

720637



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS**

Informe de trabajo

**ESTUDIO FITOQUÍMICO**

de

*Satureja mexicana* Benth y *Satureja macrostema* Kunth

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**



PRESENTA

**Q. F. B. SIMÓN HERNÁNDEZ ORTEGA**



M. en C. BALDOMERO ESQUIVEL RODRÍGUEZ





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**

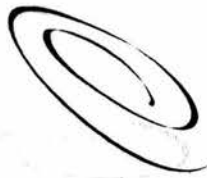


**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta 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.



OF.CPCQ.1270/03

**BIÓL. FRANCISCO INCERA UGALDE**

**Jefe de la Unidad de Administración del Posgrado**

**Presente**

Me es grato informarle que el alumno **SIMÓN HERNÁNDEZ ORTEGA**, con número de cuenta 90805516 y expediente 100354, presentará el Examen General de Conocimientos, para optar por el grado de Maestro en Ciencias, ante el siguiente jurado:

Presidente	Dr. Alfonso Romo de Vivar Romo	Instituto de Química, UNAM
Primer Vocal	Dr. Alfredo Ortega Hernández	Instituto de Química, UNAM
Segundo Vocal	Dra. Martha Eugenia Albores Velásco	Facultad de Química, UNAM
Tercero Vocal	Dr. Leovigildo Quijano	Instituto de Química, UNAM
Secretario	M. en C. José Manuel Méndez Stivalet	Facultad de Química, UNAM
Primer suplente	Dra. Yolanda Ríos Gómez	CIQ, UAE Morelos
Segundo suplente	Dr. René Miranda Ruvalcaba	FES-Cuautitlán

Sin otro particular de momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cd. Universitaria, D.F. a 28 de noviembre de 2003.

Atentamente.

**DR. MIGUEL COSTAS BASÍN**  
Coordinador del Programa



QUÍMICA  
D.E.PG.

*Pab*  
10/xii/03

c.c.p. Integrantes del Jurado  
Interesado  
Expediente  
Sección Escolar de la Coordinación de Posgrados, Facultad de Química.

# INDICE

## RESUMEN

I.- INTRODUCCIÓN	1
II.- ANTECEDENTES	2
III.- DISCUSIÓN	
A) COMPUESTOS AISLADOS DE <i>Satureja mexicana</i> BENTH.	7
B) COMPUESTOS AISLADOS DE <i>Satureja macrostema</i> BENTH	23
IV.- APENDICES	
A. CONCLUSIONES	A-1
B. PARTE EXPERIMENTAL	
A) INSTRUMENTAL Y REACTIVOS UTILIZADOS	B-1
B) AISLAMIENTO DE COMPUESTOS Y REACCIONES	B-1
C. BIBLIOGRAFIA	C-1





## RESUMEN

La composición química del género *Satureja* en México no ha sido estudiada de manera amplia como la de otros géneros de la familia *Labiatae*. Sin embargo, se ha descrito en la literatura una amplia gama de metabolitos secundarios aislados de algunas especies de este género. En el presente trabajo se describe el estudio fitoquímico de dos especies; *Satureja mexicana* y *S. macrostema*, el cual condujo al aislamiento de compuestos flavonoides (flavonas, flavanonas y rutinósidos de flavanonas), triterpenos y esteroides; la estructura de éstos se determinó mediante el uso de diversas técnicas espectroscópicas.

Dos glicósidos de flavonoide, Neoponcirina y Hesperidina, se aislaron como productos sólidos que resultaron ser los compuestos mayoritarios en estas dos especies de *Satureja*.

Asimismo, estas especies son ricas en aceites esenciales, los cuales fueron caracterizados mediante su separación por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

## ABSTRACT

The chemical composition of the genus *Satureja* in Mexico has not been as thoroughly studied as other genus of the *Labiatae* family. Nevertheless in previous reports it has been described the isolation and characterization of several secondary metabolites from some species of this genus. The phytochemical analysis of two *Satureja* species (*S. mexicana* and *S. macrostema*), has been led the isolation of flavonoid compounds (flavones, flavanones, flavanones rutinosides), triterpenes and sterols. The structures of the isolated compounds were established using spectroscopic techniques.



The flavanone rutinosides (neoponcirin and hesperidin) were isolated as amorphous solids. They are the more abundant natural products from *Satureja* species.

Furthermore, these species are rich in essential oils whose main components were separated and characterized by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GCMS)

## I INTRODUCCION

Las plantas sintetizan una gran variedad de compuestos, la gran mayoría muy complejos, los cuales son derivados del metabolismo de éstas. Las sustancias producidas en mayor abundancia (carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos y proteínas), se clasifican tradicionalmente como productos del metabolismo primario. Existen además otros que son sintetizados por las plantas, entre los que se pueden mencionar por ejemplo; algunas clases de pigmentos que dan color a los pétalos y a otros órganos, aceites esenciales (responsables del olor de varias plantas entre otros). Estos y otro tipo de compuestos son clasificados como productos del metabolismo secundario y se denominan de manera tradicional productos naturales o bien metabolitos secundarios.<sup>1</sup>

Anteriormente se tenía la idea de que estos productos no eran esenciales para las plantas ya que solo se encontraban en algunas familias, géneros o especies. Asimismo, es posible que fueran productos de desintoxicación y que por lo mismo no tuvieran ningún papel importante en las plantas que los producen. Sin embargo, la presencia de algunos metabolitos secundarios está relacionada con el estado de desarrollo de estos organismos, y es afectada por varias clases de presiones ambientales.<sup>2,3</sup>

Actualmente, se ha encontrado que estos compuestos secundarios juegan un papel importante en el desarrollo de las plantas como protectores contra insectos herbívoros o algunos otros, inclusive se ha encontrado un sin número de metabolitos secundarios como componentes en insectos que se alimentan de una especie en particular que produce esos compuestos.<sup>2,4,5,6</sup>

Así, la importancia de los productos naturales, se ha incrementado enormemente en las áreas de la farmacología, quimiotaxonomía y ecología química.<sup>2,4,5</sup>



## II ANTECEDENTES

La familia *Labiatae* (*Lamiaceae*) es una de las familias mas grandes de las angiospermas y su distribución es cosmopolita. Se divide, de acuerdo a la morfología del polen, en dos subfamilias, *Lamioideae* y *Nepetoideae*.<sup>7,8</sup> De acuerdo a diversos estudios, las especies pertenecientes a la primera subfamilia, producen glicósidos de iridoideas, son pobres en aceites esenciales y no generan ácido rosmarínico, mientras que las pertenecientes a la segunda subfamilia, producen ácido rosmarínico pero no glicósidos de iridoideas y además son ricas en terpenos volátiles (aceites esenciales).

Las especies de la familia *Labiatae* son conocidas como plantas aromáticas debido a la producción y acumulación de aceites esenciales, de ahí su importancia ecológica y económica<sup>9</sup>, a los aceites esenciales se les ha dado un significado taxonómico a un nivel superior,<sup>9, 10, 11</sup> sin embargo, existen numerosos especies que no producen aceites esenciales.<sup>8, 9, 12</sup>

Diversos estudios han determinado que la familia *Labiatae* es químicamente rica en compuestos de tipo terpenoide y flavonoide. A los flavonoides se les ha utilizado para propósitos quimiotaxonómicos en niveles infrafamiliares o infragenéricos,<sup>8, 9</sup> este tipo de compuestos son interesantes desde el punto de vista económico por su aplicación en farmacología, cosméticos e industria alimenticia.<sup>13</sup>

Los compuestos con estructura de diterpeno que se han aislado de especies de géneros como *Salvia*, *Ajuga*, *Teucrium*, *Scutellaria* y *Satureja* han mostrado tener actividad antialimentaria e insecticida.<sup>14,15,16,17</sup>

De algunas especies de géneros *Satureja* y *Nepeta* (subf. *Nepetoideae*), se han aislado compuestos con estructura de iridoide, estos se encuentran generalmente como glicósidos.<sup>18, 19</sup>

Algunas de las especies de familia *Labiatae*, crecen en zonas semiáridas, y producen una gran variedad de compuestos terpenoides y flavonoides, los

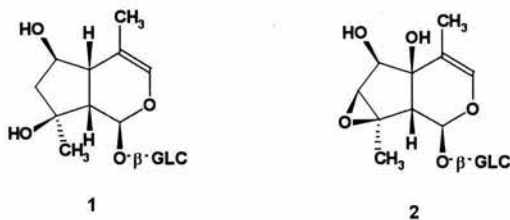
cuales juegan un papel muy importante en la competencia con otras plantas por los nutrientes del suelo, y por el agua.<sup>14, 15, 19, 20</sup> A este fenómeno se le ha denominado alelopatía.<sup>13,16,17,18, 22, 23</sup> lo anterior puede correlacionarse en su aplicación en el control de plagas.<sup>14,15, 20,21</sup>

Desde el punto de vista farmacológico, diversas especies de la familia *Labiatae*, son comúnmente utilizadas como remedios tradicionales, por sus diversas actividades tales como; espasmolítica, antimicrobiana<sup>24,25,26</sup> estomáquica, espectorante<sup>27</sup> antioxidante<sup>28</sup> y antidiarréica.<sup>29,30,31</sup> Las especies como tomillo, lavanda, menta, savory, salvia y romero son cultivadas para la obtención de los aceites esenciales, ó para el consumo de las partes secas de la planta como infusiones, así como en la industria farmacéutica.<sup>9,12, 31</sup>

Uno de los géneros de la familia *Labiatae* de gran importancia económica, etnobotánica, química y cultural es el género *Satureja*, conformado por especies distribuidas en diferentes países europeos. Son plantas aromáticas anuales o perennes, semiarbuscos que crecen en suelos áridos, cálidos y rocosos. Especies como *Satureja cilicica*, *S. Douglasii*, *S. gilliessi*, *S. hortensis*, *S. horvatii*, *S. juliana*, *S. kitaibelli*, *S. Montana*, *S. obovata*, *S. parvifolia*, *S. thymbra*, *S. vissiani* y *S. vulgaris* son utilizadas en medicina tradicional en diferentes países europeos,<sup>20,25,26,27, 29</sup> las especies de *Satureja* son conocidas comúnmente como "savory".<sup>30,32</sup>

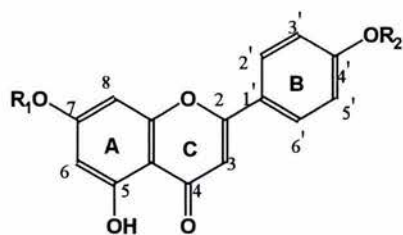
Los aceites esenciales de *Satureja obovata* ("winter savoir")<sup>32</sup> tienen actividad espasmolítica y antimicrobiana.<sup>24</sup>

De *Satureja vulgaris* y *Satureja montana* L ssp *kitaibelli* se aislaron los iridoides: lamiol (**1**) y desoxilamiósido (**2**).<sup>18,19</sup>



La *Satureja montana* L, es utilizada como espectorante y carminativa, de ésta se han aislado principalmente compuestos flavonoides como apigenina (3), acetina (4'-O-metilapigenina) (4), gengkwana (7-O-metilapigenina) (5), circimaritina (6), salvigenina (7), xantomicro (8), gardenina B (9) y 5-desmetóxi-nobiletina (10).<sup>30</sup>

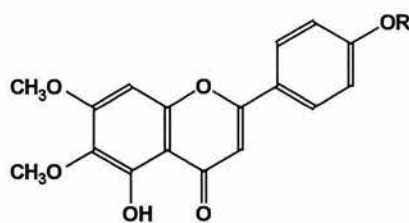
En estudios de actividad biológica se ha demostrado que ciertos compuestos flavonoides tienen actividad estrogénica, antitumoral o anti-VIH.<sup>33,34,35</sup>



(3)  $R_1, R_2 = H$

(4)  $R_1 = H, R_2 = CH_3$

(5)  $R_1 = CH_3, R_2 = H$



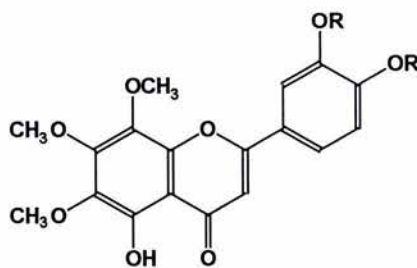
(6)  $R = CH_3$

(7)  $R = H$



(8)  $R = H$

(9)  $R = CH_3$

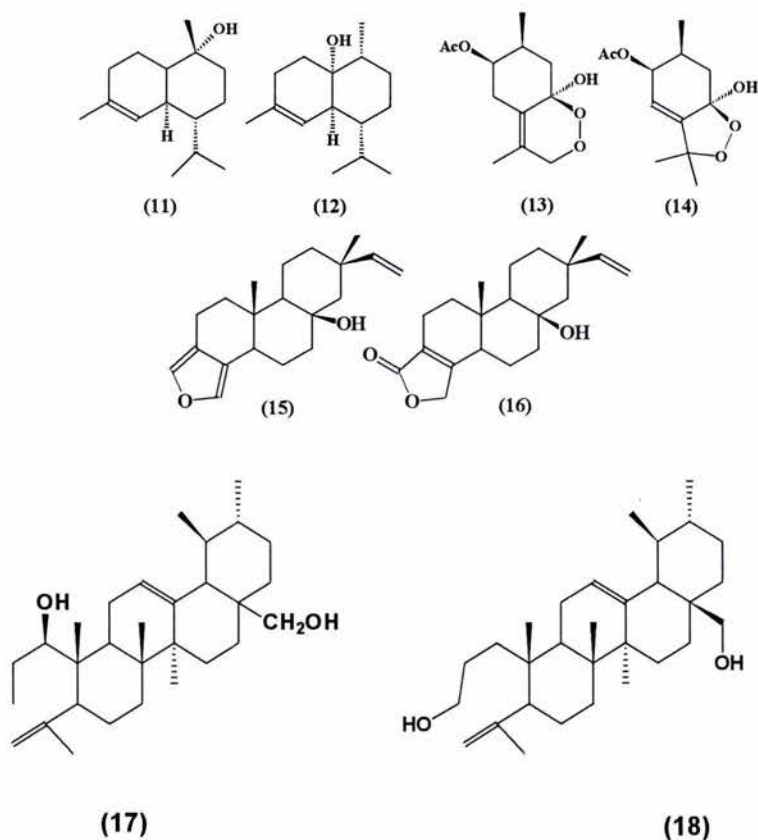


(10)  $R = CH_3$

De *Satureja hortensis* L. se aisló; 7-O-glucoronil-apigenina, 7-O-glucoronil-luteonina y 7-O-glucosil-luteonina.<sup>36</sup> los aceites esenciales de esta especie, tienen efecto antiespasmódico, antidiarreico<sup>37</sup> y antioxidante.<sup>38</sup>

De *Satureja gilliessi*,<sup>16, 17</sup> se aislaron sesquiterpenos como (+)-t-cadinol (**11**), (-)-cadin-4-en-1-ol (**12**), y peróxidos de monoterpenos acetilsaturejol (**13**) e isoacetilsaturejol (**14**), mientras que de otra población de la misma especie se aislaron diterpenos con esqueleto de isopimarano transpuesto como el saturol (**15**) y saturólido (**16**),<sup>39</sup> estos compuestos mostraron actividad citotóxica y antialimentaria.<sup>16</sup>

De *Satureja calamintha* y *S. graeca*, se aisló además de ácido ursólico y ácido oleanólico, ácido epiursólico y los 3,4-seco-ursanos: calamintadiol (**17**) e isocalamintadiol (**18**).<sup>40,41</sup> Se ha descrito que el ácido ursólico y el ácido oleanólico muestran actividad antitumoral y antiviral.<sup>42,43,44</sup>



En América, el género *Satureja* está conformado por especies distribuidas en Estados Unidos de América, México, la zona de Centroamérica y en América del sur en países como Argentina, Bolivia, Colombia, Chile, Ecuador, Perú y Venezuela. La mayoría de las especies, tienen importancia económica por su uso en medicina tradicional.<sup>47, 48</sup> como antiviral, antihelmintico, antimicrobiano e insecticida.<sup>49, 50, 51</sup>

En México, el género *Satureja* esta conformado por 13 especies que se distinguen por ser plantas aromáticas.

Por lo que respecta a su uso en medicina tradicional, únicamente de 4 de ellas se tiene información etnobotánica (*S. macrostema*, *S. oaxacana*, *S. brownei*, *S. xalapensis*), y son abundantes. Las otras tres especies mexicanas del género son plantas pequeñas y poco abundantes.<sup>52</sup>

Algunas de las especies de *Satureja* (*Satureja oaxacana*, *S. mexicana* y *S. macrostema*) crecen en suelo semiárido.<sup>53</sup>

Hasta ahora, se han descrito dos trabajos de especies relacionadas con este género; la especie *Calamintha macrostema*<sup>54</sup> y la especie *Satureja macrostema*.<sup>46, 55, 56, 57</sup> La particularidad de esta especie es que crece en suelo montañoso, tiene olor agradable y se conoce como "Té nurité" o "Té de monte" (Michoacán), "hierba del borracho" (Oaxaca), ó "tuché" (Milpa alta, D.F.).<sup>56, 57</sup>

### III DISCUSION

#### A) COMPUESTOS AISLADOS DE *Satureja mexicana* Benth.

La especie *Satureja mexicana* Benth (sección *Gardoquia*, tribu *Menthae* subfamilia *Nepetoideae*, familia *Labiatae*) es una planta perenne de 0.8 a 1.0 m. de altura, de flores color naranja de 2 a 3 cm de largo, olor agradable y penetrante, crece en suelo calizo y su entorno se encuentra poco rodeado por otro tipo de plantas.

Se estudiaron las partes aéreas de la planta. Una porción de hojas frescas se utilizó para estudio del aceite esencial. De la separación por cromatografía de gases acoplada al espectrómetro de masas, los compuestos mayoritarios identificados fueron pulegona, piperitona y d-carvona.

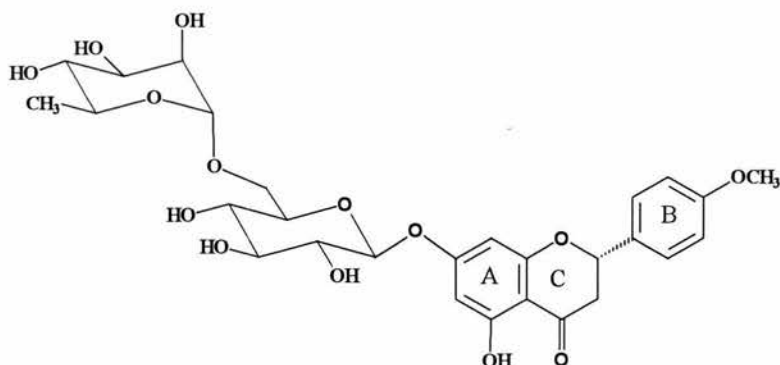
Las hojas secas se sometieron a maceración con acetona como disolvente posteriormente con metanol. Después de recuperar el disolvente se obtuvieron los extractos correspondientes de acetona y metanol.

Durante el proceso de extracción, precipitó un producto sólido amorfo. La cromatografía en capa fina comparativa de los productos sólidos indica que están constituidos por los mismos componentes.

En el espectro de infrarrojo (IR) de los productos sólidos precipitados, (espectro 1) se observan bandas de absorción para grupos oxhidrilo ( $3540\text{-}3100\text{ cm}^{-1}$  ancha), para grupo carbonilo conjugado ( $1647\text{ cm}^{-1}$ ) y para enlaces  $\text{C}=\text{C}$  ( $1607\text{ cm}^{-1}$ ) de tipo aromático principalmente.<sup>58</sup>

De la separación por cromatografía de una muestra de este producto, se obtuvieron dos compuestos.

Del análisis de los datos espectroscópicos del producto menos polar, se deduce que la estructura de este compuesto es la correspondiente al glicósido (**19**), aislada anteriormente de *calamintha nepeta*.<sup>46</sup>

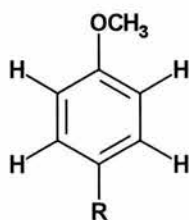


(19)

El compuesto (19), es un sólido blanco que funde con descomposición a  $\sim 250^\circ$ . En su espectro en el ultravioleta (U.V.) se observan máximos de absorción en 320 nm (2851.2) y 275 nm (14526).<sup>60</sup>

Del espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN<sup>1</sup>H), se obtiene la siguiente información. Una señal simple en  $\delta$  12.01 ppm, asignada al hidrógeno del grupo oxhidrilo en posición C-5 del esqueleto de flavonoide y está formando un enlace de hidrógeno con el oxígeno del grupo carbonilo C-4.

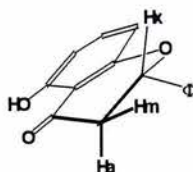
En  $\delta$  7.46 y 6.97 ppm, se observan dos señales dobles que integran para 2 hidrógenos c/u con  $J = 8.8$  Hz, formando un sistema AA'BB', característico de los hidrógenos en C-2'/C-6' y C-3'/C-5' respectivamente del anillo B de la flavanona. El sustituyente en C-4' se asigna como un grupo OCH<sub>3</sub> cuya señal simple para el CH<sub>3</sub> se observa en  $\delta$  3.76 ppm (**Figura 1**).



**Figura 1**

En  $\delta$  6.12 ppm, se encuentra una señal simple ancha que integra para dos hidrógenos, asignados a los protones en C-6 y C-8 del anillo A .

En  $\delta$  5.57 ppm se observa una señal doble de dobles con  $J = 12.6, 2.7$  Hz que integra para un hidrógeno. Esta señal se asigna al hidrógeno en C-2 que presenta interacciones con los hidrógenos de C-3 cuyas señales se observan en  $\delta$  3.15 ppm (parcialmente sobrepuesta con otras señales) y en 2.77 ppm como una señal doble de dobles con  $J = 17.2, 3.0$  Hz, formando entre sí un sistema *AMX* como se indica en la **Figura 2**.<sup>60</sup>



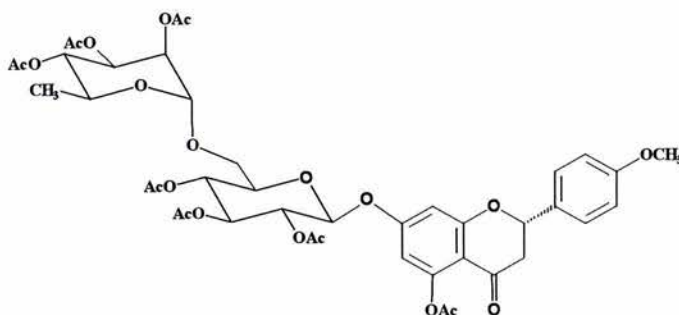
**Figura 2**

Dos señales importantes que no intercambian con  $D_2O$ : la primera se observa como una señal doble en  $\delta$  4.96 ppm con  $J = 7$  Hz y que por su posición se asigna al hidrógeno anomérico de un fragmento de glucosa, mientras que la segunda se observa en  $\delta$  4.50 ppm como una señal doble con  $J = 2$  Hz, la cual se asigna al hidrógeno anomérico de un fragmento de ramnosa.<sup>61</sup> Asimismo, en  $\delta$  1.06 ppm se observa una señal doble con  $J = 6.2$  Hz perteneciente al  $CH_3$  del fragmento de ramnosa.



Los desplazamientos de los carbonos de la glucosa y ramnosa se asignaron con base en la comparación con los datos ya descritos en la literatura.<sup>61</sup>

La acetilación del compuesto **19** con anhídrido acético en piridina, produjo el compuesto peracetilado (**20**) de p.f.= 134-136°.



(20)

En su espectro en el IR, el producto acetilado (**20**) muestra bandas de absorción grupos carbonilo de los grupos acetoxi ( $1750\text{ cm}^{-1}$  y  $1070\text{ cm}^{-1}$ ), así como una banda de absorción en  $1680\text{ cm}^{-1}$  debida al grupo carbonilo conjugado de la  $\gamma$ -pirona y en  $1620\text{ cm}^{-1}$  y  $1575\text{ cm}^{-1}$  que se asignan para vibraciones C=C de tipo aromático.<sup>58, 60</sup>

En el espectro de RMN<sup>1</sup>H se observan señales características de un sistema AA' BB' centradas en  $\delta$  7.37 y 6.95 ppm en  $\delta$  3.83 ppm se encuentra la señal asignada al CH<sub>3</sub> del grupo metóxi.

En  $\delta$  6.48 y 6.31 ppm con  $J = 2.5\text{ Hz}$  se observan dos señales dobles que integran para un hidrógeno cada una y que forman un sistema AB correspondientes a los protones sobre los carbonos 6 y 8 del anillo A.

En  $\delta$  5.46, 3.05 y 2.73 ppm se encuentran tres señales dobles de dobles correspondientes al sistema AMX que forman los hidrógenos unidos a C-2 y C-3 del anillo C de la  $\gamma$ -pirona.

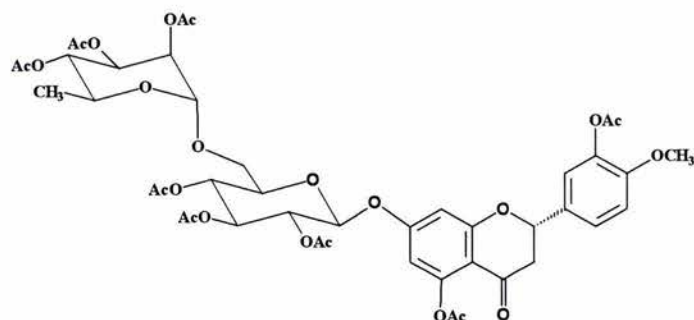
Se observa la señal del hidrógeno sobre el carbón 2 de la unidad de glucosa, en  $\delta$  5.05 ppm como una señal doble de dobles con  $J = 7.8$ , y  $7.5$  Hz debidas a las interacciones axial-axial con los hidrógenos sobre los carbonos C-1 y C-3. En  $\delta$  4.7 ppm se observa la señal del hidrógeno anomérico de la unidad de ramnosa, como una señal doble con una  $J = 1.4$  Hz debida al acoplamiento ecuatorial-ecuatorial. El resto de señales correspondientes a los hidrógenos del disacárido se observan como señales múltiples superpuestas entre  $\delta$  5.10 y 5.45 ppm que integran para 12H.

Por otra parte, en  $\delta$  2.09, 2.07, 2.05, 2.03 y 1.96 ppm, se observan las señales simples correspondientes a los  $\text{CH}_3$  de los grupos acetóxi del glicosido y en  $\delta$  1.14 ppm se encuentra una señal doble con  $J = 7$  Hz característico del  $\text{CH}_3$  de la ramnosa.

Estas señales se asignaron con base en la comparación con los datos descritos en la literatura para glicósidos similares.<sup>45, 61, 62, 63</sup>

De la separación por cromatografía de los productos sólidos, el otro sólido aislado de las fracciones mas polares fue un compuesto blanco, que con base en sus características físicas, se deduce que se trata de otro glicósido de una flavanona.

Debido a las características polares de este compuesto, una muestra se acetiló con anhídrido acético en piridina en las condiciones usuales, obteniendo el derivado peracetilado que se identificó como el octaacetato de la hesperidina (**21**) ya descrito en la literatura.<sup>62, 63</sup>



(21)

En el espectro en el IR del compuesto acetilado (**21**) se observan bandas de absorción en  $1755\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al carbonilo de los grupos acetatos, en  $1680\text{ cm}^{-1}$  a la vibración del carbonilo de la cetona conjugada y en  $1640$ ,  $1620$ ,  $1570$ ,  $1500$ , a enlaces C=C de tipo aromático.<sup>63</sup>

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$  de (**21**), se observan las siguientes señales: en  $\delta$  7.27 ppm, una señal doble de dobles que integra para un hidrógeno con  $J = 8.5$  y  $2.2$  Hz que se asignó al protón de la posición 6' del anillo B y que tiene acoplamiento *o* y *m* con los hidrógenos de la posición 5' y 2', los cuales se encuentran en  $\delta$  7.0 ppm (d,  $J = 8.6$  Hz) y  $\delta$  7.16 ppm (d,  $J = 2.2$  Hz) respectivamente formando un sistema ABX.

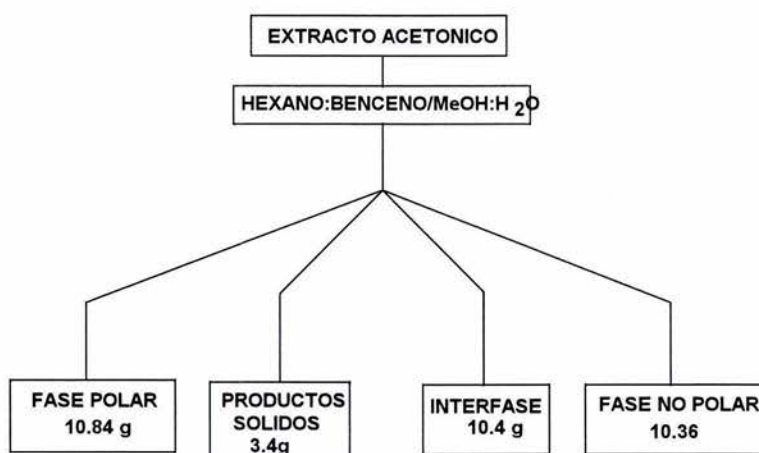
En  $\delta$  6.47 y 6.32 ppm, se observa un sistema AB con  $J = 2.5$  Hz que se asignó a los protones en las posiciones 8 y 6 del anillo A respectivamente. Asimismo, se observa un sistema AMX con señales centradas en  $\delta$  5.44, 3.05 y 2.74 ppm, y con  $J = 12.8$ , 3.2; 16.6, 12.8; y 16.6, 3.2 para los protones H2, H3<sub>m</sub> y H3<sub>x</sub>. En  $\delta$  3.85 ppm se observa una señal simple que integra para 3 hidrógenos del grupo metoxilo en la posición C-4'.

A campo alto se observan las señales simples en  $\delta$  2.38, 2.33, 2.04, 2.09, 2.08 (señal crecida) y 1.96 ppm debidas a los grupos CH<sub>3</sub> de los 8 acetilos.

Finalmente, se observa una señal doble en  $\delta$  1.14 ppm, con  $J = 6.4$  Hz que integra para 3 protones y que se asigna a los hidrógenos del grupo metilo de la ramnosa.

La comparación por cromatografía en placa delgada (CCD) del compuesto aislado **21**, con una muestra de hesperidina, aislada previamente de la planta *Salvia holwayi* Blake<sup>63</sup> y con los descritos en la literatura permite, concluir que el compuesto aislado es la hesperidina (7-O-rutinósido de hesperetina).<sup>61,62,63,64</sup> En estudios recientes se ha descrito que la hesperidina tiene actividad antiinflamatoria, analgésica, antihipertensiva y diurética.<sup>64, 65, 66, 67</sup>

Continuando con la separación de los extractos obtenidos, el extracto de acetona se fraccionó mediante un proceso de partición entre el sistema de disolventes hexano:benceno y MeOH:H<sub>2</sub>O [**Diagrama I**].



**DIAGRAMA I.** Partición del extracto de acetona

Del análisis de las cromatografías en placa delgada comparativa, se concluyó que los productos sólidos precipitados, están constituidos por la mezcla de los glicósidos de flavonoides **19** y **21**.

La fase polar de la partición, después de la extracción con AcOEt, se separó en una columna empacada con gel de sílice, con un gradiente de polaridad creciente.

De las fracciones iniciales, se aisló un producto blanco cristalino (hexano/acetona), de p.f.=130-132°. De acuerdo a las características físicas, se identificó como  $\beta$ -sitosterol.

De fracciones siguientes se aisló un compuesto sólido amorfo de p.f.= 287-289°. Después del análisis de los datos físicos, se determinó que la estructura de este compuesto corresponde al ácido ursólico. Es interesante mencionar que este compuesto ha presentado actividad biológica contra células de carcinoma de pulmón humano, adenocarcinoma de colon humano y contra el virus de inmunodeficiencia humana (anti-VIH).<sup>42, 43, 44</sup>

De las fracciones mas polares de la columna, eluidas con hexano:AcOEt (1:1), se aisló un compuesto cristalino de color amarillo de p.f.=187-190°. El análisis de los datos de su espectro en el IR, denota principalmente bandas de absorción características para grupos oxhidrilo (3369-3199  $\text{cm}^{-1}$ ); para grupo carbonilo conjugado (1668  $\text{cm}^{-1}$ ) y de C-H de tipo aromático (1601, 1573, 1514, 1444  $\text{cm}^{-1}$ ), así para C-O de tipo OCH<sub>3</sub> aromático 1240  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>58</sup>

Del análisis del espectro de masas (IE) del compuesto, se determina que éste tiene un peso molecular de 374 ( $\text{M}^+$ ) y que presenta una pérdida de 15 unidades de masa [ $\text{M}^+ -15 = 359$ , P.B.], así como fragmentos en  $m/z = 197$ , 180 y 163.

El análisis de las señales del espectro de RMN <sup>1</sup>H permite deducir un compuesto con características aromáticas, en donde, se observan cuatro señales para los OCH<sub>3</sub> que se encuentran en  $\delta$  4.12, 4.00, 3.99, y 3.98 ppm.

En  $\delta$  7.59 ppm se observa una señal doble de dobles con  $J = 8.5, 2.1$  Hz; que integra para un hidrógeno, el cual presenta interacciones *orto* y *meta* con los hidrógenos cuyas señales se observan en  $\delta$  7.44 ppm (dd,  $J = 2.1$  Hz) y en  $\delta$  7.02 ppm (dd,  $J = 8.5$  Hz), ambas señales integran para un hidrógeno cada una.

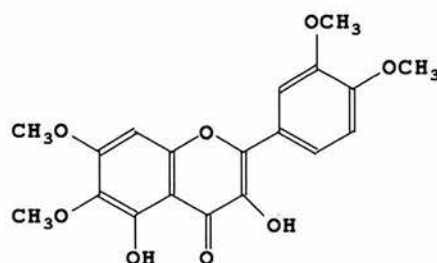
Por los datos descritos anteriormente, se deduce que el compuesto tiene un esqueleto de flavonoide, en donde la posición 5 del anillo A debe encontrarse ocupada por un grupo oxhidrilo el cual esta formando puente de hidrógeno (IR,  $3400-2500\text{ cm}^{-1}$ ), con el grupo carbonilo de la  $\gamma$ -pirona, ya que el protón de este grupo, se observa en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  como una señal ancha en  $\delta$  12.4 ppm, y que intercambia con  $\text{D}_2\text{O}$ .

Las posiciones 6 y 7 del anillo A, se proponen estar ocupadas por los dos grupos  $\text{OCH}_3$ , los grupos que faltan por asignar (un grupo OH y un H), se sugieren en las posiciones 3 y 8 respectivamente. Por lo que la señal en  $\delta$  6.62 ppm que integra para un hidrógeno se asigna al protón de la posición 8 del anillo A. La presencia del oxhidrilo en la posición C3 se dedujo del análisis del espectro de masas del compuesto, en donde se confirman los picos correspondientes a la fragmentación típica retro Diels-Alders de los compuestos flavonoides; 197 (P.B. -  $\text{C}_9\text{H}_7\text{O}_3$ ) y 163 (P.B. -  $\text{C}_9\text{H}_9\text{O}_5$ ).

La reacción de acetilación produce el derivado de acetilación parcial, el cual en el espectro de RMN  $^1\text{H}$ , se observa, en  $\delta$  12.58 ppm una señal simple que se asigna al protón del oxhidrilo en la posición 5 y que se encuentra formando puente de hidrógeno con el carbonilo en C4. Asimismo, se observan las señales para el sistema ABC de los protones H-6' ( $\delta$  7.60 ppm), H-2' ( $\delta$  7.43 ppm) y H-5' ( $\delta$  7.03 ppm). sin cambios aparentes en su desplazamientos. Sin embargo, aparece una señal simple en  $\delta$  2.40 ppm que

integra para 3 hidrógenos y que se asigna por su posición a los protones del CH<sub>3</sub> correspondientes al grupo acetilo en C-3.

Las características físicas del compuesto aislado coinciden con las descritas en la literatura para la 3,5-dihidroxi-3',4',6,7-tetrametóxilavona (**22**), aislada de *Artemisia lanata*<sup>68, 69</sup> y cuya estructura ha sido confirmada por síntesis.<sup>70</sup>



**(22)**

Continuando con la separación del extracto polar y por sucesivas cromatografías, se aisló un producto cristalino de color amarillo. Del análisis de los datos espectroscópicos en el IR (3584 cm<sup>-1</sup> -OH, 3036 cm<sup>-1</sup> C-H arom., 1641, 1591, 1515cm<sup>-1</sup> C-C arom),<sup>58</sup> y de acuerdo con los datos observados en su espectro de RMN <sup>1</sup>H, se deduce que este compuesto tiene un esqueleto de flavonoide. Su patrón de sustitución se discute a continuación:

A campo bajo se observa una señal simple en  $\delta$  12.05 ppm que integra para un hidrógeno y que se intercambia con D<sub>2</sub>O esta señal debe corresponder al protón de un grupo oxhidrilo unido a C-5 y que se encuentra formando puente de hidrógeno con el oxígeno del grupo carbonilo en posición C-4.

En  $\delta$  7.38 y 6.95 ppm se observan señales características de un sistema AA' BB' con J = 8.6 Hz que integran para dos hidrógenos cada una. Estas señales se asignan a los hidrógenos H-2',H3' y H5',H6' de anillo aromático B de un esqueleto de una flavona. Por los desplazamientos químicos de estas

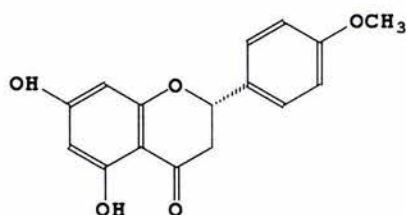
señales, y por comparación con datos descrito en la literatura,<sup>59, 60, 61</sup> la posición 4' se deduce sustituida por un grupo metoxilo cuya señal para los hidrógenos del CH<sub>3</sub> se observan en  $\delta$  3.83 ppm.

Centradas en  $\delta$  6.0 y 5.98 ppm se encuentran dos señales dobles de un sistema AB con  $J = 3$  Hz que indica un acoplamiento de tipo meta. Estas señales se asignan a los hidrógenos de las posiciones 6 y 8 del anillo A.

En  $\delta$  5.80 ppm se observa un singulete ancho que integra para un hidrógeno y que intercambia con D<sub>2</sub>O. Esta señal se asigna al hidrógeno de un grupo oxhidrilo en la posición 7 del anillo A del esqueleto de una flavona.<sup>59, 60, 61</sup>

Por otra parte, en  $\delta$  5.37, 3.11 y 2.78 ppm se encuentran tres señales dobles de dobles con  $J = 12.9, 3.0, J = 17.2, 12.9$  y  $J = 17.2, 3.0$  Hz respectivamente que integran para un hidrógeno cada uno y que se asignan a los hidrógenos 2, 3<sub>a</sub>, 3<sub>m</sub> del sistema AMX del anillo C de una flavanona.

Con base en la información anterior y de las características físicas y espectroscópicas de este compuesto, la estructura de compuesto flavonoide (**23**) se propone a continuación:



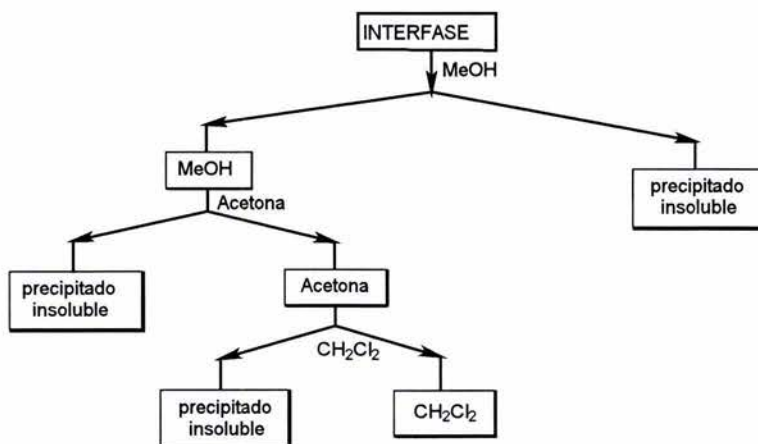
**(23)**

Los datos coinciden con los descritos en la literatura para la 4'-O-metilnaringenina.<sup>71</sup>

El residuo de la interfase de la partición (diagrama 1) se trató con disolventes de diferente polaridad como se describe en el diagrama No. 2.

De las fases insolubles en los diferentes disolventes, se obtuvieron 5.0 g de producto sólido precipitado constituido por la mezcla de glicósidos **19** y **21**.





**DIAGRAMA No. 2.** Extracción por disolventes la interfase de la partición del extracto de acetona

La fase soluble en diclorometano del tratamiento anterior (**Diagrama 2**), se separó por cromatografía en columna empacada con gel de sílice, de esta, se obtuvieron 4 compuestos flavonoides que se describen a continuación:

De las fracciones iniciales de la columna, se aisló un compuesto cristalino de color amarillo, el cual después del análisis de los datos espectroscópicos, se identificó como la flavanona 4'-O-metil-naringenina (**23**) aislada previamente de la parte polar soluble en MeOH.

De una de las fracciones posteriores de la columna de la fase soluble en diclorometano, se separaron tres compuestos **24**, **25** y **26**.

El compuesto (**24**) tiene un p.f.= 222-224° y un peso molecular de 344, obtenido por espectrometría de masas. En su espectro en el IR se observa una banda de absorción para grupos oxhidrilo (3689, 3603, 3538  $\text{cm}^{-1}$ ), para grupo carbonilo conjugado (1658  $\text{cm}^{-1}$ ), así como de anillo aromático (1604, 1619, 1513  $\text{cm}^{-1}$ ), y para grupos  $\text{CH}_3$  en 1461  $\text{cm}^{-1}$ . De acuerdo a esta

información se propone que se trate también de un compuesto con estructura de tipo flavonoide.

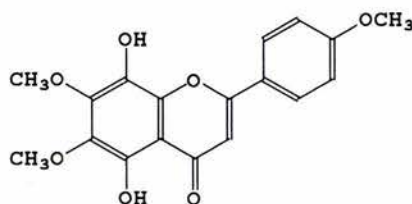
En el espectro de RMN<sup>1</sup>H, se observa una señal simple que intercambia con D<sub>2</sub>O en  $\delta$  12.65 ppm la cual se asigna al protón de un grupo oxhidrilo, que debe corresponder al oxhidrilo unido a C-5 que esta formando un enlace de hidrógeno con el oxígeno del carbonilo en C-4.

En la zona de protones aromáticos, se observan señales características para un sistema AA'BB' con señales centradas en  $\delta$  7.8 y 7.0 ppm que se asignaron a los hidrógenos H<sub>2</sub>'-H<sub>6</sub>' y H<sub>3</sub>'-H<sub>5</sub>' del anillo B. Asimismo, en  $\delta$  6.55 ppm se observa una señal simple que integra para un hidrógeno, que por su desplazamiento químico, puede ser asignada a H-3 ó H-8.

En  $\delta$  4.10, 3.97 y 3.94 ppm, se observan señales simples que corresponden a grupos CH<sub>3</sub> de 3 grupos metoxilos, uno de los cuales debe encontrarse unido al carbono 4' del anillo **B** y los otros dos grupos metoxilo restantes a las posiciones 6 y 7 del anillo **A**.

Lo anterior se basa en el análisis del espectro de masas, que de acuerdo con el patrón de fragmentación típica de estos compuestos (fragmentación retro Diels-Alder), se deduce que la posición en C-3 no esta sustituida, así la señal simple en  $\delta$  6.55 ppm debe corresponder al hidrógeno en C-3, y la posición C-8 debe encontrarse sustituida por un grupo oxhidrilo.

Por lo tanto, la estructura del compuesto aislado debe corresponder a la 5,8-dihidroxi-4',6,7-trimetoxiflavona: **(24)**



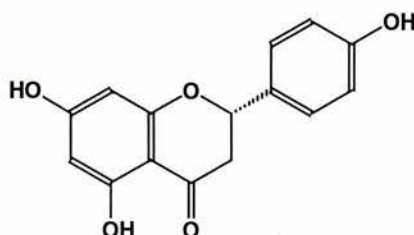
**(24)**

La comparación de los resultados obtenidos coinciden con los descritos en la literatura para la pedunculina aislado de diversas especies de la subfamilia *Nepetoideae*, subtribu *Saturejeae*.<sup>20, 72</sup>

El compuesto **(25)** muestra, en su espectro en el IR, las siguientes bandas de absorción; 3307  $\text{cm}^{-1}$  banda ancha debida a la asociación del OH con el grupo carbonilo, en 1630  $\text{C}=\text{O}$ , 1601, 1554  $\text{cm}^{-1}$  de enlaces  $\text{C}=\text{C}$  de tipo aromático.

En el espectro de RMN  $^1\text{H}$ , se observan las siguientes señales: en  $\delta$  12.19, 9.72 y 8.63 ppm, que se intercambian con  $\text{D}_2\text{O}$  que corresponden a tres grupos oxhidrilo, la señal a campo mas bajo ( $\delta$  12.19), corresponde al hidrógeno de un grupo oxhidrilo unido a C-5 que está formando puente de hidrógeno con el carbonilo en C-4 y las otras dos son protones de dos grupos oxhidrilo no asociados.

En la región de protones aromáticos ( $\delta$  7.39 y 6.89 ppm) se observan señales características de un sistema AA'BB' que forman los hidrógenos de los carbonos C2'-C6' y C3'-C5' del anillo B. En  $\delta$  5.95 ppm se encuentra una señal simple que integra para 2 hidrógenos, esta señal por su desplazamiento se puede asignar a los hidrógenos de las posiciones C-6 y C-8. A campo mas alto, se observa un sistema AMX con señales centradas en  $\delta$  5.45, 3.19 y, 2.72 ppm ( $J = 13,3 \text{ H}_{2_x}$ ; 17,13  $\text{H}_{3_b}$ ; 17,3  $\text{H}_{3_a}$ ) que corresponden los hidrógenos  $\text{H}_2$ ,  $\text{H}_{3_a}$  y  $\text{H}_{3_b}$  de las posiciones C-2 y C-3 respectivamente.



(25)

Los datos observados en el IR y en RMN  $^1\text{H}$  de este compuesto corresponden a los descritos para la naringenina, **(25)**.<sup>46, 73, 74, 75</sup>

De las fracciones mas polares de la columna de la fase soluble en diclorometano, se aisló el compuesto **(26)** de p.f. = 178-179° y peso molecular de 358 obtenido por espectrometría de masas. En su espectro en el IR se observan bandas de absorción características de grupos oxhidrilo ( $3538\text{cm}^{-1}$ ), de carbonilo ( $1657\text{ cm}^{-1}$ ), y bandas de vibración C-H de tipo aromático ( $1588, 1515, 1497\text{cm}^{-1}$ ).

Del análisis del espectro de masas el ion molecular  $m/z$  358 tiene 15 unidades de masa, lo que representa la pérdida de un grupo metilo que da origen al pico base (P.B.) y fragmentos en  $m/z$  211, 132 y 183.

Del espectro de RMN $^1\text{H}$  se obtiene la siguiente información; en  $\delta$  12.58 ppm, se observa una señal simple que integra para un protón que por su posición y desplazamiento, se puede asignar a un protón de oxhidrilo en posición C-5, el cual esta formando enlace de hidrógeno con el oxígeno del carbonilo en C-4, de un compuesto flavonoide

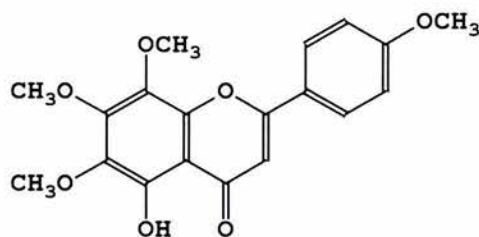
En  $\delta$  6.61 ppm, se observa una señal simple que integra para un protón la cual se puede asignar al hidrógeno del carbono C-3, esta asignación esta de acuerdo con el fragmento de  $m/z$  132 (RetroDiels-Alder) determinado del espectro de masas.

Se observa además, en  $\delta$  7.91 y 7.04 ppm señales características de un sistema AA'BB', este sistema se puede asignar a los protones H2'-H6' y H3'-H5' del anillo B.

La posición en C-4' del anillo B, esta sustituida por uno de los grupos metoxilo que se encuentran en  $\delta$  4.12, 3.98, 3.96 y 3.91 ppm y que observan como señales simples.

Los otros tres grupos metoxilo restantes, se asignan a las posiciones C6, C7 y C8 del anillo A. Esta asignación esta de acuerdo con el fragmento de m/z 211 (RetroDiels-Alder) que se determina del espectro de masas

Asi entonces, la estructura de este compuesto se estableció como la 5-hidroxi-4',6,7,8-tetrametóxilflavona. Los datos y las características de este compuesto corresponden para la Gardenina B **(26)**,<sup>30, 76</sup>



**(26)**

Actualmente se han descrito trabajos en la literatura en los cuales las flavonas polimetoxiladas presentan actividad anticancerígena,<sup>77, 78</sup> y tripanocida.<sup>79</sup>

## B) COMPUESTOS ISLADOS DE *Satureja macrostema* Benth.

La especie *Satureja macrostema* Benth., se colectó en el estado de Guerrero en la región denominada Filo de caballo. Es un arbusto perenne de 1 a 1.7 mts de altura; tallo redondeado-cuadrangular; hoja simple, opuesta, oblongo-lanceolada de 2.5 a 3 cm de largo, aserrada; inflorescencia regular axilar; de color naranja, limbo bilabiado de 2.5 cm de largo, existe silvestre en lugares húmedos y altos del país. Esta planta se conoce con el nombre de "té nurité" o "té de monte" "hierba del borracho" y "tuche".<sup>56, 57</sup>

Las hojas frescas de *Satureja macrostema*, se sometieron a destilación con arrastre de vapor para la extracción del aceite esencial, obteniéndose 1.035 g de aceite. Del análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas del aceite esencial obtenido se determinó que los componentes mayoritarios de son: pulegona, linalol, mentona, isomentona, isopulegona y piperitona.

Las hojas secas y molidas se extrajeron por maceración con acetona como disolvente, durante 10 días a temperatura ambiente. Durante la obtención del extracto, se separaron 10.5 g de un producto sólido amorfo.

De la separación por cromatografía en columna de gel de sílice, de una muestra de este producto, se obtuvieron dos compuestos; el ácido ursólico y 7-O-rutinósido de hesperetina (hesperidina) (**21**).<sup>61, 62, 63</sup>

El Residuo del extracto de acetona se colocó en una columna de cromatografía para su separación.

De las diferentes fracciones de la columna cromatográfica, se aislaron:  $\beta$ -sitosterol y ácido ursólico

#### IV CONCLUSIONES

Se llevó a cabo el estudio fitoquímico de dos especies Mexicanas del género *Satureja* (*S. mexicana* y *S. macrostema*), lo que permitió el aislamiento de diversos compuestos como triperpenos, esteroides y flavonoides.

De *Satureja mexicana*, se aislaron Neoponcirina, Hesperidina,  $\beta$ -sitosterol, ácido ursólico, 3,5-dihidroxi-6,7,3',4'-tetrametoxi flavona, 4'-O-metil-naringenina, 5,8-dihidroxi-6,7,4'-trimetoxiflavona, Naringenina y 5-hidroxi-6,7,8,4'-tetrametoxiflavona.

De *Satureja macrostema* se aislaron; Hesperidina,  $\beta$ -sitosterol y ácido ursólico.

Se encontró que pulegona, piperitona y  $\delta$ -carvona son los componentes mayoritarios en *S. Mexicana*.

De *S. macrostema* son: pulegona, linalol, mentona, isomentona, isopulegona y piperitona.

Es necesario mencionar que se deben de realizar más estudios fitoquímicos de las diversas especies pertenecientes a este género, para una mejor correlación de los componentes químicos y su aplicación en medicina tradicional.

No se tiene conocimiento en cuanto al uso comercial que pudiera tener la explotación del aceite esencial, en nuestro país.

## V PARTE EXPERIMENTAL

### A) INSTRUMENTAL Y MATERIAL UTILIZADO

Las especies *Satureja mexicana* y *S. macrostema*, fueron clasificadas por el personal del Herbario Nacional del Instituto de Biología de la UNAM, los números de clasificación son: MEXU489369 Y MEXU763221

Los puntos de fusión, se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos.

La pureza de los compuestos y las separaciones por cromatografía en columna se siguieron por medio de cromatografías en placa fina de gel de sílice Merck F-264 utilizando como revelador una solución de ácido sulfúrico/ácido acético/agua (1:20:4) o solución de sulfato cérico al 1% en ácido sulfúrico 2N.

Para las cromatografías en columna, se utilizó gel de sílice 60-Merck (35-70, 70-230, 230-400 ASTM).

Los espectros en el IR se determinaron en un espectrómetro Nicolet FT-5X en solución de  $\text{CHCl}_3$ , suspensión en Nujol o en pastilla de KBr

Los espectros de RMN  $^1\text{H}$ , se determinaron en un aparato Varian Gemini-200 MHz. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) están en partes por millón (ppm), con referencia al tetrametilsilano (TMS). Los espectros se realizaron en solución de  $\text{CDCl}_3$ , o  $\text{CDCl}_3$ -DMSO- $d_6$ .

Los espectros de masas se obtuvieron en un aparato Hewlet Packard 5985-B, mediante la técnica de impacto electrónico (IE) ó ionización química (IQ).

Los espectros en el U.V. se determinaron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer modelo 552, en solución de etanol.



## B) AISLAMIENTO DE COMPUESTOS:

La especie *Satureja mexicana* se colectó en el poblado del Súchil a 10 Km de la población Vaquerías, municipio de Mexquititlán Hidalgo.

Las hojas (950 g), una vez secas se sometieron a maceración con acetona (5 días, dos veces) y posteriormente con metanol 2 (días). Después de eliminar el disolvente por destilación a presión reducida, se obtuvieron los extractos correspondientes. Durante la obtención de los extractos se separaron 8.7 g y 11.4 g de producto sólido precipitado de características polares.

El extracto de acetona (38.8 g), se fraccionó por partición entre un sistema de disolventes hexano:benceno (1:1) y metanol:H<sub>2</sub>O (9:1), de este proceso, se obtuvo una fase polar, una no polar y una interfase (10.84 g, 10.36 g, 10.4 g respectivamente), se obtuvo además 3.4 g de producto sólido precipitado. (Diagrama 1)

### Aislamiento de Neoponcirina (19) y Hesperidina (22)

Una muestra del producto sólido precipitado (2.56 g), se separó por cromatografía en columna utilizando gel de sílice de malla 70-230 como soporte y eluída con mezclas de disolvente hexano:acetona en gradientes de polaridad creciente hasta acetona y posteriormente mezclas de disolvente acetona:metanol en gradiente de polaridad creciente hasta metanol, obteniéndose los compuestos **(19 y 22)**:

**Neoponcirina (19)**: Sólido cristalino, incoloro, p.f. 250° con descomposición.

**I.R.**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>) CHCl<sub>3</sub>

3540-3100 ancha (-OH); 1647 (C=O conjugado); 1607, 1580, 1519, 1503 (C=C aromático)

**R.M.N.  $^1\text{H}$ .**  $\delta$ (ppm) J(Hz), DMSO- $d_6$ 

2.01, s, 1H ( $\underline{\text{H}}\text{-O}$ ); 7.46, d 2H, AA'BB'; (8.8), H-6', H-2'; 6.97 d 2H, AA'BB', (8.8), H-3', H-5'; 6.12 s ancho 2H, H-6; H-8; 5.57 dd 1H, AMX, (12.6, 2.7), H-2; 4.96 d 1H, 7Hz (H1 anomérico glucosa); 4.5 s 2Hz, 1H (H1 anomérico de ramnosa); 3.76 s 3H  $\text{CH}_3\text{-O-C-4}$ ; 3.60-3.10 mult. H (gluc-ramn); 3.15 dd H $_{3a}$ , 2.77 dd 1H (1.7, 3) AMX H- $_{3a}$ ;  $\delta$ 1.06 d 3H 6.2 Hz  $\text{CH}_3$ -ramnosa.

**R.M.N.  $^{13}\text{C}$**   $\delta$  (ppm), DMSO- $d_6$ 

C-2, 78.26; C-3, 31.86; C-4, 197.0; C-5, 162.97; C-6, 96.45; C-7, 165.11; C-8, 96.45; C-9, 162.52; C-10, 103.27; C-1', 130.31; C-2', 128.40; C-3', 113.88; C-4', 159.47; C-5', 113.88; C-6', 128.40;  $\text{OCH}_3\text{-C-4'}$ , 55.15; Glucosa, C-1, 100.55; C-2, 72.94; C-3, 76.25; C-4, 69.60; C-5, 75.54; C-6, 65.97; Ramnosa C-1, 99.40; C-2, 70.25; C-3, 70.67; C-4, 72.05; C-5, 68.27; C-6, 17.78.

**Acetilación de Neoponcirina (19)**

Una muestra de 500 mg de neoponcirina (**19**) se sometió a reacción con anhídrido acético (10 ml) en piridina (7 ml) durante 72 hrs a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se trató de la manera usual, para obtener el derivado peracetilado (**20**), como un sólido blanco cristalino de p.f. 134-136°, con las características espectroscópicas siguientes:

**I.R.**  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ )  $\text{CHCl}_3$ 

1750 (C=O éster); 1680 (C=O cetona conj.); 1650, 1620, 1575 (C=C arom); 1250-1170 (C-O éster).

**R.M.N.  $^1\text{H}$ .**  $\text{CDCl}_3$   $\delta$ (ppm) J(Hz)

7.37, d 2H, AA'BB'; (8.75), H-6', H-2'; 6.95, d 2H, AA'BB', (8.75), H-3', H-5'; 6.31, d 1H, AB, (2.5), H-6; 6.48, d 1H, AB, (2.5), H-8; 5.46, dd 1H, AMX, (12, 4), H-2; 3.83, s 3H,  $\text{CH}_3\text{O-C-4'}$ ; 3.05, dd 1H, A, (16, 12), H- $_{3a}$ ; 2.73, dd 1H, B, (16, 4), H- $_{3b}$ ; 5.3-5.10 m 8H, H-gluc-ram; 4.7, d 1H, (1.4), H-1 ramn; 5.05, dd 1H (7.8, 7.5), H-anom.; 2.38, s 3H,  $\text{AcO-C-5}$ ; 2.09, 2.07, 1.96, 3s 3H c/u, 3  $\text{AcO-}$ ; 2.03, s 9H, 3  $\text{AcO}$ ; 1.14, (7) d 3H,  $\text{CH}_3$ -ramn.

**R.M.N.  $^{13}\text{C}$ .**  $\delta(\text{ppm})$   $\text{CDCl}_3$ 

C2, 79.11; C-3 44.5 ;C4 188.9; C5 151.74; C6 102.06; C7 163.85; C8 105.642; C9 161.7; C10 1.09.47; C1' 130.07; C2',C6' 114.09; C3',C5' 127.73;  $\text{OCH}_3\text{-C4}'$ , 55.22; Glucosa C1 97.89; C2 73.09; C3 79.23; C4 68.47; C5 73.03; C6 65.96; Ramnosa: C1 97.44; C2, C4 70.71; C3 68.83; C5 66.52; C6 17.15. 170-06-169.02 7s  $\text{C=O}$  de  $\text{CH}_3\text{C=O}$  20.94-20.49 6s de grupos  $\text{CH}_3\text{C=O}$ .

**Aislamiento y acetilación del rutinósido de hesperetina (21)**

De fracciones mas polares de la cromatografía, se aisló otro producto que se identificó de acuerdo con sus características físicas y espectroscópicas, como otro glicósido de una flavanona. Debido a las características polares de éste, una muestra de el (960 mg) se sometió a reacción de acetilación con anhídrido acético en piridina en condiciones usuales, de donde se obtuvo el derivado peracetilado de p.f. 144-147°.

**I.R.**  $\nu$  ( $\text{cm}^{-1}$ ),  $\text{CDCl}_3$ 

1755 ( $\text{C=O}$ , éster); 1680 ( $\text{C=O}$  cetona conj); 1640, 1620, 1570, 1500 ( $\text{C=C}$  arom), 1250-1150 ( $\text{C-O}$ ).

**R.M.N.  $^1\text{H}$**   $\delta(\text{ppm})$  J(Hz).  $\text{CDCl}_3$ 

7.27, dd 1H, ABC, (8.5, 2.2), H-6'; 7.16, d 1H, ABC, (2.2), H-2'; 7.0, d 1H, ABC, (8.6), H-5'; 6.47, d 1H, AB, (2.5), H-8; 6.32, d 1H, AB, (2.5), H-6; 5.44, dd 1H, ABX, (12.8, 3), H-2; 3.85, s 3H,  $\text{CH}_3\text{-C-4}'$ ; 3.05, dd 1H, AMX, (16.6,12.8), H-3<sub>a</sub>; 2.74, dd 1H, AMX, (16.6, 3.2), H-3<sub>b</sub>; 5.3-5.0, m 8H, Gluc-ramn.; 4.69, d 1H, H-1 ramn.; 1.14, d 3H, (6.4),  $\text{CH}_3\text{-ramn.}$ ; 2.38, 2.33, 2s 3H c/u,  $\text{AcO-C4}'\text{C-5}$ ; 2.04, s 6H, 2  $\text{AcO-}$ ; 2.09, 2.08, 1.96, 3s 3H c/u, 3  $\text{AcO}$ .

**R.M.N.  $^{13}\text{C}$**   $\delta(\text{ppm})$   $\text{CDCl}_3$ 

C2 78.64, C3 44.61, C4 188.68, C5 151.87, C6 105.88, C7 163.76, C8 102.15, C9 161.85, C10 109.59; C1' 139.93, C2' 112.45, C3' 151.56, C4' 130.73, C5' 124.80, C6' 121.15; Glucosa: C1 97.56, C2 72.42, C3 70.84, C4

68.94, C5 73.23, C6 66.12, Ramnosa:C1 98.05, C2 69.33, C3 70.84, C4 68.59, C5 66.64, C6 17.26, CH<sub>3</sub>C=O 169.80, CH<sub>3</sub>C=O 169.75, CH<sub>3</sub>C=O 169.39, CH<sub>3</sub>-C=O 170.14, CH<sub>3</sub>C=O 169.99, CH<sub>3</sub>C=O 169.30, CH<sub>3</sub>C=O 168.82, CH<sub>3</sub>C=O 169.10. OCH<sub>3</sub>-C4' 56.00,

El residuo (10.84 g) de la fase polar (MeOH:H<sub>2</sub>O), de la separación por partición del extracto acetónico de la planta, se separó en columna empacada con gel de sílice para placa (5 cm de diámetro por 5 cm de alto), y se eluyó con hexano, mezclas de hexano:AcOEt, AcOEt, mezclas de AcOEt:MeOH de polaridad creciente. y finalmente MeOH (DIAGRAMA 1).

De las fracciones de menor polaridad, se aisló β-sitosterol de p.f.130-132° (Acetona/Hexano), soluble en hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, insoluble en acetona, MeOH y AcOEt.

De fracciones de mediana polaridad, se aisló ácido ursólico de p.f. 287-289° (Acetona/Hexano), soluble en MeOH, Acetona, insoluble en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

#### **Aislamiento de la 3,5-dihidroxi-6,7,3',4'-tetrametoxiflavona (22).**

De fracciones mas polares, eluidas con hexano:AcOEt 1:1, se aisló un producto cristalino de color amarillo de p.f. 187-190° (Acetona) soluble en acetona, MeOH, insoluble en Hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

**I.R.**  $\nu$  (cm<sup>-1</sup>)

3369-3199 (OH); 1668(C=O); 1601, 1573, 1514, 1444 (C-H arom); 1240(C-O OCH<sub>3</sub> aromático).

**E.M. I.E.** m/z : 374 (M<sup>+</sup>), 375 (M<sup>+</sup>+1), 359 (M<sup>+</sup>-15), 345 (M<sup>+</sup>-30), 197 (M<sup>+</sup>+1-15-RDA) 163 (RDA)

**R.M.N. <sup>1</sup>H.**  $\delta$ (ppm) J(Hz) CDCl<sub>3</sub>

12.4, s 1H, HO-C-5; 7.59, dd 1H, ABC, (8.5 2.1), H-6'; 7.44, d 1H, AB, (2.1), H-2'; 7.02, d 1H, AB, (8.5), H-5; 6.62, s 1H, H-8; 5.55, s 1H, HO-C-3;  $\delta$ 4.12, s 3H, CH<sub>3</sub>O-C-6; 4.0, s 3H; 3.99, s 3H; 3.98, s 3H;

**Acetilación de la 3,5-dihidroxi-6,7,3',4'-tetrametoxiflavona .**

Una muestra de 10.2 mg de **23**, se acetiló con anhídrido acético en piridina a temperatura ambiente de la manera usual.

**R.M.N.  $^1\text{H}$**   $\delta$ (ppm) J(Hz)  $\text{CDCl}_3$

12.58, s 1H, (int.  $\text{D}_2\text{O}$ ), HO-C-5; 7.6, dd 1H, (8.5, 3.0), ABC, H-6'; 7.43, d 1H, (3.0) ABC, H-2'; 7.04, d 1H, (8.5) ABC, H-5'; 6.65, s 1H, H-8; 4.05, s 3H,  $\text{CH}_3\text{O-C6}$ ; 3.97, s 6H,  $2\text{CH}_3\text{O}$ ; 3.95, s 3H,  $\text{CH}_3\text{O}$ ; 2.40, s 3H  $\text{CH}_3\text{-CO-}$ .

**Aislamiento de 4-metil-naringenina (23).**

De una fracción polar (335.4 mg) de la cromatografía del residuo de la fase polar de la partición, eluidas con mezclas de hexano:acetona (3:7), se separó por cromatografías sucesivas, un producto cristalino de color amarillo (57.8mg) de pf 182-184°..

**I.R.**  $\nu(\text{cm}^{-1})$   $\text{CHCl}_3$

3584 (HO); 3336 C-H arom.) 2930-2854 (C-H sat.) 1641 (C=O conj); 1620, 1591, 1515, 1462 (C=C arom).

**R.M.N.  $^1\text{H}$ .**  $\delta$ (ppm) J(Hz).  $\text{CDCl}_3$

12.05, s 1H, (int  $\text{D}_2\text{O}$ ), HO-C-5; 7.38, d 2H, AA'BB', (8.6), H-2', H-6'; 6.95, d 2H, AA'BB', (8.6), H-3', H-5'; 6.0, d 1H, AB, (3.0), H-8; 5.98, d 1H, AB, (3.0), H-6; 5.80, s ancho, int  $\text{D}_2\text{O}$ ; 5.37, dd 1H, AMX, (12.9, 3.0), H-2; 3.83, s 3H,  $\text{CH}_3\text{O-C-4}$ ; 3.11, dd 1H, AMX, (17.2, 12.9), H-3<sub>b</sub>; 2.78, dd 1H, AMX, (17.2, 3.0), H-3<sub>a</sub>

El residuo de la interfase de la partición se trató con disolventes de diferente polaridad como se indica en el diagrama de separación No. 2.

**Aislamiento de 5,8-dihidroxi-4',6,7-trimetoxiflavona, pedunculina (24).**

De las fracciones polares de la cromatografía en columna sobre gel de sílice para placa de la fase soluble en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y eluida con mezclas de Hexano y AcOEt con un gradiente de polaridad, se aisló de las fracciones eluidas con

hexano-AcOEt (6:4), un producto cristalino de color amarillo, de p.f. 222-224° (hexano:acetona).

I.R.  $\nu(\text{cm}^{-1})$   $\text{CHCl}_3$

3689, 3603, 3538 (OH), 1658 (C=O conjugado), 1604, 1513, C=C aromático), 1461, 1438  $\text{CH}_3$ , 1027(C-O).

E.M. I.E. m/z

344( $\text{M}^+$ ), 345( $\text{M}^++1$ ), 339( $\text{M}^+-15$ ), 211( $\text{M}^+-15\text{-RDA}$ ) 183(RDA-28), 118 (RDA)

R.M.N.  $^1\text{H}$   $\delta(\text{ppm})$  J(Hz)  $\text{CDCl}_3/\text{DMSO-d}_6$

12.65, s 1H, int.  $\text{D}_2\text{O}$ , 7.8, d 2H, AA' BB', (8.5), H-2', H-6'; 7.0, d 2H, AA'BB', (8.5), H-3', H-5'; 6.55, s 1H, H-3; 4.10, 3.97, 2s 3H c/u,  $\text{CH}_3\text{OC}_6, \text{C}_4'$ ; 3.94, s 3H,  $\text{CH}_3\text{O-C}_7$  C8.

#### **Aislamiento de 5,7,4'-trihidroxi flavanona, Naringenina (25).<sup>79</sup>**

De la purificación en columna de una fracción proveniente de la columna por cromatografía de la fase soluble en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , y eluída con mezclas de disolventes hexano:acetona en polaridad creciente, se aisló otro compuesto cristalino de color amarillo de p.f. 251-252° (hexano:acetona).

I.R.  $\nu(\text{cm}^{-1})$   $\text{CHCl}_3$

3307 (HO); 2992-2852 (C-H sat.) 1630 (C=O conj); 1601, 1518, 1495, (C=C arom).

**E.M.**

242 ( $\text{M}^+$ ), 179 ( $\text{M}^+-93$ ), 153 ( $\text{M}^+-119$ ), 120 ( $\text{M}^+-152$ ), 91, 69.

R.M.N.  $^1\text{H}$   $\delta(\text{ppm})$  J(Hz)  $\text{CDCl}_3$

12.19, s 1H int.  $\text{D}_2\text{O}$  HO-C-5; 9.72, s 1H int  $\text{D}_2\text{O}$  HO-C-7; 8.63 s 1H int  $\text{D}_2\text{O}$  HO-C-4'; 7.39 d 2H AA' BB' (8.48), H-2', H-6'; 6.89 d 2H AA' BB' (8.48) H-3' H5'; 5.95 s ancho 2H H-8, H-6; 5.45 dd 1H (13,3) H2; 3.19 dd 1H (17,13) H3<sub>b</sub>; 2.72 dd 1H (17,3) H3<sub>a</sub>.

**Aislamiento de 5-hidroxi-4',6,7,8-tetrametoxiflavona , Gardenina B (26).**

De fracciones polares de la columna de la interfase soluble en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , eluidas con mezclas de hexano:acetona (2:8), se aisló, otro compuesto cristalino de color amarillo y de P.F. 178-179°.

**I.R.**  $\nu(\text{cm}^{-1})$   $\text{CHCl}_3$

3538 (OH), 3088 (C-H aromático) 1657 (C=O de carbonilo conjugado), 1588, 1515, 1497, (C=C de tipo aromático), 1024 (C-O).

**E.M. I.E.**

358 ( $\text{M}^+$ ), 343 ( $\text{M}^+-15$ ), 211( $\text{M}^+-15\text{-RDA}$ ), 132( $\text{M}^+-15\text{-RDA}$ ), 183, 168, 117, 89, 69.

**R.M.N.  $^1\text{H}$ .**  $\delta(\text{ppm})$  J(Hz)  $\text{CDCl}_3$

12.58, s 1H int.  $\text{D}_2\text{O}$  HO-C-5; 7.91, d 2H AA' BB' (9.00), H-2', H-6'; 7.04 d 2H AA' BB' (9.00), H-3' H5'; 6.61 s 1H H-3, 4.12 s 3H  $\text{CH}_3\text{-O}$ , 3.98 s 3H  $\text{CH}_3\text{-O}$ , 3.96 s 3H  $\text{CH}_3\text{-O}$ , 3.91 3H  $\text{CH}_3\text{-O}$ .

## VI BIBLIOGRAFIA

- 1.- Torsell, K.B.G. Natural Product CHEMISTRY. A mechanistic and biosynthetic approach to secondary metabolism. (1983) John Wiley and Sons.
- 2.- Rosenthal, G. A., Janse, D.H., Herbivores: Their Interactions with Secondary Metabolites. (1979). Academic Press.
- 3.- Mann, J., SECONDARY METABOLISM, (1987),, 303, Oxford Chemistry Series.
- 4.- Colegate, S.M., Molyneux R.J., Bioactive Natural Products. Detection, Isolation and Structural Determination. (1993) pag 1-8 CRC. Press.
- 5.- Harbone, J.B.,. *Natural Products Reports* (1997), 14, 83-98
- 6.- Harbone, J.B.,. *Natural Products Reports* (1999), 16, 509-523.
- 7.- Paton, A., Harley, R. M. & REYNOLS T. (Ed)., *Advances in Labiatae Science*, Royal Botanic Garden, Kew. (1992),
- 8.- Cantino, P.D. and Snaders, R., *Sistematic Botany* (1986), **11**(1), 163-185.
- 9.- Barberan, F.A.T. *Fitoterapia* (1986), **57**(2) 67-95.
- 10.- Ann Per, W., L angenheim, J.H.,. *Biochemical Systematics and Ecology*, (1998), **26**, 25-34.
- 11.- Zgorka, G., Glowniak, K *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* (2001), **26** 79-87.
- 12.- Tomas-Barberán and Gil M.A En Harley, R. M. & REYNOLS T. (Ed)., *Advances in Labiatae Science*, Royal Botanic Garden, Kew. (1992).
- 13.- Tomas-Barberan F. A., Gil M. A. *Revista Latinoamericana de Química*. (1990), **21** (3-4), 134-139
- 14.- Camps F., Coll, J., and Cortel A., *Revista Latinoamericana de Química* (1981), **12** (1), 18.
- 15.- Rodríguez-Hahn, B. Esquivel and J. Cárdenas. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* (1994) Wien Springer-Verlag New York.
- 16.- Lebbe C., Castillo M., Fainia F., Col J., Connolly J.D.. *Phytochemistry*, (1994), **36**(3), 735-738
- 17.- Lebbe, A., Castillo M., Connolly J.D., (1993), **34**(2), 441-444.
- 18.- Bianco A. Lamesi, S., Passacantilli, P *Phytochemistry* (1984), **23**, 121-123
- 19.- Proeva E., Koeva, J., Handjieva, N.. *Biol. Fak. Kn.* (1995), 85, 45-51  
*Chemical Abstracts* (1996), **124**. Resumen No. 50619h
- 20.- Tomas-Barberan F.A., Wollenweber, E. *Plant Systematics and Evolution* (1990), **173**, 109-118.
- 21.- Van Beek T.A., De Groot A. E.. *Recueil Des Travaux Chimiques Des Pays-Bas* (1986) **105** (12) 513-527
- 22.- Rice L.Elroy, ALLELOPATHIA, Academic Press, Inc. 2a. Ed. 1984
- 23.- Regnault-Roger, C. et. al. ,. *Journal of the Chemical Ecology*. (1993). **19**, 1233-44.



- 24.- Navarro, C., Zarzuela, A., Jimenez, J., Duarte, J., *Fitoterapia* (1989), **60**, 277-281.
- 25.- Delitheos, A. K. , Papadimitriou, C.A., Yannitsaros, A.G. *Fitoterapia* (1992), **63**(5), 441-450.
- 26.-Capone, W., Mascia, C., Spanedda,L., Chiappini, M. *Fitoterapia* (1989) **60**(1), 153-155.
- 27.- Diaz, R., Quevedo-Sarmiento, J., Ramos-Carmenzana A. *Fitoterapia* (1988), **59**(4), 329-332.
- 28.- Slavkovska, V. et. al. *Phytochemistry* (2001) **57**, 71-76
- 29.- Madsen L. H., Sorensen B., Skibsted L., Bertelsen G. *Food Chemistry* (1998), **63**, 173-180.
- 30.- Wollenweber, E., Valant-Vetschera, K.M., *Fitoterapia* (1991), **52**, 462.
- 31.- Tomas-Barberan, F.A., Husain, S.Z., Gil, M.I. *Biochemical Systematics and Ecology*, (1988), **16**, 43-46.
- 32.- Arrebola M. L., Navarro, M. C., Jimenez, J., Ocaña F. A. *Phytochemistry* (1994), **35**(1), 83-93.
- 33.- Lee, S.-J., Chung, H.-Y., Maier, G.A. C., Wood, A.R., Dixon, R.A., Mabry, T.J. *Journal Agricultural and food Chemistry* (1998), **46**, 3325-3329.
- 34.-Habtermarian S., *Journal of the Natural Products* (1997), **60**, 775-778.
- 35.-Lin Y.-M., Anderson, H., Flavin, M., Pai, Y.-H. *Journal of the Natural Products* (1997), **60**, 884-888.
- 36.- Darbour, N., Baltassat, F., Raynaud J., Pellecuer, J. *Pharm. Acta Helv.* (1990), **65**(8).
- 37.- Hajhashemi, V., Sadraei, H., Ghannadi, A.R., Mohseni, M., *Journal of ethnopharmacology* (2000), **71**, 187-192.
- 38.- Madsen, H.L., Sorensen,B., Skibsted, L.H., Bertelsen, G. *Food Chemistry* (1998), **63**(2), 173-180.
- 39.- Manriquez, V., Lebbe, A., Castillo O. Witte, *Acta Crystallographica* (1997), C53, 624-626
- 40.- Gianneto, P., Romeo, G., Aversa, M.A. *Phytochemistry*, (1979), **18**, 1203-1205.
- 41.- Gianneto, P., Romeo, G., Aversa, M.A. "A New 3,4-Secopentacyclic Triterpenoid from the Genus *Satureja*". *Phytochemistry*, (1980), **19**,437-439
- 42.- Sung H.K., Byung-Zun..A., Shi, Y.R. *Phytotherapy Research* (1998), **12**(8),
- 43.-Fang, X., McLaughlin J.L., *Fitoterapia*, **61**, 2( 1990).
- 44.- Kashiwada, Y., et. al. *Journal of Natural Products* (1998), **61**, 1090-1095.
45. Petar D. et. al. . *Phytochemistry* 58 (2001) 943-947
- 46.- Bellino, A., Venturella, P., Marceno, C. *Fitoterapia* (1980), **51**, 163-165
- 47.- Bustos, A.D., Tapia, A.A., Feresin, G.E., Ariza, L., Espinar.. *Fitoterapia*, (1996), **67**(5), 435-442.

- 48.- Velasco-Negueruela, A., Perez-Alonso, M.J., Esenarro Abarca, G., *Fitoterapia*, (1995), **66**(5), 447-461.
- 49.- Abad, M.J, Bermejo, P., Gonzales, E., Iglesias, I., Iruzum, A., Carrasco, L. *Pharmacology* (1999), 32, 499-503.
- 50.- Hernández, N.E., Tereschuk, M.L., Abdala, L.R. *Journal of ethnopharmacology* (2000), **73**, 317-322.
- 51.- Feresin G.E., Tapia, A., López, S.N., Zacchino, S.A. *Journal of ethnopharmacology* (2001), **78**, 103-107.
- 52.- Martinez, M. Las Plantas Medicinales de México (1969), Ed, Botas.
- 53.- Observación de campo
- 54.- Manjarrez Moreno, M. Tesis Esc. Nacional Ciencias Químicas, MEXICO (1952). y Manjarrez A., Iriarte J., Boletín del Instituto de Química UNAM, (1952) **IV**.
- 55.- Bernardino Jerónimo J., Jose S. Calderón Pardo,. resumen No. 158 XXXII congreso de Soc. Quím. Méx.(1996),**40**, 144-145.
- 56.- Linarez, M., E., Bye R. Tes Curativos de México Fondo de Cultura Economica (1990).
- 57.- Linares, M., E., Flores P, B., Bye, R. Selección de Plantas Medicinales de México Edit. Limusa (1988).
- 58.-Nakanishi, K. Infrared Absorption Spectroscopy (Practical) Holden-Day, San Francisco & Nankodo Company Limited (1962).
- 59.- Mabry, T.J., Markham, K.P., the Systematics identification of flavonoids. Springer-Verlag Nueva York (1970)
- 60.- Pretsch, E., Clerc, T., Seibl, J., Simon W., Tablas para la Elucidación Estructural de los Compuestos Orgánicos por Métodos Espectroscópicos. Ed. ALHAMBRA (1985).
- 61.- Markham, K.R, Ternal B.. *Tetrahedron* (1976) **32**, 2607-2612,
- 62.- Valverde S., Escudero J., López C., Rabanal R.M. *Journal of Natural Products* (1985) **48**, 128-131.
- 63.- Cruz Diaz Patricia Maribel TESIS (1990), UNIVERSIDAD VERACRUZANA.
- 64.- Di Mauro, A., Fallico, B., Passerini, A., Rapisarda, P., Maccarone, E. *Journal of Agricultural, and Food chemistry*, (1999), **47**, 4391-4397
- 65.- Da Silva E. J.A., Oliveira, A.B., Lapa J.A. *Journal Pharm. Pharmacol.* (1994), **46**, 118-122 (**Medline**)
- 66.- Suarez, J., Herrera, M.D., Merhuenda E. *Phytoterapy Reseach* (1996), **18**, 616-618.
- 67.- Galati, E.M., Trovato, A., Kirjavainen, S., Forestieri, A.M., Rossito, A., Manforte, M.T.. *Farmaco* (1996), **51**(3), 219-221 (**Medline**)
- 68.- Esteban M.A., Gonzalez, C.I., Macias, F.A., Massanet, G.M., Rodriguez L.F. *Phytochemistry* (1986), **25**(6), 1502-1504.
- 69.- Horie, T., Kawamura Y., Yamada T. *Phytochemistry* (1989) **28**, 2869-2871

- 70.- Horie, T., Kawamura Y., Tsukamaya. M., Yoshizakui S.. *Chemical of the Pharmaceutical Bulletin* (1989), **37**(5), 1216-1220.
- 71.- Liu Y., Ho D.K., Cassady J. M., *Journal of the Natural Products* (1992), **55**(3) 357-363.
- 72.- Laduke *American Journal Botany* (1983) **69**.
- 73.- Venturella P., Bellino A., Marino M.L.. *Heterocycles* (1980), **14**(12) 1979-1983
- 74.- Venturella P., Bellino A Papucci A., *Heterocycles*, (1977), **6**(3). 267-269
- 75.- Voirin B., Bayet C. *Phytochemistry* (1992) **31**(7), 2299-2304.
- 76- Kingston, D.G.I., Roa, M.M., Zucjker W.V. *Journal of The Natural Products* (1979), **45**(5), 496-499.
- 77.- Chen, J., Montanri, A.M., Widmer, W.W. *Journal Agricultural and food Chemistry* (1997), **45**, 364-368.
- 78.- Manthey, J.A., Grohmann, K., Montanari, A.M., Ash, K., Manthey C.L. *Journal of The Natural Products* (1999), **62**, 441-444.
- 79.- Ribeiro, A., Piló-Veloso, D. T *Journal of The Natural Products* (1997), **60**, 836-838.