

ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LAS HOJAS DE *BOWDICHIA VIRGILIOIDES*

Juan Carlos Ticona^a, David Gutierrez, Efraín Salamanca^a, Grace Ruiz^a, Crispín Paredes^a, Enrique Udaeta^a, Nayra Rodríguez^b, Gabriel García^b, Isabel López^b, Antonio Jiménez^b, Pedro Alvarado^c, Rogelio Chuqui^d, Ninoska Flores^a, *Alberto Giménez^a

^aInstituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas-IIFB, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. Universidad Mayor de San Andrés, Casilla 3239, La Paz - Bolivia. ^bInstituto Universitario de Bioorgánica "Antonio González", Universidad de La Laguna, Tenerife, Islas Canarias, España. ^cComunidad de Macahua, Provincia A. Iturrealde, ^dComunidad de Santa Rosa de Maravilla, Provincia A. Iturrealde, La Paz-Bolivia.

*Corresponding author: agimenez @megalink.com

Key words: *Bowdichia virgilioides*, hojas, *P. falciparum*, terpenos tipo lupano, oleanano y esteroides.

ABSTRACT

Bowdichia virgilioides, is a medicinal plant used by the Tacana ethnic group. The leaves of this tree were collected, during the dry season, in the Abel Iturrealde province, Bolivia. The dry and pulverized leaves were macerated with methylenechloride, and the raw extract did not show activity at 10µg/mL, against *Plasmodium falciparum* (strain F32, sensible to chloroquine). Chromatographic studies of the crude extract and spectroscopical analysis of the isolated substances allowed us to identify: Lupeol (1), Lupenone (2), β-sitosterol (3), stigmaterol (4) and β-amyrine (5), as the main triterpenes components along with non identified fatty acids.

RESUMEN

Bowdichia virgilioides, es una planta medicinal utilizada por la etnia Tacana, las hojas de este árbol fueron colectadas, en época seca, en la Prov. Abel Iturrealde, Bolivia. Las hojas secas y pulverizadas fueron sometidas a maceración con diclorometano y el extracto crudo no presentó actividad antipalúdica a dosis de 10µg/mL, frente a *Plasmodium falciparum* (cepa F32, sensible a la cloroquina). Estudios cromatográficos del extracto crudo y análisis espectroscópicos de las sustancias aisladas nos han permitido identificar: Lupeol (1), Lupenona (2), β-sitosterol (3), estigmaterol (4) y β-amirina (5), como los principales componentes triterpénicos acompañados de ácidos grasos no identificados.

INTRODUCCIÓN

Bowdichia virgilioides (leguminosae, subfamilia Papilionoideae, tribu soforeae), es un árbol que crece en el trópico de Sud América y se expande

desde Venezuela al este de Brazil¹. La corteza de la planta es empleada para el tratamiento de la artritis, diabetes, como antirreumático y para la diarrea². En Bolivia en la Etnia Tacana *Bowdichia virgilioides* es conocida como *Nuriri aquí* o *chiriguano* y la corteza es utilizada para la disentería, paludismo y espundia en forma de cocción o cataplasma³.

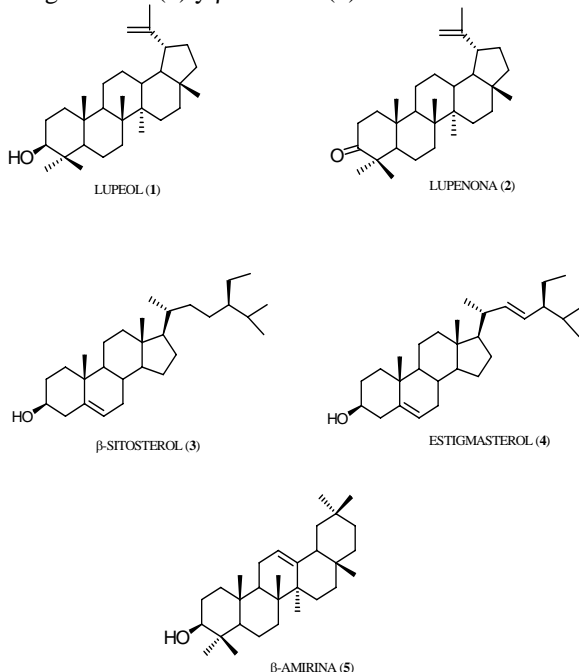
Estudios fitoquímicos anteriores de corteza y de raíz describen metabolitos secundarios de interés desde el punto de vista químico por su novedad estructural, como desde el punto de vista farmacológico por las diversas actividades biológicas. Entre los metabolitos aislados se destacan alcaloides tipo piperidina^{4,5} ormosia⁶, triterpenos⁷, derivados de dihidrobenzofuranos⁸, flavonoides, como las isoflavonoides^{7,9} y aceites esenciales¹⁰.

El presente trabajo describe el aislamiento y la caracterización de los principales componentes presentes en extractos orgánicos de hojas de *Bowdichia virgilioides*, de los cuales se aislaron cinco triterpenos, dos de la serie del esqueleto del lupano: lupeol (1) y lupenona (2); dos de la serie de los ciclopentanos perhidrofenantrenos: β-sitosterol (3) y estigmaterol (4), y uno de la serie del oleano: β-amirina (5); este trabajo constituye la primera descripción de la presencia de este tipo de metabolitos en las hojas del género *Bowdichia*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las hojas secas y molidas de *Bowdichia virgilioides* fueron sometidas a una extracción con CH₂Cl₂, obteniéndose 10.5g de extracto crudo al evaporar el solvente. Este fue evaluado frente a parásitos de *Plasmodium falciparum* en estadio esquizonte observándose que el extracto

crudo no presenta inhibición de crecimiento de los parásitos a una concentración de 10µg/mL. El extracto orgánico crudo fue sometido a un fraccionamiento mediante cromatografía en columna, obteniéndose diez fracciones, las fracciones fueron sometidas a purificación por diferentes técnicas cromatográficas como: cromatografía de exclusión molecular sobre Sephadex LH-20, cromatografía en capa fina y preparativa que permitieron el aislamiento y la identificación por métodos espectroscópicos de lupeol (**1**), lupenona (**2**), β-sitosterol (**3**), estigmasterol (**4**) y β-amirina (**5**).



El compuesto (**1**) muestra en su espectro de masas un ión molecular a $m/z=426$, correspondiente a una fórmula molecular $C_{30}H_{50}O$, observándose como fragmentos más significativos a $m/z=411$ correspondiente a la pérdida de un metilo [M^+-CH_3] y $m/z=411$ [$M^+-CH_3-H_2O$] pérdida de un metilo y agua. En su espectro de RMN- 1H presento seis señales como singletes a δ 0.77 (3H, s, Me-24), 0.81 (3H, s, Me-28), 0.86 (3H, s, Me-25), 0.93 (3H, s, Me-27), 0.95 (3H, s, Me-23) y 1.02 (3H, s, Me-26) y que integra cada una para tres protones; a campos mas bajos otro singlete a δ 1.67 (3H, s, Me-30) asignable a un metilo sobre doble enlace; un multiplete de base ancha a δ 1.94 (2H, m, H-21); un doble doblete a δ 2.4 (1H, dd, $J=11.01$ y 5.7Hz, H-19) asignable a un protón metínico; un doble doblete a δ 3.20 (1H, dd, $J=10.9$ y 5.3Hz, H-3) asignable a un protón geminal a un alcohol secundario; dos dobletes correspondiente a protones de un metileno exocíclico a δ 4.55 (2H, d, $J=2.0$ Hz, H-29) y 4.67 (2H, d, $J=2.0$ Hz, H-29). Estos datos comparados con los reportados en la

bibliografía confirmaron la estructura de **1** como **lupeol**¹¹.

El compuesto (**2**) muestra en su espectro de masas un ión molecular a $m/z=424$, correspondiente a una fórmula molecular $C_{30}H_{48}O$, se observaron fragmentos significativos a $m/z=409$ [M^+-CH_3] y $m/z=205$ [$M^+-C_{16}H_{27}$] correspondiente a las principales fragmentaciones de un esqueleto de lupano¹². En su espectro de RMN- 1H presento seis señales como singletes, que integra cada una para tres protones, a δ 0.78 (3H, s, Me-24), 0.90 (3H, s, Me-28), 0.93 (3H, s, Me-25), 0.98 (3H, s, Me-27), 1.03 (3H, s, Me-26), 1.53 (3H, s, Me-23), un singlete a δ 1.68 (3H, s, Me-30) asignable a un metilo sobre doble enlace; un triplete a δ 2.37 (2H, t, $J=5.3$ Hz, H-2); dos dobletes correspondiente a protones de un metileno exocíclico a δ 4.57 (2H, d, $J=2.0$ Hz, H-29) y 4.68 (2H, d, $J=2.0$ Hz, H-29). Estos datos comparados con los reportados en la bibliografía confirmaron la estructura de **2** como **lupenona**¹³.

El compuesto (**3**) muestra en su espectro de masas un ión molecular a $m/z=414$, correspondiente a una fórmula molecular $C_{29}H_{50}O$, se observaron fragmentos significativos a $m/z=396$ pérdida agua [M^+-H_2O] y $m/z=381$ [M^+-CH_3O] correspondiente a la pérdida de un grupo metilo y agua. En su espectro de RMN- 1H presento seis señales la región de los metilos; dos singletes correspondientes a metilos angulares a δ 0.69 (3H, s, Me-18) y δ 1.00 (3H, s, Me-19); tres dobletes característicos de metilos de la cadena lateral a δ 0.82 (3H, d, $J=6.3$ Hz, Me-27), 0.84 (3H, d, $J=6.5$ Hz, Me-26), 0.93 (3H, d, $J=6.4$ Hz, Me-21) y un triplete a δ 0.86 (3H, t, $J=2.7$ Hz, Me-29); un multiplete a δ 3.54 (1H, m, H-3) asignable a un protón geminal a un alcohol; un doblete de protón vinílico a δ 5.35 (1H, d, $J=4.2$ Hz, H-6). Estos datos comparados con los reportados en la bibliografía confirmaron la estructura de **3** como **β-sitosterol**.¹¹

El compuesto (**4**) muestra en su espectro de masas un ión molecular a $m/z=412$, correspondiente a una fórmula molecular $C_{29}H_{48}O$. En el espectro de masas de baja resolución se observaron fragmentos significativos a $m/z=394$ pérdida de agua [M^+-H_2O] y $m/z=379$ [M^+-CH_5O]. En su espectro de RMN- 1H presento dos señales como singletes a δ 0.69 (3H, s, Me-18) y δ 1.00 (3H, s, Me-19) correspondientes a los dos metilos angulares; señales para cuatro metilos uno como triplete a δ 0.82 (3H, s, $J=6.3$ Hz, Me-29) y tres como

dobletes a δ 0.86 (3H, d, $J=7.1$ Hz, Me-27), 0.87 (3H, d, $J=2.7$ Hz, Me-26) y δ 1.02 (3H, d, $J=7.0$ Hz, Me-21), δ 1.63 (2H, m, H-1), δ 2.31 (2H, m, H-2); un multiplete a δ 3.56 (1H, m, H-3) asignable a un protón del alcohol terciario; dos doblete de dobletes a δ 5.02 (1H, d, $J=9.3$ y 16.6Hz, H-23) y δ 5.18 (1H, d, $J=9.3$ y 16.6Hz, H-22) y un doblete a δ 5.35 (1H, d, $J=4.2$ Hz, H-6). Estos datos comparados con los reportados en la bibliografía confirmaron la estructura de **4** como **estigmasterol**¹⁴.

El compuesto (**5**) muestra en su espectro de masas un ión molecular a $m/z=426$, correspondiente a una fórmula molecular $C_{30}H_{50}O$. En el espectro de masas de baja resolución se observaron como fragmentos más significativos a $m/z=411$ [M^+-CH_3] y $m/z=393$ [M^+-CH_2O]. En su espectro de RMN-¹H presenta 7 señales como singuletes a δ 0.78 (3H, s, Me-24), 0.82 (3H, s, Me-28), 0.86 (6H, s, Me-29 y Me-30), 0.93 (3H, s, Me-25), 0.95 (3H, s, Me-23), 0.99 (3H, s, Me-26) y 1.12 (3H, s, Me-27), un multiplete a δ 3.22 (1H, m, H-3) asignable a un protón del alcohol terciario, un triplete a δ 5.17 (1H, t, $J=12$ Hz, H-12). Estos datos comparados con los reportados en la bibliografía confirmaron la estructura de **5** como **β -amirina**.¹³

Este trabajo constituye el primer estudio de las hojas de *Bowdichia virgilioides*, aislándose terpenos de la serie del lupano, oleano y esteroides; estudios reportados por Bravo *et al.*¹⁵ de la corteza demuestran la presencia de alcaloides tipo ormosia, ormosanina y homoormosanina, estos datos nos muestran la presencia de diferente tipo de metabolitos en la corteza y en las hojas, alcaloides en la corteza y triterpenos en las hojas.

EXPERIMENTAL

Estudios espectroscópicos

Los espectros de RMN ¹H y RMN ¹³C fueron obtenidos en espectrómetros BRUKER AVANCE 300 Y AMX500, utilizando programas de COSY, DEPT, HMQC, HMBC Y ROESY. Para la realización de los experimentos los productos fueron disueltos en CDCl₃. Los espectros de masas de baja resolución se realizaron en espectrómetros HEWLETT-PACKARD, modelo 5995 y VGMICROMASS ZAB-2F. La determinación de las fórmulas moleculares de fragmentos y de iones moleculares fueron realizados en un espectrómetro VGMICROMASS ZAB-2F (potencia de ionización de 15 o 70 CV), y FISIONS INSTRUMENTS modelo VG Autospec. Los estudios espectroscópicos fueron

realizados en el Instituto Universitario de Bioorgánica "Antonio González" de la Universidad de La Laguna, Tenerife, Islas Canarias, España.

Estudios cromatográficos

Las técnicas que se utilizaron para el aislamiento y purificación de los metabolitos fueron técnicas cromatográficas tales como: cromatografía de exclusión molecular en columna empacada con Sephadex LH-20 (Pharmacia), suspendida y eluida con la mezcla A: *n*-hexano-CHCl₃-MeOH (2:1:1); cromatografía líquida al vacío (CLV) con gel de sílice de 0.063-0.020 mm de diámetro, eluida con diferentes mezclas de AcOEt, *n*-hexano, CH₂Cl₂, (Me)₂CO, Et₂O; cromatografía en capa fina (CCF) utilizando placas cromatográficas con soporte de gel sílice con fluorescencia UV 254 nm (Macherey-Nagel) de 25 μ m de espesor con base de aluminio; cromatografía en capa fina preparativa en placas de 1 mm de espesor, tipo G1510/LS254.

Colección del material vegetal

Las hojas y corteza de *Bowdichia virgilioides* (Papilionaceae) fueron colectadas en Macagua, provincia Abel Iturralde, del departamento de La Paz, en mayo y septiembre del 2006 (Sud 13°48'337 y al Oeste 68°06'707 a una altura de 360 m.s.n.m.). Muestras de herbario fueron depositadas en el Herbario Nacional de La Paz y su identificación taxonómica se realizó mediante comparación, con las muestras de vaucher (GB1734, GB1820 y GB1831) del Herbario Nacional de La Paz, Bolivia.



Bowdichia virgilioides (Papilionaceae)

Foto: Leslie Cayo, Madidi.

Preparación del extracto

Las hojas secas (753g) y pulverizadas, fueron sometidos a una maceración con CH₂Cl₂ (1:10) durante 72 horas a temperatura ambiente. El residuo obtenido fue filtrado, evaporado a 40°C y llevado a sequedad, obteniéndose 10.5g de extracto crudo, 1.39% con relación al material seco.

Separación y aislamiento de los componentes del extracto

El extracto crudo, fue fraccionado por cromatografía en columna, utilizando como sistema de elusión con mezclas de *n*-hexano:AcOEt en orden creciente de polaridad, obteniéndose 10 fracciones (**F1-F10**). La fracción (**F2**) fue recromatografiada en columna de Sephadex LH-20 suspendida y eluída con la mezcla A, obteniéndose 4 fracciones. De la fracción F2-2 se aisló **lupenona** (71.8mg). La fracción F2-3 fue separada mediante cromatografía en placa preparativa utilizando como sistema de elusión *n*-hexano-eter etílico (8:2), aislándose **lupenona** con Rf=0.36 (0.8mg, un total de 72.6mg 0.69% del extracto crudo).

La fracción (**F4**) fue recromatografiada en columna en Sephadex LH-20 suspendida y eluída con la mezcla A, obteniéndose 5 fracciones. La fracción F4-3 fue purificada mediante cromatografía en placa preparativa con una mezcla de *n*-hexano-EtOAc (85:15), obteniéndose **β -sitosterol** con un Rf=0.19 (11mg, 0.10% del extracto crudo). Los componentes de la fracción F4-4 fueron separados mediante cromatografía en columna sobre sílica gel con sistemas de elusión de *n*-hexano-acetona con polaridad creciente, obteniéndose 5 fracciones. De la fracción F4-4.1 se aislaron **lupeol** (44.6mg) y **β -amirina** (15.4mg). La fracción F4-4.2 fue separada mediante cromatografía en placa preparativa con *n*-hexano-acetona (75:25) obteniéndose **β -sitosterol** (4.6mg) con un Rf=0.55 y **estigmasterol** con un Rf=0.45 (0.8mg). La fracción F4-4.4 fue purificada mediante cromatografía en placa preparativa con *n*-hexano-acetona (75:25) obteniéndose **lupenona** con un Rf=0.42 (11.7mg).

La fracción 6 (**F6**) fue recromatografiada en columna en Sephadex LH-20 suspendida y eluída con la mezcla A, obteniéndose 3 fracciones. La fracción F6-2 fue purificada por cromatografía en columna sobre sílica gel con una mezcla de *n*-hexano-éter etílico en polaridad creciente, obteniéndose nueve fracciones, y de las cuatro últimas se obtuvo **β -sitosterol** (18.4mg) y **estigmasterol** (3.3mg).

Compuesto (**1**) **lupeol**: 44.0mg, 0.42% del extracto crudo, EIMS (rel. int.) m/z 426 (62.2%), $C_{30}H_{50}O$, a $m/z=411$ (15.8%) $[M^+-CH_3]$ y $m/z=411$ (15.8%) $[M^+-CH_3O]$. RMN- 1H ($CDCl_3$, 300 MHz), δ 0.77 (s, Me-24), 0.81 (s, Me-28), 0.86 (s, Me-25), 0.93 (s, Me-27), 0.95

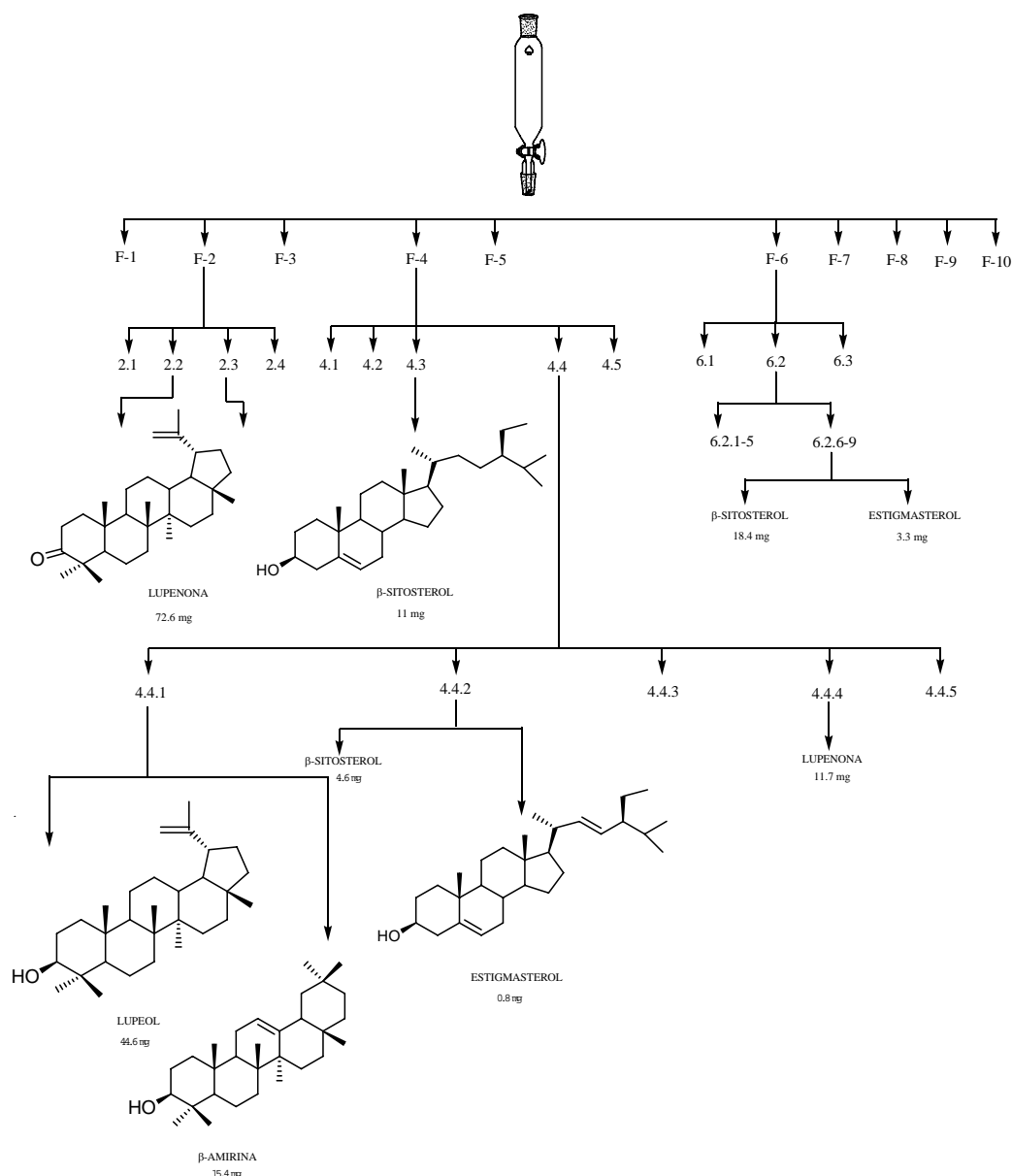
(s, Me-23) y 1.02 (s, Me-26) δ 1.67 (s, Me-30); δ 1.94 (2H, m, H-21); δ 2.4 (1H, dd, $J=11.01$ y 5.7Hz, H-19); δ 3.20 (1H, dd, $J=10.89$ y 5.3Hz, H-3); δ 4.55 (2H, d, $J=2.0$ Hz, H-29) y 4.67 (2H, d, $J=2.0$ Hz, H-29).

El compuesto (**2**) **lupenona**: 83.3mg, 0.79% del extracto crudo EIMS (rel. int.) m/z 424 (0.7%), $C_{30}H_{48}O$, $m/z=409$ (0.27%) $[M^+-CH_3]$ y $m/z=205$ (72.0%) $[M^+-C_{18}H_{27}]$. RMN- 1H ($CDCl_3$, 300 MHz), δ 0.78 (3H, s, Me-24), 0.90 (3H, s, Me-28), 0.93 (3H, s, Me-25), 0.98 (3H, s, Me-27), 1.03 (3H, s, Me-26), 1.53 (3H, s, Me-23), δ 1.68 (3H, s, Me-30); δ 2.37 (2H, t, $J=5.3$ Hz, H-2); δ 4.57 (2H, d, $J=2.2$ Hz, H-29) y 4.68 (2H, d, $J=2.0$ Hz, H-29).

Compuesto (**3**) **β -sitosterol**: 34.0mg, 0.32% del extracto crudo, EIMS (rel. int.) $m/z=414$ (78.8%), $C_{29}H_{50}O$, $m/z=396$ (40.4%) $[M^+-H_2O]$ y $m/z=381$ (20.7%) $[M^+-H_2O-CH_3]$. RMN- 1H ($CDCl_3$, 300 MHz), δ 0.69 (3H, s, Me-18) y δ 1.00 (3H, s, Me-19); δ 0.82 (3H, d, $J=6.3$ Hz, Me-27), 0.84 (3H, d, $J=6.5$ Hz, Me-26), 0.93 (3H, d, $J=6.4$ Hz, Me-21), δ 0.86 (3H, t, $J=2.7$ Hz, H-29); δ 3.54 (1H, m, H-3); δ 5.35 (1H, d, $J=4.2$ Hz, H-6).

Compuesto (**4**) **estigmasterol**: 4.1mg, 0.04% del extracto crudo, EIMS (rel. int.) m/z 412 (39.2%), $C_{29}H_{48}O$, m/z 394 (6.52%) $[M^+-H_2O]$ y m/z 379 (4.02%) $[M^+-H_2O-CH_3]$. RMN- 1H ($CDCl_3$, 300 MHz), δ 0.69 (3H, s, Me-18) y δ 1.00 (3H, s, Me-19); δ 0.82 (3H, t, $J=6.3$ Hz, Me-29), δ 0.86 (3H, d, $J=7.1$ Hz, Me-27), 0.87 (3H, d, $J=2.7$ Hz, Me-26) y δ 1.02 (3H, d, $J=7.0$ Hz, Me-21), d 1.63 (2H, m, H-1), d 2.31 (2H, m, H-2), δ 3.56 (1H, m, H-3), δ 5.02 (1H, dd $J=16.6$ y 9.3Hz, H-23) y δ 5.18 (1H, dd, $J=16.6$ y 9.3Hz, H-22), δ 5.35 (1H, d, $J=4.2$ Hz, H-6).

Compuesto (**5**) **β -amirina**: 15.4mg, 0.15% del extracto crudo, EIMS (rel. int.) $m/z=426$, $C_{30}H_{50}O$, $m/z=411$ (2.1%) $[M^+-CH_3]$ y $m/z=393$ (0.5%) $[M^+-CH_3O]$. RMN- 1H ($CDCl_3$, 300 MHz): δ 0.78 (3H, s, Me-24), 0.82 (3H, s, Me-28), 0.86 (6H, s, Me-29 y Me-30), 0.93 (3H, s, Me-25), 0.95 (3H, s, Me-23), 0.99 (3H, s, Me-26) y 1.12 (3H, s, Me-27), δ 3.22 (1H, m, H-3), δ 5.17 (1H, t, $J=12$ Hz, H-12).



Esquema 1. Aislamiento de los metabolitos de *Bowdichia virgilioides*.

Actividad antiplasmódica

El extracto (2mg) disuelto en DMSO (200 μ L) y de esta se realizan las respectivas diluciones para obtener una concentración de 10 μ g/mL. Los controles fueron DMSO en dilución 1:100 en RPMI para el control negativo y Cloroquina como control positivo a las concentraciones de 10, 100, 1000 nM

Preparación de la placa.

En cada pozo se colocan 100 μ L de glóbulos rojos con un hematocrito del 2% (RPMI con suero o plasma al 20%), y una parasitemia del 1% (los parásitos deben de estar en estadio anillo en su mayoría, no se toman en cuenta los otros estadios), y luego se añaden las concentraciones seriales de las drogas (dando un volumen final de 200 μ L), esta placa se incubaba a 37°C por el lapso de 48hrs. Por último se

observó en el microscopio, con lente de inmersión X 100, contando tanto glóbulos rojos no infectados (GRL) como infectados (GRI), para así obtener el % de inhibición. El cálculo para hallar la Concentración Inhibitoria del 50% en la maduración de los esquizontes (CI₅₀), se hizo por el método gráfico mediante el programa Cricket Graph 1.3, considerándose como activos aquellos que presentaron un CI₅₀ menor a 10 μ g/mL.

AGRADECIMIENTOS

A la AECI Programa Intercampus (PCI-Iberoamerica) de Cooperación Interuniversitaria 2007 por el financiamiento del proyecto (PCI A/4954/07). Al Programa ASDI-SAREC-UMSA proyecto Enfermedades Infecciosas. A la Red RIBIOFAR del CYTED.

Al CIPTA, las comunidades de Santa Rosa de Maravilla y Macahua, por el acceso a las especies medicinales.

A la Facultad de Ciencias Farmacéuticas-Bioquímicas de la Universidad Mayor de San Andrés.

REFERENCIAS

- ¹ POLHILL, R.M. Papilionoideae, In *Advances in Legume Systematics Part 1*, Royal Botanic Gardens, Eds. Raven, 1981, pp 191-208.
- ² CORREIA, M. P. *Diccionario das plantas Úteis do Brasil*, Eds. Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, Brasil, 1984, 6-VI, p 149.
- ³ BOURDY, G., GIMENEZ, A. Y OTROS. "Tacana: Ecuánasha aquí, ecuanasha id'rene cuana, me schanapaque" (Tacana: Conozcan nuestros árboles, nuestras hierbas). Editores: UMSA: IIFB-IIQ-IBBA; FONAMA-EIA; IRD. Eds. Plural, La Paz, Bolivia, 1999, pp 11-496.
- ⁴ TORRENEGRA, R., BAUEREISS, P., ACHENBACH, H. *Phytochemistry*, 1989, **28**, 2219.
- ⁵ MARINHO, L. C., DA CUNHA, C. M. T. M., THOMAS, G., BARBOSA-FILHO, J. M. *Fitoterapia*, 1994, **65**, 475.
- ⁶ TORRENEGRA, R., ESCARRIA, S., BAUEREISS, P., ACHENBACH, H. *Planta Médica*, 1985, **3**, 276.
- ⁷ ARRIAGA, A. M. C., GOMES, G. A., BRAZ-FILHO, R. *Fitoterapia*, 2000, **71**, 211.
- ⁸ MELO, F. N. NAVARRO, V. R., DA SILVA, M. S., DA-CUNHA, E. V. L., BARBOSA-FILHO, J. M., BRAZ-FILHO, R., *Natural Product Letters*, 2001, **15**, 261.
- ⁹ VELOZO, L. S. M., DA SILVA, B. P., BERNARDO, R. R., PARENTE, J. P. *Phytochemistry*, 1999, **52**, 1473.
- ¹⁰ ARRIAGA, A. M. C., MACHADO, M.I.L., GOMES, G.A., CRAVEIRO, A. A. *Journal of Essential Oil Research*, 1998, **10**, 205.
- ¹¹ BRAVO, J.A. "Étude chimique et biologique des métabolites de six plantes boliviennes á activité antiparasitaire, antibactérienne et antifongique", Thèse doctorale, 1999, pp 163-164, 215-217.
- ¹² BUDZIKIEWICZ H., DJERASSI C., WILLIAMS D.H. *Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry. Steroids, terpenoids, sugars, and miscellaneous classes*. San Francisco: Holden-Day, 1964, **2**.
- ¹³ VIQAR UDDIN AHMAD, ATTA-UR-RAHMAN. *Handbook of Natural Products Data. Pentacyclic Triperpenoids*. Eds., Elsevier, Amsterdam-Netherlands, 1994, **1, 3**, pp 21-22;1029-1030.
- ¹⁴ BRAVO, J.A. *Saponines de Myrsine coriacea*. Thèse de Master Université de Reims, 1993, p 12.
- ¹⁵ BRAVO, J.A., LAVAUD, C., BOURDY, G., DEHARO, E., GIMÉNEZ, A., SAUVAIN, M. *Revista Boliviana de Química*, 2002, **19**, 12.