

Isolement, Identification Et Activite Antifongique De Deux Sesquiterpenes D'*Asteriscus Graveolens* Subsp. Odorus (Schousb.) Greuter

Hakim Alilou

Bouchaib Bencharki

Laboratoire d'Agroalimentaire et Santé, Faculté des Sciences et Techniques, Université Hassan 1er, BP 577 Route de Casablanca, Settat, Maroc.

Mohammed Akssira

Laboratoire de Chimie Physique et Chimie Bioorganique, FST, Université Hassan II Mohammadia-Casablanca. BP 146, Mohammadia 20800, Maroc.

Lalla Mina Idrissi Hassani

Laboratoire de Biotechnologies Végétales, Département de Biologie, Faculté des Sciences Université Ibn Zohr, BP 28/S-Dakhla, Agadir 80000, Maroc.

Noureddine Barka

Laboratoire des Sciences des Matériaux, des Milieux et de la Modélisation (LS3M), Faculté Polydisciplinaire de Khouribga, BP. 145 Khouribga, Morocco

doi: 10.19044/esj.2016.v12n33p112 [URL:http://dx.doi.org/10.19044/esj.2016.v12n33p112](http://dx.doi.org/10.19044/esj.2016.v12n33p112)

Abstract

Two sesquiterpenes of *Asteriscus graveolens* subsp. *odorus*, have been extracted, separated, purified and identified by NMR and IR: the naupliolide and asteriscunolide 3c.

The valuation of these compounds is part of the search for a preventive approach of integrated control to reduce significantly the use of pesticides and especially the fungicide ones. The results revealed a strong inhibitory effect on naupliolide against *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* and *Penicillium expansum* dice concentration of 200 ppm. The asteriscunolide 3c showed a remarkable effect against *Botrytis cinerea* from the concentration of 150 ppm.

Keywords: Antifungal activity, *Asteriscus graveolens* subsp. *odorus*, pathogens fungi, Sesquiterpenes

Résumé

Deux sesquiterpènes d'*Asteriscus graveolens* subsp. *odorus* ont fait l'objet d'une extraction, séparation, purification et identification par RMN et IR : le naupliolide et l'asteriscunolide 3c.

La valorisation de ces deux molécules s'inscrit dans le cadre de la recherche d'une démarche préventive de lutte intégrée visant à la réduction significative de l'utilisation des pesticides et en particulier les fongicides. Les résultats obtenus ont révélé un fort effet inhibiteur du naupliolide sur *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum* dès la concentration de 200 ppm. L'asteriscunolide 3c a montré un effet remarquable sur *Botrytis cinerea* à partir de la concentration de 150 ppm.

Mots clés : Activité antifongique, *Asteriscus graveolens* subsp. *odorus*, Champignons pathogènes, Sesquiterpènes

Introduction

De nos jours, les produits naturels sont une source importante pour la recherche de nouveaux composés actifs contre de nombreuses maladies. L'utilisation thérapeutique des plantes est partie intégrante des traditions de toutes les cultures. La valorisation médicinale de ces pratiques passe notamment par l'isolement et l'identification de nouvelles molécules.

Au cours des vingt dernières années, une attention considérable a été donnée au genre *Asteriscus* et principalement aux sesquiterpènes lactones. Les asteriscunolides (3a, 3b, 3c et 3d) ont été isolés à partir des parties aériennes d'*Asteriscus aquaticus* (San Feliciano et al. 1982 ; 1984 ; 1985a et b), *Asteriscus graveolens* (El-Dahmy et al. 1985), *Asteriscus sericeus* (Jakupovic et al. 1987) et *Asteriscus vogelii* (Rauter et al. 2001). Les asteriscunolides et leurs hydroxyacides libres ont été aussi obtenus de l'extrait de *Nauplius intermedius* (Bohlmann & Pauls, 1992). D'autres lactones sesquiterpènes comme l'asteriscanolide et l'aquatolide ont été obtenus à partir de l'extrait d'*Asteriscus aquaticus* (San Feliciano et al. 1985 a et b, 1989). *Asteriscus graveolens* a été reconnu pour son activité antimicrobienne et hypoglycémiant (Ahmed, 1992). Quant aux extraits des feuilles et des fleurs d'*Asteriscus graveolens* subsp. *odorus*, ils sont reconnus par leurs activités antifongiques contre *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum* (Alilou et al. 2007 ; 2013).

Dans le but de rechercher les composés actifs dotés de propriétés antifongiques, nous avons purifié et identifié les sesquiterpènes majoritaires d'*Asteriscus graveolens* subsp. *odorus*, selon le protocole présenté par Akssira et al. (2006). La valorisation de ces molécules afin de mieux cerner leurs effets sur les champignons pathogènes de post récolte semble intéressante. À cet effet, deux molécules ont été testées à savoir le

naupliolide, qui est une nouvelle molécule identifiée par Akssira et *al.* (2006) et qui n'a été jamais étudiée de point de vue activité biologique, et l'asteriscunolide 3c. Cette dernière est le précurseur de biosynthèse de naupliolide. L'activité antifongique a concerné les champignons : *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum* et *Botrytis cinerea*.

Matériel et méthodes

Matériel végétal

L'appareil végétatif d'*Asteriscus graveolens* subsp. *odorus* a été récolté de la région d'Agadir durant le mois d'avril (2015) de manière aléatoire. Cette plante constitue un patrimoine local floristique très important qui n'est en grande partie décrit que d'un point de vue botanique. Un spécimen de cette plante a été déposé à l'herbier de la Faculté des Sciences d'Agadir (Université Ibn Zohr, Agadir, Maroc) après identification par le Professeur B. CHEBLI à l'École nationale des sciences appliquées d'Agadir (Maroc). La plante a été ensuite séchée à l'ombre, à l'abri de l'humidité et broyée au moulin électrique jusqu'à obtention d'une poudre.

Extraction et fractionnement

Après extraction chloroformique de 1 kg de matériel végétal par soxhlet, un décirage a été effectué à une température de -20°C pendant une nuit en utilisant le chloroforme et le méthanol bouillant. Ensuite, une extraction par le dichlorométhane a été faite suivi d'un lavage avec une solution de Na_2CO_3 à 10% qui a donné deux phases : une phase organique et une phase aqueuse. Cette dernière a été acidifiée jusqu'à $\text{pH}=2$ (HCl à 50%) puis extraite par CH_2Cl_2 pour avoir une phase organique et une phase aqueuse. La phase organique a été lavée avec $\text{NaCl}/\text{H}_2\text{O}$, séchée avec Na_2SO_4 et évaporée pour avoir une phase organique acide. La phase organique a été aussi le résultat du lavage par Na_2CO_3 à 10%. Cette phase a subi le même protocole de la phase organique acide. La phase organique neutre obtenue de cette dernière extraction à l'aide du dichlorométhane a été pesée avant de passer au fractionnement par chromatographie sur colonne.

L'extrait neutre (37 g) a été fractionné sur une colonne ouverte de gel de silice après élution par un mélange hexane-acétate d'éthyle de polarité croissante. La chromatographie sur colonne a donné quatre fractions importantes dont on a récupéré seulement deux, selon la méthode préconisée par Akssira et *al.* (2006) pour obtenir :

- La fraction 1 (1,37g) éluee avec $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOAc}$ (9:1) donnant le naupliolide (20 mg)
- La fraction 2 (3,5 g) éluee avec l'hexane/ Et_2O (1:1) pour donner l'asteriscunolide 3c (345,4 mg).

Identification spectrale des produits isolés

Les spectres infrarouges ont été effectués après avoir mélangé les produits purifiés dans des plaques de NaCl, par un spectrophotomètre de type Génisis Series FTIR de Mattson.

L'analyse GC-MS a été faite sur un spectromètre du thermomass (modèle trio 1000) couplé à un chromatographe en phase gazeuse. Le chromatographe est équipé d'une colonne capillaire (25 m long × 0,25 mm). La colonne est programmée à une température de 60°C pendant 6 min, avec 5 °C d'augmentation par min puis portée à 150 °C; il a été maintenu pour 10 min. Le gaz vecteur est l'hélium pulsé à la vitesse de 2 mL/mn. Les températures de détecteur et de l'injecteur ont été maintenues respectivement à 250 et 225 °C. Le spectromètre de masse a été réalisé en utilisant la gamme 28-400 amu.s⁻¹, avec un voltage ionisant de 70 eV et un courant de l'ionisation de 150µA.

Les composés ont été identifiés par MS et leurs identités ont été confirmées en comparant leurs indices de rétention relative à C8-C32 n-alkanes selon Kovats (1958) et en comparant leurs spectres de masse et le temps de rétention avec ceux de produits de différences ou avec les données déjà décrites dans la bibliothèque NIST ou la banque de donnée informatisée (Adams, 2001).

Les spectres RMN ont été enregistrés sur Varian Gemini 300 et Varian Inova 400. Les déplacements chimiques sont référencés au signal résiduel CHCl₃ à δ 7,26 ppm. Les spectres RMN ¹³C ont été référencés à la crête centrale de CDCl₃ à δ 77,0 ppm. Les spectres HMBC et COSY ont été enregistrés avec des séquences Varian standard gradient d'impulsion.

Test antifongique

Le naupliolide et l'asteriscunolide 3c ont été purifiés, identifiés et testés pour leur activité antifongique sur *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum* et *Botrytis cinerea*. Une solution mère des deux molécules a été préparée pour obtenir les concentrations finales 0, 50, 100, 125, 150, 200, 250, 500, 1000 et 2000 ppm qui ont été ajoutées au milieu Potato-Dextrose-Agar (PDA) stérile. 20 mL de la solution a été coulée, sous agitation magnétique, dans les boîtes de Pétri. Un disque de 6 mm de diamètre de culture jeune de chaque champignon a été déposé au centre de la boîte de pétri contenant le milieu de culture et les différentes concentrations des produits purs. L'incubation a été effectuée à une température de 25°C ± 1°C pendant 7 jours. Le pourcentage d'inhibition (PI) a été calculé en utilisant la formule suivante :

$$PI = [(C-T)/C] \times 100$$

C : Diamètre moyen de 3 répétitions de la croissance mycélienne estimé du champignon testé ou de colonie des spores sur milieu témoin (Cm)

T : Diamètre moyen de 3 répétitions de la croissance mycélienne ou de colonie des spores de boîte, traitées avec l'une des concentrations des sesquiterpènes (Cm).

Isolement de l'agent pathogène

L'isolement de l'agent pathogène a été effectué à partir des fruits d'agrumes présentant les pourritures causées par *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum* et *Botrytis cinerea*. Le choix de ces derniers est dû aux dégâts causés dans les stations de conditionnements de la région du sud du Maroc. Ces champignons ont été isolés à partir des fruits infectés de la station Soussia (Tassila, Agadir). Des morceaux d'écorce infectés sont détachés et placés au centre du milieu de culture PDA. Les boîtes ainsi préparées sont incubées à 25°C pendant sept jours. Après purification par des repiquages successifs sur PDA, le champignon est isolé puis conservé à 4°C sur le même milieu de culture.

Résultats et discussions

Identification des deux lactones sesquiterpéniques d'*Asteriscus graveolens* subsp. *odorus*

Identification du naupliolide

L'identification du naupliolide a été basée sur le protocole déjà cité par Akssira et al. (2006). Ainsi, ce composé se présente sous forme de poudre blanche amorphe. Il a un pouvoir rotatoire $[\alpha]_D = +80$ (c=0.11 ; CHCl₃). La formule moléculaire de ce composé a été déterminée comme C₁₅H₁₈O₃ par HREIMS, m/z 246,13 indiquant 7 degrés d'insaturation. Le spectre infrarouge a montré une bande d'absorption à 1765 cm⁻¹ correspondant à la bande d'absorption du groupement carbonyle (C=O) du squelette γ -lactone et une deuxième bande d'absorption 1660 cm⁻¹ correspondant au groupe cétone à α,β -insaturés.

Le spectre ¹³C RMN du naupliolide a montré la présence de 15 signaux, dont chacune représente le signal de résonance d'un carbone. La présence d'une double liaison trisubstituée qui peut être établie par ceux à 136,2 ppm (singulet) et 138,7 ppm (doublet). Les signaux restants, présentent une multiplicité correspondante à deux CH₃, trois CH₂, cinq CH et un carbone quaternaire. Leur valeur de δ est caractéristique du carbone sp³ non fonctionnalisé. Ainsi, le naupliolide contient trois fonctions insaturées et possède quatre cycles dans sa structure.

Le spectre ¹H RMN présente des signaux : à 6,34 ppm (1H, ddq, J= 8,9, 7,7, et 1,3 Hz) caractéristique d'une double liaison trisubstituée conjuguée par le groupe cétone, à 1,84 ppm (3H, s) et 1,34 ppm (3H, s) caractéristiques de deux groupements méthyle. Par ailleurs, un signal à 4,66 ppm (1H, d, J=4,2 Hz) a été attribué à un proton lié à un carbone oxygéné.

D'autres signaux à savoir 0,57 ppm (1H, dd, J =6.0 et 8.0 Hz), 0,64 ppm (1H, dd, J =6.0 et 4.0 Hz), et 1,61 ppm (1H, ddd, J =8.4 et 4.0 Hz) ont été attribués à un cycle cyclopropane. L'interprétation des signaux restants a été faite à l'aide de 2D-RMN, HSQC et ^1H - ^1H COASY permettant d'établir la structure partielle du naupliolide. Tous les protons sont liés avec une corrélation directe à l'exception de groupement méthyle à 1,34 ppm dans ^1H RMN.

Les corrélations HMBC permettent de joindre le composé C1 au groupement méthyle et de déterminer les liaisons entre le reste des fragments structuraux de ce composé. Ainsi, la structure carbonatée du naupliolide a été établie. La stéréochimie de la double liaison a été déterminée par la corrélation NOE observée pour H_6 et Me- C_7 en spectre 1D-NOESY. La configuration relative de six carbones stéréogéniques a également été établie par le spectre 1D-NOESY et $J_{\text{H}_2-\text{H}_9}=9.9\text{Hz}$, confirmant qu'il n'y a pas de relation entre ces protons. En outre, les corrélations NOE observées pour $\text{H}_5\beta\text{H}_9$ et $\text{H}_4\beta\text{H}_9$ sont en accord avec la conformation bateau pour la raie cyclooctène. Ainsi, la caractérisation structurale du squelette tetracyclique sesquiterpénique trouvé est celle du naupliolide (Figure 1). Cela est en conformité avec les résultats obtenus par Akssira *et al.* (2006).

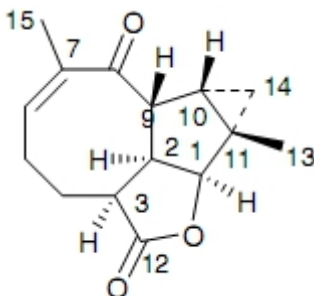


Figure 1 : Structure de naupliolide : 14,15-diméthyl-7,13-dioxotricyclique[6.4.0.0^{9,11}]dodéca-12,13-olide.

Identification de l'asteriscunolide 3c

Dans notre étude, nous avons déterminé la structure, la configuration et la conformation du composé 3c par les analyses spectrales ^1H -RMN et ^{13}C -RMN.

Les résultats obtenus ont montré que l'asteriscunolide 3c se présente sous forme de cristal blanc. Au niveau du spectre ^1H -RMN, on observe deux doublets à 6,27 et 5,91 ppm, respectivement proposés pour α et β des protons (H_9 et H_{10}). Ces doublets correspondent à des doubles liaisons disubstituées conjuguées à un groupement carbonyle.

Ainsi, les spectres ^{13}C -RMN, ^1H -RMN d'asteriscunolide 3c sont présentés dans les tableaux 1 et 2.

Tableau 1 : Données spectrales ^1H -RMN d'asteriscunolide 3c

	H_9	H_{10}	H_{14}	H_{15}
Asteriscunolide 3c	5.91(J=16.5)	6.27 d	1.36	1.28

Tableau 2 : Données spectrales ^{13}C -RMN d'asteriscunolide 3c

C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15
85,6	149,7	138,6	22,8	33,9	128,4	135,6	202,6	129,5	156,4	40,7	173,7	21,1	24,6	21,0

Ainsi, la caractérisation de la structure d'asteriscunolide 3c (Figure 2) est en accord avec Akssira et *al.* 2006, San Feliciano et *al.* (1982 ; 1984 ; 1985a et b).

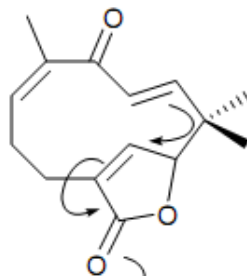


Figure 2 : Structure d'asteriscunolides 3c (Z,E)

Activité antifongique

Neuf concentrations de deux sesquiterpènes naupliolide et asteriscunolide 3c ont été utilisées pour tester la réponse des trois champignons étudiés (*Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum*). Une augmentation des doses des deux produits sesquiterpéniques a été accompagnée par une augmentation de pourcentage d'inhibition (Tableau 3).

Tableau 3 : Pourcentages d'inhibition de la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum* (PD), *Penicillium expansum* (PE) et *Botrytis cinerea* (BC) en utilisant les différentes concentrations de deux sesquiterpènes d'*Asteriscus graveolens* subsp. *odorus*.

	PI en %	50pp	100p	125p	150p	200p	250p	500p	1000pp	2000pp
		m	pm	pm	pm	pm	pm	pm	m	m
Naupli olide	BC	50,00	60,34	63,79	71,98	81,03	85,34	92,67	95,26	100,00
	PD	25,46	36,60	52,25	68,97	76,13	80,64	89,39	92,84	100,00
	PE	29,32	39,36	53,01	65,46	72,69	85,54	93,17	98,39	100,00
Asteris cunol- ide 3c	BC	24,14	36,21	45,69	81,03	84,48	92,24	97,41	100,00	100,00
	PD	27,06	39,26	45,09	53,58	70,03	87,00	89,92	92,57	93,10
	PE	13,65	31,73	37,75	43,78	53,82	64,26	76,71	88,76	94,78

PI : Pourcentage d'inhibition

Test *in vitro* des sesquiterpènes d’*Asteriscus graveolens* subsp. *odorus* sur la croissance mycélienne du *Botrytis cinerea*

Les deux produits testés naupliolide et asteriscunolide 3c ont affiché des comportements différents en fonction des concentrations utilisées. En effet, si le naupliolide présente de meilleurs résultats en termes d’inhibition de la croissance du *Botrytis cinerea* à des doses de 50, 100 et 125 ppm estimées par 50, 60,34 et 63,79%, l’asteriscunolide 3c, quant à lui, se présente plus efficace à des doses de 150 à 1000 ppm estimées de 81,3 à 100%. Toutefois, à 2000 ppm une inhibition complète similaire des deux produits a été notée (Figure 3 et Tableau 3).

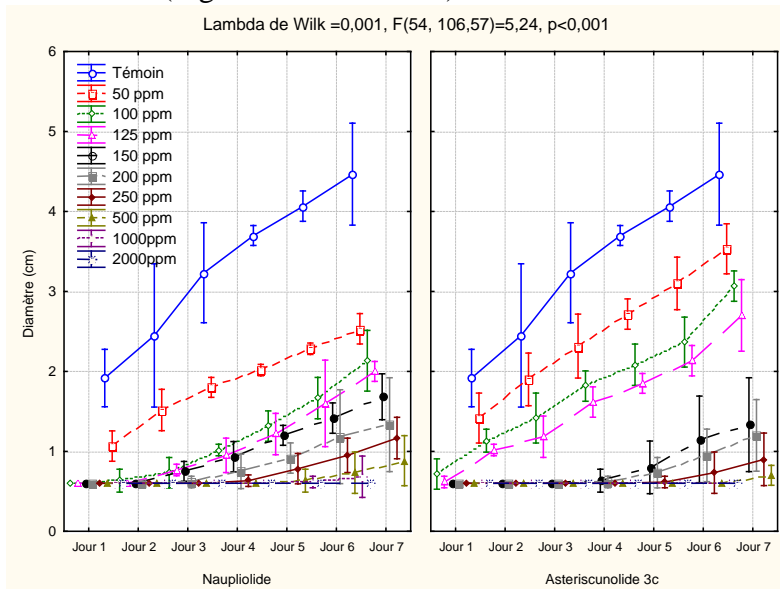


Figure 3 : Évolution de la croissance mycélienne de *Botrytis cinerea* en fonction de différentes concentrations de deux sesquiterpènes d’*Asteriscus graveolens* subsp. *odorus* durant les 7 jours d’incubation.

Test *in vitro* des sesquiterpènes d’*Asteriscus graveolens* subsp. *odorus* sur la croissance mycélienne du *Penicillium digitatum*

Penicillium digitatum semble répondre sensiblement aux deux produits testés (Figure 4). Toutefois, cette sensibilité est significativement plus accentuée vis-à-vis du naupliolide que de l’asteriscunolide 3c. L’effet amplifié en fonction de la concentration utilisée est toujours remarquable (Tableau 1).

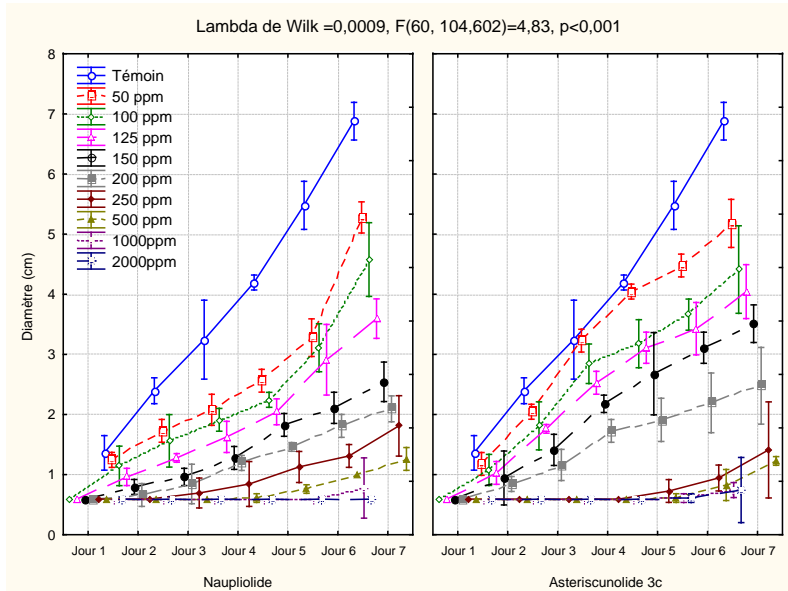


Figure 4 : Évolution de la croissance mycélienne de *Penicillium digitatum* en fonction de différentes concentrations de deux sesquiterpènes d'*Asteriscus graveolens* subsp. *odorus* durant les 7 jours d'incubation.

Test *in vitro* des sesquiterpènes d'*Asteriscus graveolens* subsp. *odorus* sur la croissance mycélienne du *Penicillium expansum*.

A l'instar du *P. digitatum*, le *P. expansum* répond sensiblement aux deux produits testés, avec une inhibition plus accentuée sous l'effet du naupliolide que de l'asteriscunolide 3c (Figure 5 et Tableau 3).

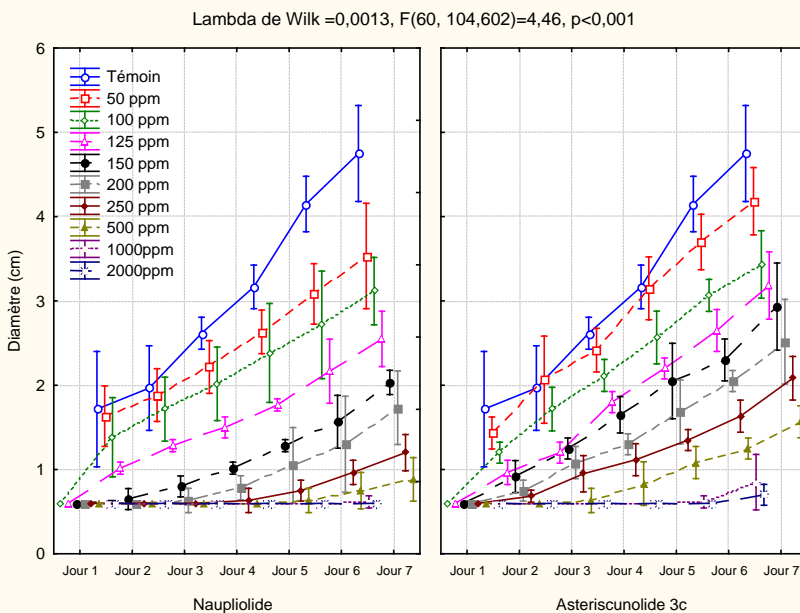


Figure 5 : Évolution de la croissance mycélienne de *Penicillium expansum* en fonction de différentes concentrations de deux sesquiterpènes d'*Asteriscus graveolens* subsp. *odorus* durant les 7 jours d'incubation.

L'étude de l'activité antifongique des deux sesquiterpènes d'*Asteriscus graveolens* subsp. *odorus* a montré une meilleure efficacité sur les trois champignons testés. En effet, le naupliolide, la nouvelle molécule identifiée par Akssira et *al.* (2006), a marqué une forte inhibition contre *Botrytis cinerea* à des doses de 50, 100 et 125 ppm et une inhibition complète à la concentration 2000 ppm. Cette même molécule a montré une meilleure efficacité sur *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum*. Quant à la molécule asteriscunolide 3c, elle a marqué un effet remarquable sur *Botrytis cinerea* à des doses de 150 à 1000 ppm et une inhibition complète à la dose 2000 ppm. Toutefois, cette molécule paraît moyennement efficace sur *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum*.

La recherche de l'activité biologique des lactones sesquiterpéniques a toujours été d'actualité. Ainsi, les propriétés phytotoxiques et cytotoxiques (due à l'existence du groupement α -méthylène- γ -lactone) des asteriscunolides ont fait l'objet d'une étude publiée par Rauter et *al.* (2001). Cette dernière a montré que, l'asteriscunolide 3c présente une activité phytotoxique supérieure à 90% contre *Lemna paucicostata*.

Bruneton (1993) a montré que certaines lactones sesquiterpéniques ont une activité antibactérienne contre des germes Gram positifs. C'est le cas de l'hénélanine de l'aunée (*Inula helenium*) et de la cnicine du chardon béni (*Cnicus benedictus*).

De même, il a été prouvé que certaines lactones sesquiterpéniques sont antifongiques (Mitscher & Hasennhuettl, 1975). L'artémisine est un anti malarique qui a donné d'excellents résultats sur l'Homme, tandis que l'ambrosine, un pseudoguaianolide d'*Ambrosia maritima*, est anthelminthique et molluscide (Bruneton, 1993).

Conclusion

À l'issue de cette étude nous avons extrait, séparé et identifié deux sesquiterpènes majoritaires à partir d'*Asteriscus graveolens* subsp. *odorus* : naupliolide et asteriscunolide 3c. Les structures de ces composés ont été établies sur la base de méthodes spectroscopiques en interprétant les spectres RMN (^1H , ^{13}C , COSY, HMQC, HMBC et NOESY) et les spectres IR.

L'étude effectuée pour l'évaluation de l'activité antifongique des deux sesquiterpènes d'*Asteriscus graveolens* subsp. *odorus* a montré une différence d'efficacité aussi bien pour les molécules utilisées et les champignons testés que les différentes concentrations étudiées. En effet, cette étude a révélé une forte inhibition du naupliolide contre *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum*. Quant à la molécule asteriscunolide 3c, elle a marqué un effet remarquable sur *Botrytis cinerea*. Toutefois, cette dernière molécule semble être moyennement efficace sur *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum*.

L'efficacité des sesquiterpènes majoritaires de la plante *Asteriscus graveolens* subsp. *odorus* pourrait être le sujet d'une investigation et une exploitation dans la lutte intégrée contre les trois champignons testés qui causent beaucoup de dégâts sur les fruits et légumes en post-récolte : *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* et *Penicillium expansum*.

References:

1. Adams RP., 2001. Identification of essential oil components by Gas Chromatography. Quadrupole Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corp. Carol Stream (III, USA).
2. Ahmed AA., 1992. Farnesol and thymol derivatives from *Asteriscus pygmaeus*. *J. of Nat. Prod.* 55, 824-827.
3. Alilou H., Talbi J. & Idrissi Hassani LM., 2013. Activité antifongique des extraits de quatre plantes du sud du Maroc : *Asteriscus imbricatus* (Cav.) DC., *Asteriscus graveolens* subsp. *odorus* (Schousb.) Greuter, *Cladanthus arabicus* (L.) Cass. et *Kleinia anteuphorbium* (L.) Haw. *Science Lib.* 5, 1-9.
4. Alilou H., Rouhi R., Idrissi Hassani LM & Akssira M., 2007. Activité antifongique de *Bubonium odorum* (Asteracées) sur des champignons pathogènes d'agrumes. *Reviews in Biology and Biotechnology.* 6 (1), 20-24.
5. Akssira M., Mellouki F., Salhi A., Alilou H., Saouf A., El Hanbali F., Jesus, FA. & Barrero AF., 2006. Naupliolide, a sesquiterpene lactone with a novel tetracyclic skeleton from *Nauplius graveolens* sub sp. *odorus*. *Tetrahedron Letters.* 47, 6719-6721.
6. Bohlmann F. & Pauls A., 1992. Humulane derivatives from *Nauplius intermedius* *Phytochemistry.* 31, 1663-1665.
7. Bruneton J., 1993. *Phytochimie et pharmacognosie des plantes médicinales*, éditions techniques et documentations Lavoisier. 915 p.
8. El-Dahmy S., Jakupovic J., Bohlmann F. & Sarg TM., 1985. New humulene derivatives from *Asteriscus graveolens*. *Tetrahedron Letters.* 41 (2), 309-316.
9. Jakupovic J., Lehmann L., Bohlmann F. & Hogdson AA., 1987. Nerolidol derivatives from *Asteriscus sericeus*. *Phytochemistry.* 26 (10), 2854-2855.
10. Mitscher LA. & Hasennhuettl G., 1975. *Phytochemistry.* 9, 243-283.
11. Rauter AP., Branco I., Bermejo J., Gonzalez AG., Garcia-Gravalos MD. & San Feliciano A., 2001. Bioactive humulene derivatives from *Asteriscus vogelii*. *Phytochemistry.* 56, 167-171.
12. San Feliciano A., Barrero AF., Medarde M., Del Corral JM., Ledesma E. & Sanchez-Ferrando F., 1982. Humulanolide from *Asteriscus aquaticus*. *Tetrahedron Letters.* 23, 3097-3100.

13. San Feliciano A., Barrero AF., Medarde M., Del Corral JM., Aizpiri AA. & Sanchez-Ferrando F., 1984. Asteriscunolides A, B, C and D, the first humulanolides; two pairs of conformationally stable stereoisomers. *Tetrahedron Letters*. 40, 873-878.
14. San Feliciano A., Barrero AF., Medarde M., Del Corral JM., Aramburu A. & Perales A., 1985a. The stereochemistry of asteriscunolides. An X-Ray based correction. *Tetrahedron Letters*. 41, 5711-5717.
15. San Feliciano A., Barrero AF., Medarde M., Del Corral JM., Aramburu A., Perales A. & Fayos J., 1985b. Asteriscunolide A : sesquiterpene lactone with a new natural skeleton. *Tetrahedron Letters*. 26, 2369-2382.
16. San Feliciano A., Medarde M., del Corral JM., Aramburu A., Gordaliza M. & Barrero AF., 1989. Aquatolide A new type of humulane-related sesquiterpene lactone. *Tetrahedron Letters*. 30, 2851-2854.