



UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE SAN LUIS POTOSI

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE METABOLITOS
SECUNDARIOS DE LA *Gymnosperma glutinosum*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

Q U I M I C O

P R E S E N T A :

MANUEL CERVANTES OLVERA

ASESORA: DRA. LUCIA E. VALLE AGUILERA

SAN LUIS POTOSI, S. L. P.

1993

95
4

T

QK495

.C74

C4

c.1



1080075061



UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE SAN LUIS POTOSI

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE
METABOLITOS SECUNDARIOS DE LA
Gymnosperma glutinosum

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
Q U I M I C O
P R E S E N T A:
MANUEL CERVANTES OLVERA

ASESORA: DRA. LUCIA E. VALLE AGUILERA

T
RKY
S
K
C
132



Esta tesis se realizó en el Centro de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas, bajo la dirección de la Dra. Lucía. E. Valle Aguilera y con el apoyo otorgado por el CONACyT, clave D111-904236.

DEDICATORIA

**A mí mamá: gracias por su paciencia, apoyo y confianza
que me ha dado siempre.**

A mis abuelos.

A mis hermanos.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Lucía E. Valle, por su valiosa asesoría y dirección durante el desarrollo de este trabajo.

Al Q. Héctor Mendoza C., por su gran ayuda durante el trabajo experimental y por la obtención de los espectros de infrarrojo.

Al Dr. Roberto Martínez, del Instituto de Química de la U.N.A.M. , por la obtención de los espectros de RMN- ^1H , ^{13}C y E. de Masas.

Al M.C. Alfredo Toscano, del Instituto de Química de la U.N.A.M. , por la obtención de la estructura de Rayos-X.

A la Ing. Agr. Sonia Salas de León, del Instituto de Zonas Desérticas.

Al M.C. Josué Alfaro López, por compartirme sus conocimientos en computación.

A mis maestros y amigos.

INDICE

I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	6
III. DISCUSION Y RESULTADOS	12
IV. PARTE EXPERIMENTAL	22
V. CONCLUSIONES	26
VI. ANEXOS	27
VII. BIBLIOGRAFIA	43

I. INTRODUCCION.

Los productos naturales son recursos de uso múltiple para el hombre, le proporcionan alimentos, agentes medicinales, fibras, colorantes, aromas, etc.

Por la realidad socioeconómica de nuestro país, así como, la de los países en vías de desarrollo, se hace prioritaria la investigación de los recursos naturales propios para su aprovechamiento racional, ya que se estima que aproximadamente de un 75 - 80% de la población total de estos países hacen uso de la medicina tradicional, y debido al elevado costo de los medicamentos han surgido políticas de diversas organizaciones internacionales, tales como la ONUDI (Organización de las Naciones Unidas para el Desarrollo Industrial) y la OMS (Organización Mundial de la Salud) que en su tratado de Alma-Ata de 1978,¹ propone:

- 1) Que los países en desarrollo, hagan uso de los recursos naturales y de su medicina tradicional para resolver ciertos problemas de salud.
- 2) Impulsar la investigación de la medicina tradicional y los recursos terapéuticos que utiliza así como establecer lineamientos de investigación y estudio.²

Estas alternativas unidas a la interrelación de grupos diversos de investigación, en áreas como la medicina, química, biología, farmacología, sociología y agricultura, permitirán comprender la fisiología y bioquímica de los organismos que se producen para lograr su mejor aprovechamiento científico y económico, en beneficio de la población.

En el caso particular de México, la medicina tradicional tiene sus raíces en la medicina prehispánica de la cual existen recopilaciones bibliográficas sobre herbolaria medicinal,³ siendo esta una importante vía alternativa en México. Dentro de este campo, el lugar que ocupa la herbolaria medicinal justifica el que se le dediquen importantes

esfuerzos de investigación⁴ y que a la vez justifique el trabajo que el químico realiza dentro de este estudio interdisciplinario.

El aspecto químico dentro de esta área, permite aislar, conocer y determinar la estructura de los constituyentes orgánicos mayoritarios de la flora medicinal y facilita además el hallazgo de nuevos agentes medicinales, permitiendo también utilizar estos constituyentes como modelos para estudios en espectroscopía, estereoquímica, síntesis y farmacología, ya que el interés por estudiar estos compuestos es cada vez mayor, dado que se han observado una serie de actividades biológicas importantes.⁵

La especie que se estudió en esta tesis es una planta perteneciente a la familia de las compuestas (*Gymnosperma glutinosum*) que se recolectó en el Altiplano Potosino, y fué clasificada en el Instituto de Zonas Desérticas de esta Universidad.

Dentro del conjunto de la flora de México destaca de manera preponderante la familia *Compositae*.⁶ Este grupo de plantas representan alrededor del 13% del total de los géneros de fanerógamas que se conocen en el país y prevalece también sobre las demás familias tanto a nivel de especies como de individuos.

Aunque numerosas compuestas son componentes de gran variedad de comunidades y climas, su amplia difusión resulta modificada por la dispersión de especies y familias a otros hábitats, así como por los cambios de su entorno ecológico, y por consecuencia abundan en biogénesis secundarias.

La familia de las compuestas es de las más abundantes y homogéneas de las plantas superiores y aunque muchos géneros de las *Compositae* mexicanas han sido investigadas con bastante detalle, su estudio global no se ha realizado todavía. Y dentro de la zona árida de San Luis Potosí se encuentran como uno de los principales componentes naturales, por lo tanto el estudio taxonómico de esta familia debe ser considerado como una contribución al conocimiento de las plantas silvestres de nuestra región.

Las compuestas son plantas de flores hermafroditas, reunidas a menudo en una inflorescencia, las flores son individuales pequeñas y sésiles en una cabeza cerrada o sobre un receptáculo común. El número de especies se estima entre 13,000-15,000 en formas herbáceas y arbustivas, constituyen más del 10% de todas las plantas florales.

Están ampliamente distribuidas, y son representadas por muchas especies en casi todos los hábitats excepto en bosques lluviosos tropicales o en situaciones estrictamente acuáticas, donde éstas **no** son relativamente comunes.

Las compuestas en general son fáciles de distinguirse por su inflorescencia en forma de cabezuela provista de involucreo calicino,⁷ simulando una flor simple; la naturaleza de la cabezuela tampoco parece haber sido un secreto en el México prehispánico, como lo revela el nombre náhuatl de "cempaxúchitl" (*Tagetes erecta*) que viene de "cempóatl" (veinte y por extensión, muchas) y "xúchitl" (flor).

El género *Gymnosperma*, de la familia *Compositae*, especie *glutinosum*, es una planta arbustiva muy ramificada de alrededor de 1 m de alto, de hojas alternas, sésiles, angostamente lanceoladas, enteras de 1.5 a 4.5 cm de largo y hasta 8 mm de ancho. Cabezuelas de 4 cm de alto, flores periféricas que carecen de pistilo y estigma, tienen los carpelos abiertos y los óvulos al descubierto, es decir no contenidos en un ovario, hermafroditas, algunas estériles y flor amarilla,⁸ ha sido localizada entre 1700 y 2300 m.s.n.m. Se le conoce con el nombre vulgar de "Mariquita", es planta monotípica en México y de esta región de San Luis Potosí.

La literatura describe numerosos efectos biológicos de compuestas.⁹

-Citotóxicos y propiedades inhibitoras de tumores:

Investigaciones químico-medicas han recibido considerable atención en estas últimas décadas. Investigaciones por Kupchan y col.¹⁰ establecieron que todo el

esqueleto de tipo sesquiterpénico contiene una lactona con un metileno exocíclico, exhibiendo actividad contra tumores celulares derivados del cáncer en piel humana. Pettit y Cragg,¹¹ demostraron que la helenalina, un pseudoguayanolido identificado del *Helenium autumnale*, exhibe actividad antileucémica.

- Antidermatitis:

Mitchell y col.¹² demostraron que 52 lactonas derivadas de especies de las compuestas como de *Ambrosia*, *Parthenium*, *Gaillardia* y *Xanthium* fueron encontradas como buenos agentes antialérgicos.

- Insecticida:

Evidencia experimental de lactonas sesquiterpénicas previenen el crecimiento de los insectos. Destruye las larvas con experimentos realizados con la *Vernonia*,¹³ concentraciones del 1% con esta planta son efectivas en prevención contra insectos y larvas. Otras que presentan propiedades insecticidas son el *Chrysanthemum cinerariaefolium*.

- Inhibidor del crecimiento microbiano:

Investigaciones de Mathur y col.¹⁴ sobre terpenoides de la *Mikania monagasensis* enseñan que los germacranolidos, mikanolidos y dihidromikanolidos, son capaces de inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. La Cnicina, una lactona de *Cnicus benedictus*, es también reportada por tener propiedades antibacteriales.

- Inhibidor del crecimiento de plantas o alelopata:

El Vernolepin, un eudesmanólido obtenido de la *Vernonia hymenolepis*, ha servido como inhibidor del crecimiento de la cáscara del trigo. Resultados similares fueron obtenidos con el Parthenin del *Parthenium hysterophorus*, hallado para inhibir la germinación del *Phaseolus vulgaris*.

- Otras especies son mencionadas, así como su utilidad:

*Piquerina trinervia*¹⁵- Febrífugo antiartrítico.

*Montanda tomentosa*¹⁶- Oxitósica.

*Elephantopus tomentosus*¹⁷- Inhibidor de tumores.

*Achyroline tomentosa*¹⁸- Tratamiento de la influenza.

*Conyza bonariensis*¹⁹- Diurético, astringente, antidiarreico, antitérmico e insecticida.

*Eupatorium brevipes*²⁰- Molusquicida, posiblemente antitumoral.

II. ANTECEDENTES.

En los vegetales, se producen sustancias químicas que son producto del metabolismo de la planta llamadas metabolitos secundarios, útiles para el crecimiento o reproducción del organismo o inútiles y hasta tóxicas. A este grupo pertenecen los flavonoides, alcaloides, cumarinas, esteroides, terpenos, quinonas, etc; encontrándose en organismos muy distantes o muy próximos, esto permite utilizar la información adquirida por los bioquímicos o químicos para explicar, en términos de consideraciones biogenéticas o químicas, la presencia de un mismo metabolito secundario en plantas pertenecientes a taxonomías diferentes (especies, géneros, tribus, etc.), o de metabolitos similares en la misma planta.

Es importante también la discusión de la estructura y la estereoquímica del metabolito secundario, debido al interés que ello tiene para el químico, pues significa una base firme para:

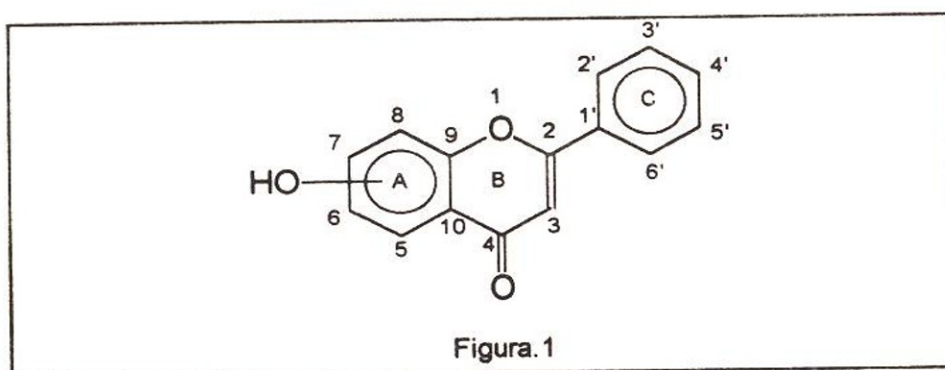
- a) elegir con mayor seguridad entre varias estructuras posibles,
- b) asignar su estereoquímica más probable,
- c) proponer un camino sencillo para sintetizar un compuesto semejante al natural.²¹

De los numerosos tipos de sustancias producidas por una planta, alcaloides, aceites esenciales, terpenos, glicósidos, flavonas, etc; los cuales al encontrarse en un determinado vegetal, pueden carecer de función definida en el metabolismo, y por su abundancia o ausencia, le proporcionan a una planta características químicas útiles para su clasificación botánica o su aprovechamiento por el hombre.

Dentro de los metabolitos secundarios encontrados en la planta que hemos trabajado (*Gymnosperma glutinosum*) se describirán de manera general las características de los más importantes.

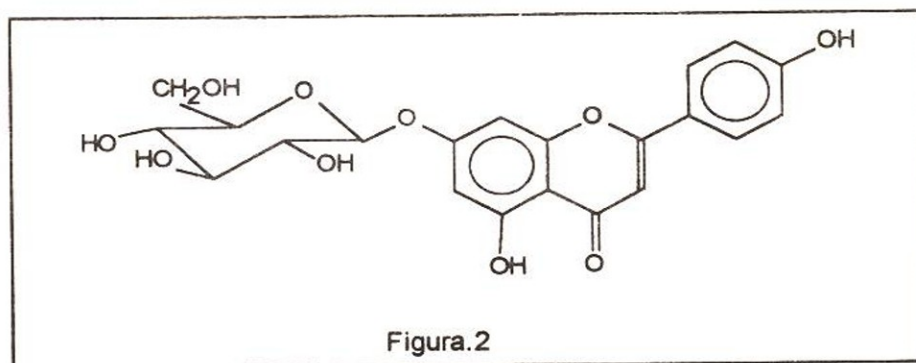
FLAVONAS:

Son pigmentos vegetales de las plantas cuyo nombre deriva de la flavona misma (del latín, flavus, amarillo) y poseen una gran variedad de formas y estructuras. Todas contienen 15 átomos de carbono en sus núcleos básicos y estos están acomodados en un arreglo $C_6-C_3-C_6$ como se muestra en la Fig.1, esto es dos anillos aromáticos unidos por un anillo de 3 carbonos. Por conveniencia los anillos son mencionados A,B y C, y los átomos de carbono individuales son numerados ordinariamente empezando con B,A y luego con C.²²

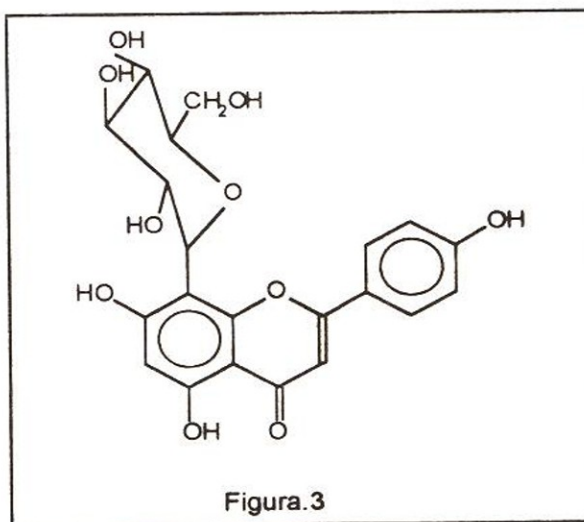


Se conocen unas 900 flavonas naturales; que se encuentran extensamente distribuidas entre las plantas, tanto libres o como glicósidos, estos últimos contribuyen a darle color a las flores, frutos y hojas.²³ Se estima que las flavonas representan alrededor del 2% de todo el carbono fotosintetizado por las plantas. Las flavonas constituyen uno de los más grandes grupos de fenoles que se presentan en la naturaleza, están virtualmente en plantas verdes y por ello se han realizado muchos trabajos de extractos en plantas. Por esta razón son importantes en química, bioquímica, fisiología, biología, etc.

Existen también debido a la glicosilación de la flavona, flavonas O-glicosídicas y flavonas C-glicosídicas. Las flavonas O-glicosídicas, contienen un azúcar o azúcares unidos por un enlace hemiacetal (Fig.2). La glucosa es el azúcar más comúnmente involucrada y otras como galactosa, rhamnosa, xilosa y arabinosa son poco comunes.



Las flavonas C-glicosídicas, contienen un azúcar o azúcares unidos directamente al núcleo del benceno por un enlace carbono-carbono (Fig.3). Se ha encontrado que la unión C- azúcar sólo se presenta en la posición 6 y 8 sobre el núcleo del flavonoide.²²



En términos generales se puede decir que las flavonas son sintetizadas por numerosos grupos de plantas y con excepción de algunas flavonas localizadas en las alas de algunas mariposas, probablemente por ingestión, se puede decir que no se les encuentra en animales. Las flavonas conteniendo poliglicósidos son muy solubles en agua y escasamente solubles en la mayoría de los disolventes orgánicos.

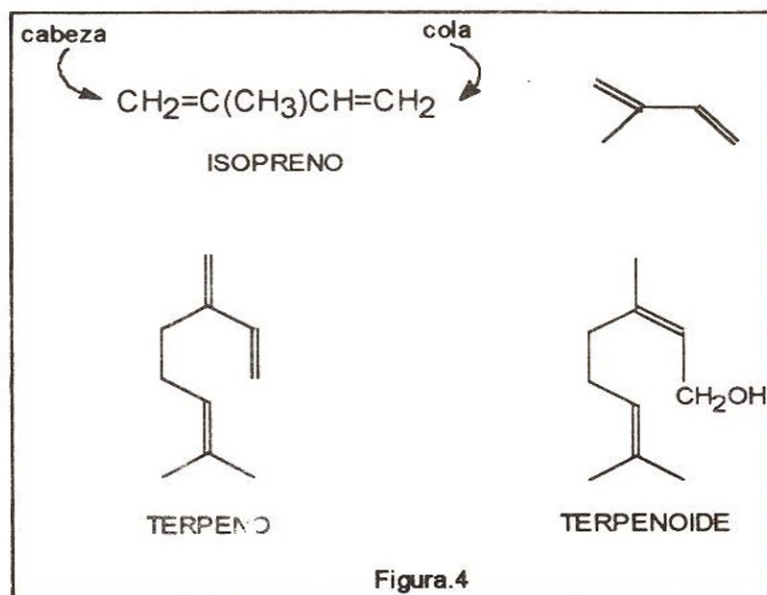
La posición ocupada por la porción glicosídica influye en la solubilidad de la molécula, las flavonas y flavonoles son poco solubles en agua por lo que se han logrado aislamientos con técnicas de cromatografía en papel, gel de sílice, o en cromatografía en columna empacadas en adsorbentes poco polares, obteniéndose magníficas separaciones y resultados.²²

TERPENOS:

Los componentes olorosos de las plantas, que pueden separarse por destilación con vapor de agua, se llaman **aceites esenciales**. Muchos aceites esenciales, tales como los de las flores, se usan en perfumes y la mayor parte de estos aceites son mezclas de TERPENOS, una clase de productos naturales que se encuentra en las plantas y los animales. El nombre deriva de "trementina" (en inglés: turpentine), que es rica en terpenos.

Todos los terpenos parecen haber sido contruidos por unión de unidades de isopreno cabeza a cola (**Fig.4**). La cabeza es el extremo más próximo a la ramificación del metilo. Los terpenos contienen dos, tres, o más unidades de isopreno.

Sus moléculas pueden ser de cadena abierta o acíclica, cerrada o cíclica. Pueden contener dobles enlaces, grupos oxhidrilo, grupos carbonilo u otros grupos funcionales. Una estructura del tipo terpeno que contenga otros elementos aparte de C e H se llama un terpenoide.²⁴



Los terpenos se clasifican de acuerdo al número de pares de unidades de isopreno que contienen:

Monoterpenos: dos unidades de isopreno, 10 carbonos.

Sesquiterpenos: tres unidades de isopreno, 15 carbonos.

Diterpenos: cuatro unidades de isopreno, 20 carbonos.

Triterpenos: seis unidades de isopreno, 30 carbonos.

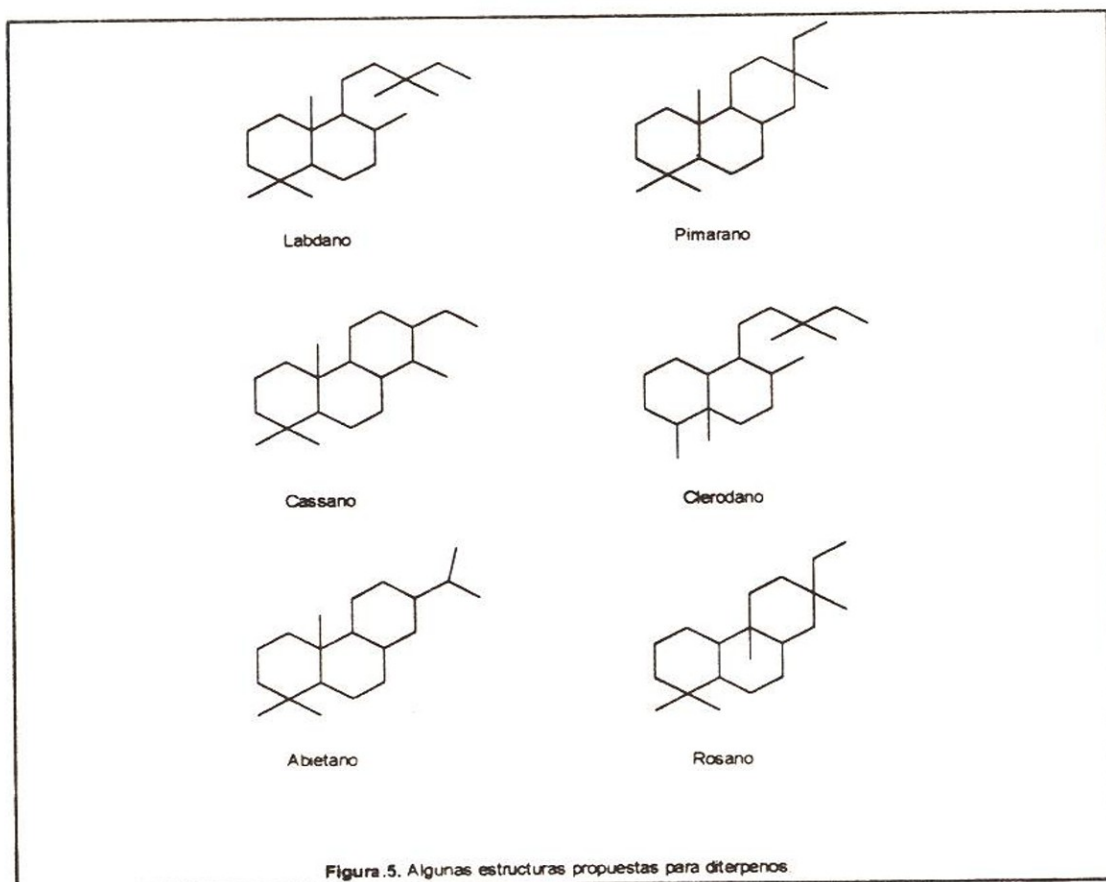
Tetraterpenos: ocho unidades de isopreno, 40 carbonos.

DITERPENOS:

Los diterpenos forman un grupo de sustancias con esqueletos de 20 carbonos, derivados del pirofosfato de geranilgeraniol. Son obtenidos principalmente de hongos y

plantas e incluyen a las giberelinas, entre éstas últimas encontramos importantes hormonas del crecimiento de las plantas.²⁵

Gran parte de la química de los diterpenos, es común en algunas series alicíclicas y se les encuentra fácil analogía con la serie de los esteroides. No obstante hay algunos factores que son particulares de los diterpenos. La más clara clasificación de los diterpenos está basada en consideraciones biogenéticas,^{26,27} se sabe que existen unos pocos diterpenos de cadena abierta como el geranilgeraniol, siendo cíclicos la mayoría de estos compuestos. El geranilgeraniol puede sufrir una serie de ciclaciones y transposiciones que conducen a los esqueletos más comunes en diterpenos (**Fig.5**).



III. DISCUSION Y RESULTADOS.

COMPUESTO 1:

De las fracciones 71 a 80 que corresponden a los extractos menos polares 90:10 hexano-acetato de etilo, se aisló el primer compuesto cristalino con un punto de fusión de 183-186°C.

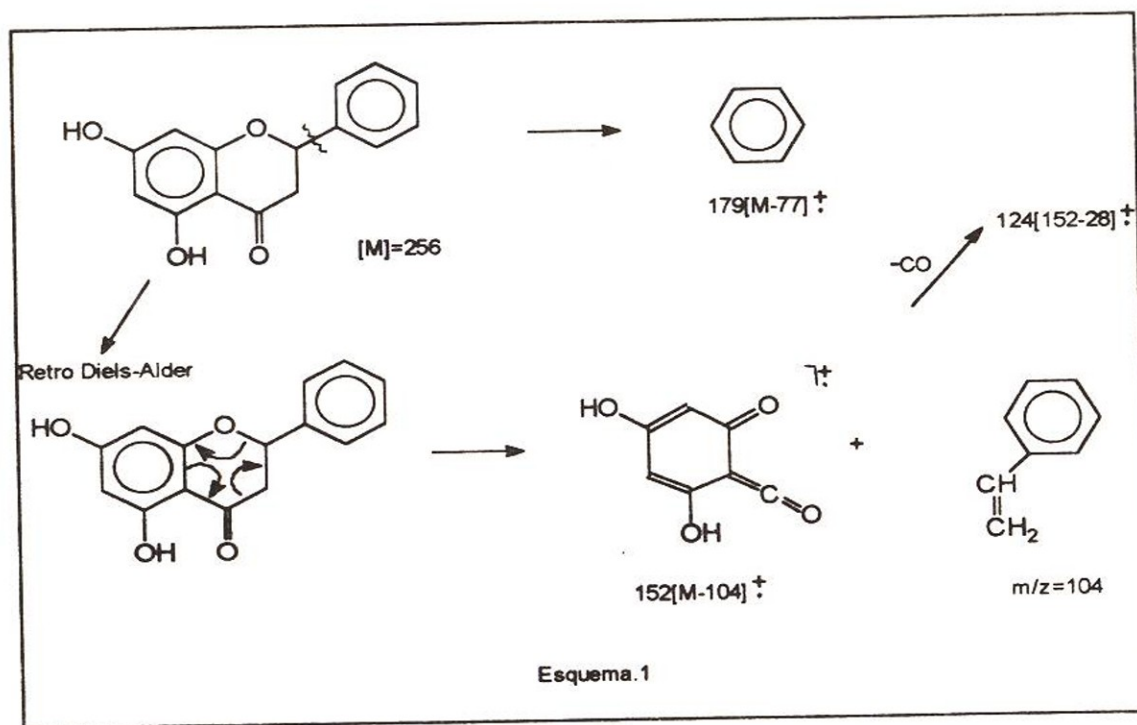
El espectro de infrarrojo (Fig.6), muestra una banda ancha centrada en 2920 cm^{-1} probablemente por la presencia de grupos OH; en 1634 cm^{-1} la presencia de grupo carbonilo y en 1170 cm^{-1} una señal que comprueba la presencia de grupos OH fenólicos.

La RMN- ^1H (Fig.7), muestra dos señales en 2.8 y 2.95 ppm y J aproximadas de 2 y 12 Hz respectivamente, es un doble de dobles que podría ser cada una para un proton; en 5.4 ppm, un doble de dobles bien definido con $J_1=12$ Hz y $J_2=2$ Hz que integra para un hidrógeno desplazado a campos bajos por estar unido posiblemente a un grupo electonegativo; en 5.92 ppm aparece una señal sencilla que integra para dos hidrógenos iguales probablemente pertenecientes a un anillo bencénico y cercanos a un grupo carbono base de oxígeno, una señal múltiple en el rango de 7.2-7.55 ppm para 5 hidrógenos y que es característico de los protones aromáticos.

La espectroscopía de masas (Fig.8), muestra el ión m/z 256 para una estructura aproximada de 15 carbonos, que según los trabajos de Markham²² y Mabry²⁸ puede ser una hidroxiflavanona; la pérdida de 77 unidades de masa $[M-77]^+$ justifica la pérdida de fenilo, el fragmento $152[M-104]^+$ muestra un rompimiento retro Diels-Alder de la molécula y $124[152-28]^+$ probablemente por la pérdida de CO.

La revisión en el Chem. Abstr. a partir de 1907 dá muy pocos informes de *Gymnosperma glutinosum*, sólo tres, de especies recolectadas en los alrededores de Monterrey²⁹ y una procedente de San Luis Potosí.³⁰

Asimismo se encontró el reporte de Masakazu y colaboradores,³¹ para $C_{15}H_{12}O_4$ donde corroboramos nuestra identificación, como una 5,7-dihidroxi-flavanona llamada Pinocembrin. De este modo justificamos el espectro de masas, **Esquema 1**:



COMPUESTO 2:

De las fracciones 150 a 161 de polaridad 85:15 hexano-acetato de etilo se aisló un segundo compuesto con un punto de fusión de 175-178°C.

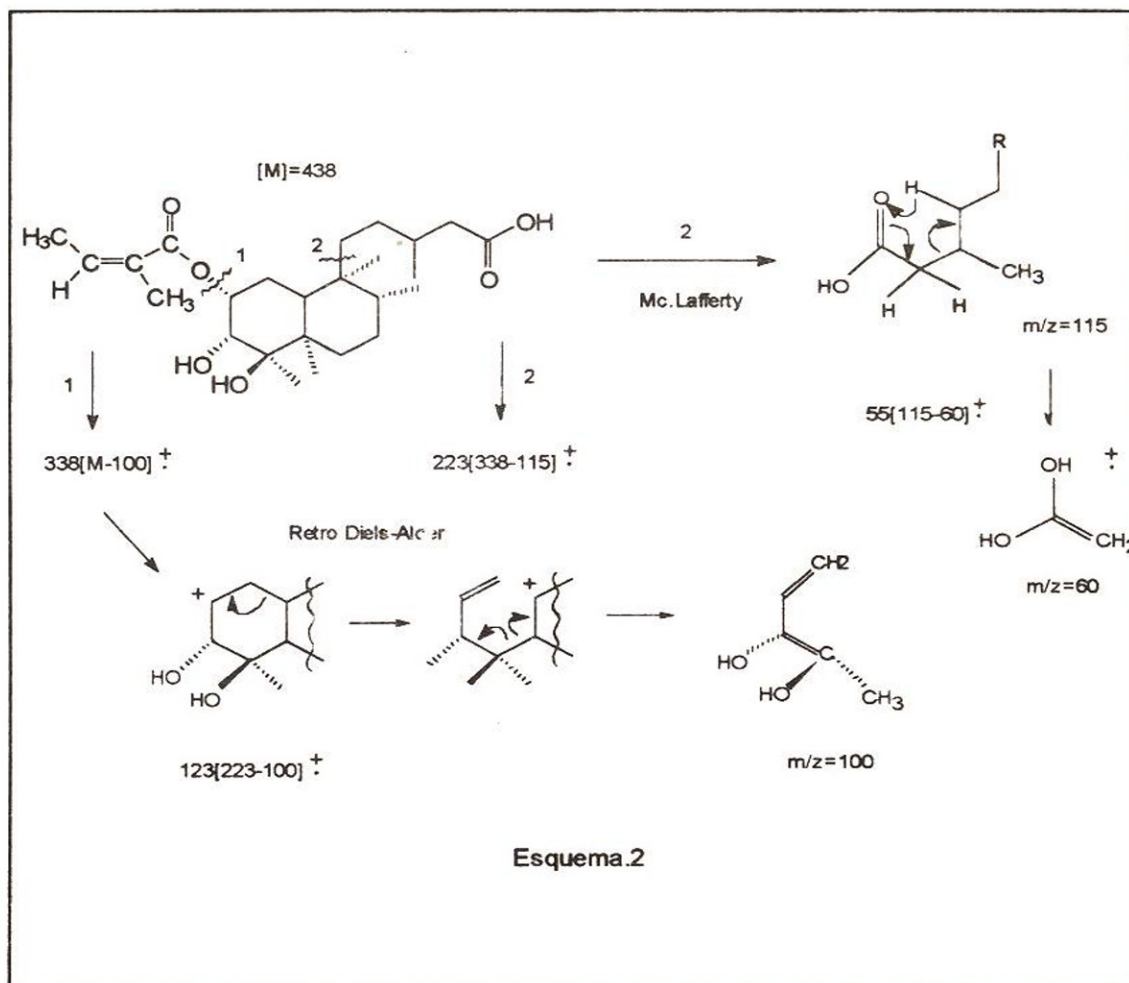
En el espectro de infrarrojo (**Fig.9**), es notable la banda ancha centrada en 3406 cm^{-1} característica de grupos OH, una banda ancha en 2957 cm^{-1} de vibración longitudinal C-H, también es notable la banda fuerte en 1711 cm^{-1} perteneciente a carbonilo posiblemente de un éster $\alpha\beta$ -insaturado y en 1152 cm^{-1} una banda de alcohol terciario. En RMN- ^1H (**Fig.10**), aparecen 5 señales de metilos en un rango característico entre 0.71 y 1.22 ppm ; dos señales dobles de metilos vinílicos en 1.78 y 1.92 ppm; un doble de dobles que integra para un hidrógeno centrado en 2.35 ppm y con $J=15\text{ Hz}$; una señal doble en 3.7 ppm y $J=3.5\text{ Hz}$ que integra para un hidrógeno unido al carbono base de un átomo electronegativo; luego aparece una señal ancha centrada en 4.5 la cual al añadir agua deuterada desaparece lo que es característico de la presencia de grupos OH, esto nos ayudó además a resolver los metilos vinílicos como se puede observar en la parte superior de la **figura 10**; en 5.25 aparece una señal ancha que integra para un hidrógeno característica de protones vinílicos; una señal doble de triples para un protón desplazado a campos bajos en 6.02 ppm por lo que parece estar cerca de un grupo electronegativo como puede ser el de un éster; por lo anterior nos podemos inclinar por la presencia de un éster angélico en la molécula, fragmento que ya ha sido ampliamente reportado en la literatura.³² Por las dos espectroscopías anteriores se propusieron como estructuras de trabajo un Labdano o un Clerodano.^{33,34}

Estudiando el espectro de RMN- ^{13}C desacoplado (**Fig.11**), encontramos 25 señales que al realizar el experimento APT mostró lo siguiente: dos señales hacia abajo en 175.5 ppm atribuida a un carbonilo de ácido y otra en 167 ppm característica del carbonilo del éster angélico. Desplazándonos hacia la parte media del espectro observamos dos señales aisladas una señal hacia arriba en 137 ppm de un metino vinílico, enseguida una señal hacia abajo en 128.5 de carbón vinílico, en 76.88 aparece una señal hacia abajo de carbón cuaternario y por ser el que aparece a campo más bajo lo asignamos a C-4 de la estructura de trabajo, probablemente está unido a un grupo OH, también muestra la

presencia de un metino desplazado a 76.5 ppm probablemente por conectividad a un grupo OH; en 73.6 un metino unido al éster; en 41.6 ppm aparece una señal hacia abajo de metileno desplazada del grupo de las otras señales por estar cerca de un grupo electronegativo.

En resumen encontramos dos carbonos bases de oxígeno y dos carbonilos uno de ácido y otro de éster, dos carbonos cuaternarios en 40.5 y 38.5; tres señales de metino en 38.9, 36.0 y 30.8; 5 señales de metilenos en 35.7, 32.0, 29.5, 26.7 y 22.3; 7 señales de metilos en 21.6, 20.8, 20.0, 18.7, 17.3, 16.0 y 15.9 donde cinco pertenecen a metilos y dos al grupo angelato.

Con esta información se realizó la búsqueda en la literatura para hacer el estudio total del espectro, se encontraron reportes para 20 carbonos en estructuras de Labdanos y Clerodanos.^{33,34,35,36} Puesto que el espectro de masas (**Fig.12**), sólo mostró el fragmento $[M]^{\ddagger} = 338$, se acudió a un experimento por ionización química ó CIMS donde aparece el ión m/z , 439 debido a $[M+1]$, lo cual nos da ya 25 átomos de carbono, prosiguiendo en la búsqueda bibliografica encontramos que Faini³⁴ y Rossomando,³⁷ nos pueden servir de guía para nuestra asignación. En el experimento CIMS aparecen también: $421[M-17]^{\ddagger}$ por la pérdida de OH; $338[M-100]^{\ddagger}$ que se justifica por la pérdida de 100 unidades de masa debido a la pérdida del éster angélico; $55[115-60]^{\ddagger}$ debido a una transposición de Mc.Lafferty en la ramificación del clerodano donde se encuentra el grupo ácido. De esta forma, el espectro de masas lo justificamos así, **Esquema 2:**



De este modo en base al análisis de los distintos espectros podemos afirmar la existencia de un grupo de éster angélico, una ramificación con un grupo ácido, y dos anillos fusionados de tipo decalina formando el clerodano, dos grupos oxhidrilo uno secundario y uno terciario unido a un metilo. Por la distribución en el espectro de RMN- ^{13}C llegamos a la estructura que se muestra para una fórmula $\text{C}_{25}\text{H}_{42}\text{O}_5$ (**Fig.11**).

COMPUESTO 3:

De las fracciones 194 a 202 de polaridad 65:35 hexano-acetato de etilo se aisló un tercer compuesto con punto de fusión de 197-199°C.

El espectro de infrarrojo (**Fig.13**), muestra una banda ancha en 3440 cm^{-1} característica de grupos OH; una señal fuerte en 2956 cm^{-1} de vibración longitudinal C-H; en 1714 cm^{-1} aparece la banda perteneciente a carbonilo posiblemente de ácido; una banda en 1400 cm^{-1} que confirma la presencia de carbonilo de ácido; en 1160 cm^{-1} aparece una señal para alcohol terciario y en 1043 cm^{-1} una señal para alcohol primario; en RMN- ^1H (**Fig.14**) aparecen cinco señales de metilos en un rango característico entre 0.7 y 1.2 ppm; un triplete ancho en 1.45 ppm que integra para dos hidrógenos; un multiplete ancho entre 1.7 y 1.82 ppm; en 2.05 observamos una señal doble de dobles, como también en 2.25 ppm y en la integración encontramos que cada una corresponde a un protón; una señal doble en 3.48 ppm $J=3.5\text{ Hz}$ a campos bajos por estar unido a un carbono base de oxígeno y en 3.87 a 3.98 ppm una señal múltiple que integra para un hidrógeno desplazado a campos bajos, probablemente también por estar unido a un carbono base de oxígeno como podría ser el de un OH.

En el espectro de RMN- ^{13}C desacoplado, encontramos 19 señales que al realizar el experimento APT parte superior de la **Fig.15**, mostró lo siguiente: una señal hacia abajo en 174.42 ppm atribuida a un carbonilo de ácido; en la parte media superior del espectro observamos tres señales: dos hacia arriba en 77.43 y 68.11 ppm asignadas a metilenos y una hacia abajo en 75.84 ppm propia de un carbón cuaternario, estas tres señales están desplazadas a campos bajos probablemente por estar unidos a grupos OH; siguiendo con el espectro encontramos tres señales hacia arriba de metinos en 37.6, 35.14 y 30.13 ppm; cinco señales para metilenos en 40.98, 31.29, 28.58, 25.88 y 24.93 ppm; dos señales hacia

abajo para carbonos cuaternarios en 39.75 y 37.55 ; y un grupo de cinco señales características para metilos en 20.81, 19.25, 17.81, 16.39 y 15.23 ppm.

El espectro de masas (**Fig.16**), da un ión m/z 338 como el de mayor masa por lo que suponemos que la estructura puede ser análoga a la del compuesto **2**, sólo que este espectro muestra la presencia de tres grupos OH lo cual se justifica para $[M]^+ = 356$ calculado en base a $338[M-18]^+$, así como $320[M-36]^+$ y $302[M-54]^+$ que representan la pérdida consecutiva de los tres grupos OH, también es importante la señal $241[M-115]^+$, que justifican el esqueleto propuesto.

En base a los datos obtenidos, y muy semejantes tanto en las señales como en los desplazamientos con respecto al compuesto (**2**), y según el trabajo publicado por Faini³⁴, el cual enseña una gran similitud en los espectros de RMN-¹H y ¹³C, concluimos que el compuesto **3** representa un clerocano diterpénico con tres bases de oxígeno y un carbonilo de ácido con una formulación $C_{20}H_{36}O_5$, al cual llamaron Acido dihidrotucumanoico.

COMPUESTO **4**: Acetilación del ácido dihidrotucumanoico.

A una solución conteniendo 50 mg de **3** en 1.5 ml de anhídrido acético se le agregó 1 ml de piridina a temperatura ambiente. Después de 7 h en agitación la mezcla de reacción fue extraída según el método usual. Se obtuvieron 17 mg de **4**, que se recristalizó de una mezcla de acetona-hexano. Punto de fusión de 211-212°C.

El espectro de IR muestra la banda ancha e intensa de 3600 a 3250 cm^{-1} de los grupos OH y la banda del carbonilo de éster en 1650.

El espectro de RMN-¹H (**Fig.17**), muestra una señal ancha en 2.1 ppm donde se encuentra acoplada una señal sencilla característica de los metilos, solo que desplazado

a campo bajo muy probablemente por estar unido al carbonilo del éster; en 2.85 y 3.2 ppm aparecen dos señales anchas que integran para un hidrógeno las cuales al agregar D_2O desaparecen, lo que es característico de la presencia de grupos OH como se puede observar en la parte superior de la Fig.17. En RMN- ^{13}C (Fig.18), mencionaremos las señales que aparecen en 174.85 ppm del carbonilo del ácido y en 169.6 ppm la del carbonilo del éster lo que comprueba la acetilación del compuesto; aparecen también tres señales en 76.4, 75.84 y 73.36 ppm la primera para un carbono cuaternario y las otras dos para metino, estas señales están desplazadas a campo bajo por estar unidas a grupos electronegativos como el OH, lo que al observar la estructura del clerodano nos muestra una alternativa para acomodar los grupos OH solamente en el C-2, C-3 y C-4, que se confirmó por el experimento APT (Fig.18) donde aparecen dos señales hacia abajo en 75.84 y 73.36 ppm para metino y una señal hacia abajo en 76.4 ppm para el carbono cuaternario, esto nos muestra que el carbono cuaternario está a campo más bajo, seguido del metino en 75.84 por estar unidos a los grupos más electronegativos que son los OH, luego aparece el metino unido al grupo éster en 73.36 que por ser menos electronegativo desplaza la señal a campo más alto, justificando así que el éster está unido al C-2, el OH secundario al C-3 y el OH terciario al C-4.

Corroboramos que la posición del éster y por lo tanto la del OH se localiza en el C-2.

Para afinar estos resultados se realizó también la prueba polarimétrica del compuesto **3**, esto nos da un desplazamiento angular dextrógiro $[\alpha]_{589} = +11.3^\circ$; que comparado con el ácido tucumanoico descrito³⁴ $[\alpha]_{589} = -16.0^\circ$ no es el mismo estereoisómero. Esto nos lleva a buscar la prueba por Rayos-X.

Los cristales de **3** ($C_{20}H_{36}O_5$), presentan una celda ortorrómbica, siendo sus dimensiones $a = 7.139(4)$, $b = 10.020(8)$ y $c = 27.497(20)$ Å; $\alpha = 90^\circ$; índices de Miller $P_{21,21,21}$; $Z = 4$; $D_C = 1.203 \text{ g cm}^{-3}$ y $\mu = 6.45 \text{ cm}^{-1}$. Los datos de intensidad fueron

colectados de un cristal único sobre un difractómetro con posición para $2\theta:\theta$ a 293°K ($2\theta_{\text{max}}=105^\circ$); utilizando la radiación k_α del Cobre filtrado por Ni de $\lambda = 1.54178 \text{ \AA}$. La corrección fué hecha para los factores de Lorentz y de polarización, pero no para absorción. De 1208 reflexiones únicas colectadas, 1058 fueron mayores de 3σ (F).

La estructura fué resuelta por métodos directos usando el paquete SHELXTL y fué refinada por mínimos cuadrados (blockedcascade). Todos los átomos que no son hidrógenos fueron refinados anisotrópicamente.

Los factores finales de discrepancia fueron $R= 0.059$ y $R_w= 0.0613$; en el mapa final de diferencias de densidades electrónicas no hubo picos mayores de 0.21 e\AA^3 . Con lo cual obtenemos la estructura que a continuación se muestra (Fig.19). Con esto encontramos una asignación de configuración relativa \underline{S} para el carbono 13. Estos últimos datos $\alpha = +11.3$ y la configuración α del C-13 afinan nuestra asignación, de manera que el compuesto aislado resulta ser un diastereómero del reportado por Faini.³⁴

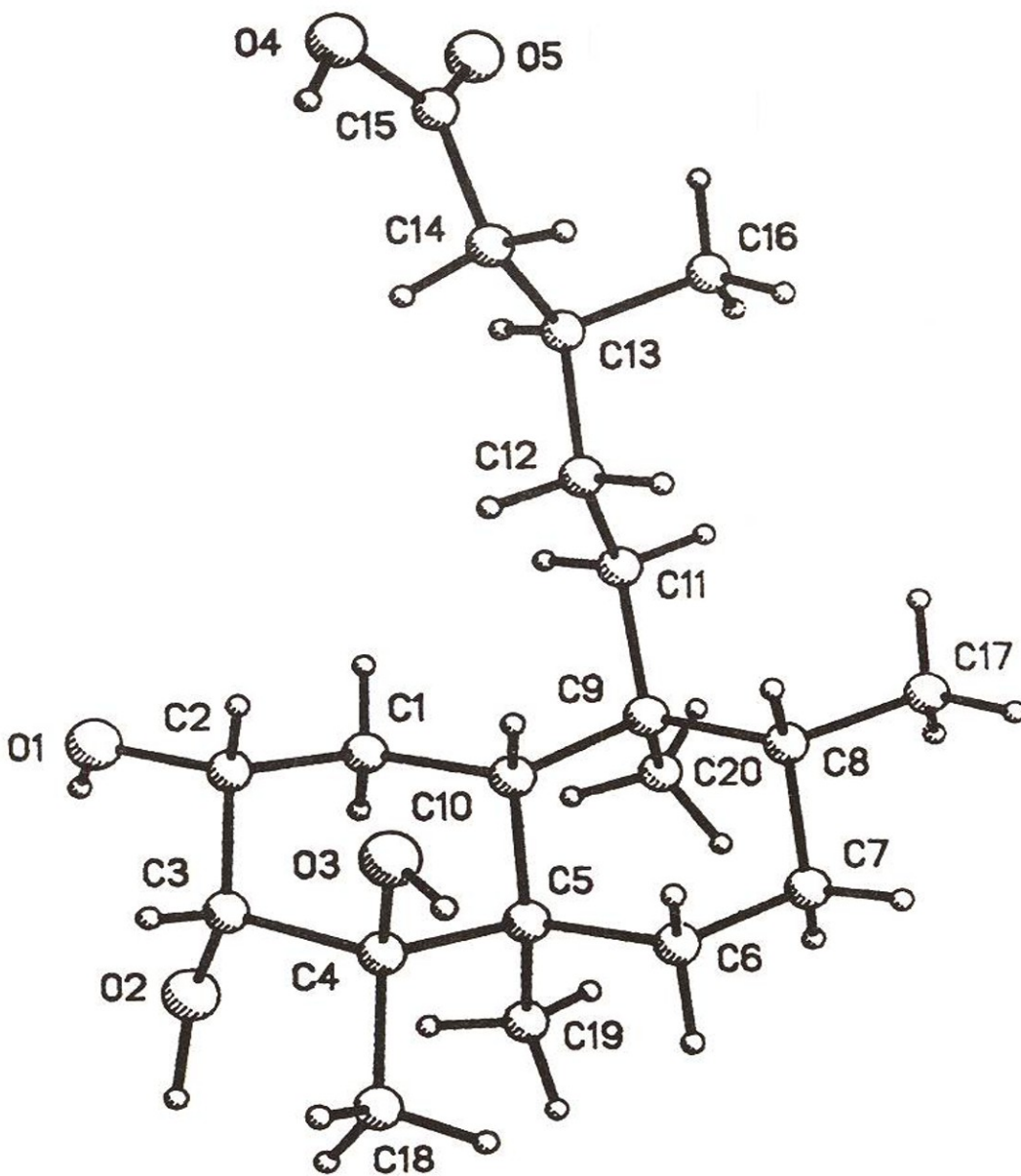


Figura 19. Perspectiva de la estructura molecular del Acido dihidrotucumanoico (3), obtenida por difracción de Rayos-X.

IV. PARTE EXPERIMENTAL.

La recolección se realizó el 25 de Agosto de 1990 a 4 Km al oeste del municipio de Guadalcázar, S.L.P; sobre la carretera estatal México 57. La planta fue depositada en el herbario del Instituto de Zonas Desérticas de la U.A.S.L.P, donde fue clasificada como *Gymnosperma glutinosum*, tomando 315 g de las partes aéreas de la planta previamente secados y molidos se trataron en una columna cromatográfica (10 cm diametro x 55 cm de altura) empacada con 800 g de gel de sílice.

La mezcla de compuestos se eluyó sistemáticamente con mezclas de hexano-acetato de etilo, empezando con un 100% de hexano, la polaridad se fue aumentando gradualmente hasta llegar a un 40% hexano-60% acetato de etilo. Las fracciones obtenidas se compararon por cromatografía en capa fina.

Los puntos de fusión se realizaron en un aparato SYBRON-Thermoline, y no estan corregidos. Los espectros de IR se llevaron a cabo en pastilla de KBr utilizando un espectrometro Nicolet 205-FT. Los espectros de RMN-¹H se determinaron en un espectrómetro Varian EM-200 a 200 MHz en CDCl₃ + DMSO-d₆ usando TMS como referencia interna. Los espectros de RMN-¹³C fueron registrados a 75.4 MHz. Los espectros de masas se obtuvieron a 70 eV por inyección directa, en el experimento por ionización química se usó metano como gas ionizante.

5,7-dihidroxi flavanona (Pinocembrin).³¹

De las fracciones 71 a 80 que corresponden a una polaridad 90:10 hexano-acetato de etilo, los volúmenes tomados fueron de 400 ml aproximadamente, que fueron concentradas en un rotavapor, obteniéndose un producto amorfo amarillo el cual fue

recristalizado en una mezcla de acetato de etilo-hexano, dando 2 g de un compuesto cristalino con punto de fusión de 183-186°C, se analizó y se obtuvieron los siguientes datos espectroscópicos:

IR: 1170, 1634, 2920 cm^{-1} ; E. de Masas (% intensidad relativa): m/z 256 $[\text{M}]^+$ (47%), 255 $[\text{M}-1]^+$ (36%), 179 $[\text{M}-77]^+$ (70%), 152 $[\text{M}-104]^+$ (70%), 124 $[\text{M}-28]^+$ (100%), 69 (90%); RMN- ^1H (200 MHz) CDCl_3 , δ : 7.2-7.55(5H,m); 5.92(2H,s); 5.4(1H,dd, $J_{\text{trans}}=12\text{Hz}$, $J_{\text{cis}}=2\text{Hz}$); 2.95(1H,dd, $J_{\text{trans}}=12\text{Hz}$); 2.8(1H,dd, $J_{\text{cis}}=2\text{Hz}$).

Acido 2-angeloildihidrotucumanoico.

De las fracciones 150 a 161 que corresponden a una polaridad 85:15 hexano-acetato de etilo, se juntaron y concentraron, obteniéndose un precipitado que fué recristalizado en una mezcla de cloroformo-hexano, obteniéndose 178.6 mg del compuesto con un punto de fusión de 175-178°C.

IR: 3406, 2957, 1711, 1152 cm^{-1} ; E. de Masas (% int.rel.) : m/z 338 $[\text{M}-\text{OAng}]^+$ (1.7%); 123 $[\text{M}-223-100]^+$ (23%); 83 $[\text{M}-355]^+$ (54%); 55 $[\text{M}-115-60]^+$ (100%). CIMS m/z 439 $[\text{M}+1]^+$ (0.5%); 421 $[\text{M}-17]^+$ (2.7%); 338 $[\text{M}-100]^+$ (25.2%); RMN- ^1H (200 MHz) CDCl_3 , δ : 0.71(3H,s)H-20; 0.76(3H,d)H-17; 0.97(3H,d, $J=8\text{Hz}$)H-16; 1.05(3H,s)H-19; 1.22(3H,s)H-18; 1.78(3H,d, CH_3 -OAng); 1.92(3H,d, CH_3 -OAng); 2.1(1H,dd, $J=15\text{Hz}$)H-14; 2.35(1H,dd, $J=15\text{Hz}$)H-14'; 3.7(1H,d, $J=3.5\text{Hz}$)H-3; 4.5(Señal ancha que desaparece con D_2O); 5.25(1H,señal ancha,H-OAng); 6.02(1H,ddd, $J=1.7\text{Hz}$)H-2; RMN- ^{13}C (75.4 MHz, APT) δ : 175.5(CO-15); 167(CO-Ang); 137(CH -Ang); 128.5(C-Ang); 76.88(C-4); 76.5(CH -3); 73.6(CH -2); 41.6(CH_2 -14); 40.5(C-5); 38.9(CH -10); 38.5(C-9); 36.0(CH -8); 35.7(CH_2 -11); 32.0(CH_2 -12); 30.8(CH -13); 29.5(CH_2 -6); 26.7(CH_2 -1); 22.3(CH_2 -7);

21.6($\underline{\text{CH}}_3\text{-OAng}$); 20.8($\underline{\text{CH}}_3\text{-18}$); 20.0($\underline{\text{CH}}_3\text{-19}$); 18.7($\underline{\text{CH}}_3\text{-16}$); 17.3($\underline{\text{CH}}_3\text{-20}$); 16.0($\underline{\text{CH}}_3\text{-17}$); 15.9($\underline{\text{CH}}_3\text{-OAng}$).

Acido dihidrotucumanoico.

De las fracciones 194 a 202 que corresponden a una polaridad de 65:35 hexano-acetato de etilo, se juntaron, concentraron y se obtuvo un precipitado blanco el cual fué tratado con carbón activado y se recristalizó con metanol, obteniéndose 1.7821 g del compuesto con punto de fusión de 197-199°C.

IR: 3440, 2956, 1714, 1400, 1160, 1043 cm^{-1} ; E. de Masas (% int. rel.): m/z 338[M-18]⁺ (10%); 320[M-36]⁺ (10%); 303[M-53]⁺; 241[M-115]⁺; 167[M-189]⁺ (20%); 137(50%); 123(92.7%); 43(100%); RMN-¹H (200 MHz) CDCl_3 , δ : 0.7(3H,s)H-20; 0.73(3H,d,J=5Hz)H-17; 0.95(3H,d,J=8Hz)H-16; 1.02(3H,s)H-19; 1.2(3H,s)H-18; 1.45(2H,t.ancho) H-1; 1.7-1.82 (2H,m) Probablemente para H-9, H-13; 2.05(1H,dd,J=15Hz)H-14; 2.25(1H,dd,J=15Hz)H-14'; 3.48(1H,d,J=3.5Hz)H-3; 3.87-3.98 (1H,m)H-2; RMN-¹³C (75.4 MHz, APT) δ : 174.42(CO-15); 77.43($\underline{\text{CH}}\text{-3}$); 75.84(C-4); 68.11($\underline{\text{CH}}\text{-2}$); 40.98($\underline{\text{CH}}_2\text{-14}$); 39.75(C-5); 37.6($\underline{\text{CH}}\text{-10}$); 37.55(C-9); 35.14($\underline{\text{CH}}\text{-18}$, $\underline{\text{CH}}_2\text{-11}$); 31.29($\underline{\text{CH}}_2\text{-12}$); 30.13($\underline{\text{CH}}\text{-13}$); 28.58($\underline{\text{CH}}_2\text{-6}$); 25.88($\underline{\text{CH}}_2\text{-1}$); 24.93($\underline{\text{CH}}_2\text{-7}$); 20.81($\underline{\text{CH}}_3\text{-18}$); 19.25($\underline{\text{CH}}_3\text{-19}$); 17.81($\underline{\text{CH}}_3\text{-16}$); 16.39($\underline{\text{CH}}_3\text{-20}$); 15.23($\underline{\text{CH}}_3\text{-17}$).

Acido 2-aceto dihidrotucumanoico:

Se pesaron 50 mg de ácido dihidrotucumanoico, se agregaron 1.5 ml de anhídrido acético y 1 ml de piridina. Se dejó reaccionando durante 7 h en condiciones anhidras y a temperatura ambiente, la reacción fué seguida por cromatografía en capa fina. El producto

de reacción se extrajo con acetato de etilo y se lavó sucesivamente con HCl al 10%, NaHCO_3 en solución y agua hasta un pH neutro. Se secó con sulfato de sodio y se concentró a vacío, obteniéndose 17 mg de producto con un punto de fusión de 211-212°C.

RMN- ^1H (200 MHz) CDCl_3 , δ : 0.71(3H,s)H-20; 0.75(3H,d,J=5Hz)H-17; 0.96(3H,d,J=8Hz)H-16; 1.08(3H,s)H-19; 1.23(3H,s)H-18; 2.1(4H, señal ancha) CH_3 -OAc + H-14; 2.35(1H,dd,J=15.6Hz)H-14'; 2.85(señal ancha 1H, que desaparece con D_2O), 3.2(señal ancha 1H, que desaparece con D_2O); 3.68(1H,d,J=3.5Hz)H-3; 5.14(1H,dt)H-2; RMN- ^{13}C (75.4 MHz, APT) δ : 174.85(CO-15); 169.6(CO-OAc); 76.4(C-4); 75.84(CH -3); 73.36(CH -2); 41.12(CH_2 -14); 40.4(C-5); 38.31(CH -10); 38.05(C-9); 35.51(CH -8); 35.22(CH_2 -11); 31.52(CH_2 -12); 30.36(CH -13); 29.03(CH_2 -6); 26.21(CH_2 -1); 21.75(CH_2 -7); 21.11(CH_3 -18); 21.06(CH_3 -OAc); 19.50(CH_3 -19), 18.13(CH_3 -16); 16.71(CH_3 -20); 15.57(CH_3 -17).

V. CONCLUSIONES.

Los productos aislados más importantes fueron una flavona y dos diterpenos con base de clerodano.

La flavona presentó una fórmula molecular $C_{15}H_{12}O_4$ de nombre 5,7-dihydroxiflavanona (1), reportada como **Pinocebrin**.³¹

El primer compuesto diterpénico de nombre Acido 2-angeloildihidrotucumanoico (2), mostró un éster angélico en el C-2 y una fórmula molecular de $C_{25}H_{42}O_6$, mencionando como característica importante que este compuesto parece ser el antecedente biogénico del compuesto (3).

Para la caracterización completa del Acido dihidrotucumanoico (3), se realizó la acetilación del compuesto (3) para corroborar la posición del éster y por lo tanto la del grupo OH del C-2, además se incluyó una prueba polarimétrica, dando un desplazamiento angular dextrógiro, de donde deducimos que no tenemos el mismo estereoisómero ya reportado del Acido dihidrotucumanoico,³⁴ el cual presentó un desplazamiento angular levógiro. Esta asignación se refuerza por la prueba de Rayos-X, donde además podemos asignar la configuración S al C-13 de la cadena, dato no reportado en la citada referencia 34, y constituye nuestra aportación a la identificación del compuesto, curiosamente para las consideraciones biogénicas estamos en el caso de un metabolito secundario presente en plantas de taxonomía diferente, el reportado en una especie *Baccharis* y el nuestro en *Gymnosperma*.

Los estudios por RMN-¹H; RMN-¹³C; E.M y Rayos-X, permitieron asignar total e inequívocamente la estereoquímica de estos compuestos.

ANEXO A: Espectros de Infrarrojo.

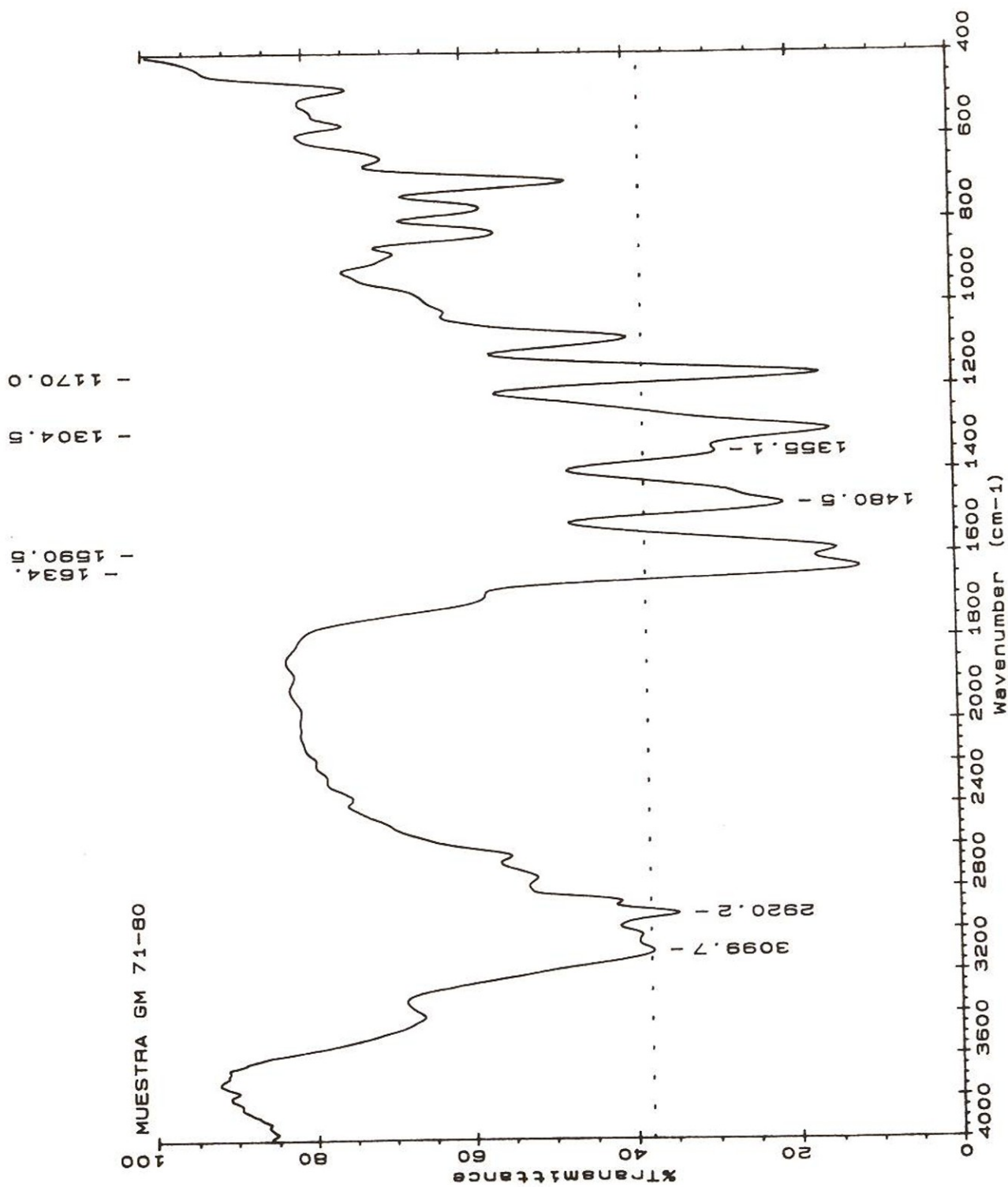


Figura 6. Espectro de IR de 5,7-dihidroxi flavanona (1).

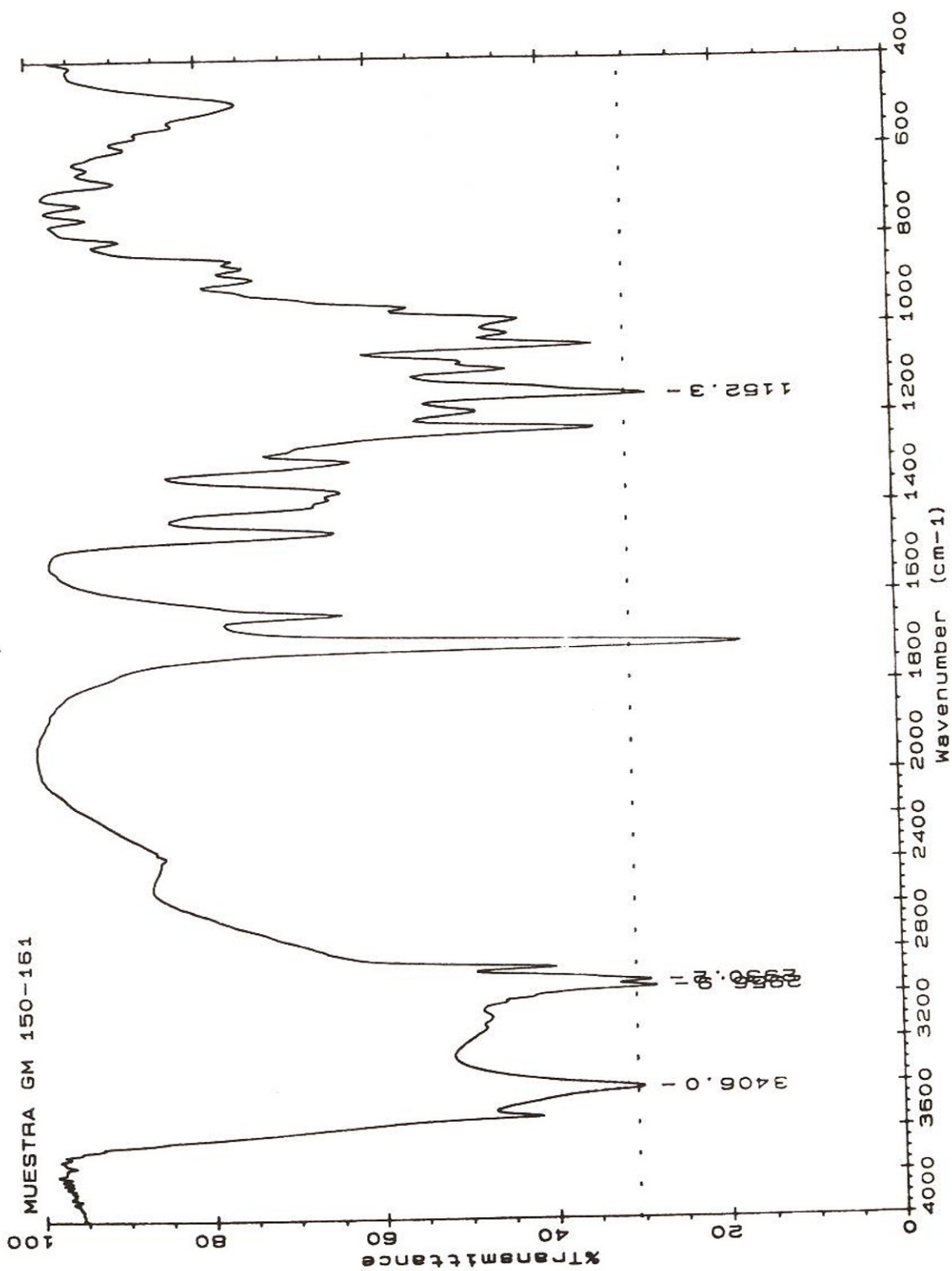


Figura 9. Espectro de IR del Acido 2-angeloloidihidrotucumanoico (2).

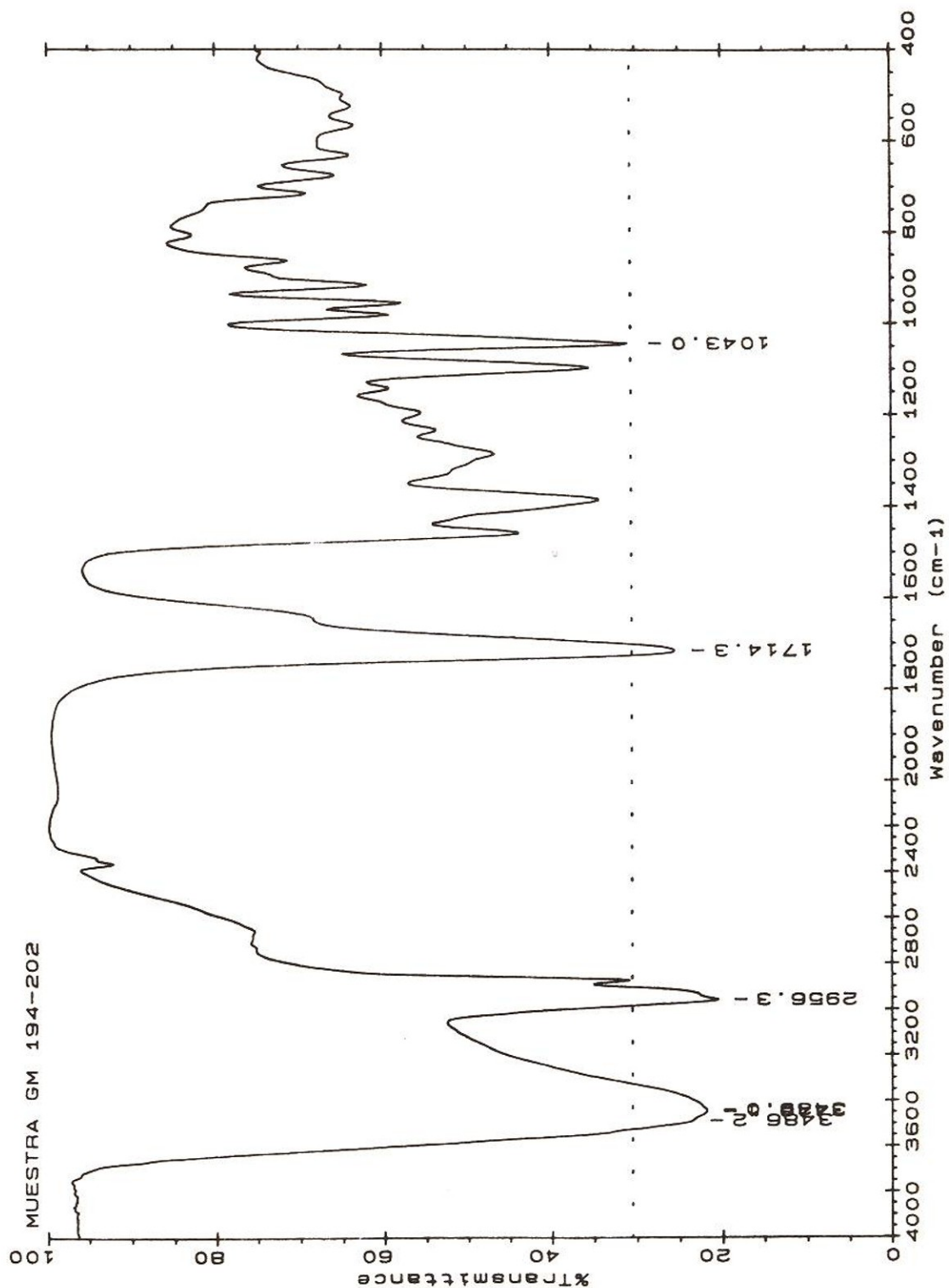


Figura 13. Espectro de IR del Acido dihidrotucumanoico (3).

ANEXO B: Espectros de RMN-¹H y RMN-¹³C.

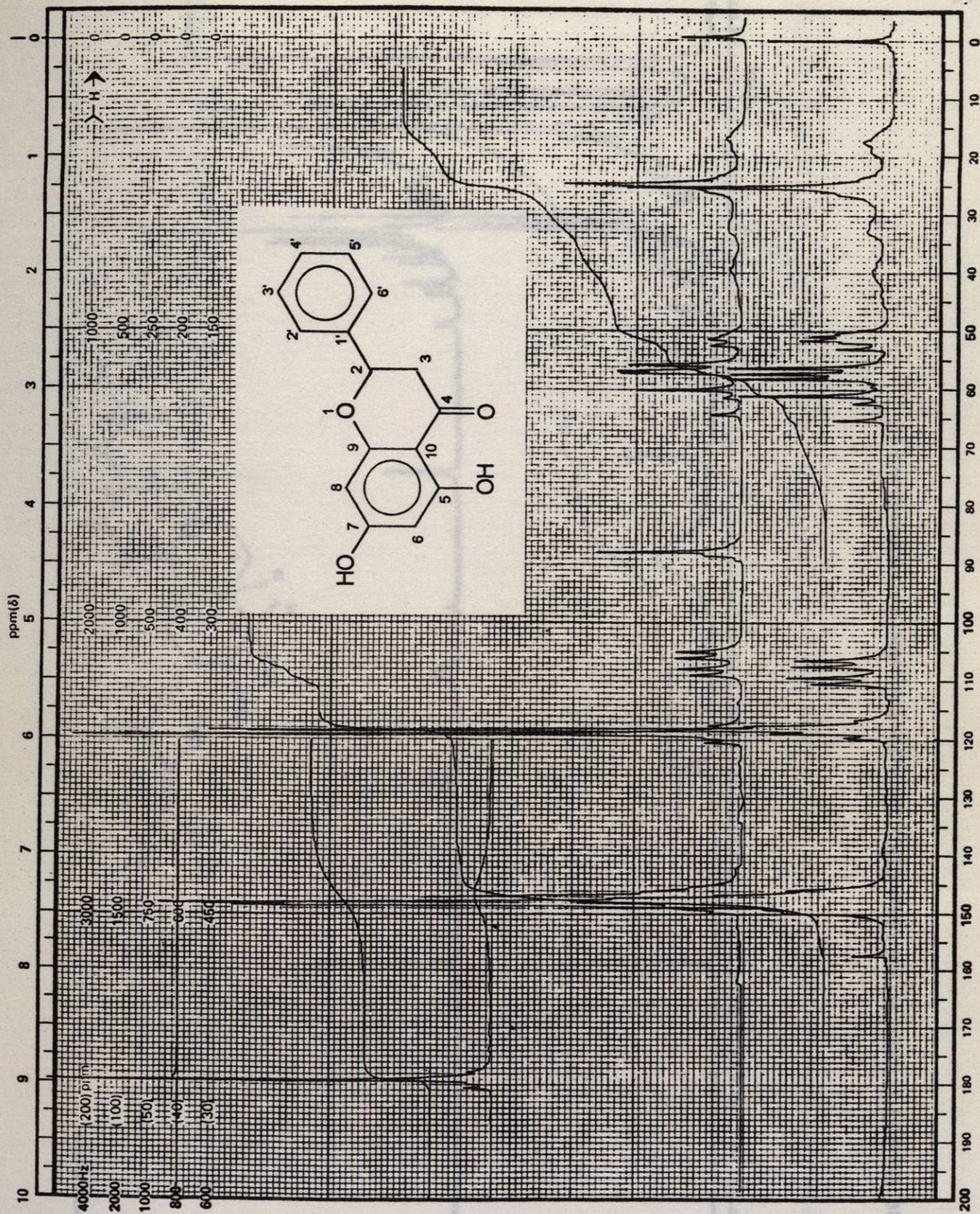


Figura 7. Espectro de RMN- ^1H , (200 MHz) CDCl_3 , de 5,7-dihidroxi flavanona (1).

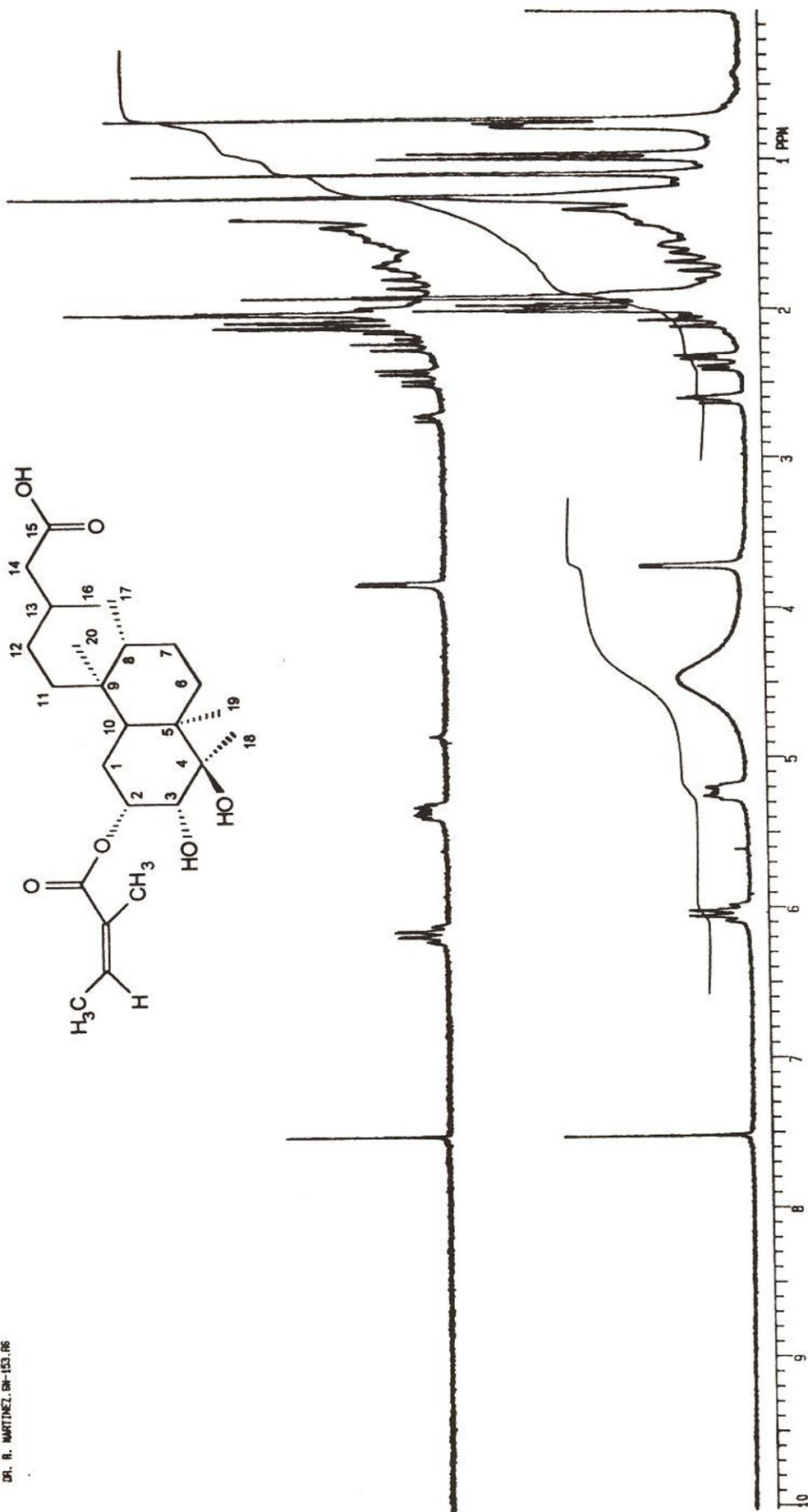


Figura 10. Espectro de RMN-¹H, (200 MHz) CDCl₃, del Acido 2-angeloyldihidrocutumanoico (2).

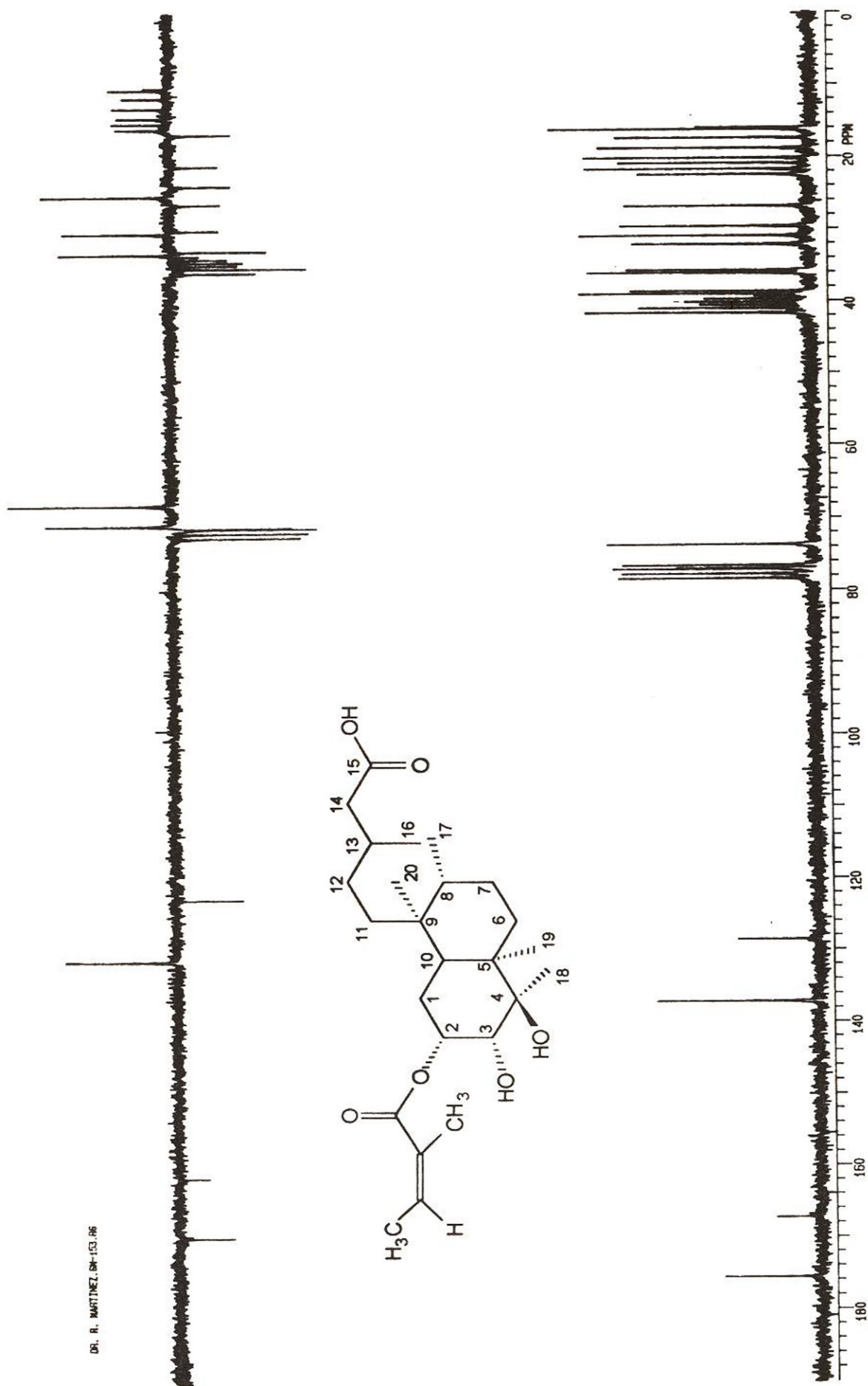


Figura 11. Espectro de RMN- ^{13}C , (75.4 MHz) y experimento APT del Acido 2-angeloidihidrotucumanoico (2).

8000 PPTZ 16 // CDCl₃-DMSO

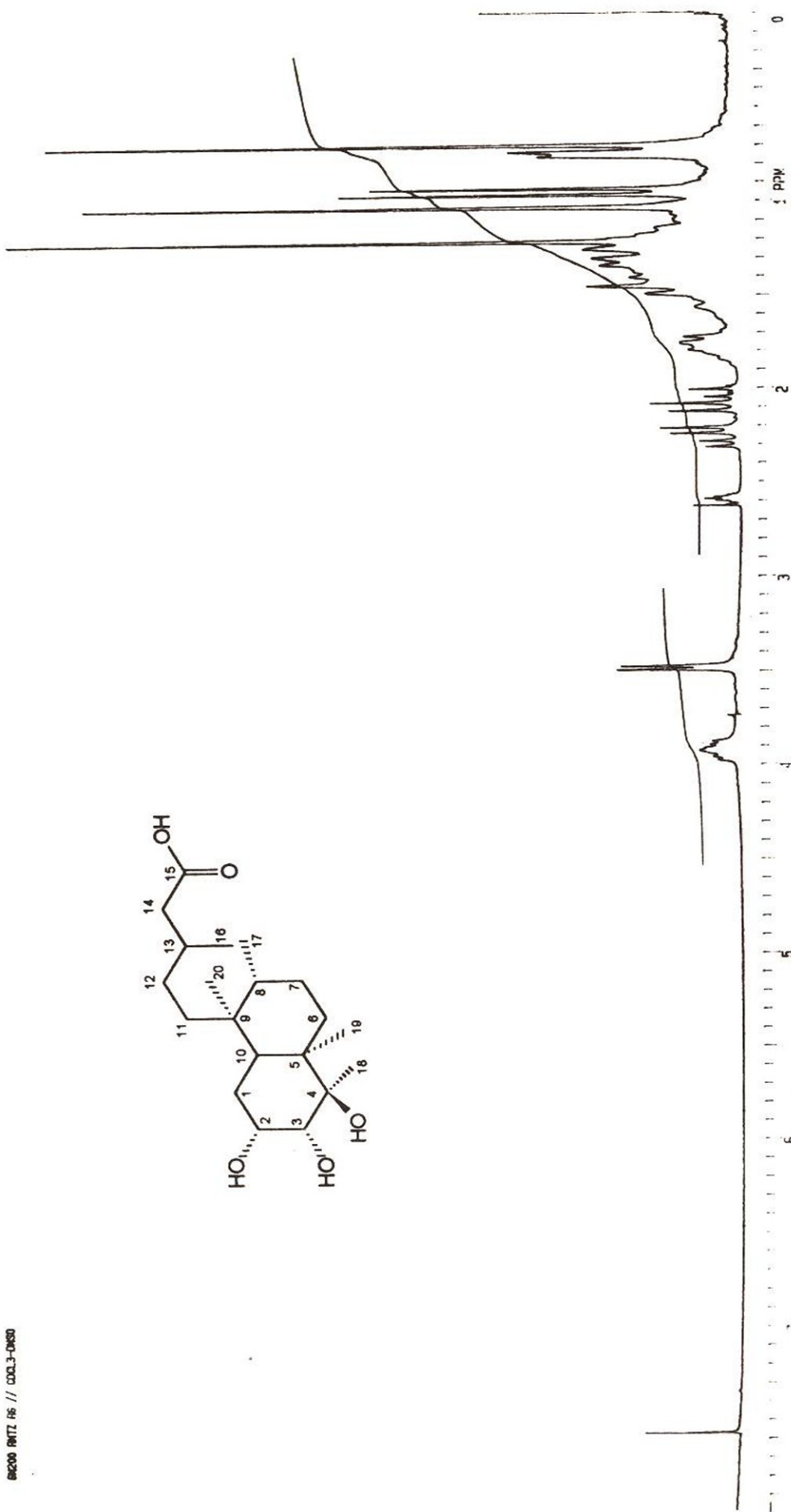


Figura 14. Espectro de RMN-¹H, (200 MHz) CDCl₃, del Acido dihidrotucumanoico (3).

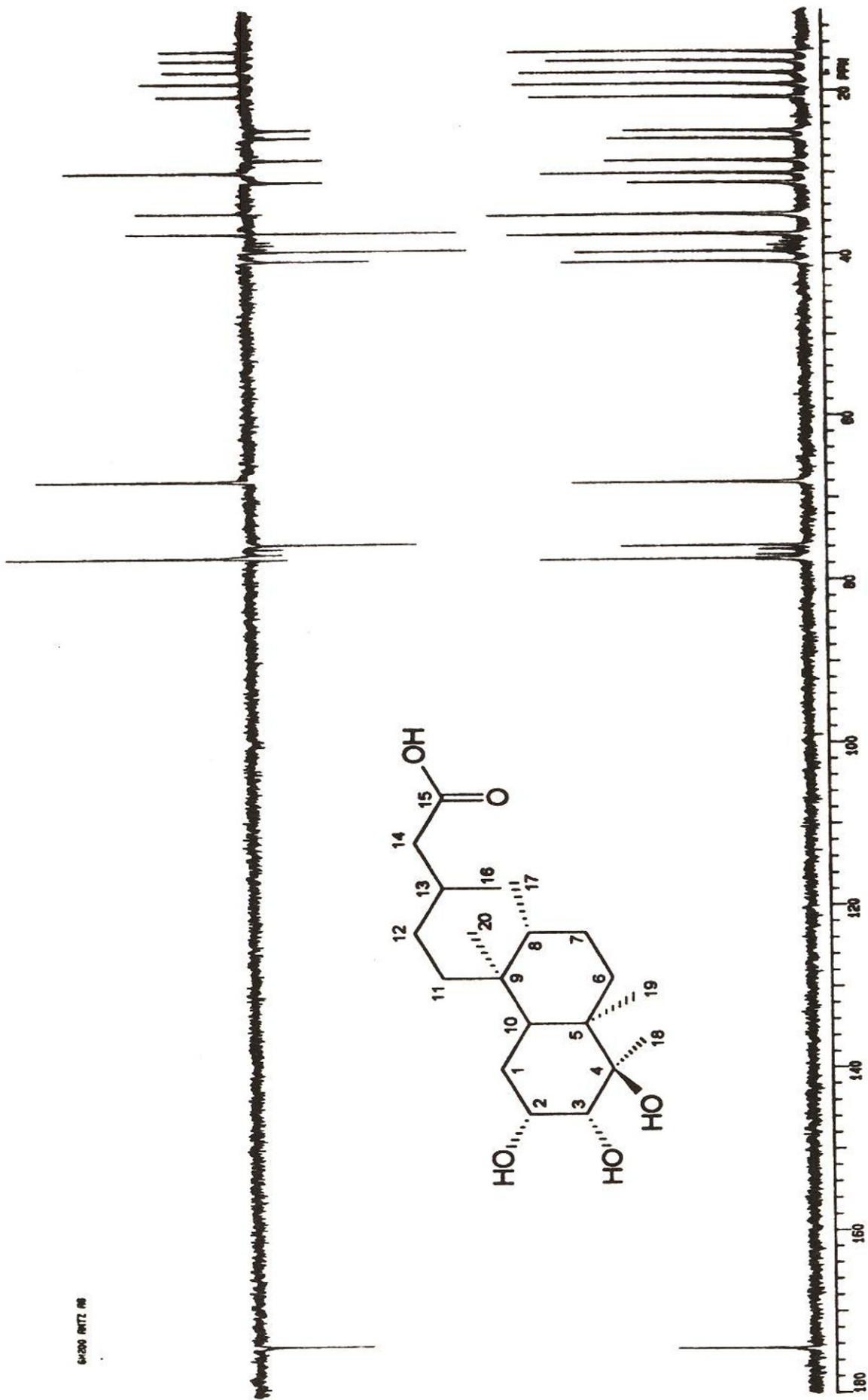


Figura 15. Espectro de RMN- ^{13}C , (75.4 MHz) y experimento APT del Acido dihidrotucumanoico (3).

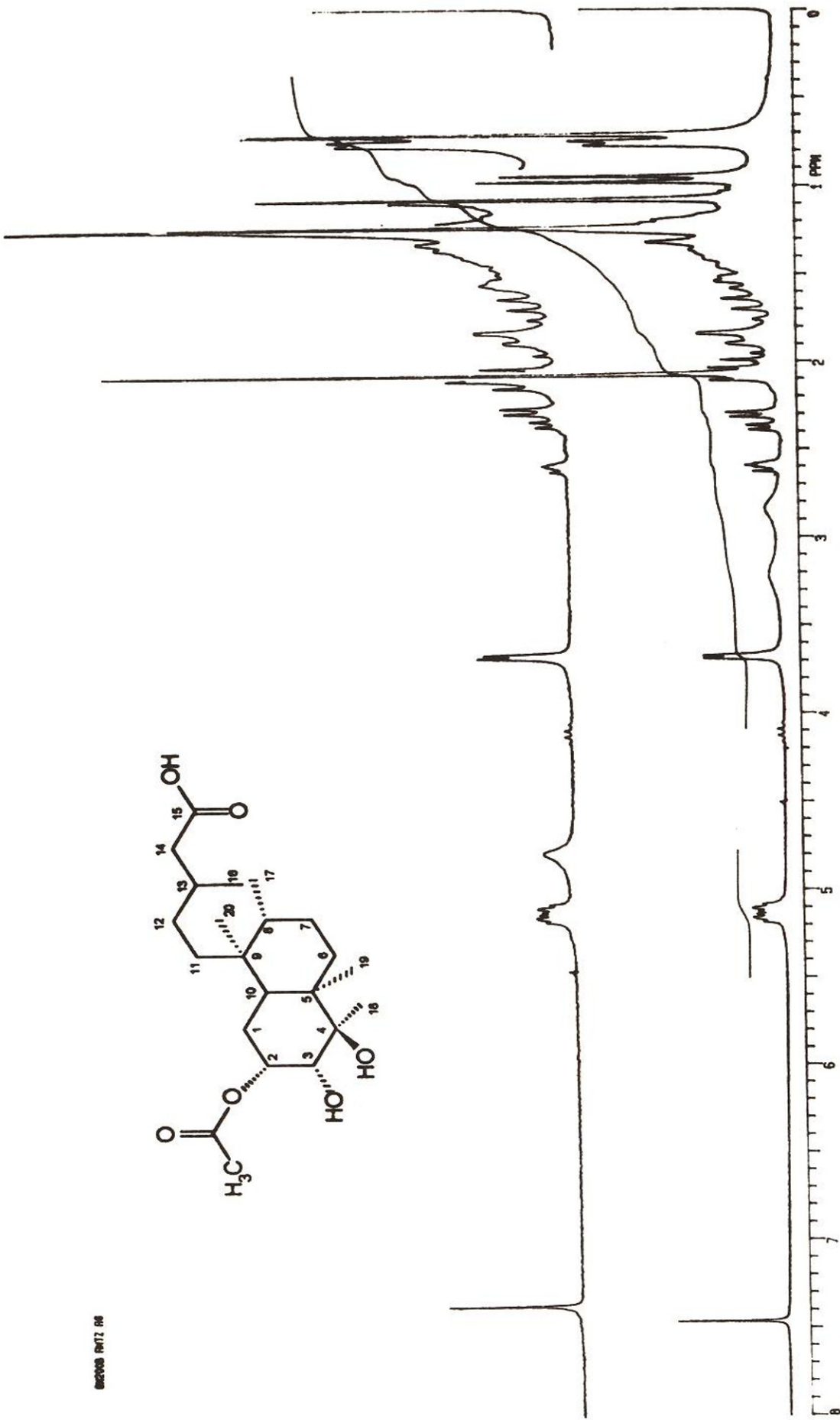


Figura 17. Espectro de RMN-¹H, (200 MHz) CDCl₃, del derivado acetilado de 2.



Figura 18 .Espectro de RMN- ^{13}C , del derivado acetilado de **3**. Parte superior expansión de 10-80 ppm del experimento APT.

ANEXO C: Espectros de Masas.

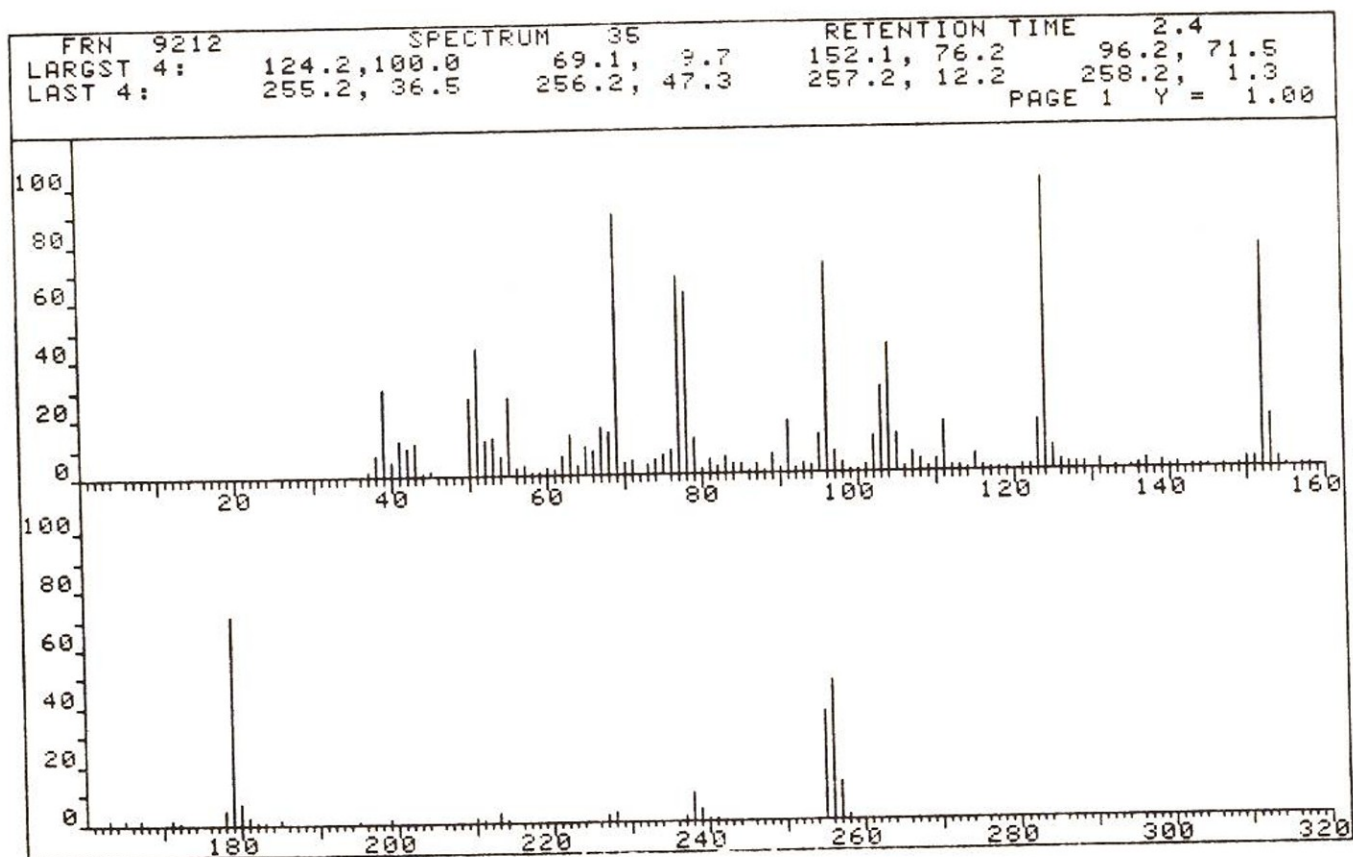
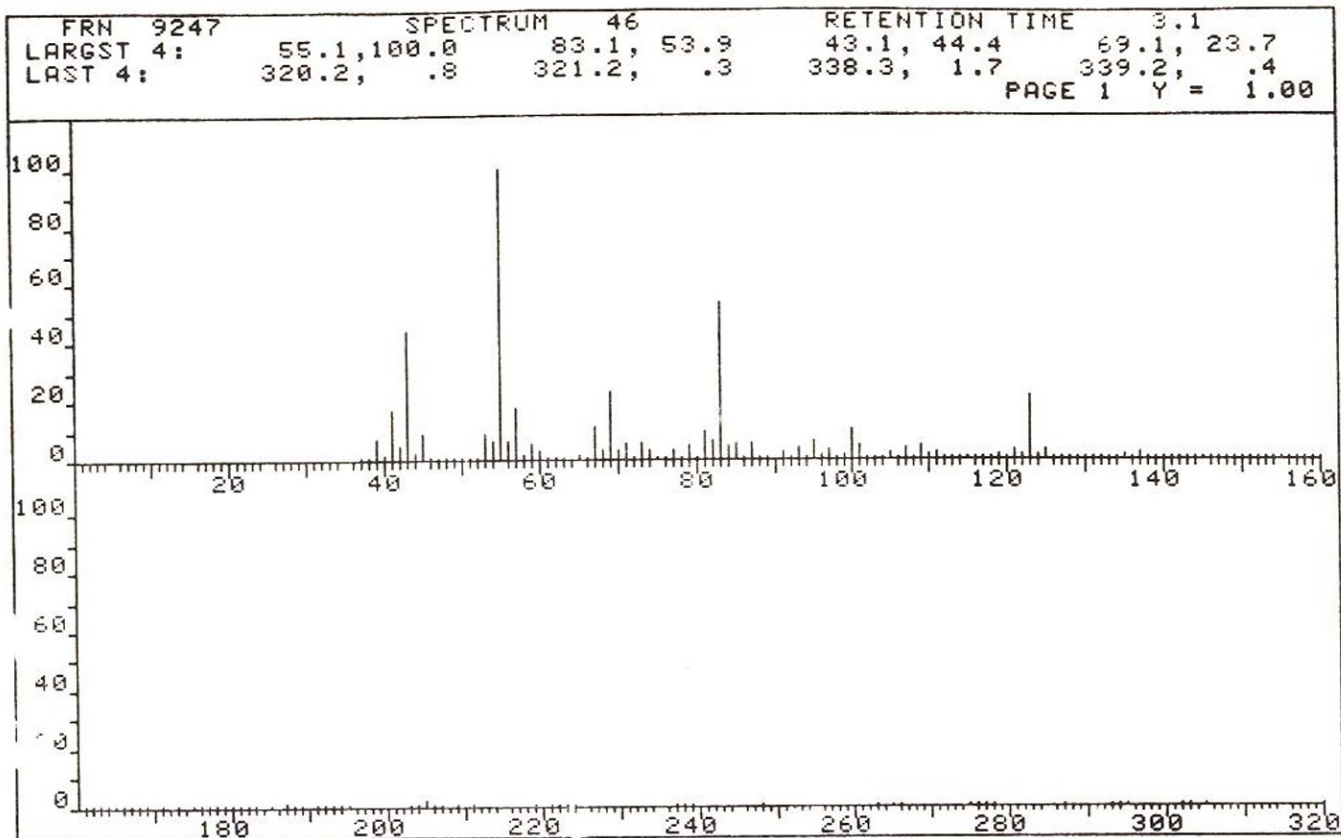


Figura 8. E. de Masas de 5,7-dihidroxi flavanona (1).



E. de Masas del Acido 2-angeloildihidrotucumanoico (2).

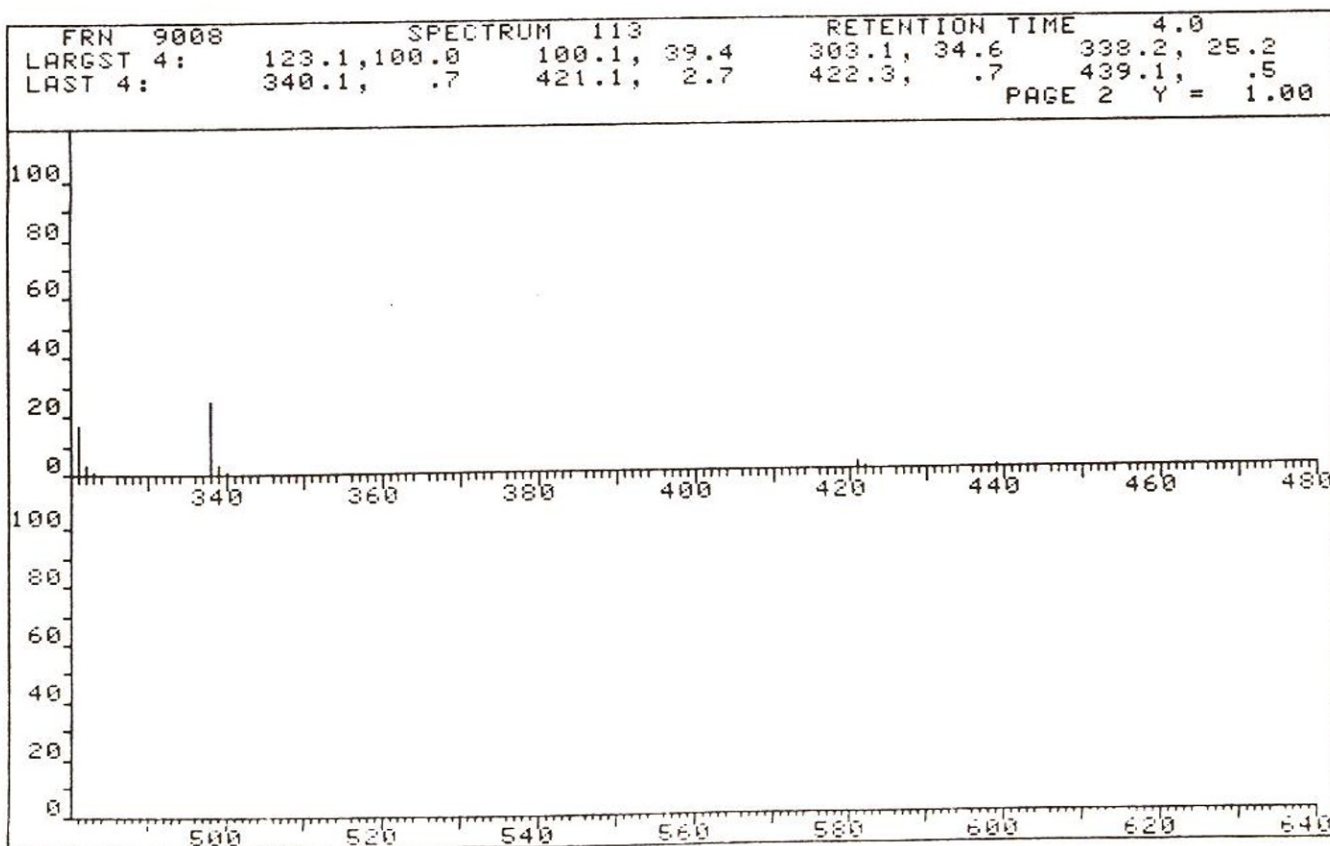


Figura 12. E. de Masas y experimento CIMS del Acido 2-angeloildihidrotucumanoico (2).

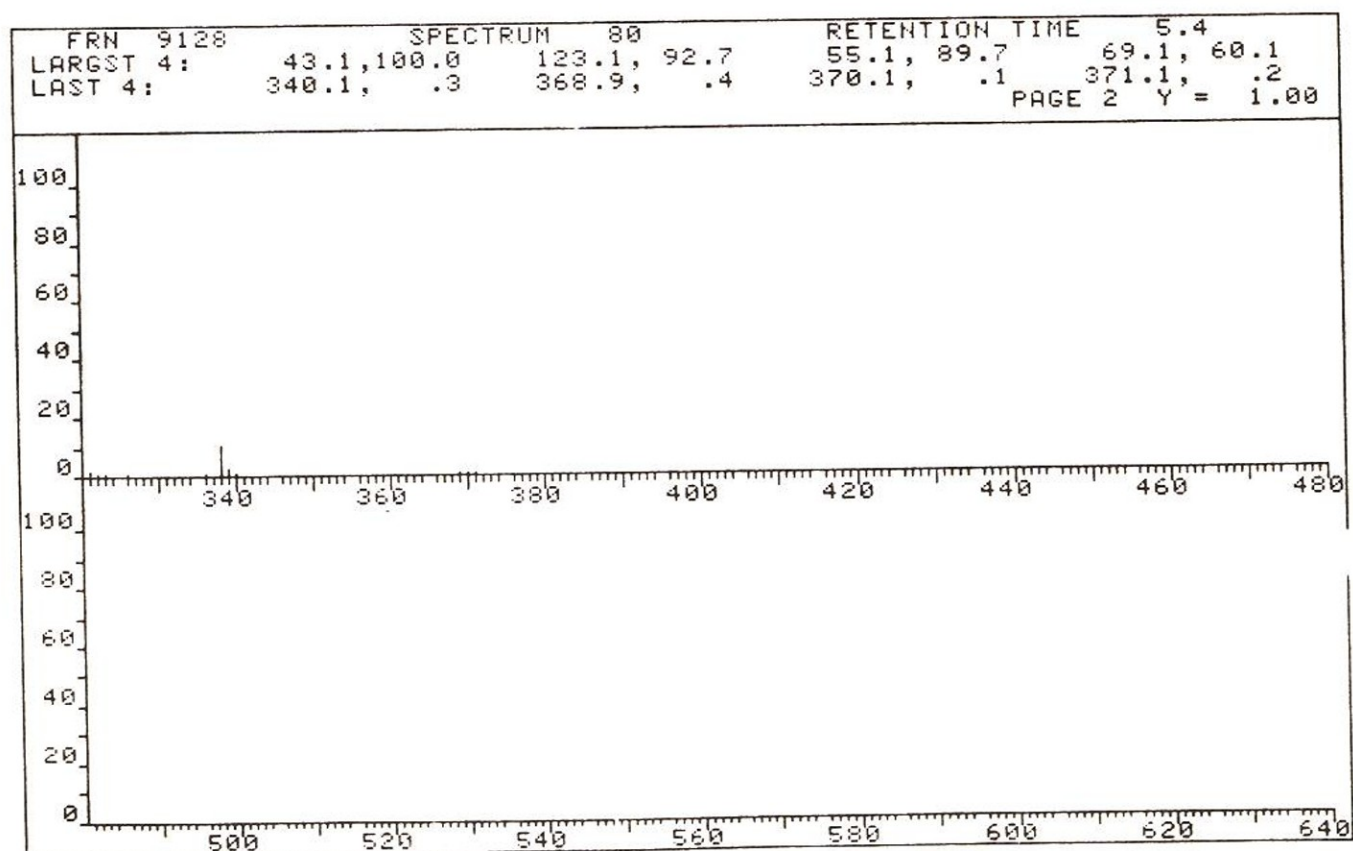
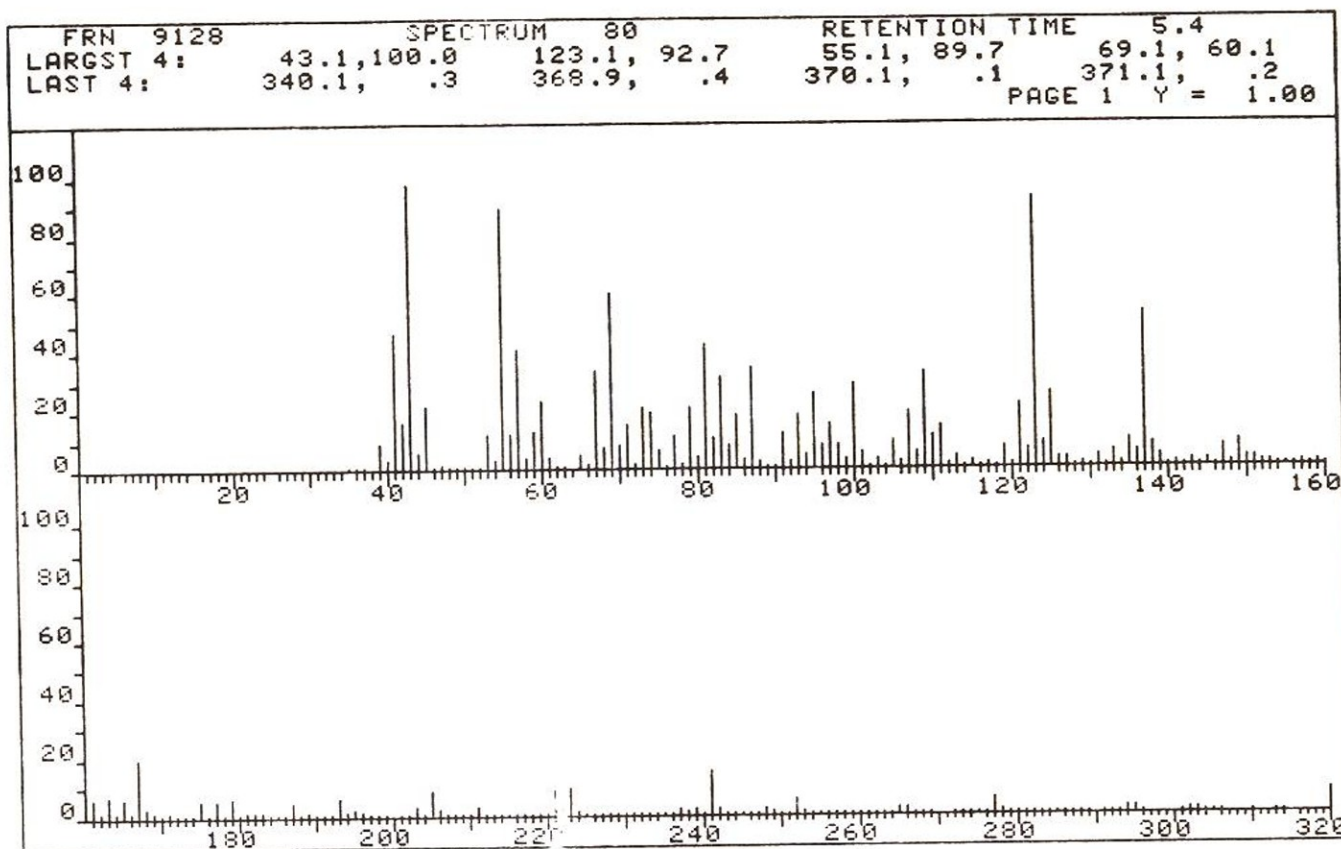


Figura 16. E. de Masas del Acido dihidrotucumanoico (3).

VII. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Organización Mundial de la Salud, Informe de la Conferencia Internacional sobre atención primaria de salud. Alma Ata, URSS ,Sep.1978.
- 2.- H.R.Benerman, *J. of Ethnopharmacology*, 2, 189-192 (1986).Organización Mundial de la Salud, *Medicina Tradicional I* ,71-73 (1976).
- 3.- X.Lozoa, *Bibliografía básica sobre herbolaria medicinal en México*. Sría. de Desarrollo Urbano y Ecología , 1984.
- 4.- D.Lamy y C. Zolla. La etnobotánica en relación con los problemas de Salud en México. *Medicina Tradicional II* , 19 (1978).
- 5.- N.S.Farsworth y A.S.Bingel. *New Natural Products and Plants Drugs with Pharmacological, biological or therapeutical activity*. Spinger Verlag, Berlin, Heindenberg, New York , 1-23 (1977).
- 6.- R. Mc.Vaugh, *Flora Novo-Galiciana*, Ed. William R.Anderson, Vol.12, *Compositae* , 1-3 (1984).
- 7.- J. Rzedowski, Identificación de los generos de la familia *Compositae* en México, *Acta Científica Potosina VII*, 1 y 2 , 6-8, (1978).
- 8.- S. Salas de León, *La familia Compositae en la Zona Arida del Estado de San Luis Potosí* , U.A.S.L.P. México , I , 92-93 (1987).
- 9.- E. Rodriguez , *Rev. Latinoamer. Quím.* , 8 / 2 , 56-61 (1976).
- 10.-S.M.Kupchan , *Fed.Proc.* , 33 , 288 (1974).
- 11.-G.R.Pettit and G.M.Cregg , *Experientia* , 29 , 781 (1973).
- 12.-J.C.Mitchell and G.Dupuis , *Brit. J. Dermat.* , 84 , 139 (1971).
- 13.-W.C.Burnett , S.B.Jones , *Biochemical Systematics and Ecology* , 12 , 25 (1974).
- 14.-S.B.Mathur , P.García Tello , *Rev. Latinoamer. Quím.* , 6 , 201 (1975).

- 15.-J.Romo , A.Romo de Vivar , **Rev. Latinoamer. Quím .** , 1 / 2 , 73 (1970).
- 16.-T.A.Geissman y T.S.Griffin ,**Rev. Latinoamer. Quím.** , 2 / 2 , 81 (1971).
- 17.-A.Romo de Vivar , F.Montiel y E.Díaz , **Rev. Latinoamer. Quím.** , 5 / 1 , 33 (1973).
- 18.-V. Martino , S. Caula , S. Villar , **Rev. Latinoamer. Quím.** , 19 / 3-4 , 111 (1988).
- 19.-G.E.Ferraro , A.M.Broussalis , C.M.Van Baren , L.V.Muschiatti, **Rev. Latinoamer. Quím.** , 19 / 3-4 , 141-147 (1988).
- 20.-E. Rodriguez , **Rev. Latinoamer. Quím.** , 8 / 2 , 59 (1977).
- 21.-X. A.Domínguez , Métodos de Investigación Fitoquímica , 45-47 (1985).
- 22.-K.R.Markham , Techniques of Flavonoid Identification , Cap.6 , Academic Press, (1982).
- 23.-X. A.Domínguez , Métodos de Investigación Fitoquímica , 81-83 (1985).
- 24.-J.Fessenden y J.Fessenden , Química Orgánica , Edit.Iberoamerica , 905-906 (1984).
- 25.-T.A.Geissman , D.H.G.Krout , **Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism** , 291 (1969).
- 26.-X. A.Domínguez , Métodos de Investigación Fitoquímica , 52-53 (1985).
- 27.-A.J.Valencia , Tesis de Pyramilacetona , Un nuevo diterpeno aislado del croton *Pyramidalis*, Universidad Veracruzana , Fac.Ciencias Químicas , (1978).
- 28.-T.J.Mabry and J.B.Harborne , **The Systematic Identification of Flavonoids** , Cambridge , Gran Bretaña , (1982).
- 29.- Sang. G.Yú, N.Fang and T.J.Mabry, **Phytochem.** , 27 , 171 (1988).
- 30.-X.A.Domínguez y B.Torre, **Phytochem.** , 13 , 1624 (1974).
- 31.-M.Miyakado , T.Kato , N.Ohno and T.J.Mabry , **Phytochem.** , 15 , 846 (1976).
- 32.-R.L.Santillan , Tesis doctoral de Química y Espectroscopía de constituyentes de *Pereziae* , CINVESTAV , Dept.Química.

- 33.-C.Zedero , F.Bohlmann and M.Niemeyer , **Phytochem.** , 31 , 1723-1726 (1992).
- 34.-F.Faini , P.Rivera , **Phytochem.** , 26 , 3281-3283 (1987).
- 35.-C.Zedero , F.Bohlmann , **Pythochem.** , 29 , 567-571 (1990).
- 36.-C.Zedero , F.Bohlmann , C.Solomon , **Phytochem.** , 28 , 531-542 (1989).
- 37.-D.C.Rossomando, O.S.Giordano and P. Joseph-Nathan , **Phytochem.** , 24 , 787-790 (1985).

