

13
ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
ZARAGOZA

ESTUDIO FITOQUIMICO DE STEVIA TOMENTOSA
AFF. H.B.K. Y STEVIA RHOMBIFOLIA H.B.K

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

ROSA ELENA GALLEGOS GALVAN

MEXICO, D. F.

1990

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CONTENIDO

INTRODUCCION	1
FUNDAMENTO DEL TEMA	3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	10
OBJETIVOS	11
HIPOTESIS	12
MATERIAL, METODOS Y DESARROLLO	13
RESULTADOS Y DISCUSION	22
CONCLUSIONES	22
ESPECTROS	24
BIBLIOGRAFIA	31

INTRODUCCION

En los últimos años la química de los productos naturales ha concentrado sus esfuerzos en la localización e identificación de compuestos farmacológicamente activos¹⁻³ que se encuentran en plantas que tienen tradición como medicinales⁴ adquiriendo a su vez valiosa información botánica, quimiotaxonómica⁵, biológica^{6,7}, médica^{8,9} y agrícola.

Es así como el hombre ha encontrado en el campo de los productos naturales nuevos horizontes dentro de la investigación, en donde la química orgánica, mediante métodos de purificación como son cromatografía en columna y capa fina entre otras, junto con las técnicas espectroscópicas⁺ (UV, IR, RMN¹H, RMN¹³C y EMD), le han permitido aislar y asignar las estructuras correctas a un gran número de compuestos de origen vegetal, para posteriormente utilizarlos como fármacos, esencias, colorantes, etc.

Una de las familias más grandes del reino vegetal es de las compuestas ya que cuenta con aproximadamente 1310 géneros y 13000 especies de las cuales están divididas en 13 tribus.

Botánicamente el género *Stevia* se incluye en la familia de las compuestas en la tribu Eupatoriaea y es uno de los que más fácilmente se reconocen contando hasta el momento con 200 especies aproximadamente. Y aunque este género está bien

⁺ UV: ultravioleta, IR: infrarojo, RMN¹H: resonancia magnética nuclear protónica, RMN¹³C: resonancia magnética nuclear de carbono 13, y EM: espectroscopia de masas.

delimitado morfológicamente es sorpresivamente heterogéneo con respecto a su composición química. Así los diferentes estudios fitoquímicos realizados sobre 10 especies mostraron, entre otras estructuras, diterpenos del tipo labdanos y clerodanos, así como glicósidos y sesquiterpenos.

El interés de estudiar este género radica no solo en obtener datos quimiotaxonómicos, sino también detectar la actividad biológica de los metabolitos aislados en este género, como serían: la inhibición de tumores cancerosos, la inhibición del crecimiento bacteriano, como mecanismos de defensa de las plantas contra herbívoros e insectos, así como endulcorantes sustituyentes del azúcar¹¹ y otros¹².

La presente tesis describe el aislamiento y elucidación estructural y estereoquímica de tres nuevas lactonas sesquiterpénicas aisladas de *Stevia aff. tomentosa* H.B.K. llamadas: 8 β -acetato de 4,5-en-1 β ,6 α ,8 β -trihidroxi-11,13-dihidro-eudesman-6-olida (ESTRUCTURA 25); 8 β -acetato de 3,4-en-1 β ,6 α ,8 β -trihidroxi-11,13-dihidro-eudesman-6-olida (ESTRUCTURA 26) y 8 β -acetato de 4,15-en-1 β ,6 α ,8 β -trihidroxi-11,13-dihidro-eudesman-6-olida (ESTRUCTURA 27); mientras que la *Stevia rhombifolia* H.B.K. se aisló una flavona llamada 5-hidroxi-2-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-3,6,7-trimetoxi-4H-1-benzopirán-4-ona (Casticina) (ESTRUCTURA 29) la cual ha sido aislada con anterioridad de otras especies de *Stevia*.

FUNDAMENTACION DEL TEMA

Como se comentó anteriormente, una de las familias más grandes del reino vegetal es la de las compuestas, en donde las lactonas sesquiterpénicas son los metabolitos secundarios que mejor caracterizan a esta familia.

Por lo general es aceptado que estos metabolitos secundarios son formados biogenéticamente, a partir del pirofosfato de farnesilo ($C_{15}H_{20}P_2O_7$) el cual inicialmente se cicla y posteriormente sufre diferentes oxidaciones y modificaciones, formando los diferentes tipos de esqueletos de lactonas sesquiterpénicas (Esquema I).

También se ha mencionado que esta familia está dividida en 13 tribus, a la cual pertenece la tribu Eupatoliaea dentro de la cual el género *Stevia* es una de las que más fácilmente se reconocen morfológicamente y que consta de 200 especies aproximadamente hasta el momento.

El estudio químico de este género es incompleto hasta ahora, ya que solamente se han estudiado 19 de las aproximadamente 200 especies en donde se muestra la existencia de: diterpenos del tipo labdanos en cuatro especies ¹³⁻¹⁶, clerodanos en 2¹⁷, glicósidos en 4¹⁸, además de sesquiterpenos principalmente del tipo de longipineno, en 18 de las 19 hasta hoy estudiadas. Como hecho notable se ha encontrado, únicamente en 7 especies la presencia de lactonas sesquiterpénicas que se resumen en los esquemas II Y III.

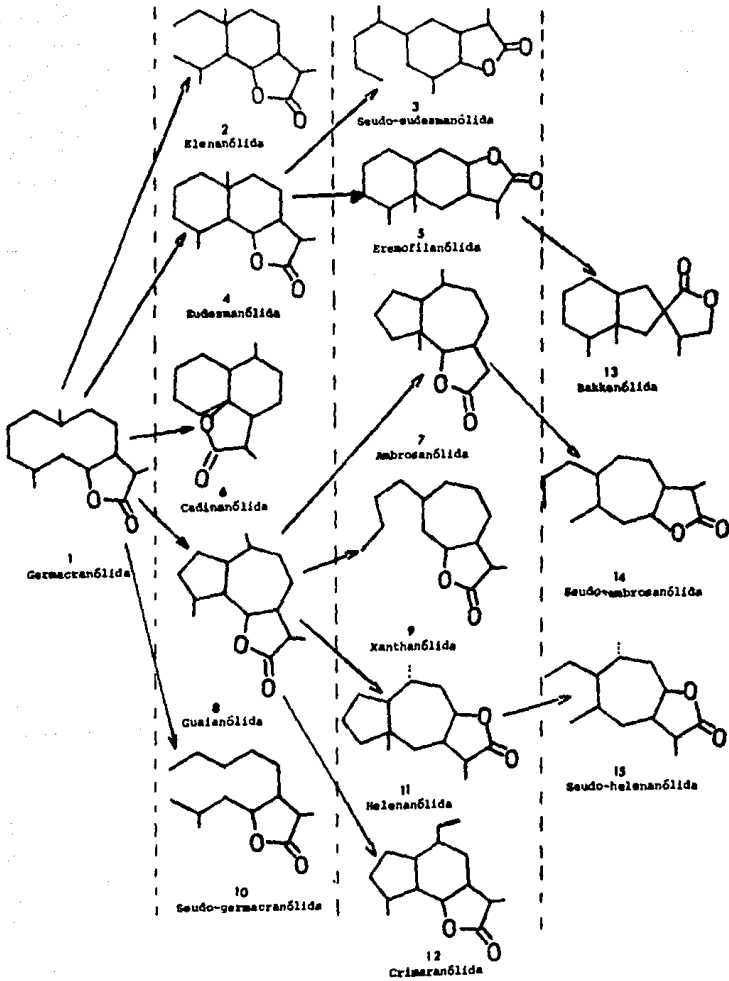
Como se puede observar en estos esquemas la *S. serrata*, *S. achalensis*, *S. ovata* y *S. mercedensis* continen lactonas sesquiterpénicas del tipo de guaianólida (ESTRUCTURA 8);

mientras que las *S. boliviensis* y *S. serrata* contienen esqueletos del tipo germacranólida (ESTRUCTURA 1); asimismo se han encontrado eudesmanólida en *S. achalensis*, una pseudo-eudesmanólida en *S. rhombifolia* (ESTRUCTURA 3) y una helenanólida en *S. monaerdifolia*. (ESTRUCTURA 11).

Por otro lado, es conocido que la lactona sesquiterpénica leucodina¹⁹, aislada a partir de *Stevia pilosa*^{20,21}, presentan actividad biológica como el ser anti-alimentaria para algunas clases de insectos o como agentes citotóxicos o antitumoral.

ESQUEMA I

Biogénesis propuesta para las lactonas sesquiterpénicas



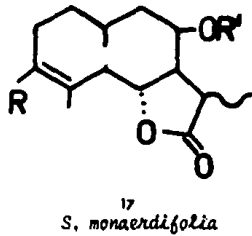
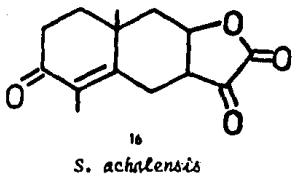
ESQUEMA II

Principales metabolitos secundarios del género *Stevia*

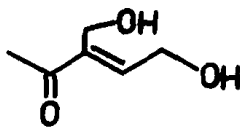
ESPECIES	ESTRUCTURAS	REFERENCIAS
1. <i>S. achalensis</i>	16	45,46
2. <i>S. monaerdiifolia</i>	17	49
3. <i>S. rhombifolia</i>	18	51
4. <i>S. serrata</i>	19	50
5. <i>S. boliviensis</i>	20	47
6. <i>S. serrata</i>	21	48
7. <i>S. achalensis</i>	22	46
8. <i>S. ovata</i>	23	53
9. <i>S. mercedensis</i>	24	52,21

ESQUEMA III

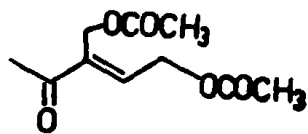
Estructuras de lactonas sesquiterpénicas en *Stevias*



a. R= Ac , R'=



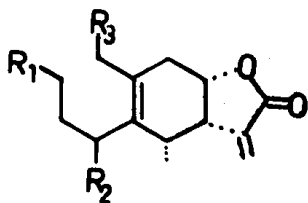
b. R= Ac , R' =



c. R= Ac, R' = H

d. R= R' = Ac

e. R= R' = H

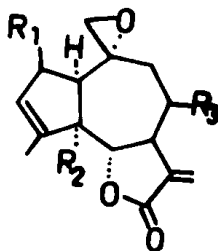


18
S. rhombifolia

$R_1 = \text{CH}_2\text{OH}$

$R_2 = \text{OMac}$

$R_3 = \text{OH}$

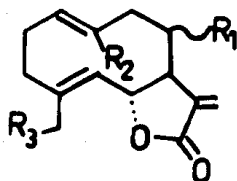


19
S. serrata

$R_1 = \text{OH}$

$R_2 = \text{H}$

$R_3 = \text{O-Ang-4-Ac}$

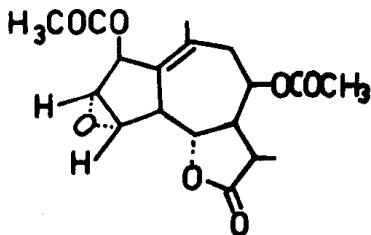


20
S. boliviensis

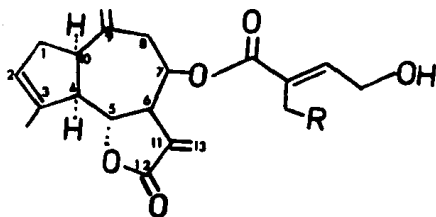
$R_1 = \beta\text{-OMac}$

$R_2 = \text{OH}$

$R_3 = \text{OAc}$

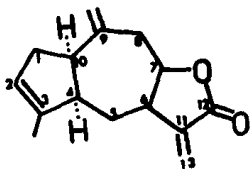


21
S. serrata

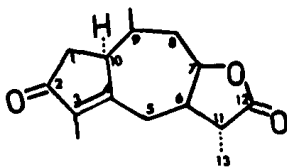


22
S. achalensis

- a. R= H
- b. R= OH
- c. R= 8-OH



23
S. ovata



24
S. mercedensis

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El género *Stevia* presenta más de 200 especies ubicadas en nuestro país siendo algunas de ellas abundantes, lo que indica su potencial como un recurso renovable, del cual solamente se han estudiado 19 especies.

Por eso es necesario conocer los componentes químicos de las diferentes especies del género *Stevia* y de esta manera aportar datos para su posible uso farmacéutico (citotóxico), así como potencial proveedor de materias primas para la obtención de productos sintéticos útiles.

OBJETIVO

Aislar y determinar las estructuras de metabolitos secundarios mediante técnicas espectroscópicas como RMN¹H y ¹³C así como IR, UV y EM, de las especies *Stevia aff tomentosa* H.B.K. y *Stevia rhombifolia* H.B.K.

HIPOTESIS

Es sabido que distintas especies del género *Stevia* presentan metabolitos secundarios como diterpenos, glicósidos, lactonas sesquiterpénicas, longipinenos entre otros, por lo que se espera que los metabolitos secundarios aislados por métodos cromatográficos, e identificados por técnicas instrumentales IR, UV, RMN¹H, RMN¹³C y EM, pertenezcan a algunos de los tipos de moléculas antes mencionadas.

MATERIAL, METODOS Y DESARROLLO

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Jones.

Las cromatografías en columna, se efectuaron en sílica gel 60 Merk (70-230 Mesh ASTM), en proporción 1 a 30g con respecto al extracto.

La pureza de los productos y el desarrollo de reacciones se siguió por cromatoplasmas de gel de sílice Merck F-254 con espesor de 0.25 mm, usando como revelador sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2N.

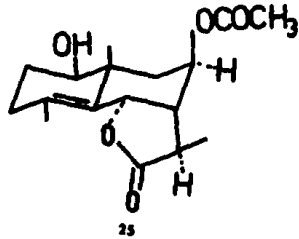
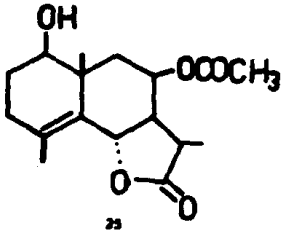
Los espectros de infrarrojo (IR) se determinaron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer, Mod. 337 en pastilla con KBr o solución clorofórmica.

Los espectros de ultravioleta (UV) se determinaron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer, UV-VIS, Mod. 202 en metanol.

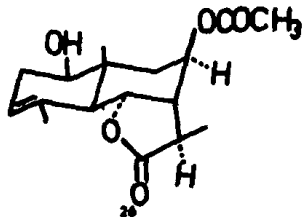
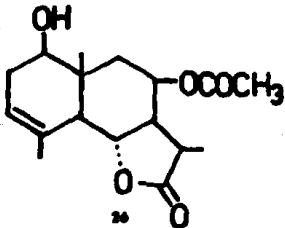
Los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (^1H) y ^{13}C se realizaron en FT-80 Varian, y HA-300 Varian. Los desplazamientos químicos (δ) están dados en ppm referidos al tetrametilsilano (TMS) como referencia interna; las constantes de acoplamiento (J) están dadas en Hertz.

Los espectros de masas (EM) fueron determinados en un espectrómetro Hewlett-Packard 5985B con un sistema GC/MS.

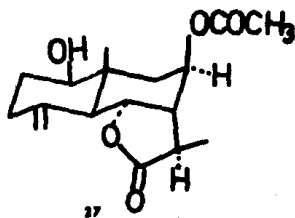
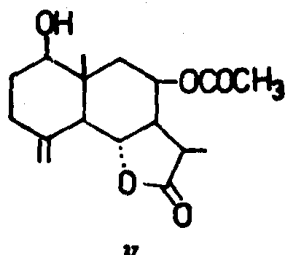
ESTRUCTURAS



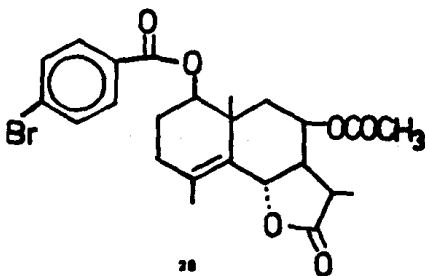
8 β - acetato de 4,5 - en - 1 β , 6 α , 8 β -
trihidroxi - 11, 13 - dihidro - eudesman -
6 - olida



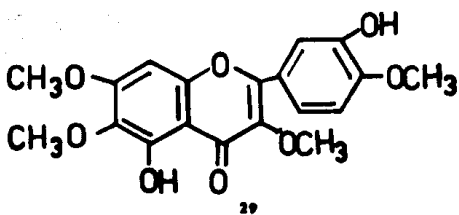
8 β - acetato de 3,4 - en - 1 β , 6 α , 8 β -
trihidroxi - 11, 13 - dihidro - eudesman -
6 - olida



8 β - acetato de 4, 15 - en - 1 β , 6 α , 8 β -
trihidroxi - 11, 13 - dihidro - eudesman -
6 - olida



Acetato de p-bromo benzoato de 4, 5 - en -
1 β , 6 α , 8 β - trihidroxi - 11, 13 - dihidro -
eudesman - 6 - olida



CASTICINA

La *Stevia aff tomentosa* H.B.K. se colectó en Valsequillo Puebla, México en agosto de 1987. (voucher Martínez 40 depositada en el herbario del Instituto de Biología, UNAM). Las partes aéreas secas y molidas de la planta (107g) se colocaron en una columna con celita al fondo, y fue extraída con Hexano, AcOEt y MeOH sucesivamente. El extracto de AcOEt se concentró a presión reducida el residuo obtenido (3.7g) fue colectado en una columna empacada con SiO_2 (silica gel), usando como sistema eluyente una mezcla de Hexano-AcOEt de polaridad creciente.

En las fracciones eluidas con Hexano-AcOEt 8:2 se aislaron 10mg de un producto cristalino incoloro ($R_f=0.34$), p.f.=157-164 °C, los datos espectroscópicos para este producto son los siguientes:

IR Vmax (CHCl_3), cm : 3611 (-OH); 1772 (γ -lactona); 1737 (éster) (ESPECTRO 1).

RMN^1H (CDCl_3), 300 MHz, δ : 5.51 (1H, q, $J=2.5$ y 2.6 Hz, H-8); 5.35 (1H, bd, $J=11$ Hz, H-6); 3.51 (1H, dd, $J=4.1$ y 11 Hz, H-1); 2.73 (1H, qt, $J=7$ Hz, H-11); 2.38 (1H, ddd, $J=11$, 8 y 2.5 Hz, H-7); 2.33 (1H, dd, $J=2.7$ y 15 Hz, H-9); 2.30-2.40 (2H, m, H-3); 2.07 (3H, s, -COCH₃); 1.87 (3H, bs, H-15); 1.75-1.65 (2H, m, H-2); 1.48 (1H, dd, $J=2.7$ y 15 Hz, H-9); 1.25 (3H, d, $J=7$ Hz, H-13); 1.20 (3H, s, H-14) (ESPECTRO 2).

RMN^{13}C (CDCl_3) 75.4 MHz, δ : 178.7 (C-12); 170.0 (-COCH₃); 128.8 (C-5); 127.0 (C-4); 77.8 (C-1); 77.4 (C-6); 68.6 (C-8); 48.9 (C-7); 43.3 (C-9); 41.4 (C-10); 37.3 (C-11); 33.4 (C-3); 26.6 (C-2); 21.6 (-COCH₃); 20.91 (C-14); 20.0 (C-15); 11.5 (C-13) (ESPECTRO 3, 3a).

Diagrama de Correlación Heteronuclear $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ (HETCOR), (CDCl_3) 300 MHz 75.4, δ : 77.8 (3.51); 77.4 (5.35); 68.6 (5.55); 48.9 (2.38); 43.3 (2.33 y 1.48); 37.3 (2.73); 33.4 (2.20-2.00); 26.6 (1.75-1.65); 21.6 (2.07); 20.91 (1.20); 20.0 (1.87); 11.5 (1.25) (ESPECTRO 4)

EM, m/z (70 ev) (abund. rel.): 308 M^{+2} (2%); 266 (5%);

248 (18%); 215 (27%); 159 (15%); 107 (26%); 91 (35%); 43 (100%).

Los datos espectroscópicos antes descritos pertenecen al compuesto 8 β -acetato de 4,5-en-1 β ,6 α ,8 β -trihidroxi-11,13-dihidro-eudesman-6-olida (ESTRUCTURA 25).

Con el mismo sistema eluyente se aislaron 8mg de un producto aceitoso transparente cuya espectroscopia está dada a continuación:

IR V_{max} (CHCl₃), cm^{-1} : 3460 (-OH); 1780 (γ -lactona); 1740 (éster); 1460 (alifático C-H); 1440 (C-O) (ESPECTRO 5).

RMN¹H (CDCl₃) 80 MHz, δ : 5.51 (1H, q, J=2.5 y 5.5 Hz, H-8); 4.58 (1H, dd, J=12 y 12 Hz, H-6); 3.65 (1H, dd, J=6 y 8 Hz, H-1); 2.74 (1H, qt, J=7 Hz, H-11); 5.37 (1H, bs, H-3); 2.04 (3H, s, -OCOCH₃); 1.83 (3H, bs, H-15); 1.30 (3H, d, J=7 Hz, H-13); 1.05 (3H, s, H-14) (ESPECTRO 6).

EM, m/z (70 eV) (abund. rel.): 308 M⁺ (5%); 248 (10%); 220 (9%); 159 (8%); 124 (23%); 91 (20%); 41 (25%); 43 (100%).

Que corresponden al compuesto 8 β -acetato de 3,4-en-1 β ,6 α , 8 β -trihidroxi-11,13-dihidro-eudesman-6-olida (ESTRUCTURA 26).

De las fracciones eluidas con Hexano-AcOEt 1:1 se obtuvo una mezcla que fue recromatografiada sobre SiO₂ utilizando como eluyente una mezcla de Hexano-AcOEt 7:3 obteniéndose 9mg de un producto aceitoso transparente con los datos espectrales que a continuación se describen:

IR V_{max} (CHCl₃), cm^{-1} : 3600 (-OH); 3500 (-OH); 1770 (γ -lactona); 1730 (éster); 1650 (C=C); 1450 (C-H)

(ESPECTRO 7).

RMN¹H(CDCI₃) 80 MHz, δ: 5.47 (1H, q, J=3 Hz, H-8); 4.75 (1H, dd, J=11 Y 11 Hz, H-6); 3.45 (1H, dd, J=5 Y 10 Hz, H-1); 2.73 (1H, qt, J=7 Hz, H-11); 2.05 (3H, s, -OCOCH₃); 4.90 (1H, bs, H-15); 4.97 (1H, bs, H-15); 1.25 (3H, d, J=7 Hz, H-13); 0.95 (3H, s, H-14) (ESPECTRO 8).

EM, m/z (70 ev) (abund. rel.): 308 M⁺ (1%); 248 (8%); 230 (20%); 159 (14%); 119 (18%); 107 (25%); 91 (27%); 55 (28%); 41 (34%); 43 (100%).

La cual corresponde al compuesto 8β-acetato de 4,15-en-1β, 6α,8β-trihidroxi-11,13-dihidro-eudesman-6-olida (ESTRUCTURA 27).

Preparación del Cloruro del Acido p-Bromobenzóico²³: Se mezclaron 2g de ácido p-bromobenzóico y 2g de PCl₅ colocándose en un matraz de fondo redondo de 100 ml adaptado a un aparato de destilación a presión reducida, con una trampa que contiene una solución de NaOH saturada para atrapar el HCl producido en la reacción. Una vez eliminado el HCl en forma gaseosa se destiló el oxiclorigeno de fósforo (POCl₃), posteriormente se destiló el cloruro del ácido p-bromobenzóico a 154-155 °C a una presión de 50 mm, se realizó con hexano obteniéndose cristales en forma de agujas transparentes con un p.f. de 40-60 C.

Preparación del Acetato de p-Bromobenzoato de 8β-acetato de 4,5-en-1β,6α,8β-trihidroxi-11,13-dihidro-eudesman-6-olida: Se mezclaron 10mg de 8β-acetato de 4,5-en-1β,6α,8β-trihidroxi-11,13-dihidro-eudesman-6-olida en 0.6 ml de piridina y 40mg de cloruro de ácido p-bromobenzóico, dejándose reaccionar por 72

horas, con agitación continua, después de este tiempo se diluyó con CH_2Cl_2 además de lavarse con una solución saturada de NaHCO_3 y H_2O . La fase orgánica fue reducida en volumen mediante presión reducida, para que la piridina se eliminara se adicionó tolueno y posteriormente se sometió a presión reducida. Se purificó el producto de la reacción mediante procesos de recristalización con MeOH y Hexano obteniéndose 6mg del producto: acetato de p-bromobenzoato de 4,5-en-1 β ,6 α ,8 β -trihidroxi-11,13-dihidro-eudesman-6-olida (ESTRUCTURA 28), con un p.f. de 160-163 °C, con las siguientes constantes espectroscópicas:

IR $\nu_{\text{max}}(\text{CHCl}_3)$, cm^{-1} : 2915 (alifático C-H); 1780 (γ -lactona); 1740 (éster); 1720 (C=O); 1590 (C=C) (ESPECTRO 9).

RMN^1H (CDCl_3) 300 MHz, δ : 7.85 (2H, d, $J=8.7$ Hz, p- BrC_6H_4); 7.53 (2H, d, $J=8.6$ Hz, p- BrC_6H_4); 5.48 (1H, q, $J=2.5$ y 4.5 Hz, H-8); 5.36 (1H, bd, $J=11.2$ Hz, H-8); 5.01 (1H, dd, $J=11$ y 5 Hz, H-1); 2.75 (1H, q, $J=7$ Hz, H-11); 2.41 (1H, dd, $J=2.5$ y 15 Hz, H-9); 2.08 (3H, s, $-\text{OCOCH}_3$); 1.92 (3H, bs, H-15); 1.58 (1H, dd, $J=2.6$ y 15 Hz, H-9); 1.24 (3H, d, $J=7$ Hz, H-13); 1.25 (3H, s, H-14) (ESPECTRO 10).

RMN^1H (Benceno) 300 MHz, δ : 7.84 (2H, d, p- BrC_6H_4); 7.1 (2H, d, p- BrC_6H_4); 5.01 (3H, m, H-8,3,6); 2.1 (2H, m, H-1,11); 1.98 (3H, bs, H-15); 1.43 (3H, s, $-\text{OCOCH}_3$); 1.22 (3H, s, H-13); 0.86 (3H, s, H-14) (ESPECTRO 11).

EM, m/z (70 eV) (abund. rel.): 446 M^+ -44 (2%); 202 (100%); 200 (99%); 185 (82%); 183 (86%); 75 (25%); 45 (10%).

La *Stevia rhombifolia* H.B.K. se colectó en Valsequillo Puebla México en julio de 1988. (voucher MEXU 460378), depositándose un ejemplar en el herbario del Instituto de Biología, UNAM. Las partes aéreas secas y molidas de la planta (112.1g) se colocaron en una columna con celita en el fondo y se hizo pasar Hexano hasta extracción total, posteriormente

AcOEt y por último MeOH. Los extractos resultantes se concentraron a presión reducida.

Del extracto hexánico, se precipitó un polvo de color amarillo claro (30mg) el cual fue sometido a recristalización con AcOEt obteniéndose un p.f. de 202-205 °C y un Rf= 0.53 en AcOEt-Hexano 4:1 de la que se describe la siguiente espectroscopía:

UV (MeOH) $\lambda_{\text{máx}}$ =210 (E=12300); 270 (E=1200); 345 (E=1800) (ESPECTRO 12).

IR $\nu_{\text{máx}}$ (CHCl₃), cm⁻¹ : 3544 (-OH); 1663 (-C=O); 1595 (-C=C-); 1325 (-C-O-); 2853 (CH₂-O-); 1267 (-C-OH) (ESPECTRO 13).

RMN¹H (CDCl₃) 300 MHz. δ : 12.41 (1H, s, -CO₂H, intercambiable con D₂O); 7.72 (1H, dd, J=2 y 9 Hz, H-6); 7.67 (1H, s, J=2 Hz, H-2); 6.98 (1H, d, J=9 Hz, H-5); 6.54 (1H, s, H-8); 3.99 (3H, s, -OCH₃); 3.96 (6H, s, OMe); 3.86 (3H, s, OMe) (ESPECTRO 14).

RMN¹³C (CDCl₃) 75.4 MHz, δ : 178.74 (C-4); 156.12 (C-2); 152.97 (C-7), 151.45 (C-5); 149.75 (C-9); 148.84 (C-3); 145.32 (C-4); 138.83 (C-6); 129.28 (C-1); 123.08 (C-8); 122.20 (C-5); 111.42 (C-2); 110.43 (C-10); 106.39 (C-3); 90.21 (C-8); 60.19 (6-OCH₃); 56.50 (7, 3, -OCH₃) (ESPECTRO 15).

EM, m/z (70 ev) (abund. rel.): 374 M⁺ (100%); 373 M⁺ (15 + 18) (46%); 181 (10%); 151 (15%); 123 (10%); 69 (45%) (ESTRUCTURA 20).

Estos datos pertenecen a la 5-hidroxi-2-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-3,6,7-trimetoxi-4H-1-benzopirán-4-one (Casticina), previamente aislada de las siguientes plantas: *Parthenium*²³⁻²⁴, *Brickellia chorolepis*²⁵, *Brickellia lacinata*²⁶, *Brickellia veronicaefolia*²⁷, *Vitex*²⁸, entre otras.

La identidad de este producto se confirmó también por comparación directa de sus espectros así como de su p.f., con los datos descritos en la literatura²⁹⁻³¹.

RESULTADOS Y DISCUSION

Stevia aff. tomentosa H. B. K.

La *Stevia aff. tomentosa* H. B. K. fue colectada en Valsequillo Puebla, México en Agosto de 1987. Del extracto de AcOEt se lograron aislar mediante procesos cromatograficos tres compuestos, dos de ellos obtenidos en eluciones de Hexano-AcOEt 8:2, mientras que el más polar fue obtenido en eluciones de la misma mezcla pero en proporción 1:1.

El compuesto menos polar aislado en el sistema Hexano-AcOEt 8:2 presenta un p.f. de 162-164°C. Su peso molecular determinado por espectrometría de masas $M^+ = 308$, está de acuerdo para un compuesto de fórmula de $C_{17}H_{24}O_5$. Esta sustancia se denominó 8 β -acetato de 4,5-en-1 β ,6 α ,8 β -trihidroxi-11,13-dihidro-eudesman-6-olida (ESTRUCTURA 25).

La elucidación de su estructura se describe a continuación.

El espectro de IR del 8 β -acetato de 4,5-en-1 β ,6 α ,8 β -trihidroxi-11,13-dihidro-eudesman-6-olida (ESPECTRO 1) presenta una banda en 1772 cm^{-1} , característica de una γ -lactona, así como una banda intensa en 1737 cm^{-1} que se asigna a una función éster.

El estudio de los espectros de RMN^1H , $RMN^{13}C$ (ESPECTRO 2 y 3) así como la espectrometría de masas permiten establecer las siguientes evidencias.

La presencia de un grupo acetato se establece espectrometría de masas tanto por el pico a m/z 43 ($C_2H_3O^+$, 100%) que corresponde al acilo respectivo así como por el pico a m/z 248 ($M^+ - 60$) que indica la pérdida de una molécula de ácido

acético, lo cual fue confirmado por la señal característica del grupo acetato en RMN^1H que aparece a 2.07 ppm, así como el espectro de RMN^{13}C donde el carbono del carbonilo se localizó a 170.0 ppm y el metilo aparece a 20.0 ppm.

La presencia de un grupo oxhidrilo en el compuesto fue elucidada de acuerdo con los siguientes datos: una banda a 3611 cm^{-1} en el espectro de IR (ESPECTRO 1), la pérdida de una molécula de agua a partir del ión molecular observada a m/z 230 en el espectro de masas del compuesto y la presencia de un doble de doble en el espectro de RMN^1H a 3.51 ppm, que integra para un protón el cual fue asignado a un hidrógeno geminal de un grupo alcohol.

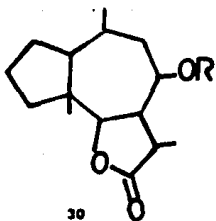
Es necesario puntualizar que el doble de doble anteriormente descrito a 3.51 ppm ($J = 4.1$ y 11 Hz) fue asignado al protón α axial geminal del grupo alcohol que por su desplazamiento se ubicó en el C-1^{22,23}.

Si se resta de la fórmula molecular del β -acetato de 4,5-en-1 β ,6 α ,8 β -trihidroxi-11,13-dihidro-eudesman-6-olida ($\text{C}_{17}^1\text{H}_{24}^2\text{O}_5$) (ESTRUCTURA 26) los átomos que corresponden al acetato y al alcohol, tenemos una fórmula parcial de $\text{C}_{15}^1\text{H}_{20}^2\text{O}_2$; que aunado a la presencia de una γ -lactona detectada en IR se deduce que el esqueleto de este compuesto corresponde a una lactona sesquiterénica, en donde la presencia de un doblete que integra para tres protones a 1.25 ppm así como la ausencia de las señales características del metilo exocíclico, es evidencia de que este producto es un -11,13-dihidro derivado.

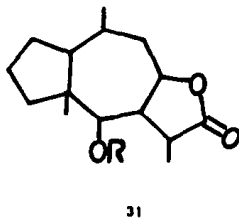
La fórmula residual $\text{C}_{15}^1\text{H}_{20}^2\text{O}_2$ indica que la molécula contiene seis insaturaciones, las cuales son fácilmente localizables; una del carbonilo, otra insaturación es por la presencia de un doble enlace tetrasustituido detectado por RMN^{13}C , donde se observan dos señales a 127 y 128.8 ppm, y cuatro insaturaciones correspondientes al esqueleto tricíclico.

Estos datos son determinantes para la elucidación del esqueleto del compuesto en estudio; ya que hasta el momento se puede pensar solamente en cinco tipos de lactonas sesquiterpénicas como son la Ambrosanólidas, Helenanólidas, Eremofilanólidas y Eudesmanólidas cerradas tanto en la posición 6 como en la posición 8 (ESQUEMA IV).

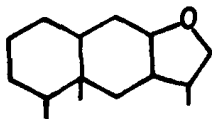
ESQUEMA IV



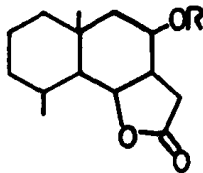
Ambrosanólida



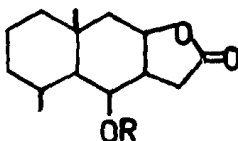
Helenanólida



Eremofilanólida



Eudesmanólida



34

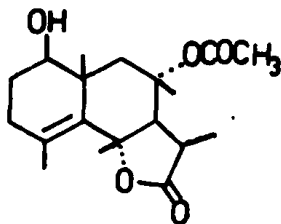
Eudesmanólida

Como se mencionó anteriormente existe en la molécula una doble ligadura tetrasustituida ya que solo fue detectada por RMN¹³C, siendo uno de los sustituyentes un metilo, ya que la señal característica del metilo vinílico aparece en RMN¹H a 1.87 ppm, este requerimiento estructural elimina la posibilidad de que sea Eremofilanólida.

Por otra parte en RMN¹H se observan dos señales a campo bajo un aparente cuarteto a 5.81 ppm (J= 2.6 y 2.5 Hz) y un doblete a 5.35 ppm (J= 11 Hz) que pueden ser asignados tanto a la base del cierre de la lactona, como a la base del acetato. Se puede apreciar que estos dos protones sufren un desplazamiento químico mayor a campo bajo que los esperados para una base de una lactona normal, lo que indica que esta base esta en una posición alilica³⁴⁻⁴². Este hecho elimina la posibilidad de que los esqueletos sean del tipo de las Ambrosanólidas y Helenanólidas. En este punto faltaría solamente elucidar el cierre de la lactona en un esqueleto de Eudesmanólida. Si el cierre de la lactona es trans en el C-8, dejando el H-8 con una orientación β -axial sería como el acetato de la ciclopirethrosina³², el cual presenta desplazamientos a campo más alto comparado con los presentados

para el compuesto en discusión; por lo tanto se descarta la posibilidad de una lactona de este tipo. Por otro lado si se considera el cierre de la lactona en la misma posición C-8 o con el protón H-8 con una orientación α -ecuatorial, sería como la tulipifera⁴⁸ la cual presenta desplazamientos diferentes a los observados, por lo que estos datos permiten descartar la ESTRUCTURA 35.

De acuerdo con lo anterior, el único esqueleto que cumple con los requisitos de la lactona sesquiterpénica es necesariamente una Eudesmanólida que está cerrada en la posición 6 (ESTRUCTURA 34), de la cual se ha encontrado una similitud del compuesto en estudio y las torrentina⁴⁹, que es una Eudesmanólida con cierre de lactona en α -C₆ y un acetato en posición α -C₈, así mismo posee un grupo hidroxilo en β -C₁ y una doble ligadura tetrasustituida entre C-4 y C-5. La comparación de los espectros de RMN¹H del compuesto en estudio y la torrentina permiten deducir que la diferencia entre estos dos compuestos es debido solamente al grupo acetato en C-8, ya que la constante de acoplamiento señalan que el éster en C-8 posee una orientación β -axial en el compuesto en estudio quedando la estructura como la 8β -acetato de 4,5-en-1 β ,6 α ,8 β -trihidroxi-11,13-dihidro-eudesman-6-olida (ESTRUCTURA 25).



35

Torrentina

La relación axial-axial de H-6 y el H-7 fue determinada por la constante de acoplamiento del H-6 ($J = 11$ Hz) lo que indica un ángulo dihedro ϕ de aproximadamente 180° tomando en cuenta las consideraciones biogenéticas las cuales señalan al H-7 como α -axial, por lo que se deduce que el H-6 tiene una orientación β .

Por otro lado la determinación estereoquímica del centro quiral del C-8 se estableció como base en los valores de las constantes de acoplamiento observada para los protones 7 α H y H-8 relacionandolos con el ángulo dihedro ϕ , por medio de la ecuación de Karplus⁴⁵.

La constante de acoplamiento entre H-7 y H-8 es ($J = 2.5$ Hz), este valor corresponde al ángulo de 0° . Por lo tanto si H-7 es α implica que el H-8 debe tener una orientación β del grupo acetato que se localiza en la posición del C-8. Esta orientación se ve apoyada por el hecho de que el 6 β H sufre un desplazamiento mayor en este compuesto que en la torrentina, ya que esto se explica fácilmente si se toma en cuenta la interacción que se establece entre el lado β en el C-8 y 6 β H del compuesto en estudio y que no se presenta en la torrentina.

Con el objeto de obtener cristales adecuados para el estudio cristalográfico por difracción de rayos-X, se esterificó el 8 β -acetato de 4,5-en-1 β ,6 α ,8 β -trihidroxi-11,13-dihidro-eudesman-8-olida con cloruro de ácido p-bromobenzoico, desafortunadamente los cristales obtenidos no fueron los adecuados para realizar este estudio. Sin embargo, el producto obtenido de la reacción, la 1 β p-bromobenzoato 8 β -acetato-4,5-en-1 β ,6 α ,8 β -trihidroxi-11,13-dihidro-eudesman-8-olida fue utilizado para elucidar la estereoquímica del metilo que se encuentra en el C-11, siguiendo el método de Narayanan^{40,46} el cual es empleado para lactonas sesquiterpénicas con configuración 6 β H-7 α H, como la propuesta para la molécula en estudio. Este método se basa en la diferencia de desplazamiento

químico del grupo metilo ubicado en el C-11 en el espectro de RMN^1H cuando se determina en CDCl_3 y en C_6D_6 . Así, el grupo metilo del C-11 muestra un desplazamiento a campo bajo de 0.38 ppm en C_6D_6 relativo al CDCl_3 , lo cual es indicativo de la β -orientación del metilo (ESPECTROS 10 y 11).

La estructura propuesta se ve corroborada por el espectro de RMN^{13}C , así como los experimentos del (ESPECTRO 3a) y el diagrama de correlación heteronuclear $^{13}\text{C}/^1\text{H}$ (HETCOR) (ESPECTRO 4).

El segundo de los compuestos obtenidos del aislamiento de la mezcla del Hexano-AcOEt 8:2 resultó ser un líquido aceitoso transparente. Su peso molecular de 308 obtenido por espectrometría de masa esta de acuerdo para la fórmula condensada $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{O}_5$. Esta sustancia fue determinada como la 8β -acetato de 3,4 -en-1 β ,6 α ,8 β -trihidroxi-11,13-dihidro-eudesman-6-olida (ESTRUCTURA 26) En su espectro de IR (ESPECTRO 5) presenta entre otras bandas una a 3480 cm^{-1} asignada para un grupo alcohol; otra a 1780 cm^{-1} característica de una γ -lactona y una banda intensa en 1740 cm^{-1} propia de una función éster. Los datos obtenidos de RMN^1H (ESPECTRO 6) y espectrometría de masas nos permite asegurar que este compuesto es un isómero del 8β -acetato 4,5-en-1 β ,6 α ,8 β -trihidroxi-11,13-dihidro-eudesman-6-olida (ESTRUCTURA 25); a continuación se describen algunas de las señales más importantes en RMN^1H . Así el protón de la posición H-6, a diferencia del primer compuesto, no es alílico, por lo cual su desplazamiento es a campo alto, observándose como un doble de doble a 4.58 ppm con constantes de acoplamiento de ($J=12$ y 12 Hz). Estos valores corresponden a las interacciones entre H-6, H-5 y entre H-6, H-7 respectivamente, lo cual implica valores de ángulos dihedrales

de aproximadamente 180° para cada uno según la ecuación de Karplus, donde por consideraciones biogenéticas el H-7 es α y el H-8 es β . En base a lo anterior y a la ecuación de Karplus H-5 se localiza en una orientación α , el desplazamiento del protón en la posición H-8 es el mismo para ambos compuestos, observándose en este compuesto un cuarteto a 5.51 ppm asignada al H-8, asimismo se localiza un multiplete a campo bajo que fue asignado al protón vinílico en la posición H-3; además se observa un singulete que integra para tres protones a 183 ppm que es el desplazamiento adecuado para el metilo vinílico de C-4. Finalmente se localizan los desplazamientos tanto para el protón como para el grupo metilo en C-11, el primero se observa como un cuarteto a 2.74 ppm y el segundo como un doblete a 1.30 ppm. Estos desplazamientos son muy semejantes a los presentados por el 8 β -acetato de 4,5-en-1 β ,6 α ,8 β -trihidroxi-11,13-dihidro-eudesman-6-olida, lo cual es indicativo de que ambos poseen la misma estereoquímica en C-11.

El compuesto de mayor polaridad resultó ser un líquido aceitoso transparente, su peso molecular de 306 obtenido por espectrometría de masas esta de acuerdo con la fórmula condensada $C_{17}H_{24}O_5$. Este compuesto es un isómero de los compuestos (estructura 25, 26) denominándosele la 8 β -acetato de 4,15-en-1 β ,6 α ,8 β -trihidroxi-11,13-dihidro-eudesman-6-olida (ESTRUCTURA 27). De acuerdo con los siguientes datos espectroscópicos en el IR (ESPECTRO 7) se observan entre otras señales a 3500 y 3600 cm^{-1} correspondientes al grupo alcohol; a 1770 cm^{-1} otra señal característica para una γ -lactona. Por otro lado considerando el desplazamiento para el protón H-6 a 4.75 ppm como un doble de doble y con constantes de

acoplamiento de ($J = 11$ y 11 Hz) correspondiendo a las interacciones entre el protón H-6 y H-5, H-6 y H-7. Permiten postular una orientación β para H-6 y una orientación α para H-5 y H-7 tomándose en cuenta las consideraciones biogenéticas antes mencionadas; se presentó un doble de doble con un desplazamiento a 4.75 ppm H-6 con constantes de acoplamiento de ($J = 11$ y 11 Hz) al igual que la estructuras 25 y 26 estas constantes corresponden a las interacciones $6\beta H-7\alpha H$ respectivamente.

Los desplazamientos anteriormente mencionados son muy semejantes a los dos compuestos descritos al inicio de esta discusión lo cual indica que este producto posee la misma estereoquímica en C-11 para los tres.

Los protones vinílicos en C-5 presentan singuletes anchos a 4.80 ppm y 4.90 ppm, lo que demuestra que existe una doble ligadura entre C-4 y C-15, a diferencia de los compuestos descritos para las estructuras 25 y 26 que presentan otros desplazamientos para C-15.

La *Stevia rhombifolia* H.B.K. fue recolectada en Valsequillo Puebla, México en Julio de 1988. De la extracción de las partes aéreas secas y molidas con Hexano se logra aislar un compuesto.

Este compuesto resulto ser un polvo amarillo con p.f. de 202-205 °C, sus constantes físicas y espectroscópicas corresponden a las descritas para el compuesto 5-hidroxi-2-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-3,6,7-trimetoxi-4H-Benzopirán-4-ona (Casticina), (ESTRUCTURA 29) previamente aislada de las siguientes plantas: *Achillea millefolium*, *Parthenium*, *Bickellia veronicaefolia*, *Vitex*, entre otras. La identidad de esta

sustancia se confirmó por comparación directa de sus espectros de UV (ESPECTRO 12), IR (ESPECTRO 13), RMN¹H (ESPECTRO 14) y RMN¹³C además de espectrometría de masas, con los descritos en la literatura²⁰⁻²¹.

CONCLUSIONES

Del estudio fitoquímico de dos plantas mexicanas del género *Stevia*: *Stevia aff. tomentosa* H.B.K. y *Stevia rhombifolia* H.B.K., recolectadas en Valsequillo Puebla, se llegó a las siguientes conclusiones.

1. El estudio químico de estas dos especies muestran que su composición es muy diferente. Así de *Stevia rhombifolia* H.B.K. se aisló un compuesto conocido, 4H-1-benzopirán-4-one-5-hidroxi-2-(3-hidroxi-4-metoxifenil)-3,6,7-trimetoxi llamada también Casticina (ESTRUCTURA 29); la cual ha sido aislada de *Achillea millefolium*, *Bickelia veronicaefolia*. Mientras que de la *Stevia aff. tomentosa* H.B.K. se aislaron tres compuestos que resultaron ser lactonas sesquiterpénicas con esqueleto de Eudesmanólida denominadas: 8 β -acetato de 4,5-en-1 β ,6 α ,8 β -trihidroxi-11,13-dihidro-eudesman-6-olida (ESTRUCTURA 25); y dos más que son isómeros de éste; 8 β -acetato de 3,4-1 β ,6 α ,8 β -trihidroxi-11,13-dihidro-eudesman-6-olida (ESTRUCTURA 26) y 8 β -acetato de 4,15-en-1 β ,6 α ,8 β -trihidroxi-11,13-dihidro-eudesman-6-olida (ESTRUCTURA 27).

2. La estereoquímica de estos compuestos fue determinada por métodos químicos y espectroscópicos.

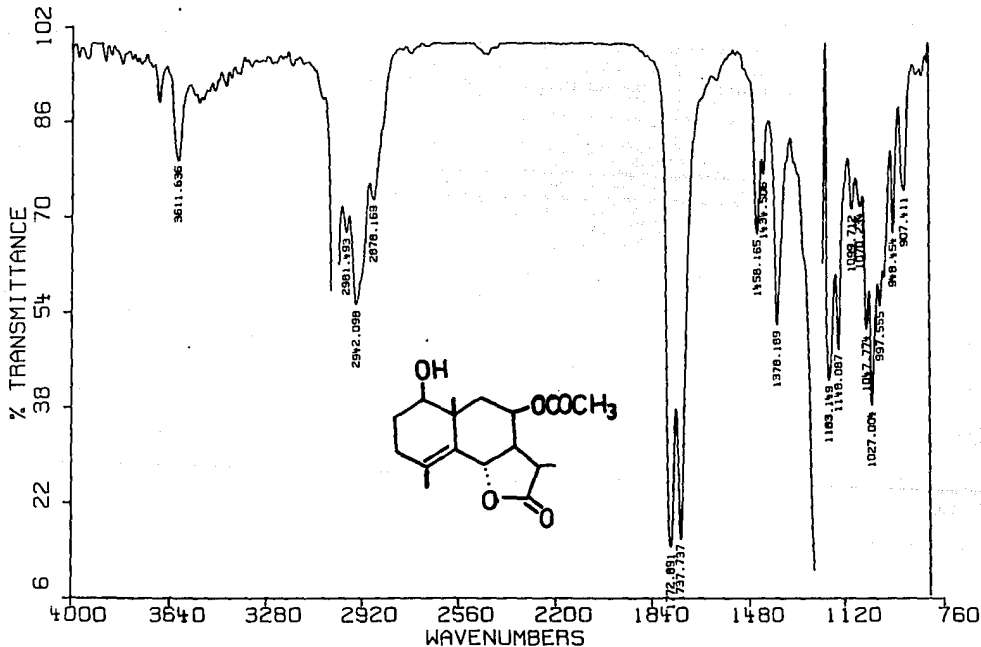
3. Debido a la diferencia de composición para *Stevia rhombifolia* H.B.K., con la previamente publicada para la misma, se sugiere ampliar su estudio fitoquímico, no solo de las partes aéreas de la planta sino también de las raíces.

4. Así mismo se sugiere ampliar el estudio fitoquímico de la *Stevia aff. tomentosa* H.B.K. con el fin de obtener mayor cantidad de los compuestos aislados y de esta manera determinar su posible actividad biológica.

ESPECTROS

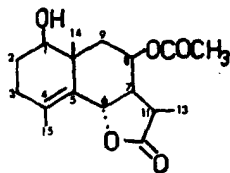
ESPECTRO 1

M.MTZ. M.A.52 SOL./CHCL3 29/04/88 TORRES

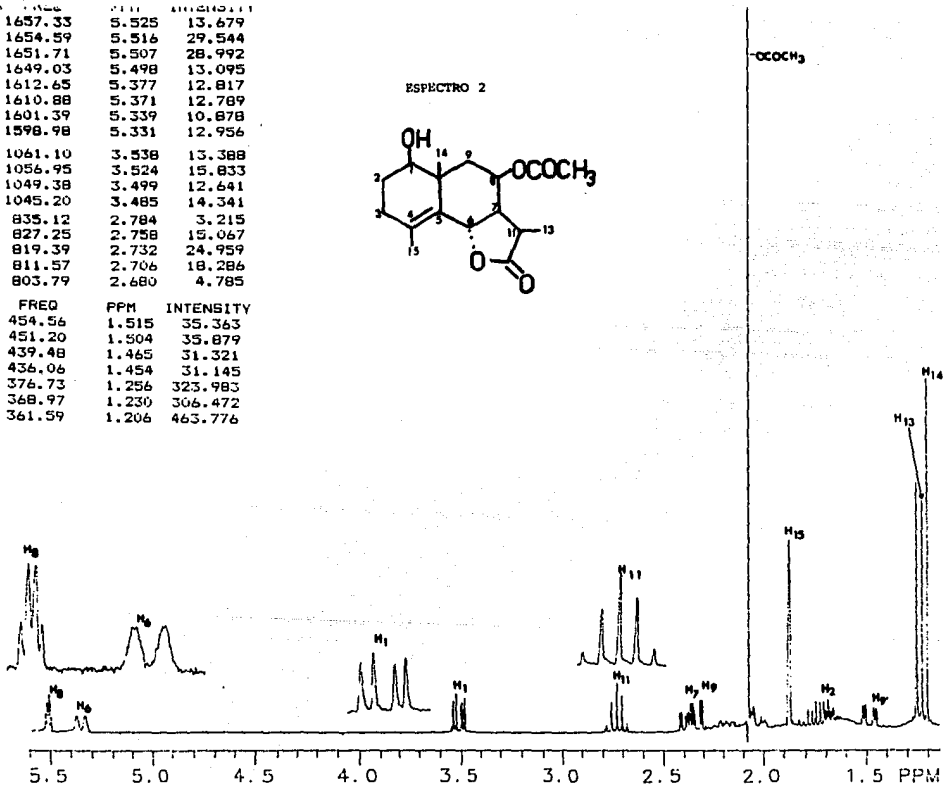


INDEX	FREQ	PPM	INTENSITY
01	1657.33	5.525	13.679
02	1654.59	5.516	29.544
03	1651.71	5.507	28.992
04	1649.03	5.498	13.095
05	1612.65	5.377	12.817
06	1610.88	5.371	12.789
07	1601.39	5.339	10.878
08	1598.98	5.331	12.956
01	1061.10	3.538	13.388
02	1056.95	3.524	15.833
03	1049.38	3.499	12.641
04	1045.20	3.485	14.341
01	835.12	2.784	3.215
02	827.25	2.758	15.067
03	819.39	2.732	24.959
04	811.57	2.706	18.286
05	803.79	2.680	4.785

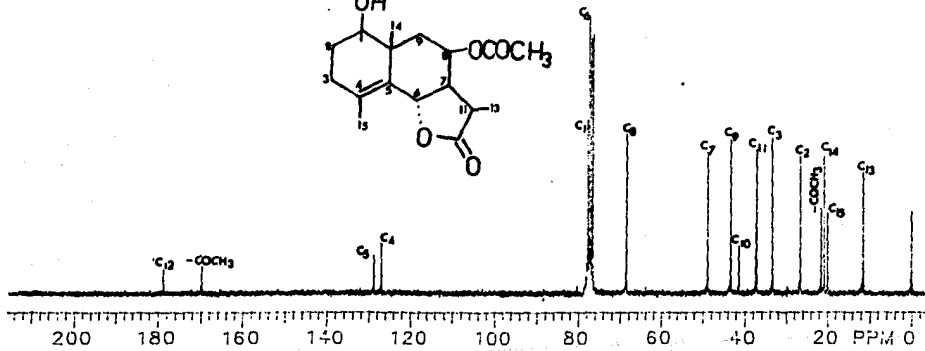
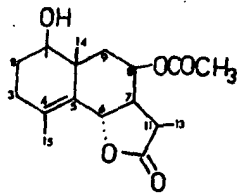
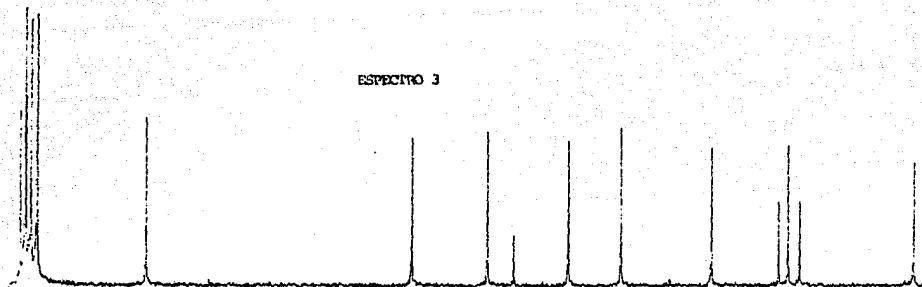
ESPECTRO 2



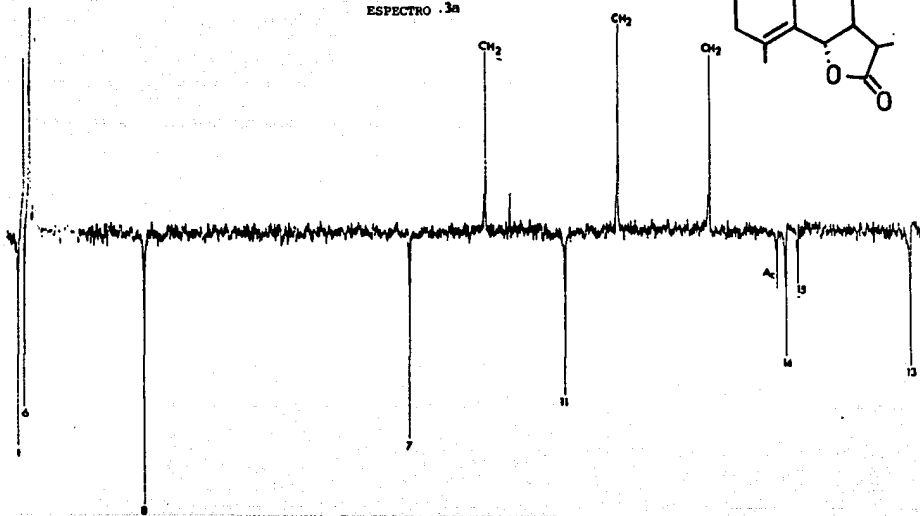
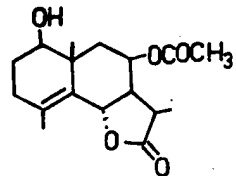
INDEX	FREQ	PPM	INTENSITY
01	454.56	1.515	35.363
02	451.20	1.504	35.879
03	439.48	1.465	31.321
04	436.06	1.454	31.145
05	376.73	1.256	323.983
06	368.97	1.230	306.472
07	361.59	1.206	463.776



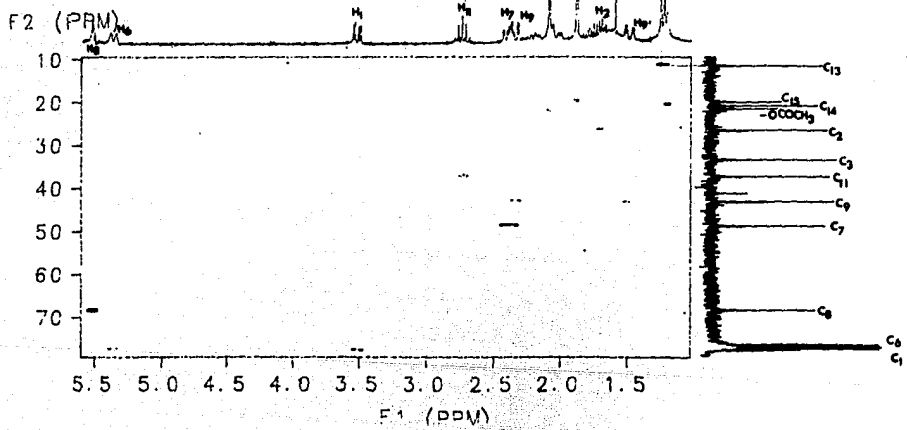
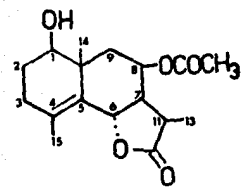
ESPECTRO 3

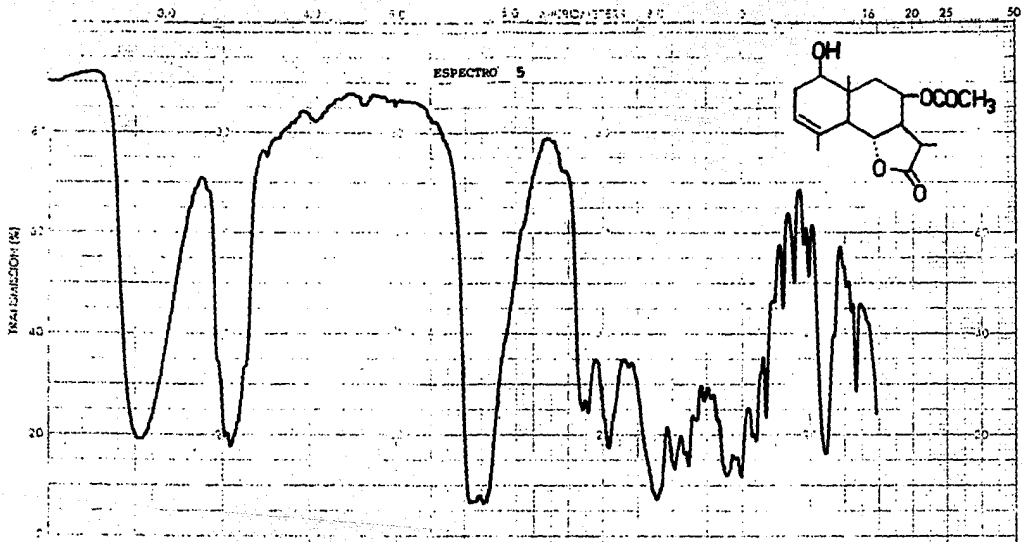


ESPECTRO .3a



ESPECTRO 4



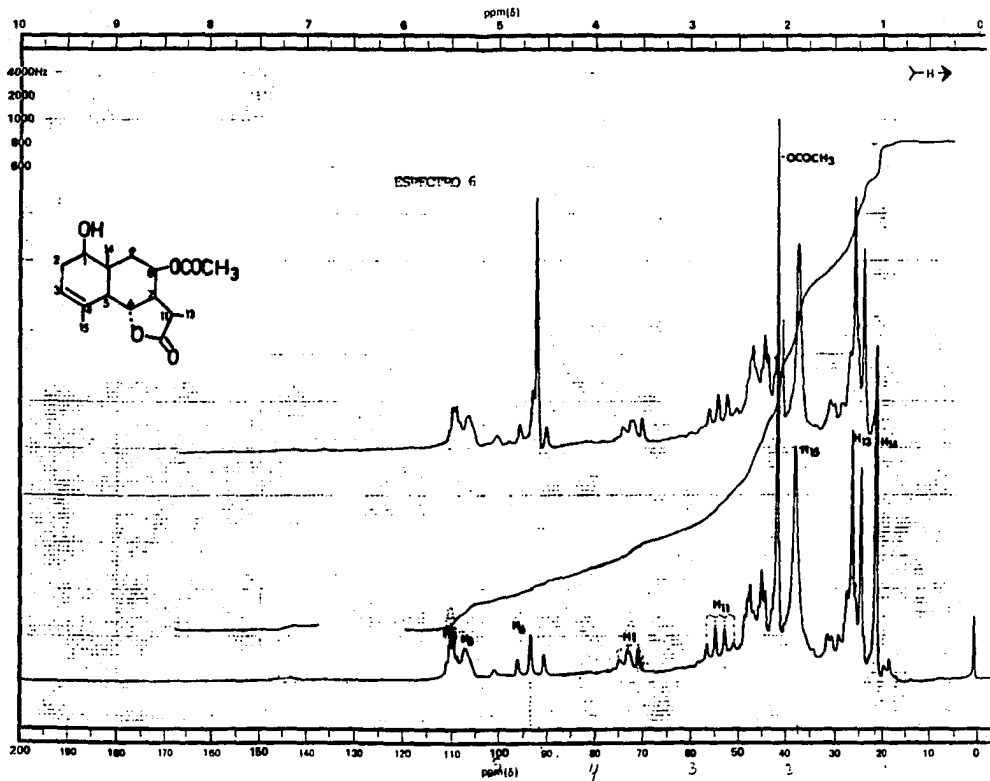


WAVE NUMBER (cm ⁻¹)	3500	2000	1800	1600	1400	WAVE NUMBER (cm ⁻¹)	800	600	500	200
EXPANSION	ANSCISSA	EXPANSION	COORDINATE	SCAN TIME	RESPONSE	REP. SCAN	SINGLE BEAM	TIME DRIVE	PS3 SAMPLE CHOP	DATE
CONTRAST		ABS		SUIT PROGRAM	OPERATOR					1968-12-27
SAMPLE	PH-37	REMARKS		SOLVENT		CELL PATH	NaCl			
C. BIN	11. finches			CONCENTRATION	pellets/100g	REFERENCE	air			

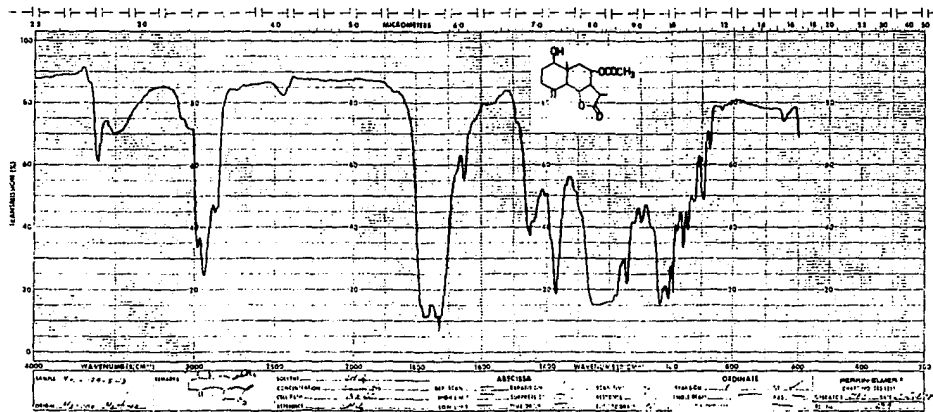
SAMPLE

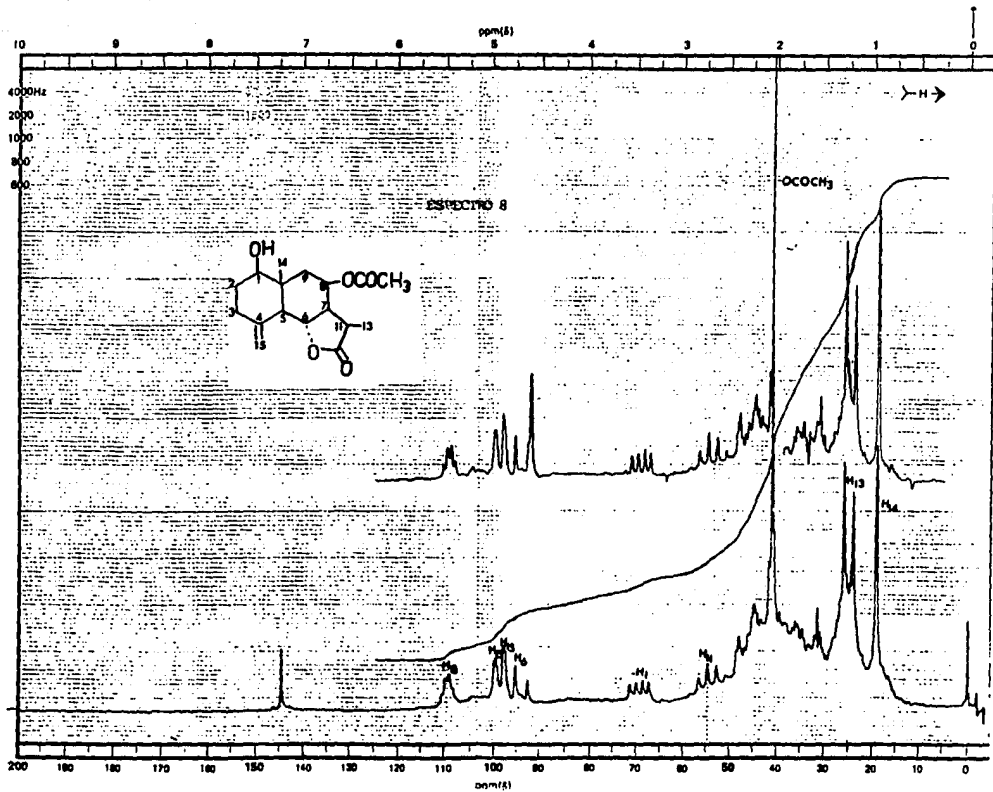
REF. NO.

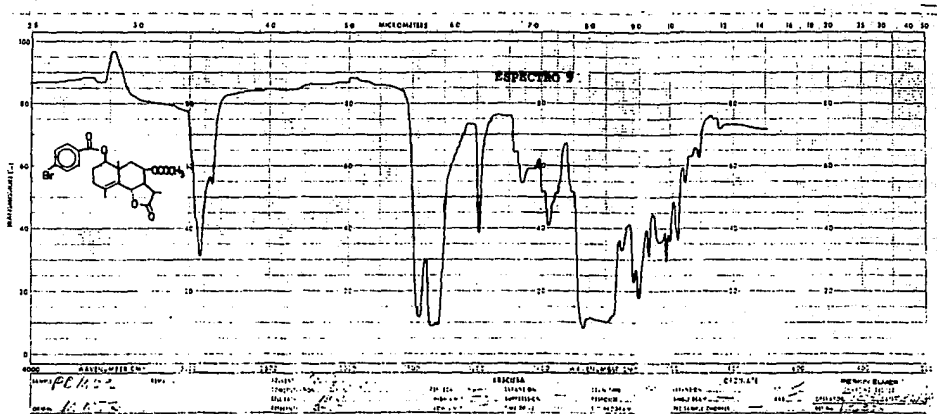
11333



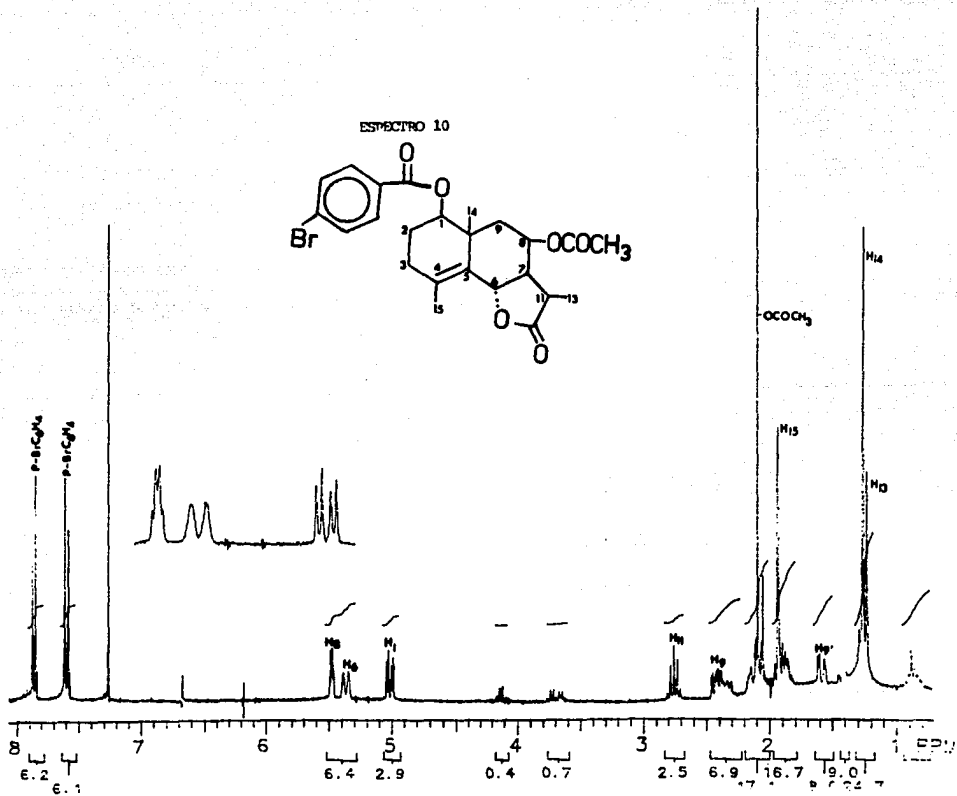
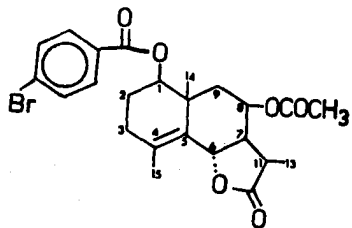
ESPECTRO 7







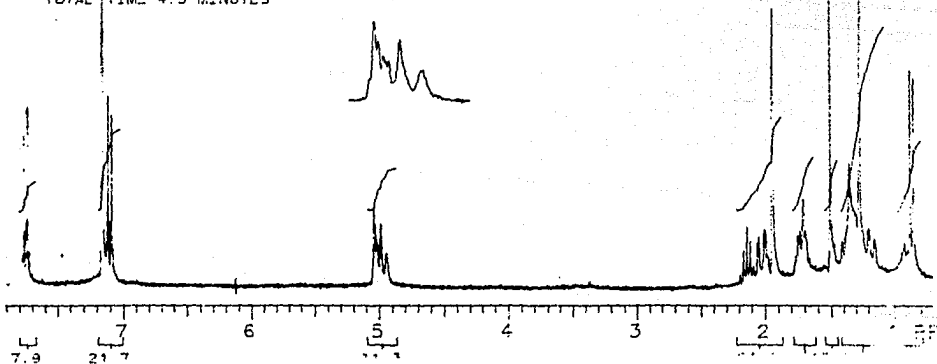
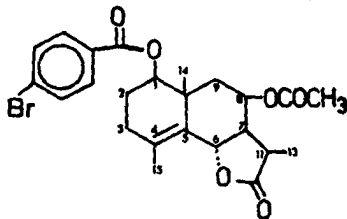
ESPECTRO 10

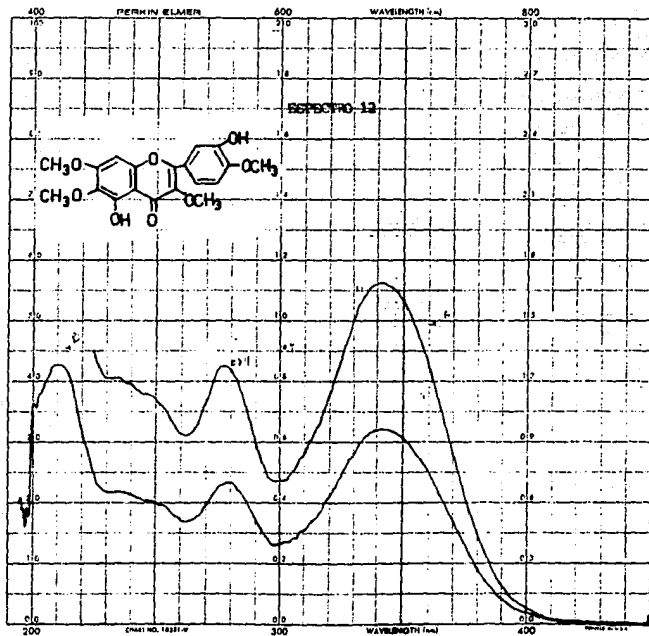


RENZDATO
EXP1 PULSE SEQUENCE STD1H
DATE 28-04-89
SOLVENT C6D6
FILE H

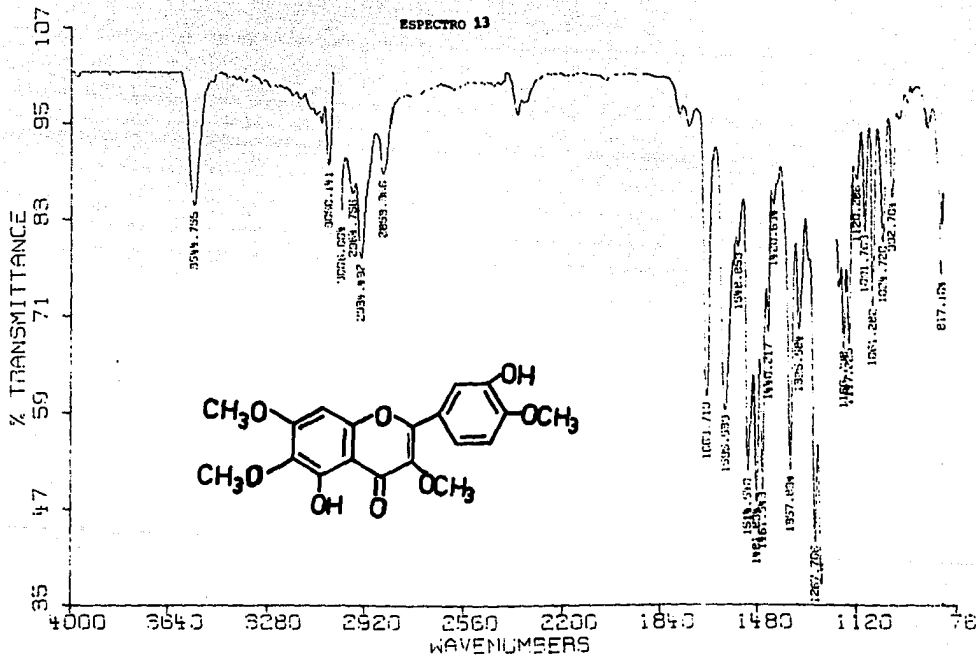
ESPECTRO 11

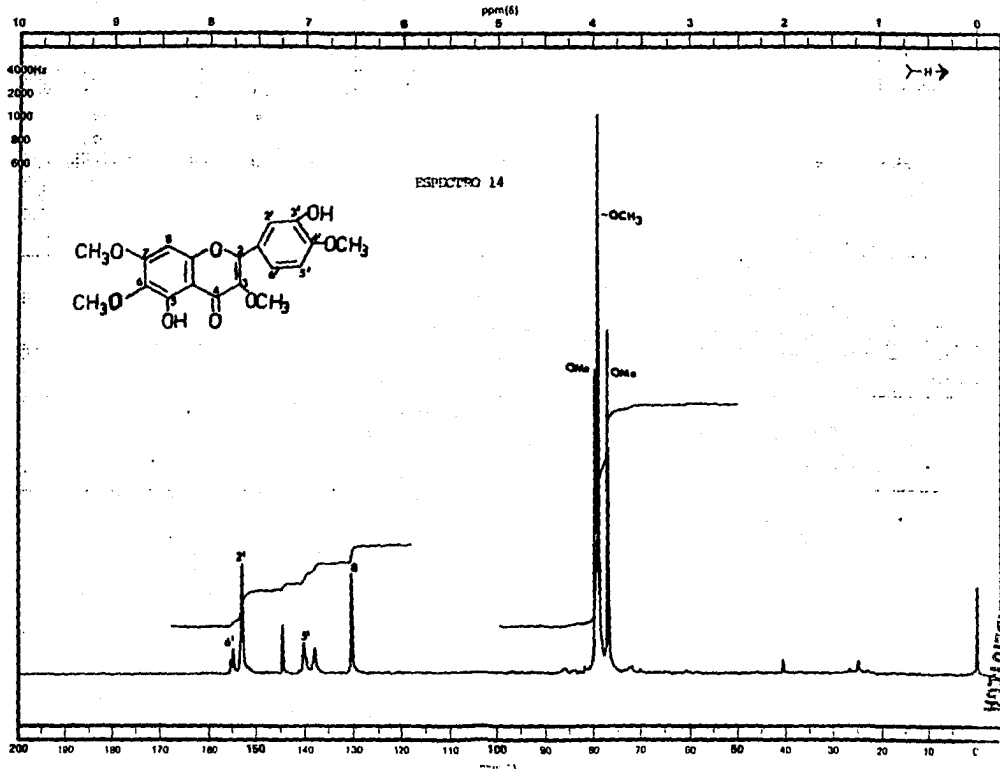
OBSERVE PROTON
FREQUENCY 299.943 MHz
SPECTRAL WIDTH 4000 HZ
ACQ. TIME 3.752 SEC
PULSE WIDTH 45 DEGREES
AMBIENT TEMPERATURE
NO. REPETITIONS 72
SPIN RATE 20 HZ
DOUBLE PRECISION ACQUISITION
DATA PROCESSING
RESOLUTION ENHANCED
FT SIZE 32K
TOTAL TIME 4.5 MINUTES





M.MTZ. P3C-EST-H SOL./CHCL3 2/03/89 TORRES



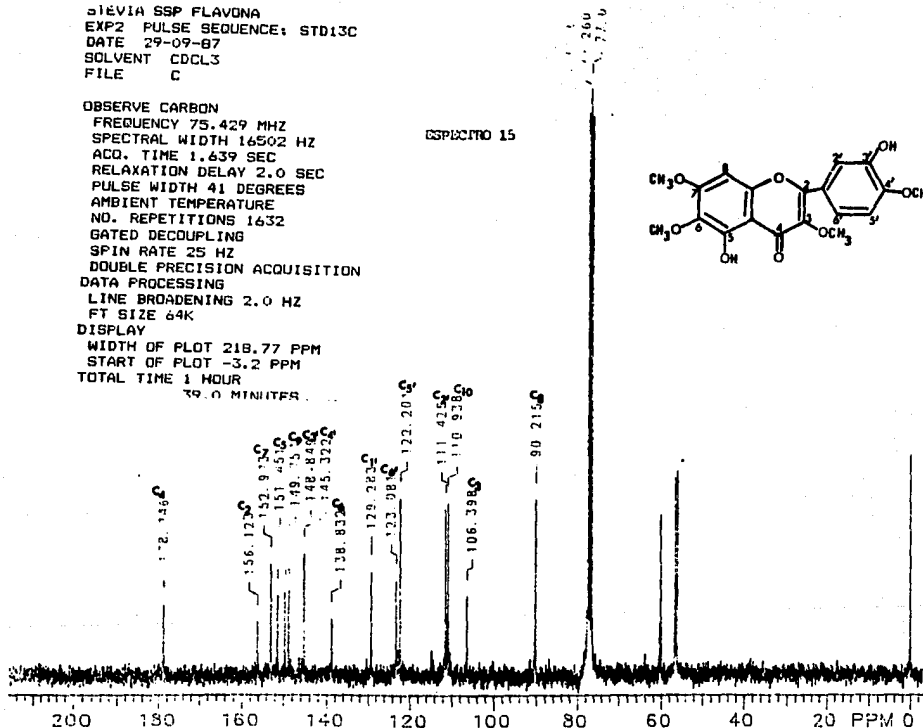


ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

51EVI4 SSP FLAVONA
EXP2 PULSE SEQUENCE: STD13C
DATE 29-09-87
SOLVENT CDCL3
FILE C

OBSERVE CARBON
FREQUENCY 75.429 MHZ
SPECTRAL WIDTH 16502 HZ
ACQ. TIME 1.639 SEC
RELAXATION DELAY 2.0 SEC
PULSE WIDTH 41 DEGREES
AMBIENT TEMPERATURE
NO. REPETITIONS 1632
GATED DECOUPLING
SPIN RATE 25 HZ
DOUBLE PRECISION ACQUISITION
DATA PROCESSING
LINE BROADENING 2.0 HZ
FT SIZE 64K
DISPLAY
WIDTH OF PLOT 218.77 PPM
START OF PLOT -3.2 PPM
TOTAL TIME 1 HOUR
39.0 MINUTES

ESPECTRO 15



BIBLIOGRAFIA

1. Haynes, L.J., *Quarterly Reviews* II, 46 (1948).
2. Rodriguez, E., Towers, G. H. N. and Mitchell, J.C., *Pytochemistry*, †, 1573 (1976).
3. Romo de Vivar, A., Rodriguez, E., *Rev. Latinoamer. Quim.*, 56 (1977).
4. Romo de Vivar, A., *Estado actual del conocimiento de plantas medicinales mexicanas. Lactonas Sesquiterpénicas. Clasificación, Actividad y Biogénesis*, IMEPLAM, 151 (1976).
5. Herout, V., *Chemotaxonomie of familie compositae. In Pharmacognosy and Phytochemistry*, Springer Verlag, N.Y. (1971).
6. Kapchan, S.M., *Fed Proc.*, §§, 288 (1974).
7. Kapchan, S.M. and Shubert, R.M., *Science*, •, 795 (1974).
8. Geissman, T.A., *The Chemistry of Flavonoids*, Macmillan, N.Y. (1962).
9. Toscano, L., Grisanti, G. Fioriello, G., Barlotti, L., Binchentti, A. and Riva, M. J. *Med. Chem.*, †, 213 (1977).
10. King, R. and Robinson, H., *Phytochemistry*, 446 (1980).
11. Wagner, H., Hirochi, H. and Norman, R., *Farrsworth. Economic and Medical Plant Research*, Academic Press, London, •, 3 (1985).
12. Rodriguez, E., Salmón, M., Ortega, A. and Díaz, E., *Rev. Latinoamer. Quim.*, 45 (1975).
13. Belic, J. and Cerin, B., *Vesth. Sluv. Kem. Drug.*, 33 (1962).
14. Quijano, L., Calderón, J., Gómez, F., Vega, J. and Ríos,

- T., *Phytochemistry*, **†**, 1369 (1972).
15. Ortega, A., Martínez, R. and Garcha, C., *Rev. Latinoamer. Quim.*, **••**, 45, (1980).
 16. Salmón, M., Ortega, G. and Angeles, E., *Phytochemistry*, **††**, 1512 (1983).
 17. Angeles, E., Fottina, K., Griego, P., Huffman, J., Miranda, R. and Salmón, M., *Phytochemistry*, **†**, 1804 (1982).
 18. Kaneda, N., Khoda, J., Yamasaki, H., Tanako, O. and Nishi, *Chem. Pharm. Bull.*, **†**, 2266 (1978).
 19. Rustaiyan, A. and Nazarian, L., *Fitoterapia*, , 175 (1977).
 20. Wyman, J., *J. Am. Chem. Soc.*, **†**, 3173 (1963).
 21. Martínez, M., Muñoz, A. and Joseph-Natan, J. *of Natural Products*, **•**, 221 (1988).
 22. Sudborough, By. J., J., *J. Chem. Soc.*, , 591 (1965).
 23. Falk, A., *J. Pharm. Sci.*, , 1838 (1977).
 24. Rodríguez, E., *Biochemistry Syst. Ecol.*, , 207 (1977).
 25. Ulubelen, J., Ayhan, Timmerman, B. and Marby, T., *Phytochemistry*, **•**, 905 (1980).
 26. Timmerman, B., Mues, R., Marby, T. and Powell, M., *Phytochemistry*, **•**, 1895 (1979).
 27. Roberts, M., Timmerman, B. and Marby, T., *Phytochemistry*, **•**, 127 (1980).
 28. Belic, J. and Cerin, B., *Vestn. Sluv. Kem. Drug.*, , 33 (1962).
 29. Breknell, D. and Carman, R., *Tetrahedron Letters*, 73 (1978).
 30. Mues, R., Timmerman, B., Ohno, N. and Marby, T., *Phytochemistry*, **•**, 1379 (1979).
 31. Harbone, J., Marby, T. and Marry, H., "The Flavonoids", Chapmanhall London (1975).
 32. Iriuchijima, S., Tamura, S., *Tetrahedron Letters*, **†**, 1066 (1967).

33. Delgado, G., Marco, J., Linares, P., Sánchez, P., Sendra, M., Seoane, E., *Phytochemistry*, * , 1523 (1979).
34. Unde, N., Hiremath, S., Kulkarni, G. and Kelkar, G., *Tetrahedron Letters*, 4861 (1968).
35. Jain, T. and Mc Closky, J., *Tetrahedron Letters*, 4525 (1969).
36. Irwin, M. and Geissman, T., *Phytochemistry*, , 2411 (1969).
37. Knoche, H., Ourisson, G., Perold, G., Foussereau, V., Malaville, T., *Science*, * , 239 (1969).
38. Matsueda, S. and Geissman, T., *Tetrahedron Letters*, 2159 (1967).
39. Romo de Vivar, A. and Jiménez, H., *Tetrahedron*, †, 1741 (1965).
40. Bermejo, J., González, A. and Villar del Fresno, A., *Anales. Real. Soc. Esp. Fisic. E. Quim.*, 893 (1968).
41. Suni, Y., *J. Org. Chem.*, † , 3438 (1964).
42. Doskoteh, R., El-Ferally, F., *J. Pharm. Sci.*, , 877 (1969).
43. Doskoteh, R., Keely, S., Hufford, D., El-Ferally, F., *Phytochemistry*, * , 769 (1975).
44. Narayanan, C. and Venkatasubramanian, N., *J. Org. Chem.*, ††, 3156 (1968).