividad, configuración y conformación de los átomos que la componen.

Debido a la fácil disponibilidad de programas computacionales, actualmente se pueden comparar los cálculos teóricos con los resultados experimentales. En particular, estos programas se emplean usualmente para generar modelos útiles en la determinación de la estructura y conformación de una sustancia. En ocasiones, las discrepancias entre los cálculos y el resultado experimental se explican con base en efectos electrónicos⁸ o algunos tipos de "efectos conformacionales" no considerados.

Modelado Molecular. Se denomina modelado molecular al conjunto de métodos que pretenden predecir las propiedades y el comportamiento de los sistemas químicos en forma numérica, apoyándose en entornos gráficos para la manipulación de moléculas.

El modelado molecular es una técnica de estudio relativamente nueva que relaciona la estructura molecular y las propiedades químicas macroscópicas de la materia. La base del modelado molecular es el uso de métodos computacionales para simular, explicar o predecir la estructura tridimensional y las propiedades

fisicoquímicas de la molécula con la ayuda esencial de métodos gráficos. Estas técnicas se encuentran dentro de la química computacional.

Para realizar el modelado molecular se recurre a programas de computación más o menos sofisticados que incluyen una o varias de las siguientes funcionalidades

- a) Permiten el cálculo de energías moleculares y propiedades asociadas con dichas energías.
- b) Permiten el cálculo de la estructura tridimensional de las moléculas.
- c) Permiten la visualización de las moléculas y de sus propiedades.
- d) Permiten el análisis cuantitativo de los resultados del modelado.
- e) Permiten la aplicación de todas las propiedades anteriores a problemas reales.

De aquí que los componentes del modelado molecular sean los siguientes.

- a) Los métodos de cálculo (empíricos, semiempíricos, *ab initio*, funcionales de la densidad, etc.) forman el corazón de un verdadero sistema de modelado molecular. Con ellos se calculan las energías (calores de formación, energías electrónicas, electrostáticas, etc.) y otras propiedades tales como momentos dipolares, densidad electrónica, etc.
- b) Los procedimientos de manipulación de la geometría molecular permiten el estudio de las diferentes conformaciones de un sistema. Al acoplarse con los métodos de cálculo, permiten el estudio de las propiedades moleculares dependientes de la conformación.
- c) Los métodos gráficos, son el tercer gran pilar en que se asienta el modelado molecular. Permiten la interpretación visual de las conformaciones y las propiedades moleculares en forma atractiva.

- d) Los procedimientos de análisis permiten interpretar los datos producidos por algunos componentes del sistema. Por ejemplo, analizar el grado de flexibilidad o de rigidez que presentan las distintas zonas de la molécula.

- e) Todas las funcionalidades expresadas pueden utilizarse en el estudio de sistemas químicos o bioquímicos complicados, como puede ser, por ejemplo, los estudios de farmacología teórica o los estudios de reacciones químicas.⁹

2 ANTECEDENTES

2.1 El género *Stevia*

El género *Stevia*, perteneciente a la tribu Eupatorieae, familia Asteraceae, se extiende desde el suroeste de los Estados Unidos hasta el norte de Argentina, a través de México, América Central, los Andes y las Tierras Altas Brasileñas en ecosistemas localizados entre 1000 y 2000 m sobre el nivel del mar. Se estima que el número de especies dentro del género es de 300, de las cuales más de 80 se encuentran en Norte América, y de éstas, 70 especies son nativas de México (Figura 2).¹⁰

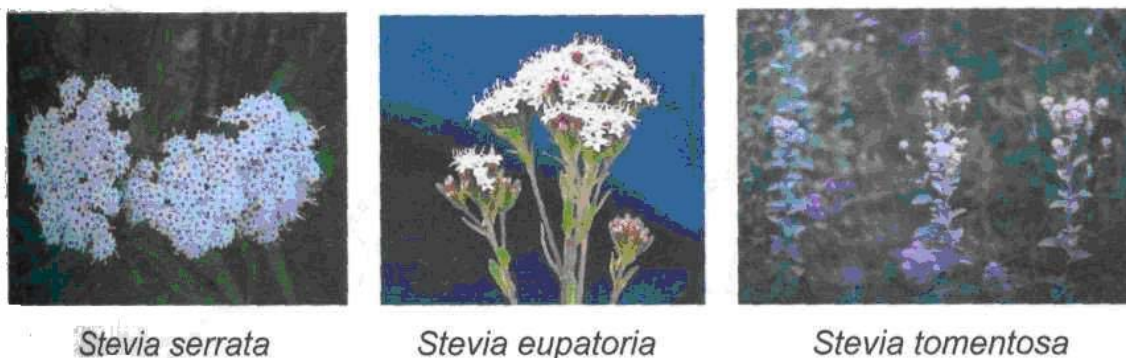


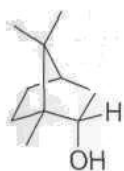
Figura 2. Ejemplos de algunas especies de *Stevia*.

En el estado de Hidalgo, las condiciones climáticas y fisiográficas tan diversas de la Sierra de Pachuca propician la existencia de un considerable número de habitats, lo cual ha favorecido el establecimiento de distintas comunidades vegetales, entre las cuales se encuentran 21 especies de *Stevia*: *S. eupatoria*, *S. hirsuta* DC. var. *hirsuta*, *S. iltisiana*, *S. jorullensis*, *S. latifolia*, *S. lucida*, *S. micrantha*, *S. aff. monardifolia*, *S. monardifolia*, *S. nepetifolia*, *S. ovata*, *S. ovata* var. *ovata*, *S. pilosa*, *S. porphyrea*, *S. purpusii*, *S. rhombifolia* var. *typica*, *S. saücifolia*, *S. salicifolia* var. *salicifolia*, *S. serrata*, *S. tephra* y *S. tomentosa*.¹² De las 21 especies encontradas en el Edo. de Hidalgo, únicamente se han descrito estudios fitoquímicos de 10 especies.¹³

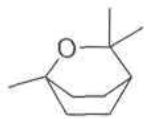
2.2 Composición química de *Stevia*

Debido a que el género *Stevia* es uno de los más grandes y reconocidos de la tribu Eupatorieae, este taxón, morfológicamente bien delineado en el grupo Piquería, tiene una amplia diversidad en su composición química.¹⁴ De los estudios fitoquímicos realizados en aproximadamente 70 especies se han encontrado metabolitos tales como:

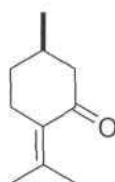
- *Aceites esenciales y otros constituyentes volátiles.* Como ejemplos se pueden mencionar: borneol (1), cineol (2), pulegona (3), geraniol (4), acetato de linalol (5), chamazuleno (6), α -humuleno (7), cariofileno (8), etc.



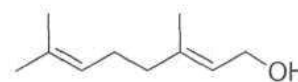
1



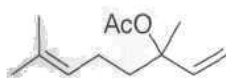
2



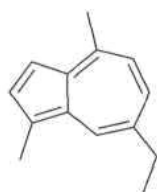
3



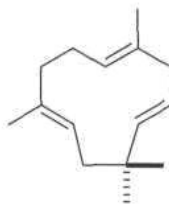
4



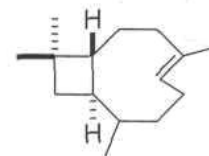
5



6

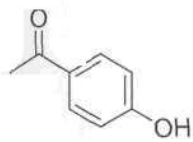


7

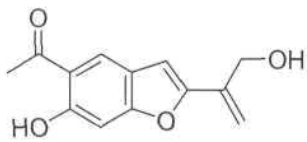


8

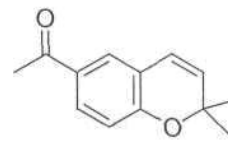
- *Derivados de la acetofenona, benzofurano y cromeno.* Como ejemplos de estos compuestos se encuentran: p-hidroxiacetofenona (9), un derivado del benzofurano (10) y el derivado del cromeno (11)



9



10



11

➤ *Sesquiterpenos funcionados*, de los cuales se muestran los esqueletos de un representante de cada familia.

-Bisabolanos (12)

-Longipinanos (13)

-Germacrenos (14)

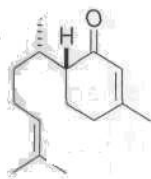
-Elemanólidos (15)

-Eudesmanos (16)

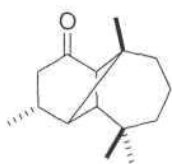
-Eremofilanos (17)

-Guaianólidos (18)

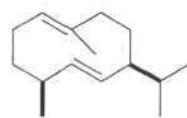
-Pseudoguaianólidos (19)



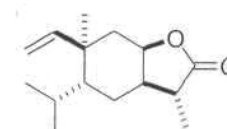
12



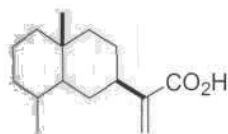
13



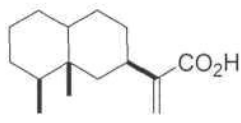
14



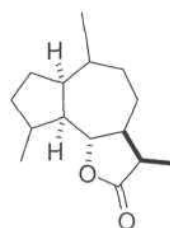
15



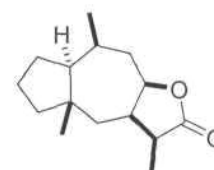
16



17



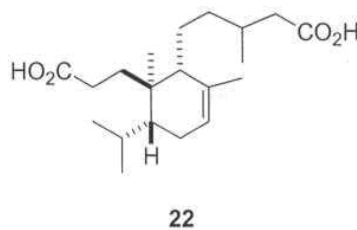
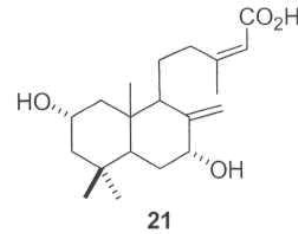
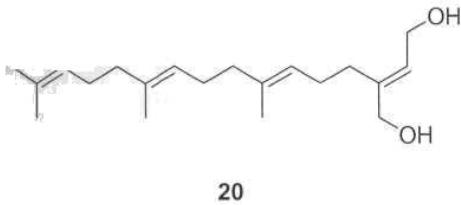
18



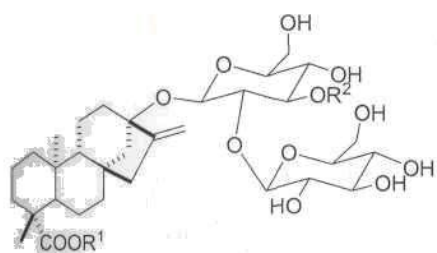
19

➤ *Diterpenos*. Los más comunes son los tetracíclicos.

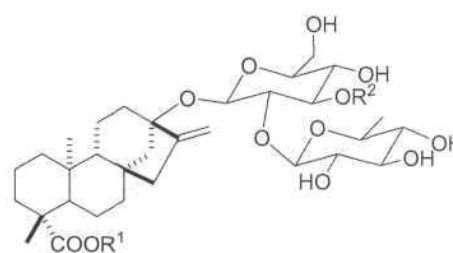
- Acíclicos y bicíclicos, tales como el 20-hidroxigeranilnerol (20), el ácido 2 α , 7 α -dihidroxi-8(17),13Z-labdadien-15-oico (21) y el seco-labdano (22).



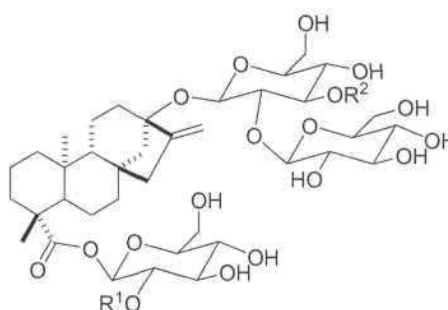
- Tetracíclicos. Representantes característicos de este tipo de diterpenos son los derivados del enf-kaureno (**23-30**), de los cuales **23** y **25** son glicósidos dulces que se emplean como sustitutos del azúcar debido a su alto poder edulcorante y bajo contenido calórico.



- 23 $R^1 = \text{Glc}; R^2 = \text{H}$
 24 $R^1 = R^2 = \text{H}$
 25 $R^1 = R^2 = \text{Glc}$
 26 $R^1 = \text{H}; R^2 = \text{Glc}$

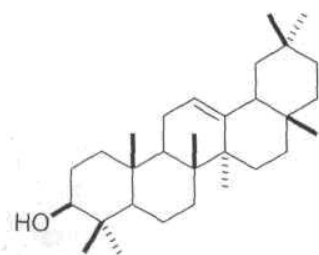


- 27 $R^1 = R^2 = \text{Glc}$
 28 $R^1 = \text{Glc}; R^2 = \text{H}$

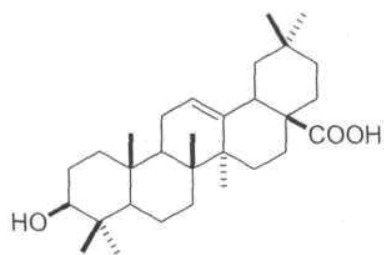


- 29 $R^1 = \text{H}; R^2 = \text{Glc}$
 30 $R^1 = \text{Glc}; R^2 = \text{H}$

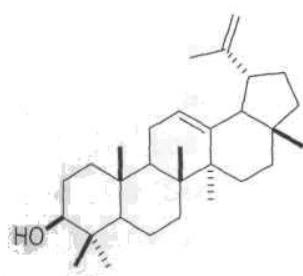
- *Triterpenos y esteróles.* Dentro de este grupo de compuestos están el β -sitosterol, estigmasterol, campesterol, oleananos, lupanos, taraxasteranos y friedelanos. Como ejemplos se muestran a continuación: (β -amirina (31), ácido oleanólico (32), lupeol (33) taraxasterol (34) y friedelina (35).



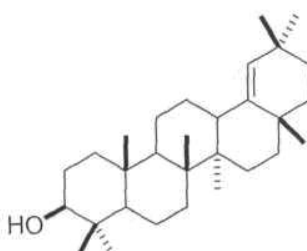
31



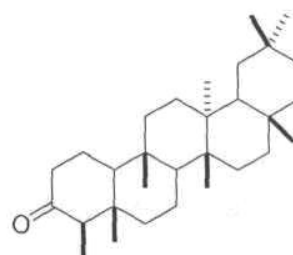
32



33

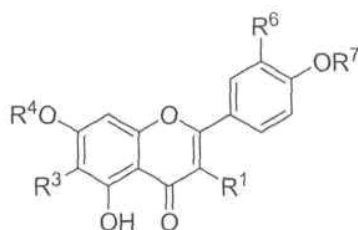


34



35

- Flavonoides. Los miembros de la familia *Asteraceae* son una fuente rica en agliconas flavonoides, las cuales se acumulan principalmente en las partes aéreas de la planta, encontrándose patrones de sustitución similares entre flavonas y flavonoles. Como ejemplo se muestran los flavonoides 40-43.



40 $R^1=R^3=OMe$; $R^4=H$; $R^6=OH$; $R^7=Me$

41 $R^1=R^3=R^6=R^7=H$; $R^4=Me$

42 $R^1=OH$; $R^3=R^6=R^7=H$; $R^4=Me$

43 $R^1=R^3=R^4=R^6=H$; $R^7=Me$

Los derivados del longipinano constituyen una de las clases más representativas de compuestos presentes en *Stevia*. Este grupo comprende 61 compuestos, 43 longipinanos y 18 longipinenos, los cuales pueden clasificarse sistemáticamente en 18 tipos representativos. Como puede apreciarse en la Figura 3, los grupos funcionales característicos presentes en estos compuestos son un grupo carbonilo en C-1 y grupos hidroxilo o ésteres en C-7, C-8, C-9 y/o C-15. En los compuestos saturados el grupo metilo en C-3 se encuentra siempre con una configuración α , mientras que el grupo hidroxilo o los grupos ésteres en C-7, C-8 y C-9 tienen siempre una configuración β , α y α , respectivamente. Cada una de las especies analizadas generalmente produce muchas de estas sustancias generando mezclas complejas que dificultan su separación. Los ésteres más comunes son angelatos (Ang), tiglatos (Tigl), senecioatos (Sen), metilacrilatos (Meacr) y acetatos (Ac), aunque también se han encontrado en menor proporción epoxiangelatos (Epang), isovaleratos (i-Val), isobutiratos (i-Bu), sarracenilatos (Sar), acetoxisarracenilatos (Sarac) y α -metilbutiratos (MeBu).¹⁴ Este último residuo [MeBu = CH₃CH₂CH(CH₃)CO] sólo se ha encontrado unido a tres lactonas sesquiterpénicas aisladas de *S. serrata* Cav. y a dos derivados del longipineno aislados de la misma especie. Cabe señalar que la configuración absoluta de dicho residuo no había sido descrita hasta ahora.¹⁵⁻¹⁷

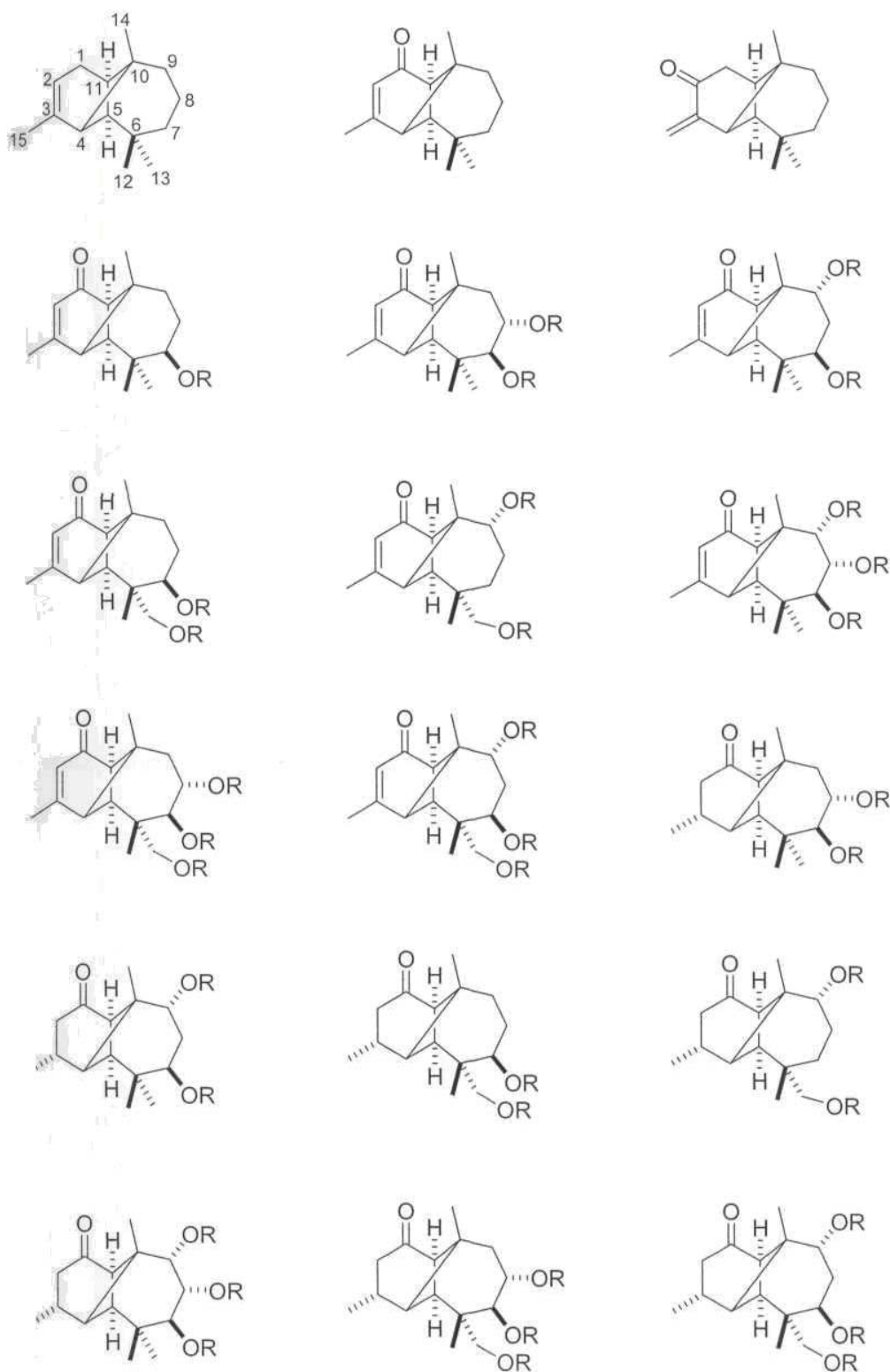


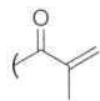
Figura 3. Tipos de derivados del longipineno aislados de *Stevia*, donde OR pueden ser diversos grupos éster.

R¹, R² y R³ pueden ser:

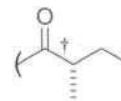
Ac



Meacr



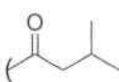
MeBu



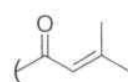
i-Bu



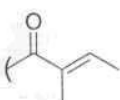
i-Val



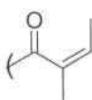
Sen



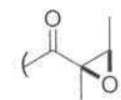
Tigl



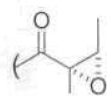
Ang



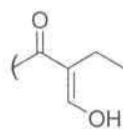
Epang



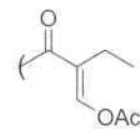
Epang*



Sar



Sarac



Estereoquímica absoluta determinada en este trabajo

2.3 Distribución de metabolitos secundarios en *Stevia*

La Tabla 2 muestra la distribución de metabolitos secundarios en *Stevia*, reportados hasta el año 1998.¹³

Tabla 2. Metabolitos secundarios en *Stevia*.

Especie	Lactonas Sesquiterpénicas				Lg	Sq	DT	TT y St	FI	Otros	Colectada en	Parte estudiada
	Ge	Gu	Eu	Otr								
<i>S. achalensis</i>		+	+	+	+	+				+	Argentina	Aérea
<i>S. aff. tomentosum</i>			+								México	Aérea
<i>S. alpina</i>		+		+							Argentina	Aérea
<i>S. amambayensis</i>	+			+		+	+			+		Aérea, Raíz
<i>S. andina</i>						+	+	+			Perú	Aérea
<i>S. aristata</i>	+			+	+	+	+	+		+	Paraguay	Aérea, Raíz
<i>S. berlandieri</i>					+	+	+	+	+	+	México	Aérea
<i>S. boliviensis</i>		+			+	+		+		+	Bolivia	Aérea, Raíz
<i>S. breviaristata</i>	+	+	+	+					+		Argentina	Aérea, Raíz
<i>S. chamaedrys</i>	+	+	+			+					México	Aérea
<i>S. cuzcoensis</i>									+		Perú	Aérea
<i>S. elatior</i>					+						Guatemala	Raíz
<i>S. eupatoria</i>		+			+	+	+				México	Aérea
<i>S. galeopsidifolia</i>									+		Perú	Aérea
<i>S. gilliesii</i>		+									Argentina	Aérea
<i>S. grisebachiana</i>	+	+								+	Argentina	Aérea
<i>S. hyssopifolia</i> var. <i>hyssopifolia</i>						+	+			+	México	Aérea
<i>S. isomeca</i>				+							México	Aérea
<i>S. jaliscoensis</i>					+		+					Aérea, Raíz
<i>S. jujuyensis</i>	+			+			+	+	+		Argentina	Aérea
<i>S. lemmonia</i>	+	+			+	+	+			+	México	Aérea, Raíz
<i>S. lucida</i>					+		+	+	+		Venezuela, México	Aérea, Raíz
<i>S. maimarensis</i>	+	+							+		Argentina	Aérea
<i>S. mandonii</i>					+	+		+			Bolivia	Aérea, Raíz
<i>S. mercedensis</i>	+	+			+	+		+	+	+	Argentina	Aérea, Raíz
<i>S. microchaeta</i>									+		México	Aérea
<i>S. monardaefolia</i>				+			+	+	+		México	Aérea
<i>S. myriadenia</i>		+				+	+	+		+	Brasil	Aérea, Raíz
<i>S. nepetifolia</i>									+		México	Aérea
<i>S. organoides</i>				+	+			+	+		México	Aérea, Raíz
<i>S. ovata</i> (= <i>S. rhombifolia</i>)	+	+		+	+	+	+			+	México, Japón (cult), Guatemala	Aérea, Raíz
<i>S. paniculata</i>							+	+			Japón (cult)	Aérea
<i>S. phlebophylla</i>							+				México	Aérea
<i>S. pilosa</i> *		+									México	Aérea
<i>S. polycephala</i>					+	+	+				México, Guatemala	Aérea, Raíz
<i>S. polyphylla</i>	+	+	+	+		+					Bolivia	Aérea
<i>S. potrerensis</i>	+				+						Argentina	Aérea
<i>S. procumbens</i>	+	+							+		Argentina	Aérea
<i>S. purpurea</i>						+			+	+		Aérea,

<i>S. rebaudiana</i>						+	+	+	+	+	Paraguay, Japón (cult), Filipinas (cult)	Aérea
<i>S. salicifolia</i>						+	+	+		+	México	Aérea, Raíz
<i>S. salicifolia</i> var. <i>salicifolia</i>								+			México	Aérea
<i>S. salicifolia</i> var. <i>typica</i>								+			México	
<i>S. samaipatensis</i>		+					+	+			Bolivia	Aérea
<i>S. sanguinea</i>	+	+								+	Argentina	Aérea
<i>S. sarensis</i>	+	+				+		+		+	Bolivia	Aérea
<i>S. satireifolia</i>		+								+	Argentina	Aérea
<i>S. seleriana</i>								+	+		México	Aérea
<i>S. serrata</i>	+	+				+				+	México, Japón (cult), Guatemala	Aérea, Raíz
<i>S. setifera</i>		+					+	+	+		Bolivia	Aérea
<i>S. soratensis</i>										+	Perú	Aérea
<i>S. subpubescens</i>						+		+		+	México	Aérea, Raíz
<i>S. subpubescens</i> var. <i>intermedia</i>						+			+		México	Raíz
<i>S. triflora</i>						+					Venezuela	Aérea
<i>S. vaga</i>	+	+				+				+	Argentina	Aérea
<i>S. viscida</i>						+					México	Raíz
<i>S. yaconensis</i>	+	+				+	+	+		+	Bolivia	Aérea, Raíz
<i>S. yaconensis</i> var. <i>aristifera</i>		+				+					Argentina	Aérea
<i>S. yaconensis</i> var. <i>subeglandulosa</i>		+									Argentina	Aérea

Ge: germacranólidos; Gu: guayanólidos; Lg: Longipinanos; Sq: sesquiterpenos;

DT: diterpenos; TT: triterpenos; ST: esteroides; Fl: flavonoides.

2.4 *Stevia pilosa* Lag.



Stevia pilosa Lag. se utiliza como planta ornamental en el tradicional día de muertos en el Estado de Hidalgo, tal vez por su llamativa flor morada. De esta planta se encontró sólo un estudio químico sobre la parte aérea, de donde se aisló una sesquiterpenlactona conocida como leukodina.¹⁸

2.5 *Stevia tomentosa* H.B.K



A partir del extracto hexánico de las raíces de *S. tomentosa* H.B.K. se aislaron y caracterizaron los sesquiterpenos 44 a 48, así como los triterpenos: acetato de dammaranilo (49), 3 β -friedelanol (50), β -sitosterol y estigmasterol (51) (Figura 4), los cuales se caracterizaron mediante sus datos

físicos y espectroscópicos y por comparación con datos descritos de sustancias conocidas o compuestos relacionados.¹⁹ Los datos completos de RMN de ¹H y de ¹³C del compuesto 44 no se encontraron descritos.¹⁹

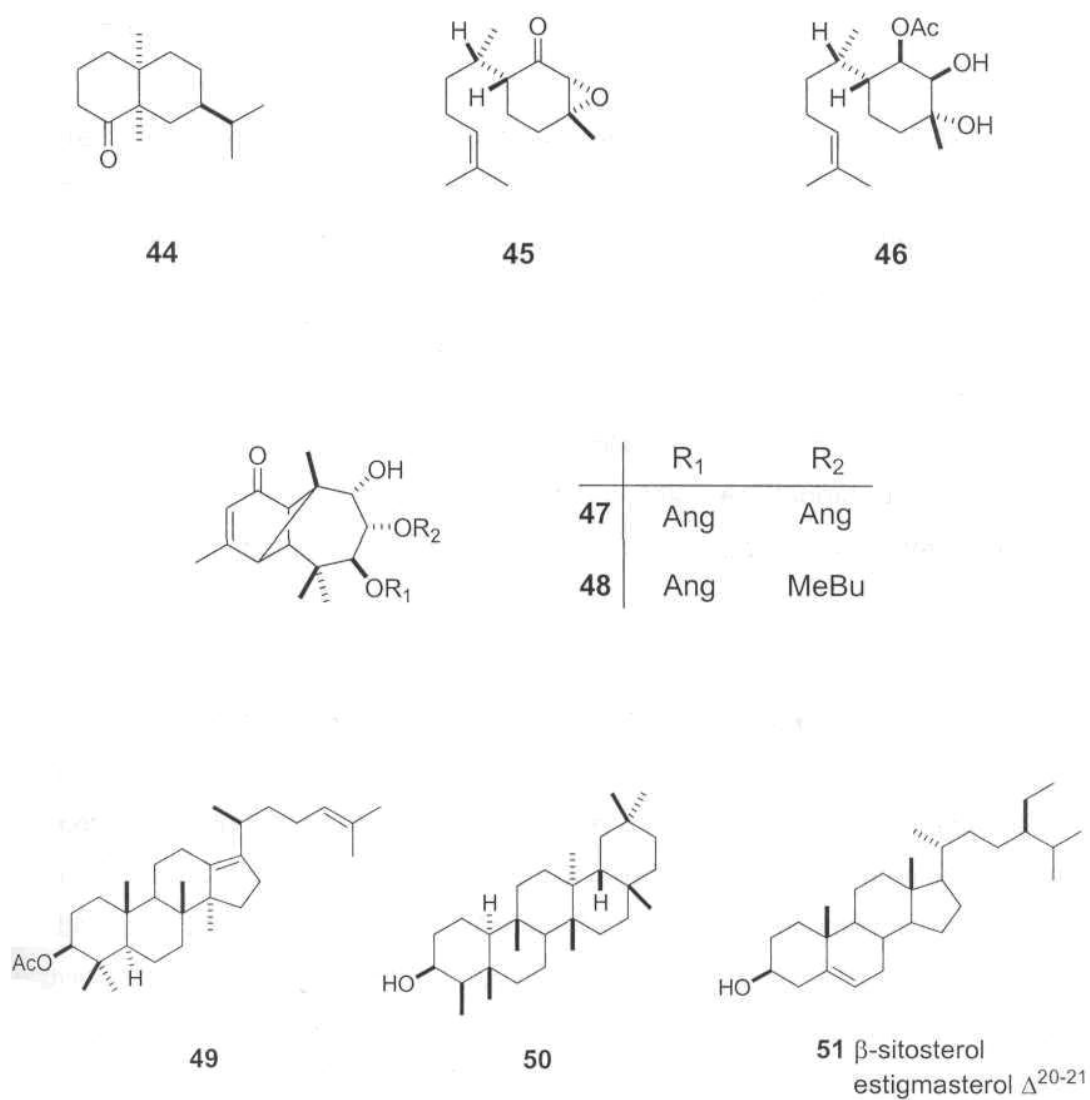


Figura 4. Compuestos aislados a partir del extracto hexánico de las raíces de *S. tomentosa* H.B.K

2.6 Actividad antibacteriana de los extractos de *S. pilosa* y *S. tomentosa*

Se realizaron pruebas de actividad antibacteriana y determinación de la concentración mínima inhibitoria de los extractos de hexano, acetato de etilo y metanol, de la parte aérea (flor, hoja y tallo) y raíces de cada planta, mediante un ensayo de difusión en agar, según la técnica de Kirby Bauer modificada. Las cepas empleadas fueron bacterias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 2592, *Bacillus subtilis* ATCC 6633), y bacterias Gram negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 4028 y *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031)²⁰ y los resultados obtenidos se mencionan a continuación. Se empleó como testigo positivo la estreptomycinina en concentraciones de 0.1 y 1.0 mg/mL.

Extractos de *S. pilosa* Lag. Los diferentes extractos inhibieron a por lo menos una de las 5 bacterias estudiadas, observándose halos de inhibición a una concentración de 500 mg/mL, excepto para el extracto hexánico de las flores, el cual inhibió a *Staphylococcus aureus* encontrándose una concentración mínima inhibitoria (CMI) de 50 mg/mL. Todos los extractos estudiados mostraron actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, mientras que *Bacillus subtilis* sólo fue inhibido por los extractos de flores y hojas. El extracto de acetato de etilo de las flores fue el único capaz de inhibir *Escherichia coli*. Las cepas de *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhimurium* fueron inhibidas por los extractos de flores. También se observó que los extractos de flores fueron los más activos contra las bacterias estudiadas, seguidos por los de hojas y los de raíz. En general, los extractos de *S. pilosa* fueron más activos contra bacterias Gram positivas, que contra bacterias Gram negativas. La determinación de la actividad antibacteriana se consideró positiva al observarse un halo de inhibición.

Extractos de *S. tomentosa* H.B.K. Los extractos evaluados mostraron actividad contra por lo menos una de las 5 bacterias estudiadas. Esta actividad se presentó mediante halos de inhibición a las concentraciones de 500 mg/mL, excepto para los extractos de acetato de etilo obtenidos de las hojas y los extractos hexánicos obtenidos de la raíz a una concentración de 330 mg/mL. Los dos extractos mencionados anteriormente fueron los más activos contra *Staphylococcus aureus* a una concentración de 330 mg/mL, presentando halos de inhibición de 3.75 y 4.00 mm, respectivamente. Todos los extractos estudiados mostraron actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, mientras que *Bacillus subtilis* solo fue inhibido por los extractos metanólicos de las flores y de las hojas, y el extracto de acetato de etilo de las hojas. Las cepas de *Eschehchia coli* y *Klebsiella pneumoniae* no fueron inhibidas por ningún extracto. Los extractos metanólico y de acetato de etilo de las flores y de las hojas, respectivamente, fueron los únicos capaces de inhibir a *Salmonella typhymurium*. Se observó que los extractos de flores y hojas fueron los más activos contra un mayor número de cepas, seguido por los de raíz. Los extractos de esta planta mostraron mayor actividad inhibitoria contra bacterias Gram positivas.

En este trabajo se describe el estudio químico del extracto hexánico de las raíces de *S. pilosa*, la asignación de la configuración absoluta del residuo α -metilbutanoico en los derivados del longipineno encontrados en esta especie, así como el estudio conformacional de los sesquiterpenos: (-)-valeranona, (4R,5S,7R,10R,11R)-7-angeloiloxilongipin-2-en-1-ona, α -isocomeno y γ -cadineno. Además, se asignaron por completo los espectros de RMN de ^1H y de ^{13}C de (-)-valeranona, mediante la combinación de cálculos de teoría de funcionales de la densidad (DFT), simulación espectral y experimentos en dos dimensiones de RMN.

3 OBJETIVOS

1. Llevar a cabo el estudio químico del extracto hexánico de las raíces de *Stevia pilosa* Lag.
2. Establecer una metodología para la determinación de la configuración absoluta de residuos α -metilbutiroilos en productos naturales.
3. Determinar la configuración absoluta del residuo α -metilbutiroilo en los derivados del longipineno 48 y 63.
4. Realizar el análisis conformacional de (-)-valeranona (44), aislada a partir de las raíces de *Stevia tomentosa* H.B.K.
5. Realizar el análisis conformacional del (4R,5S,7R,10R,11R)-7-angeloiloxilongipin-2-en-1-ona (58), aislado de las raíces de *S. pilosa* Lag.
6. Realizar el análisis conformacional del α -isocomeno (52), aislado de las fracciones poco polares de las raíces de *S. pilosa* Lag.
7. Llevar a cabo el análisis conformacional del γ -cadineno (54), el cual se aisló a partir del extracto hexánico de las raíces de *S. pilosa* Lag.

4 JUSTIFICACIÓN

Debido a que en la actualidad existe un gran número de especies vegetales de las cuales se desconoce su composición química, y por lo tanto, la estructura del o los productos naturales que pudiesen presentar alguna actividad farmacológica benéfica o dañina, es necesario llevar a cabo el estudio químico de las especies que se encuentran a nuestro alrededor.

Como en la mayoría de los casos los compuestos aislados de las plantas son quirales, encontrándose sólo uno de los enantiómeros, y algunas de estas sustancias presentan actividad biológica, resulta importante determinar su estereoquímica y configuración absoluta debido a la implicación en el contexto de la actividad farmacológica, ya que si en un futuro se encontrara que dicho compuesto tiene alguna actividad biológica y se llevara a cabo su síntesis, el compuesto sintetizado debe de tener exactamente la misma configuración que la presentada por el producto natural para que éste sea farmacológicamente activo.

Además, debido a que en el organismo humano se tienen receptores determinados con requerimientos tridimensionales específicos, el estudio conformacional de un compuesto es un aspecto muy relevante, ya que la perfecta relación conformación-actividad biológica da como resultado una buena respuesta farmacológica. El estudio del comportamiento conformacional de las moléculas nos proporciona la información necesaria para entender la relación que guarda una molécula con su receptor biológico y poder así proponer la síntesis de análogos conformacionales biológicamente activos, los cuales no siempre están representados por el conformero más estable energéticamente.

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Esta sección de la tesis ha sido dividida en tres partes:

5.1 Aislamiento y caracterización de los metabolitos de *Stevia pilosa* 47,48 y 52-64 (Figura 5).

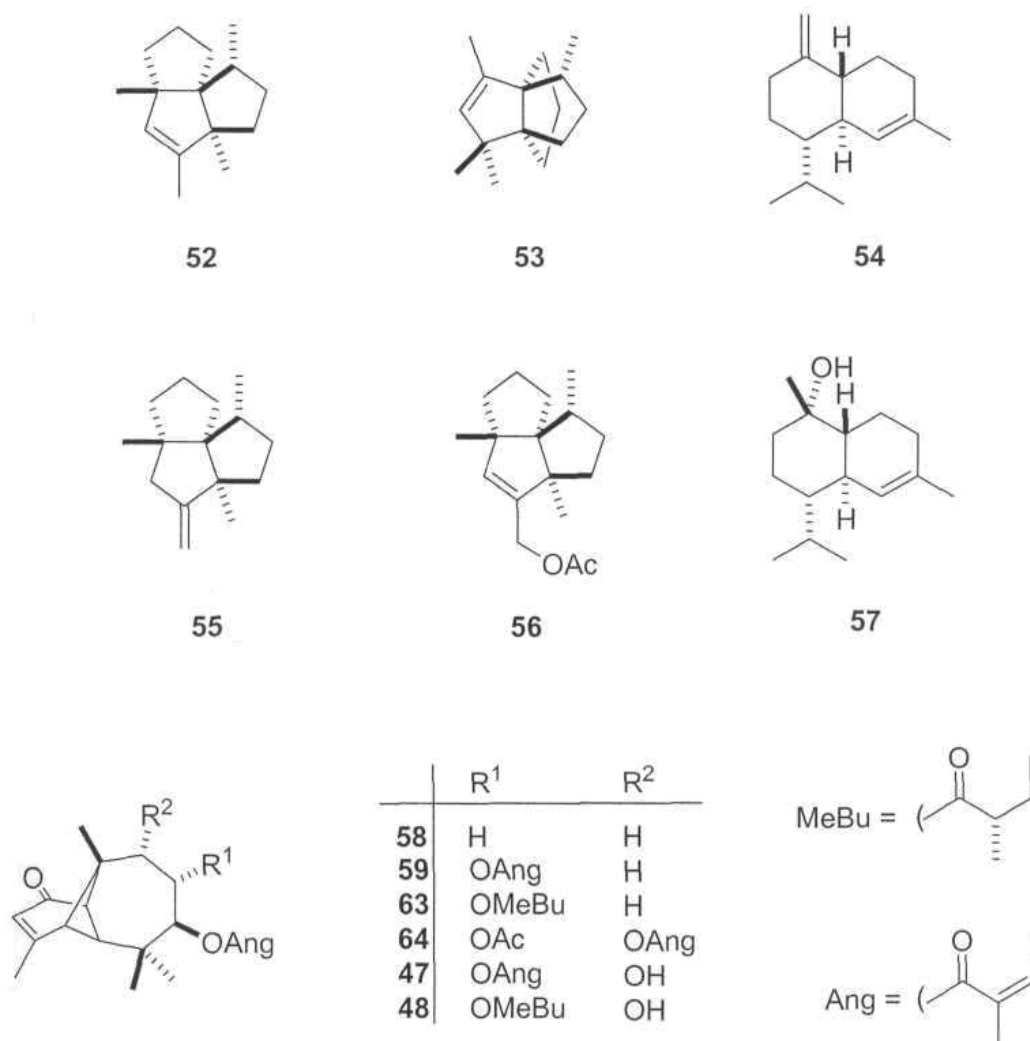
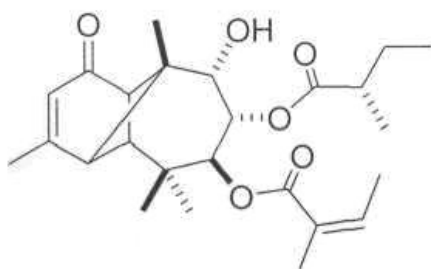
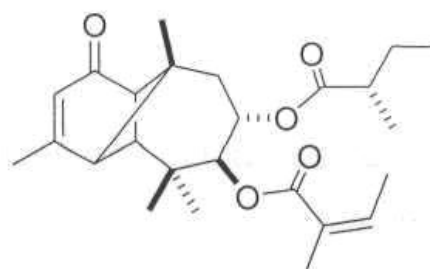


Figura 5. Metabolitos aislados de *Stevia pilosa* Lag.

5.2 Determinación de la configuración absoluta del residuo α -metilbutiroílo en derivados del longipineno

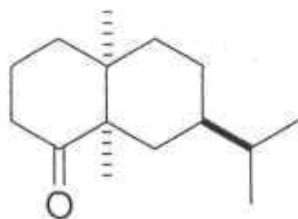


48

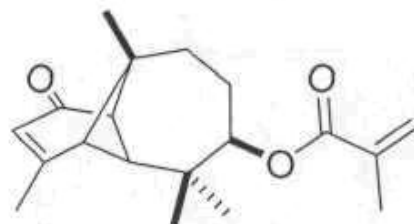


63

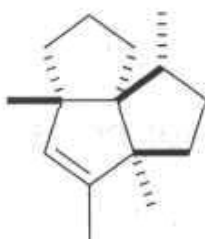
5.3 Análisis conformacional de compuestos selectos aislados de especies del género *Stevia*.



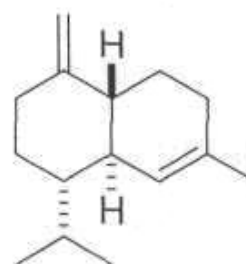
44



58



52



54

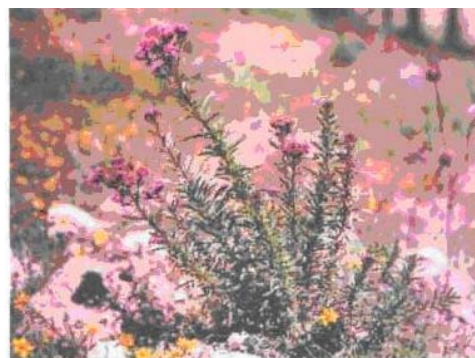
5.1 Aislamiento y caracterización de los metabolitos de *Stevia pilosa* Lag.



Localidad El Guajolote

Las especies estudiadas se colectaron en su periodo de floración, en el mes de octubre del año 2001, en el Municipio de Mineral del Monte y en la localidad conocida como El Guajolote, Epazoyucan, Hgo.

Los especímenes fueron identificados por el Dr. Jerzy Rzedowski y un ejemplar se depositó en el Herbario del Instituto de Ecología A. C, Pátzcuaro, Michoacán, México [(M. Torres Valencia 10 (IEB)].



Stevia pilosa Lag.

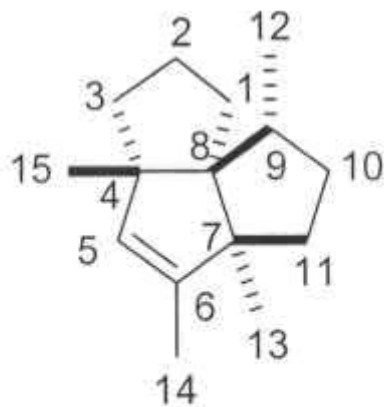
Los especímenes colectados se secaron al aire libre y en la sombra, se dividieron en parte aérea (flor, hoja y tallo) y raíces. Las raíces se sometieron a molienda mecánica y posteriormente a reflujo durante 6 h empleando hexano como disolvente, seguido por acetato de etilo y finalmente metanol, filtrado y concentración en rotavapor. De esta manera se obtuvieron los extractos de hexano, AcOEt y MeOH. Posteriormente, los extractos de hexano y acetato de *etilo* se desgrasaron, para lo cual se agregó metanol, se calentó a 50 °C, se dejó enfriar a temperatura ambiente y después se refrigeraron a 0 °C durante 12 h. Después se filtraron y se concentraron en rotavapor para obtener así los extractos desgrasados.

El extracto hexánico de las raíces de *S. pilosa* Lag. se sometió a cromatografía rápida, colectando eluatos de 20 mL y usando hexano, mezclas de hexano-AcOEt 9:1, hexano-AcOEt 8:2, hexano-AcOEt 1:1 y AcOEt como eluyentes. Los eluatos 9-14 se recromatografiaron empleando gel de sílice impregnada con AgNO_3 (20%), hexano como eluyente y colectando fracciones de 2 mL. En los eluatos 21-37 se obtuvo una mezcla de sesquiterpenos, los cuales se separaron mediante CCF (Cromatografía en Capa Fina) impregnada con AgNO_3 (20%) usando como eluyentes pentano y CH_2Cl_2 .

De la banda de Rf 0.69 se obtuvo un aceite transparente cuyo espectro de RMN de ^1H a 300 MHz (Figura 6) mostró en 4.86 ppm una señal simple ancha del protón vinílico H5 y en 1.56 ppm un señal doble para Me14 ($J = 1.5$ Hz). En 2.0 ppm se observa una señal quintuple de dobles ancha correspondiente a H9 por acoplamiento con los protones metilénicos H10a y H10(3, y el metilo Me12 ($J = 6.9$, 1.8 Hz). La señal de los protones del metilo Me12 se muestran como una señal doble en 0.85 ppm ($J = 1.8$ Hz). Las señales para los protones de los metilos Me13 y Me15 se observan como señales simples casi sobrepuestas en 1.03 y 1.04 ppm, la distinción entre Me13 y Me15 se logró mediante el experimento HMBC. Así, la señal para Me13 mostró correlación con las señales de C11 y C6 y, la señal del Me15 mostró correlación con las señales de C3 y C5 (Figura 11). Esto nos condujo a corregir la asignación descrita²¹ respecto al desplazamiento de las señales correspondientes a los carbonos C1, C2, C10 y los carbonos de los metilos 13 y 15 (Figuras 7-11).

Las señales para los carbonos protonados y de los grupos metilo se asignaron mediante los experimentos HSQC y HMBC, a partir de la asignación de las señales en el espectro de ^1H .

Por comparación del espectro de RMN de ^1H con datos descritos^{22,23} se determinó que se trataba del sesquiterpeno tricíclico α -isocomeno (52), el cual pertenece a la familia de los triquinanos.



52

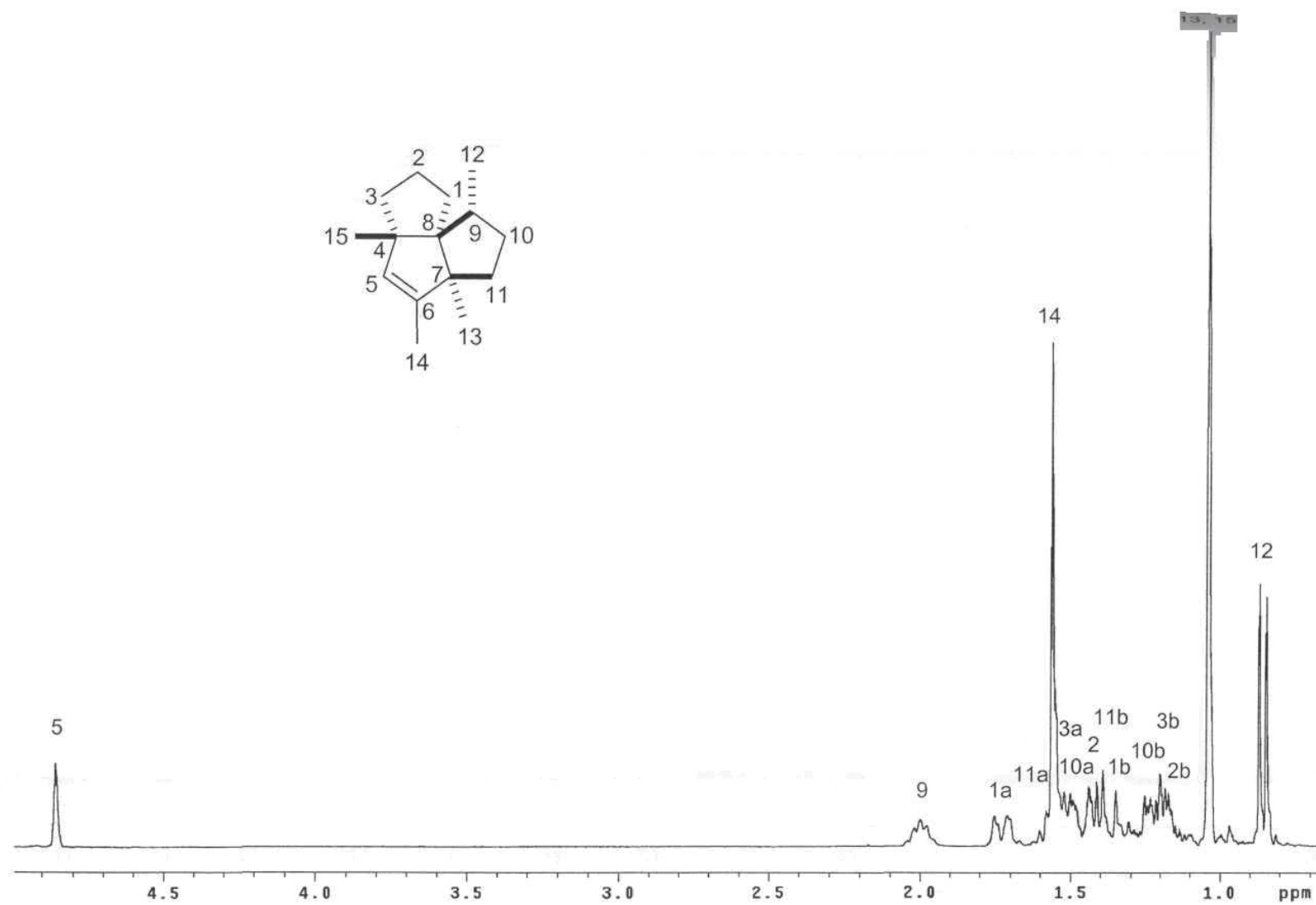


Figura 6. Espectro de RMN de ^1H a 300 MHz del α -isocomeno (52) en CDCl_3 .

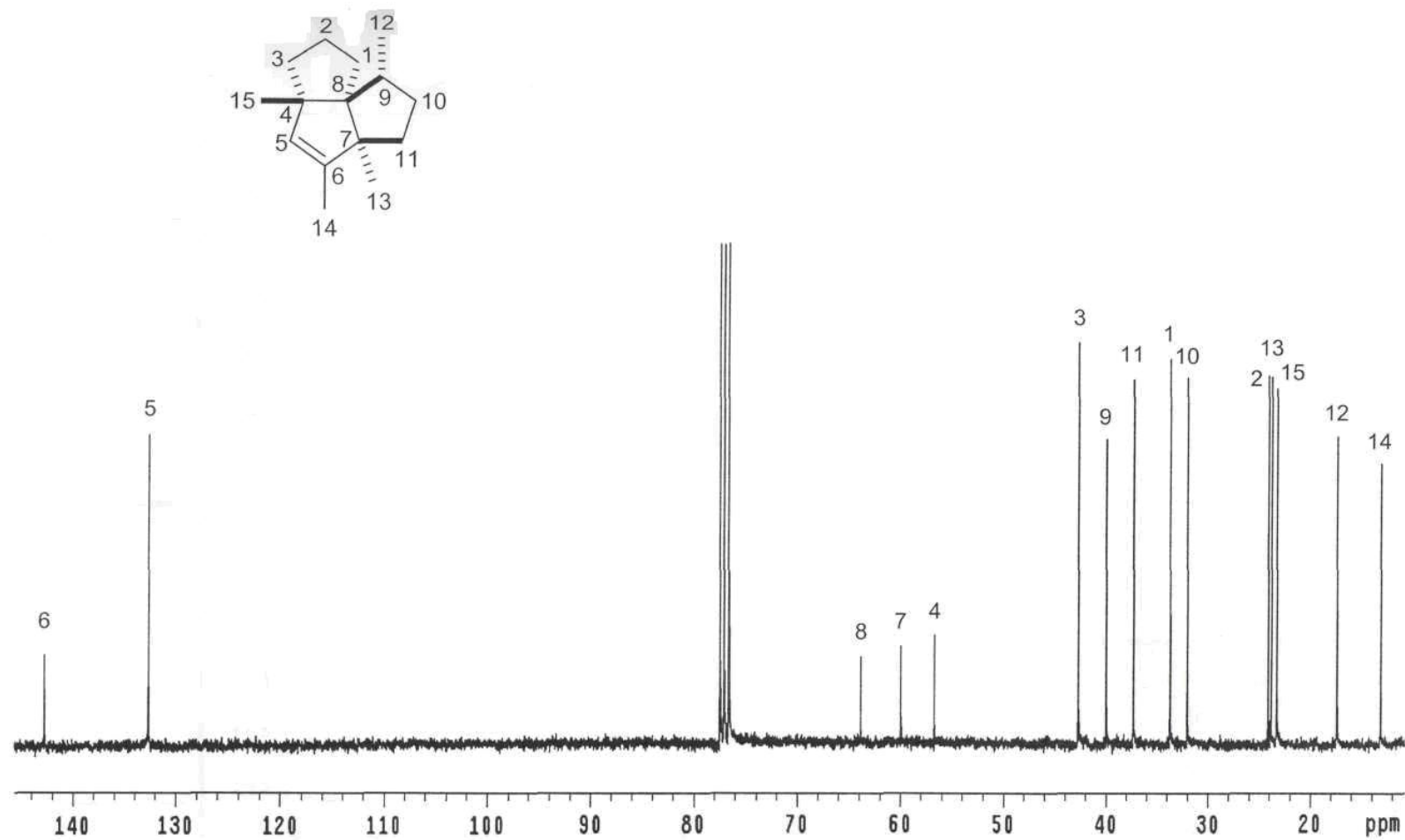
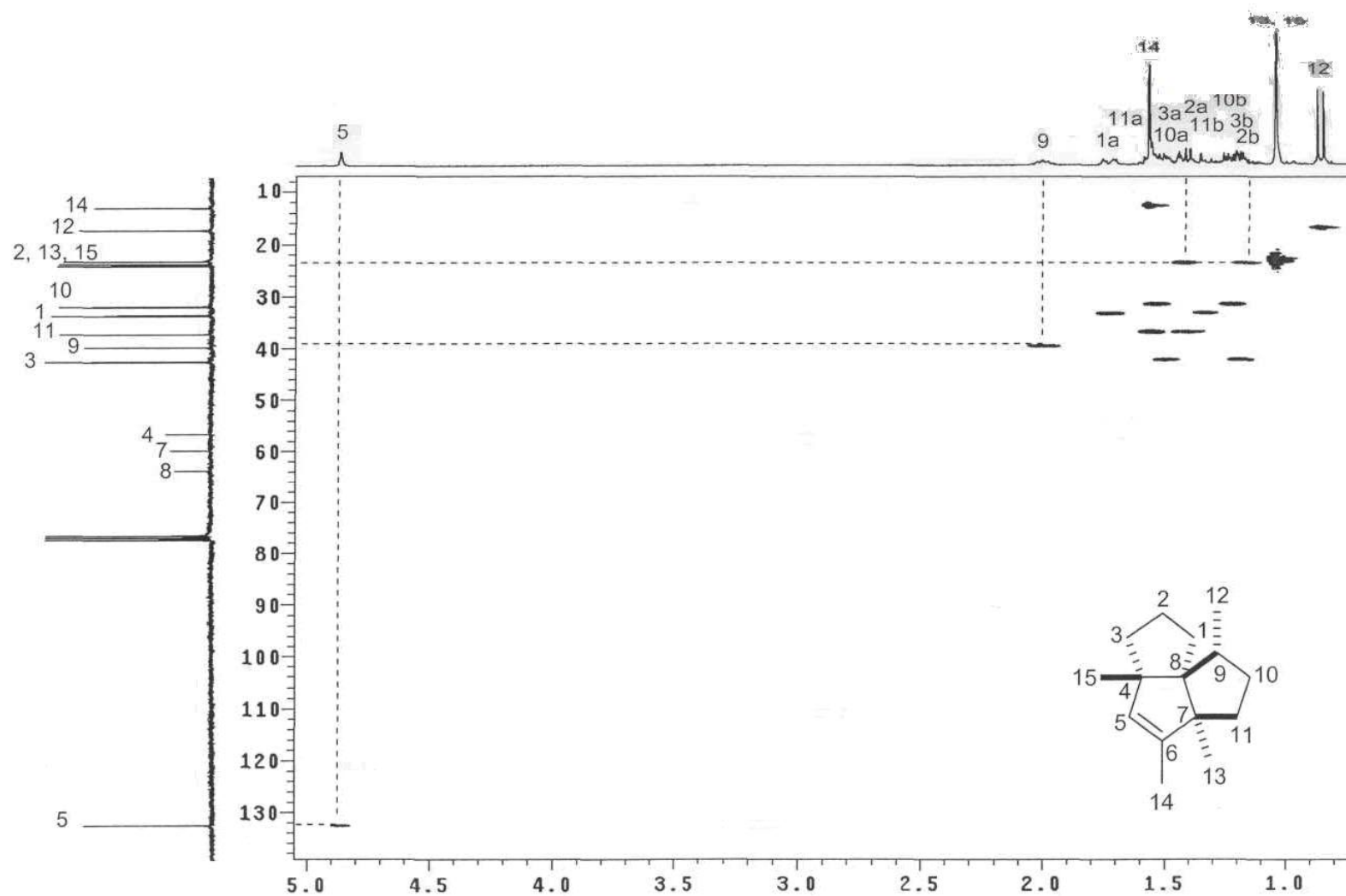
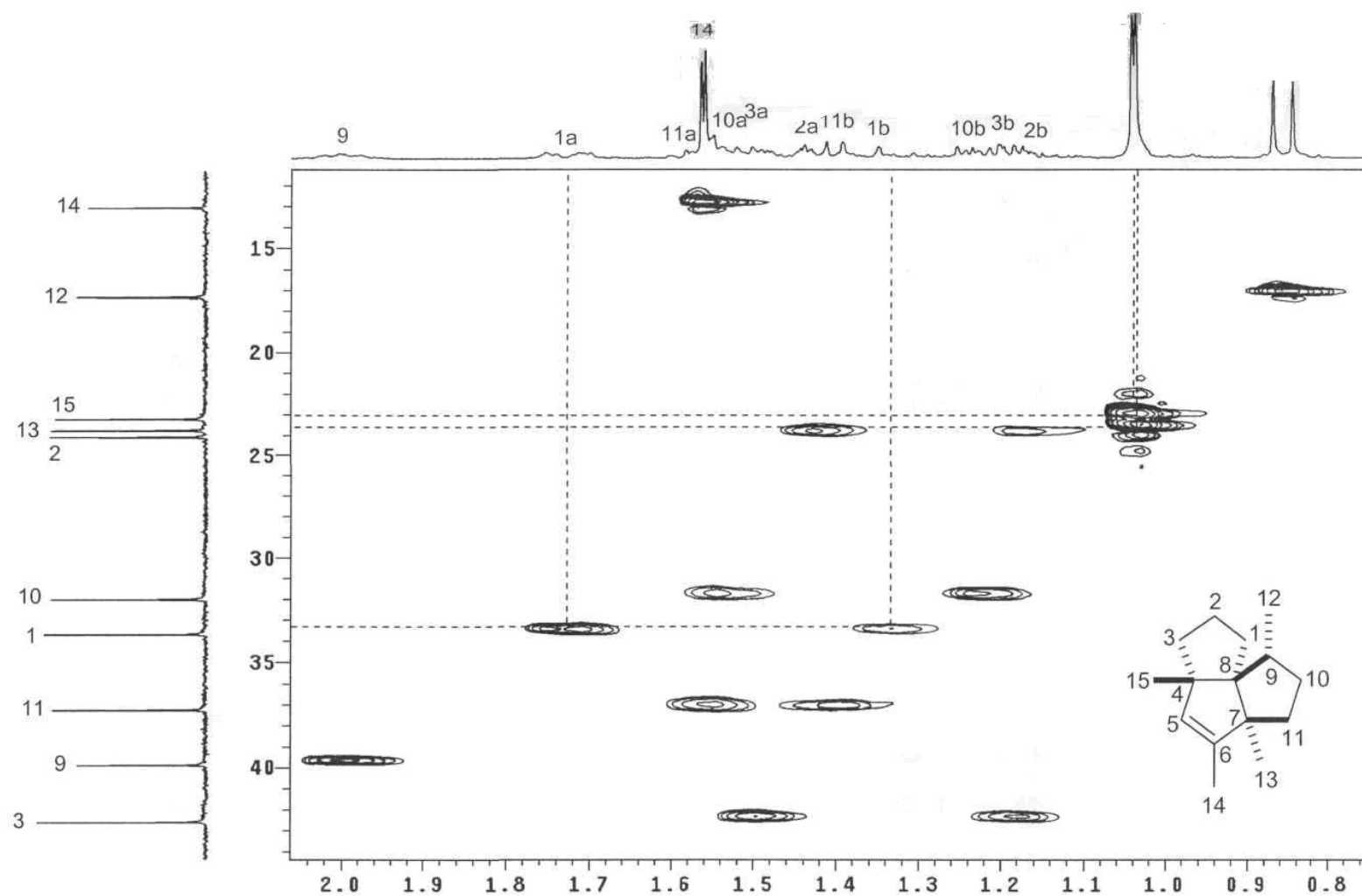
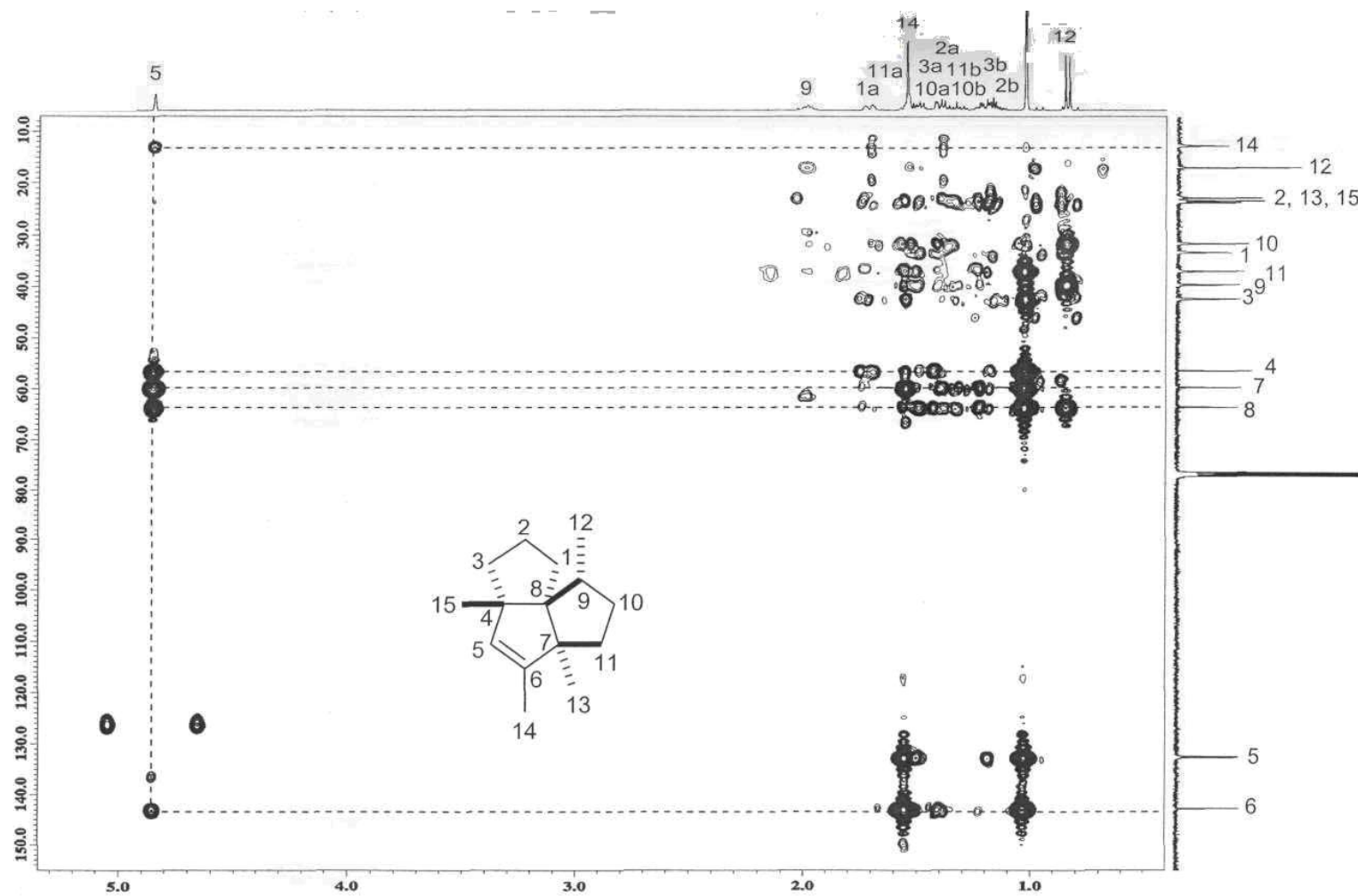


Figura 7. Espectro de RMN de ^{13}C a 75.4 MHz del α -isocomeno (52) en CDCl_3 .

Figura 8. Espectro HSQC (300 MHz) del α -isocomeno (52).

Figura 9. Ampliación del espectro HSQC (300 MHz) del α -isocomeno (52).

Figura 10. Espectro HMBC a 300 MHz del α -isocomeno (52).

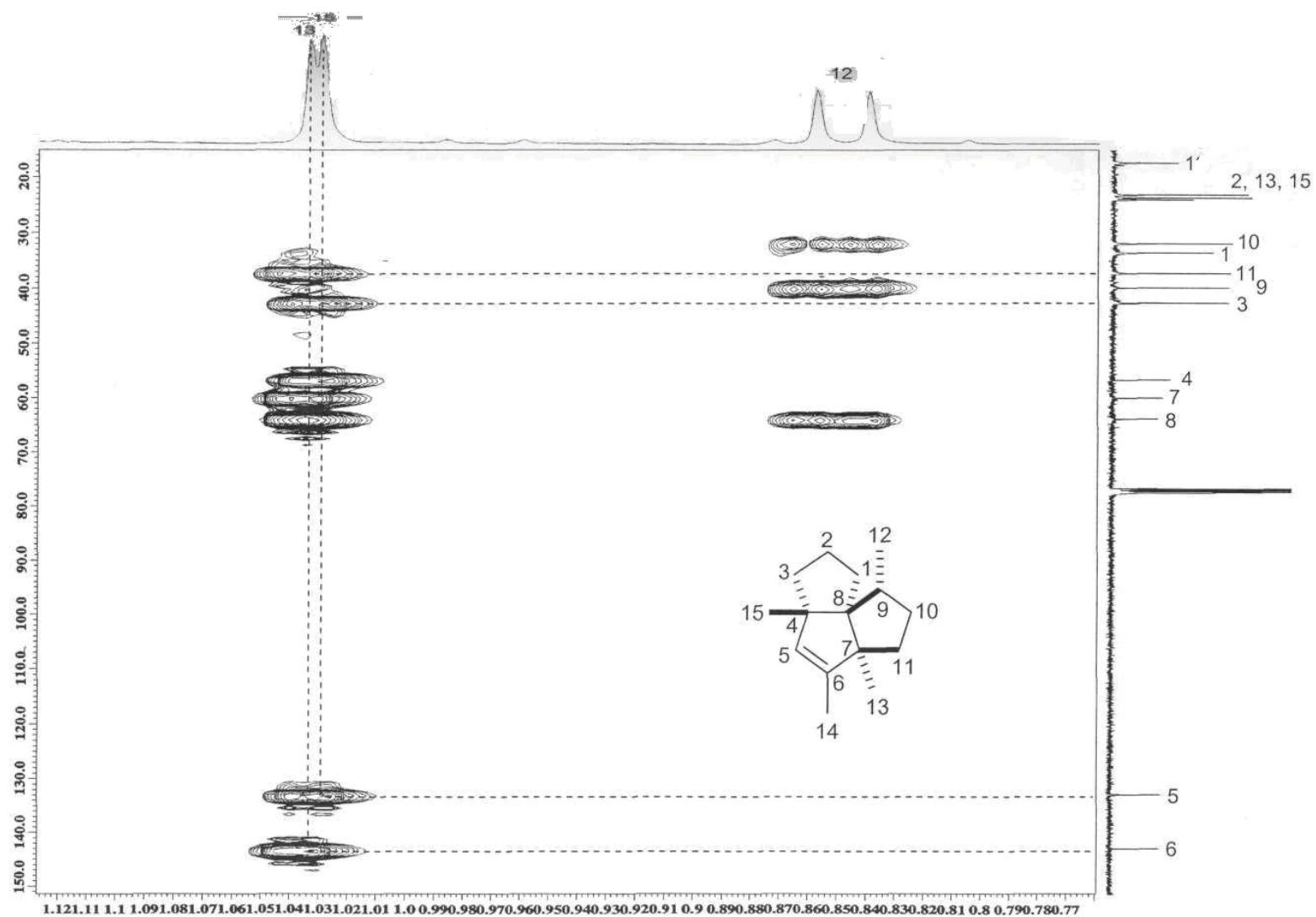
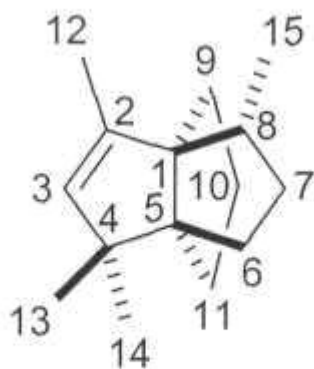


Figura 11. Ampliación del espectro_HMBC a 300 MHz del α -isocomeno (52).

Déla banda de *R_f* de 0.41 se aisló un compuesto como un aceite transparente, en cuyo espectro de RMN de ¹H a 400 MHz (Figura 12) mostró una señal simple ancha en 4.83 ppm característica de un protón vinílico, en 1.61 ppm se observó una señal simple de un metilo vinílico, en 0.97 ppm una señal simple que integró para 9 protones y que correspondió a tres metilos. Los desplazamientos y multiplicidad de las señales se compararon con datos reportados²⁴⁻²⁵ y se concluyó que se trataba del sesquiterpeno conocido como modefeno (53).

**53**

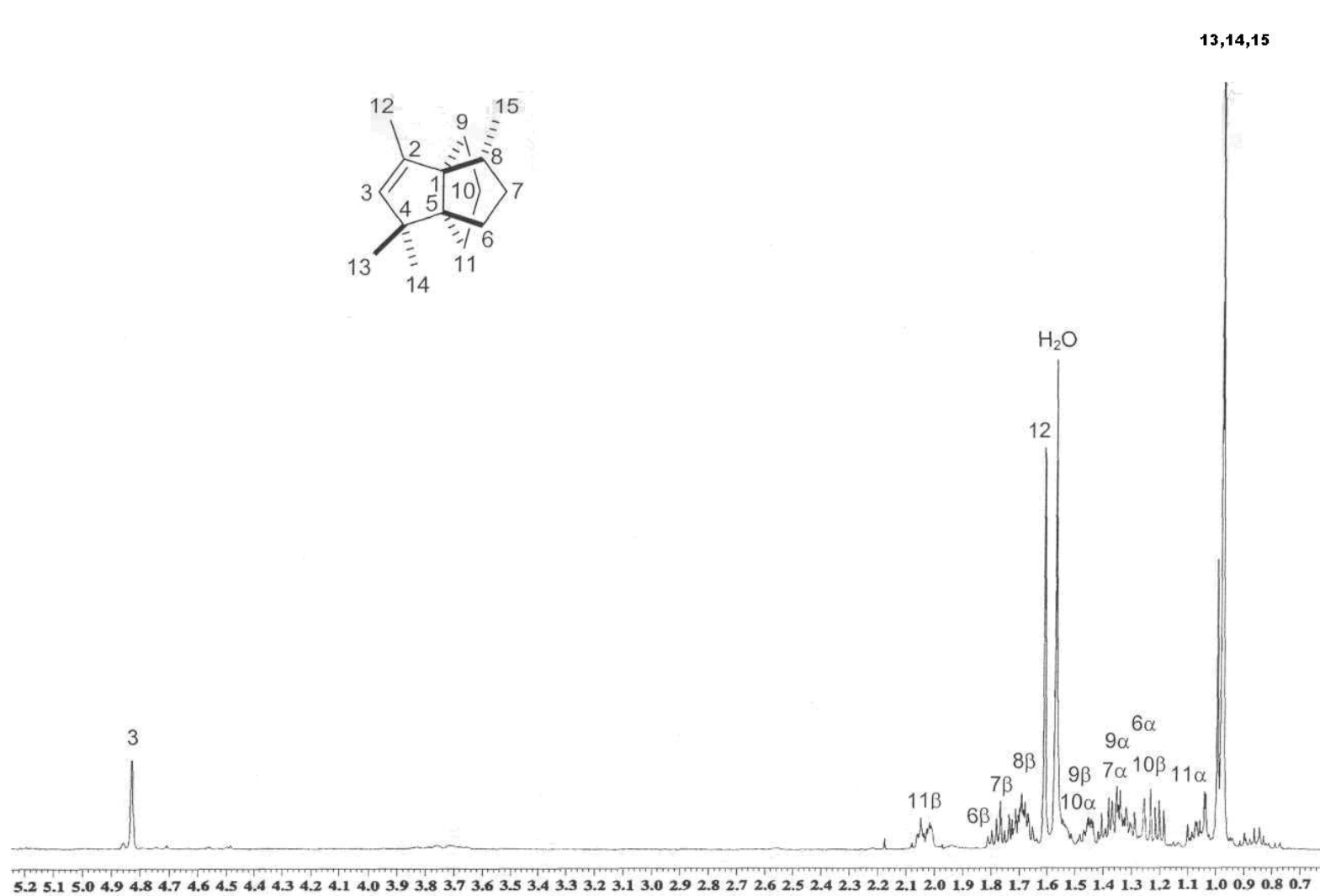
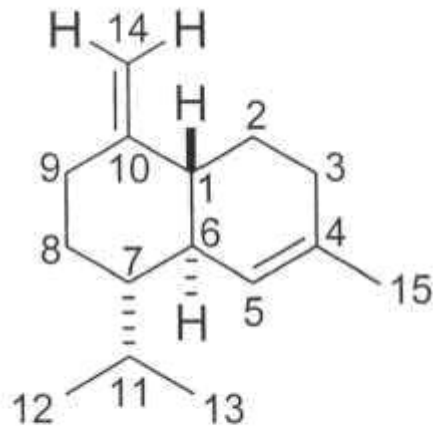


Figura 12. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del modafeno (**53**) en CDCl_3 .

De los eluatos 17-22 se aisló el γ -cadineno (54) como un aceite transparente. El espectro de RMN de ^1H (Figura 13) mostró en 5.56 ppm la señal ancha del protón vinílico H5 y en 1.69 ppm una señal simple ancha para Me15. En 4.66 y 4.55 ppm se observaron señales simples que corresponden a los protones H14 y H14' del metileno exocíclico, pero al obtener una ampliación del espectro de RMN de ^1H se apreció que en realidad son señales cuádruples anchas ($J = 0.6$ Hz), es decir cada uno de los protones exocíclicos se acopla con los protones H1, H9(3 y el respectivo protón geminal, cuyo valor de la constante de acoplamiento es similar y teóricamente el mismo. Los protones con los cuales mostraban un acoplamiento H14 y H14' se determinó después de analizar los ángulos diedros teóricos del confórmero de mínima energía obtenido mediante cálculos de funcionales de la densidad ($\Phi_{\text{H14-H1}} = 116.7^\circ$, $\Phi_{\text{H14-H1}} = 124.2^\circ$, $\Phi_{\text{H14-H9b}} = -116.2^\circ$). La señal del protón H9 en 2.39 ppm, se observa como una señal doble de triples ($J = 12.8, 3.7$ Hz) por acoplamiento con los protones metilénicos H8a y H8p, la asignación de esta señal se llevó a cabo principalmente mediante los experimentos HMQC y HMBC. La señal séptuple de dobles en 2.20 ppm corresponde al protón H11 por acoplamiento con el protón metínico H7 y los metilos Me12 y Me13 ($J = 6.9, 3.3$ Hz). En 1.49 ppm se muestra la señal correspondiente al protón H2 α , la cual aparece como una señal doble de doble de doble de dobles (*dddd*) debida a la correlación con H1, H2 β , H3 α y H3 β ($J_{2\alpha,2\beta} = J_{2\alpha,i} = J_{2\alpha,3\beta} = 11.7$; $J_{2\alpha,3\alpha} = 6.2$ Hz). La asignación de la señal doble de doble de doble de dobles (*dddd*) para el protón H8 α en 1.12 ppm se realizó en base a los valores de las constantes de acoplamiento observadas ($J_{8\alpha,8\beta} = J_{8\alpha,7} = J_{8\alpha,9\beta} = 12.8$; $J_{8\alpha,9\alpha} = 4.0$ Hz) por acoplamiento con H7, H8 α , H8 β (3, H9 α y H9 β). Finalmente, en 0.92 y 0.73 ppm se observan dos señales dobles correspondientes a Me12 y Me13 respectivamente, por acoplarse con H11 ($J = 6.9$ Hz).

El compuesto 54 se caracterizó mediante la comparación de sus datos de RMN en una y dos dimensiones (Figuras 13-16) con los descritos.²⁶ El valor de su rotación óptica $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +122.3$ ($c = 0.11$, CHCl_3) también fue de gran utilidad ya que existen

varios isómeros de acuerdo a la posición que tienen los dobles enlaces en la molécula, pero el valor y el signo de la rotación óptica son característicos para cada uno.²⁷



54

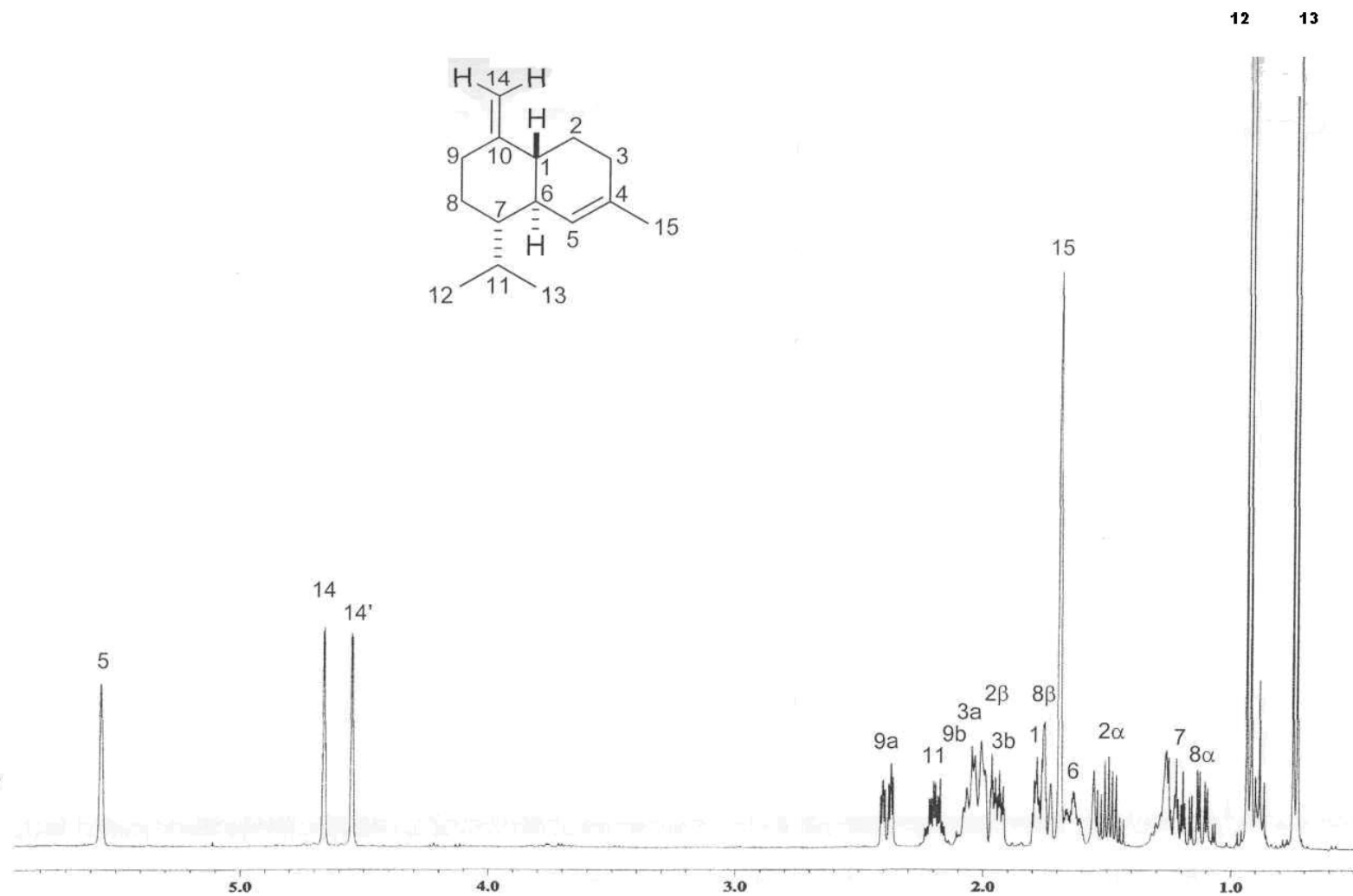


Figura 13. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del γ -cadineno (54) en CDCl_3 .

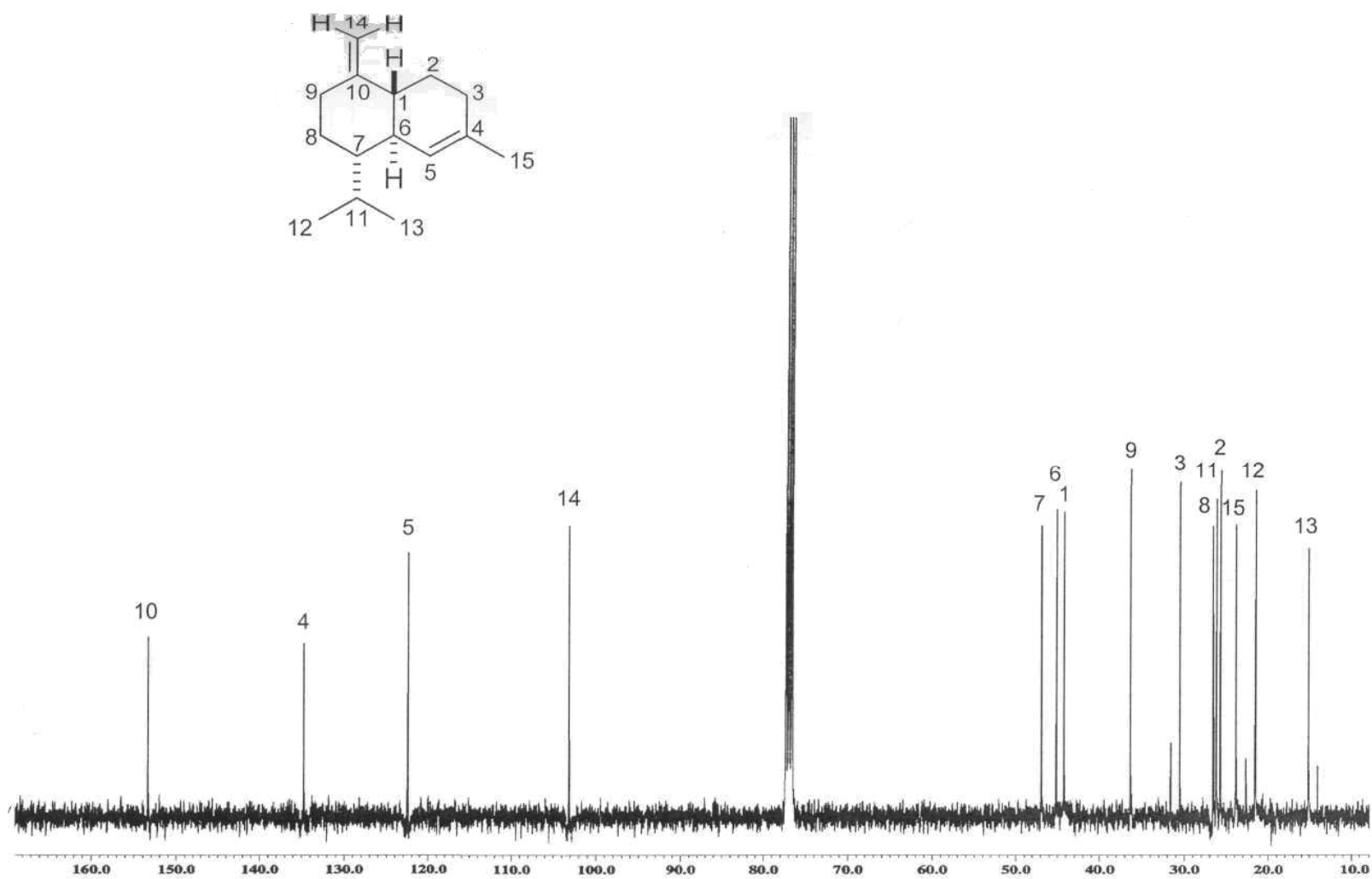
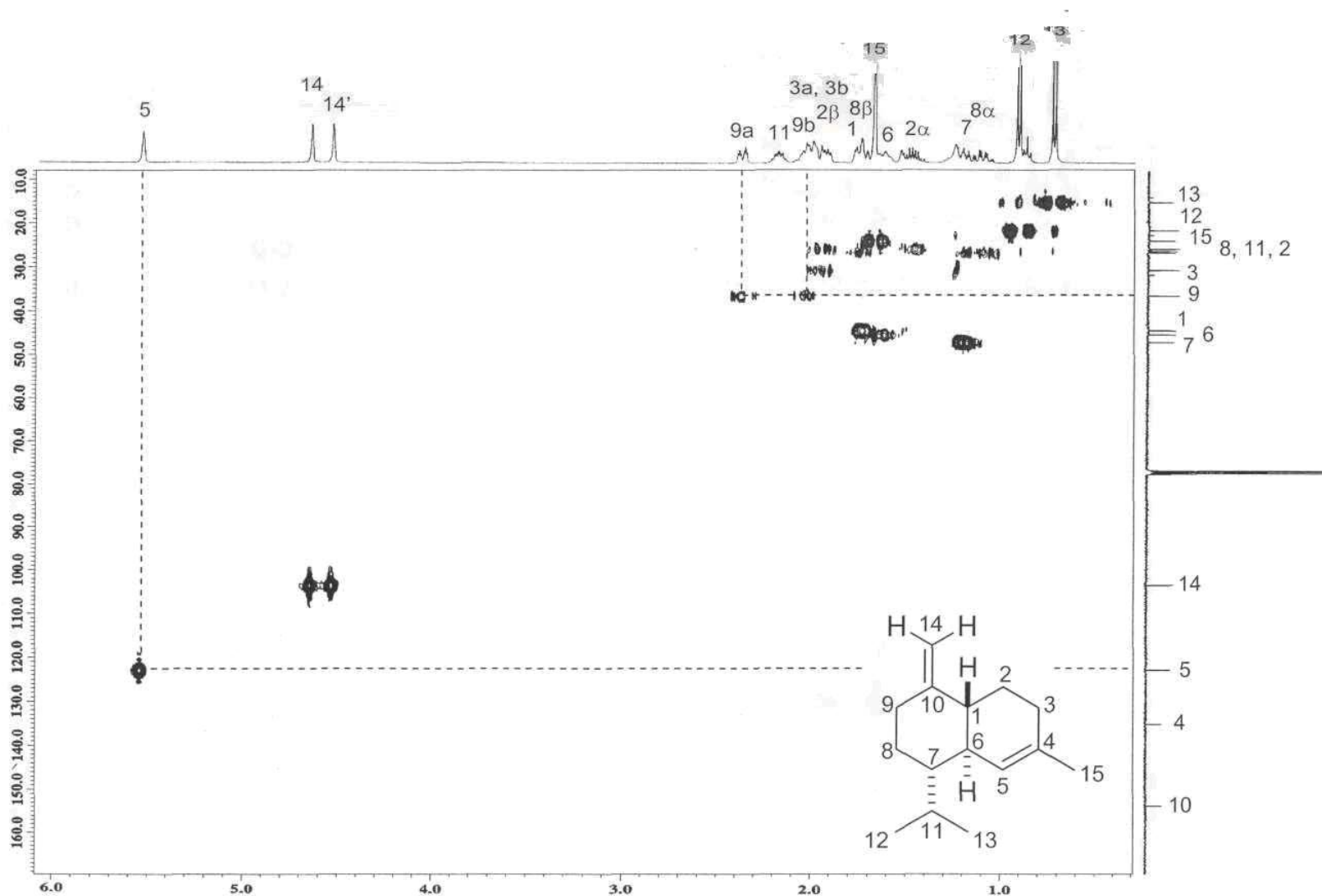
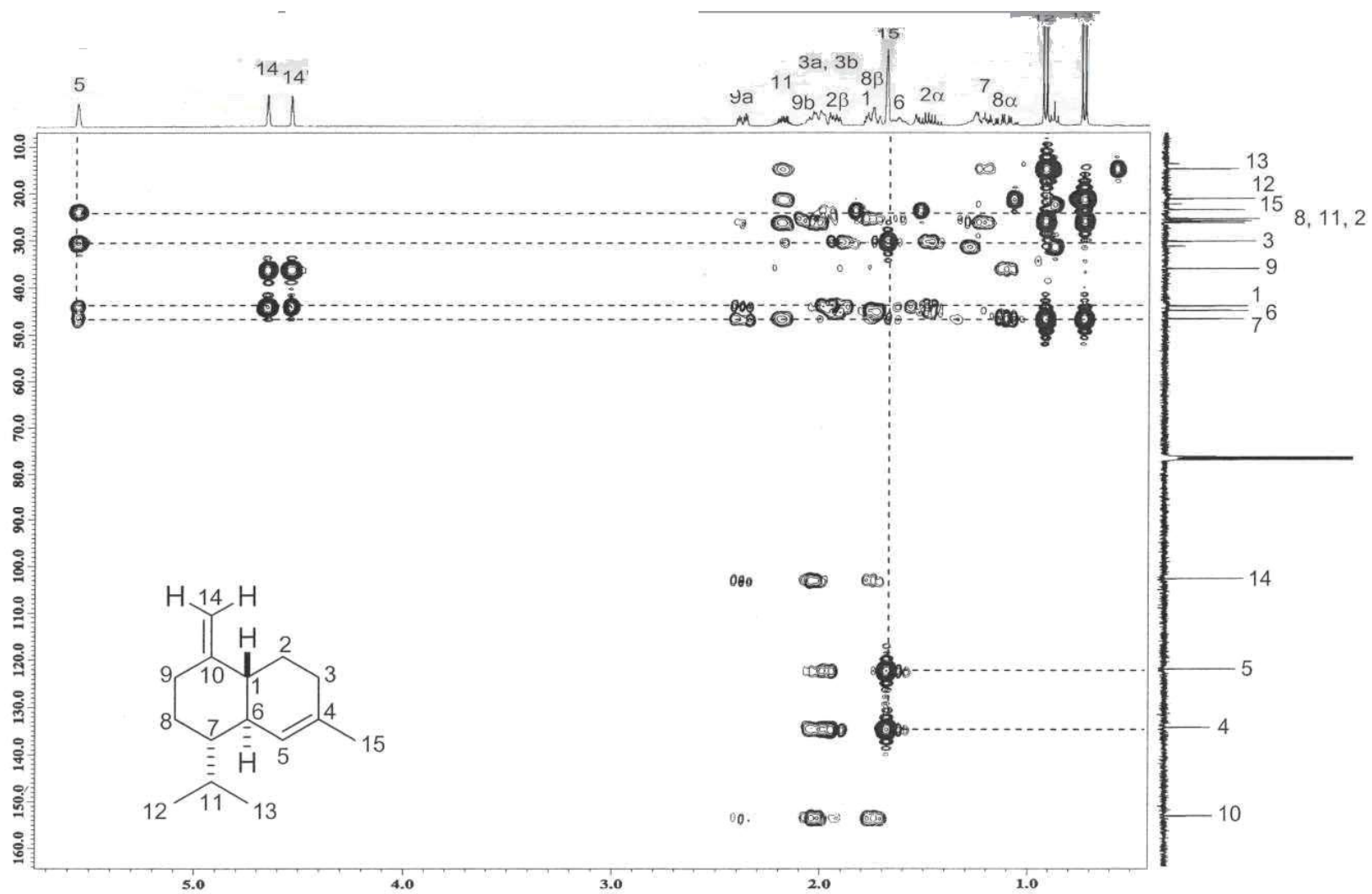
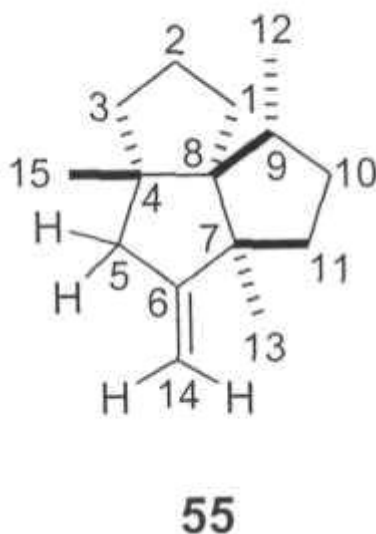


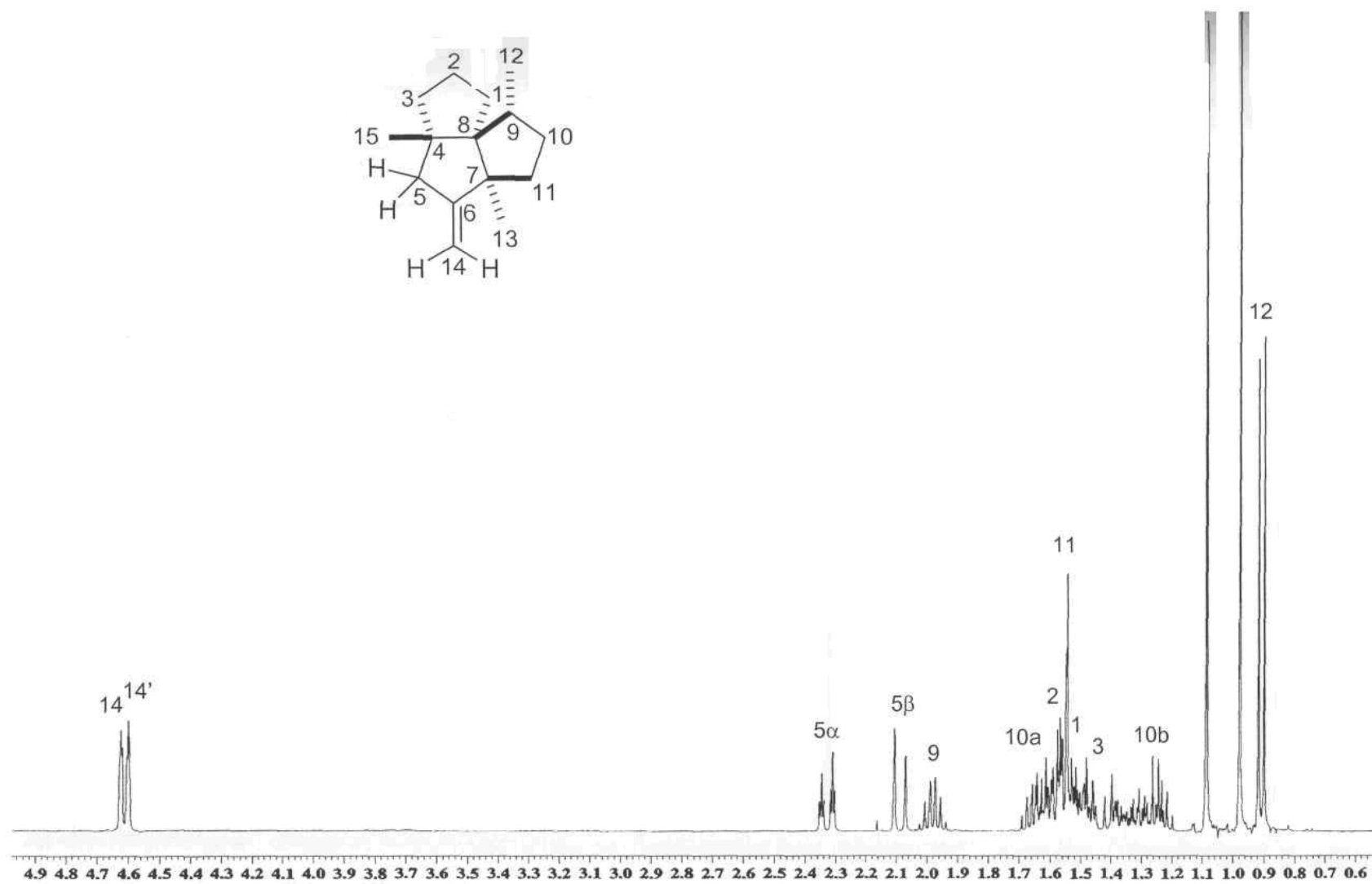
Figura 14. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del γ -cadineno (54) en CDCl_3 .

Figura 15. Espectro HMQC (400 MHz) del γ -cadineno (54).

Figura 16. Espectro HMBC (400 MHz) del γ -cadineno (54).

De las fracciones 42-46 se obtuvo un aceite transparente en cuyo espectro de RMN de ^1H (Figura 17) se observaron dos señales múltiples anchas en 4.63 y 4.60 ppm respectivamente, las cuales integraron para un protón cada una, ambas señales corresponden a los protones del metileno exocíclico H14. La señal doble de triples en 2.34 ppm se asignó al protón 5a por mostrar acoplamiento con el protón 5 β y H14 ($J = 14.6, 2.6$ Hz), mientras que la señal en 2.09 ppm corresponde al protón H5p el cual sólo se encuentra acoplado al protón geminal H5a ($J = 14.6$ Hz), la diferenciación de las señales correspondientes a H5 α y H5 β se llevó a cabo mediante el análisis de los ángulos dihedros teóricos, a partir del conformero de mínima energía encontrado por teoría de funcionales de la densidad. La señal séxtuple que se aprecia en 1.99 ppm corresponde al protón H9 el cual se acopla a los protones del metileno 10 α y 10 β , así como a los protones del metilo Me12 ($J = 6.9$ Hz). En 1.09 y 0.98 ppm se observaron las señales simples de los metilos Me13 y Me15, respectivamente. Finalmente, en 0.91 ppm se apreció una señal doble ($J = 6.9$ Hz) que correspondió al metilo Me12. La asignación de las señales del espectro de RMN de ^{13}C se hizo en base a las correlaciones observadas en los experimentos bidimensionales y al espectro de ^{13}C asignado del compuesto 52 (Figura 7) ya que no se observaron cambios significativos en el sistema del triquinano. Al comparar todas las señales, tanto del espectro de ^1H como de ^{13}C (Figuras 17-20) con los datos reportados,^{28,29} concluimos que se trataba del β -isocomeno (55).



Figura 17. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del β -isocomeno (55) en CDCl_3 .

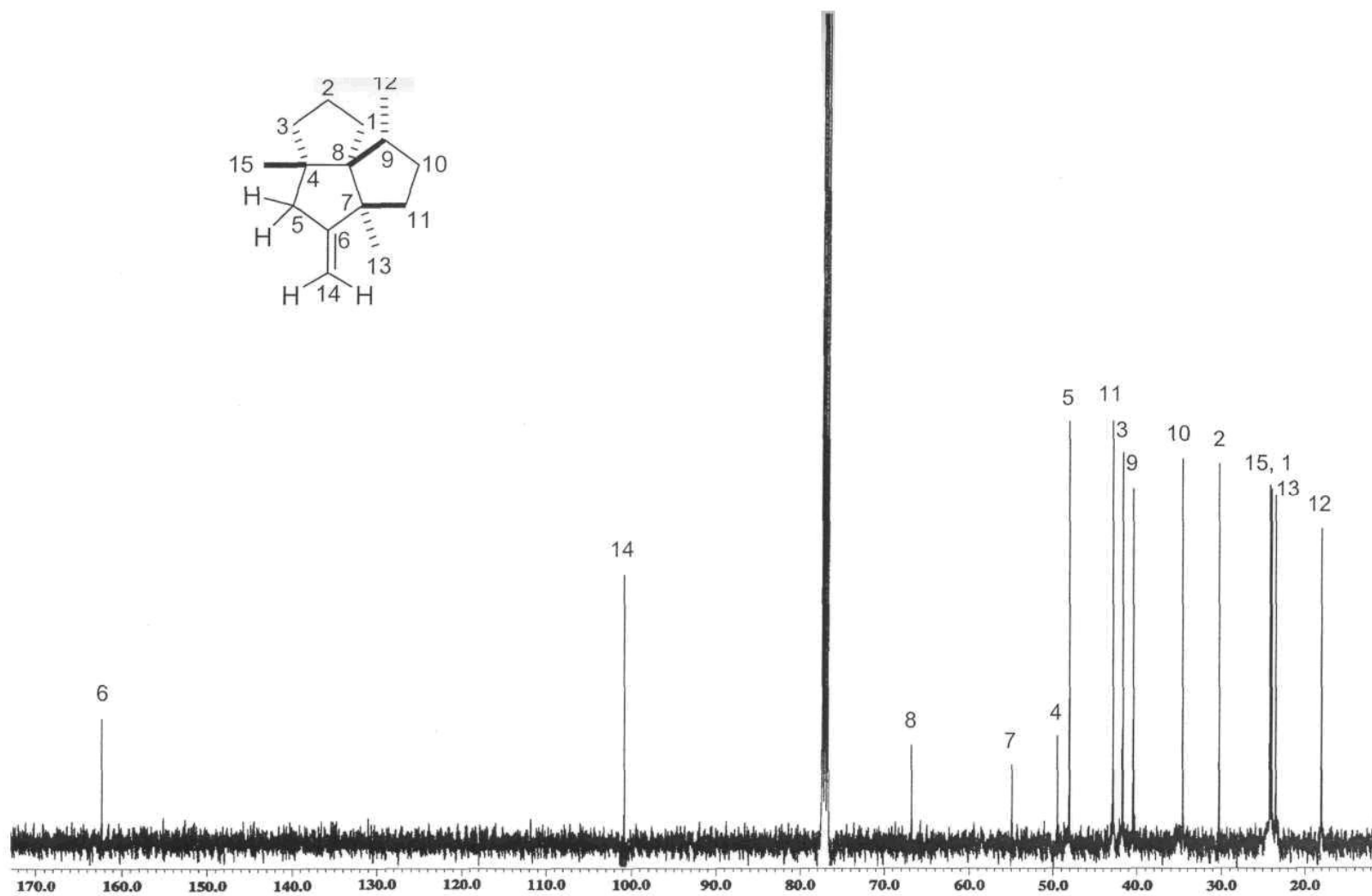
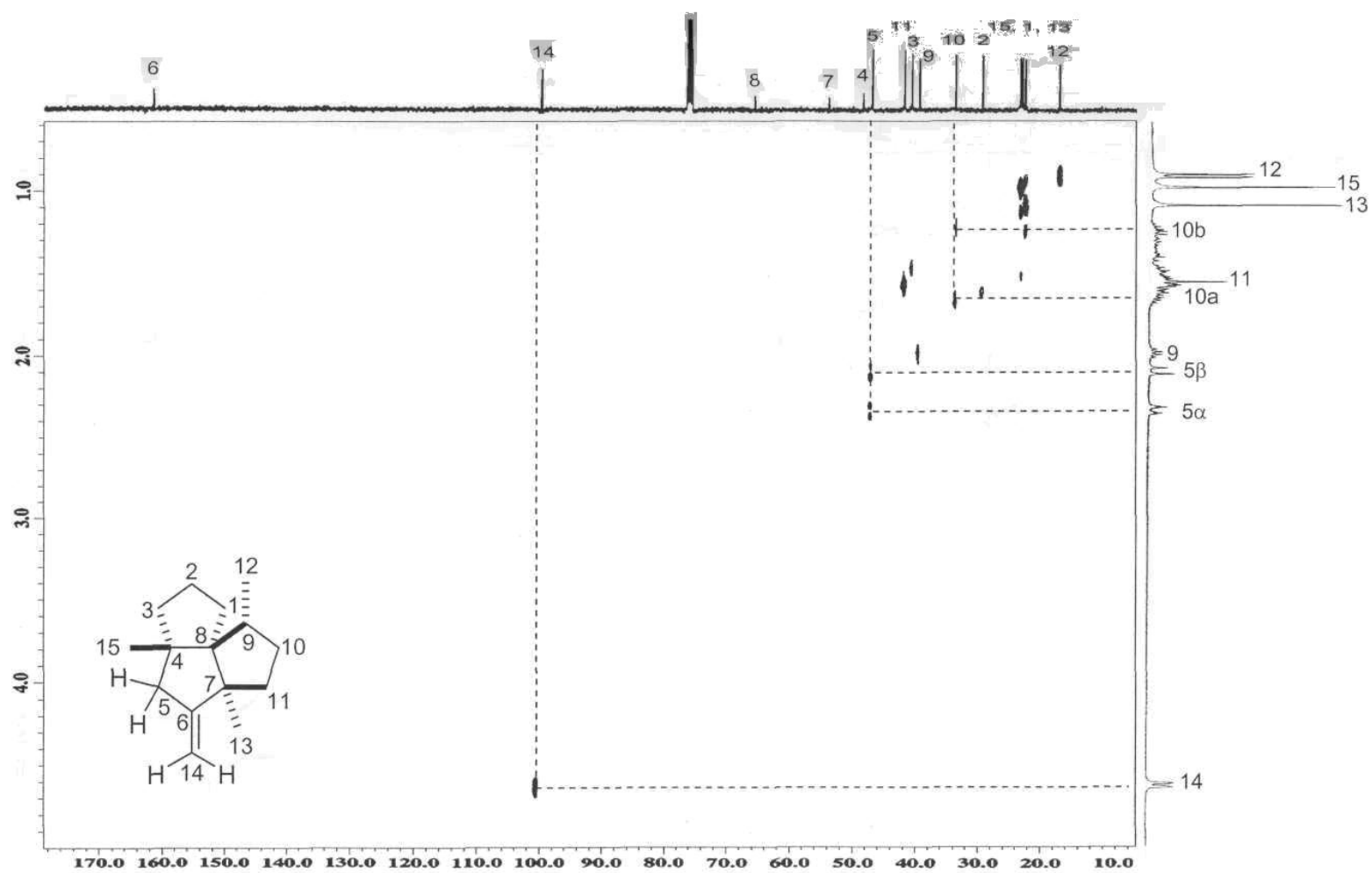
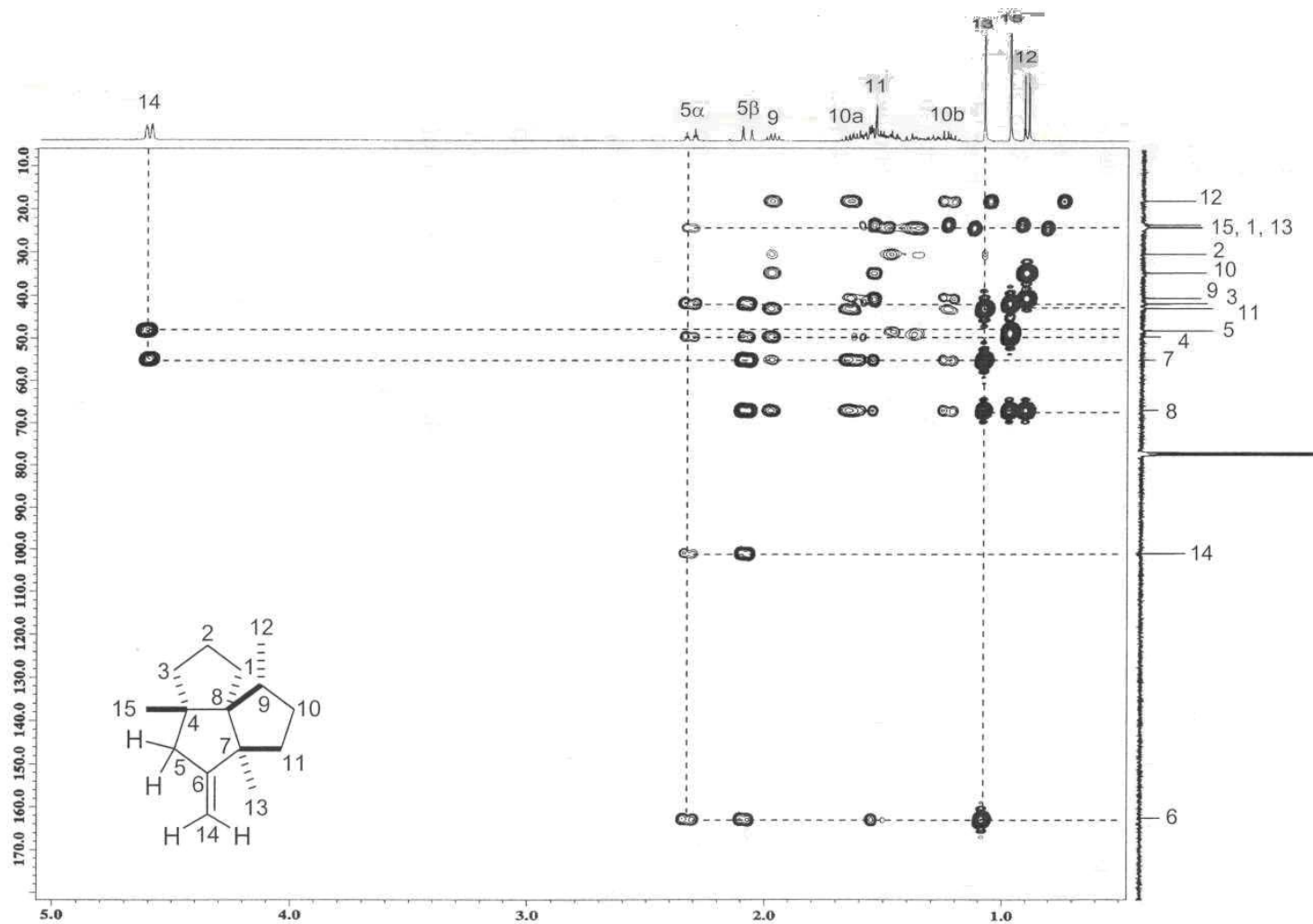


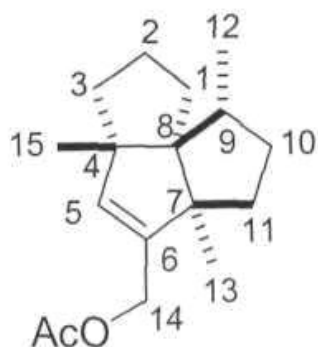
Figura 18. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del β -isocomeno (55) en CDCl_3 .

Figura 19. Espectro HETCOR (400 MHz) del β -isocomeno (55).

Figura 20. Espectro de HMBC (400 MHz) del β -isocomeno (55).

Las fracciones 57-65 se sometieron a una recromatografía en columna empleando gel de sílice impregnada con AgNO_3 (20%), hexano como eluente y colectando eluatos de 5 mL. Como resultado de esta cromatografía, en las fracciones 23-37 se obtuvo un compuesto cuyo espectro de RMN de ^1H (Figura 21) es similar al obtenido para el α -isocomeno (52) (Figura 6). A diferencia de 52 la señal correspondiente a los protones del metilo Me14 en 1.56 ppm se desplazó a frecuencias altas, encontrándose ahora en 4.56 ppm, desplazamiento que nos indicó que el metilo se había convertido en un metileno base de un éster, y además, en 2.10 ppm se apreció una señal simple que integró para tres protones, característica de un grupo metilo de acetato. Por lo tanto, se concluyó que se trataba de un derivado acetilado del isocomeno. Esto se comprobó mediante el experimento HMBC (Figura 24), al observarse la correlación a tres enlaces de los protones H14 con el carbonilo del grupo acetilo.

El análisis espectroscópico del compuesto aislado permitió determinar la estructura del 14-acetoxiisocomeno (56), el cual de acuerdo a la comparación de los espectros de RMN (Figuras 21-24) con datos reportados para otros derivados acetilados del isocomeno²⁹⁻³² resultó ser un compuesto nuevo. La configuración absoluta del compuesto 56 se propone como 4S,7S,8R,9R debido a que si se considera que la ruta biogénica para su formación es la misma que para el α -isocomeno, cuya configuración absoluta se estableció mediante síntesis,³³ es posible suponer que el compuesto 56 tendrá la misma configuración absoluta.



56

Cabe resaltar que es la primera vez que se aislan los compuestos 52, 53 y 55 de plantas de este género. Además, se tiene conocimiento de isocomenos en los cuales un grupo acetato se encuentra en las posiciones 1 y 13, pero hasta ahora no se había descrito el aislamiento del 14-acetoxiisocomeno (56)

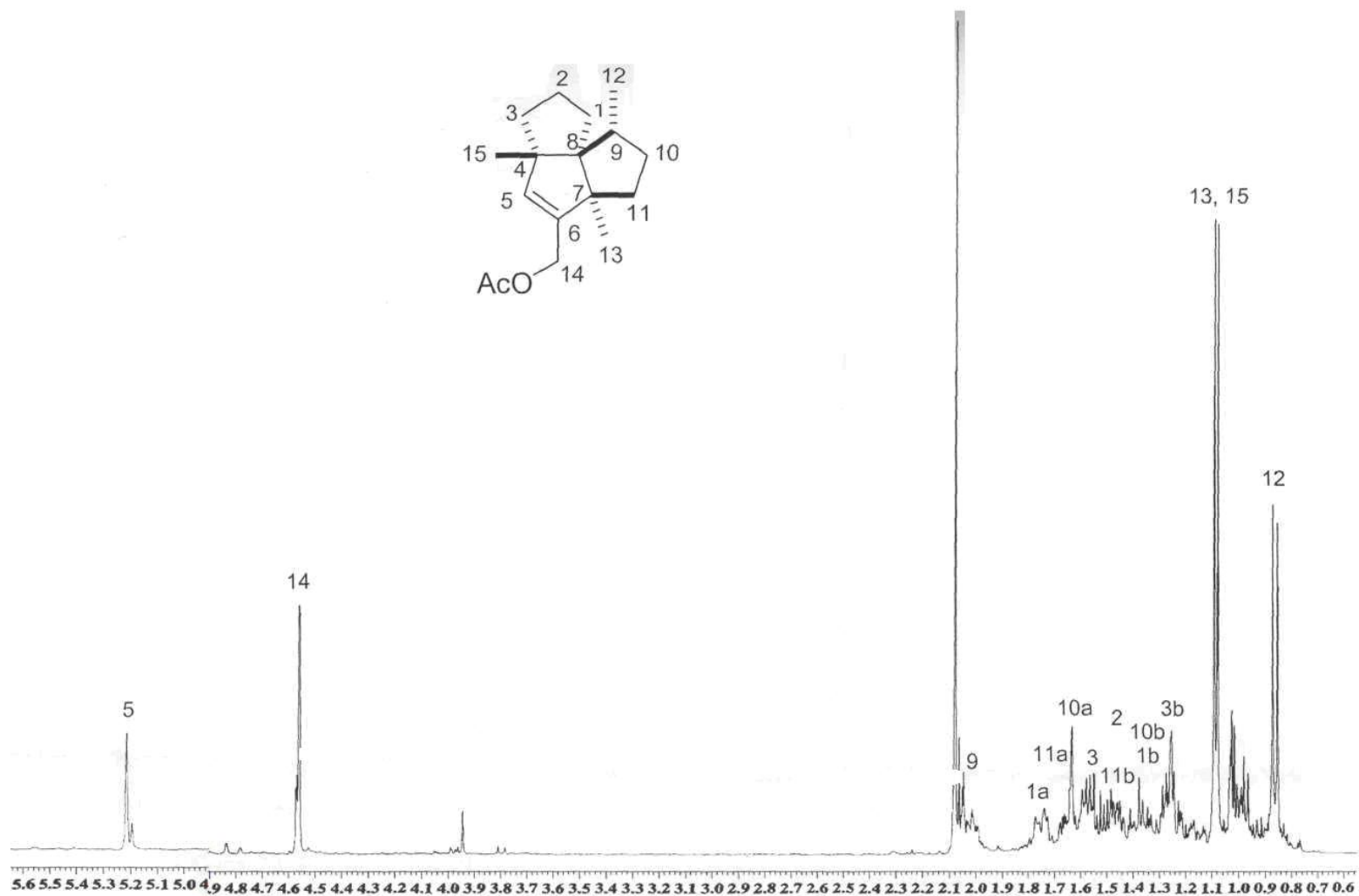


Figura 21. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del 14-acetoxiisocomeno (56) en CDCl_3 .

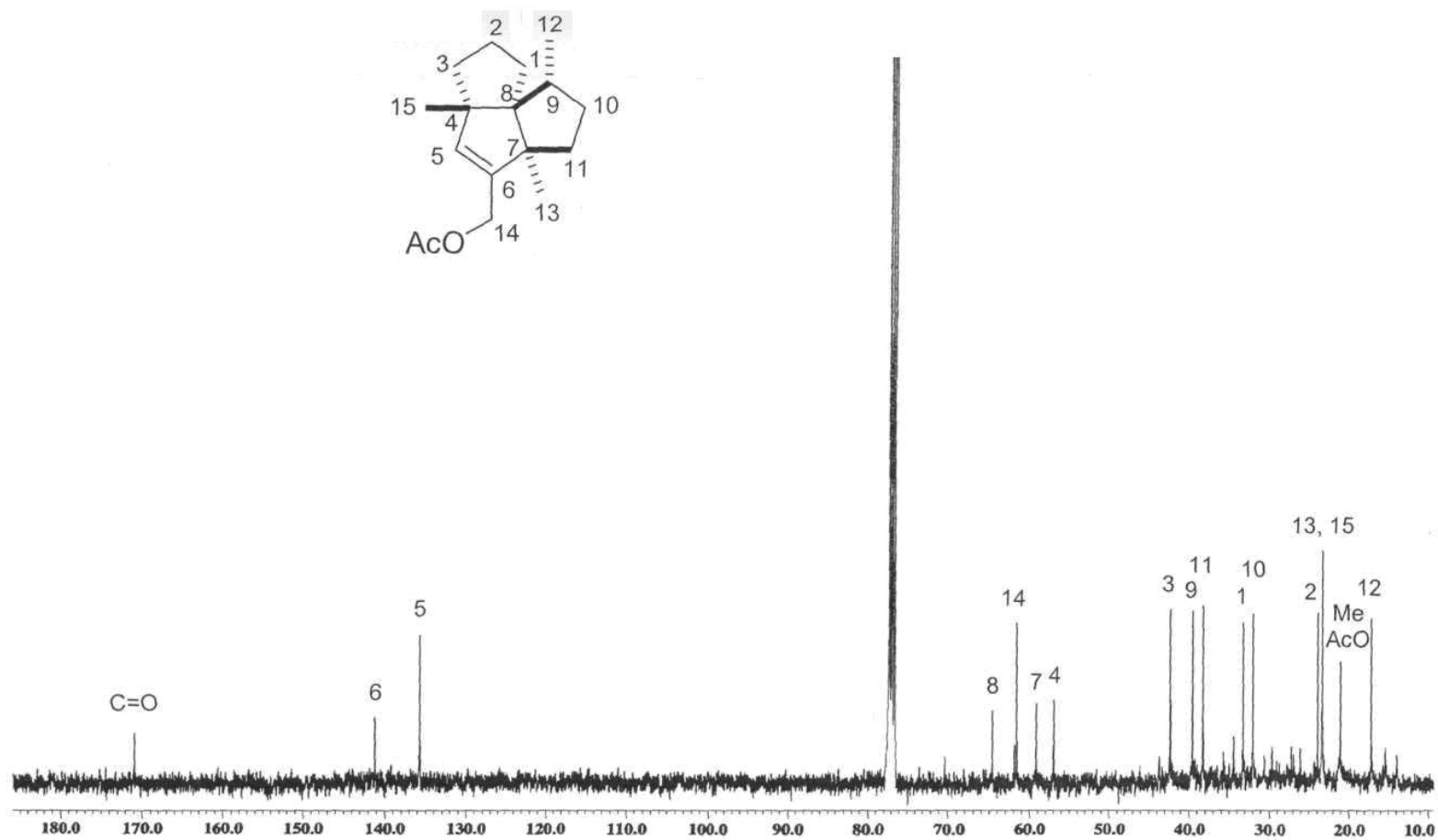


Figura 22. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del 14-acetoxisocomeno (56) en CDCl_3 .

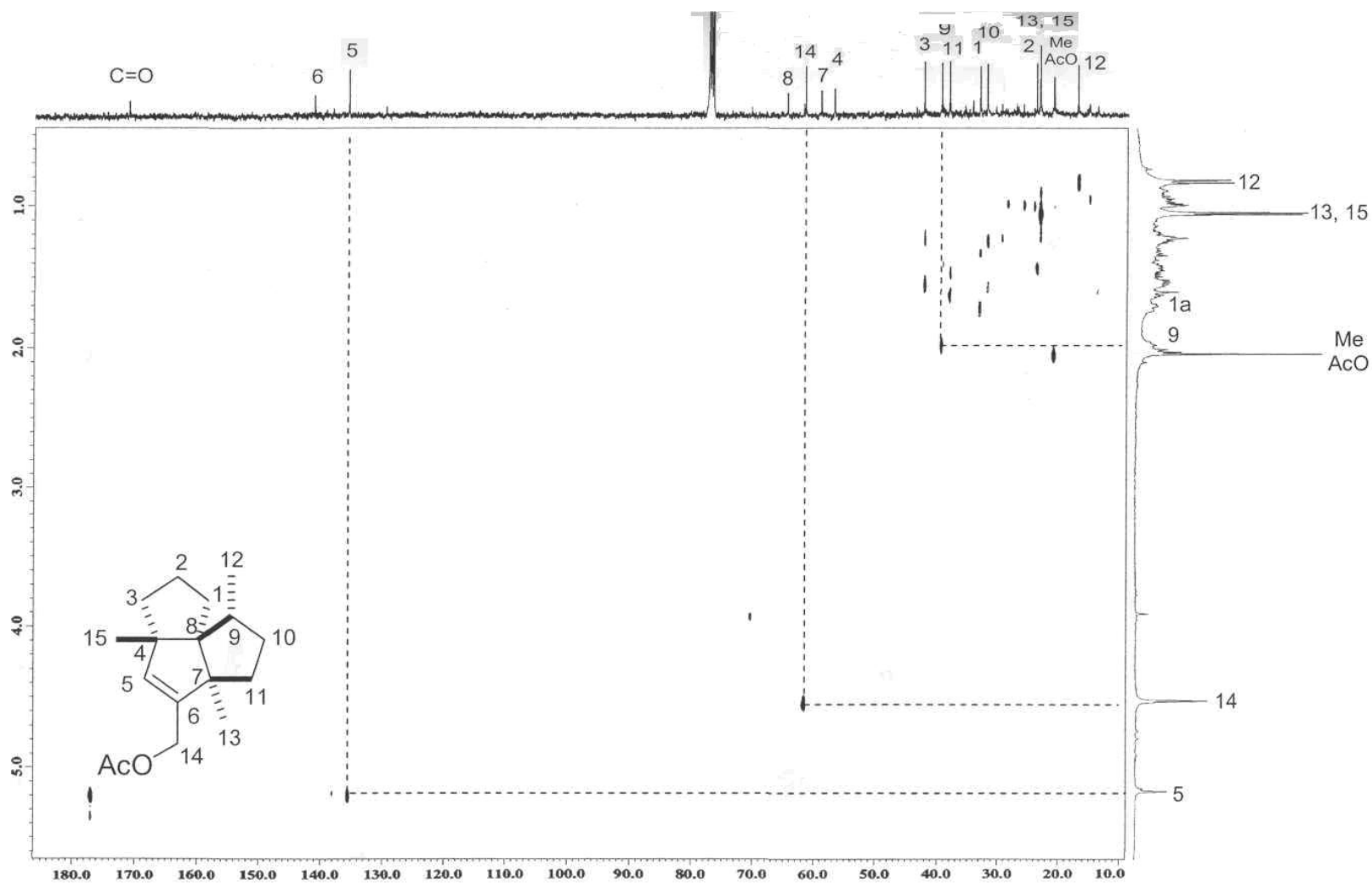


Figura 23. Espectro HMQC (400 MHz) del 14-acetoxiisocomeno (56).

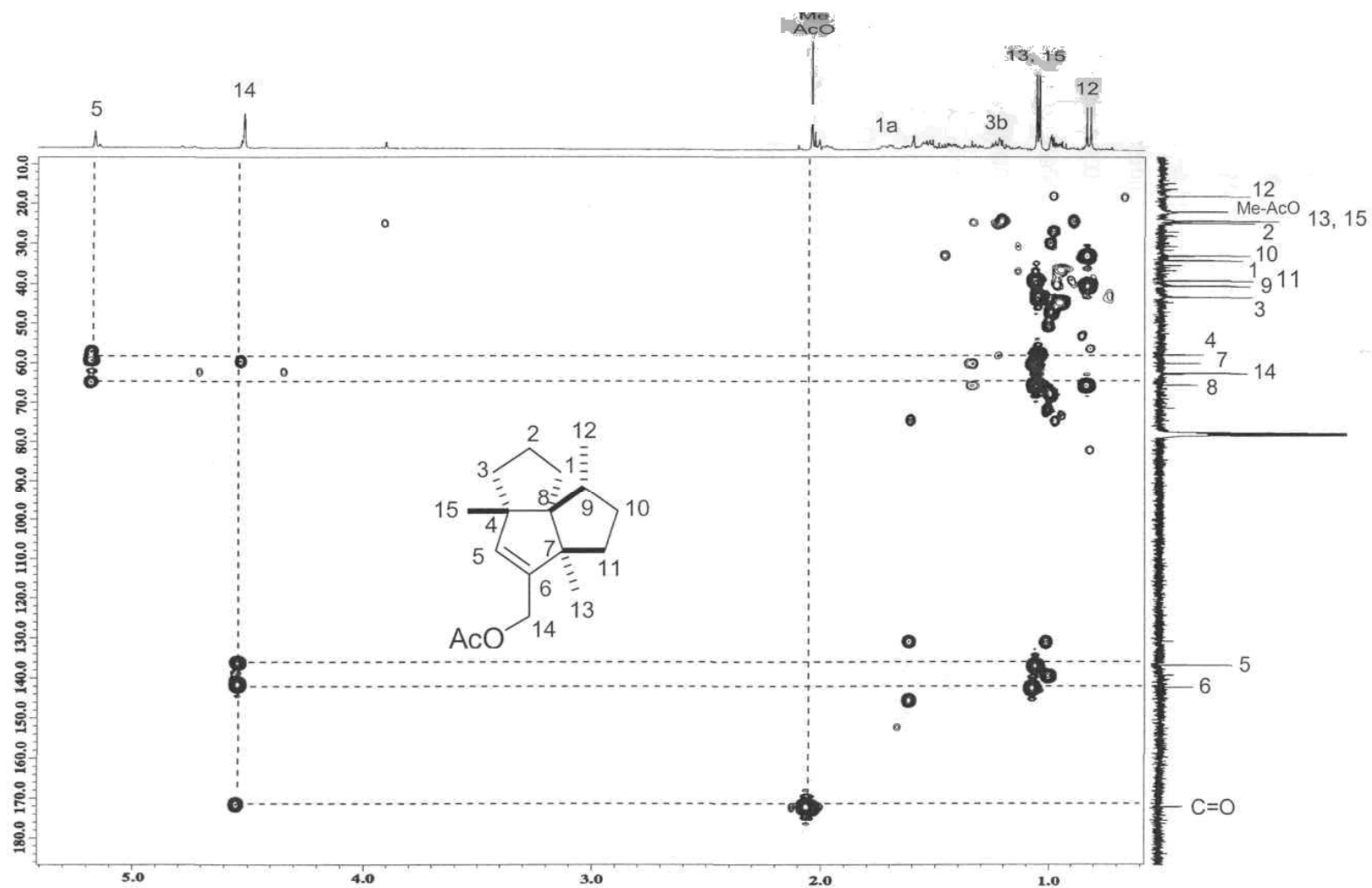
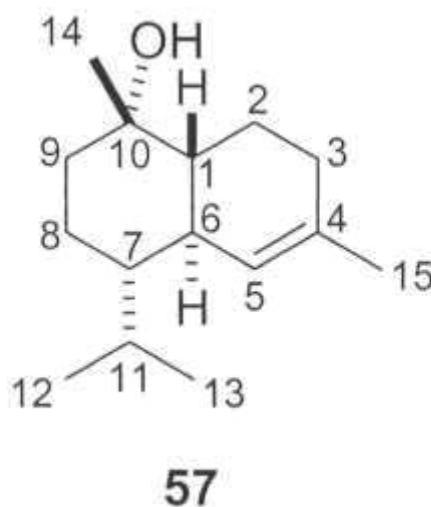
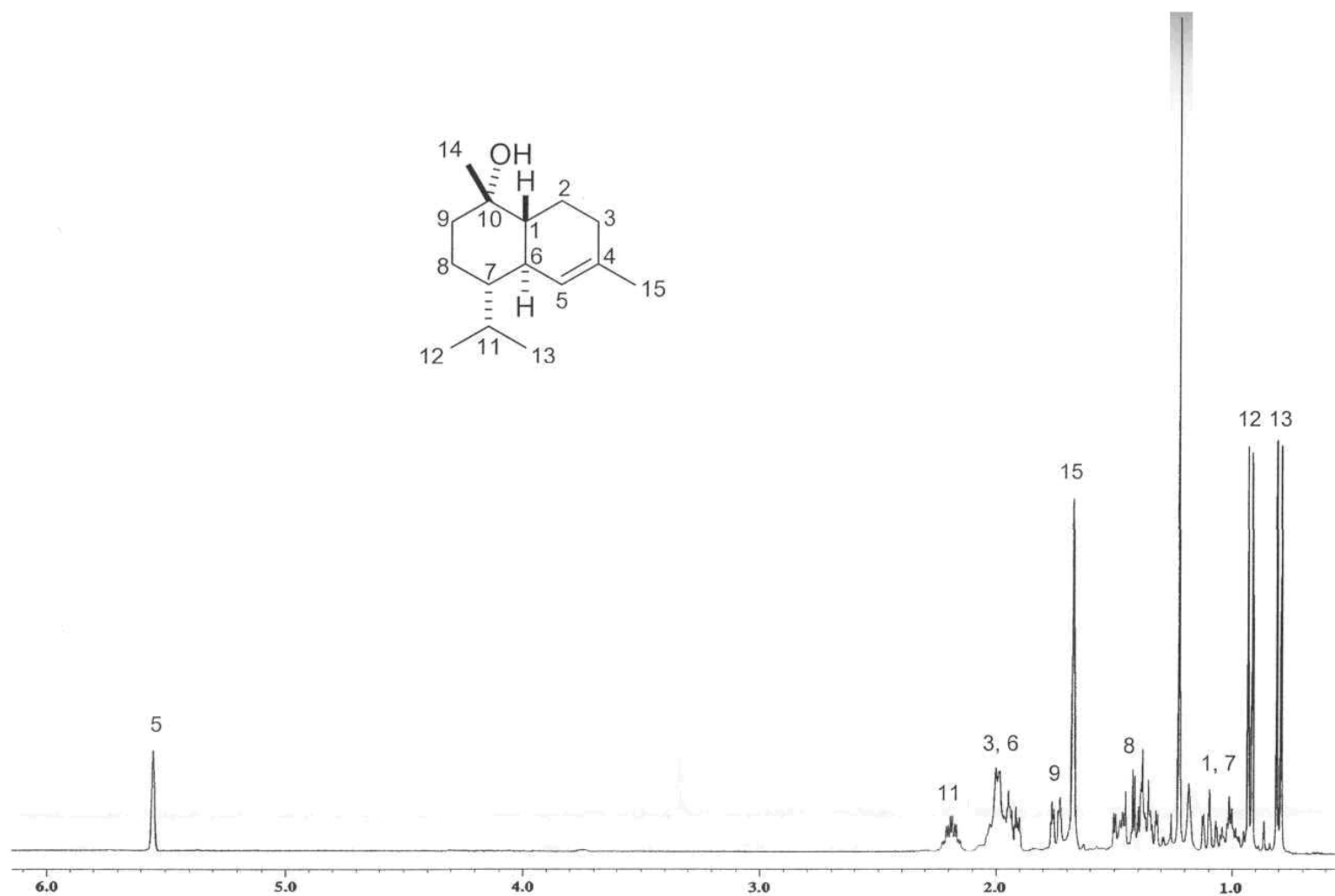


Figura 24. Espectro HMBC (400 MHz) del 14-acetoxiisocomeno (56).

En las fracciones 66 a 75 se obtuvo un compuesto como un aceite transparente. Los datos de RMN indicaron que se trataba de un compuesto hidroxilado, donde los anillos de seis miembros no presentan cambios significativos con respecto al compuesto 54 (Figura 13). El espectro de RMN de ^1H en CDCl_3 de 57 se muestra en la Figura 25. En 5.54 ppm se observó una señal simple ancha que se asignó al protón vinílico H5 y la señal simple en 1.66 ppm que integró para tres protones se asignó al metilo vinílico Me15. A frecuencias bajas en 2.17 ppm aparece una señal séptuple de dobles la cual corresponde al protón H11 ($J = 6.9, 3.3$ Hz), mientras que las señales dobles en 0.92 y 0.80 ppm se asignaron a Me12 y Me13 ($J = 6.9$ Hz). Se asignó la señal simple ancha en 1.22 ppm como Me14 ya que como se puede observar en la Figura 25 por el desplazamiento que presenta, corresponde a un metilo unido a un carbono base de un alcohol. El experimento HMBC permitió llevar a cabo la diferenciación entre las señales de ^{13}C de C7 y C1, encontrándose que la señal en 47.0 ppm corresponde a C7 ya que se observó una correlación de dicha señal con las señales de H5, Me12 y Me13.

La comparación de los datos de RMN de ^1H y ^{13}C (Figuras 25-28) con los datos reportados,³⁴ así como el valor de la rotación óptica $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +3.4$ (c 1.3, CHCl_3), nos indicaron que el compuesto aislado era el α -cadinol (57).



Figura 25. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del α -cadinol (57) en CDCl_3 .

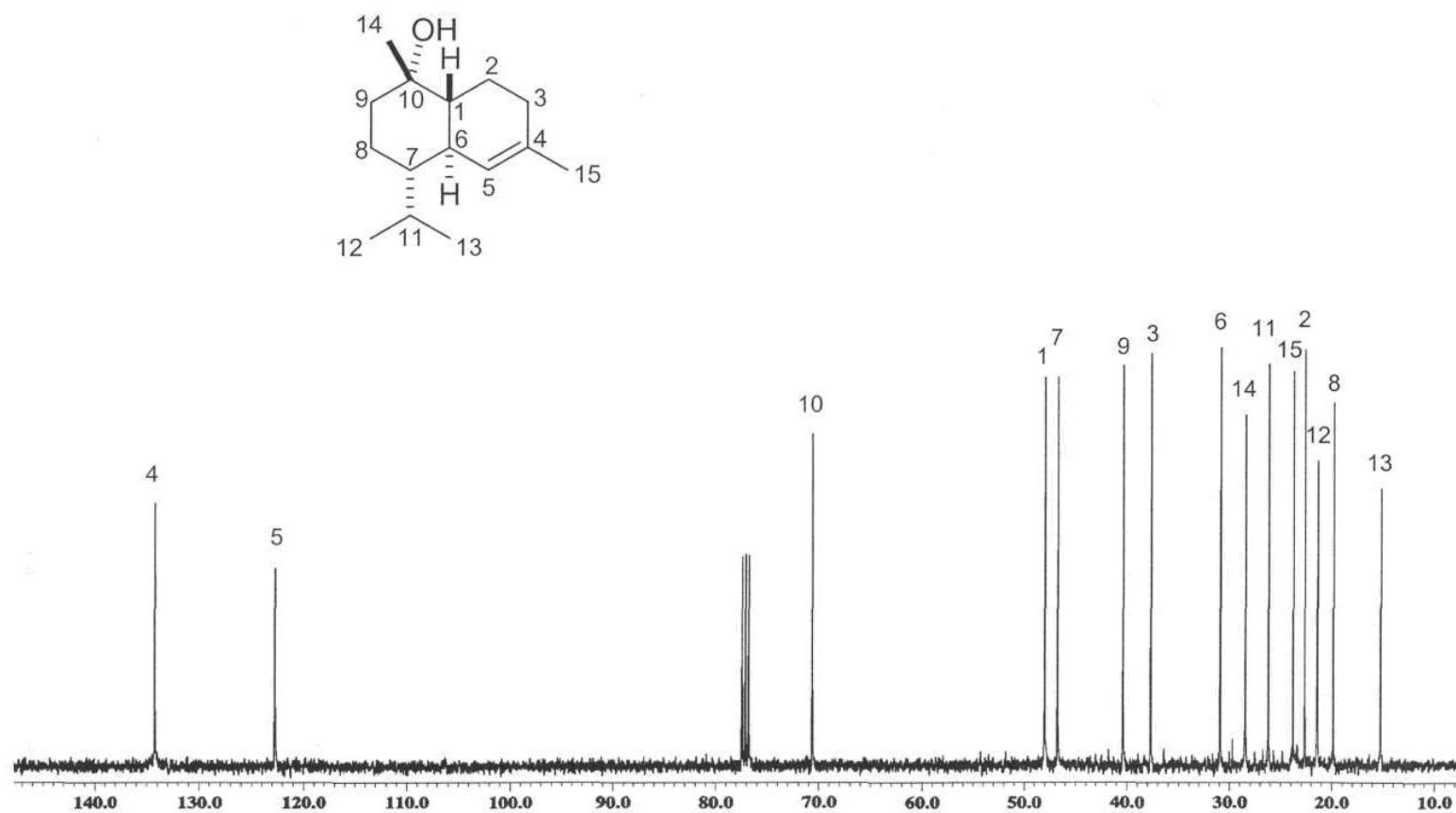
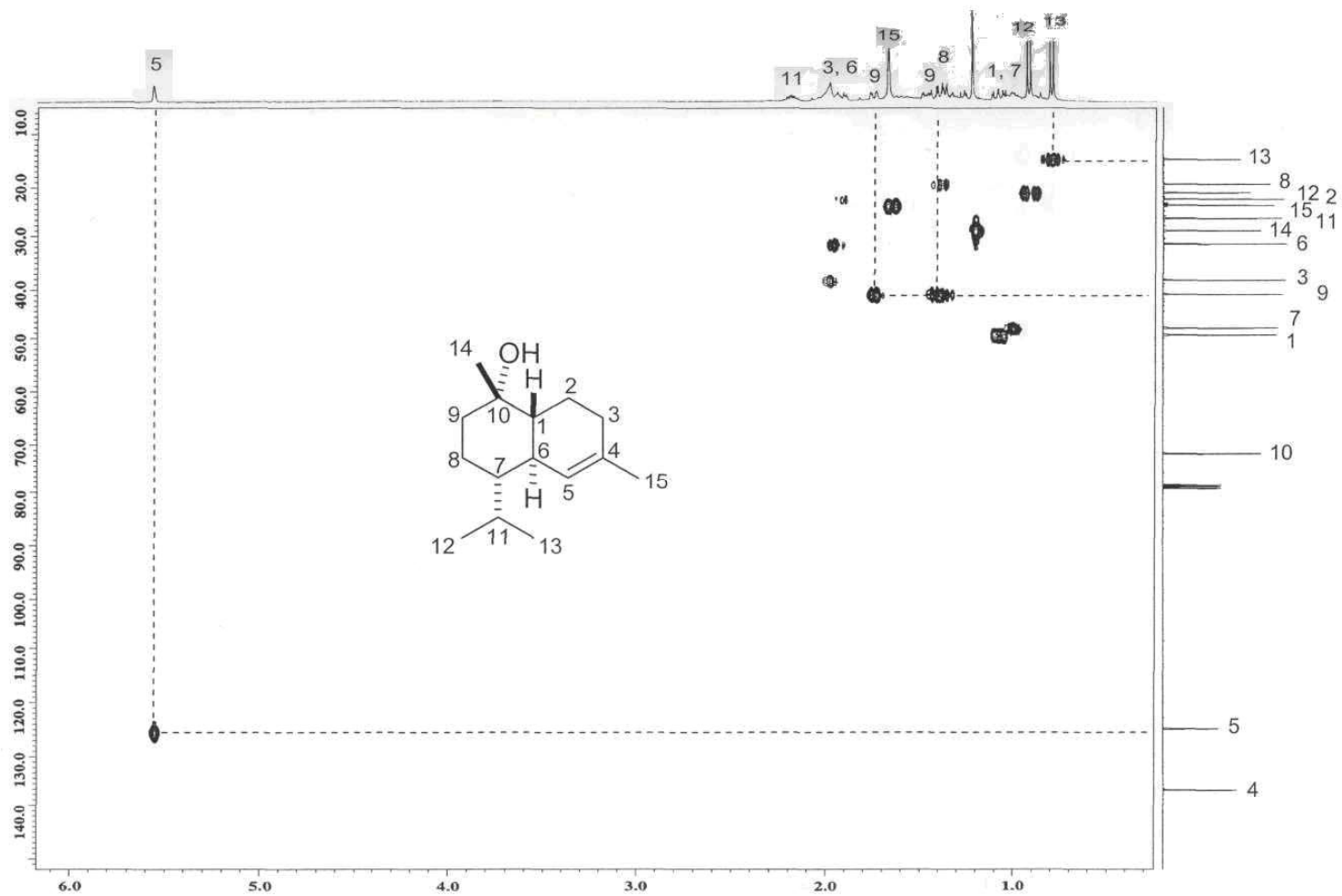
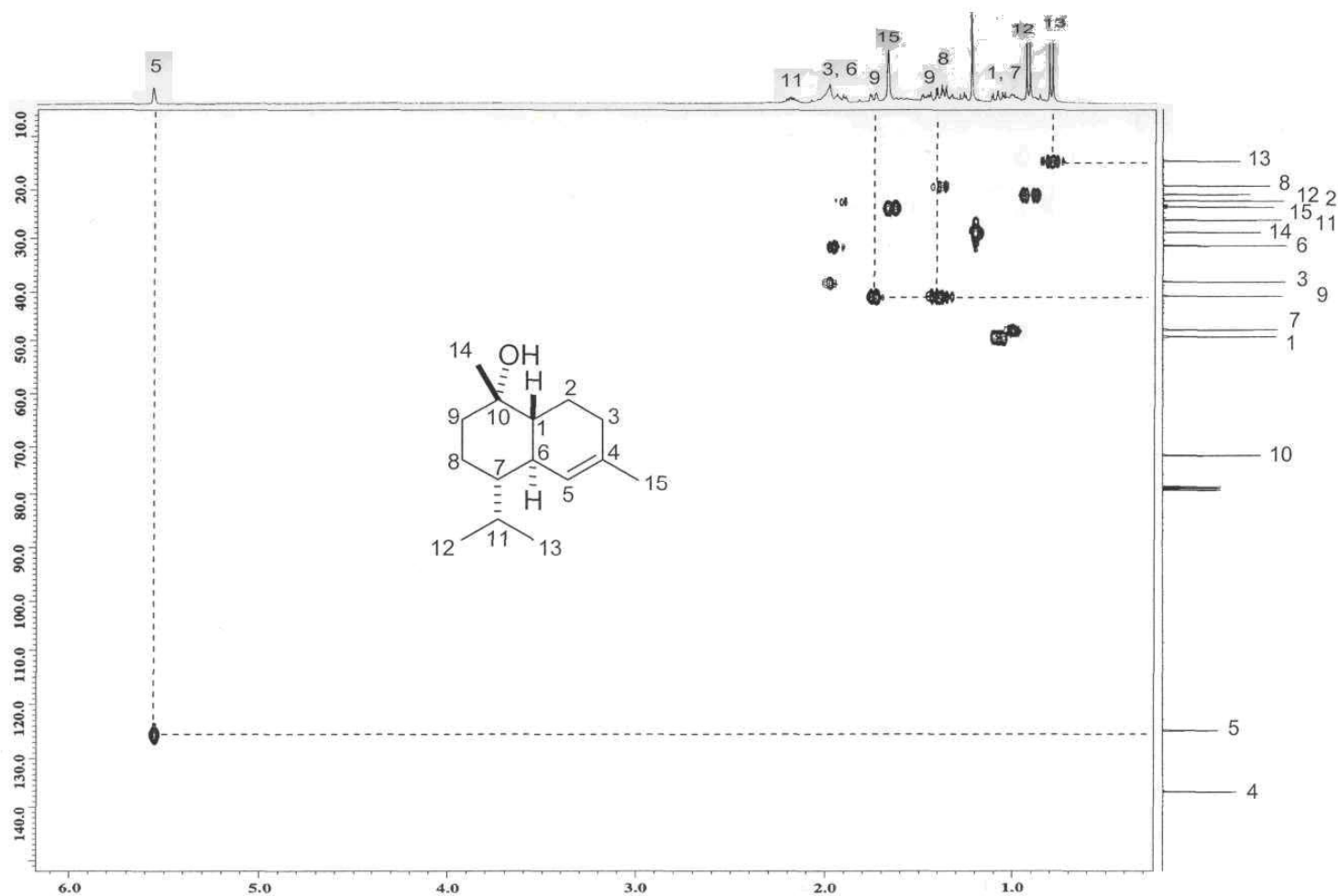


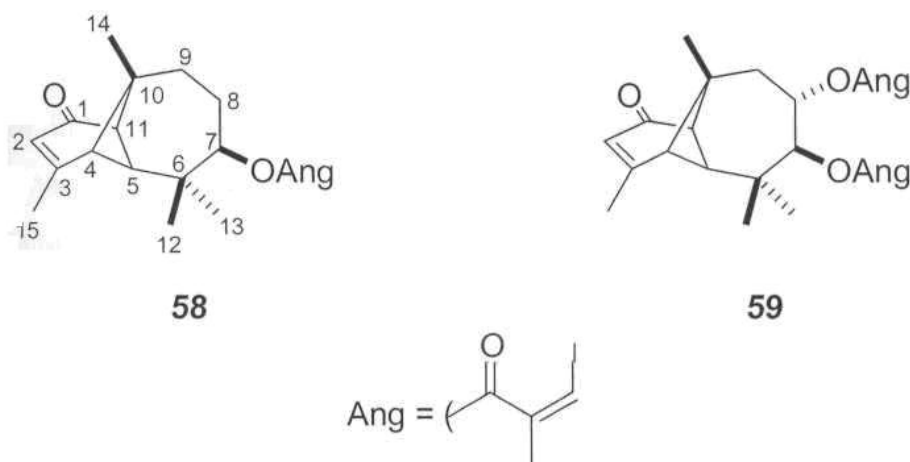
Figura 26. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del α -cadinol (57) en CDCl_3 .

Figura 27. Espectro HMBC (400 MHz) del α -cadinol (57).

Figura 27. Espectro HMQC (400 MHz) del α -cadinol (57).

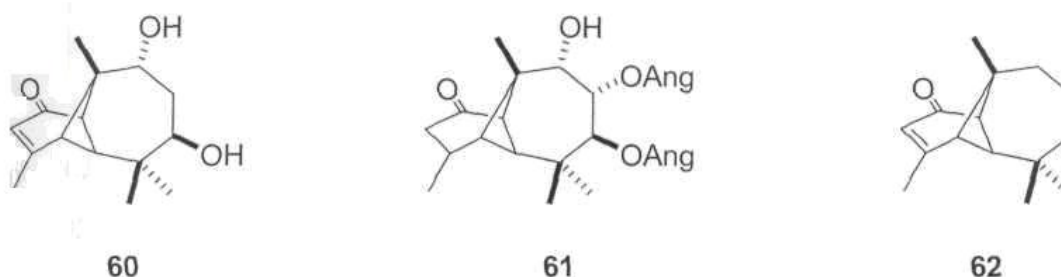
Las fracciones 99-137 obtenidas de la elución con hexano:AcOEt (9:1), cada una de 10 mL, se juntaron para su posterior recromatografía, así como las fracciones 146-148.

La recromatografía de las fracciones 99-137 se llevó a cabo mediante cromatografía rápida, empleando una mezcla de hexano-AcOEt 95:5 y colectando fracciones de 10 mL. En los eluatos 165-211 se obtuvo una mezcla de compuestos, la cual se purificó por CCF (hexano-AcOEt 9:1, 18 desarrollos) proporcionando los compuestos 58 (R_f 0.74) y 59 (R_f 0.64). Estos compuestos se analizaron mediante RMN, en donde se pudo determinar que se trataba de dos derivados del longipineno conteniendo residuos angelóilo. La comparación de sus datos con los reportados nos permitieron determinar que los compuestos correspondían al (4R,5S,7R,10R,11R)-7-angeloiloxilongipin-2-en-1-ona (58) (Figuras 29-31),³⁵ y (4R,5S,7S,8S,10/?,11R)-7,8-diangeloiloxilongipin-2-en-1-ona (59) (Figura 32).^{35,36}



La configuración del sistema del longipineno fue establecida por correlación química del diol 60, el cual se obtuvo como producto de hidrólisis de los ésteres naturales y también como producto de la correlación química del compuesto conocido como rasteviona (61), con una molécula relacionada que es la vulgarona B (62). Se compararon las curvas de dicroísmo circular, encontrándose una muy buena correspondencia entre

ellas. La configuración absoluta de la vulgarona B 61) fue establecida por correlación con el (+)-longipineno.^{37,38}



El espectro de RMN de ^1H de 58 (Figura 29) mostró señales que corresponden a los protones del residuo angelóilo unido al sistema de longipineno. En 6.09 ppm aparece una señal cuádruple de cuádruples del protón vinílico H3' ($J = 7.4, 1.5$ Hz), la señal doble de cuádruples en 2.02 que corresponde a H4' se debe al acoplamiento de H4' con H3' y H5' ($J = 7.4, 1.5$ Hz) y finalmente la señal quíntuple en 1.92 ppm se asignó como H5' ($J = 1.5$ Hz). Con respecto a los protones del sistema de longipineno, en 5.77 ppm se observa la señal para el protón vinílico H2 como una señal simple ancha. La señal doble de dobles en 4.80 ppm corresponde al protón H7 por acoplamiento con H8a y H8p ($J = 11.4, 1.1$ Hz), el valor tan pequeño de la constante de acoplamiento entre H7 y H8a se debe al ángulo dihedro formado entre ambos protones, el cual tiene un valor de 74° (análisis mediante relaciones de tipo Karplus). Las señales dobles en 2.83 y 2.72 ppm se asignaron a H11 y H4 respectivamente ($J = 6.6$ Hz). En 2.22 y 2.04 ppm se aprecian dos señales que corresponden a H5 y Me15 respectivamente. Finalmente, las señales simples debidas a los metilos del sistema se localizan en 1.05, 0.99 y 0.93 ppm y corresponden a Me12, Me14 y Me15.

La asignación de las señales en el espectro de RMN de ^{13}C se llevó a cabo mediante el análisis de los experimentos bidimensionales HMQC y HMBC y por comparación con la base de datos de longipinenos.³⁷

El espectro de RMN de ^1H del compuesto 59 (Figura 32) es similar al de 58, excepto que ahora encontramos una señal triple de dobles en 5.43 ppm ($J = 11.0, 5.1$ Hz). La cual corresponde al protón H8 base del segundo residuo angelóilo, la presencia de un éster en C8 modifica también la multiplicidad y desplazamiento de los protones H9, encontrándose ahora a H9p en 2.21 ppm como una señal doble de dobles ($J = 14.3, 5.1$ Hz). Debido a que las señales correspondientes a los protones H3' de los residuos presentes tienen desplazamientos ligeramente distintos, esto hace que la multiplicidad que presentan las señales no se vea de forma tan clara como en el caso del compuesto 58.

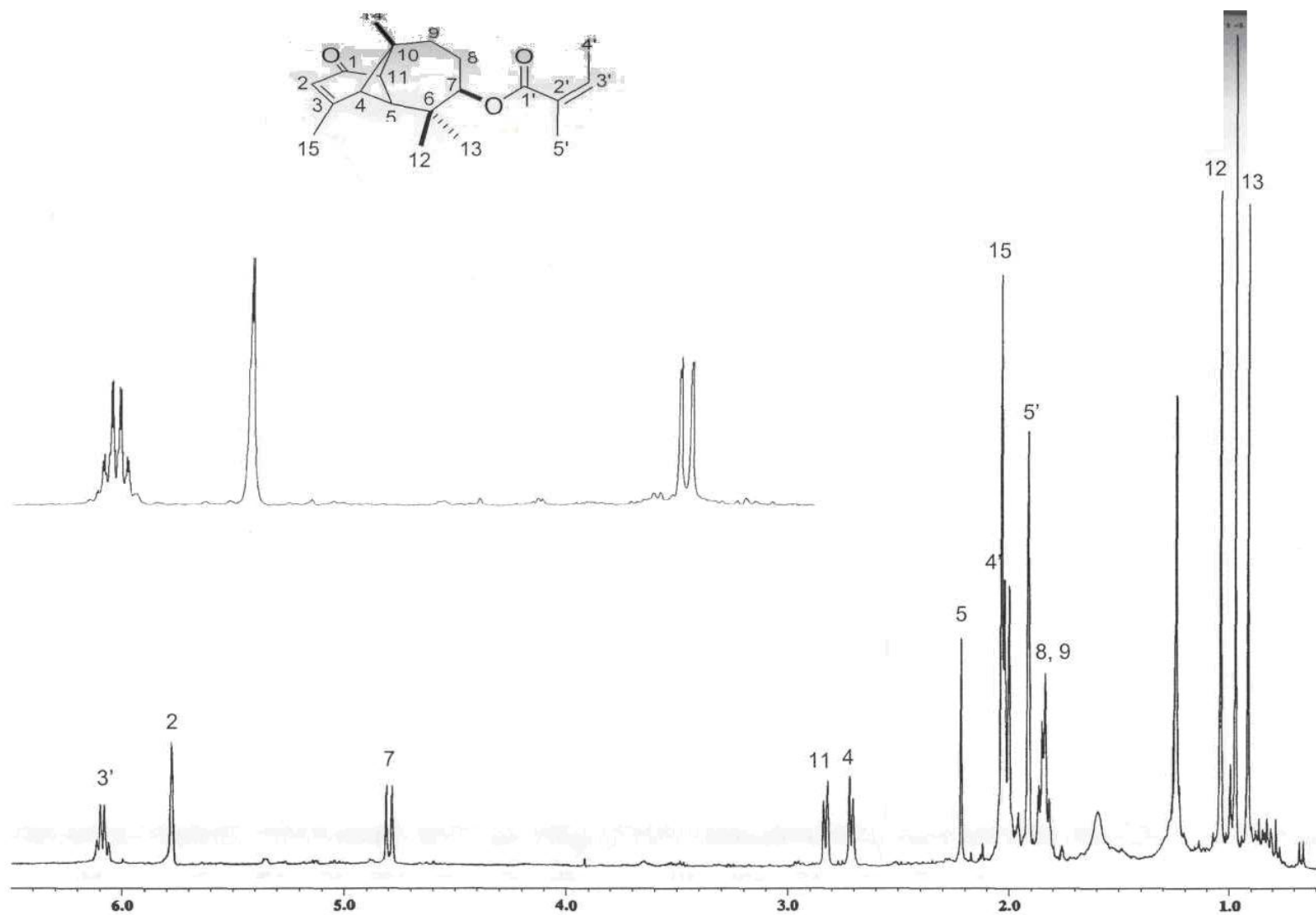


Figura 29. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz del (4R,5S,7R,10R,11R)-7-angeloiloxilongipin-2-en-1-ona (58) en CDCl₃.

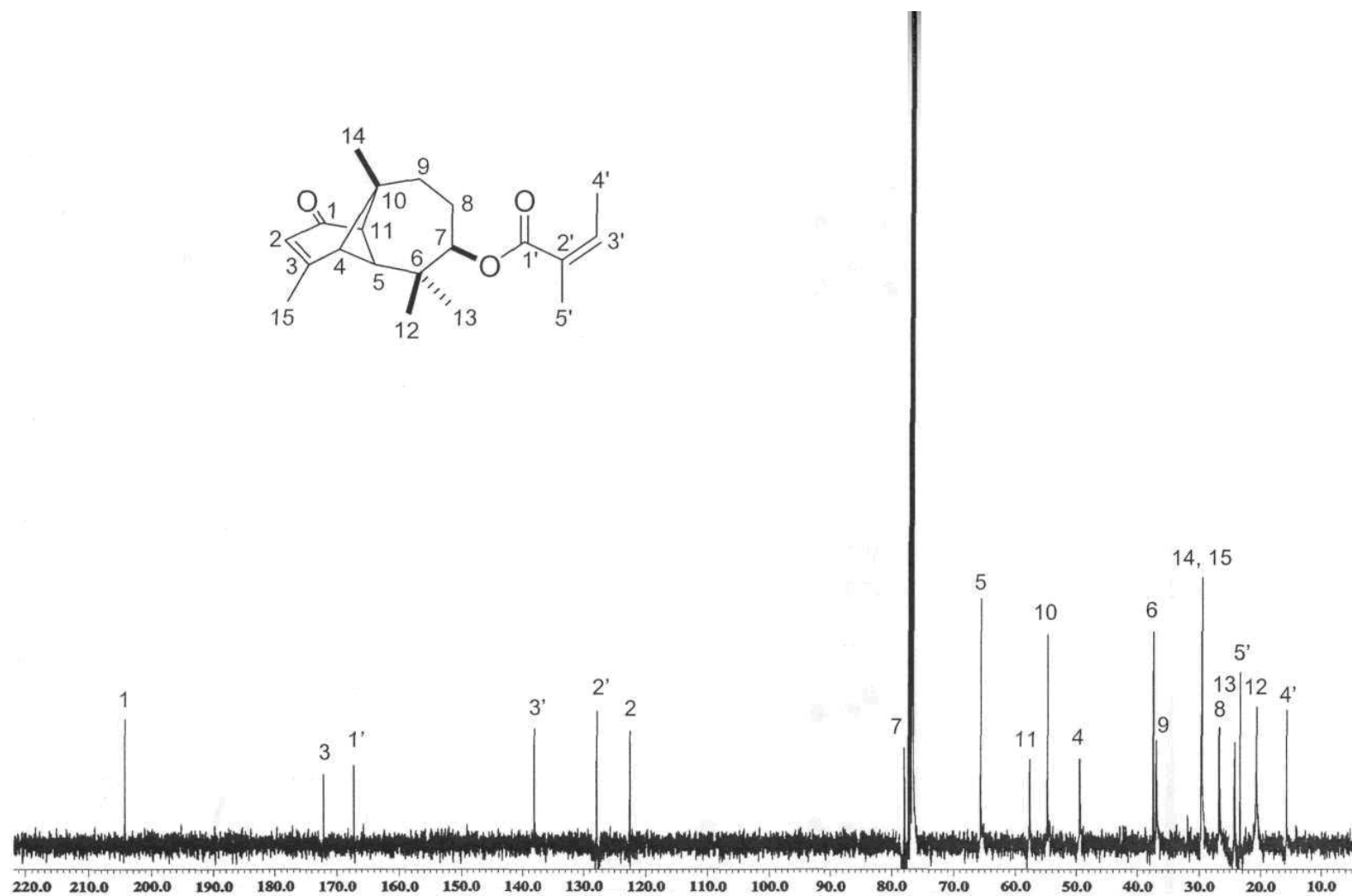


Figura 30. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del (4R,5S,7R,10R,11R)-7-angeloilongipin-2-en-1-ona (58) en CDCl_3 .

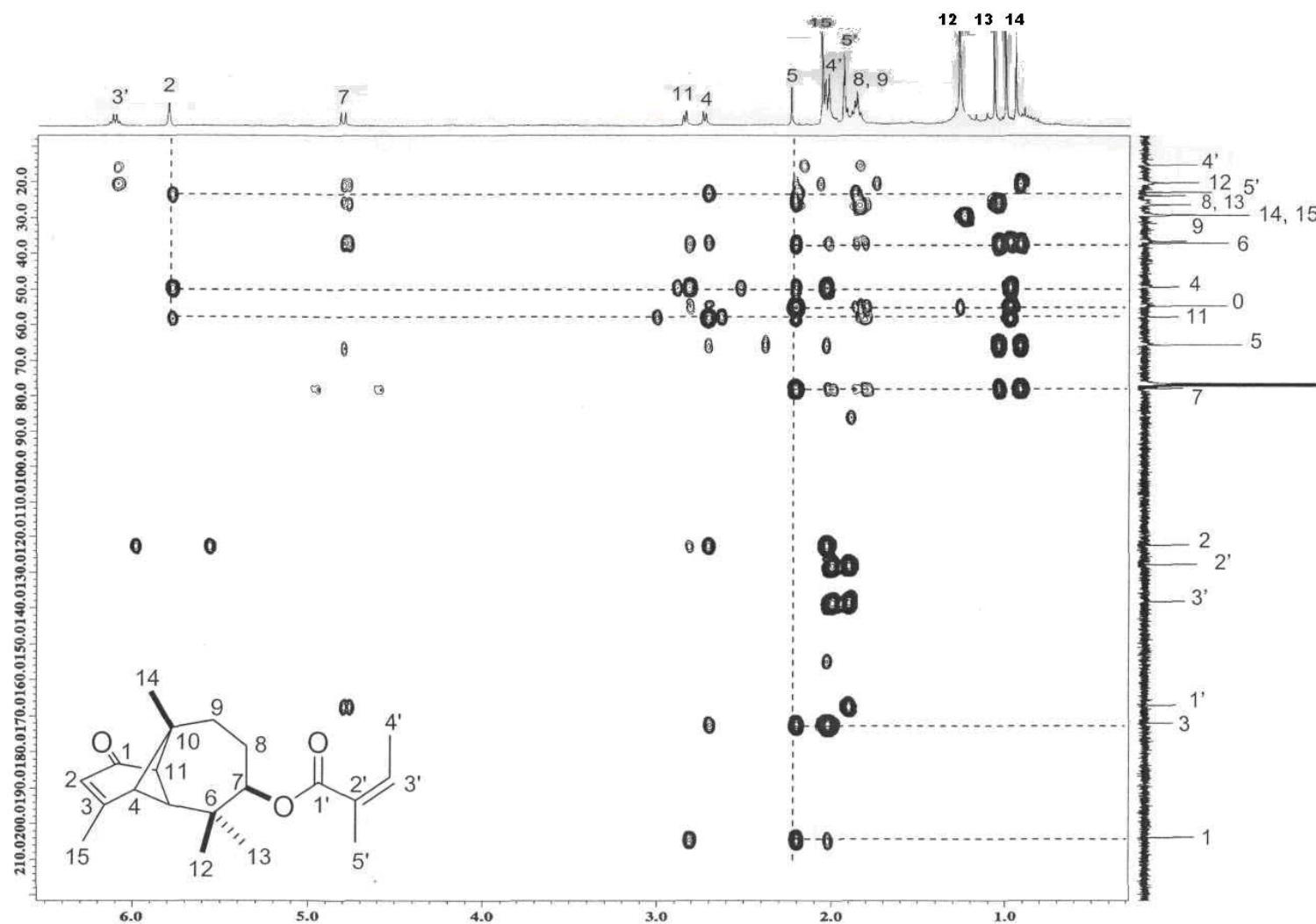


Figura 31. Espectro HMBC (400 MHz) del (4R,5S,7R,10R,11R)-7-angeloiloxilongipin-2-en-1-ona (58).

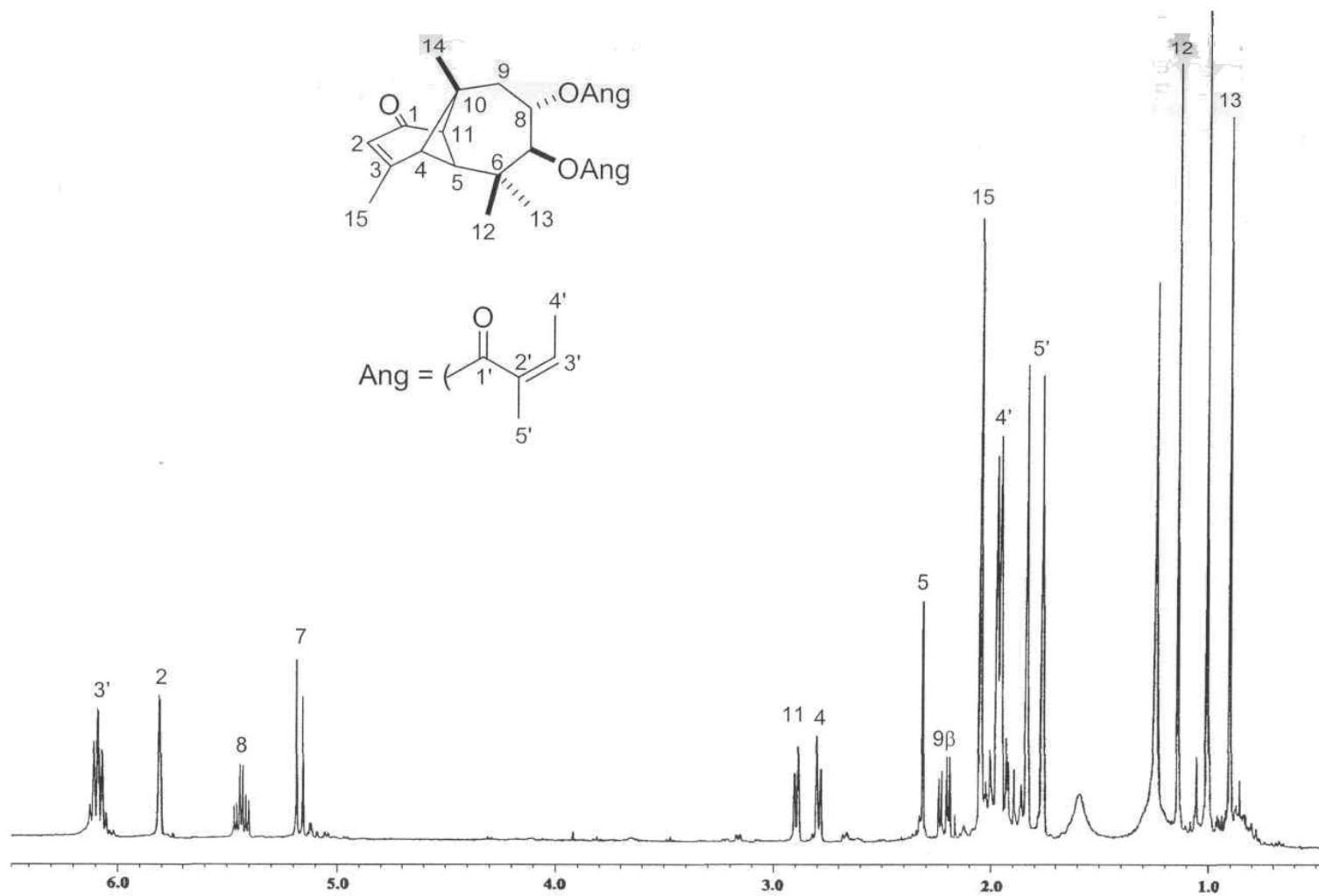
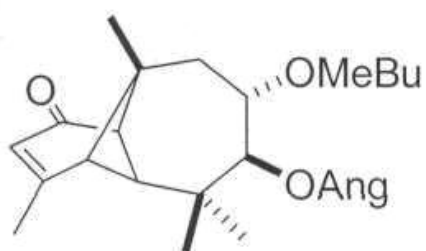
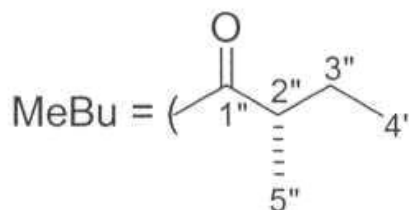


Figura 32. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz del (4R,5S,7S,8S,10R,11R)-7,8-diangeloilongipin-2-en-1-ona (59) en CDCl₃.

De las fracciones 238-280 de la recromatografía de 99-137 se obtuvo una mezcla de dos compuestos, de los cuales mediante CLAR (MeOH-H₂O, 70:30, con un flujo de 4.5 mL/min, inyectando 2.5 mg) se separó y purificó el compuesto (4R,5S,7S,8S,10R,11R,2"S) -7-angeloiloxi-8-(α -metilbutiroiloxi)-longipin-2-en-1-ona (63), el cual tuvo un tiempo de retención de 82 minutos. El espectro de ¹H (Figura 33) no muestra diferencias significativas con respecto al del compuesto 59, excepto en que ahora se observan en el espectro de RMN de ¹H señales correspondientes a un residuo α -metilbutiroilo. En 2.26 ppm aparece una señal séxtuple debida al acoplamiento de H-2" con el metileno 3" y Me 5" ($J = 7.0$ Hz). Las señales múltiples en 1.58 y 1.45 ppm corresponden a H-3"a y H-3"b. Finalmente, en 1.06 y 0.84 ppm se observan una señal doble ($J = 7.0$ Hz) y una señal triple ($J = 7.3$ Hz) debidas a los metilos 4" y 5", respectivamente. La asignación completa del espectro de ¹H se realizó mediante la comparación con datos reportados.³⁹



63



4"

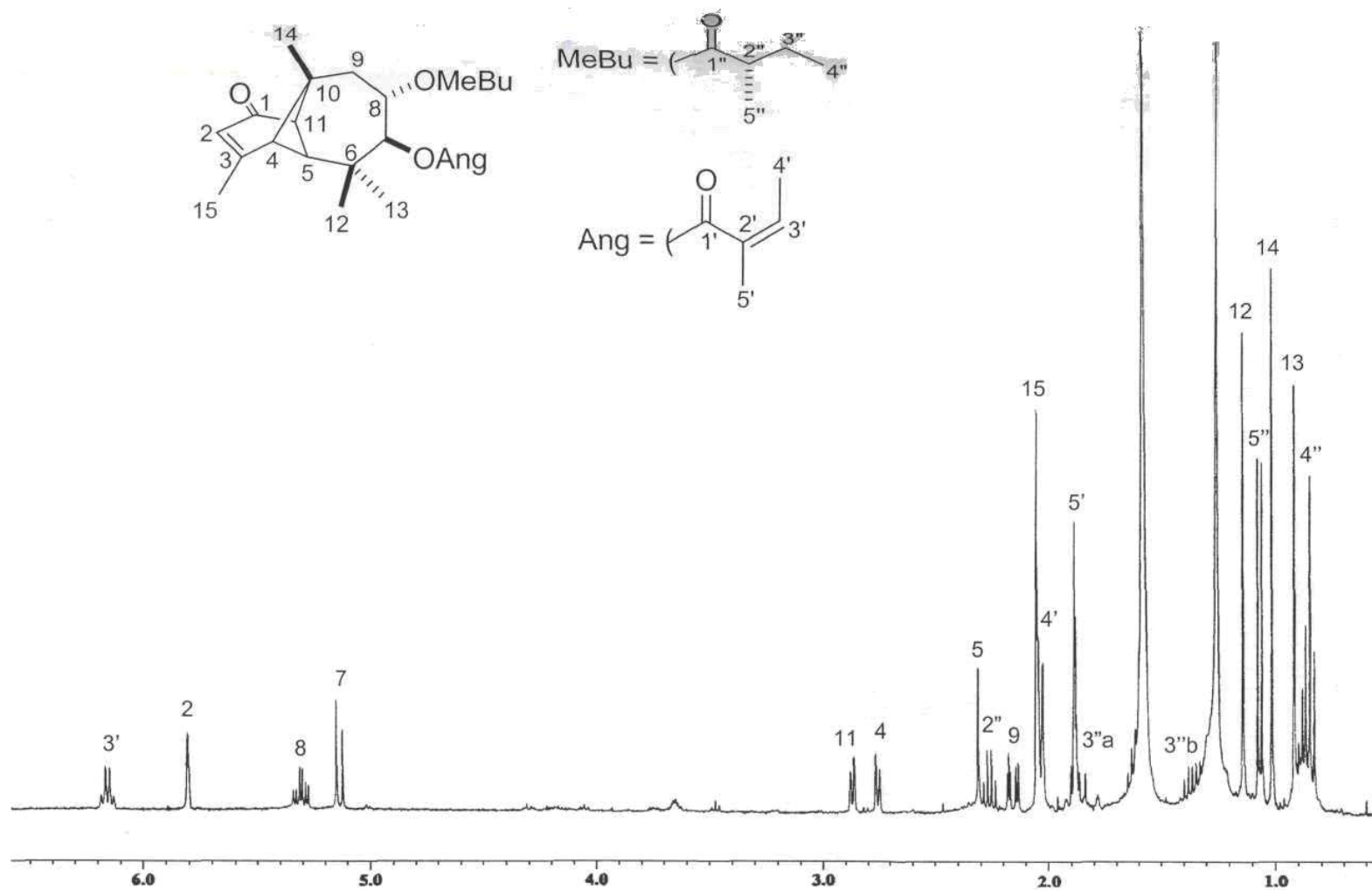
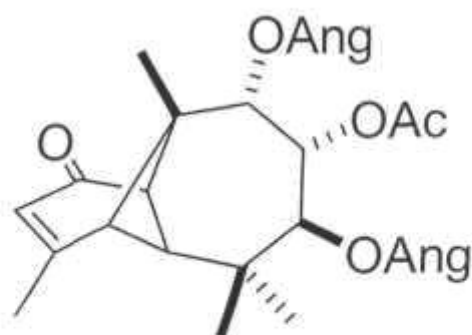


Figura 33. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz del (4*R*,5*S*,7*S*,8*S*,10*R*,11*R*,2''*S*)-7-angeloiloxi-8-(α -metilbutiroiloxi)-longipin-2-en-1-ona (**63**) en CDCl₃.

Délos eluatos 324-329 obtenidos con una mezcla de hexano-AcOEt 9:1 se aisló un compuesto, cuyo espectro de RMN de ^1H (Figura 34) mostró señales características de un derivado del longipineno, encontrándose presentes dos residuos angeloilo y un acetilo, ya que se aprecian en el espectro tres señales base de grupos éster, la señal doble en 5.51 ppm ($J = 11.7$ Hz) corresponde a H7, en 5.48 ppm se encuentra una señal doble que se asignó a H9 ($J = 3.3$ Hz) y la señal doble de dobles ($J = 11.7, 3.3$ Hz) que corresponde a H8 por acoplamiento con H7 y H9 se muestra en 5.40 ppm. En cuanto a las señales correspondientes a los esterés, la multiplicidad y valores de las constantes de acoplamiento son similares a los ya descritos, únicamente se encuentran pequeñas diferencias en el valor del desplazamiento de los protones de cada residuo angeloilo presente en 64, encontrándose además, una señal simple en 1.90 ppm del metilo del residuo acetilo. Para determinar la posición en la cual se encontraban cada uno de los residuos se obtuvieron los espectros bidimensionales, los cuales se compararon con los reportados^{36,40} y de esta forma se pudo determinar que el compuesto aislado era la (4R,5S,7S,8R,9S,10R,11R)-8-acetoxi-7,9-diangeloilongipin-2-en-1-ona (64) (Figuras 34-35).



64

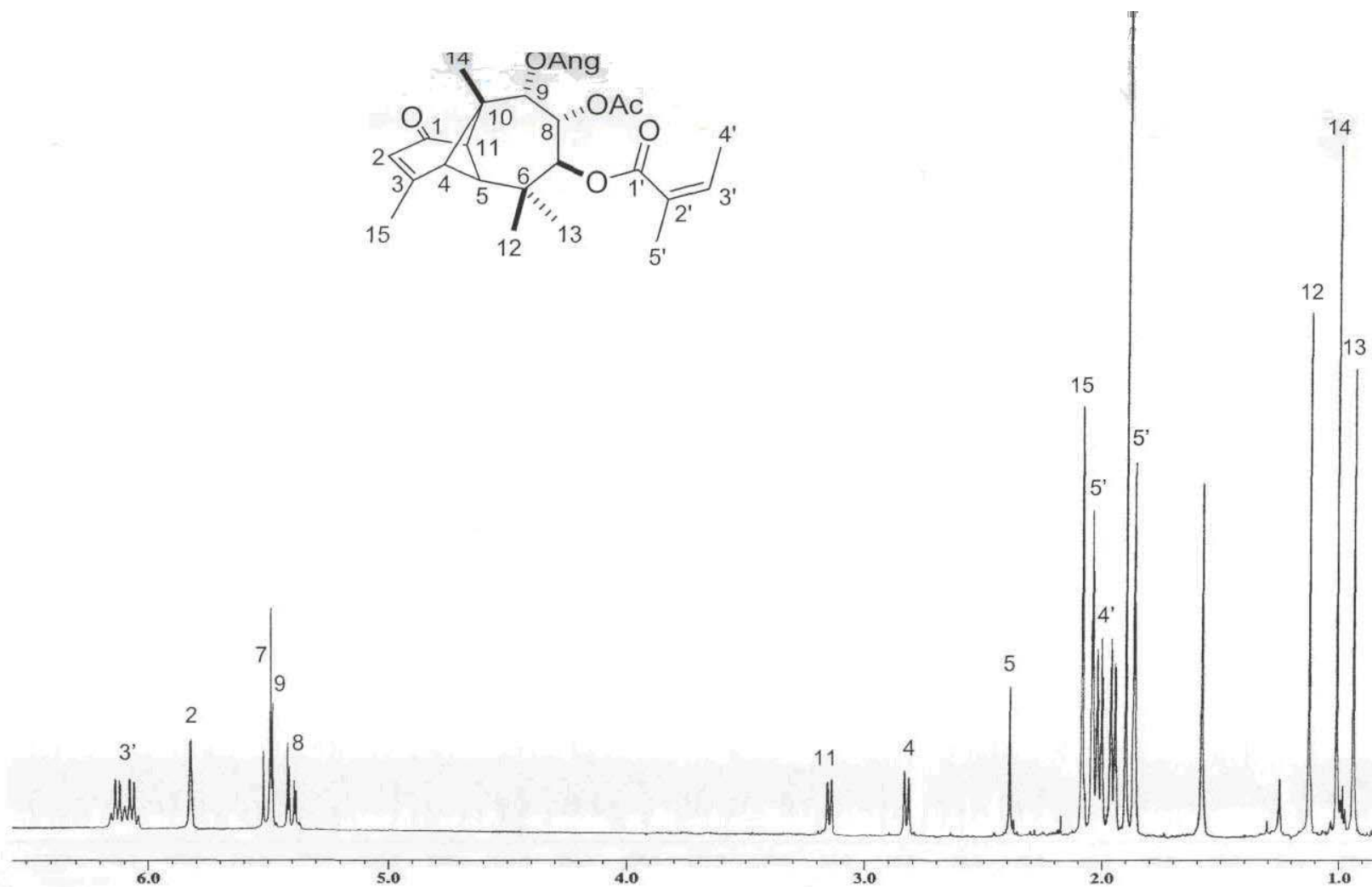


Figura 34. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz del (4*R*,5*S*,7*S*,8*R*,9*S*,10*R*,11*R*)-7,9-diangeloiloxi-8-acetoxilongipin-2-en-1-ona (**64**) en CDCl₃.

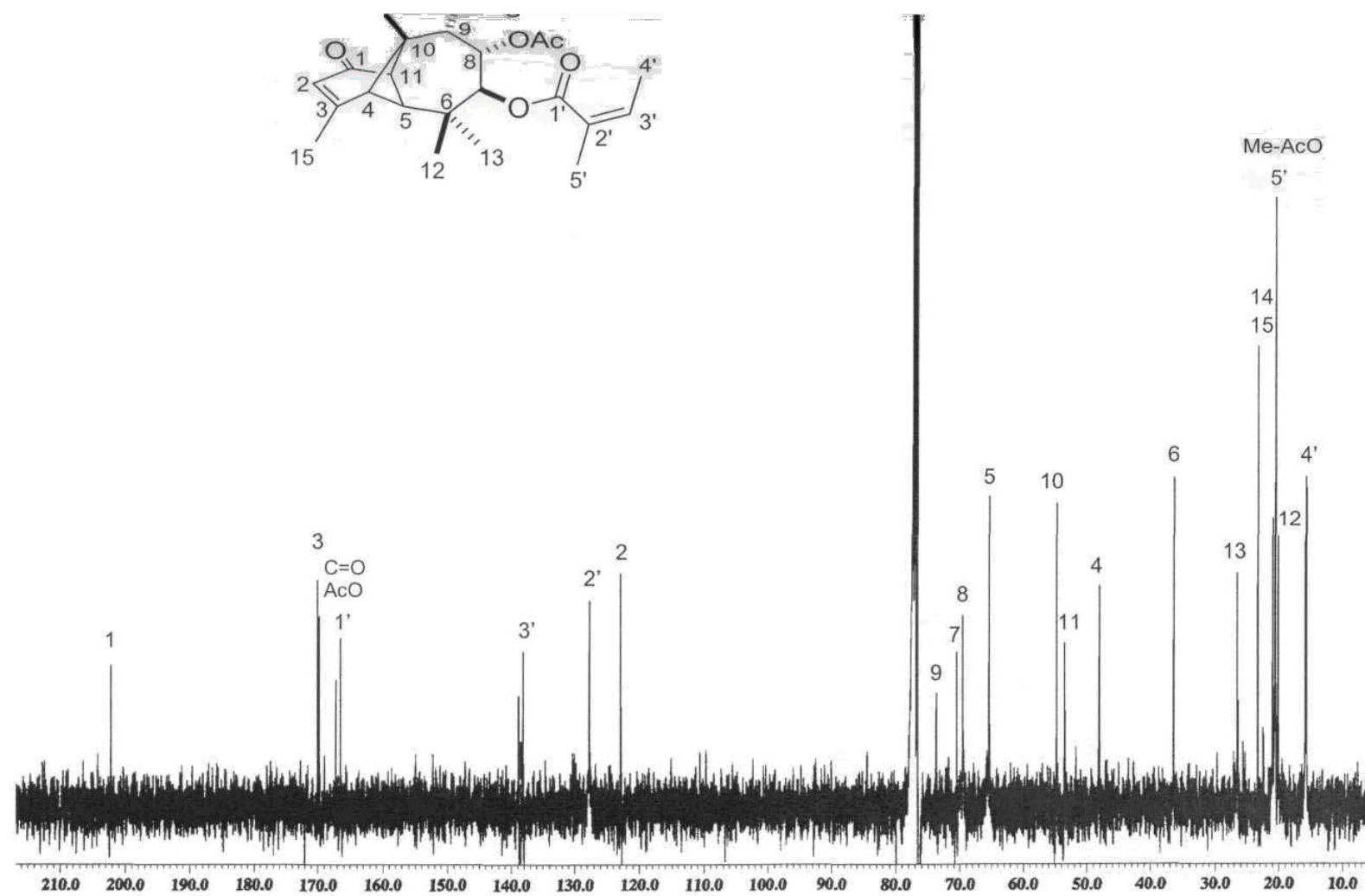
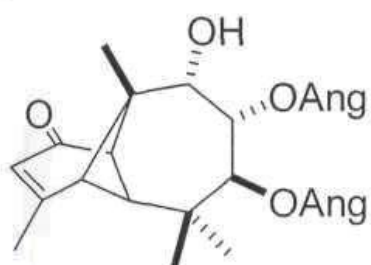
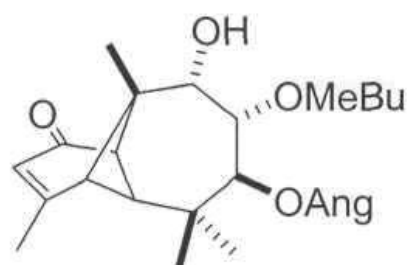


Figura 35. Espectro de RMN de ¹³C a 100 MHz del (4*R*,5*S*,7*S*,8*R*,9*S*,10*R*,11*R*)-7,9-diangeloiloxi-8-acetoxilongipin-2-en-1-ona (64) en CDCl₃.

Finalmente, de las fracciones 146-148 se obtuvo una mezcla de derivados del longipineno, los cuales se identificaron comparando sus espectros de RMN de ^1H y ^{13}C con los de la literatura.^{1536,39,41} Esto nos permitió caracterizar a los derivados del longipineno 47 y 48 como (4R,5S,7S,8S,9S,10R,11R)-7,8-diangeloiloxi-9-hidroxi-longipin-2-en-1-ona^{39,41} (Figura 36) y (4R,5S,7S,8S,9S,10R,11R,2"S)-7-angeloiloxi - 9 -hidroxí-8-(a-metilbutiroiloxi)-longipin-2-en-1 -ona^{39,42} respectivamente. Los desplazamientos de los protones del sistema del longipineno, así como de los sustituyentes en C7, C8 y C9 se muestran en la Tabla 11 en la parte experimental.



47



48

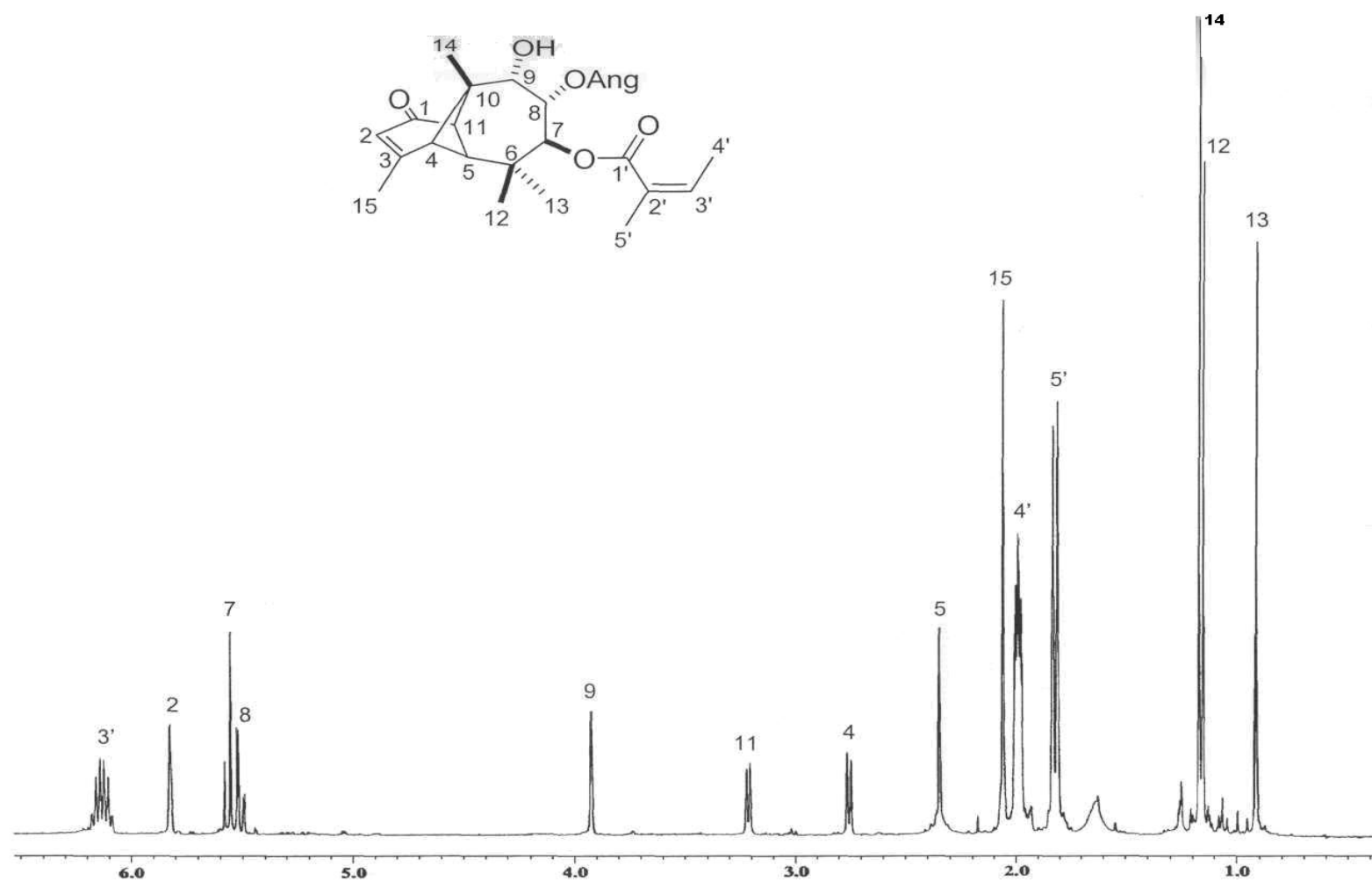
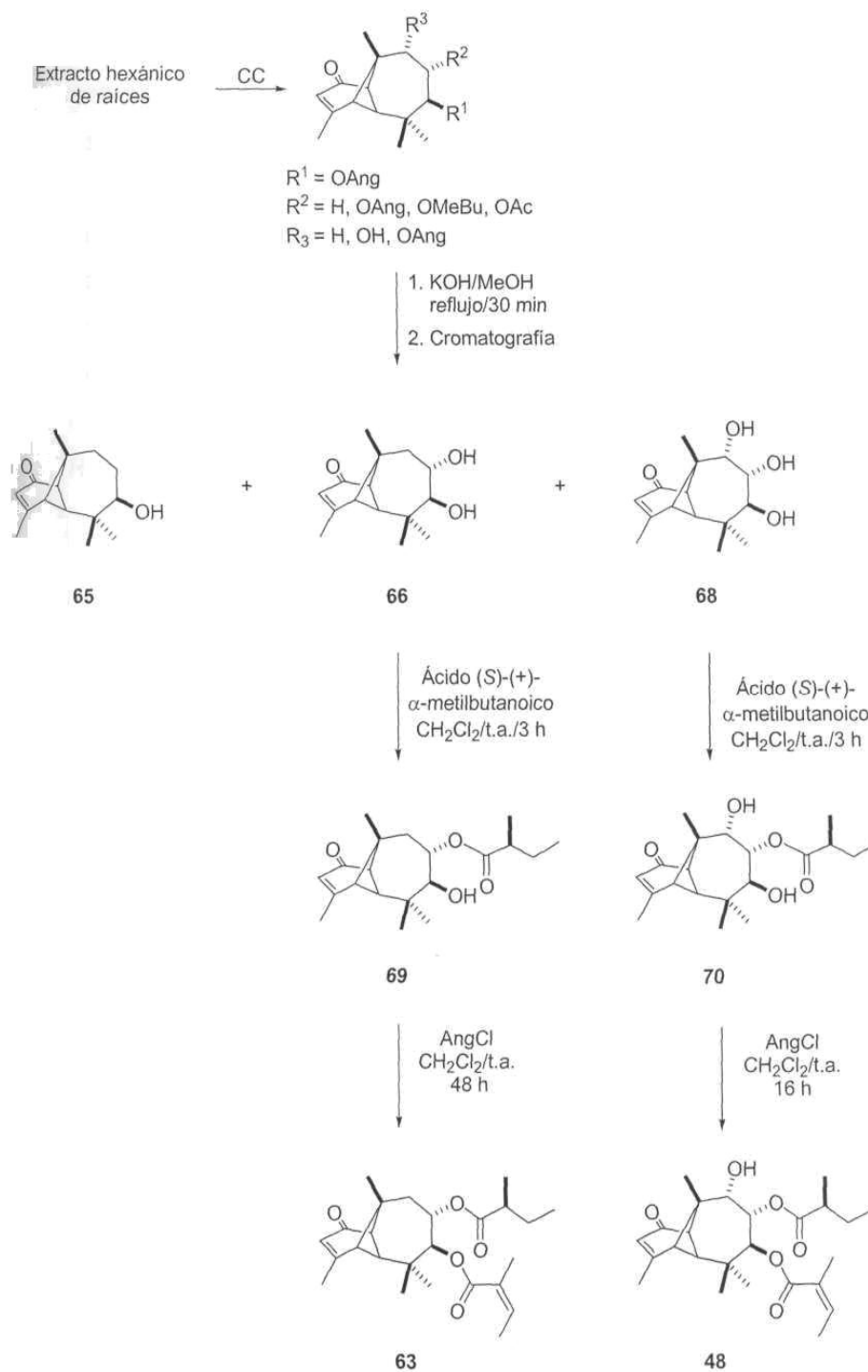


Figura 36. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz del (4*R*,5*S*,7*S*,8*S*,9*S*,10*R*,11*R*,2''*S*)-7,8-diangeloiloxy-9-hidroxi-longipin-2-en-1-ona (47).

5.2 Determinación de la configuración absoluta del residuo α -metilbutiroílo en derivados del longipineno

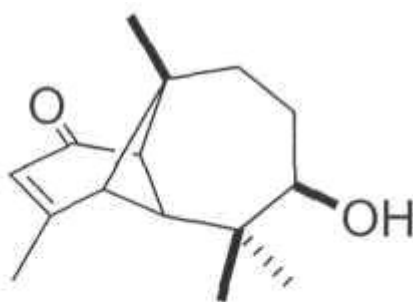
5.2.1 Síntesis parcial de derivados del longipineno con el residuo α -metilbutiroílo.

Debido a que no se había descrito la configuración absoluta del residuo MeBu en derivados del longipineno de *Stevia*, se decidió llevar a cabo la síntesis de los productos naturales 48 y 63, a partir del ácido (S)-(+)- α -metilbutanoico, el cual es un reactivo comercial. La comparación de los datos espectroscópicos del éster sintético con los del producto natural conduciría a determinar la estereoquímica completa. Para ello, se planteó la ruta de síntesis mostrada en el Esquema 1.



Esquema 1. Ruta de síntesis propuesta para la obtención de los productos naturales 48 y 63

La hidrólisis de una alícuota del extracto hexánico de las raíces de *S. pilosa*, permitió obtener un aceite amarillo transparente. El producto se separó a través de una cromatografía rápida, empleando una mezcla hexano:AcOEt (1:1) como eluyente y colectando 100 eluatos de 20 mL. De los eluatos 22 a 31 se obtuvo un aceite transparente cuyo espectro de RMN de ^1H (Figura 37) mostró señales similares con respecto a 58, características de un sistema de longipineno, encontrándose ahora la señal doble de dobles de H-7 a frecuencias bajas (3.56 ppm) por tratarse ahora de un protón base de OH. Este compuesto se caracterizó mediante sus datos de RMN de ^1H , ^{13}C , HMQC y HMBC como (4R,5S,7R,10R,11R)-7-hidroxilongipin-2-en-1-ona (65).



65

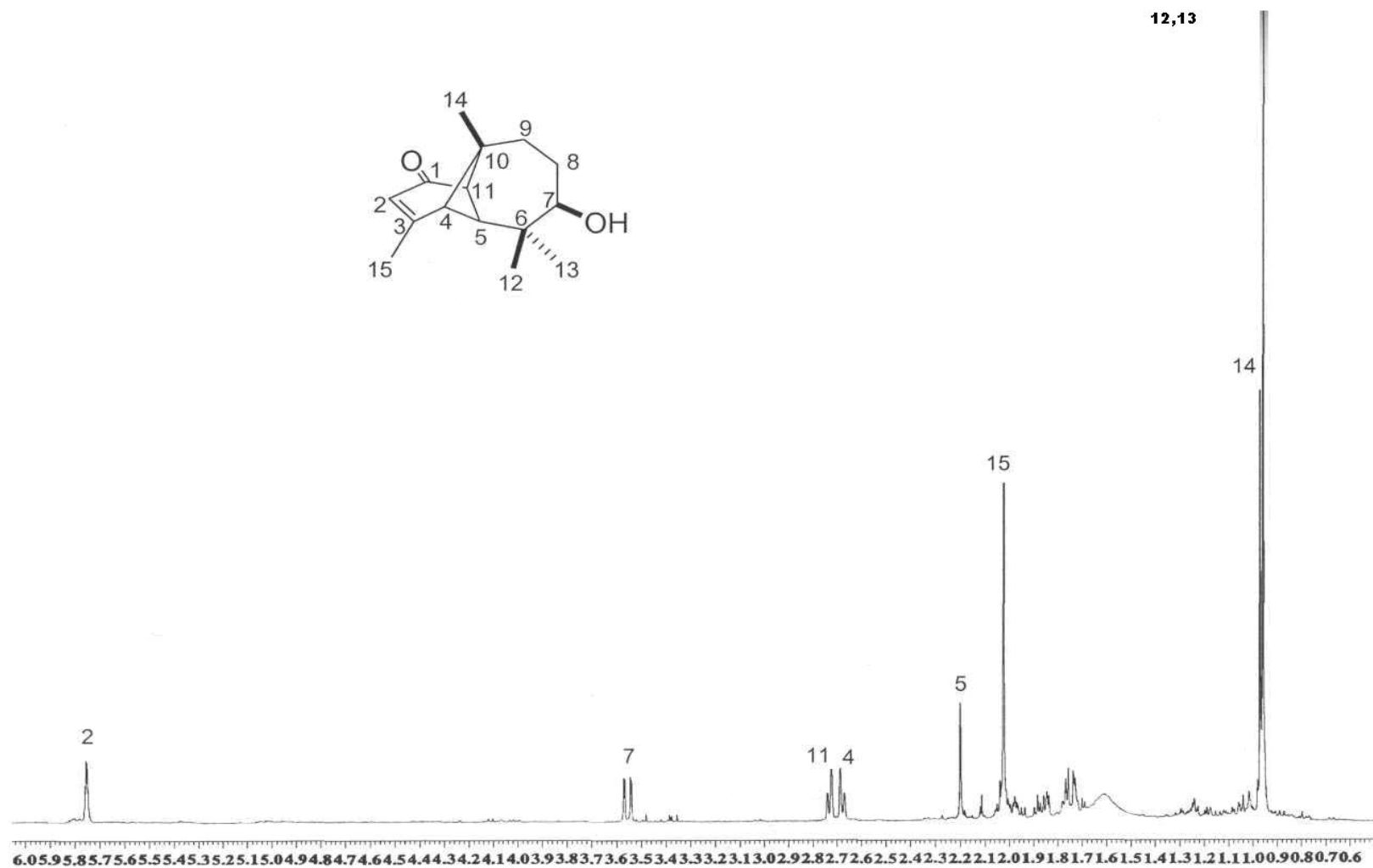
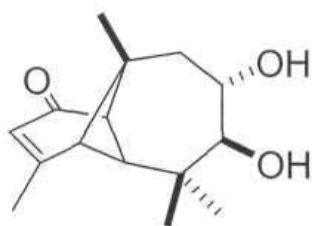
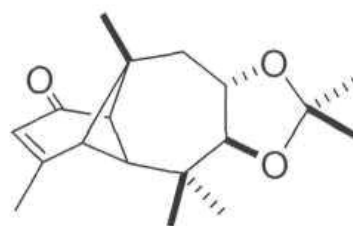


Figura 37. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz del (4*R*,5*S*,7*R*,10*R*,11*R*)-7-hidroxilongipin-2-en-1-ona (65) en CDCl₃.

En los eluatos 48 a 67 se encontró el compuesto 66 pero no totalmente puro, por lo que fue necesario recromatografiarlo, empleando una mezcla de hexano:AcOEt 2:1 como eluyente inicial y aumentando gradualmente la polaridad. De los eluatos 6-7 se obtuvo un compuesto, cuyo espectro de RMN de ^1H (Figura 38) mostró las señales características de un sistema de longipineno. Además, en el espectro se puede observar claramente la multiplicidad de los protones 9a y 9p, el protón 9a se aprecia como una señal doble de dobles en 1.73 ppm ($J_{9\alpha-9\beta} = 14.3$ Hz; $J_{9\alpha-8\beta} = 11.0$ Hz) y 9(3 se encuentra en 2.26 ppm como una señal doble de dobles ($J_{9\alpha-9\beta} = -14.3$ Hz; $J_{9\alpha-8\beta} = 4.4$ Hz). En el espectro también se observaron dos señales que integraron para seis protones, las cuales corresponden a dos metilos (1.4 y 1.4 ppm), analizando las condiciones en las que se llevó a cabo la reacción, se concluyó que el compuesto aislado correspondía al acetónido del diol (67). Su formación se explica debido a la presencia de acetona al momento de disolver la muestra y el paso de ésta junto con el compuesto a través de la columna, la cual se encontraba empacada con gel de sílice y hay que recordar que este soporte se comporta como un ácido de Lewis, por lo que pudo llevarse a cabo una reacción ácido base y esto propició la formación del acetónido (Figuras 38-40).



66



67

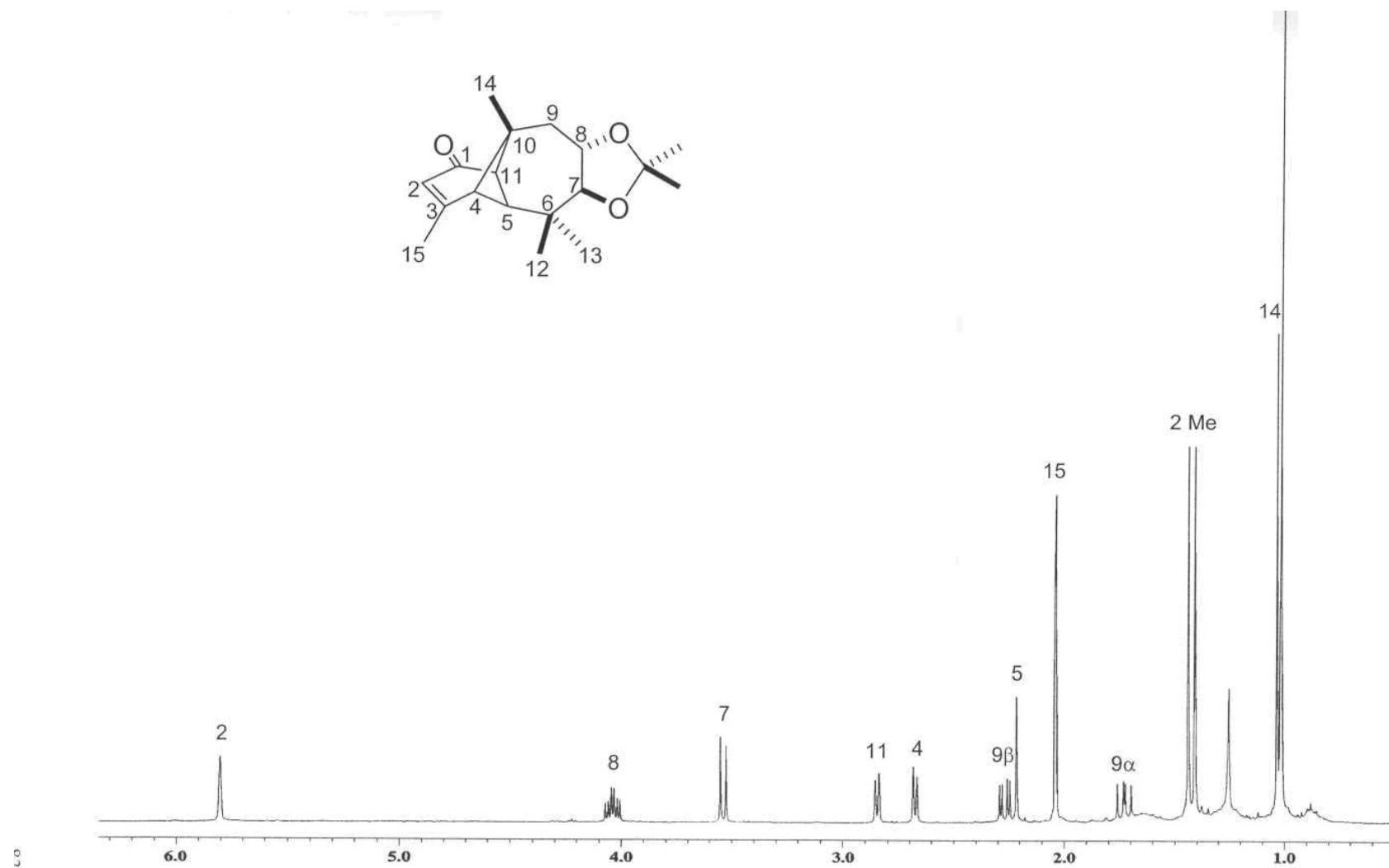


Figura 38. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del acetónido del diol (**67**) en CDCl_3 .

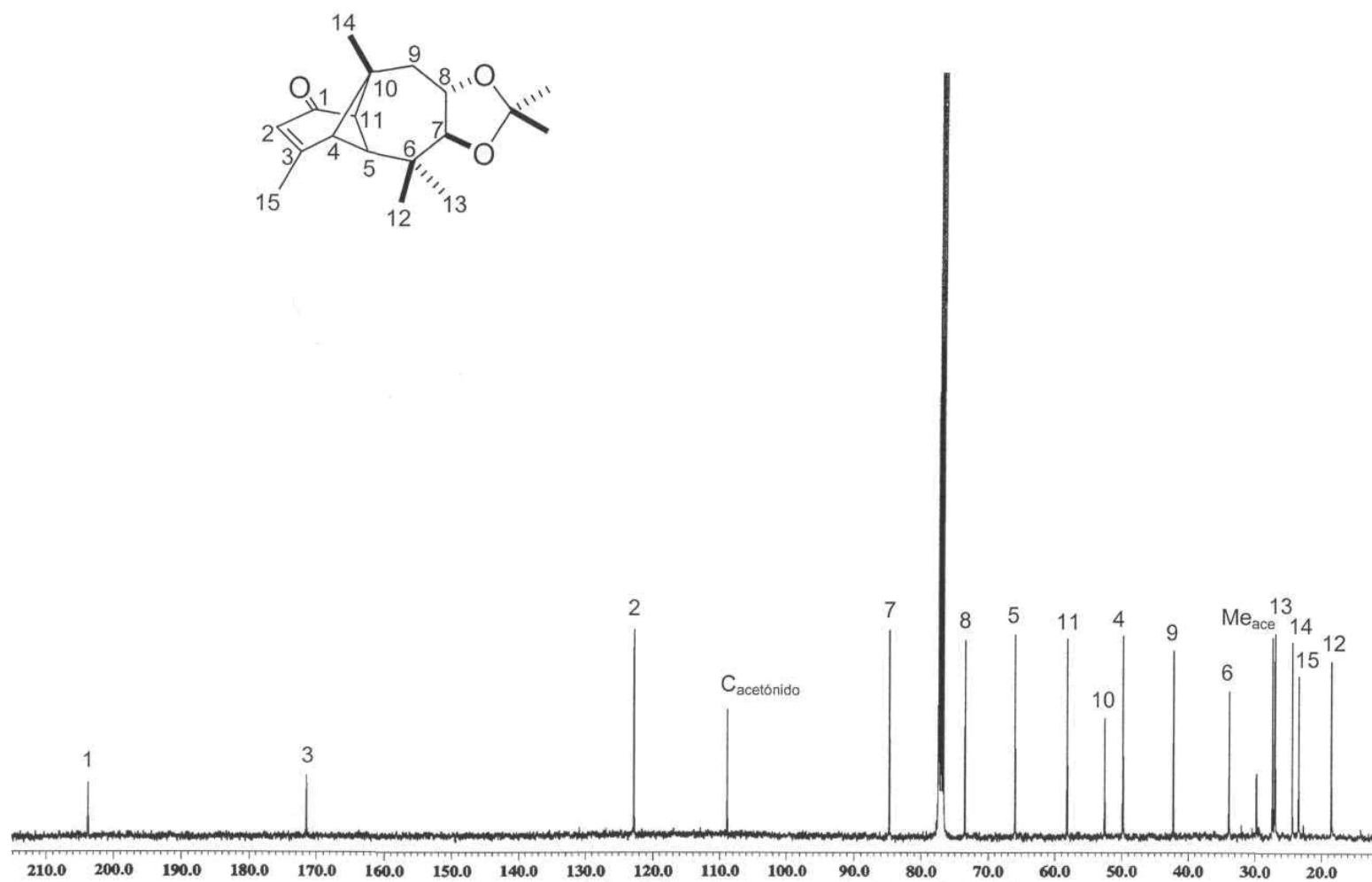


Figura 39. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del acetonido del diol (67) en CDCl_3 .

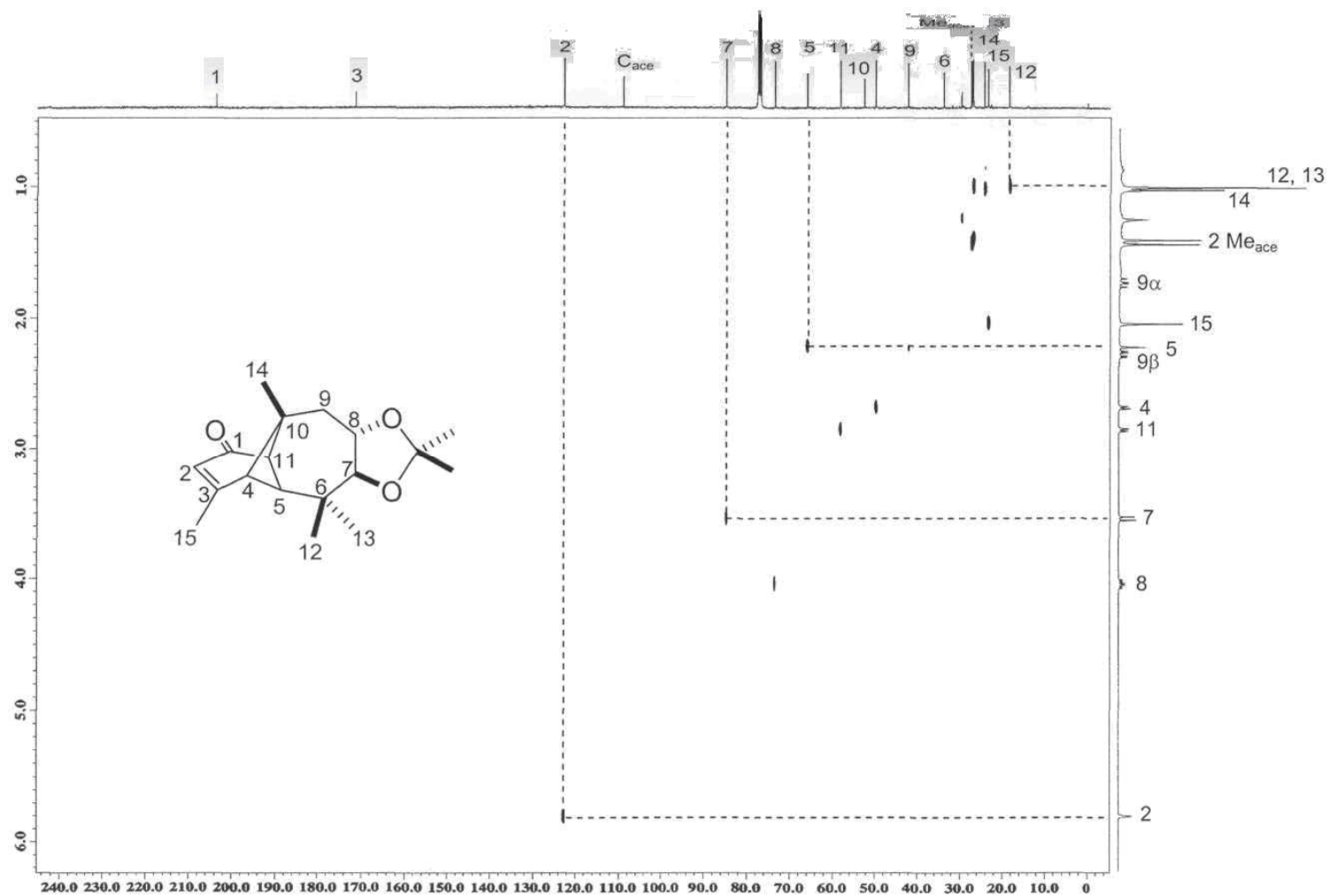
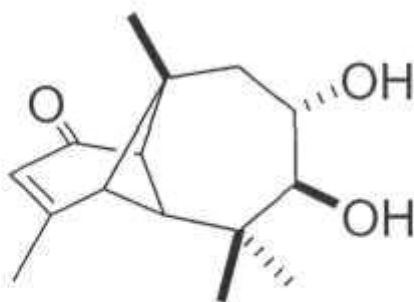


Figura 40. Espectro HETCOR (400 MHz) del acetonido del diol (67).

De las fracciones 42-56 (hexano:AcOEt, 1.5:1) se obtuvieron cristales de p.f. 156-159 °C, los cuales correspondieron al derivado dihidroxilado 66, en cuyo espectro de RMN de ^1H (Figura 41) se observaron las señales características de un compuesto derivado del longipineno, en donde las señales doble en 3.33 ppm ($J = 10.3$ Hz) y triple de dobles en 3.85 ppm ($J = 10.3, 4.8$ Hz) correspondientes a H-7 y H-8, respectivamente, se desplazaron a frecuencias más bajas con respecto a las observadas en los espectros de los compuestos 59 y 63 (Figuras 31 y 32), debido a que ahora son bases de grupos hidroxilo (Figuras 41-42). En el espectro de ^{13}C las diferencias significativas con respecto a los espectros de RMN de 59 y 63 se presentan en C7 y C8, las cuales se encuentran en 78.65 y 68.38 ppm respectivamente.



66

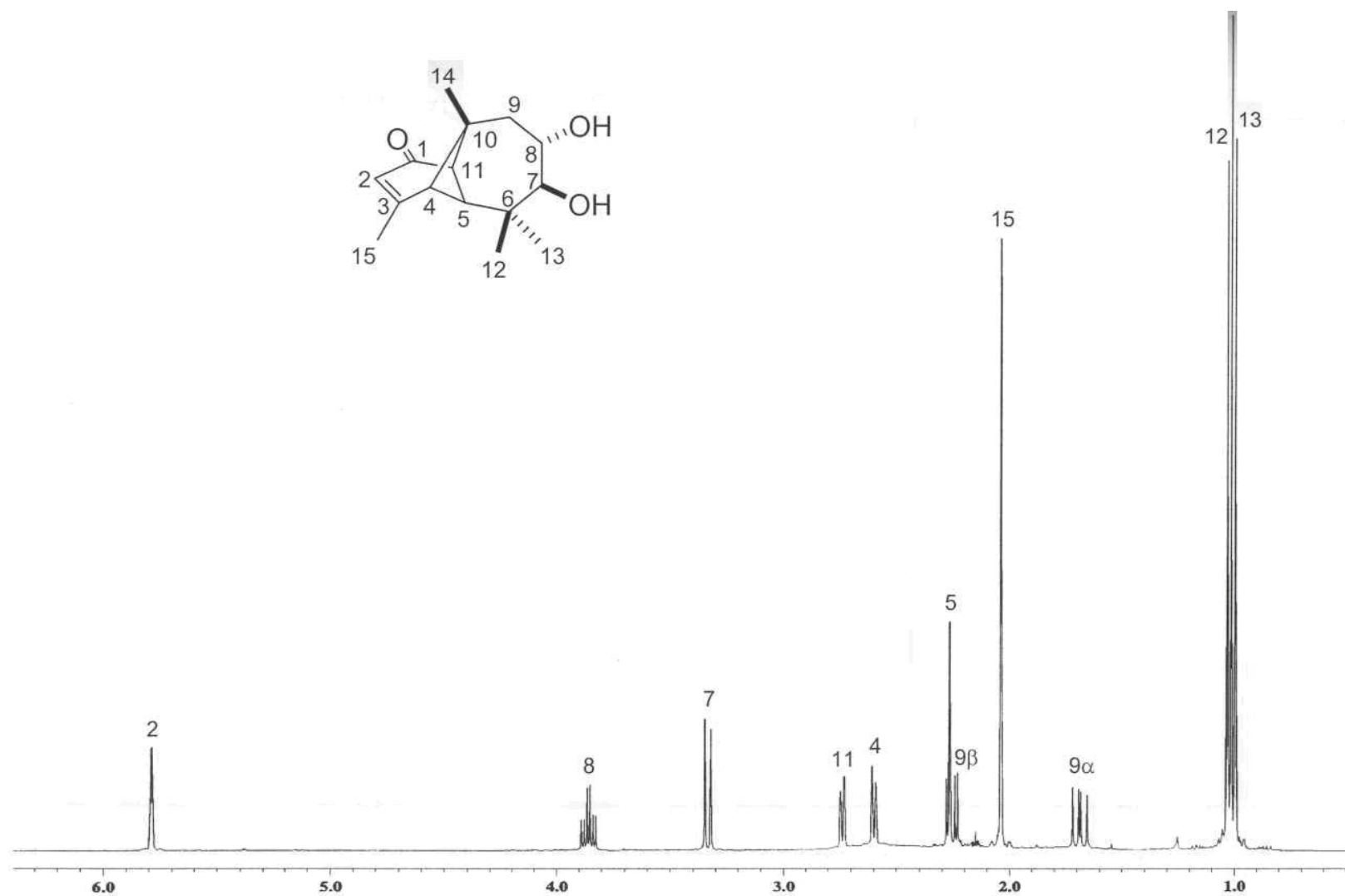


Figura 41. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz del (4R,5S,7S,8S,10R,11R)-7,8-dihidroxislongipin-2-en-1-ona (66) en CDCl₃.

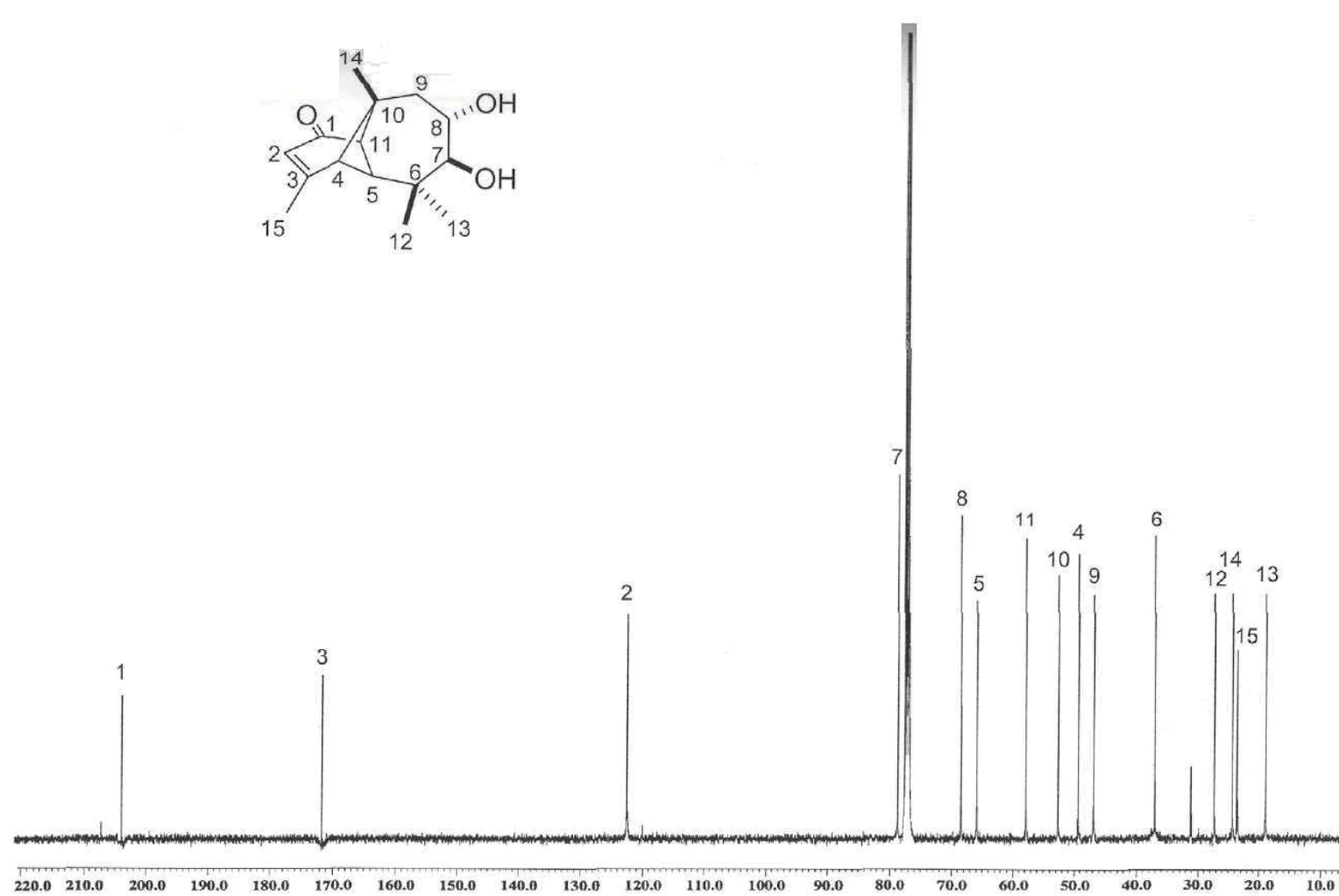
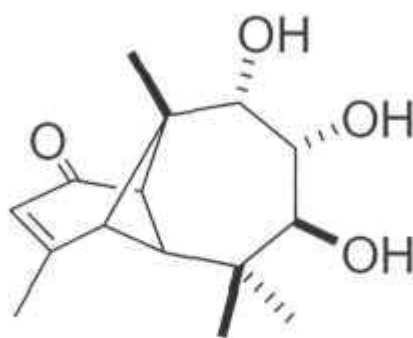


Figura 42. Espectro de RMN de ¹³C a 100 MHz del (4R,5S,7S,8S,10R,11R)-7,8-dihidroxislongipin-2-en-1-ona (**66**) en CDCl₃.

De las fracciones 84 a 100 se obtuvo el derivado trihidroxilado 68 como un sólido cristalino de p.f. 164-166 °C, ya que en su espectro de RMN de ^1H (Figura 43) no se observan diferencias significativas en cuando al desplazamiento o multiplicidad de los protones del sistema del longipineno, la único que hay que destacar es la presencia de tres señales correspondientes a los protones H-7, H-8 y H-9 bases de grupo OH (*d*, *dd*, *d* en 3.69, 3.81 y 3.93 ppm, respectivamente).



68

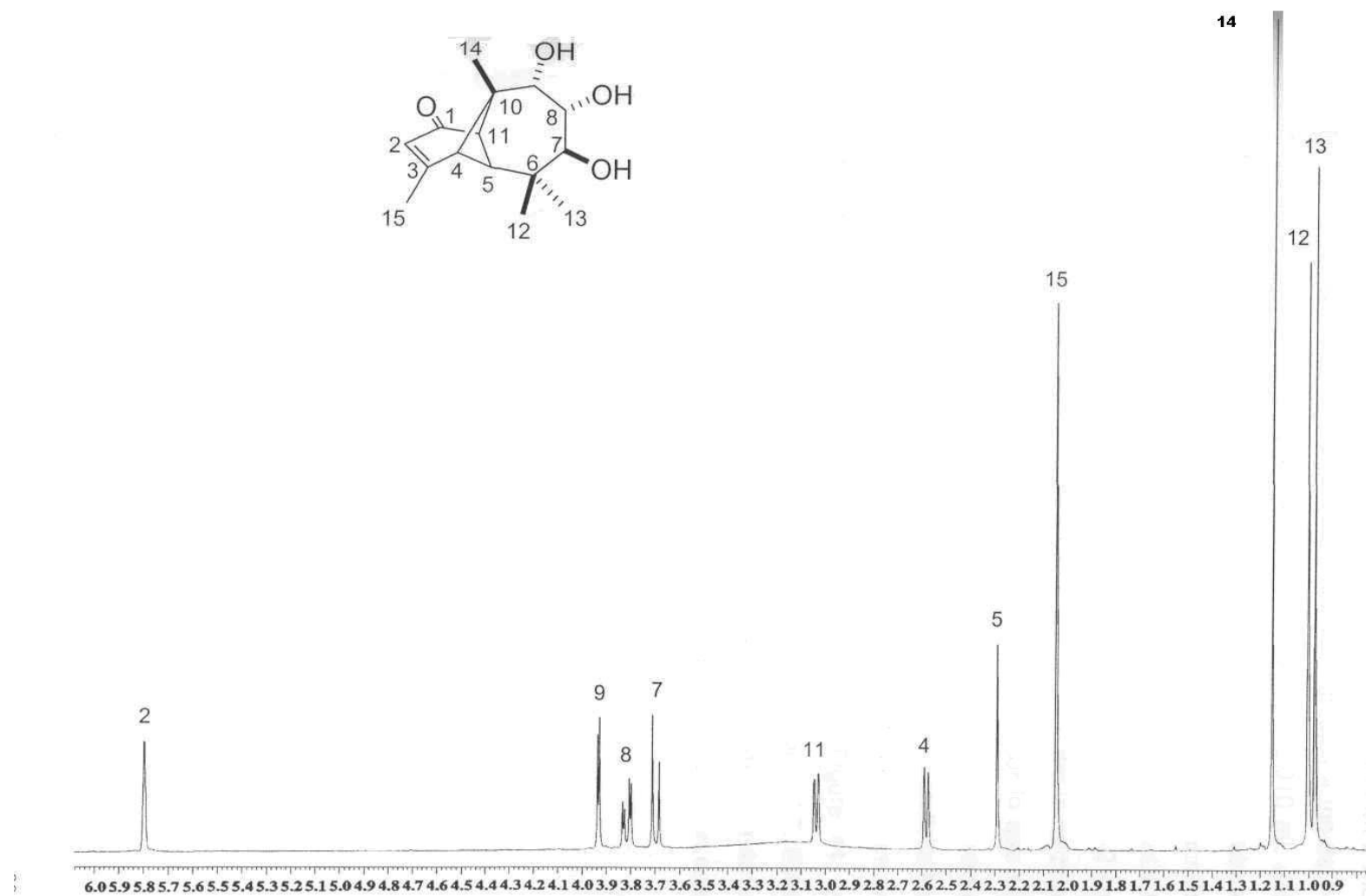
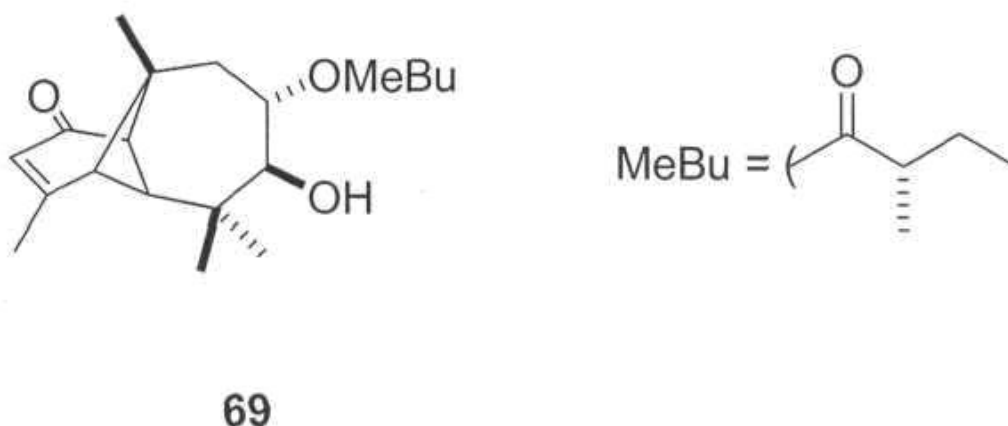


Figura 43. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz del (4R,5S,7S,8R,9S,10R,11R)-7,8-trihidroxi-laipin-2-en-1-ona (68) en CDCl₃.

La reacción de esterificación de diol 66 con el ácido quiral (S)-(+)- α -metilbutanoico se llevó a cabo de la siguiente manera: 25 mg del diol 66 se disolvieron en 2 mL de CH_2Cl_2 , después se agregaron 51 mg de dicitohexilcarbodiimida y 4 mg de 4-N, N-dimetilaminopiridina. Posteriormente, se agregó a la solución 0.010 mL del ácido (S)-(+)- α -metilbutanoico. La reacción se dejó reposar a temperatura ambiente y después de 4 h se filtró y se concentró, obteniendo así un aceite transparente, el cual se cromatografió empleando una mezcla de hexano:AcOEt 3:1) y colectando eluatos de 20 mL. En la fracción conteniendo los eluatos 1-2 se obtuvo el ácido (S)-(+)- α -metilbutanoico y en los eluatos 3-8 se encontró la mezcla del derivado esterificado en C-8 y el derivado esterificado en C-7, por lo que se intentó recromatografiar estas fracciones para obtener únicamente el derivado esterificado en C-8. Esto no fue posible, por lo tanto, se variaron las condiciones de reacción. En este segundo intento, la reacción se detuvo cuando el 50% de la materia prima se convirtió al éster α -metilbutírico en C-8 (69) (Figura 44) y comenzaban a formarse pequeñas cantidades del éster en la posición C-7. Este proceso se observó mediante CCF. De esta forma se obtuvo solamente un 48% de rendimiento del monoéster en C-8 (69), pero la selectividad de la reacción con respecto a la formación del monoéster en C-7 fue de 98%.



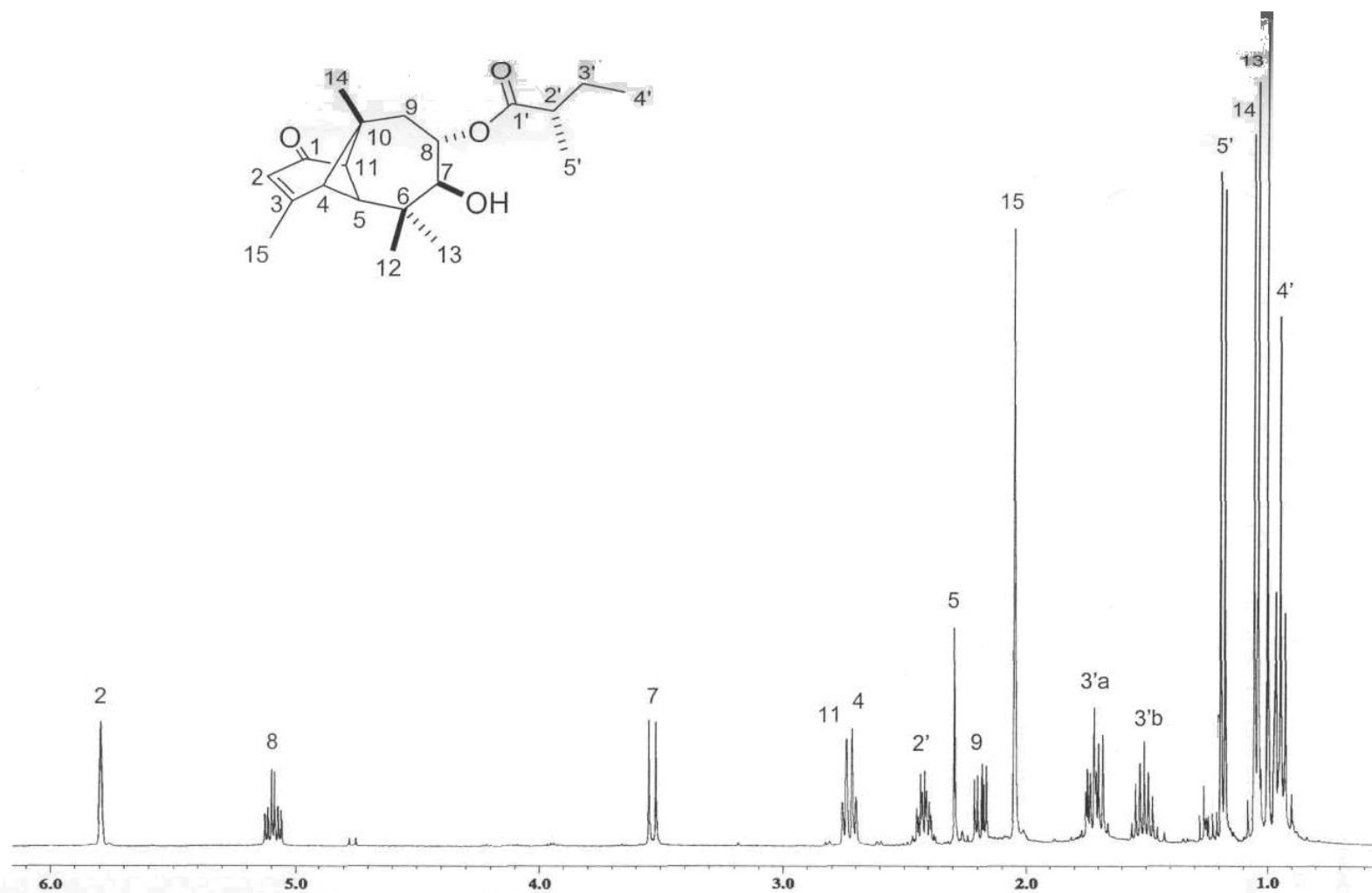
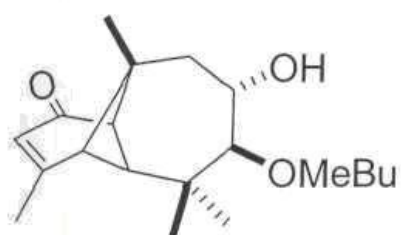
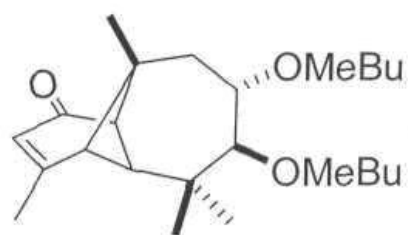


Figura 44. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz del (4*R*,5*S*,7*S*,8*S*,10*R*,11*R*,2''*S*)-7-hidroxi-8-(α -metilbutiroiloxi)-longipin-2-en-1-ona (**69**) en CDCl₃.

Como otros subproductos de la reacción del primer intento de esterificación, se obtuvieron el (4R,5S,7S,8S,10R,11R 2"S)-8-hidroxi-7-(α -metilbutiroiloxi)-longipin-jn-2-en-1-ona (71) y (4R,5S,7S,8S,10R,11R 2"S)-7,8-di(α -metilbutiroiloxi)-longipin-2-en-1-ona (72) (Figura 45), deducido mediante sus datos de RMN de ^1H , por comparación con los espectros del compuesto 66 (Figura 41) y datos descritos.³⁹



71



72

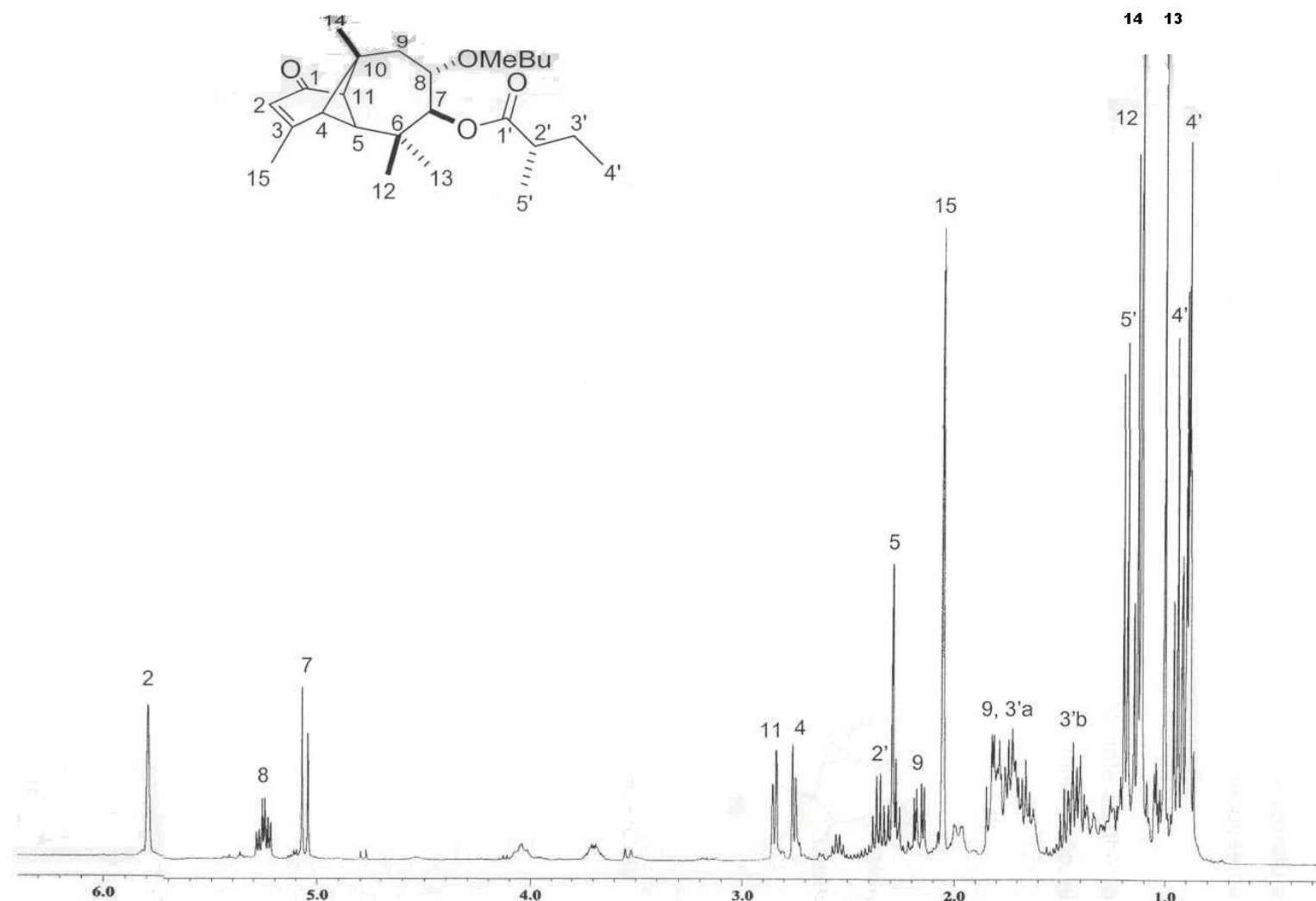
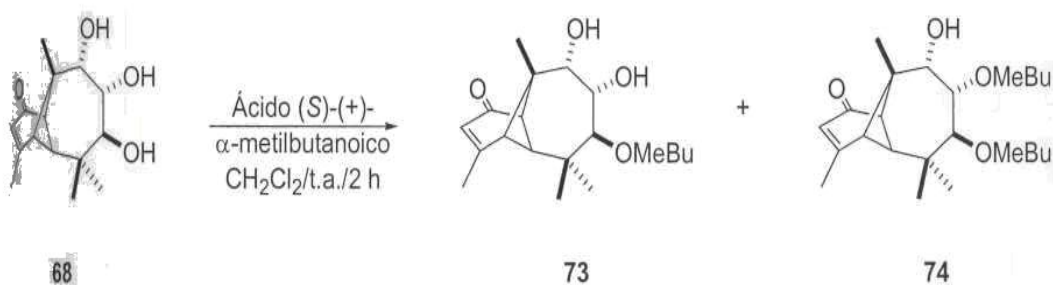


Figura 45. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del (4*R*,5*S*,7*S*,8*S*,10*R*,11*R*, 2''*S*)-7,8-di(α -metilbutiroiloxi)-longipin-2-en-1-ona (72).

Las condiciones de esterificación para el caso del triol **68** fueron diferentes debido a la presencia de un tercer grupo OH en la posición 9. Para esta reacción se probaron dos lotes de 20 mg del triol. Uno de los lotes se dejó a temperatura ambiente durante 2 h y el otro lote se mantuvo a 4 °C durante 72 h. Después de transcurrido el tiempo de reacción, cada lote se purificó por cromatografía.

Como producto mayoritario del lote que se dejó a temperatura ambiente se obtuvo el monoéster en la posición 7 (**73**) (Figuras 46-48) y como producto minoritario, el diéster en las posiciones 7 y 8 (**74**) (Esquema 2).



Esquema 2. Tratamiento de **68** con el ácido (S)-(+)- α -metilbutanoico a temperatura ambiente.

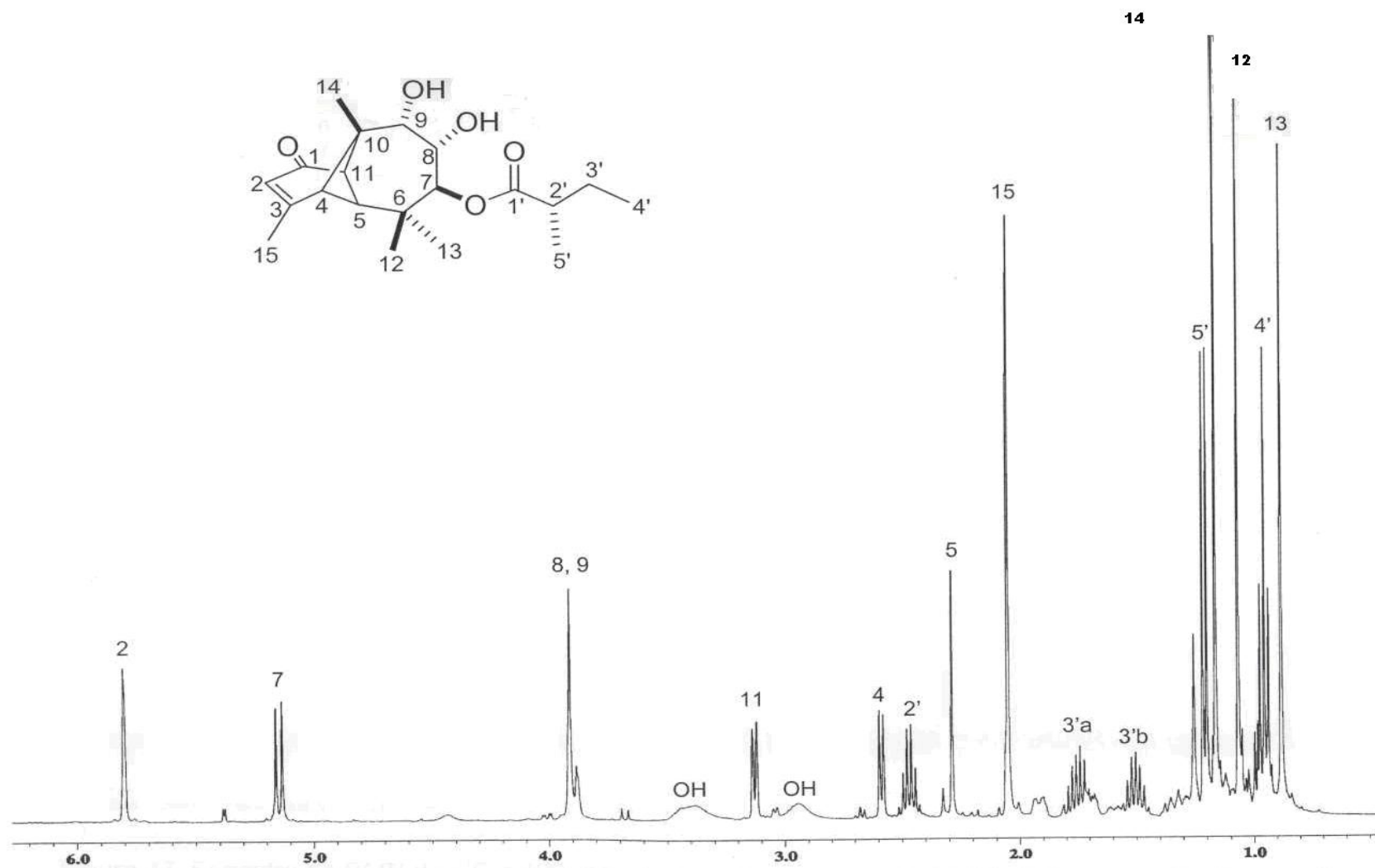


Figura 46. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz del (4*R*,5*S*,7*S*,8*S*,9*S*,10*R*,11*R*, 2''*S*)-7-(α -metilbutiroiloxi)-8,9-dihidroilongipin-2-en-1-ona (73) en CDCl₃.

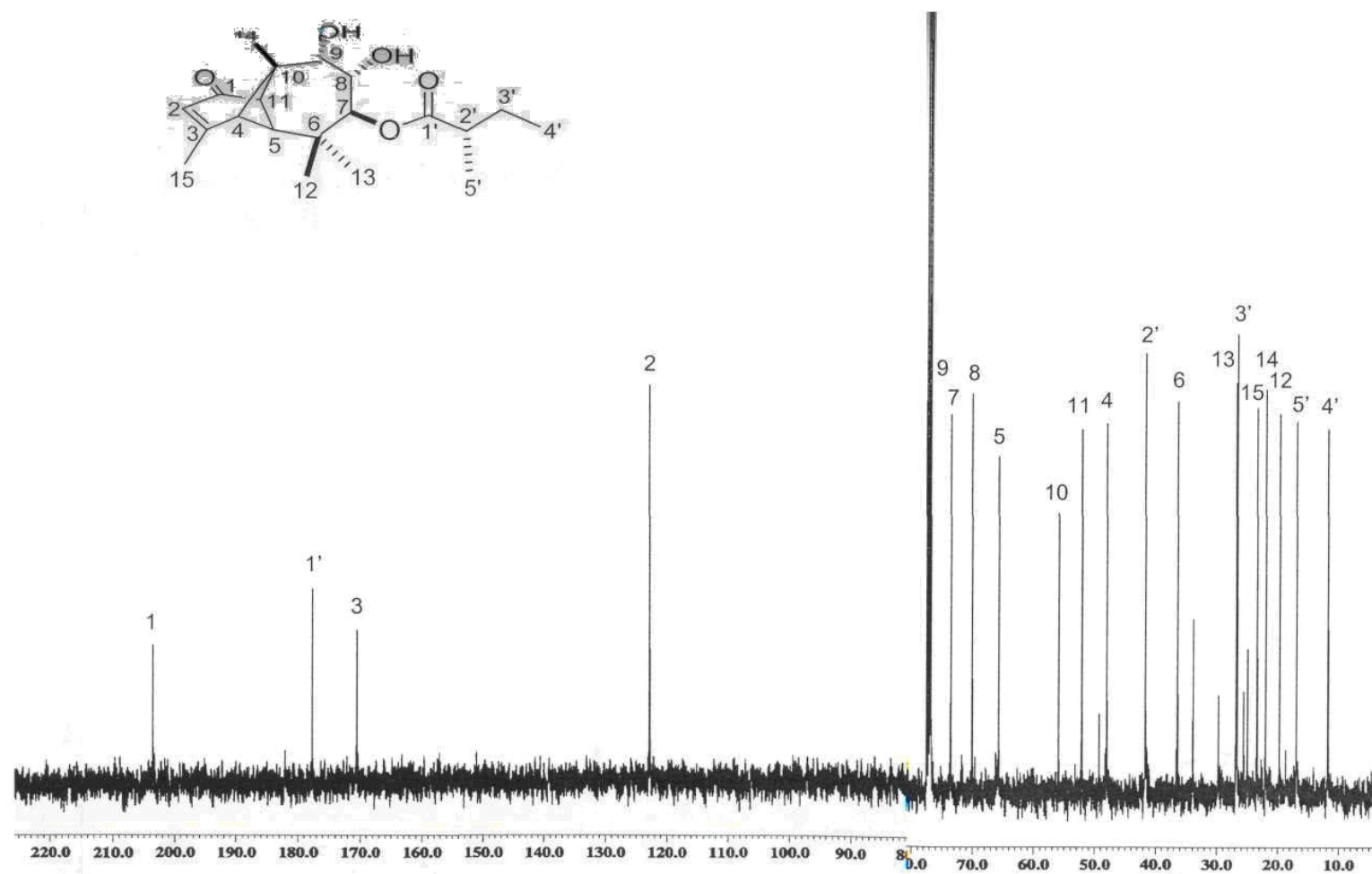


Figura 47. Espectro de RMN de ^{13}C a 400 MHz del $(4R,5S,7S,8S,9S,10R,11R,2''S)$ -7-(α -metilbutiroiloxi)-8,9-dihidroxi-longipin-2-en-1-ona (**73**) en CDCl_3 .

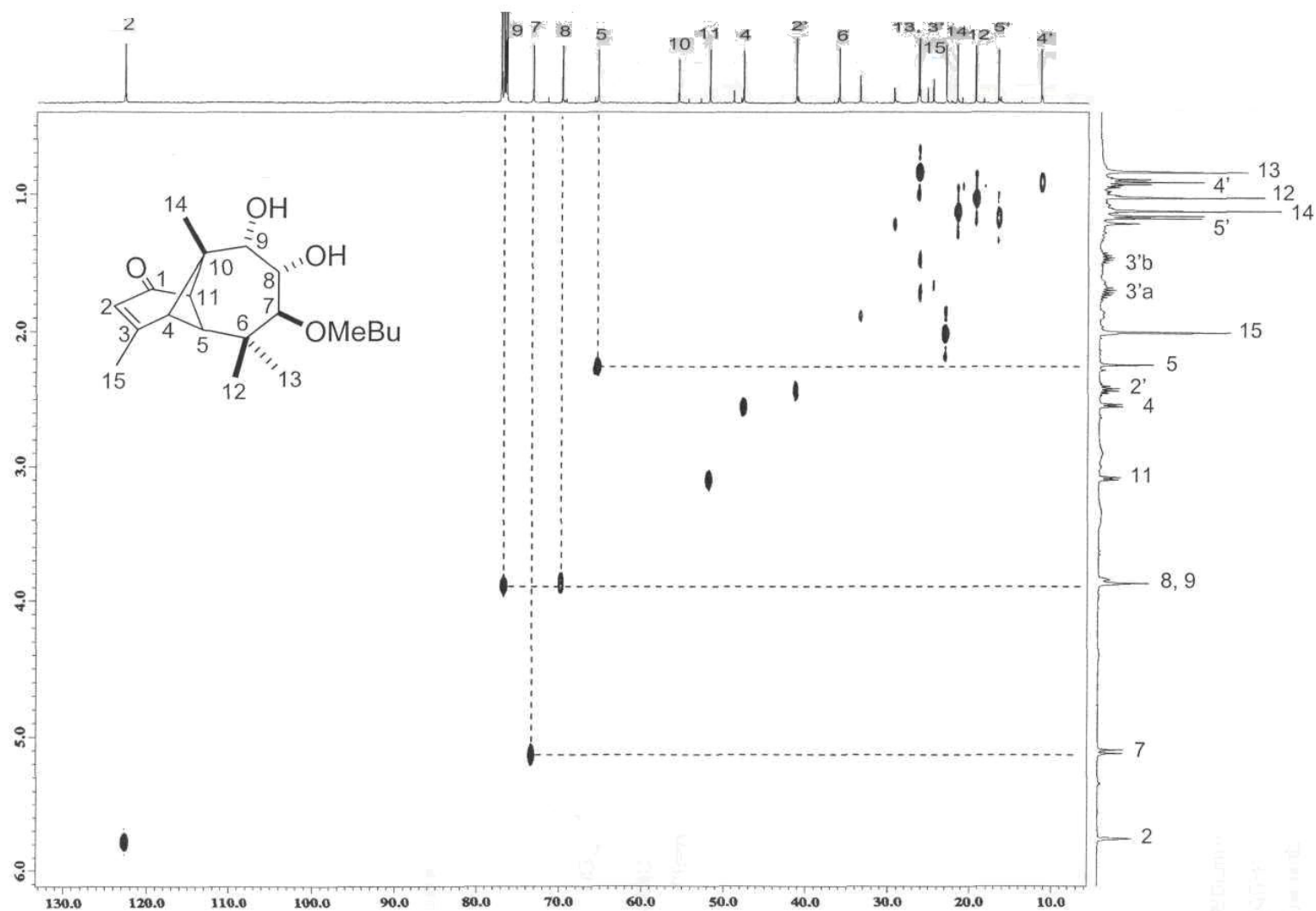
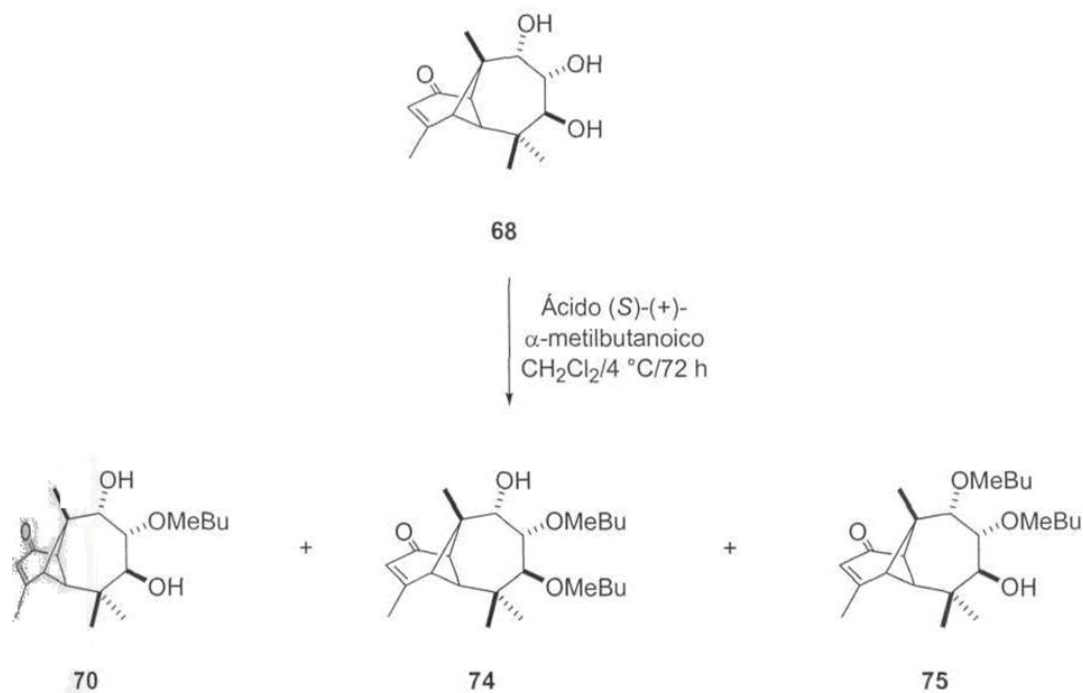


Figura 48. Espectro HMQC (400 MHz) del (4*R*,5*S*,7*S*,8*S*,9*S*,10*R*,11*R*, 2''*S*)-7-(α -metilbutiroiloxi)-8,9-dihidroxi-longipin-2-en-1-ona (**73**) en CDCl₃.

En el caso del lote que se trató en condiciones de baja temperatura, se obtuvo como producto mayoritario monoéster en la posición 8 (70) (Figura 49), que era el deseado, así como los diésteres 74 (Figuras 50-52) y 75 (Figuras 53-55), Esquema 3). La posición de los ésteres se determinó en base a la multiplicidad observada en el espectro de RMN de ^1H para los protones H7, H8 y H9.



Esquema 3. Tratamiento de **68** con el ácido (S)-(+)- α -metilbutanoico a baja temperatura.

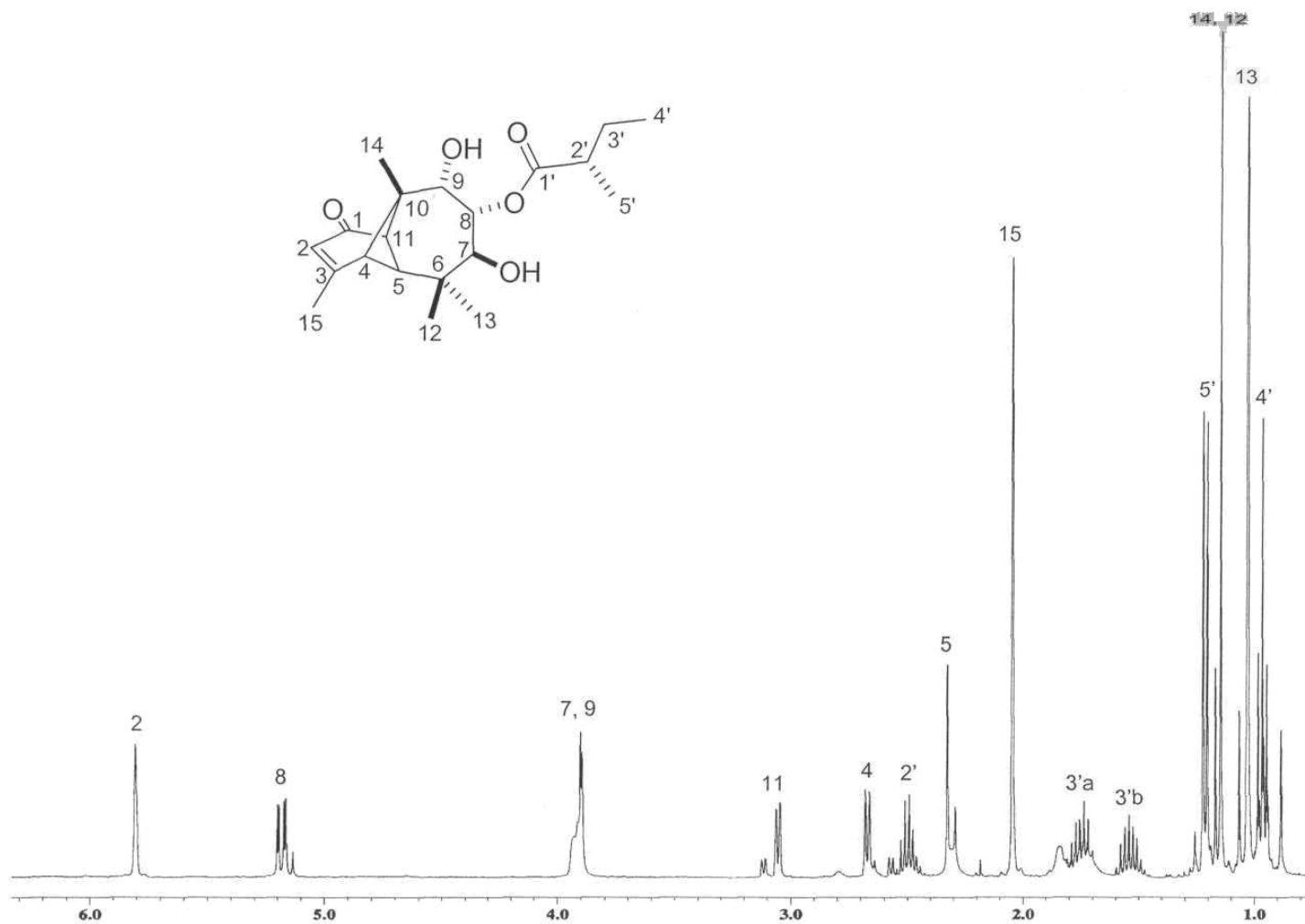


Figura 49. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz del (4*R*,5*S*,7*S*,8*R*,9*S*,10*R*,11*R*,2''*S*)-7,9-dihidroxi-8-(α -metilbutiroiloxi)-longipin-2-en-1-ona (**70**) en CDCl₃.

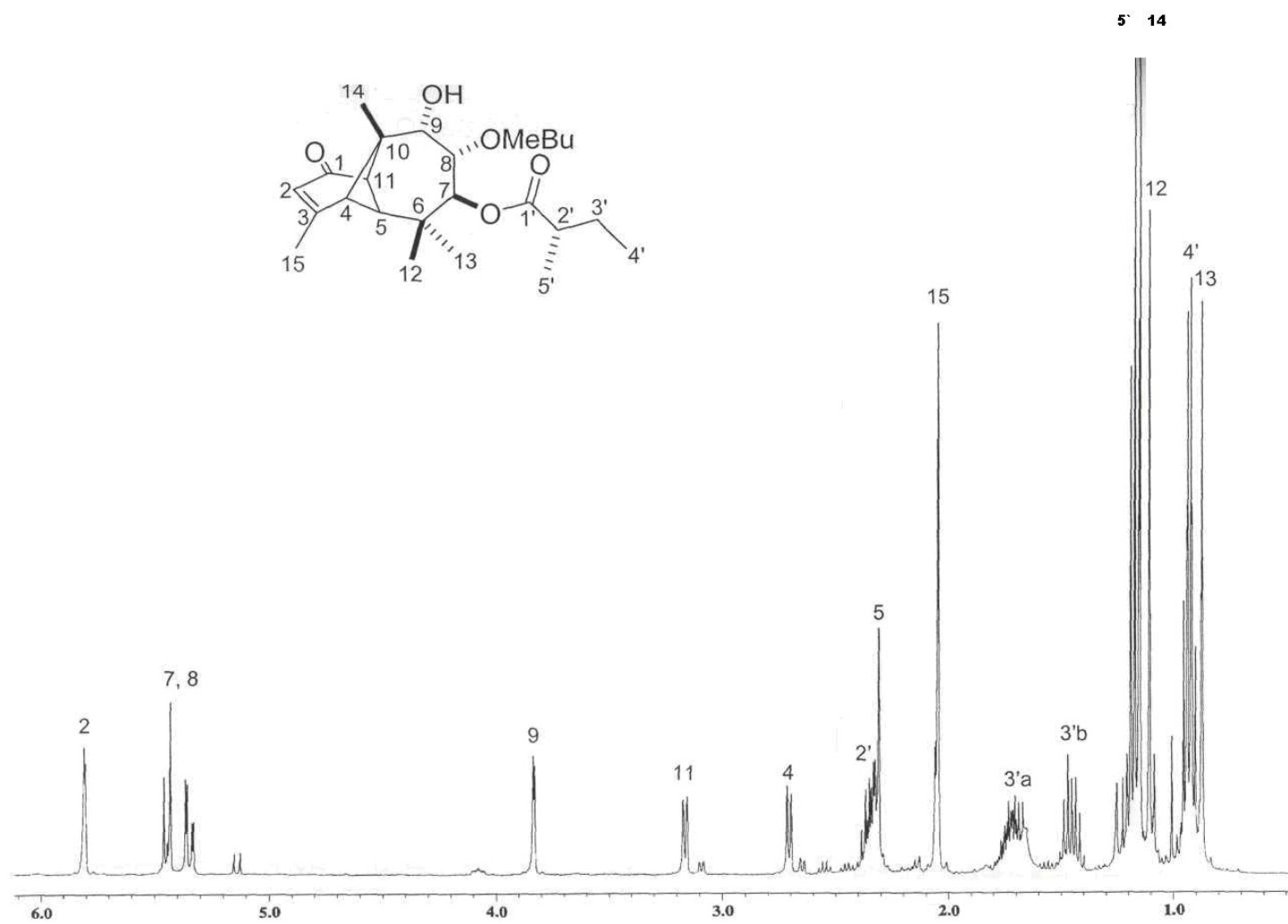


Figura 50. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz del (4*R*,5*S*,7*S*,8*S*,9*S*,10*R*,11*R*,2''*S*)-7,8-di-(α -metilbutiroiloxi)-9-hidroxi-longipin-2-en-1-ona (74) en CDCl₃.

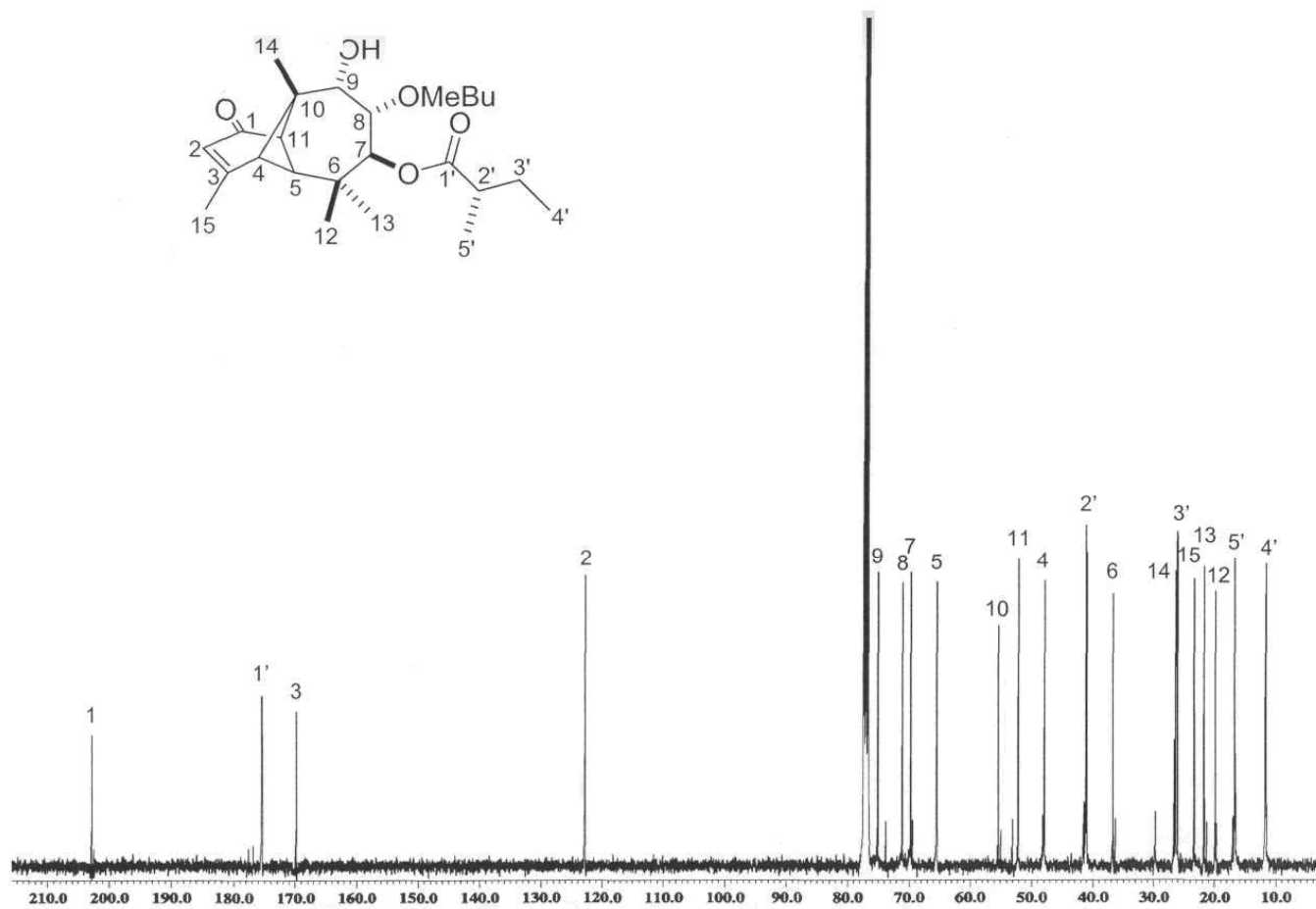
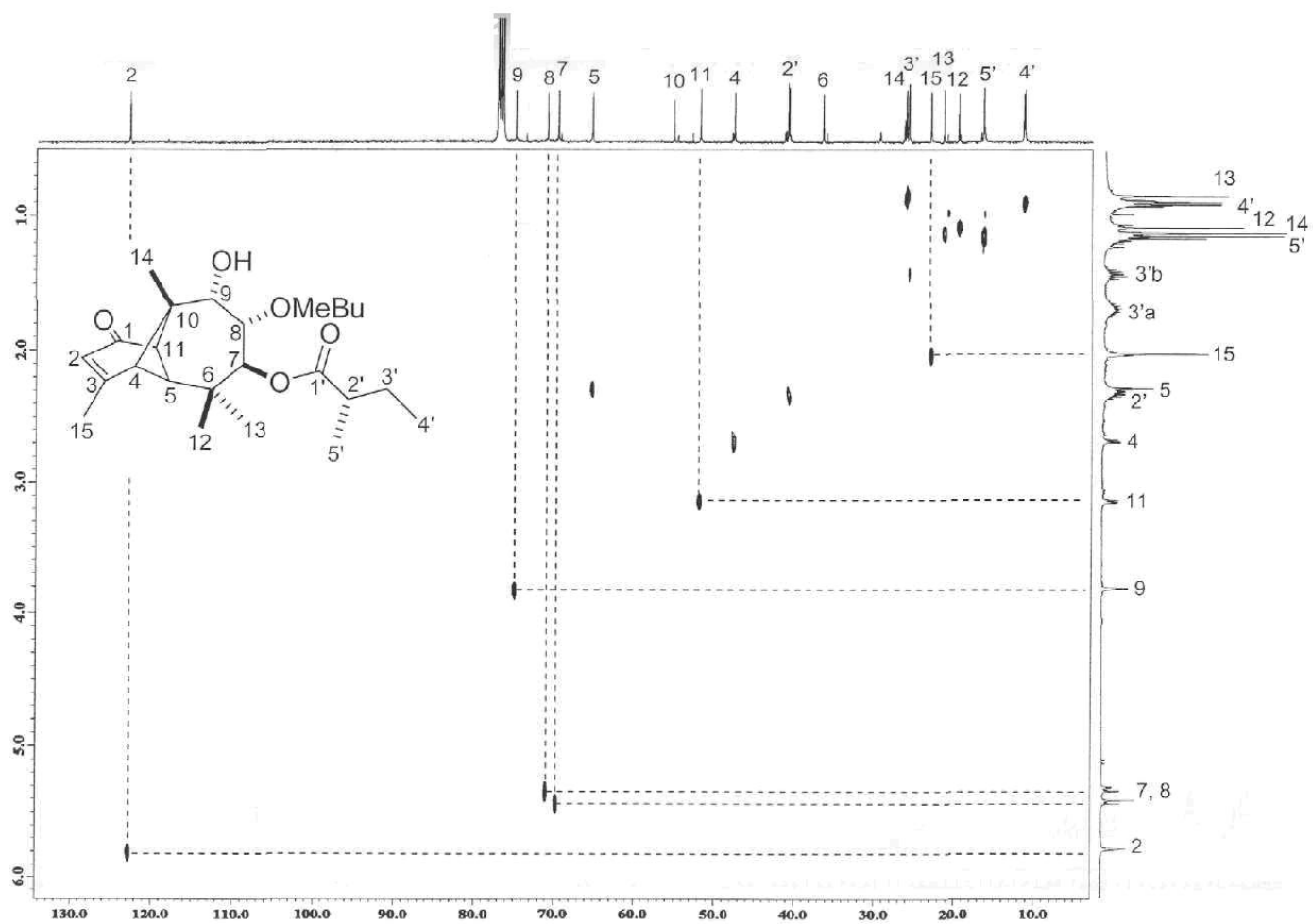


Figura 51. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del (4*R*,5*S*,7*S*,8*S*,9*S*,10*R*,11*R*,2''*S*)-7,8-di-(α -metilbutiroiloxi)-9-hidroxilongipin-2-en-1-ona (**74**) en CDCl_3 .



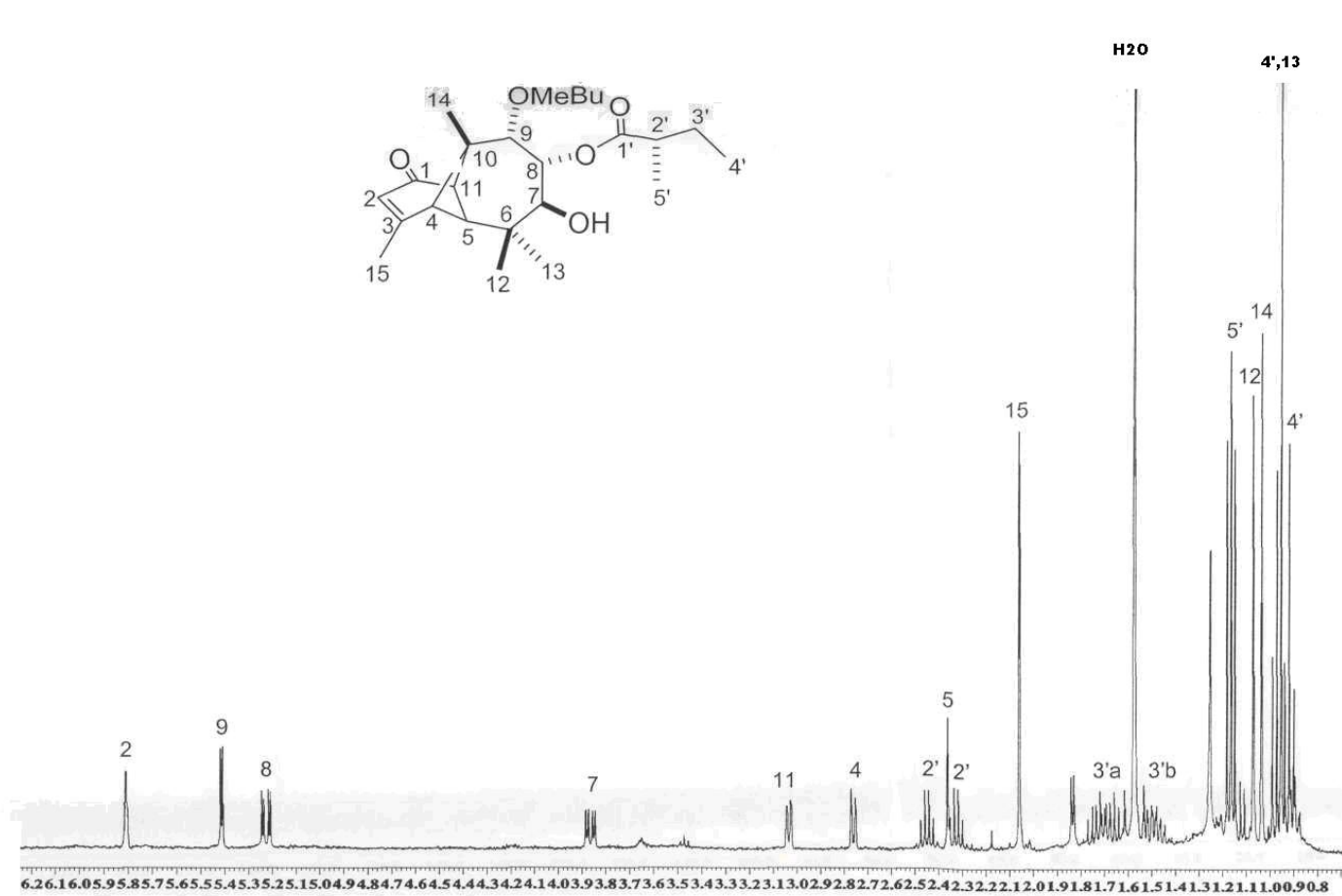


Figura 53. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del (4*R*,5*S*,7*S*,8*R*,9*S*,10*R*,11*R*,2''*S*)-7-hidroxi-8,9-di-(α -metilbutiroiloxi)-longipin-2-en-1-ona (**75**) en CDCl_3 .

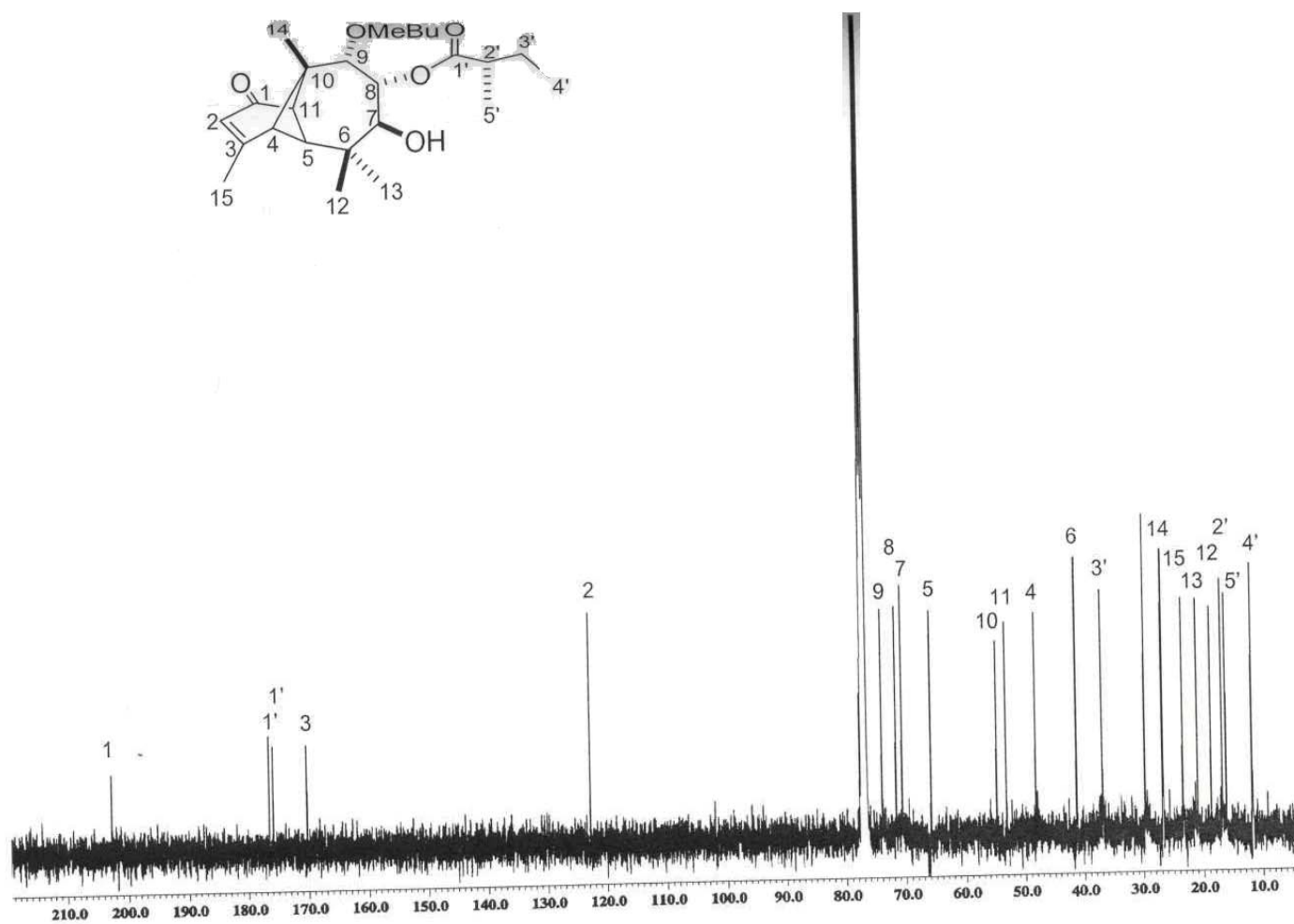


Figura 54. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del (4*R*,5*S*,7*S*,8*R*,9*S*,10*R*,11*R*,2''*S*)-7-hidroxi-8,9-di-(α -metilbutiroiloxi)-longipin-2-en-1-ona (75) en CDCl_3 .

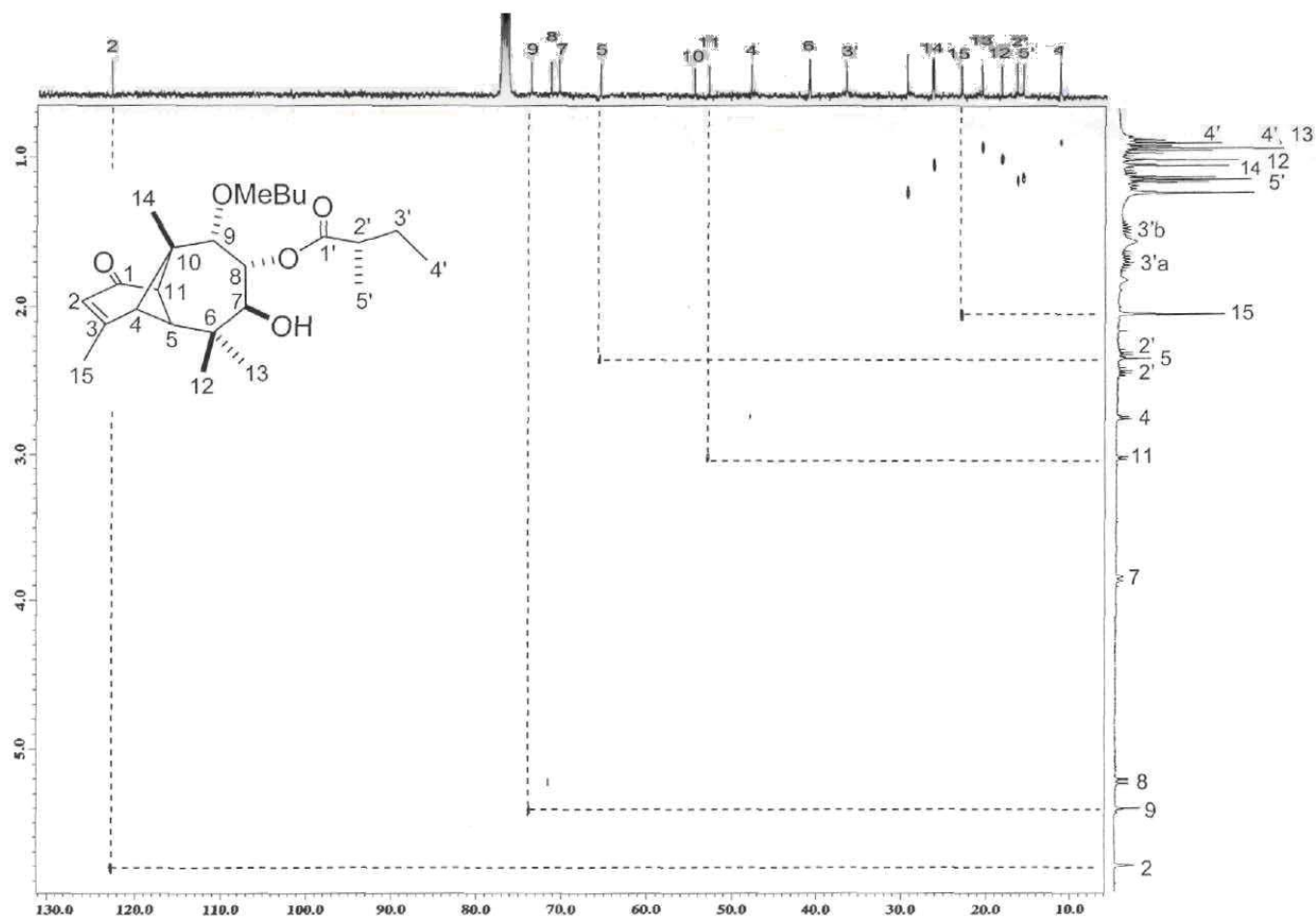
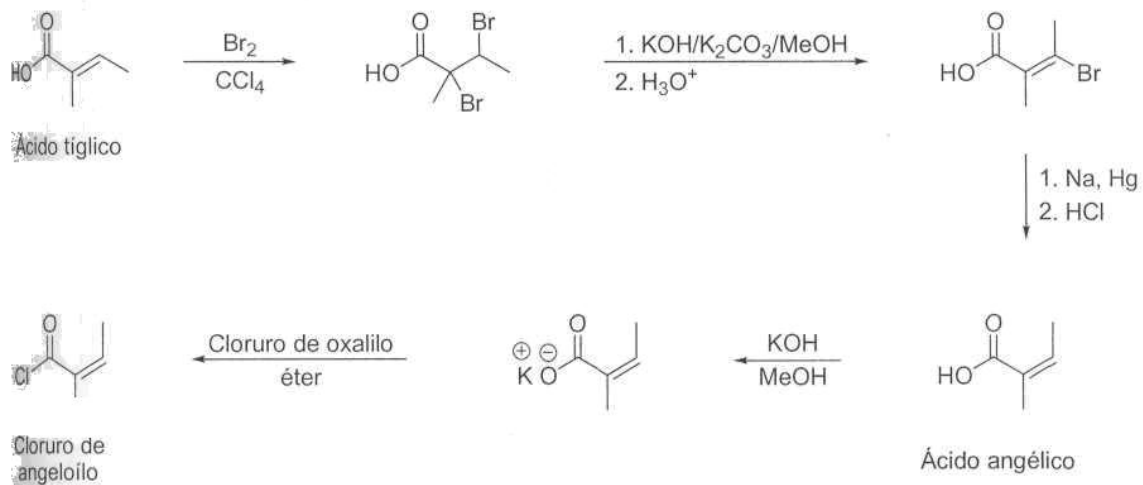


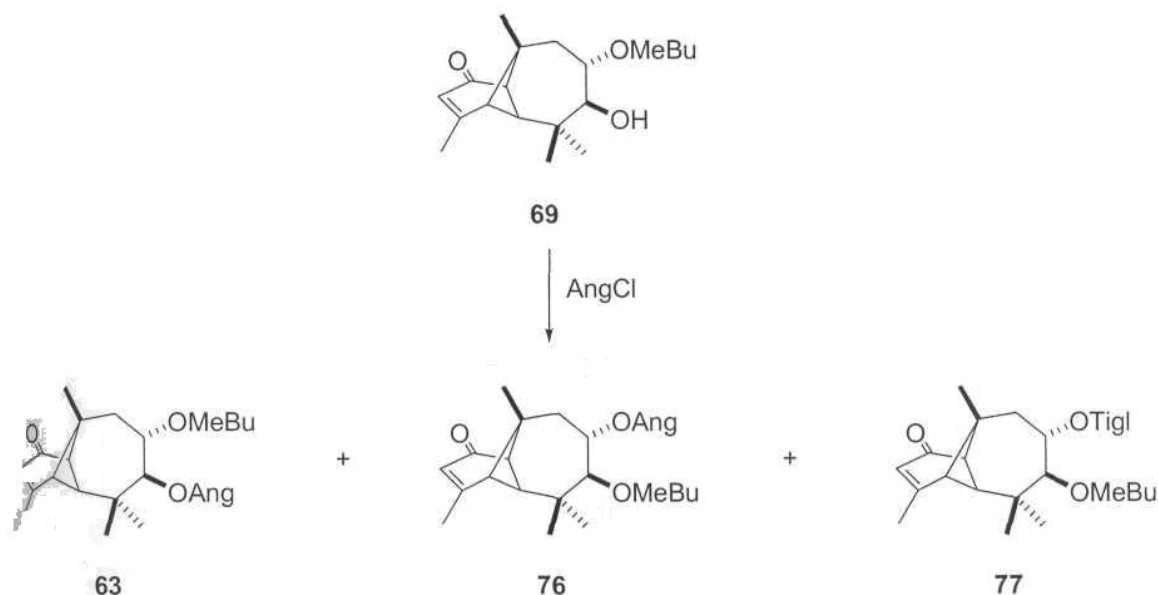
Figura 55. Espectro HETCOR (400 MHz) del (4*R*,5*S*,7*S*,8*R*,9*S*,10*R*,11*R*,2''*S*)-7-hidroxi-8,9-di-(α -metilbutiroiloxi)-longipin-2-en-1-ona (75).

Para llevar a cabo la esterificación con el cloruro de angelóilo y obtener así los productos naturales, dicho cloruro se preparó a partir del ácido tíglico como se muestra en el Esquema 4, de acuerdo a una ruta de síntesis descrita.⁴³



Esquema 4. Ruta de síntesis para la obtención del cloruro de angelóilo.

La esterificación de 69 con el cloruro de angelolo se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 48 h (Esquema 5). El producto se cromatografió para obtener 56 mg de la mezcla de los compuestos 63, 76 y 77, en una relación aproximada de 1:4:1 respectivamente, determinada mediante RMN de ^1H , la cual no fue posible separar por cromatografía.



Esquema 5. Tratamiento de 69 con cloruro de angelolo.

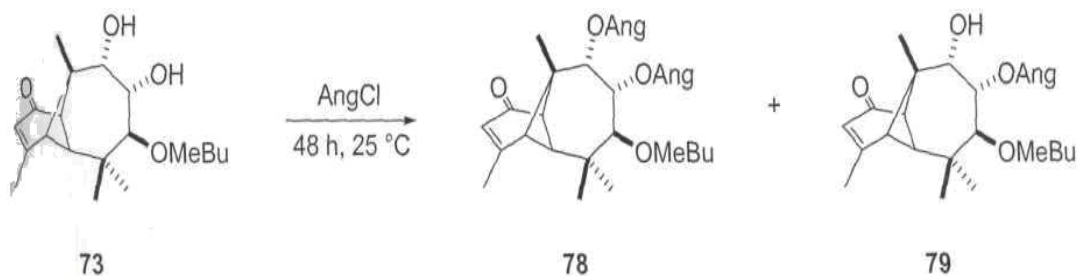
La formación de 76 se puede explicar tomando en consideración los antecedentes de los procesos de transesterificación intramolecular que se llevan a cabo en sistemas del longipineno con grupos hidroxilo libres.⁴⁴ Es conocido que en presencia de medio ácido o disolventes como el MeOH o el H₂O ocurre la protonación o polarización del carbonilo del éster que permite el ataque del OH en la posición vecina, formando un intermediario similar a un acetónido. Cuando el oxígeno regresa un par de electrones para recuperar el carbonilo, el éster cambia a una posición vecina. En este caso, el medio ácido se debe a la presencia de HCl formado como producto de la reacción. Por otro lado, la formación de 77 pudiera explicarse considerando la transesterificación del MeBu a la posición 7, la esterificación del cloruro de angelolo en la posición 8 y la isomerización del angelato al tigolato debido al medio ácido generado en la reacción.

En el caso de la esterificación del compuesto **67** a temperatura ambiente por 16 h, esta sustancia no dio como producto de reacción el compuesto deseado **48**, sino que se obtuvo el éster **73** mediante una transesterificación, es decir el residuo MeBu en C8 migró a C7 (Esquema 6).



Esquema 6. Tratamiento de **70** con cloruro de angelóilo.

Finalmente, con el objetivo de preparar ésteres derivados del longipineno conteniendo residuos angélicos en C8 y C9, y *a*-metilbutíricos en C7, y que sus datos físicos y espectroscópicos pudieran ayudar a determinar la estructura de posibles productos naturales, el éster **73** se trató con el cloruro de angelóilo para obtener los ésteres **78** y **79**, los cuales se caracterizaron completamente mediante sus datos espectroscópicos (Figuras 56-57) (Esquema 7).



Esquema 7. Tratamiento de **73** con cloruro de angelóilo.

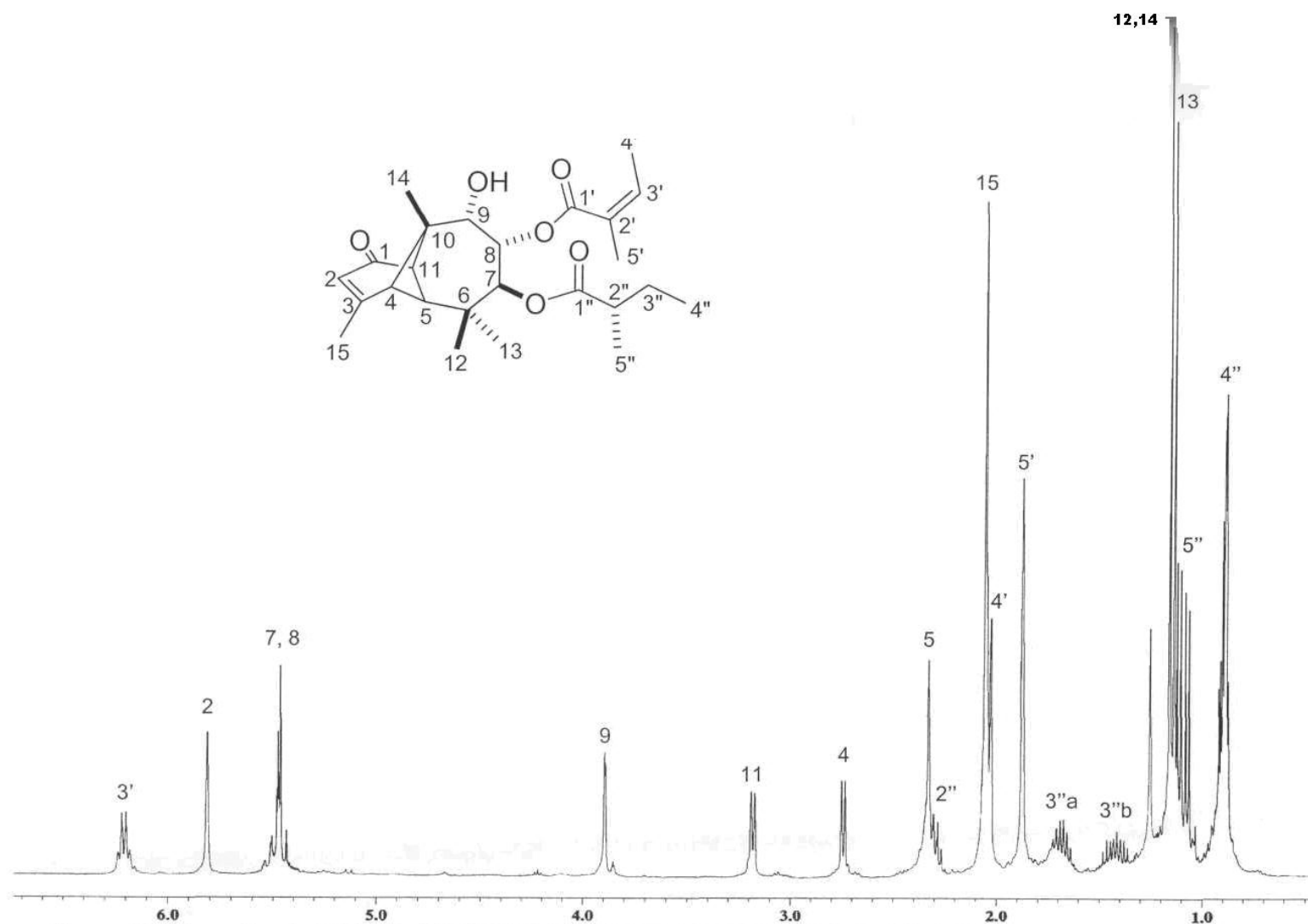


Figura 56. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz) del (4*R*,5*S*,7*S*,8*S*,9*S*,10*R*,11*R*,2''*S*)-8-angeloiloxi-9-hidroxi-7-(α-metilbutiroiloxi)-longipin-2-en-1-ona (**79**) en CDCl₃.

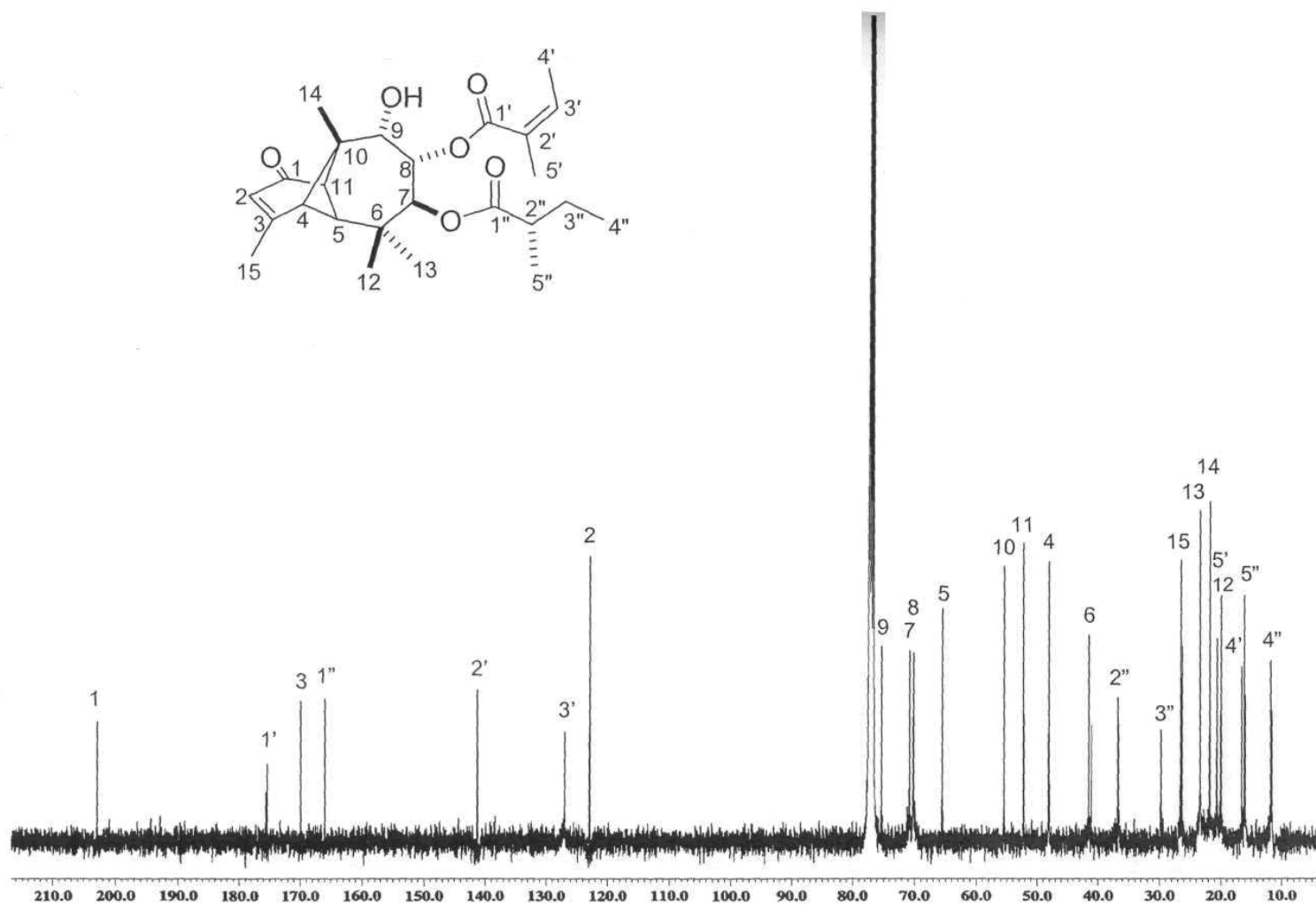
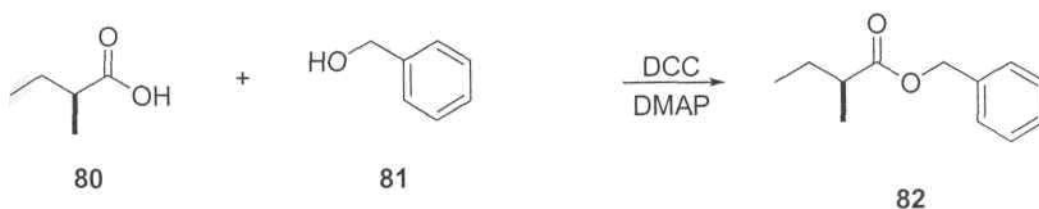


Figura 57. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del (4*R*,5*S*,7*S*,8*S*,9*S*,10*R*,11*R*,2''*S*)-8-angeloiloxi-9-hidroxi-7-(α -metilbutiroiloxi)-longipin-2-en-1-ona (**79**) en CDCl_3 .

5.2.2 Correlación química con el (S)-(+)- α -metilbutanoato de bencilo

Debido a que no fue posible purificar la mezcla que se obtuvo al esterificar el compuesto 69 con el cloruro de angelóilo, y a que de los intentos que se realizaron para esterificar 70 y obtener así 63 no dieron como resultado el compuesto deseado debido a problemas de transesterificación, se buscó un camino alternativo para determinar la configuración absoluta del residuo MeBu. Esta ruta consistió en la preparación del (S)-(+)- α -metilbutanoato de bencilo (82), a partir del ácido (S)-(+)- α -metilbutanoico comercial (80), y la comparación de los datos físicos y espectroscópicos de 82 con los datos del α -metilbutanoato de bencilo obtenido a partir de los esteres naturales que contienen el residuo MeBu (S)-82.

El ácido (S)-(+)- α -metilbutanoico (80) se esterificó con el alcohol bencílico (81) para obtener 82, como se puede apreciar en el Esquema 8. El compuesto 82 se obtuvo con 50% de rendimiento y se caracterizó mediante sus datos físicos y espectroscópicos principalmente por RMN de ^1H (Figura 58) y de ^{13}C (Figura 59). En el espectro de ^1H se observa en 7.40-7.30 ppm una señal múltiple que corresponde a los protones aromáticos *o*, *m* y *p*. La señal simple en 5.12 ppm que integró para dos protones se asignó a H7, mientras que la señal séxtuple en 2.43 ppm corresponde a H2 por acoplamiento con H3a, H3b y Me5 ($J = 7.0$ Hz). En 1.71 y 1.49 ppm se aprecian dos señales múltiples que se asignaron a los protones H3a y H3b. Finalmente, se observan una señal doble en 1.17 ppm ($J = 7.0$ Hz) y una señal triple en 0.90 ppm ($J = 7.3$ Hz) las cuales corresponden a los protones de los metilos Me5 y Me4 respectivamente. Este compuesto mostró $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +12$ ($c = 1.87$, CHCl_3).



Esquema 8. Preparación del estándar 82

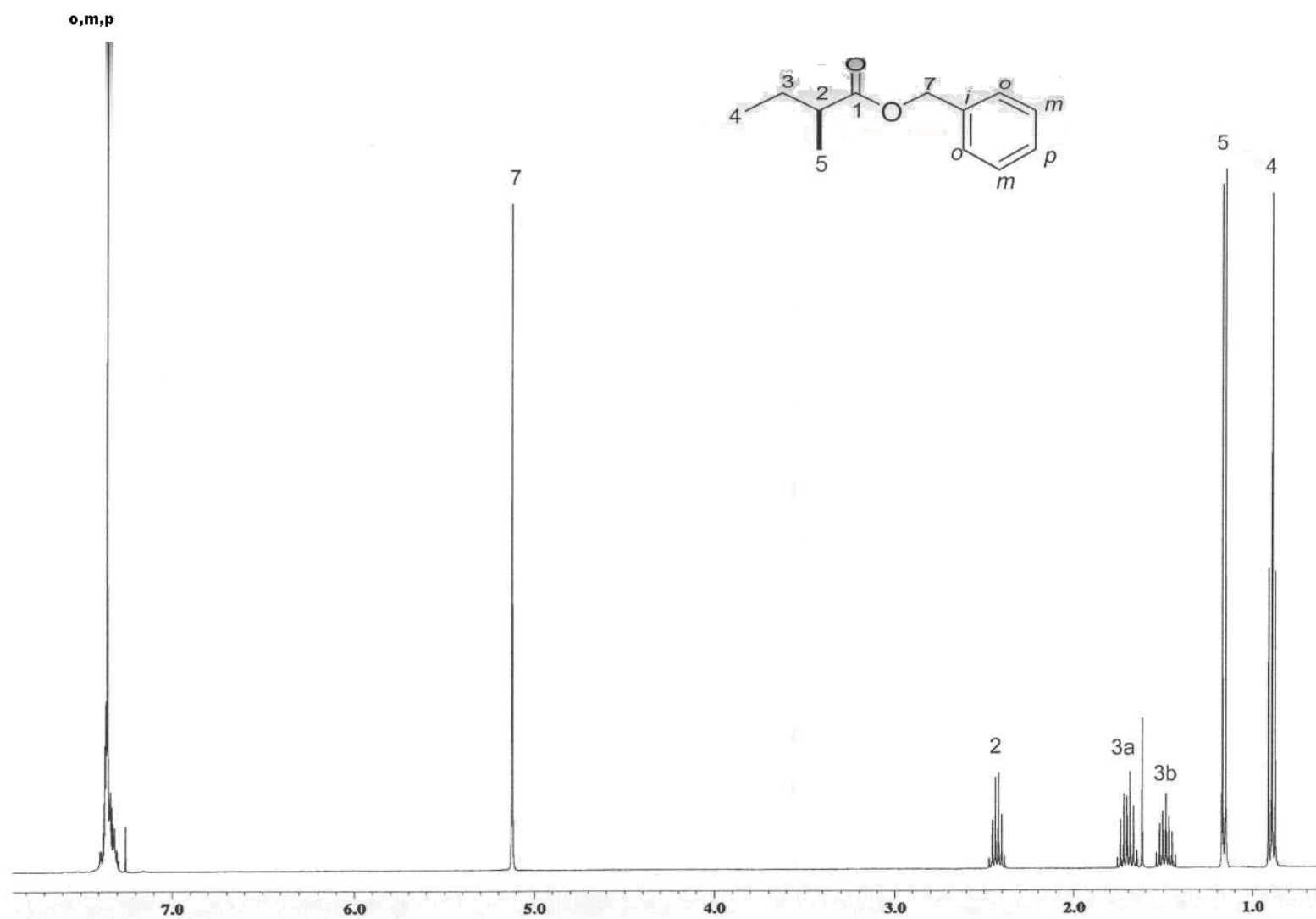


Figura 58. Espectro de RMN de ¹H a 400 MHz del (S)-(+)-α-metilbutanoato de bencilo (**82**) en CDCl₃.

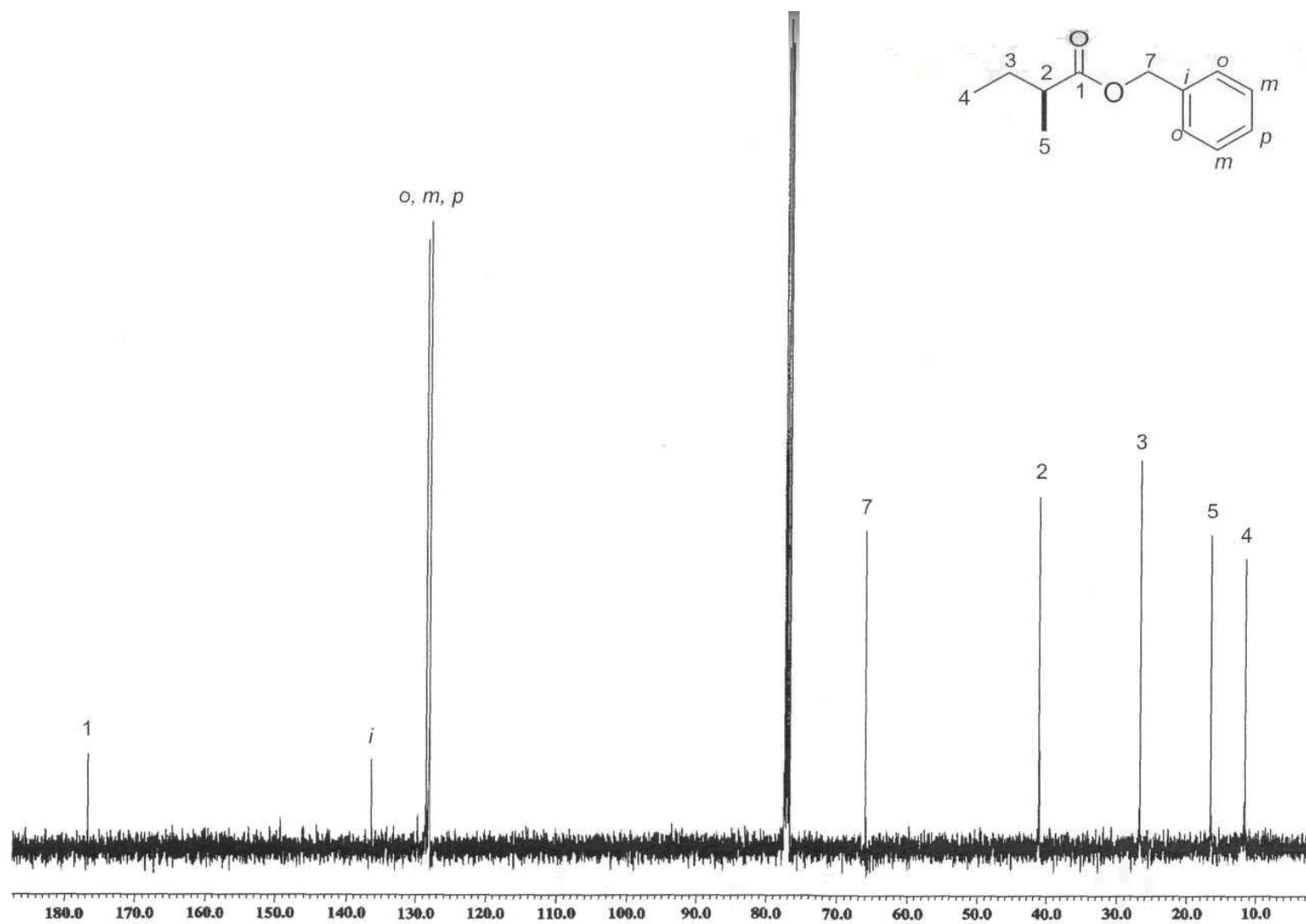
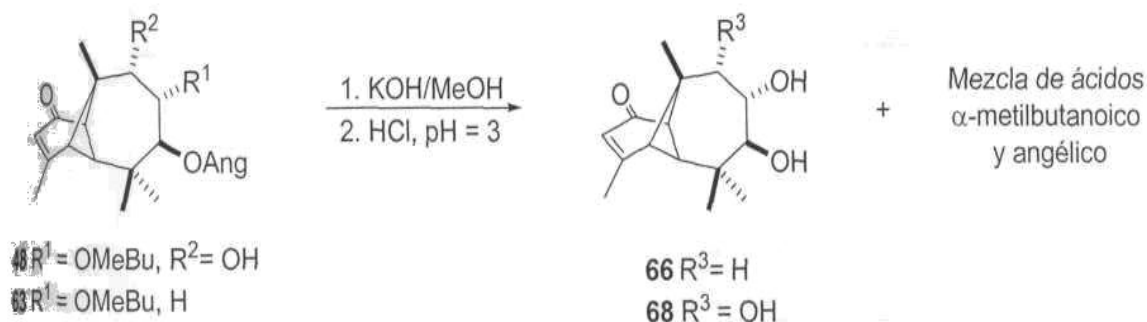


Figura 59. Espectro de RMN de ^{13}C a 100 MHz del éster de (S)-(+)- α -metilbutanoato de bencilo (**82**) en CDCl_3 .

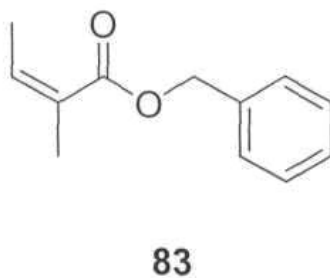
Una vez preparado el (S)-(+)- α -metilbutanoato de bencilo (82) se procedió a obtener el ácido α -metilbutanoico natural de la forma como se describe en el Esquema 9.



Esquema 9. Obtención del ácido α -metilbutanoico

Así, la fracción de longipinenos obtenida mediante la cromatografía del extracto hexánico, cuyo espectro de ^1H (Figura 60) mostró como productos mayoritarios los compuestos 48 y 63, se trató con $\text{KOH}/\text{H}_2\text{O}$, seguido por HCl hasta pH de 3, para obtener la mezcla de los ácidos α -metilbutanoico y angélico (Figura 61).

La esterificación de la mezcla de ácidos, obtenida de la hidrólisis de los derivados del longipinenolide, con el alcohol bencílico, dio lugar a la formación de varios ésteres, los cuales se separaron mediante cromatografía en columna y CLAR y se caracterizaron por RMN y espectrometría de masa. Como resultado, se identificaron los ésteres α -metilbutanoato de bencilo (S)-82 (Figuras 62-63) y el angelato de bencilo (83) (Figura 64).



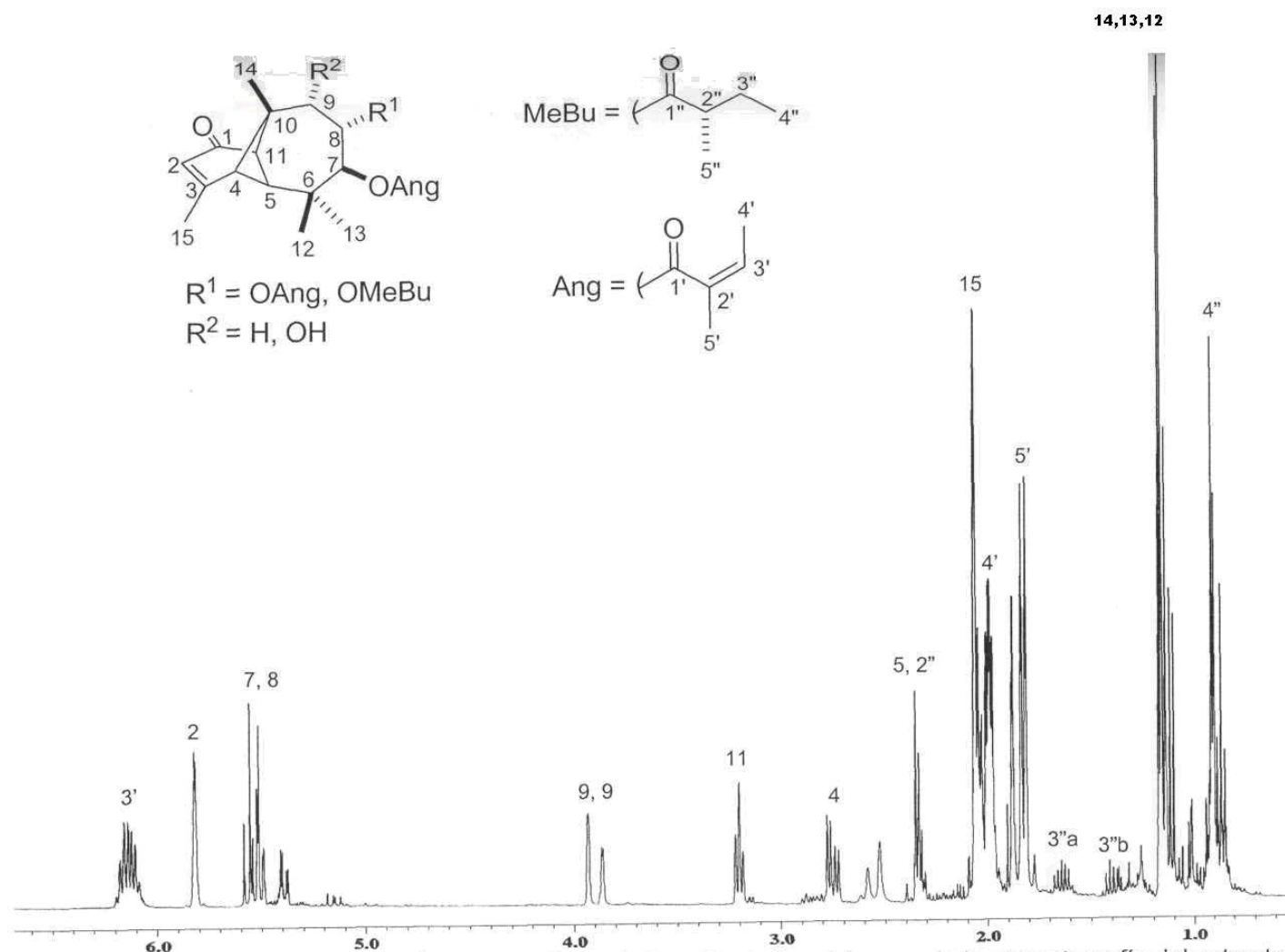


Figura 60. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz de la fracción de longipinenos de la cromatografía del extracto hexánico de las raíces de *S. pilosa* Lag en CDCl_3 .

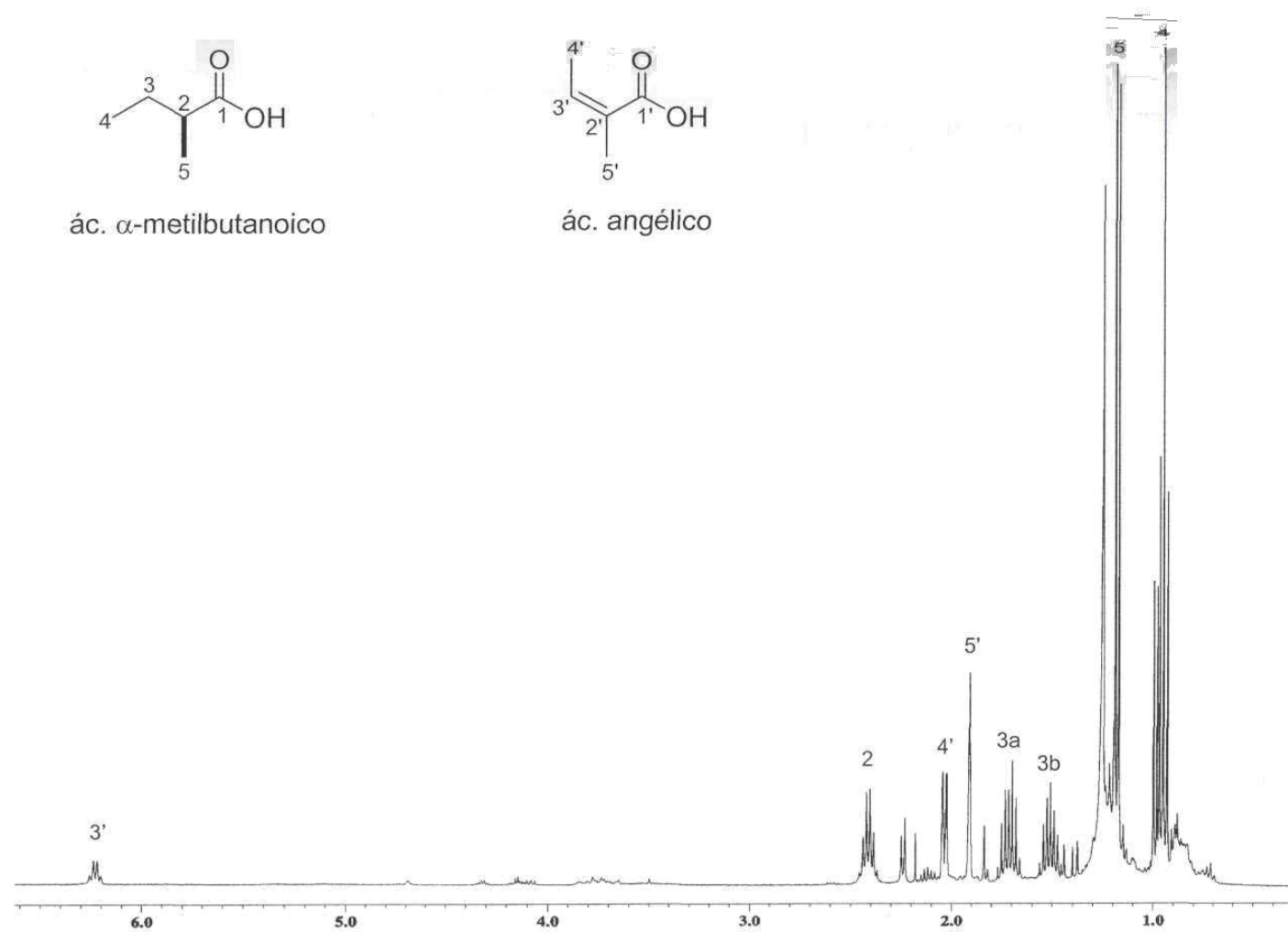


Figura 61. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz de la mezcla de ácidos angérico y α -metilbutanoico en CDCl_3 .

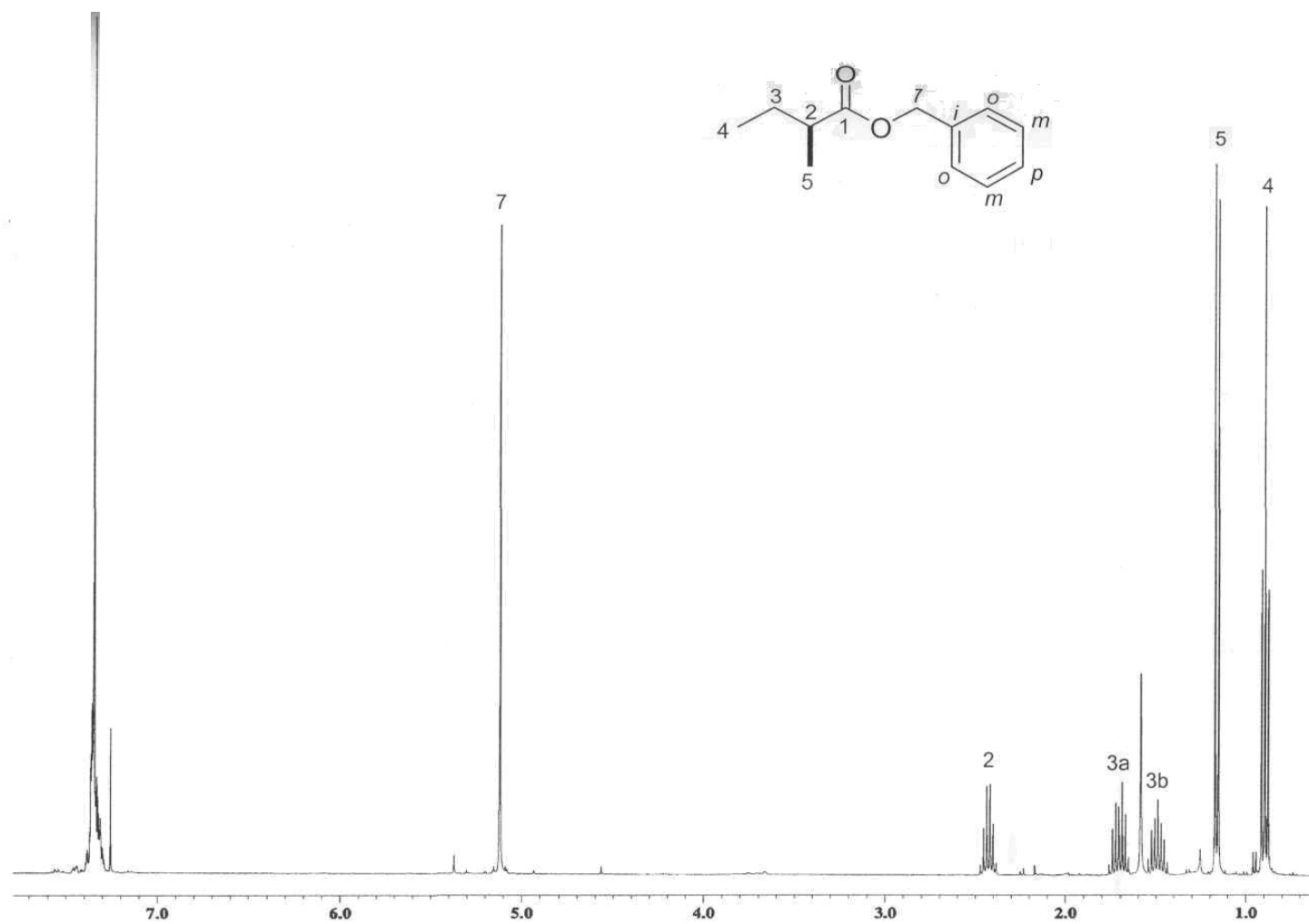
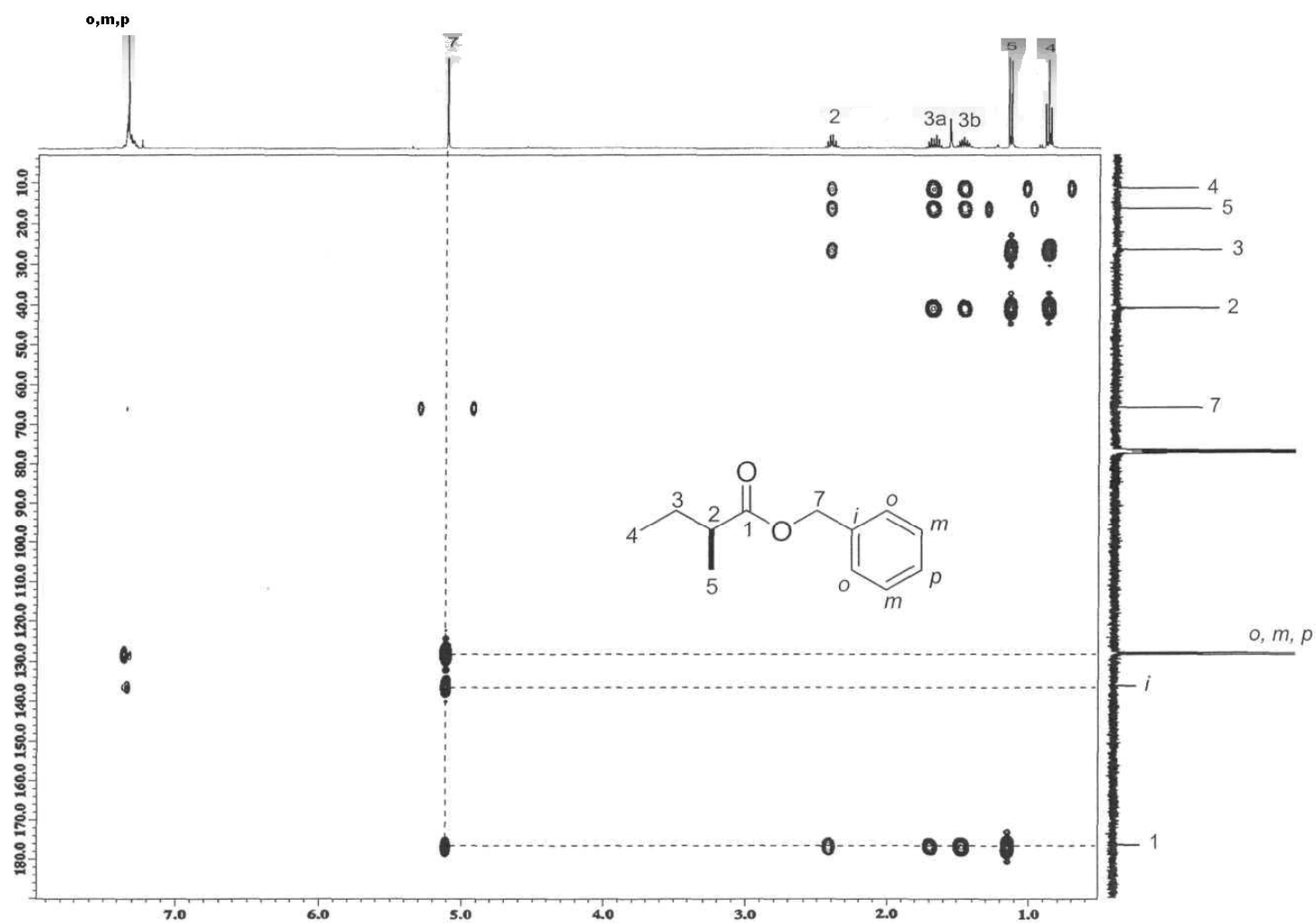


Fig. 62. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del α -metilbutanoato de bencilo de origen natural (S)-82 en CDCl_3 .

Figura 63. Espectro HMBC (400 MHz) del α -metilbutanoato de bencilo de origen natural (S)-82.

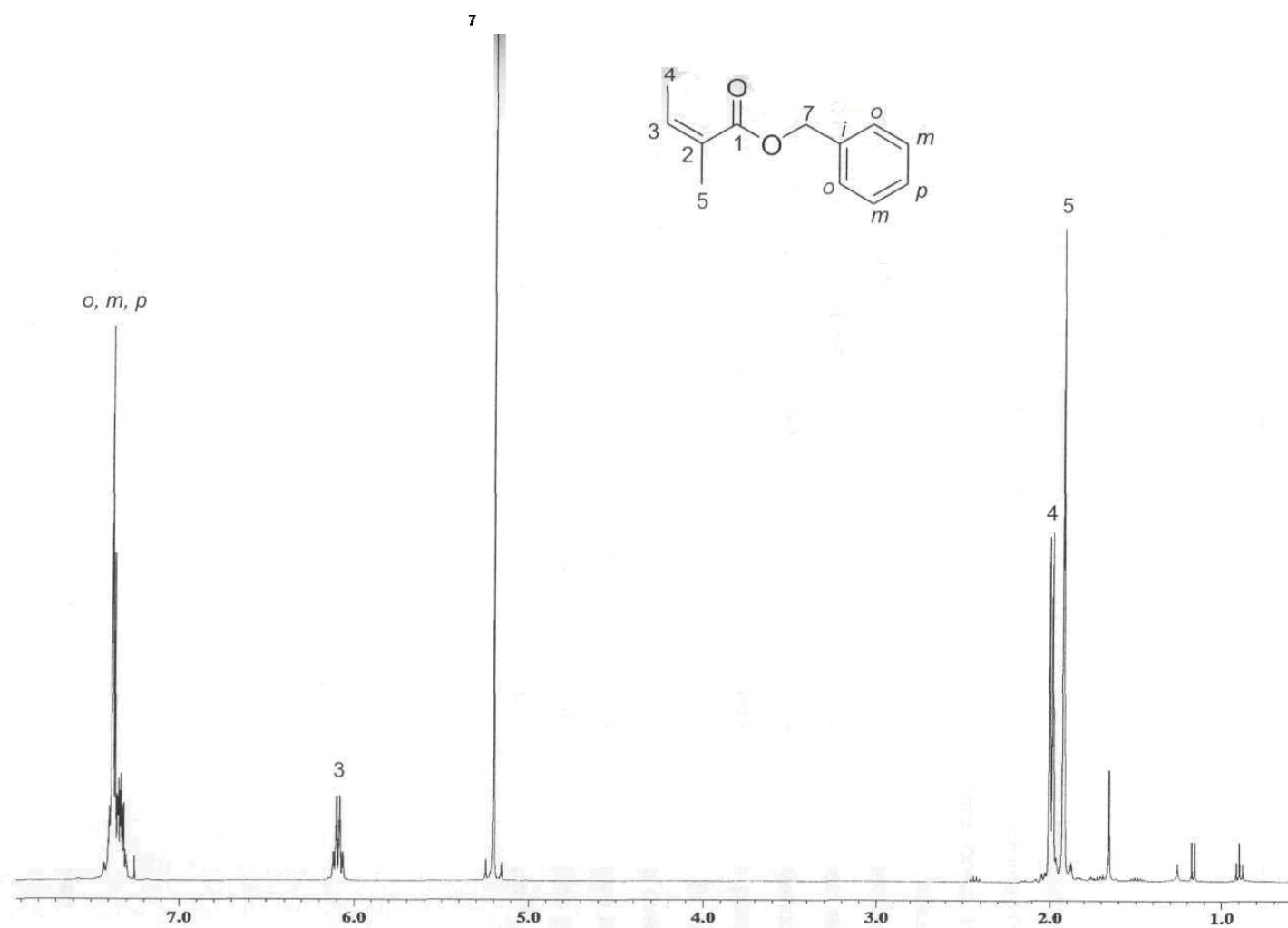
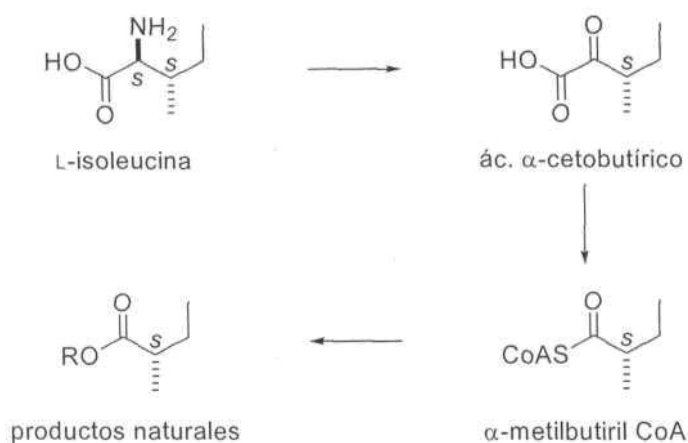


Figura 64. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz del angelato de bencilo (**83**) en CDCl_3 .

La comparación de los datos espectroscópicos, principalmente de RMN (Figura 65), y el valor de la rotación óptica: $[\alpha]^{20}_D = +12$ ($c = 0.20, \text{CHCl}_3$) del α -metilbutanoato de bencilo proveniente de la hidrólisis de los esteres naturales, con los del éster sintético (S)-82 $[\alpha]^{20}_D = +12$ ($c = 1.87, \text{CHCl}_3$), nos permitió determinar la configuración absoluta del centro estereogénico en C-2 del residuo MeBu como S

Estos resultados, junto con reportes previos⁴⁵⁻⁴⁶ para la asignación de residuos α -metilbutíricos en productos naturales funcionalizados, contribuye al conocimiento de la configuración absoluta de ácidos alifáticos ramificados de cadena corta, lo cual es relevante para reforzar el origen biogénico propuesto para estos residuos, que es a partir de aminoácidos² (Esquema 10). Estudios biosintéticos indican que la L-isoleucina se convierte en α -metilbutiril CoA que a su vez es transformada en derivados del α -metilbutirato en muchas especies,⁴⁷ incluyendo algunas plantas del género *Datura*⁴⁸ Esta ruta también ha sido considerada para la biosíntesis de metabolitos secundarios producidos por bacterias.⁴⁹⁻⁵⁰ Si la biogénesis de los residuos α -metilbutíricos inicia a partir de la L-isoleucina, la cual posee la configuración 2S,3S^{51,52} los residuos formados deberán tener siempre la configuración S. Sin embargo, existen algunos ejemplos donde el isómero R es el predominante, como es el caso de las plantas medicinales del género *Rheum*⁵³ y *Veratrum*.⁵⁴



Esquema 10. Análisis estereoquímico de la biosíntesis de residuos α -metilbutiroilo en productos naturales a partir de L-isoleucina.

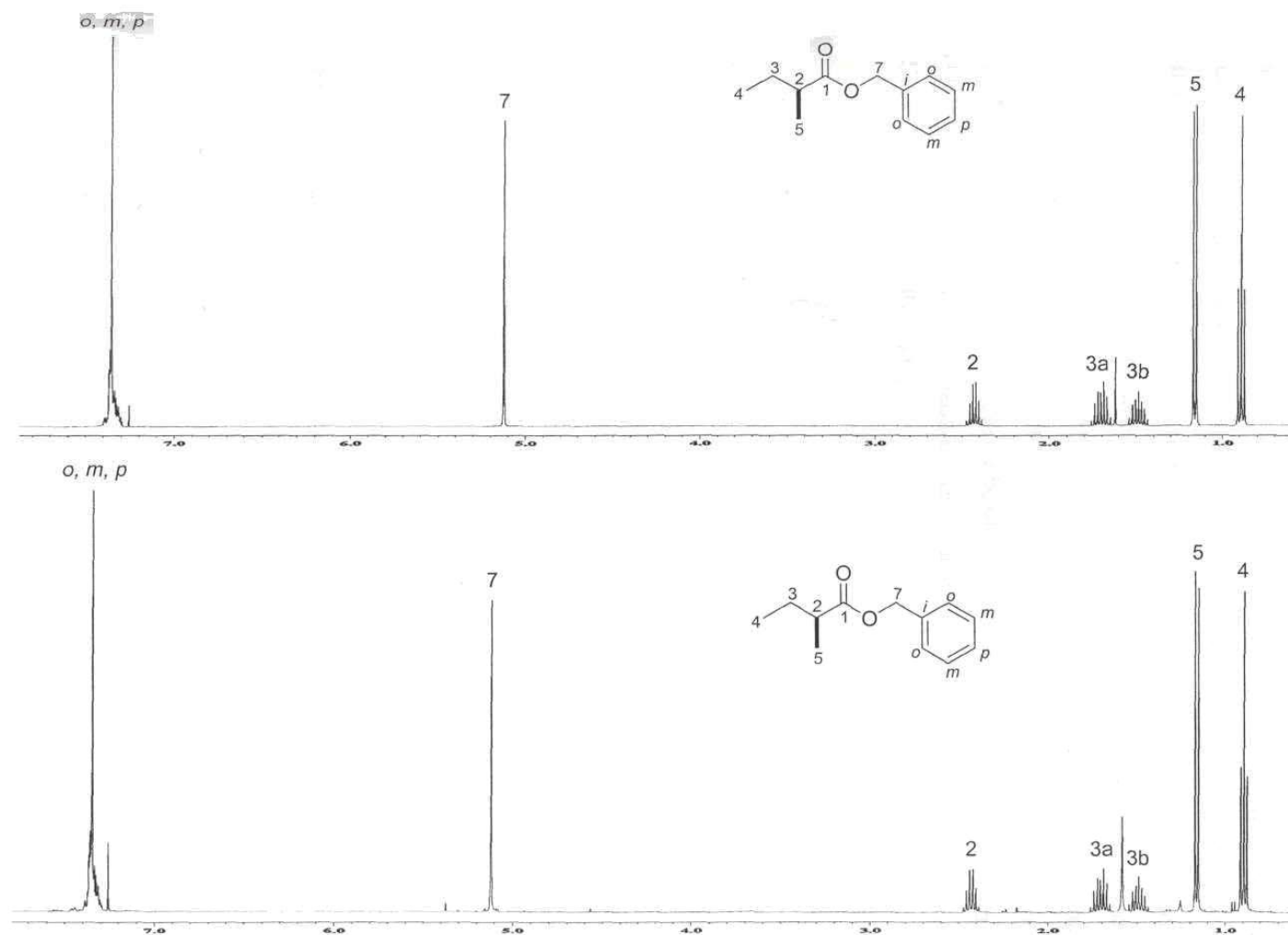
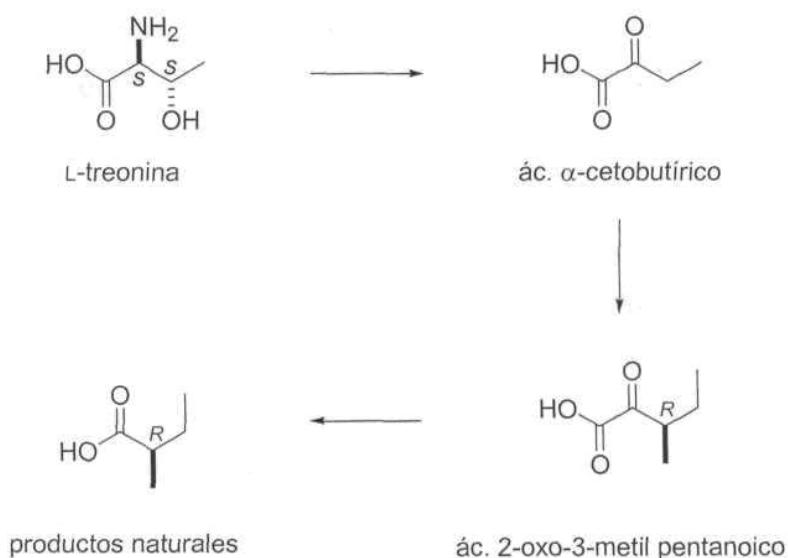


Figura 65. Comparación de los espectros de ^1H a 400 MHz, espectro superior (*S*)-(+)- α -metilbutanoato de bencilo (**82**), espectro inferior el del α -metilbutanoato de bencilo de origen natural (*S*)-**82**.

El presente estudio refuerza la presencia de la ruta de la L-isoleucina en la biosíntesis de metabolitos secundarios en *Stevia pilosa* Lag. como se muestra en el Esquema 10. El centro quiral en C-2 en el residuo α -metilbutiroílo es S, esto concuerda con la quiralidad del átomo de carbono de la L-isoleucina a partir de la cual se originan los residuos α -metilbutíricos. Por otro lado, se ha propuesto una ruta alterna a partir de la L-treonina⁵⁵ (Esquema 11), en la que este aminoácido se convierte en un ácido acetobutírico por medio de la treonina deshidratasa. Enseguida, por medio de un complejo enzimático se forma el ácido α -ceto- β -metilvalérico y finalmente, se descarboxila. La coexistencia de ambas rutas se puede explicar en aquellos casos en los cuales esté presente una mezcla de los (S)-(+)- y R-(-)- α -metilbutiratos.

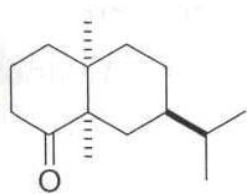


Esquema 11. Análisis estereoquímico de la biosíntesis de residuos α -metilbutiroílo en productos naturales a partir de L-treonina.

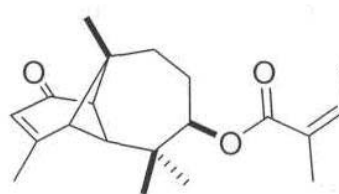
15.3 Análisis conformacional de compuestos selectos aislados de *Stevia*.

Como se comentó previamente, debido a que en el organismo humano se tienen sitios activos quirales con requerimientos tridimensionales muy específicos, la determinación de la conformación, así como de la configuración absoluta de un compuesto es un aspecto muy relevante. Aunque por ahora no se tiene conocimiento de la actividad farmacológica de todos los compuestos aislados, siempre existe la posibilidad de que en un futuro se les encuentre alguna aplicación biológica y será necesario contar con la mayor información posible para poder plantear rutas de síntesis apropiadas y no agotar así la fuente natural. El conocimiento de la configuración absoluta ayudará principalmente al planteamiento de síntesis enantioselectivas, ya que como es conocido, en el caso de tener la estereoquímica contraria en uno de los centros estereogénicos de la estructura, se pueden modificar las propiedades farmacológicas de dicha sustancia. Por otro lado, al existir en el organismo humano receptores específicos en donde es de gran importancia la relación conformación-actividad biológica para que pueda existir una buena respuesta farmacológica, el estudio del comportamiento conformacional de las moléculas nos proporciona la información necesaria para entender la relación que guarda una molécula con su receptor biológico y poder así proponer la síntesis de análogos conformacionales biológicamente activos, los cuales no siempre están representados por el conformero más estable energéticamente.

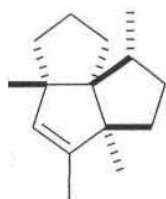
Por lo anterior, en el presente trabajo se decidió llevar a cabo el estudio conformacional de cuatro compuestos representativos de los metabolitos aislados de *S. pilosa* Lag. y *S. tomentosa* H. B. K., los cuales se muestran a continuación.



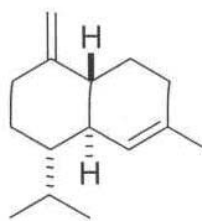
44



58



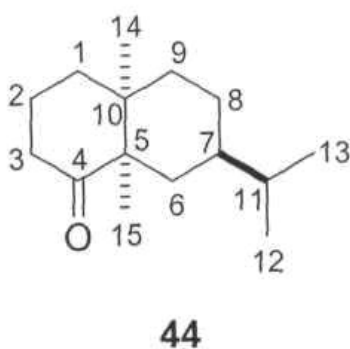
52



54

5.3.1 Análisis conformacional de (-)-valeranona aislada de *S. tomentosa* H.B.K.

La (-)-valeranona (44), aislada por primera vez por Stoll y colaboradores,⁵⁶ es un sesquiterpeno reordenado con esqueleto de una c/s-decalina y dos carbonos cuaternarios estereogénicos vecinales. Este compuesto se encuentra ampliamente distribuido entre los miembros de la familia Valerianaceae,⁵⁷ incluyendo la especie medicinal *Valeriana officinalis*⁵⁸ De hecho, se sabe que esta sustancia suprime las contracciones rítmicas y relaja las contracciones estimuladas por el potasio en músculo liso.⁵⁸ La estructura de 44 fue establecida de forma definitiva por Hikino y colaboradores⁵⁷ y posteriormente, confirmada por síntesis total a partir de (-)-carvomentona⁵⁹ y (+)-carvomentona.⁶⁰ Desde entonces, han surgido muchas otras rutas de síntesis de 44 con la finalidad de confirmar su estereoquímica, la cual fue una vez tema de discusión.⁶¹ Hasta la fecha, la asignación del espectro de RMN de ¹³C de este sesquiterpeno antiespasmódico no se había llevado a cabo, además el estudio de su espectro de RMN de ¹H no se había descrito más allá de la asignación de los grupos metilo y no existía ningún estudio conformacional basado en datos de RMN. Algunos trabajos previos, enfocados principalmente a propuestas sintéticas,⁶¹⁻⁶³ sólo mencionan los desplazamientos químicos de RMN de ¹³C de 44 con fines de identificación.



El estudio conformacional de valeranona aislada del extracto hexánico de las raíces de *S. tomentosa* H.B.K. inició con el cálculo de la geometría mediante mecánica molecular, usando el método Monte Carlo, el cual explora de manera automatizada las estructuras de mínima energía que presenta una molécula. Esta exploración condujo a 14 estructuras minimizadas, cuya energía oscilaba entre 0-110 kcal/mol. De aquí se escogieron 4 estructuras con un rango energético de 0-5 kcal/mol y que representaron una población del 99.99 %. Estas cuatro estructuras se llevaron a una optimización de la geometría usando teoría de funcionales de la densidad (DFT) a un nivel de cálculo B3LYP/6-31G*, lo cual condujo a las estructuras 44a-44d que se muestran en la Figura 66. Las tres primeras estructuras representan isómeros conformacionales debidos al giro del enlace sencillo entre C-7 y C-11 (grupo isopropilo), mientras que la estructura de más alta energía representa la inversión de los anillos.

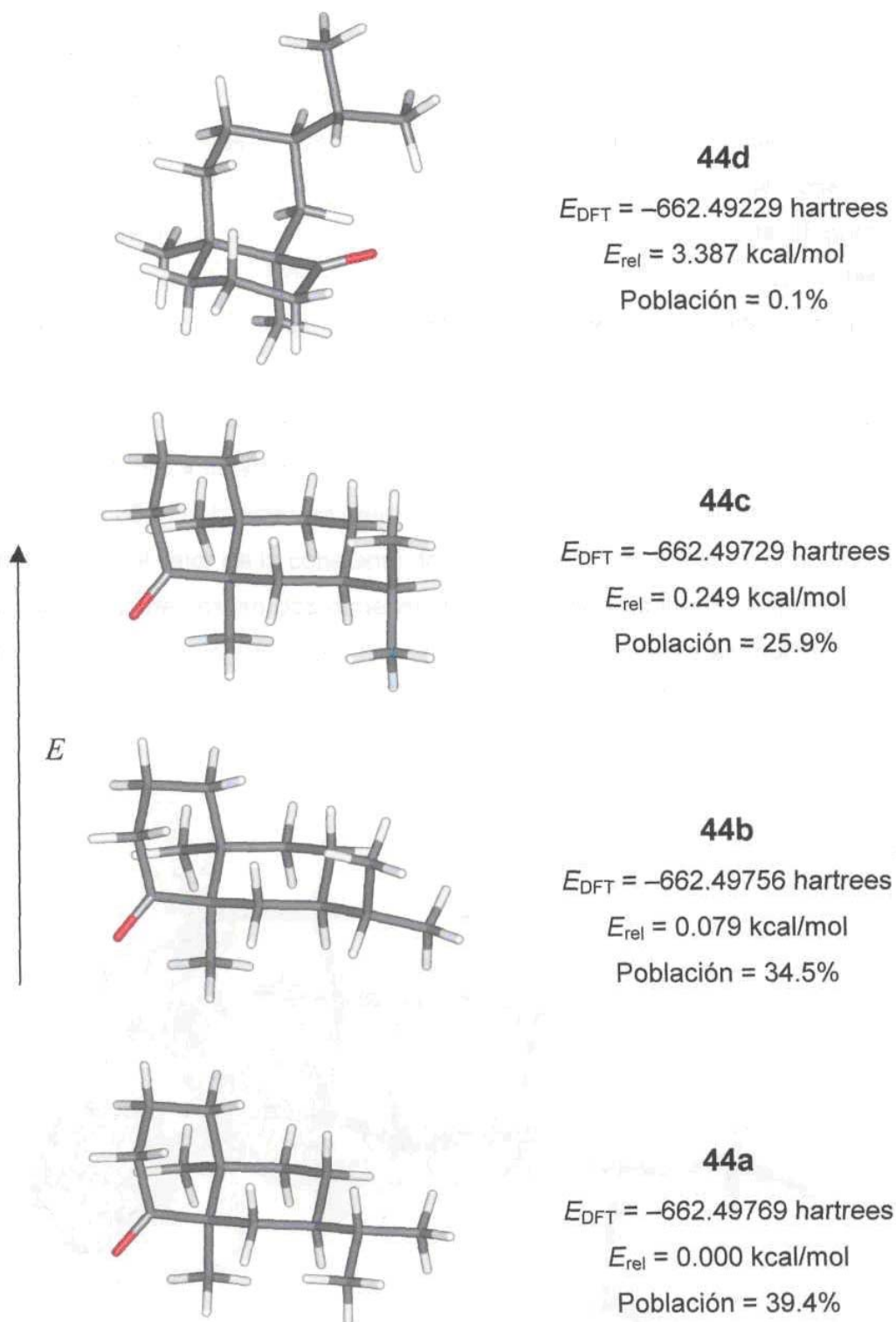


Figura 66. Distribución conformacional de valeranona (**44**).

Usando una ecuación generalizada de tipo Karplus, los ángulos dihedros teóricos H-C-C-H permitieron obtener las constantes de acoplamiento vecinales ^1H - ^1H correspondientes, las cuales se usaron como datos iniciales para la simulación espectral de **44** [Figura 67(b) y 67(c)]. Después de varias iteraciones se observó una excelente correlación con el espectro de RMN de ^1H experimental [Figura 167(a)]. Los valores de las $^3J(\text{H,H})$ calculadas fueron muy parecidas a las experimentales, excepto en la constante entre el hidrógeno axial alfa al grupo carbonilo y el hidrógeno ecuatorial beta al grupo carbonilo ($J_{2\beta}, J_{3\beta}$) (Tabla 3). La diferencia se explica de la siguiente forma: debido a que la densidad electrónica del HOMO se encuentra muy incrementada en los alrededores de los núcleos H- 2β y H- 3β (Figura 68) se obtiene una mejor transmisión de la información spin-spin incrementando así el valor de la constante de acoplamiento. El espectro simulado, junto con los experimentos en dos dimensiones de RMN permitieron asignar por completo los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C de este interesante sesquiterpeno (**44**) (Tabla 4).

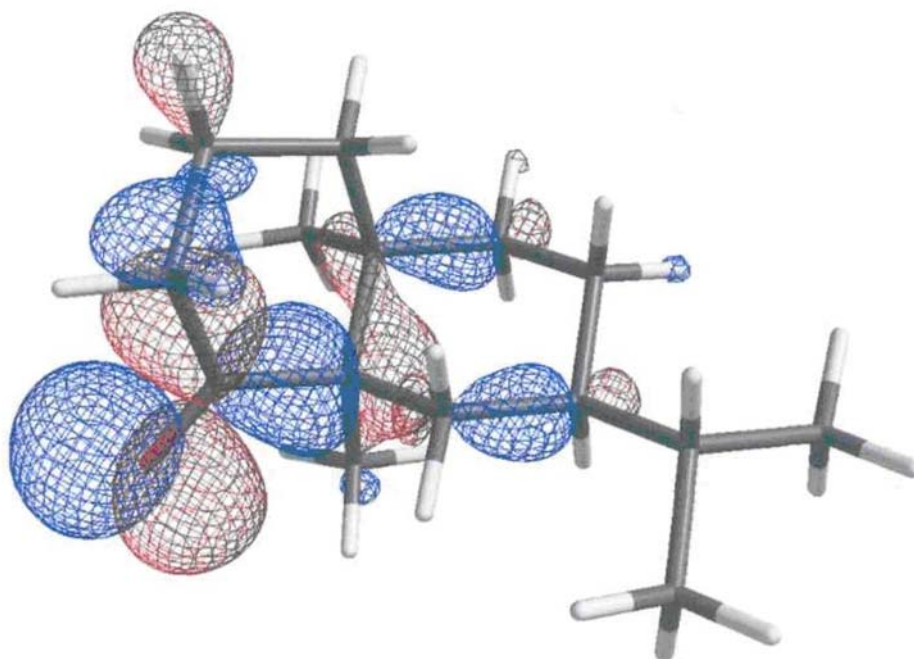


Figura 68. Orbital molecular más alto ocupado (HOMO) de valeranona (**44**).

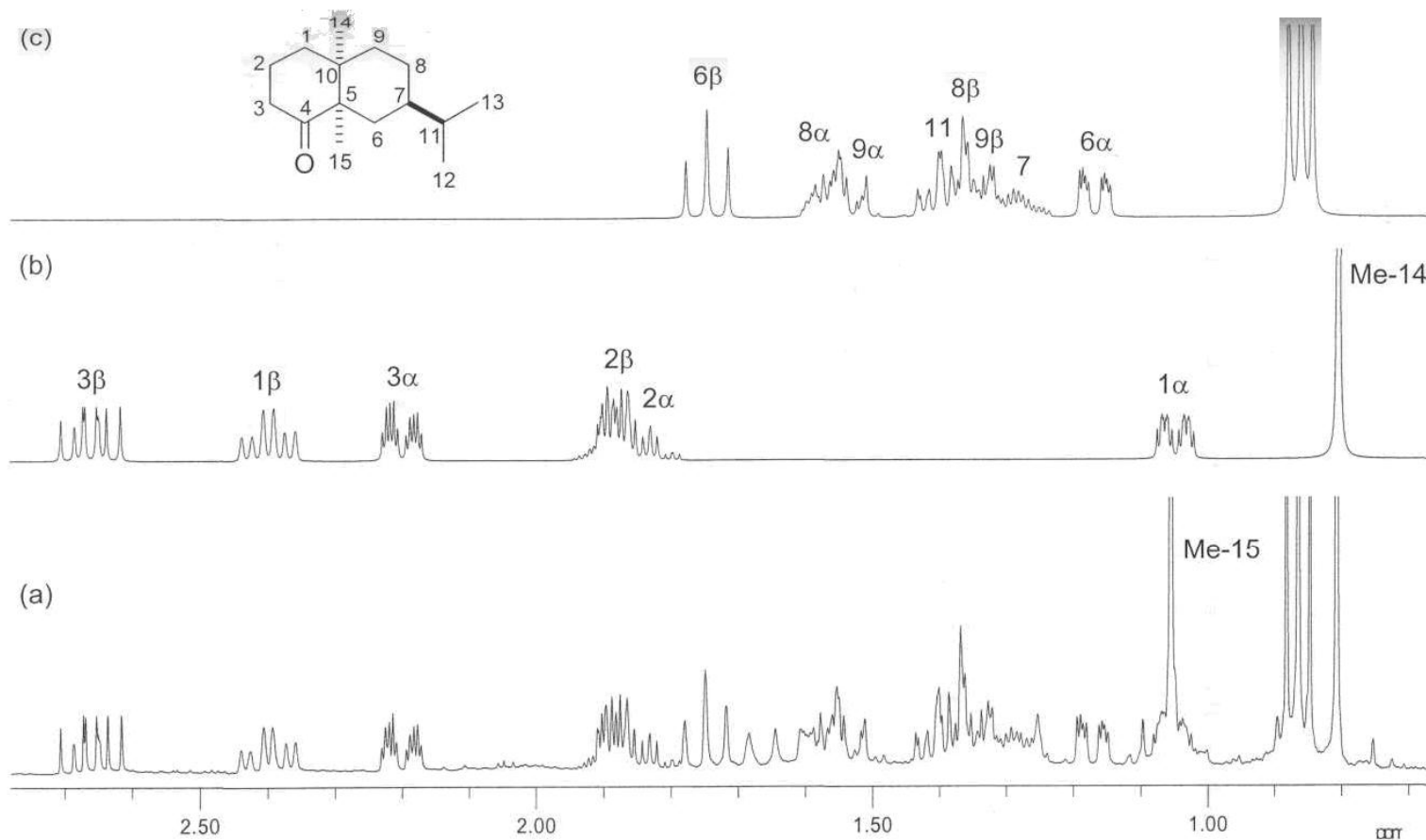


Figura 67. (a) Espectro experimental de RMN de ^1H a 400 MHz de valeranona (**44**), (b) espectro simulado del sistema de espines del anillo A, y (c) espectro simulado del sistema de espines del anillo B. El Me-15 no se incluyó en la simulación y las señales en la región de 1.6-1.7 ppm se deben a impurezas.

Tabla 3. Ángulos dihedros obtenidos por la teoría de funcionales de la densidad y constantes de acoplamiento vecinales calculadas de valeranona (44), comparadas con las observadas experimentalmente.

$H_x-C-C-H_y$ x,y	ϕ_{DFT}^a			J_{calcd}^b			J_{prom}^c	J_{obs}
	44a	44b	44c	44a	44b	44c		
1 α ,2 α	+56.6	+56.4	+55.9	3.60	3.63	3.72	3.6	3.9
1 α ,2 β	-60.4	-60.6	-60.9	2.84	2.81	2.76	2.8	2.8
1 β ,2 α	+171.9	+171.6	+171.0	13.13	13.11	13.07	13.1	13.4
1 β ,2 β	+54.9	+54.6	+54.2	4.00	4.06	4.14	4.1	5.3
2 α ,3 α	-50.3	-50.6	-49.6	4.82	4.77	4.98	4.8	4.8
2 α ,3 β	-169.2	-169.4	-168.3	13.06	13.08	12.99	13.0	13.5
2 β ,3 α	+65.9	+65.5	+66.5	1.98	2.03	1.89	2.0	2.1
2 β ,3 β	-53.1	-53.3	-52.2	4.41	4.36	4.58	4.4	7.5
6 α ,7	+59.2	+63.1	+62.6	3.33	2.78	2.84	3.0	3.5
6 β ,7	+174.8	+178.8	+179.0	12.29	12.36	12.36	12.3	12.7
7,8 α	-56.5	-59.5	-59.0	3.72	3.27	3.29	3.4	3.5
7,8 β	-172.7	-176.3	-175.5	12.22	12.33	12.31	12.3	12.5
7,11	+179.1	-64.4	+66.2	11.46	2.17	1.96	5.8	5.9
8 α ,9 α	+54.2	+55.0	+54.1	4.13	3.98	4.14	4.1	4.5
8 α ,9 β	-60.7	-60.2	-61.2	2.82	2.90	2.74	2.8	2.6
8 β ,9 α	+169.8	+170.8	+170.1	13.08	13.15	13.10	13.1	13.2
8 β ,9 β	+54.9	+55.6	+54.8	3.96	3.81	3.97	3.9	4.1

^aEn grados, calculadas con la base B3LYP/6-31G*.

^bEn Hz, calculadas con el programa Altona.

^cEn Hz, obtenidas por simulación espectral.

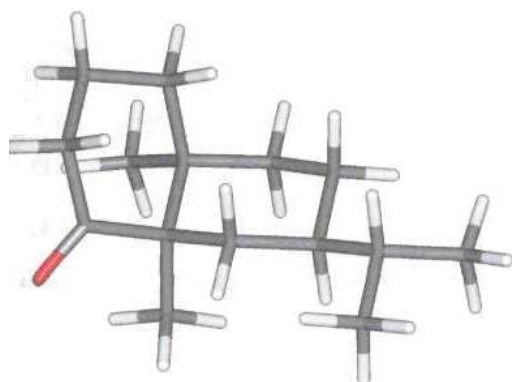
Tabla 4. Desplazamientos químicos de RMN de ^1H y de ^{13}C (ppm) y constantes de acoplamiento (Hz) de valeranona (44).

Hidrógeno	δ en ppm	Carbono	δ en ppm
H-1 α	1.037 <i>dddd</i>	C-1	32.0
H-1 β	2.379 <i>ddd</i>	C-2	21.8
H-2 α	1.830 <i>dddddd</i>	C-3	37.0
H-2 β	1.894 <i>ddd</i>	C-4	217.5
H-3 α	2.195 <i>dddd</i>	C-5	53.2
H-3 β	2.657 <i>ddd</i>	C-6	37.5
H-6 α	1.159 <i>ddd</i>	C-7	38.5
H-6 β	1.734 <i>dd</i>	C-8	24.7
H-7	1.277 <i>dddddd</i>	C-9	36.2
H-8 α	1.565 <i>dddddd</i>	C-10	38.6
H-8 β	1.366 <i>ddd</i>	C-11	32.9
H-9 α	1.534 <i>ddd</i>	C-iPr	19.7
H-9 β	1.334 <i>ddd</i>	C-iPr	19.8
H-11	1.377 <i>dsext</i>	C-14	24.9
Me-(iPr)	0.835 <i>d</i>	C-15	16.8
Me-(iPr)	0.856 <i>d</i>		
Me-14	0.788 <i>s</i>		
Me-15	1.037 <i>s</i>		

Constantes de acoplamiento en Hz: $1\alpha,1\beta = -13.0$; $1\alpha,2\alpha = 3.9$; $1\alpha,2\beta = 2.8$; $1\alpha,3\alpha = 2.2$; $1\beta,2\alpha = 13.4$; $1\beta,2\beta = 5.3$; $2\alpha,2\beta = -13.5$; $2\alpha,3\alpha = 4.8$; $2\alpha,3\beta = 13.5$; $2\beta,3\alpha = 2.1$; $2\beta,3\beta = 7.5$; $3\alpha,3\beta = -14.2$; $6\alpha,6\beta = -12.9$; $6\alpha,7 = 3.5$; $6\alpha,8\alpha = 2.0$; $6\beta,7 = 12.7$; $7,8\alpha = 3.5$; $7,8\beta = 12.5$; $7,11 = 5.9$; $8\alpha,8\beta = -13.5$; $8\alpha,9\alpha = 4.5$; $8\alpha,9\beta = 2.6$; $8\beta,9\alpha = 13.2$; $8\beta,9\beta = 4.1$; $9\alpha,9\beta = -13.1$; $11,12 = 7.0$; $11,13 = 7.3$.

iPr = isopropilo

Conformación del mínimo global de valeranona obtenido mediante DFT



44a

Los cálculos de DFT permitieron encontrar el conformero de mínima energía (**44a**), cuyo valor fue de $E_{DFT} = -662.49769$ hartrees. Las coordenadas cartesianas de sus átomos (Tabla 5) se emplearon para alimentar el programa RICON, mediante el cual es posible conocer la conformación exacta de los anillos que forman parte del sistema.

Tabla 5. Coordenadas cartesianas del mínimo global de (-)-valeranona **44a** (A)

Átomo	X	Y	Z
C-1	1.911650	-0.556236	1.391817
C-2	2.938889	0.573859	1.530715
C-3	2.403597	1.875817	0.910005
C-4	1.896860	1.655019	-0.510511
C-5	0.917364	0.482473	-0.749498
C-6	-0.448537	0.893759	-0.104338
C-7	-1.531993	-0.203907	-0.151514
C-8	-0.981184	-1.479469	0.512887
C-9	0.368133	-1.919025	-0.074884
C-10	1.471739	-0.833063	-0.072144
C-11	-2.866673	0.265855	0.493420
C-12	-3.412693	1.553398	-0.147582
C-13	-3.950982	-0.825219	0.440746
C-14	2.687098	-1.383128	-0.852388
C-15	0.723192	0.331943	-2.272253
O-4	2.246619	2.390840	-1.416545

A partir de dicho programa se obtuvieron los parámetros propuestos por Cremer y Pople⁶⁴ que son datos que permiten ubicar un vector Q con ángulos de θ y ϕ , en una esfera conformacional en la cual, en los polos ($\theta = 0^\circ$ ó 180°) se encuentran las conformaciones de silla ideal y en el ecuador las conformaciones de bote. Conforme se asciende o desciende a través de la esfera conformacional (Figura 69), se pasa a través de las conformaciones de bote torcido hasta llegar a la silla. La ubicación de este vector en la esfera conformacional permitió conocer la conformación exacta de los anillos que forman al sistema de valeranona. Los parámetros de Cremer y Pople obtenidos fueron los siguientes: Anillo A: $Q = 0.531$, $\theta = 6.03^\circ$, y $\phi = 5.59^\circ$; anillo B: $Q = 0.555$, $\theta = 2.62^\circ$, y $\phi = 4.59^\circ$. Esto permitió llegar a la conclusión de que ambos anillos están en la conformación de silla ligeramente distorsionada.

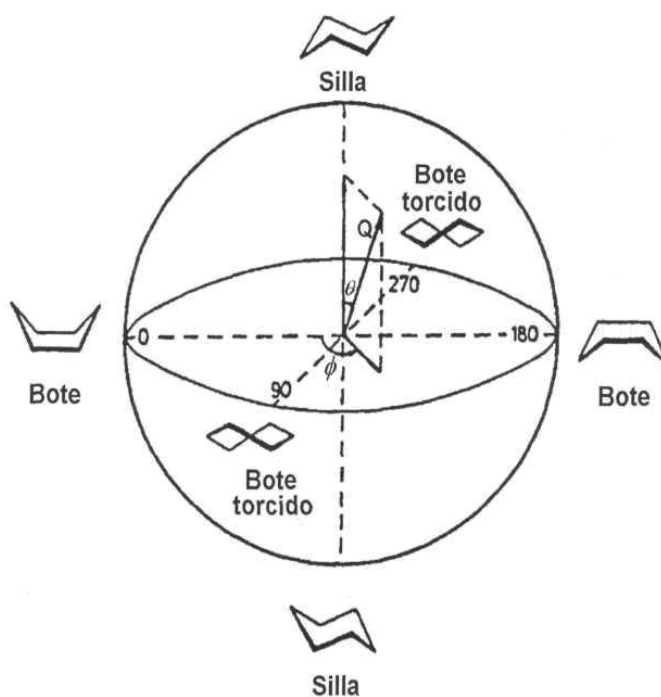
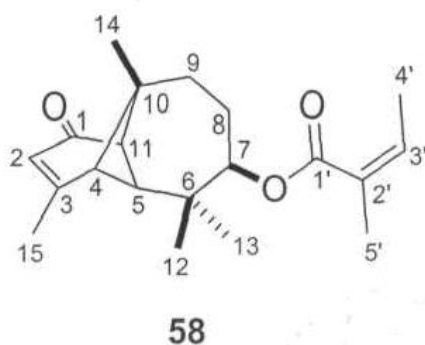


Figura 69. Esfera conformacional.

5.3.2 Análisis conformacional de (4R,5S,7R,11R)-7-angeloiloxilongipin-2-en-1-ona

En el estudio conformacional de (4R,5S,7R,10R,11R)-7-angeloiloxilongipin-2-en-1-ona (58) al igual que el de (-)-valeranona, se emplearon cálculos de mecánica molecular usando el método Monte Carlo⁶¹ para encontrar las estructuras de mínima energía que presenta la molécula. Esto condujo a 5 estructuras minimizadas, las cuales se llevaron a una optimización de la geometría usando teoría de funcionales de la densidad (DFT) a un nivel de cálculo B3LYP/6-31G*. Como resultado de esta optimización se encontraron 5 estructuras, de las cuales dos fueron descartadas por representar un porcentaje poblacional muy bajo, por lo tanto, se obtuvieron del análisis conformacional las estructuras 58a-58c que se muestran en la Figura 70. Las estructuras 58a y 58b representan isómeros conformacionales debidos al cambio en la conformación del ciclo de siete miembros, la diferencia significativa se encuentra principalmente en la orientación que adopta H-7, en el caso del conformero 58a se encuentra pseudo-axial y en el conformero 58b presenta una orientación *pset/c/o*-ecuatorial. En el caso de los conformeros 58a y 58c existe un giro del grupo angeloiló y un giro del enlace sencillo O-C=O de dicho éster, en el conformero 58a el grupo carbonilo se encuentra *cis* con H-7 y para el caso del conformero 58c el grupo carbonilo se encuentra *trans* a dicho protón.



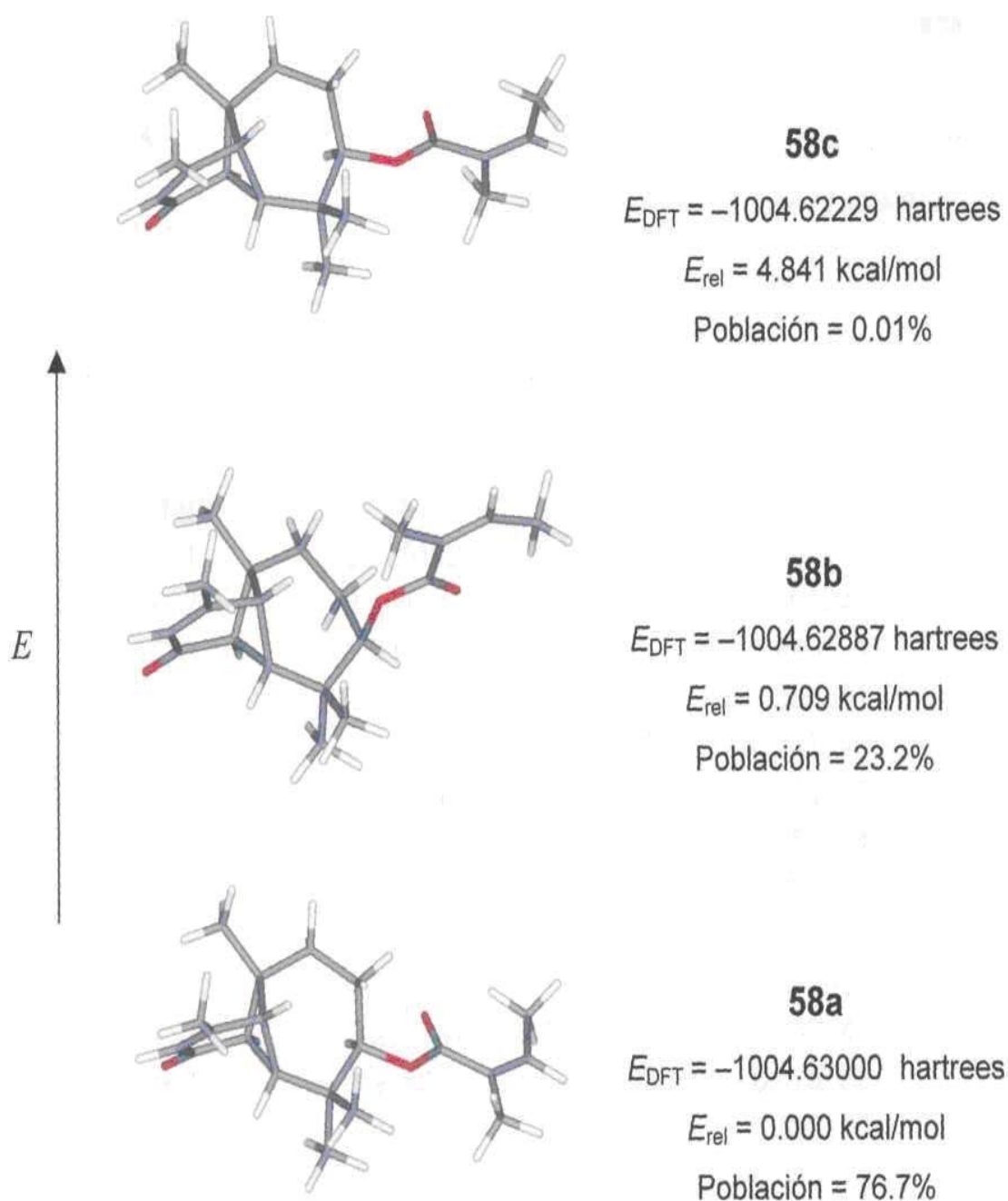
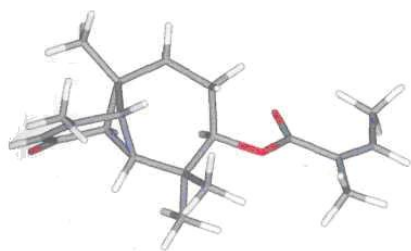


Figura 70. Distribución conformacional de (4*R*,5*S*,7*R*,10*R*,11*R*)-7-angeloiloxilongipin-2-en-1-ona (**58**).

Conformación del mínimo global de (4R,5S,7R,10R,11R)-7-angeloiloxilongipin-2-en-1-ona (58) obtenido mediante DFT



58a

Los cálculos de DFT nos permitieron conocer el conformero de mínima energía (**58a**), obteniéndose un valor de energía de EDFT= -1004.63000 hartrees, a la vez que generaron las coordenadas de sus átomos (Tabla 6).

Tabla 6. Coordenadas cartesianas del mínimo global de (4R,5S,7R,10R,11R)-7-angeloiloxilongipin-2-en-1-ona **58a** (Å)

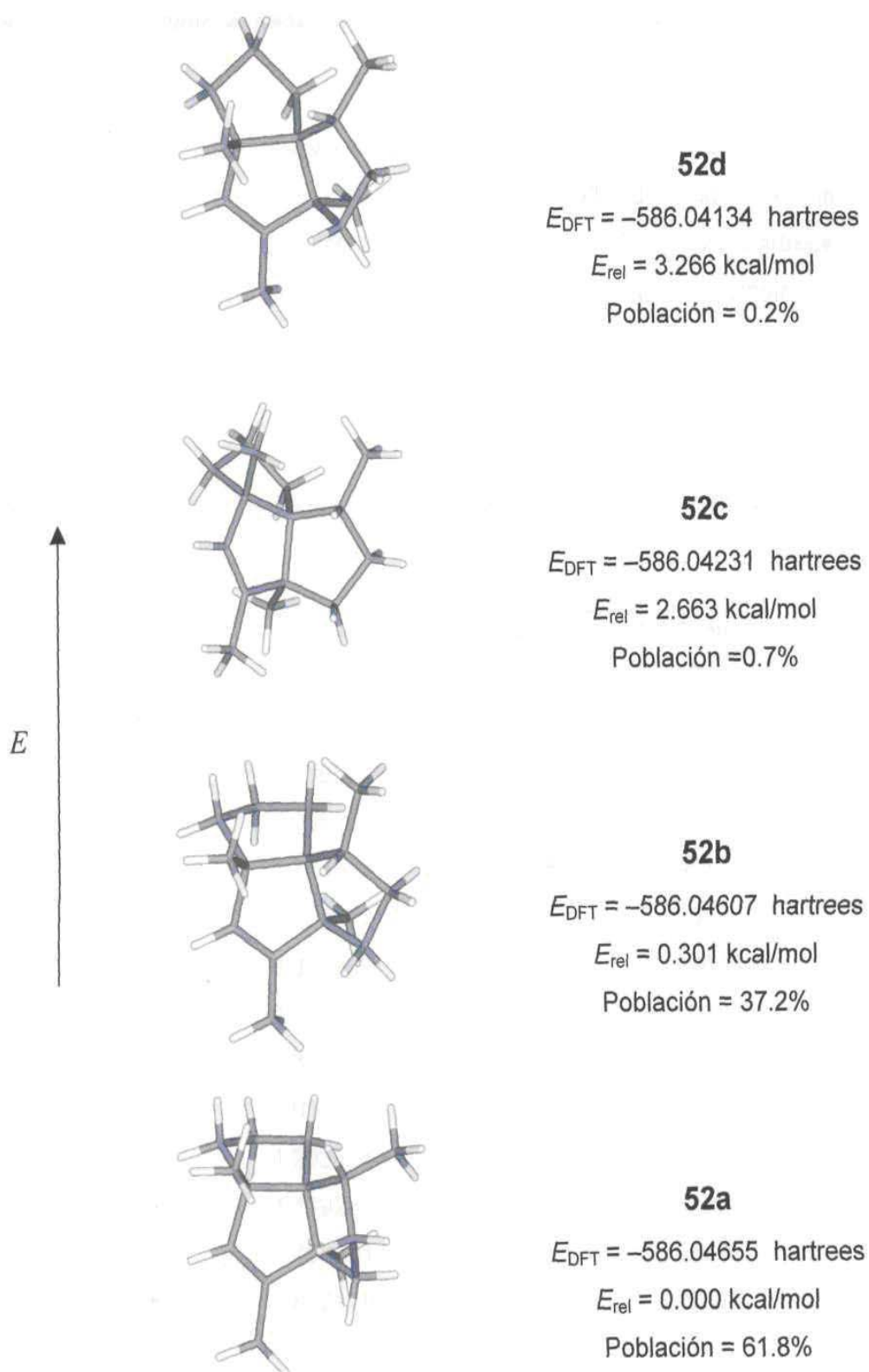
Átomo	X	Y	Z
C-1	2.175157	-1.316181	-0.082175
C-2	2.481417	0.043796	0.661249
C-3	1.637986	0.793812	-0.445385
C-4	2.049896	-0.408865	-1.365531
C-5	0.143529	1.160343	-0.267148
C-6	-0.763647	-0.084603	-0.158317
C-7	0.851244	-1.986877	0.358304
C-8	-0.309200	-1.120005	0.863326
C-9	-0.286122	1.960291	-1.517967
C-10	0.012423	2.069841	0.972918
C-11	3.232184	-2.431098	-0.097946
C-12	3.926706	0.446262	0.428352
C-13	3.447168	-0.078464	-1.899157
C-14	4.372130	0.407104	-0.845719
C-15	4.762729	0.869233	1.598856
C-1'	-3.146565	-0.374912	-0.211551
C-2'	-4.439656	0.240570	0.212771
C-3'	-5.619596	-0.385084	0.025474
C-4'	-4.380304	1.597944	0.879645
C-5'	-5.924313	-1.718698	-0.586005
O-1	3.761746	-0.198741	-3.073423
O-7	-2.999779	-1.416222	-0.827544
O-1'	-2.095406	0.392408	0.181724

A partir de las coordenadas cartesianas se obtuvieron los parámetros propuestos por Cremer y Pople, cuyos valores fueron los siguientes: el anillo de cuatro miembros formado por los átomos 4-5-11-10 únicamente está representado por el vector $Q = 0.378$ y nos indica que se encuentra plegado. Para el caso de los anillos de 6 y 7 miembros se encontraron dos posibilidades para cada uno, de acuerdo a los átomos que se consideren para la formación del anillo. En el caso del ciclo formado por los átomos 1-2-3-4-5-11, se tienen los parámetros: $Q = 0.847$, $\theta = 55.76^\circ$, y $\phi = 0.21^\circ$; para el anillo formado por los átomos 1-2-3-4-10-11, $Q = 0.795$, $\theta = 52.79^\circ$ y $\phi = 0.53^\circ$, en los dos casos el anillo tiene una conformación de semi-silla. Para el caso de los ciclos de 7 miembros se encontraron los siguientes parámetros: el anillo formado por los átomos 5-6-7-8-9-10-11: $Q = 0.972$, $Q(2) = 0.638$, $Q(3) = 0.734$, $\phi(1) = 250.45^\circ$ y $\phi(2) = 9-78^\circ$; anillo formado por los átomos 4-5-6-7-8-9-10: $Q = 0.998$, $Q(2) = 0.705$, $Q(3) = 0.707$, $\phi(1) = 46.88^\circ$ y $\phi(2) = 61.82^\circ$, esto permitió llegar a la conclusión de en ambos casos el anillo de 7 miembros tiene una conformación formada por la combinación de silla torcida, bote y bote torcido.

5.3.3 Análisis conformacional del α -isocomeno

El cálculo para el estudio conformacional del α -isocomeno (52), se inició con una minimización de la energía mediante mecánica molecular, usando el método Monte Carlo. De esta forma se obtuvieron 8 estructuras minimizadas, cuya energía oscilaba entre 1-10 kcal/mol. De aquí se eligieron 4 estructuras con un rango energético de 5 kcal/mol (Figura 71). La diferencia entre cada uno de los conformeros radica en la orientación que adopta el carbono que se encuentra fuera del plano en la conformación de sobre de los anillos A y B. Para el caso del conformero **52a**, considerando al anillo B como el plano de referencia, C-2 se encuentra por debajo y C-10 por arriba del plano. En el conformero **52b**, tanto C-2 como C-10 se encuentran por debajo del plano y, finalmente las conformaciones **52c** y **52d** son ligeramente diferentes a **52b** por pequeñas torsiones en los anillos.

Las estructuras de mínima energía encontradas se sometieron a cálculos de DFT obteniéndose así las estructuras optimizadas, las cuales se analizaron con el programa PCModel para conocer los valores de las constantes de acoplamiento calculadas para cada uno de los protones de los anillos del sistema. Se compararon los valores de las constantes de acoplamiento calculadas con las experimentales de H-9, que son las únicas que se pueden leer directamente del espectro de RMN de ^1H a 400 MHz por ser de primer orden. Los valores de las constantes de acoplamiento experimentales y las calculadas fueron muy similares para el caso del conformero **52a**, a diferencia con las obtenidas para los otros 3 conformeros. Esta similitud apoya que **52a** es el mínimo global del α -isocomeno.

Figura 71. Distribución conformacional del α -isocomeno (**52**).

Conformación del mínimo global del α -isocomeno obtenido mediante DFT

Se obtuvieron las coordenadas cartesianas para el conformero de mínima energía (**52a**) deducido mediante los cálculos de DFT ($E_{\text{DFT}} = -586.04655$ hartrees) (Tabla 7). Los valores de las coordenadas se emplearon para alimentar el programa RICON y obtener así los parámetros de Cremer y Pople.

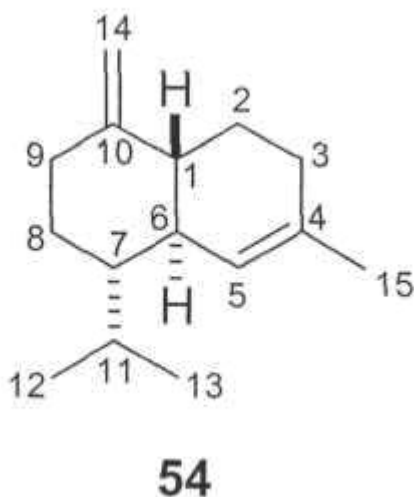
Tabla 7. Coordenadas cartesianas del mínimo global del α -isocomeno **52a** (A)

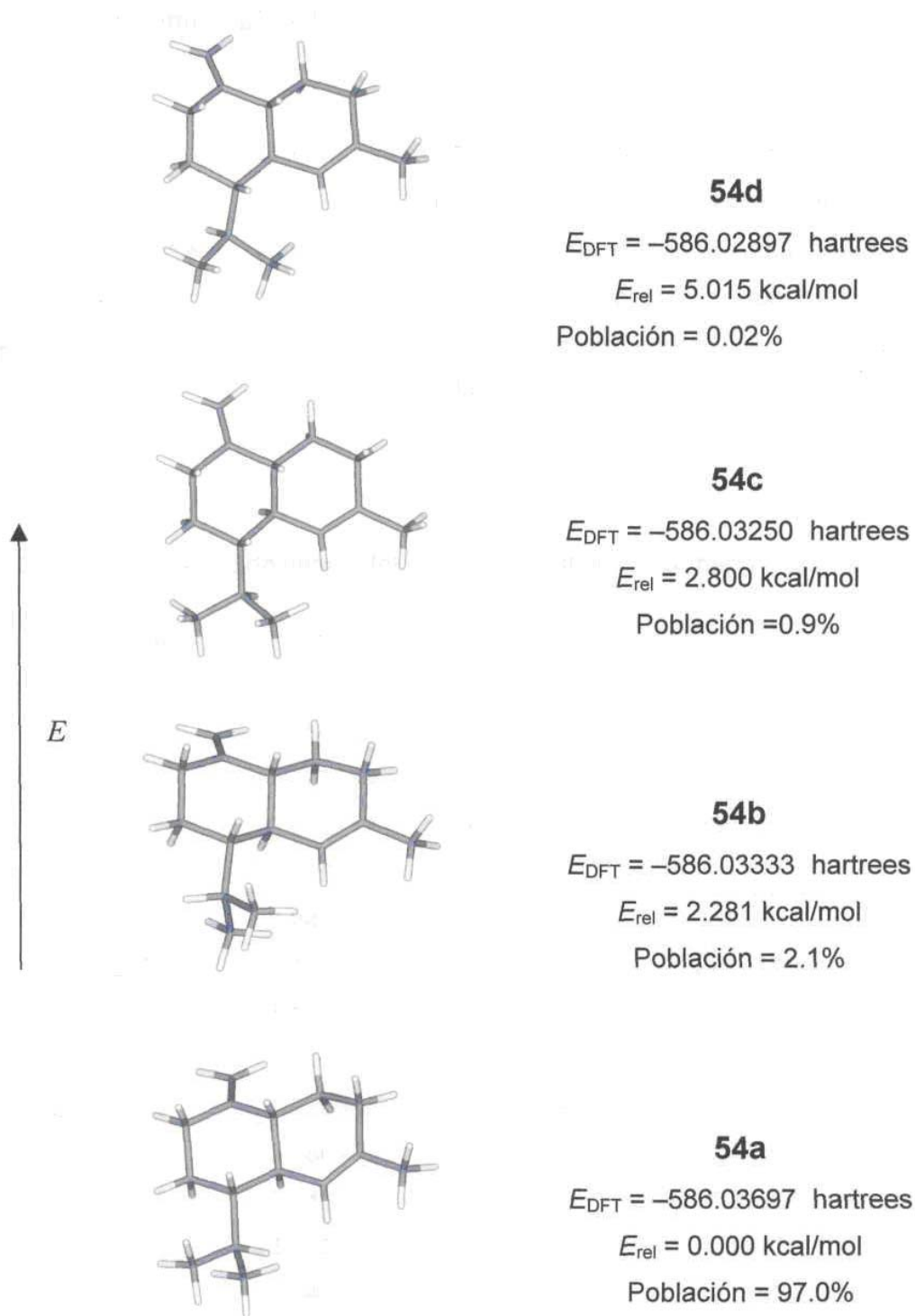
Átomo	X	Y	Z
C-1	-1.217401	-1.268524	-0.647591
C-2	-0.576339	-0.091777	0.157192
C-3	0.969046	-0.509706	0.319665
C-4	1.139529	-1.797088	-0.550009
C-5	-0.056281	-1.805438	-1.506993
C-6	1.731814	0.659385	-0.295135
C-7	3.234277	0.720092	-0.310598
C-8	0.916962	1.587659	-0.799898
C-9	-0.555315	1.320542	-0.622600
C-10	-1.308513	0.250636	1.480022
C-11	-1.014067	1.729774	1.755916
C-12	-1.293524	1.410956	-1.972026
C-13	-1.179283	2.352258	0.368509
C-14	1.453391	-0.793482	1.755649
C-15	-1.812179	-2.389313	0.225577

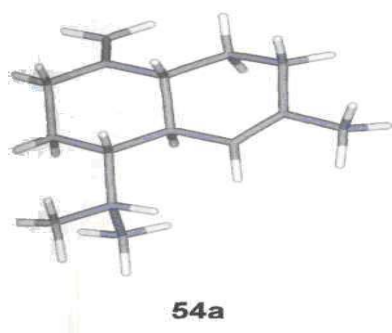
Los parámetros propuestos por Cremer y Pople nos permitieron conocer la conformación en la cual se encuentran los anillos de cinco miembros que forman al sistema del a-isocomeno en **52a**. Los valores obtenidos fueron los siguientes: anillo A: $Q = 0.416$ y $\phi = 5.81^\circ$; anillo B: $Q = 0.024$ y $\phi = 3.94^\circ$; anillo C: $Q = 0.408$ y $\phi = 9.87^\circ$. Al analizar dicha información podemos concluir que los anillos A y C se encuentran en una conformación intermedia entre sobre y sobre plegado. En el caso del anillo B, este presenta una conformación planar.

5.3.4 Análisis conformacional del γ -cadineno

Del análisis conformacional del γ -cadineno, siguiendo la misma metodología que para los sesquiterpenos 44, 58 y 52, se encontraron 4 estructuras de mínima energía (54a-54d) representadas en la Figura 72. Las cuatro estructuras representan isómeros conformacionales debidos al giro del grupo isopropilo (enlace sencillo entre C-7 y C-11). Además, el conformero de más alta energía (54d) presentó un cambio de la conformación adoptada por el anillo que contiene el doble enlace exocíclico, esto con respecto al conformero energéticamente más estable 54a.



Figura 72. Distribución conformacional del γ -cadineno (**54**).

Conformación del mínimo global del γ -cadineno obtenido mediante DFT

El conformero (**54a**) cuyo valor de energía fue de $E_{\text{DFT}} = -586.03697$ hartrees, representa la conformación de mínima energía que adopta el γ -cadineno. Este resultado se obtuvo de los cálculos de DFT, al igual que las coordenadas cartesianas de sus átomos (Tabla 8).

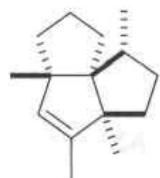
Tabla 8. Coordenadas cartesianas del mínimo global del γ -cadineno **54a** (A).

Átomo	X	Y	Z
C-1	-1.129708	2.442808	0.679481
C-2	-1.936019	1.223428	0.194971
C-3	-1.192644	-0.109393	0.418473
C-4	0.212217	-0.034547	-0.256342
C-5	1.015320	1.177148	0.301774
C-6	0.249538	2.462120	0.064981
C-7	2.452381	1.150806	-0.226714
C-8	3.183924	-0.112173	0.243566
C-9	2.345874	-1.362646	0.097045
C-10	1.026985	-1.305198	-0.135788
C-11	3.080497	-2.673203	0.224037
C-12	-2.043451	-1.346038	0.002062
C-13	-2.350085	-1.422763	-1.503230
C-14	-3.340305	-1.452105	0.823381
C-15	0.702807	3.504293	-0.638454

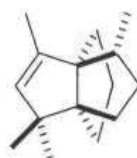
Se obtuvieron los parámetros propuestos por Cremer y Pople mediante el análisis de las coordenadas cartesianas de **54a** en el programa RICON.⁶⁴ Los valores obtenidos fueron los siguientes, anillo A: $Q = 0.578$, $\theta = 3.92^\circ$ y $\phi = 7.47^\circ$; anillo B: $Q = 0.498$, $\theta = 50.57^\circ$ y $\phi = 27.48^\circ$. De acuerdo a los parámetros encontrados el anillo A tiene una conformación de silla ligeramente distorsionada y el anillo B presenta una conformación de semi-silla.

6 CONCLUSIONES

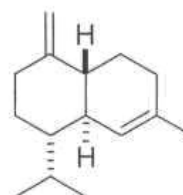
Se lograron separar e identificar 12 productos naturales (52-59, 63-64, 47 y 48) a partir del extracto hexánico de las raíces de *Stevia pilosa* Lag. El compuesto 56 es un producto natural nuevo y los compuestos 52, 53 y 55 no se habían aislado de especies de *Stevia*.



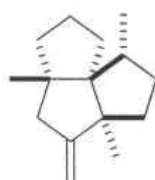
52



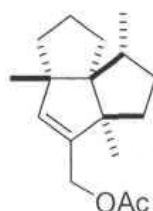
53



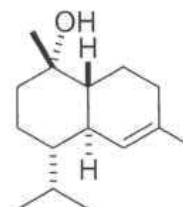
54



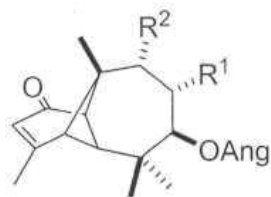
55



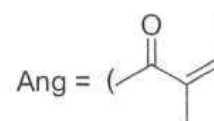
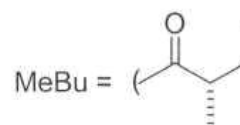
56



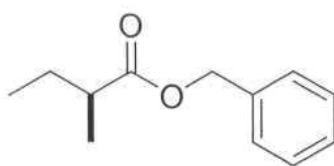
57



	R ¹	R ²
58	H	H
59	OAng	H
63	OMeBu	H
64	OAc	OAng
47	OAng	OH
48	OMeBu	OH

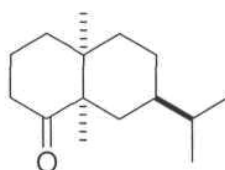


Se propuso una metodología para asignar la configuración absoluta del residuo α -metilbutanoico presente en derivados del longipineno, que se basa en separar la fracción de longipinenos, hidrólisis básica de la mezcla de longipinenos naturales, esterificación del ácido α -metilbutanoico obtenido con el alcohol bencílico y comparación de los datos físicos y espectroscópicos del éster obtenido con los datos del (S)-(+)- α -metilbutanoato de bencilo (82) preparado a partir del ácido (S)-(+)- α -metilbutanoico comercial.



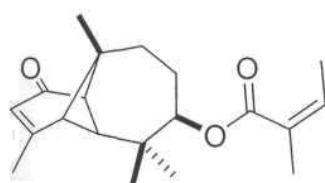
82

La (-)-valeranona (44) aislada de *Stevia tomentosa* H.B.K. se estudió conformacionalmente, tanto de manera experimental como teórica, lográndose asignar por completo los espectros de RMN de ^1H y de ^{13}C mediante simulación espectral y experimentos de RMN en dos dimensiones.

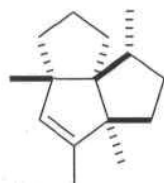


44

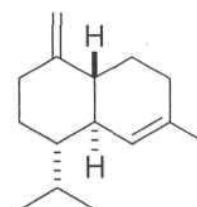
Por otro lado, se llevó a cabo el estudio conformacional de otros sesquiterpenos representativos de *Stevia pilosa* Lag., como fueron el de (4R,5S,7R,10R,11R)-7-angeloiloxilongipin-2-en-1-ona (58), el α -isocomeno (52) y el γ -cadineno (54)



58



52



54

7 PARTE EXPERIMENTAL

7.1 Generalidades

Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo empleando gel de sílice Merck 0.040-0.063 mm (230-400 mesh ASTM), en columnas de vidrio de 1.5, 2.5 y 5 cm de diámetro interno por 40 y 60 cm de largo. La separación por placa se realizó en cromatofolios de gel de sílice sobre aluminio de 2.5 x 5 cm. Para las separaciones mediante cromatografía de líquidos se empleó un equipo compuesto por una bomba Varian Prostar 215, un detector UV Varian Prostar 320 operando a 260 nm, y una columna ChromSpher 5 Si de 250 mm de largo x 4.6 mm de diámetro interno, así como también un cromatógrafo Perkin Elmer Serie 200 usando una columna de fase reversa Dynamax C 18 de 10 mm de diámetro interno x 250 mm de largo + 100 mm (pre-columna) empleando un detector UV a 254 nm.

Los espectros de masa se determinaron en un espectrómetro Hewlett Packard 5989-A, acoplado a un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 Series II, mediante impacto electrónico a 70 eV. Los espectros de IR se determinaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer 2000 FT-IR en CHCl_3 .

Los espectros de ^1H a 400 MHz y de ^{13}C a 100 MHz, así como los espectros HMQC y HMBC se determinaron en un equipo eclipse JEOL 400; y los espectros de ^1H a 300 y ^{13}C a 75.4 MHz se determinaron en un equipo Varian Mercury 300, usando CDCl_3 como disolvente y TMS como referencia interna.

Para la separación de algunos de los compuestos se empleó gel de sílice y cromatofolios impregnados con AgNO_3 al 20%, para lo cual, la técnica a seguir fue la siguiente.

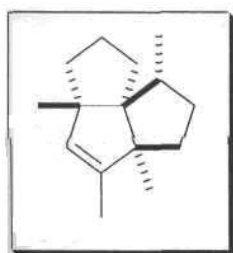
Preparación de gel de sílice impregnada con AgNO₃ al 20%. Se disolvieron 1.5 g de AgNO₃ en 40 mL de CH₃CN. La solución preparada se agregó a 8.5 g de gel de sílice, esta mezcla se concentró en el rotavapor hasta sequedad y la gel de sílice resultante se guardó en un frasco ámbar.

Preparación de las placas impregnadas con AgNO₃ al 20%. Se preparó una solución de 850 mg de AgNO₃ en 6 mL de CH₃CN, se impregnaron las placas con la solución y se secaron con aire caliente antes de aplicar la muestra.

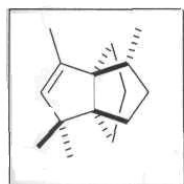
Cálculos de Modelado Molecular. Las estructuras se ensamblaron y minimizaron inicialmente mediante cálculos moleculares con el campo de fuerza Merck (MMFF94) como se encuentra implementado en el software de modelado molecular Spartan'02 de la compañía Wavefunction (Irvine, CA).⁶⁴ Una búsqueda sistemática de conformeros para ambos anillos de seis miembros se llevó a cabo con ayuda de modelos Dreiding considerando los movimientos de ángulos de torsión de cerca de 30°. Los valores de E_{MMFF} se emplearon como criterio de convergencia y la búsqueda se realizó de acuerdo con el protocolo Monte Carlo⁶⁵ considerando un corte de 10 kcal/mol sobre el mínimo global. De acuerdo con este rango, se encontraron 14 conformaciones en donde se analizó la geometría seleccionando aquellas que se encontraban en un rango de 5 kcal/mol las cuales se sometieron a cálculos de teoría de funcionales de la densidad (DFT/B3LYP/6-31G*)⁶⁶⁻⁶⁷ en el programa Spartan'02. Los parámetros de Cremer y Pople se calcularon con el programa RICON.⁶⁸ Las conversiones de los ángulos diedros en constantes de acoplamiento vecinales ³J(H-H) para cada conformero se hicieron usando el programa Altona.⁶⁹ La simulación espectral se llevó a cabo empleando la versión 2.3 del programa MestRe-C.⁷⁰

7.2 Obtención y separación cromatográfica del extracto hexánico de las raíces de *Stevia pilosa* Lag.

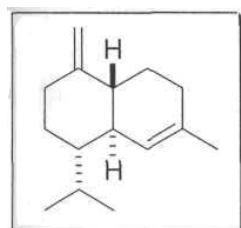
Las raíces secas y molidas (1.1 kg) se sometieron a reflujo con hexano durante 6 h, este proceso se repitió 3 veces, se filtró y se concentró en rotavapor, obteniéndose un aceite amarillo viscoso (65 g), el cual se disolvió en 250 ml de MeOH a 50 °C, se llevó a temperatura ambiente y luego a 0 °C durante 12 h, con lo cual se logró precipitar el material graso que se eliminó por filtración. La solución obtenida se concentró nuevamente en el rotavapor para obtener el extracto desgrasado. Una alícuota del aceite amarillo obtenido (5 g) se cromatografió sobre gel de sílice (120 g). Se colectaron eluatos de 20 ml usando hexano (1 L), mezclas de hexano-AcOEt (9:1, 600 mL), hexano-AcOEt(4:1, 1 L), hexano-AcOEt (1:1, 500 mL) y AcOEt (100 mL).



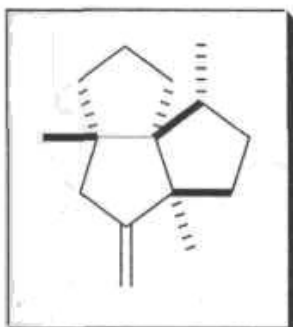
α -Isocomeno (52).²¹⁻²³ Los eluatos 9-14 (446 mg) se recromatografiaron mediante CC (2 cm d.i.) usando gel de sílice impregnada con AgNO₃ (20%) y empleando hexano como **efuente**. Se colectaron fracciones de 2 ml. En los eluatos 21-37 se obtuvo una mezcla de sesquiterpenos, los cuales se separaron en CCF impregnadas con AgNO₃ usando pentano como eluyente, permitiendo purificar y caracterizar al α -isocomeno (52) (R_f 0.86). $[\alpha]_D^{20} = -70.3$ (c 0.23, CHCl₃) (miel transparente, 20 mg, 4.5%). EIMS: m/z (rel. int.) = 204 [M]⁺ (61), 189 (94), 162 (99), 147 (70), 133 (66), 119 (100), 105 (98), 94 (90), 79 (50), 67 (26), 55 (39), 51 (11). RMN de ¹H/¹³C, ver Tabla 9.



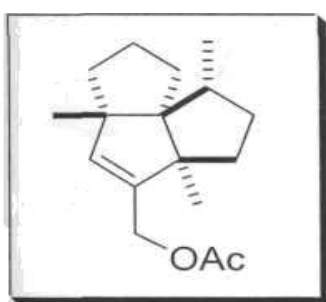
Modefeno (53).²⁴⁻²⁵ Se aisló de la misma forma que 52 (R_f 0.69), (miel transparente, 5 mg, 1.2 %). EIMS: m/z (rel. int.) = 204 [M]⁺ (17), 189 (17), 175 (6), 162 (100), 147 (46), 133 (19), 119 (30), 105 (22), 91 (20), 79(11), 67(6), 55(9).



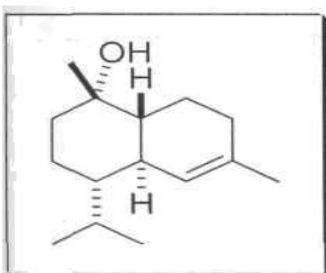
γ -Cadineno (54).²⁶⁻²⁷ Se aisló de los eluatos 17-22, como una miel transparente, (112 mg, 25%). $[\alpha]_D^{20} = +122.3$ (c = 0.11, CHCl₃). RMN de ¹H/¹³C, ver Tabla 10.



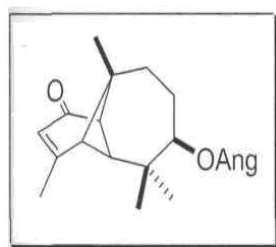
β -Isocomeno (55).^{28,29} A partir de las fracciones 42-46 se obtuvo el β -isocomeno (miel transparente, 19 mg, 4.2%) % $[\alpha]_D^{20} = -83.0$ (c 0.11, CHCl_3). IR(CHCl_3): $\nu_{\text{max}} = 3075, 2944, 2871, 1732, 1655, 1460, 1376, 1271, 1122, 877$ cm^{-1} . EIMS: *miz* (rel. int.) = 204 $[\text{M}]^+$ (15), 189 (31), 175 (7), 161 (21), 147 (31), 133 (27), 121 (34), 108 (100), 105 (36), 93 (49), 79 (44), 67 (33), 55 (40). RMN de ^1H y ^{13}C , ver Tabla 9.



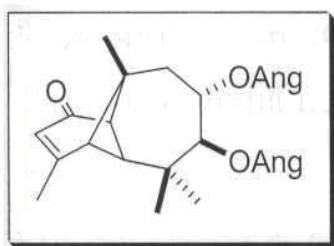
14-Acetoxyisocomeno (56). Las fracciones 57-65 se sometieron a una recromatografía empleando gel de sílice impregnada con AgNO_3 (20%) y hexano como eluyente (columna de 2.5 d.i.) y colectando eluatos de 5 ml. De las fracciones 23-37 se obtuvo este compuesto nuevo (56) como una miel transparente (263 mg, 57.8%). EIMS: *miz* (rel. int.) = 220 $[\text{M}]^+$ (26), 205 (10), 189 (40), 178 (100), 163 (31), 145 (36), 133 (19), 119 (23), 105 (26), 91 (24), 77 (14), 55 (14). RMN de ^1H y ^{13}C , ver Tabla 9.



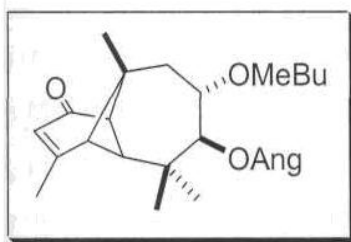
α -Cadinol (57).³⁴ Se aisló y purificó de las fracciones 66-75. (Miel transparente, 219 mg, 4.4%). $[\alpha]_D^{20} = +3.4$ (c 1.3, CHCl_3). EIMS: *miz* (rel. Int.) = 204 $[\text{M}]^+$ (50), 189 (19), 176 (4), 161 (100), 147 (5), 134 (16), 119 (20), 105 (25), 95 (13), 81 (20), 67 (5), 55 (4), 43 (11). RMN de ^1H y ^{13}C , ver Tabla 10.



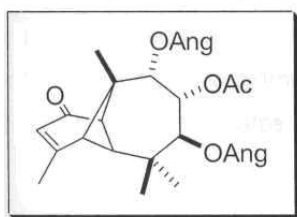
(4R,5S,7R,10R,11R)-7-Angeloiloxilongipin-2-en-1-ona (58).³⁵ Las fracciones 99-137 se reunieron (1.25 g) para su cromatografía en columna usando hexano-AcOEt 19:1, colectando fracciones de 10 mL. La mezcla contenida en los eluatos 165-211 se purificó mediante CCF (hexano-AcOEt 19:1, 18 desarrollos) de donde se logró purificar al compuesto 58 (22 mg, R_f 0.74). RMN de ^1H y ^{13}C , ver Tabla 11



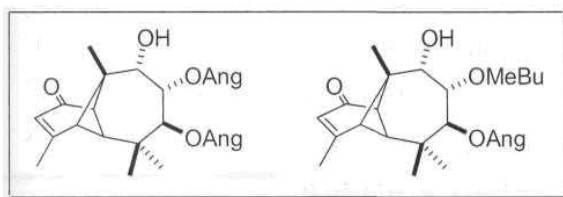
(4R,5S,7S,8S,10R,11R)-7,8-Diangeloiloxilongipin-2-en-1 - ona (59).35-36 Se aisló y purificó de la misma forma que 58 (17 mg) mostrando un Rf de 0.64. RMN de 1H y 13C, ver Tabla 11.



(4R,5S,7S,8S,10R,11R,2'S)-7-Angeloiloxi-8-(α -metilbutiroiloxi)-longipin-2-en-1-ona (63).39 La mezcla presente en las fracciones 238-280 (142 mg) se purificó mediante CLAR (MeOH-H₂O, flujo de 4.5 mL min⁻¹, inyectando 2.5 mg) lo cual permitió purificar al compuesto 60 (1 mg) con Rt de 82 min. RMN de 1H y 13C, ver Tabla 11



(4R,5S,7S,8R,9S,10R,11R)-8-Acetoxi-7,9-diangeloiloxilongipin-2-en-1-ona (64).3640 El compuesto 61 (126 mg) se aisló de las fracciones 324-329. RMN de 1H y 13C, ver Tabla 11.

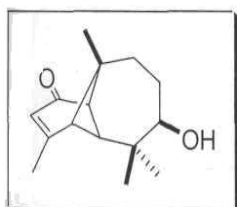


Las fracciones 146-148 proporcionaron los derivados del longipineno 47 y 48 (109 mg).363941-42 RMN de 1H y 13C, ver Tabla 11.

7.3. Determinación de la configuración absoluta del residuo (S)-(+)- α -metilbutiroilo

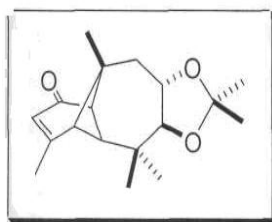
7.3.1 Síntesis parcial de derivados del longipineno con el residuo (S)-(+)- α -metilbutiroilo

Hidrólisis del extracto hexánico. Del extracto se tomaron 2 g y se disolvieron en 20 mL de MeOH, a esta solución se agregaron 2 g de KOH disueltos en la mínima cantidad de agua, la solución se sometió a agitación y reflujo durante 30 min. Transcurrido el tiempo, la reacción se concentró a $\frac{3}{4}$ partes, se vertió sobre hielo-H₂O y se extrajo con AcOEt, se lavó varias veces con H₂O, se secó con Na₂SO₄ anhidro y se evaporó a sequedad, obteniéndose 1.10 g de una miel amarilla transparente. La reacción de hidrólisis se repitió tres veces más para obtener un total de 4.06 g del producto. El producto de la reacción se separó mediante cromatografía rápida empleando una columna de 4 cm de diámetro interno y una mezcla hexano:AcOEt (1:1) como eluente. Se colectaron 100 eluatos de 20 mL.



(4R,5S,7R,10R,11fR)-7-Hidroxilongipin-2-en-1-ona (65)

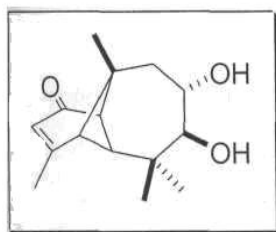
Se obtuvo de los eluatos 22 a 31 como una miel transparente. RMN de ¹H (400 MHz): δ 5.75 (1H, s, H-2), 3.56 (1H, *d*, H-7), 2.73 (1H, *d*, *J* = 7.0, H-11), 2.68 (1H, *d*, H-4), 2.20 (1H, s, H-5), 2.02 (3H, s, Me-15), 0.96 (3H, s, Me-14), 0.95 (3H, s, Me-12), 0.95 (3H, s, Me-13).



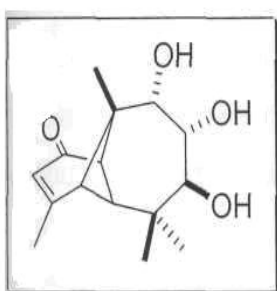
Acetónido del diol (67). Se obtuvo de los eluatos 6-7 durante la recromatografía de 63, en donde se empleó una mezcla de hexano:AcOEt 2:1 como eluyente inicial y

se aumentó gradualmente la polaridad. RMN de ¹H (400 MHz): δ 5.80 (1H, s, H-2), 4.04 (1H, *ddd*, H-8), 3.53 (1H, *d*, *J* = 7.0, H-7), 2.85 (1H, *d*, *J* =, H-11), 2.68 (1H, *d*, H-4), 2.70 (1H, *dd*, H-9 β), 2.10 (1H, s, H-5), 2.04 (H₃, *d*, Me-15), 1.72 (1H, *dd*, *J* = H-9 α), 1.43 y 1.40 (3H, s, Me-acetónido), 1.20 (3H, s, Me-12), 1.12 (6H, s, Me-12, 13). RMN de ¹³C (100 MHz): δ 204.0 (C-1), 171.2 (C-3), 123.0

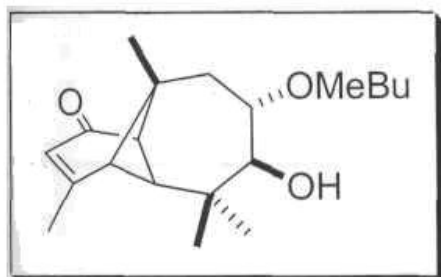
(C-2), 108.8 (C-acetónido), 84.5 (C-7), 73.3 (C-8), 65.8 (C-5), 58.0 (C-11), 52.5 (C-10), 49.5 (C-4), 42.1 (C-9), 34.0 (C-6), 27.0 (C-Me acetónido), 26.8 (Me-14), 24.3(Me-15), 23.2 (Me-12).



(4R,5S,7S,8S,10R,11R)-7,8-Dihydroxylongipin-2-en-1-ona (66). En las fracciones eluidas con hexano-AcOEt (1.5:1), se obtuvieron 111 mg de cristales de p.f. 156-159 °C. RMN de ^1H y ^{13}C , ver Tabla 12.

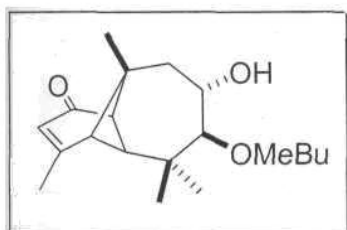


(4R,5S,7S,8R,9S,10R,11R)-7,8,9-Trihydroxylongipin-2-en-1-ona (68). Se obtuvo de los eluatos 84 a 100, p.f. 164.5-166.5 °C. RMN de ^1H ver Tabla 13.

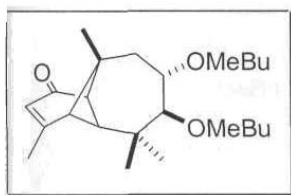


(4R,5S,7S,8S,10R,11R,2'S)-7-Hidroxi-8-(α -metilbutiroiloxi)-longipin-2-en-1-ona (69). Un total de 111 mg del diol 66 se disolvieron en 10 mL de CH_2Cl_2 , después se agregaron 226 mg de dicitohexilcarbodiimida y 4 mg de 4-N,N-dimetilaminopiridina, posteriormente se agregó a la solución 77 mg del ácido

carboxílico. La reacción se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 3 h, se filtró y se concentró. Como producto se obtuvo una miel transparente con aproximadamente un 50% del compuesto 69 y el resto de materia prima, por lo tanto, el producto se recromatografió, empleando como eluente una mezcla de hexano:AcOEt (3:1). En los eluatos 7-11 se obtuvo el compuesto **69** (72 mg). RMN de ^1H ver Tabla 12.

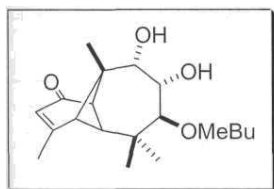


(4R,5S,7S,8S,10R,11R,2'S)-8-Hidroxi-7-(α -metilbutiroiloxi)-longipin-2-en-1-ona (71). Se obtuvo como subproducto de la reacción en las fracciones 3 y 4 durante la obtención de 69.

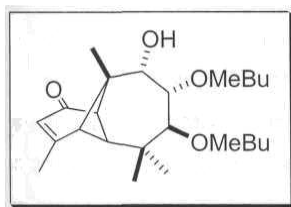


(4R,5S,7S,8S,10R,11R,2''S)-7,8-Di(α-metilbutiroiloxi)-longipin-2-en-1-ona (72).³⁹ En las fracciones 12-16, se obtuvo como subproducto de la reacción para la obtención de 69. RMN de ¹H, ver Tabla 12.

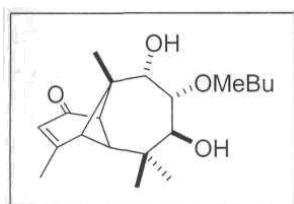
Esterificación de 68 con el ácido (S)-(+)-α-metilbutanoico. En este caso se probaron dos lotes de 200 mg de 68. En cada uno, el compuesto se disolvió en 10 mL de CH₂Cl₂, después se agregaron 387 mg de dicitclohexilcarbodiimida, 4 mg de 4-*N,N*-dimetilaminopiridina y 77 mg del ácido carboxílico. Uno de los lotes se dejó a temperatura ambiente durante 2 h y el otro se mantuvo a 4 °C durante 72 h. Transcurrido el tiempo de reacción, cada lote se filtró, se concentró y se cromatografió mediante la técnica de cromatografía rápida en una columna de 2 cm de diámetro usando una mezcla de hexano-AcOEt (2:1) y colectando eluatos de 20 mL.



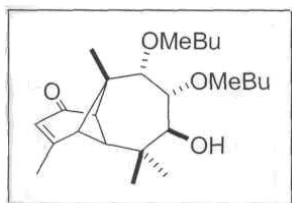
(4r,5s,7S,8S,9S,10R,11R,R,2''S)-8,9-Dihidroxi-7-(α-metilbutirol)-longipin-2-en-1-ona (73). En el caso del lote que se trató a temperatura ambiente, en los eluatos 6-7 se obtuvo el compuesto 73 (35 mg). RMN de ¹H y ¹³C, ver Tabla 13.



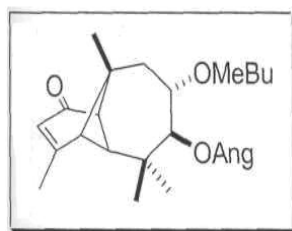
(4R,5S,7S,8S,9S,10R,11R,2''S)-8-Hidroxi-7,8-di(α-metilbutiroiloxi)-longipin-2-en-1-ona (74). Se obtuvo también del lote tratado a temperatura ambiente en los eluatos 11-42 (156 mg). RMN de ¹H y ¹³C, ver Tabla 13.



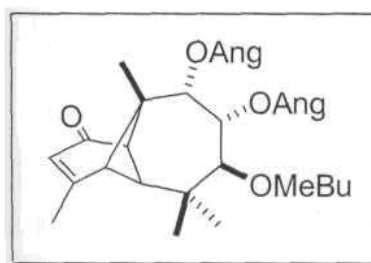
(4R,5S,7S,8R,9S,10R,11f?,2''S)-7,9-Dihidroxi-8-(α-metilbutiroiloxi)-longipin-2-en-1-ona (70). Del lote que se trató en condiciones de baja temperatura, en la fracción que contenía los eluatos 8-10 se obtuvo el compuesto **70** (130 mg). RMN de ¹H, ver Tabla 13.



(4R,5S,7S,8R,9S,10R,11R,2''S)-7-Hidroxi-8,9-di-(α -metilbutiroiloxi)-longipin-2-en-1-ona (75). Se aisló en mezcla con 67 (21 mg) en los eluatos 4-6. RMN de ^1H y ^{13}C , ver Tabla 14.

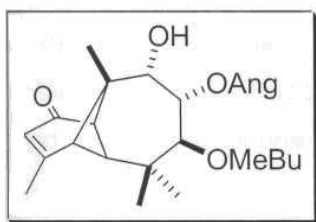


(4R,5S,7S,8S,10R,11R,2''S)-7-Angeloiloxi-8-(α -metilbutiroiloxi)-longipin-2-en-1-ona (63). A un lote del compuesto 69 (110 mg) disuelto en 10 mL de CH_2Cl_2 se adicionaron 850 mg del cloruro de angeloílo y se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 48 h diámetro. Posteriormente, se hizo una cromatografía rápida, empleando una columna de 2 cm de diámetro, eluyendo con hexano y luego con mezclas de hexano:AcOEt. En los eluatos 27-60 (hexano:AcOEt, 9:1) se obtuvo en mezcla (56 mg) con los compuestos 76 y 77 en una relación 1:3:1 respectivamente.



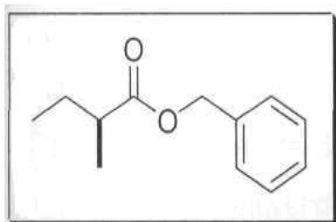
(4R,5S,7S,8R,9S,10R,11R,2''S)-8,9-Diangeloiloxi-7-(α -metilbutiroiloxi)-longipin-2-en-1-ona (78). A un lote de 70 (90 mg) disuelto en 1.0 mL de CCl_4 y 1.0 mL de CH_2Cl_2 se agregaron 30 mg del cloruro de angeloílo, la mezcla se dejó a temperatura ambiente durante 16 h.

Posteriormente, se extrajo con AcOEt, se lavó con solución saturada de NaHCO_3 y H_2O , se secó sobre Na_2SO_4 anhidro, se filtró y evaporó a sequedad, para obtener 73, el cual se analizó por RMN de ^1H . A este compuesto (73) se agregaron 335 mg del cloruro y se dejó a temperatura ambiente 48 h. Transcurrido el tiempo de reacción se extrajo de la misma forma que el producto anterior y se cromatografió, empleando una columna de 2 cm de diámetro y eluyendo con mezclas de hexano:AcOEt (3:1, 200 mL), hexano:AcOEt (2:1, 150 mL) y hexano:AcOEt (1:1, 100 mL). En la fracción que contenía los eluatos 8-13 se encontró una mezcla de los compuestos 78 y 79.

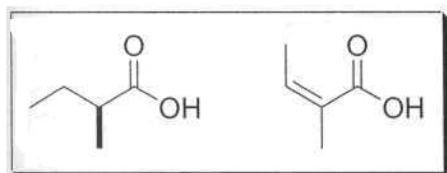


(4R,5S,7S,8S,9S,10R,11R,2''S)-8-Angeloiloxi-9-hidroxi-7-(a-metilbutiroiloxi)-longipin-2-en-1-ona (79). Se obtuvo de la misma fracción que **78** y también en los eluatos 19-24. RMN de ^1H y ^{13}C , ver Tabla 14.

7.3.2 Correlación química con el (S)-(+)- α -metilbutanoato de bencilo

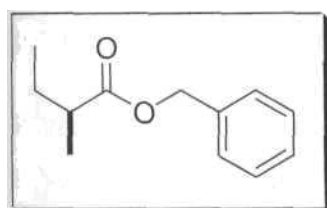


(S)-(+)- α -Metilbutanoato de bencilo (82). Una solución de alcohol bencílico (159 mg) en CH_2Cl_2 (10 mL) se trató con una solución 0.1 M de dicitclohexilcarbodiimida (DCC, 0.24 mL), 1 mg de 4-N,N-dimetilaminopiridina (DMAP) y ácido (S)-(+)- α -metilbutanoico (100 mg). La reacción se dejó a temperatura ambiente durante 5 h, se filtró y se concentró. El producto se cromatografió a través de una columna de 2 cm de diámetro empleando la técnica de cromatografía rápida y utilizando como eluente hexano. Se colectaron eluatos de 20 mL. De los eluatos 12 a 26 se obtuvieron 94 mg. $[\alpha]_D^{20} = +11.6$ (c 1.87, CHCl_3). IR (CHCl_3): $\nu_{\text{max}} = 2968, 1735, 1456, 1182, 1147 \text{ cm}^{-1}$. EIMS: m/z (rel, int.) = 192 $[\text{M}]^+$ (16), 108(22), 91 (100), 77 (8), 65 (16), 57 (34). RMN de ^1H (400 MHz): 5.740-7.30 (5H, *m*, H2 a H6), 5.12 (2H, *s*, H7), 2.43 (1H, *sext*, $J = 7.0$, H2'), 1.71 (1H, *m*, H3'a), 1.49 (1H, *m*, H3'b), 1.17 (3H, *d*, $J = 7.0$, Me5'), 0.90 (3H, *f*, $J = 7.3$, Me4'). RMN de ^{13}C (100 MHz): 8 176.5 (C1¹), 136.2 (C1), 128.5 (C2, C6), 128.1 (C3, C4, C5), 66.0 (C7), 41.1 (C2¹), 26.8 (C3¹), 16.6 (C5¹), 11.6 (C4¹).



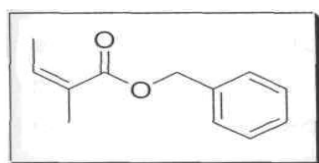
Mezcla de ácidos α -metilbutanoico y angélico. Una alícuota de 10 g del extracto hexánico de las raíces de *S. pilosa* Lag. se cromatografió en una columna de 5 cm de diámetro usando la técnica de cromatografía rápida y empleando como eluentes hexano, hexano-AcOEt (9:1) y hexano-AcOEt (8:2). De cada polaridad se colectaron eluatos de 1 L. En los eluatos hexano-AcOEt (8:2 y 1:1) se obtuvo una mezcla de longipinenos, que mostró como productos mayoritarios esterres del ácido angélico y metilbutírico. Dichos eluatos se juntaron (7.2 g) y se

sometieron a hidrólisis básica con KOH durante 20 min a temperatura ambiente. El producto de la reacción se extrajo con AcOEt, la fase acuosa se acidificó con HCl hasta un pH de 3.0 y se extrajo con CH₂Cl₂, obteniéndose como producto 688 mg de una mezcla de ácidos.



α -Metilbutanoato de bencilo proveniente de la hidrólisis de los esteres naturales. Una solución de alcohol bencílico (1.46 g) en CH₂Cl₂ (10 mL) se trató con una solución 0.1 M de DCC (2.2 mL), 1 mg de DMAP y la mezcla de ácidos obtenida a partir de la hidrólisis de

los esteres naturales (687 mg). La mezcla de reacción se dejó a temperatura ambiente durante 16 h. Posteriormente se filtró y se concentró. El producto se cromatografió a través de una columna de 2 cm de diámetro, colectando eluatos de 5 ml_ y eluyendo con hexano (600 ml_) y luego con hexano-AcOEt (19:1, 250 ml_). En los eluatos 150 a 158 (483 mg) se observó una mezcla de los esteres angelato, metilbutirato e isovalerato de bencilo. Una parte de esta mezcla (87 mg) se separó mediante CLAR usando como eluyente una mezcla de hexano-AcOEt (99:1), flujo de 3 mL/min y $X = 260$ nm. Se inyectaron 2.9 mg/30 μ l_ y se colectaron 7 eluatos (A-G) de los cuales B ($t_R = 1.82$ min) contenía el α -metilbutanoato de bencilo (10 mg, 11%) de forma pura. $[\alpha]_D^{20} = +11.6$ (C 0.2, CHCl₃).



Angelato de bencilo (83). Se aisló en mezcla con el α -metilbutanoato natural, como una aceite transparente (4 mg, 5%). IR (CHCl₃): $\nu_{max} = 2956, 1710, 1650, 1226, 1206$ cm⁻¹. UV X_{max} (EtOH): 217 nm (log s 3.80). EIMS:

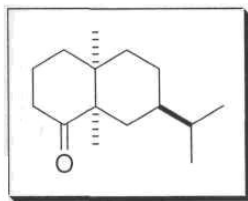
m/z (rel. int.) = 190 [M]⁺ (3), 172 (26), 145 (13), 91 (100), 83 (52), 55 (36). RMN de ¹H (300 MHz): 8 7.40-7.30 (5H, *m*, H-2 a H-6), 6.08 (1H, *qq*, $J = 7.1$ y 1.5 Hz, H3'), 5.19 (2H, *s*, H7), 1.98 (3H, *dq*, $J = 7.1$ y 1.5 Hz, Me5'), 1.91 (3H, *quint*, $J = 1.5$, Me4'). RMN de ¹³C (75.4 MHz): 5 167.8 (CV), 138.4 (C3'), 136.3 (C1), 128.5 (C2, C6), 128.0 (C3, C4, C5), 127.7 (C2¹), 65.8 (C7), 20.6 (C5'), 15.8 (C4').

7.4 Cálculos de modelado molecular de los sesquiterpenos aislados de *Stevia pilosa* Lag. y *S. tomentosa* H.B.K.

Los cálculos de modelado molecular de los cuatro sesquiterpenos seleccionados para llevar a cabo su estudio conformacional, se realizaron de acuerdo a la información proporcionada en las generalidades.

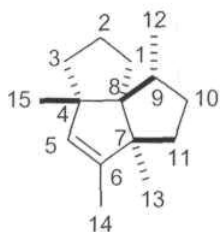
Para el caso de los especímenes colectados de *S. tomentosa* H.B.K. y el aislamiento de (-)-valeranona, se describen a continuación sus generalidades.

Especímenes. Los especímenes de *Stevia tomentosa* H.B.K. fueron colectados en El Guajolote, Epazoyucan, Estado de Hidalgo, México, en octubre del 2001 y fueron identificados por el Dr. Jerzy Rzedowski (Herbario del Instituto de Ecología A. C, Pátzcuaro, Michoacán, México), [(M. Torres Valencia 6 (IEB)]

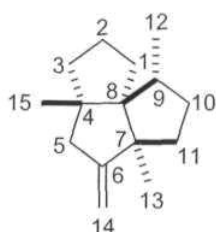


Las raíces secas (1.45 kg) de *Stevia tomentosa* H.B.K. se extrajeron con hexano proporcionando un aceite amarillo viscoso (5.0 g), el cual se disolvió en MeOH a 50 °C, se refrigeró a 0 °C durante 12 h y se filtró para remover las grasas presentes. El filtrado se evaporó bajo vacío y se obtuvo así un aceite amarillo claro (2.0 g) el cual se sometió a cromatografía en columna empleando gel de sílice 60 (Aldrich, 230-400 mesh). Se colectaron fracciones de 20 mL usando hexano (200 mL), mezclas de hexano-AcOEt (4:1, 500 mL; 3:1, 400 mL; 2:1, 300 mL, 1:1, 100 mL) y AcOEt (100 mL). Las fracciones 1-10, eludías con hexano, y las fracciones 11-29, eludías con hexano-AcOEt (4:1), se juntaron y evaporaron bajo vacío proporcionando un residuo aceitoso (250 mg), el cual se purificó por cromatografía flash en gel de sílice eluyendo con hexano-AcOEt (4:1, 150 mL). Se colectaron fracciones de 5 mL en donde se obtuvo 44 como un aceite incoloro (38 mg, 1.9 %) de las fracciones 17-20. El compuesto (-)-valeranona (44) se identificó por comparación de sus espectros de RMN de ^{13}C con los valores de las señales asignadas y por comparación del valor de su rotación óptica ($[\alpha]_{\text{D}} = -33^{\circ}$, c 0.24, EtOH) con el valor reportado ($[\alpha]_{\text{D}} = -40.7^{\circ}$, c 0.87, EtOH).

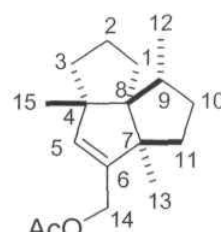
Tabla 9. Datos de RMN de ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz) de α -isocomeno (52), β -isocomeno (55) y 14-acetoxiisocomeno (56), δ en ppm, disolvente CDCl_3 , referencia interna TMS.



52



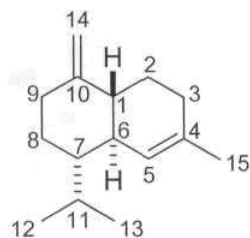
55



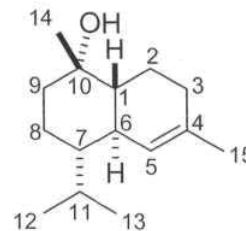
56

^1H	52	55	56	^{13}C	52	55	56
5	4.85 <i>s ancho</i>	2.34 <i>t</i>	5.21 <i>s</i>	1	-	24.0	33.4
5'	-	2.10 <i>d</i>	-	2	24.0	30.3	24.0
9	2.00 <i>quintd</i>	2.00 <i>sext</i>	-	3	42.6	41.7	42.5
12	0.85 <i>d</i>	0.93 <i>d</i>	0.86 <i>d</i>	4	56.6	49.5	57.0
13	1.03 <i>s</i>	1.10 <i>s</i>	1.09 <i>s</i>	5	132.7	48.0	135.8
14	1.55 <i>d</i>	4.62 <i>q</i>	4.56 <i>s</i>	6	142.8	162.3	141.2
14'	-	4.61 <i>q</i>	-	7	59.9	54.9	59.2
15	1.04 <i>s</i>	0.99 <i>s</i>	1.08 <i>s</i>	8	63.8	66.8	64.6
Me-Ac			2.08 <i>s</i>	9	39.9	40.5	39.7
				10	32.0	34.6	32.2
				11	37.3	42.9	38.4
				12	17.3	18.0	17.3
				13	24.0	23.5	23.5
				14	13.0	100.8	61.7
				15	23.7	24.2	23.5
				Me-Ac			21.2

Tabla 10. Datos de RMN de ^1H (400 MHz) y ^{13}C del γ -cadineno (54) y α -cadinol (57) δ en ppm, disolvente CDCl_3 , referencia interna TMS.



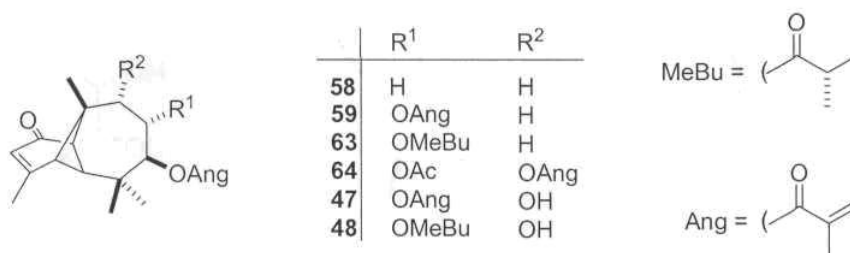
54



57

^1H	54	57	^{13}C	54	57
1	-	-	1	23.3	46.5
2 α	1.49 <i>dddd</i>	-	2	30.1	22.8
3	-	-	3	41.6	37.7
4	-	-	4	49.5	134.2
5	5.56 <i>s ancho</i>	5.54 <i>s ancho</i>	5	47.9	122.7
	-	-	6	-	-
6	-	-	7	162.2	30.9
7	-	-	8	55.0	26.2
8 α	1.12 <i>dddd</i>	-	9	66.5	19.9
9	2.39 <i>dt</i>	-	10	40.3	40.4
10	-	-	11	34.6	70.7
11	2.20 <i>septd</i>	2.17 <i>septd</i>	12	42.7	23.8
12	0.92 <i>d</i>	0.92	13	17.8	21.3
13	0.73 <i>d</i>	0.80	14	23.4	15.3
14	4.66 <i>q ancho</i>	1.22 <i>s ancho</i>	15	101.0	28.4
14'	4.55 <i>q ancho</i>	-		-	-
15	1.65 <i>q ancho</i>	1.66 <i>s</i>		24.1	23.8

Tabla 11. Datos de RMN de ^1H (400 MHz) de los derivados del longipineno 58, 59, 63, 64, 47 y 48 (5 en ppm), disolvente CDCl_3 , referencia interna TMS.



^1H	58 ^a	59 ^b	63 ^c	64 ^d	47 ^e	48 ^f
2	5.77 <i>s ancho</i>	5.81 <i>s ancho</i>	5.80 <i>s ancho</i>	5.82 <i>s ancho</i>	5.82 <i>s ancho</i>	5.82 <i>s ancho</i>
4	2.72 <i>d</i>	2.79 <i>d</i>	2.76 <i>d</i>	2.83 <i>d</i>	2.76 <i>d</i>	2.76 <i>d</i>
5	2.22 <i>s</i>	2.32 <i>s</i>	2.31 <i>s</i>	2.39 <i>s</i>	2.35 <i>s</i>	2.34 <i>s</i>
7	4.80 <i>dd</i>	5.17 <i>d</i>	5.13 <i>d</i>	5.51 <i>d</i>	5.57 <i>d</i>	5.55 <i>d</i>
8 β	1.85	5.43 <i>td</i>	5.31 <i>td</i>	5.40 <i>dd</i>	5.52 <i>dd</i>	5.40 <i>dd</i>
9 α	1.85	2.22 <i>dd</i>	2.15	-	-	-
9 β	1.85	-	-	5.48 <i>d</i>	3.92 <i>d</i>	3.88 <i>d</i>
11	2.83 <i>d</i>	2.89 <i>d</i>	2.86 <i>d</i>	3.15 <i>d</i>	3.21 <i>d</i>	3.18 <i>d</i>
12	0.93 <i>s</i>	0.93 <i>s</i>	0.91 <i>s</i>	1.01 <i>s</i>	0.91 <i>s</i>	0.90 <i>s</i>
13	0.99 <i>s</i>	1.03 <i>s</i>	1.01 <i>s</i>	0.94 <i>s</i>	1.15 <i>s</i>	1.14 <i>s</i>
14	1.05 <i>s</i>	1.15 <i>s</i>	1.14 <i>s</i>	1.13 <i>s</i>	1.17 <i>s</i>	1.16 <i>s</i>
15	2.04 <i>s</i>	2.05 <i>s</i>	2.05 <i>s</i>	2.08 <i>s</i>	2.06 <i>s</i>	2.08 <i>s</i>

^a Ang: 6.08 (*qq*), 2.02 (*dq*), 1.92 (*quint*)

^b Ang: 6.09 (*qq*), 1.99 (*dq*), 1.84 (*quint*), 1.77 (*quint*)

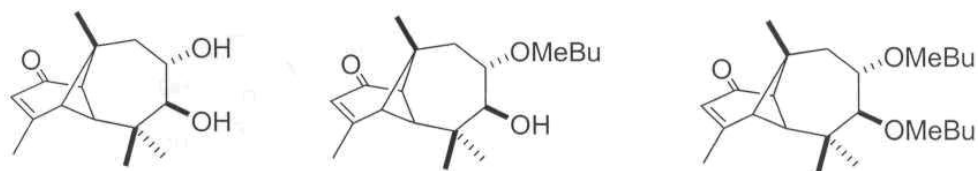
^c Ang: 6.15 (*qq*), 2.02 (*dq*), 1.88 (*quint*); MeBu: 2.26 (*sext*), 1.58 (*m*), 1.45 (*m*), 1.06 (*d*), 0.84 (*t*)

^d Ang: 6.13 (*qq*), 6.07 (*qq*), 2.05 (*quint*), 2.01 (*dq*), 1.95 (*dq*), 1.87 (*quint*); Ac: 1.90 (*s*)

^e Ang: 6.14 (*m*), 2.00 (*m*), 1.82 (*dq*)

^f Ang: 6.14 (*m*), 2.01 (*m*), 1.90 (*quint*); MeBu: 2.27 (*sext*), 1.65 (*m*), 1.40 (*m*), 1.12 (*d*), 0.86 (*t*)

Tabla 12. Datos de RMN de ^1H (400 MHz) de los compuestos 66, 69 y 72 (δ en ppm) y ^{13}C (100 MHz) de 66, disolvente CDCl_3 , referencia interna TMS



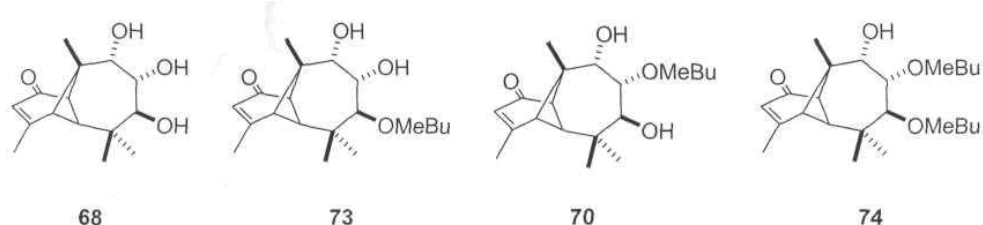
66

69

72

^1H	66	69	72	^{13}C	66
1	-	-	-	1	204.0
2	5.79 <i>s ancho</i>	5.78 <i>s ancho</i>	5.77 <i>s ancho</i>	2	122.5
3	-	-	-	3	171.6
4	2.60 <i>d</i>	2.71 <i>d</i>	2.75 <i>d</i>	4	49.4
5	2.17 <i>s</i>	2.28 <i>s</i>	2.28 <i>s</i>	5	31.0
6	-	-	-	6	37.0
7	3.33 <i>d</i>	3.53 <i>d</i>	5.05 <i>d</i>	7	78.7
8	3.85 <i>td</i>	5.08 <i>td</i>	5.26 <i>td</i>	8	68.4
9 β	2.25 <i>dd</i>	2.19 <i>dd</i>	2.15 <i>dd</i>	9	46.9
9 α	1.68 <i>dd</i>	-	-	10	-
10	-	-	-	11	52.6
11	2.73 <i>d</i>	2.74 <i>d</i>	2.84 <i>d</i>	12	57.8
12	1.03 <i>s</i>	0.98 <i>s</i>	1.13 <i>s</i>	13	27.2
13	0.99 <i>s</i>	1.05 <i>s</i>	1.01 <i>s</i>	14	18.9
14	0.93 <i>s</i>	1.06 <i>s</i>	1.10 <i>s</i>	15	24.3
15	2.04 <i>s</i>	2.03 <i>s</i>	2.06 <i>s</i>		23.5
2'	-	2.42 <i>sext</i>	2.38 <i>sext</i>		
3'	-	1.70 <i>m</i>	1.70 <i>m</i>		
		1.52 <i>m</i>	1.43 <i>m</i>		
4'		0.93 <i>t</i>	0.94 <i>t</i>		
			0.90 <i>t</i>		
5'		1.17 <i>d</i>	1.22 <i>d</i>		

Tabla 13. Datos de RMN de ^1H (400 MHz) de los compuestos 68, 73, 74 y 70 (δ en ppm) y ^{13}C (100 MHz) de 73 y 74, disolvente CDCl_3 , referencia interna TMS.



^1H	68	73	70	74	^{13}C	73	74
1	-	-	-	-	1	203.3	203.1
2	5.79 <i>s ancho</i>	5.80 <i>s ancho</i>	5.80 <i>s ancho</i>	5.81 <i>s ancho</i>	2	122.5	122.8
3	-	-	-	-	3	171.2	169.6
4	2.57 <i>d</i>	2.58 <i>d</i>	2.66 <i>d</i>	2.71 <i>d</i>	4	48.1	48.0
5	2.28 <i>s</i>	2.27 <i>s</i>	2.32 <i>s</i>	2.32 <i>s</i>	5	65.5	65.2
6	-	-	-	-	6	36.1	36.7
7	3.69 <i>d</i>	5.14 <i>d</i>	3.89 <i>d</i>	5.45 <i>d</i>	7	74.8	69.6
8	3.81 <i>td</i>	3.88 <i>td</i>	5.17 <i>td</i>	5.33 <i>td</i>	8	70.0	71.0
9	3.93 <i>d</i>	3.91 <i>d</i>	3.88 <i>d</i>	3.82 <i>d</i>	9	77.1	75.2
10	-	-	-	-	10	55.5	55.3
11	3.04 <i>d</i>	3.13 <i>d</i>	3.04 <i>d</i>	3.16 <i>d</i>	11	52.1	51.8
12	1.01 <i>s</i>	1.07 <i>s</i>	1.15 <i>s</i>	1.12 <i>s</i>	12	19.3	19.7
13	0.98 <i>s</i>	0.89 <i>s</i>	1.03 <i>s</i>	0.86 <i>s</i>	13	26.4	21.5
14	1.16 <i>s</i>	1.17 <i>s</i>	1.15 <i>s</i>	1.16 <i>s</i>	14	22.0	26.8
15	2.05 <i>s</i>	2.05 <i>s</i>	2.04 <i>s</i>	2.04 <i>s</i>	15	23.1	23.0
2'		2.46 <i>sext</i>	2.50 <i>sext</i>	2.35 <i>sext</i>		41.5	41.2
3'		1.75 <i>m</i>	1.75 <i>m</i>	1.70 <i>m</i>		26.3	36.1
		1.50 <i>m</i>	1.54 <i>m</i>	1.46 <i>m</i>		-	-
4'		0.97 <i>t</i>	0.96 <i>t</i>	0.93 <i>t</i>		10.1	11.5
5'		1.21 <i>d</i>	1.20 <i>d</i>	1.17 <i>d</i>		16.8	16.7

Tabla 14. Datos de RMN de ^1H (400 MHz) y ^{13}C (100 MHz) de los compuestos 75 y 79 (δ en ppm), disolvente CDCl_3 , referencia interna TMS.



^1H	75	79	^{13}C	75	79
1	-	-	1	202.0	202.5
2	5.81 <i>s ancho</i>	5.80 <i>s ancho</i>	2	123.0	123.0
3	-	-	3	170.0	170.0
4	2.76 <i>d</i>	2.73 <i>d</i>	4	48.1	48.0
5	2.36 <i>s</i>	2.33 <i>s</i>	5	66.5	65.2
6	-	-	6	41.6	41.5
7	3.86 <i>d</i>	5.45 <i>d</i>	7	70.4	71.0
8	5.22 <i>td</i>	5.45 <i>td</i>	8	71.5	70.2
9	5.41 <i>d</i>	3.90 <i>d</i>	9	75.0	75.1
10	-	-	10	55.1	55.5
11	3.04 <i>d</i>	3.18 <i>d</i>	11	53.0	50.2
12	0.96 <i>s</i>	1.11 <i>s</i>	12	18.8	20.2
13	1.04 <i>s</i>	1.10 <i>s</i>	13	21.0	23.1
14	2.06 <i>s</i>	1.11 <i>s</i>	14	27.2	22.0
15	2.46 <i>s</i>	2.02 <i>s</i>	15	23.5	26.5
2'	2.45 <i>sext</i>	-		17.0	142.0
2'	2.32 <i>sext</i>	-		-	-
3'	1.70 <i>m</i>	6.20 <i>qq</i>		37.0	126.5
3'	1.50 <i>m</i>	-		-	-
4'	0.98 <i>t</i>	2.03 <i>dq</i>		12.0	16.5
4'	0.92 <i>t</i>	-		-	-
5'	1.17 <i>d</i>	1.87 <i>quint</i>		16.1	20.1
5'	1.16 <i>d</i>	-		-	-
2''		2.30 <i>sext</i>			36.0
3''		1.68 <i>m</i>			-
3''		1.40 <i>m</i>			29.4
4''		0.88 <i>t</i>			11.5
5''		1.08 <i>d</i>			15.8

8 REFERENCIAS

1. Mata, R. *Curso Teórico de Farmacognosia*; UNAM: México, 2000; pp 2-5.
2. Manitto, P. *Biosynthesis of Natural Products*; Wiley: New York, 1981; Cap. 1-8.
3. Dimayuga, R. E. *Medicina tradicional y popular de Baja California Sur*, SEP UABCS:B.C.S, 1996, pp 2-4.
4. Cabrera, L. *Plantas Curativas de México*; Gómez, Gómez: México, 2000, pp 3-4.
5. Robbers, J. E.; Speedie, M. K.; Tyler, V. E. *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology*; Williams & Wilkins: U.S.A., 1996, pp 1-14.
6. Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Snader, K. M. *Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002*. *J. Nat. Prod.* **2003**, 66, 1022-1037.
7. Lloyd N. F. *Bio-Organic Mechanisms*. *J. Chem. Edu.* **1981**, 58, 456-461.
8. Juaristi, E. *Introduction to Stereochemistry and Conformational Analysis*; Wiley: New York, 1991, pp 237-238.
9. Mendoza, H. L. H. *Modelo teórico de los procesos que ocurren en la interfase electrodo-solución*; Tesis Doctoral, UNAM: México, 2002, pp 9-11.
10. Grashoff, J. L. *A Systematic Study of the North and Central American Species of Stevia*; Tesis Doctoral, University of Texas at Austin, 1972, pp 609.
11. Barrios-Rodríguez, M. A.; Medina-Cota, J. M. *Estudio Florístico de la Sierra de Pachuca, Estado de Hidalgo*. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas- IPN: México, 1996.
12. Villavicencio, M. A.; Pérez-Escandón, B. E. *Plantas Útiles del Estado de Hidalgo*; Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo: México. 1995.

13. Hernández, L. R.; Catalán, C. A. N.; Joseph-Nathan P. The Chemistry of the Genus *Stevia* (Asteraceae). *Rev. Acad. Colomb. Cieñe. Ex. Fís. Nat.* **1998**, *22*, 229-279.
14. Cerda-García-Rojas, C.M.; Pereda-Miranda, R. In *Stevia: the Genus Stevia; Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles*, vol 19; Kinghorn, A. D., Ed; Taylor & Francis: London, 2002; Cap. 5, pp 86-118.
15. Sánchez-Arreóla, E.; Cerda-García-Rojas, C. M.; Joseph-Nathan, P.; Román, L. U.; Hernández, J. D. Longipinene derivatives from *Stevia serrata*. *Phytochemistry* 1995, *39*, 853-857.
16. Bohlmann, F.; Suwita, A.; Natu, A. A.; Czerson, H.; Suwita, A. Überweitere a-Longipinen-Derivate aus *Compositen*. *Chem. Ber.* **1977**, *110*, 3572-3581.
17. Salmón, M.; Díaz, E.; Ortega, A. Epoxilactonas de *Stevia serrata* Cav. *Rev. Latinoamer. Quím.* **1977**, *8*, 172-175.
18. Martínez, V.M.; Muñoz-Zamora. A.; Joseph-Nathan, P. Conformational analysis of achillin and leukodin. *J. Nat. Prod.* **1988**, *51*, 221- 228.
19. López, O. A. S. *Triterpenos y sesquiterpenos aislados de las raíces de Stevia tomentosa* H. B. K.; Tesis de Licenciatura, ICBI-UAEH: Pachuca, 2004.
20. González, H. M. Y. *Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos de cuatro plantas del género Stevia y cuatro plantas del género Mimosa*. Tesis de Licenciatura, ICBI-UAEH: Pachuca, 2004.
21. Wenkert, E.; Arrhenius, T. S. Direct stereocontrolled synthesis of Isocomene. *J. Am. Chem. Soc.* 1983, *105*, 2030-2033.
22. Zalkow, L. H.; Harris III, R. N.; Van Derveer, D.; Bertrand, J. A. Isocomene: a novel sesquiterpene from *Isocoma wrightii*. X-ray crystal structure of the the corresponding diol. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1977**, 456-457.
23. Bohlmann, F.; Le Van, N.; Pickardt, J. Überein anomales Sesquiterpen aus *Berkheya radula* (Harv.) De Willd. *Chem. Ber.* **1977**, *110*, 3777-3781.
24. Zalkow, L. H.; Harris III, R. N.; Van Derveer, D. Modhephe: a sesquiterpenoid carbocyclic [3.3.3] propellane. X-ray crystal structure of the corresponding diol. *J. Chem. Soc. Chem. Comm.* **1978**, 420-421.

25. Reyes-Trejo, B.; Morales-Ríos, S.; Alvarez-Cisneros, C; Joseph-Nathan, P. Conformational analysis of 14-hydroxymodhephene by NMR, X-ray diffraction and molecular modeling studies. *Magn. Reson. Chem.* **2003**, *41*, 1021-1025.
26. Motl, O.; Romanuk, M.; Herout, V. Composition of the oil from *Amorpha fruticosa* L Fruits Structure of (-)- γ -amorphene. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **1966**, *31*, 2025-2033.
27. Connolly, J. D.; I—INI, R. A. *Dictionary of Terpenoids*. Chapman & Hall, 1991, pp 434.
28. Bohlmann, F.; Le Van, N.; Van Cuong, T.; Jacupovic, J.; Schuster, A.; Zabel, V.; Watson, W.H. p-Isocomen, ein neues Sesquiterpen aus *Berkheya kñen*. *Phytochemistry* **1979**, *18*, 1831-1834.
29. Bohlmann, F.; Jacupovic, J.; Ahmed, M.; Schuster, A. Sesquiterpenlactones and other constituents from *Schistostephium* Species. *Phytochemistry* **1982**, *22*, 1623-1636.
30. Bohlmann, F.; Zdero, C. Five Thcyclic Sesquiterpenes from *Callilepis solid folia*. *Phytochemistry* **1982**, *21*, 139-142.
31. Bohlmann, F.; Zdero, C. Caryophyllene derivatives and hydroxyisocomene from *Pulicaria dysenterica*. *Phytochemistry* **1981**, *20*, 2529-2534.
32. Comey, N.; Grey, A. I.; Hook, I. L; James, P.; Sheridan, H. Sesquiterpenes from *Leontopodium alpinum*. *Phytochemistry* **1999**, *50*, 1057-1060.
33. Fitjer, L; Monzó-Oltra, H. Stereospecific Rearrangemets in Tricyclopentanoid Sesquiterpenes: The Absolute Configuration of (-)- Isocomene, (-)-p-Isocomene, and (-)-Silphinene. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 6171-6173.
34. Borg-Karlson, A. K.; Norin, T. Configurations and Conformations of Torreyol (δ -cadinol), α -cadinol, T-muurolol and T-cadinol. *Tetrahedron* **1981**, *37*, 425- 430.
35. Bohlman, F.; Zdero, C. Stevisalicinon, ein neuer Diterpentyp, sowie weitere Inhaltsstoffe aus Stew'a-Arten. *LiebigsAnn. Chem.* **1985**, 1764-1783.

36. Bohlman, F.; Suwita, A.; Natu, A. A.; Czerson, H.; Suwita, A. Über weitere α -longipinen-Derivate aus *Compositen*. *Chem. Ber.* **1977**, *110*, 3572-3581.
37. Joseph-Nathan, P.; Cerda, C. M.; del Río, R. E.; Román, L. U.; Hernández, J. D. Conformation and Absolute Configuration of Naturally Occurring Longipinene Derivatives. *J. Nat. Prod.* **1986**, *49*, 1053-1060.
38. Uchio, Y. Isolation and structural determination of vulgarone A and B, two novel sesquiterpene ketones from *Chrysanthemum vulgare*. *Tetrahedron*, **1978**, *34*, 2893-2899.
39. Amaro, J. M.; Adrián, M.; Cerda, C. M.; Joseph-Nathan P. Longipinen derivatives from *Stevia lucida* and *S. triflora*. *Phytochemistry* **1988**, *27*, 1409-1412.
40. Macías, P. J. C. *Triterpenos y sesquiterpenos aislados de las raíces de Stevia tomentosa* H. B. K.; Tesis de Licenciatura, ICBI-UAEH: Pachuca, 2004.
41. Bohlman, F.; Zdero, C.; King, R. M.; Robinson, H. Neue Sesquiterpenlactone und andere Inhaltsstoffe aus *Stevia mercedensis* und *Stevia achalensis*. *Liebigs Ann. Chem.* **1986**, 799-813.
42. Bohlman, F.; Ates, N.; Jakupovic, J.; King, R. M.; Robinson, H. Types of sesquiterpenes from *Artemisia douglasiana*. *Phytochemistry* **1982**, *21*, 2691-2697.
43. Bukles, R. E.; Mock, G. V. The preparation of tiglic and angelic acids and éteres. *J. Org. Chem.* **1950**, *15*, 680-684.
44. Sánchez-Arreóla, E.; Cerda-García-Rojas, C. M.; Joseph-Nathan, P.; Román, L. U.; Hernández, J. D. Longipinene derivatives from *Stevia connata*. *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 12-15.
45. Torres-Valencia, J. M.; León, G. I.; Villagómez-Ibarra, J. R.; Suárez-Castillo, O. R.; Cerda-García-Rojas, C. M.; Joseph-Nathan, P. Stereochemical assignment of naturally occurring 2,3-epoxy-2-methylbutanoate esters. *Phytochem. Anal.* **2002**, *13*, 329-332.

46. Torres-Valencia, J. M.; Cerda-García-Rojas, C. M.; Joseph-Nathan, P. Stereochemical assignment of 2,3-epoxy-2-methylbutanoate esters in natural products. *Phytochem. Anal.* **1999**, *10*, 221-237.
47. Rawlings, B. J. Biosynthesis of fatty acids and related metabolites. *Nat. Prod. Rep.* **1998**, *15*, 275-308.
48. Léete, E. Biosynthetic conversión of α -methylbutyric acid to tiglic acid in *Datura meteloides*. *Phytochemistry* **1973**, *12*, 2203-2205.
49. Umezawa, K.; Ikeda, Y.; Naganawa, H.; Kondo, S. Biosynthesis of the lipophilic side chain in the cyclic hexadepsipeptide antibiotic IC101. *J. Nat. Prod.* **2002**, *65*, 1953-1955.
50. Denoya, C. D.; Fedecho, R. W.; Hafner, E. W.; McArthur, H. A. I.; Morgenstern, R.; Skinner, D. D.; Stutzman-Engwall, K.; Wax, R. G.; Wernau, W. C. A second branched-chain α -keto acid dehydrogenase gene-cluster (*bkdFGH*) from *Streptomyces-avermitilis*: its relationship to avermectin biosynthesis and the construction of a *bkdF* mutant suitable for the production of novel antiparasitic avermectins. *J. Bacteriol.* **1995**, *177*, 3504-3511.
51. Khawas, B. An X-ray analyses of L-isoleucine. *Acta Cryst. B26* **1970**, 385-1387.
52. Trommel, J.; Bijvoet, J. M. Crystal structure and absolute configuraron of the hydrochloride and hydrobromide of D(-)-isoleucine. *Acta Cryst.* **1954**, *7*, 703-709.
53. Dregus, M.; Schmarr, H. G.; Takahisa, E.; Engel, K.H. Enantioselective analysis of methyl-branched alcohols and acids in rhubarb (*Rheum rhabarbarum* L) stalks. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 7086-7091.
54. Weisenborn, F. L; Bolger, J.; Cheg, C. H. K.; Higa, T.; Tan, R. X. Steroidal alkaloids and stilbenoids from *Veratrum taliense*. *Planta Medica* **1999**, *65*, 480-482. 55.
55. van der Hoeven, R. S.; Steffns, J. C. Biosynthesis and elongation of short- and medium-chain-length fatty acids. *Plant Physiol.* **2000**, *122*, 275-282.

56. Stoll, A.; Seebeck, E.; Stauffacher, D. Isolierung und Charakterisierung von bisher unbekanntem Inhaltsstoffen aus dem Neutralteil des frischen Baldrians. *Helv. Chim. Acta* **1957**; *40*, 1205-1229.
57. Hikino, H.; Hikino, Y.; Takeshita, Y.; Meguro, K.; Takemoto, T. Structure and Absolute Configuration of Valeranone. *Chem. Pharm. Bull.* **1965**; *13*, 1408-1416.
58. Hazelhoff, B.; Malingre, T. M.; Meijer, D. K. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **1982**, 274-287.
59. Marshall, J. A.; Bundy, G. L.; Fanta, W. Studies Relating to the Synthesis of (+)-Valeranone. *J. Org. Chem.* **1968**; *33*, 3913-3922.
60. Wenkert, E.; Berges, D. A.; Golob, N. F. Oxycyclopropanes in Organochemical Synthesis. Total Syntheses of (-)-Valeranone and (±)- Grandisol. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, *100*, 1263-1267.
61. Takeshita, H.; Cui, Y-S; Kato, N.; Mori, A. A Total Synthesis of (+)-Valeranone, a c/s-Decalone Sesquiterpenoid from *Valeriana officinalis*, via an Intramolecular Photocycloaddition. *Bull Chem. Soc. Jpn.* **1993**, *66*, 2694-2699.
62. Sammes, P. G.; Street, L. J.; Whitby, R. J. Synthesis of (±)-Cryptofauronol and Related Valerane Sesquiterpenes via Rearrangement of Bicyclo[5.3.0]decane Precursors. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1986**, 281-289.
63. Vite, G. D.; Spencer, T. A. Synthesis of (±)-7-Epivaleranone and (+)-Valeranone. *J. Org. Chem.* **1988**, *53*, 2560-2565.
64. Kong, J.; White, C. A.; Krylov, A. I.; Sherrill, C. D.; Adamson, R. D.; Furlani, T. R.; Lee, M. S.; Lee, A. M.; Gwaltney, S. R.; Adams, T. R.; Ochsenfeld, C.; Gilbert, A. T. B.; Kdziora, G. S.; Rassolov, V. A.; Maurice, D. R.; Nair, N.; Shao, Y.; Besley, N. A.; aslen, P. E.; Dombroski, J. P.; Daschel, H.; Zhang, W.; Korambath, P. P.; Baker, J.; Byrd, E. F. C; van Voorhis, T.; Oumi, M.; Hirata, S.; Hsu, C. P.; Ishikawa, N.; Florian, J.; Warshel, A.; Johnson, B. G.;

- Gilí, P. M. W.; Head-Gordon, M.; Pople, J. A. Q-chem 2.0: A high-performance ab initio electronic structure program package. *J. Comput. Chem.* **2000**, *21*, 1532-1548.
65. Chang, G.; Guida, W. C.; Still, W. C. An International-coordinate Monte Carlo method for searching conformational space. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4379-4386.
66. Perdew, J. P. Density-functional approximation for the correlation energy of the inhomogeneous electron gas. *Phys. Rev. B.* **1986**, *33*, 8822-8824.
66. Becke, A. D. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys. Rev. A.* **1988**, *38*, 3098-3100.
67. Zotov, A. Y.; Palyulin, V. A.; Zefirov, N. S. RICON-The computer Program for the Quantitative Investigations of Cyclic Organic Molecules. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **1997**, *37*, 766-773.
68. Cerda-García-Rojas, C. M.; Zepeda, L. G.; Joseph-Nathan, P. A PC program for calculation of the dihedral angles from NMR data. *Tetrahedron Comput. Methodol.* **1990**, *3*, 113-118.
69. Cobas, C.; Cruces, J.; Sardina, J. *MestRe-C versión 2.3a* (<http://www.Mestrec.com/>).