

19  
2 Ene



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "CUAUTITLAN"**

**"ESTUDIO QUIMICO DE *Zaluzania augusta*.  
ESTEREOQUIMICA Y FOTOQUIMICA  
DE ZALUZANINA A"**

**T E S I S**

Que para obtener el título de:  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P r e s e n t a :**  
**ABIGAIL LANDA OROZCO**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

Todo el material contenido en esta tesis 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.

# CONTENIDO

## 1. INTRODUCCION

### 1.1 FAMILIA COMPOSITAE (COMPUESTAS)

## 2. GENERALIDADES

### 2.1 CLASIFICACION DE LOS TERPENOS

#### 2.1.1 SESQUITERPENOS

#### 2.1.2 DITERPENOS

#### 2.1.3 DITERPENOS TETRACICLICOS

### 2.2 ACTIVIDAD BIOLOGICA DE LACTONAS SESQUITERPENICAS

## 3. PARTE EXPERIMENTAL

### 3.1 ESTUDIO DE *Zaluzania augusta* RECOLECTADA EN TLAXCALA

#### 3.1.2 ESTUDIO DE *Zaluzania augusta* RECOLECTADA EN QUERETARO

## 4. DISCUSION DE LOS RESULTADOS

## 5. CONCLUSIONES

## 6. BIBLIOGRAFIA

## 1. INTRODUCCION

Las ideas científicas sobre los vegetales han sufrido una gran transformación con el transcurso de los años.

Los organismos los podemos dividir en dos clases: animales y vegetales, ambos conservando sus principales macromoléculas y las unidades que los constituyen.

En épocas antiguas la planta era considerada como un organismo diferente e inferior al animal. Basándose esencialmente en conceptos erróneos sobre la reproducción y organización de las mismas. En realidad se puede afirmar que la vida es una en los vegetales y animales, el citoplasma de unos y otros, presenta la misma organización y el mismo funcionamiento. Sólo existen ciertos rasgos morfológicos y fisiológicos comunes a cada uno de ellos.<sup>1</sup>

Los datos de que se dispone permiten suponer que a lo largo de millones de años se han modificado las sustancias originales.

Un carácter de suma importancia en los vegetales es la facultad de poder efectuar síntesis de sustancias orgánicas partiendo de las inorgánicas. De este poder de síntesis deriva su importancia para el hombre.<sup>2</sup>

Todos los pueblos primitivos han adquirido información sobre las propiedades medicinales de gran núme-

ro de plantas propias de su medio ambiente. Así en la Biblia están descritas unas 200 plantas medicinales y sus aplicaciones.

Desde el punto de vista práctico a la humanidad siempre le ha interesado el estudio de los vegetales, debido al papel tan importante que tiene en nuestra existencia, ya que las funciones que desempeñan constituyen un factor indispensable para la vida terrestre y todos los productos que proporcionan son utilizados por el hombre. El hombre no solamente aprovecha las plantas en su alimentación, sino también en la medicina y sobre todo en la industria, pues la mayoría de las materias primas para ésta son tomadas de los vegetales.<sup>1</sup>

Se ha observado que la cubierta vegetal de México es una de las más variadas de la tierra, pues en su territorio están representados prácticamente todos los grandes biomas que se han descrito en la superficie de nuestro planeta.

Las plantas se han clasificado en diversas familias, una de las cuales es la familia de las compuestas.

### 1.1 FAMILIA COMPOSITAE (COMPUESTAS)

Es una familia cosmopolita y muy vasta, que comprende alrededor de la décima parte de todas las fanerógamas conocidas.

El tallo es herbáceo o leñoso; las hojas alternas u opuestas y a veces con jugo lechoso; las flores se

agrupan en inflorescencias llamadas capítulos; considerados éstos como flores sencillas; pero en realidad están compuestas por numerosas florecillas.<sup>1</sup>

Existen 13 tribus de la familia de las compuestas; en donde cada una de estas tribus presenta diferentes subtribus y cada una de las subtribus presentan diferentes grupos; aunque existen algunas subtribus que no presentan grupos, sino que se deriva luego el género.

Familia de las Compuestas :

- |                |                 |
|----------------|-----------------|
| 1) Vernoniaeae | 8) Senecioneae  |
| 2) Eupatorieae | 9) Calenduleae  |
| 3) Astereae    | 10) Arctotideae |
| 4) Inuleae     | 11) Cynareae    |
| 5) Heliantheae | 12) Mutisieae   |
| 6) Helenieae   | 13) Cichorieae  |
| 7) Anthemideae |                 |

Dentro de la Heliantheae existen 15 subtribus:

- |                         |                      |
|-------------------------|----------------------|
| 1) Melampodiinae less   | 9) Bahiinae Rydb     |
| 2) Ziniinae B. y H.     | 10) Mediinae B. y H. |
| 3) Ecliptinae less      | 11) Galin soginae H. |
| 4) Verbesininae B. y H. | y H.                 |
| 5) Helianthinae Dumort  | 12) Neurolaeninae    |
| 6) Gaillardinae less    | (Rydb) stuess        |
| 7) Coreopsidinae less   | 13) Engel maninae    |
| 8) Fitchiinae Carlquist | stuessy              |

14) Ambrosiinae Less

15) Milleriinae B. y H.<sup>3</sup>

La subtribu Neurolaeninae (Rydb) Stuess no presenta un grupo, pero si 9 géneros; uno de los cuales es la *Zaluzania Pers*, el cual contiene 12 especies.

*Zaluzania Pers* (Compuestas)

Cabezuelas heterógamas, umbeladas, amarillas, agrupadas en el extremo de las ramas. Flores periféricas femeninas, uniseriadas, con las ligulas cortas, enteradas o dentadas; las flores del disco hermafrodita, tubulosas, 5-dentadas. Involucro anchamente acampanado, formado de varias series de bracteas membranosas en el margen; receptáculo cónico, anteras con la base obtusa. Plantas herbáceas perennes o subarborescentes, con las hojas alternas enteras o lobuladas.

*Zaluzania augusta* Sch. Bip (Compuestas)

"Cenicilla"

Planta subarborescente, con las ramas morenas o rojizas. Hojas pecioladas, con el margen remotamente ondulado, la cara superior de color verde claro, tomentosa, la inferior blanca, lanudo-tomentosa. Cabezuelas de 4-5 mm de alto, subumbeladas.

Septiembre a noviembre. Sierra de Guadalupe, Los Remedios, Cerro del Pino.<sup>4</sup>

## 2. GENERALIDADES

Un grupo importante de sustancias de origen natural lo constituyen los terpenos. Son un grupo de sustancias cuyas estructuras se componen de unidades de isopropeno,  $\text{CH}_2=\text{CH}-\underset{\text{CH}_3}{\text{C}}=\text{CH}_2$ .



2.1 Dependiendo del número de unidades que posea el terpenoide recibe un nombre diferente.

No. de Unidades de Isopreno	Nombre
2 Unidades	Monoterpenos ( $\text{C}_{10}$ )
3 Unidades	Sesquiterpenos ( $\text{C}_{15}$ )
4 Unidades	Diterpeno ( $\text{C}_{20}$ )
5 Unidades	Sesterpeno ( $\text{C}_{25}$ )
6 Unidades	Triterpeno ( $\text{C}_{30}$ )
N Unidades	Politerpeno ( $\text{C}_n$ )

Estos compuestos pueden ser de cadena abierta o formar ciclos, además se les puede encontrar en diversos estados de oxidación e insaturación.<sup>5,6</sup>

Los diferentes compuestos formados por grupos terpenoides están ampliamente distribuidos en plantas, microorganismos, insectos, etc., los cuales presentan importantes actividades fisiológicas.

Al irse conociendo las estructuras de un gran

número de terpenos, se aceptaba que podían derivar del esqueleto de isopreno.

Hoy se sabe que los terpenos no se forman realmente en la naturaleza a partir del isopreno, ya que éste no ha sido detectado como producto natural. El verdadero precursor universal de todos los terpenos es el ácido mevalónico que proviene del Acetil CoA (Acetato Activo).<sup>7</sup>

### 2.1.1 SESQUITERPENOS

Los sesquiterpenos pueden ser hidrocarburos cíclicos o acíclicos con diferentes grupos funcionales.

Su esqueleto carbonado puede formarse por la participación de tres unidades de isopreno.

Los sesquiterpenos son constituyentes de aceites esenciales. En estos compuestos una cadena lateral correspondiente a un radical isopropilo ha sido modificado hasta el estado de oxidación de un ácido carboxílico. Por otro lado, la introducción de oxígeno al anillo proporciona al grupo hidroxilo con el cual reacciona el grupo carboxilo para formar el anillo de lactona.<sup>8</sup>

Las lactonas sesquiterpénicas, son compuestos que poseen un esqueleto fundamental de 15 átomos de carbono, los cuales teóricamente resultan como un producto de la condensación de 3 moléculas de Isopreno (2 metil-butadieno-1,3).

Las lactonas sesquiterpénicas se han aislado

principalmente a partir de extractos de flores o partes aéreas de las compuestas, de algunas umbelíferas y magnoláceas.<sup>2,9</sup> En algunas, la lactona cierra al carbono 6 y en otras al carbono 8.

Pueden presentarse distintas funciones químicas: grupos epóxidos, ésteres, carbonilos, grupos -OH y dobles ligaduras. Son sustancias de sabor amargo, de farmacología poco estudiada; sustancias muy polares, insolubles en agua; provenientes de plantas usualmente reportadas como medicinales.

Lactonas sesquiterpénicas de especies de *Zaluzania*.<sup>10</sup>

## 2.1.2 DITERPENOS

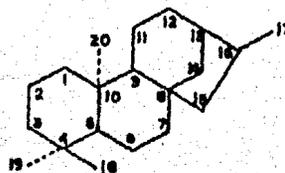
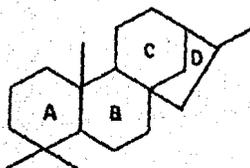
Los diterpenos forman un grupo de sustancias constituidas por un esqueleto de veinte átomos de carbono. La clasificación de los diterpenos atendiendo a las estructuras más comúnmente encontradas en la naturaleza es la siguiente.<sup>11</sup>

- A) Diterpenos lineales.
- B) Diterpenos macrocíclicos y sus productos de ciclización.
- C) Diterpenos Bicíclicos.
  - a. Serie Manóol.
  - b. Serie ácido labdanólico.

- c. Rearreglo de Labdanos.
- D) Diterpenos Tricíclicos.
  - a. Pimaranos.
  - b. Rearreglo de Pimaranos.
  - c. Abietanos y Rearreglo de Abietanos.
- C) Diterpenos Tetracíclicos.
  - a. Serie Kaureno-Filocladeno.
  - b. Giberelinas.
  - c. Grayanotoxinas.
- F) Tracilobanos.
- G) Atisereno y Alcaloides Relacionados.

### 2.1.3 DITERPENOS TETRACICLICOS

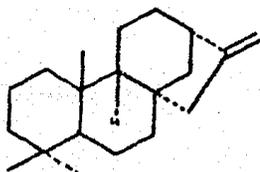
Presentan 4 anillos en su estructura. Dentro del primer grupo tenemos a los kauranos, los cuales poseen un esqueleto carbonado constituido por dos unidades terpénicas, unidad regularmente formando tres anillos de seis y uno de cinco miembros. A continuación se muestra la disposición y la numeración de estos anillos.



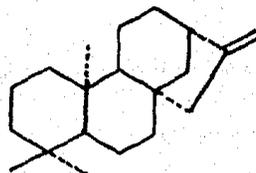
La estructura fundamental de los kauranos presenta la misma estereoquímica en la fusión de anillos A/B ("trans") presente en los diterpenos, triterpenos y esteroides. Los anillos B/C tienen una fusión "cis". La conformación silla normal del anillo se encuentra distorsionada debido a un puente formado por dos átomos de carbono entre los carbonos 8 y 13 que originan el anillo de cinco miembros (D), el cual tiene una orientación  $\beta$ .<sup>12</sup>

Los seis centros asimétricos de esta estructura, están localizados en los carbonos 5,8,9,10,13 y 16.

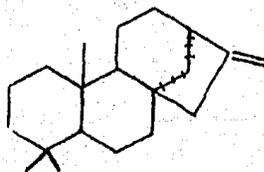
En la naturaleza se han encontrado dos estructuras que son enantioméricas: el (+) kaureno y el (-) kaureno; es interesante hacer notar que el (+) filocladeno es un diastereoisómero del (-) kaureno cuya diferencia se encuentra en los centros asimétricos de los carbonos 5,9 y 10.



(+) Kaureno



(-) Kaureno



(+) Filocladeno

## 2.2 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LACTONAS SESQUITERPENICAS

Su actividad biológica es muy variable, algunas actúan como analgésicos, otras como amebicidas, otras poseen acción fitotóxica.<sup>13</sup>

La reversibilidad de la acción de estos compuestos ha sugerido que pueden desempeñar un papel regulador *in situ*.<sup>14</sup> Se ha observado que otras lactonas tienen efecto sinergista.

En general actúan como inhibidores, pues se ha demostrado que algunas impiden el crecimiento de las células al interferir con ciertos sistemas enzimáticos. Dado que estos sistemas son muy comunes, deben de intervenir en fases del proceso de crecimiento, lo cual parece muy probable dada su amplia distribución en los vegetales. Aunque quizá realice en éstos alguna función determinada. Se ha encontrado que dosis muy bajas de las lactonas tienen acción.<sup>9</sup>

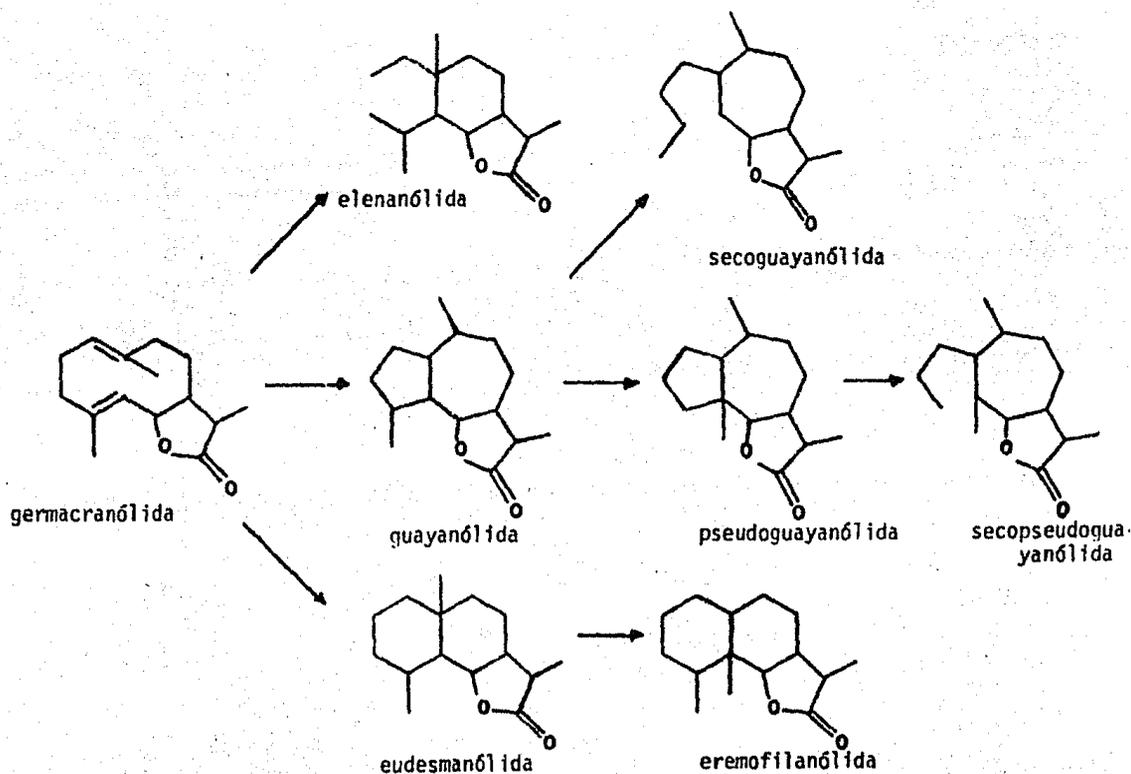
Investigaciones químico-médicas en la citotoxicidad e inhibición tumoral de lactonas han recibido considerable atención en la última década.

Investigaciones de Kupchan y colaboradores establecieron que casi cualquier sesquiterpeno que contenga una lactona con metileno exocíclico, exhibe actividad contra células tumorales provenientes de carcinoma epidermoide humano de la laringe. Pettit y Cragg han demostrado que helenalina, un pseudoguaianólido aislado de *Helenium autumn-*

nale exhibe *in vitro* actividad anti-leucemia.

Inhiben el crecimiento microbiano. Investigaciones recientes por Mathur y colaboradores mostraron que las germacranólidas, mikanolidas y dehidromikanolidas eran capaces de inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*.<sup>15</sup>

La observación cuidadosa de las estructuras de numerosos productos naturales permite emitir hipótesis razonables sobre sus posibles biogénesis.<sup>2</sup>



Al observar este esquema podemos explicar el valor quimiotaxonómico de estos productos, ya que cuantos más pasos biogénéticos requiere su formación, más característicos son.<sup>9</sup>

El uso de lactonas sesquiterpénicas en estudios quimiotaxonómicos de las compuestas ha sido revisado por numerosos quimiotaxonomistas, quienes enfatizan la utilidad de la información microquímica en la delimitación de la tribu y el género.<sup>15</sup>

Conociendo las estructuras correctas de estas sustancias y habiéndose descubierto en ellas propiedades tan interesantes, hizo que muchos investigadores en diversas partes del mundo, se interesaran en este tipo de sustancias.

Su actividad biológica se encuentra actualmente en estudio en México.

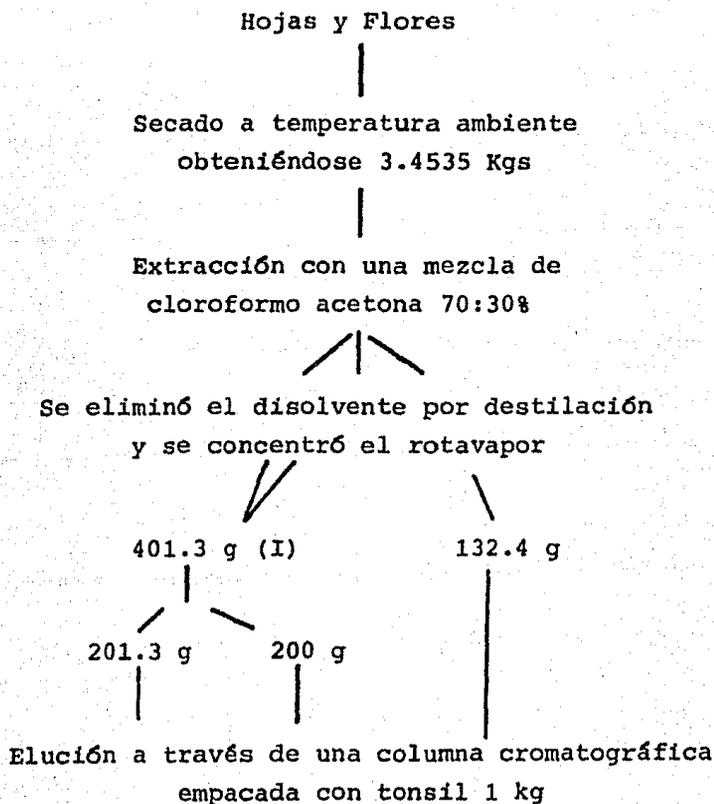
Debido a este impulso el número de lactonas conocidas ha crecido en forma espectacular, pues en 1974 se conocían alrededor de 600 (Hertz, 1973) y en la actualidad se conocen poco más de 1,000 diferentes productos naturales de este tipo (Fisher *et al.*, 1979).

Es importante considerar que la composición de una planta está sujeta a variaciones y ello depende de la situación de la planta, del clima y del año. Por lo tanto es muy importante desde el punto de vista ecológico, pues al quedar en el suelo a diferentes concentraciones, es posible que inhiban o estimulen el crecimiento celular.

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

La *Zaluzania augusta* fue recolectada en Tlaxcala en el Km 40 de la carretera Texcoco Apizaco, el 18 de septiembre de 1982; y a 39 Km al norte de la Ciudad de Querétaro el 9 de septiembre de 1982.

#### 3.1 ESTUDIO DE *Zaluzania augusta* RECOLECTADA EN TLAXCALA



Solventes	Concentración	Producto
Hexano	100	
Hexano-cloroformo	75-25	
Hexano-cloroformo	50-50	
Hexano-cloroformo	25-75	
Cloroformo	100	
Cloroformo-acetona	90-10	Zaluzanina B
Cloroformo-acetona	75-25	Zaluzanina A
Cloroformo-acetona	50-50	
Cloroformo-acetona	25-75	
Acetona	100%	

Zaluzanina B

Se disolvió en Benceno-Acetato de etilo 50-50%

Elución a través de una columna cromatográfica  
empacada con 242 g de alúmina

El producto obtenido de las fracciones 64-79 de  
un total de 97

(Elución del producto con la misma mezcla con la  
que se disolvió)

	Cantidad obtenida	Punto de Fusión
Zaluzanina A	15.44 g	243-5°C (Lit. P.F. 265°C)
Zaluzanina B	0.020 g	218-2°C (Lit. P.F. 233-235°C)

#### Datos Espectroscópicos

Zaluzanina A		Zaluzanina B	
<u>IR (cm<sup>-1</sup>)</u>			
3350 y 3572	oxidrilos	3390	oxidrilos
850 y 1631	doble ligadura del metileno exocíclico	1730-1694	gpo. acetato y lactona de 6 miembros.
1689	carbonilo de lactona $\delta$	1638	doble enlace

#### RMN (ppm)

Singlete en 0.55	hidrógeno en anillo de 3 miembros
doblete en 0.95	metilo en C-4
singlete en 1.05	metilo sobre C <sub>10</sub>
doblete en 3.78	para H <sub>6</sub>
doblete en 5.45	para H <sub>13</sub>
doblete en 6.05	para H <sub>13</sub>
d,d,d en 4.17	H, base del -OH de C-3

Se observan las mismas señales para la Zaluzanina B pero en 5.25 aparece una multiplicidad de una señal del C-3 que sostiene el grupo acetato.

## FOTOQUIMICA DE ZALUZANINA A

## I. Elección del disolvente

Después de varias experiencias se utilizó el metanol como disolvente ideal de la reacción.

## II. Condiciones de reacción

Se trabajó con lámparas de 300-253.7 nm. Se utilizaron tubos de cuarzo para evitar problemas respecto al paso de luz. La presencia de la benzofenona como sensibilizar de la reacción fue indispensable para obtener el producto de fotólisis. Se manejaron 500 mg del producto a fotolisar, 150 mg de Benzofenona y 100 ml de metanol.

## III. Muestras de reacción.

La reacción se montó 8 veces en las condiciones de reacción antes mencionadas. Los cristales que se obtuvieron en cada caso se recrystalizaron con una mezcla de 85-25% acetato de etilo-metanol, eliminándose la benzofenona con Hexano. El tiempo de reacción fue variable. El tiempo máximo fue de 9 hrs y el mínimo de 1:20 hrs, obteniéndose siempre el mismo producto de reacción. Se observó que el rendimiento fue aumentando gradualmente y el punto de fusión también fue siempre el mismo = 201-2°C. Los espectros de  $C^{13}$  RMN y ionización química no fue posible obtenerlos por problemas de solubilidad; sin embargo se llevaron a cabo 2 reacciones con el producto de fotólisis.

## 1) Reacción de acetilación

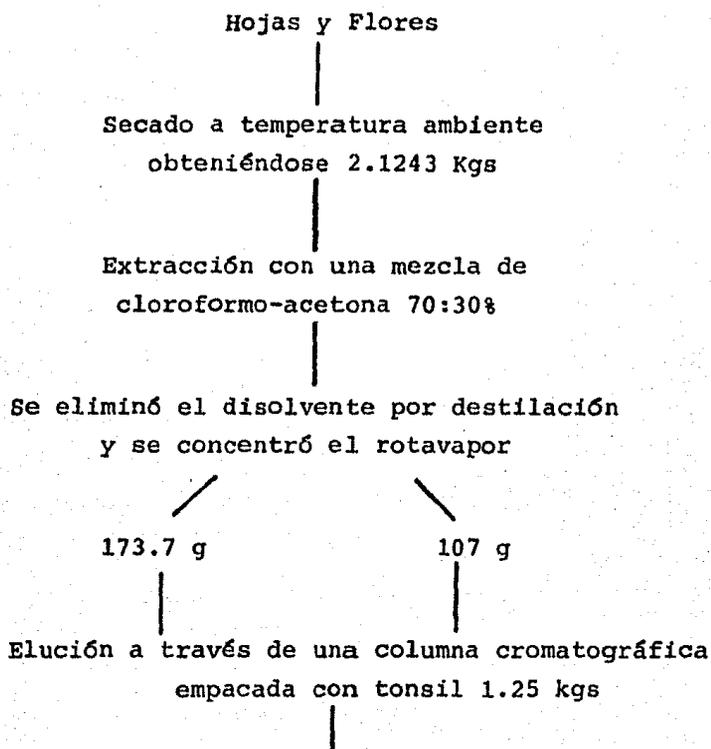
100 mg del producto de fotólisis, se le adi-

ciona 1 ml de anhídrido acético y 1 ml de piridina. El curso de la reacción se sigue por medio de cromatoplasmas. Finalizada la reacción, se agregan 5 ml de H<sub>2</sub>O se deja a T.A. unos 10 min. Se agrega CHCl<sub>3</sub> (10 ml). Se lava con HCl al 10%. Se lava con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 10% se lava con agua, se seca con NaSO<sub>4</sub> anhidro. Se filtra y lava el Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> con cloroformo. Se evapora y cristaliza.

2) Reacción de oxidación con Reactivo de Jones.

100 mg del producto se disuelven en acetona (10 ml), se adiciona el reactivo de Jones gota a gota hasta una coloración naranja, se deja reposar a temperatura ambiente y se sigue el curso de la reacción por medio de cromatoplasmas; finalizada la reacción se agrega metanol hasta obtener una coloración verde, se extrae el producto con cloroformo y se cristaliza.

Tanto en la reacción de acetilación como en la de oxidación se obtuvo una mezcla de reacción correspondiente a un producto aceitoso, por lo que los datos de IR y RMN del producto de acetilación no se consideraron.

3.1.2 ESTUDIO DE *Zaluzania augusta* RECOLECTADA EN QUERETARO

Solventes	Concentración (%)	No. de Muestras
Hexano	100	1-13
Hexano-cloroformo	75-25	14-35
Hexano-cloroformo	50-50	36-42
Hexano-cloroformo	25-75	43-48
Cloroformo-acetona	90-100	49-54
Cloroformo-acetona	75-25	55-59
Cloroformo-acetona	50-50	60-69
Cloroformo-acetona	25-75	70-72
Acetona	100	73

De las fracciones poco polares, eluidas con hexano se obtuvo el ácido (-)-kaur-9(11)-16 dien-19 oico

De las fracciones eluidas con cloroformo-acetona 90-10%, se aisló 16 $\alpha$ -hidroxi-(-)kauran-19 oico

La Zaluzanina A, se obtuvo de las fracciones 49-73 (24 fracciones) se recrystalizó con una mezcla de acetona-metanol-éter isopropílico, obteniéndose 4.50 g; P.F. 243-5°C (Lit. P.F.=265°C), para comprobar su presencia también se le corrió placa comparativa con la obtenida de Tlaxcala.

#### OBTENCION DE ALOZALUZANINA

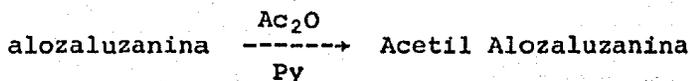
2 g del compuesto (Zaluzanina A) se disuelven en metanol (15 ml) se trata con KOH (2 g) en 40 ml de agua, se somete a reflujo por 40 minutos. Se enfría, se acidifica con HCl y se extrae con cloroformo. La fase orgánica se lava con agua. Se seca con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtra éste y se evapora a sequedad. Se obtuvieron 165 mg con un P.F.=193°C (Lit. P.F.=191-194°C). Al finalizar la reacción, se observó la presencia de un precipitado (blanco) el cual se separó por filtración.

IR        1770 y 1665 cm<sup>-1</sup>                     $\alpha, \beta$  lactona insaturada de  
5 miembros

UV         $\lambda_{m\acute{a}x}$  212 m $\mu$ ;  $\epsilon$  13640

## ACETILACION DE ALOZALUZANINA

A 100 mg de alozaluzanina, se le adiciona 1 ml de anhídrido acético, 1 ml de piridina. El curso de la reacción se sigue por medio de cromatoplasas. Una vez finalizada la reacción se agregan 5 ml de H<sub>2</sub>O, se deja a T.A. unos 10 min. Se agrega CHCl<sub>3</sub> (10 ml). Se lava este con HCl al 10%. Se lava con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 10%. Se lava con agua. Se seca con NaSO<sub>4</sub> anhidro. Se filtra y lava el Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> con cloroformo. Se evapora. Se cristaliza.



(condiciones  
suaves de ace-  
tilación)

Los cristales obtenidos se purificaron por cromatografía en capa fina. Se obtuvo un rendimiento de 16 mg, con un punto de fusión= 139-140°C (Lit. P.F. 138°C).

## DATOS ESPECTROSCOPICOS :

IR	Todavía muestra una banda de hidroxilo a 3583 cm <sup>-1</sup>	
RMN	Doblete 6.23	
	Doblete 5.73	protones del metileno exocíclico
	Triplete 5.12	H, del grupo acetilo
	Doblete 4.11	H-6 base de la lactona

Singulete 2.96	-OH(er) desaparece con D <sub>2</sub> O
Singulete 2.10	acetato (en la región del metilo)
Singulete 1.03	Superpuesto a un doblete. Metilos terciario y secundario.
Multiplete 0.48	Anillo de ciclopropano

#### DITERPENOS PRESENTES EN *Zaluzania augusta*

Estudio del ácido 16 $\alpha$ -hidroxi-(-)-kauran-19 oico. 9.07 g, P.F.=279-280°C [ $\alpha$ ]<sub>D</sub>-85 (Lit. P.F.=281-283° [ $\alpha$ ]<sub>D</sub>-92).

IR      3438 cm<sup>-1</sup>                  grupo oxidrilo  
           1694 cm<sup>-1</sup>                  carbonilo C-19

RMN     singulete 1.3 ppm        metilo C-16  
           singulete 1.2 ppm        metilo C-4  
           singulete 0.95 ppm      metilo C-10

#### ACIDO 16 $\alpha$ -HIDROXI-(-)-KAURAN-19 OICO

##### REACCION DE DESHIDRATACION

100 mg del producto a deshidratar se disuelve en 164.705 ml de Benceno, se adicionan 2.35 g de MgSO<sub>4</sub> anhidro en diferentes porciones. La mezcla de reacción se mantiene en reflujo. El curso de la reacción se sigue por plaqueo, al finalizar ésta se elimina el MgSO<sub>4</sub> y el disolvente presente. Se realizó su cristalización con Hexano, obte-

niéndose un rendimiento de 48.1 mg.

El producto de reacción obtenido fue una mezcla de compuestos, obteniéndose los siguientes datos espectroscópicos.

RMN	Singlete	5.04	metilo en el C <sub>15</sub>
	Singlete	4.72	metilo exocíclico en el C <sub>16</sub>
	Singlete	1.24	metilo en el C <sub>4</sub>
	Singlete	0.96	metilo angular en el C <sub>10</sub>

#### REACCION DE METILACION

100 mg del producto se disuelven en metanol. En un embudo de separación que contiene NaOH al 40% se adiciona eter isopropílico, observándose una interfase. Se adiciona N-nitroso-N-metil urea hasta que se observa un color amarillento en la parte superior, indicándonos esto que se ha formado el diazometano. Se extrae la sosa quedándonos la solución de diazometano, para secar éste se le agregan unas lentejas de NaOH; después de secar se vierte el diazometano a la solución que contiene el producto a metilar y se deja reposar durante 2 horas, hasta que desaparece el color amarillento. Se corrió una cromatoplaça y se observó una sola mancha. El producto se recristalizó con hexano, obteniéndose 60 mg, con un punto de fusión = 99-100°C.

## DATOS ESPECTROSCOPICOS

IR            3600        -        grupo OH  
               940         -        uniones C-H  
               1720        -        carbonilo del ester metilico

RMN           Singulete 3.64    ester metilico  
               Singulete 1.36    metilo C-16  
               Singulete 1.16    metilo C-4  
               Singulete 0.84    metilo C-10

## ESTUDIO DEL ACIDO (-)-KAUR-9(11)-16-DIEN-19 OICO

2.2 g, P.F.=149-150°,  $[\alpha]_D^{25} + 43$  (Lit. P.F.=  
 151-153°  $[\alpha]_D^{25} + 33$ ) C H O . E.M.  $M^+$  m/z 300.

IR            1650  $\text{cm}^{-1}$         doble ligadura de metileno  
               1690  $\text{cm}^{-1}$         grupo carbonilo  
               3500 - 2300  $\text{cm}^{-1}$     -OH de un carboxilo

RMN           singulete en 1.0  
               singulete en 1.23 ppm        metilos  
               singulete 4.76 y 4.86 ppm    metileno C-17  
               triplete en 5.2 ppm        protón vinílico C-11

#### 4. DISCUSION DE LOS RESULTADOS

En 1967 se estudió por primera vez la *Zaluzania augusta* (Romo et al.), un arbusto que crece en grandes extensiones del suelo árido del valle del Mezquital, al que proporciona un bello aspecto cuando se cubre de flores amarillas los últimos meses del año, la planta pertenece a la familia de las compuestas de la tribu *Heliantheae*.<sup>16</sup>

El presente estudio se llevó a cabo con *Zaluzania augusta* recolectada en los estados de Tlaxcala y Querétaro, plantas que se trabajaron por separado.

Estudio de la *Zaluzania augusta* recolectada en Tlaxcala. El extracto obtenido con una mezcla de cloroformo-acetona de las hojas y flores de la *Zaluzania augusta*, se hizo pasar a través de una columna cromatográfica empacada con tonsil (1 kg). De las fracciones eluidas con 25% acetona 75% cloroformo, se obtuvo la Zaluzanina A (1a) P.F.= 243-5°C. Se comprobó la identidad de esta sustancia por las propiedades espectroscópicas que a continuación se describen y que corresponden a las descritas en la literatura.<sup>16</sup>

En el espectro de IR (Espectro No. 1) se observan dos bandas, una en 3542 y otra en 3350  $\text{cm}^{-1}$  para oxhidrilos, en 850  $\text{cm}^{-1}$  y 1631  $\text{cm}^{-1}$  banda de doble ligadura del metileno exocíclico y en 1689  $\text{cm}^{-1}$  una banda para carbonilo de lactona  $\delta$ .

En el espectro de RMN (Espectro No. 2) se observa un singulete en 0.55 ppm para hidrógenos en anillo de 3 miembros, un singulete en 1.05 para metilo sobre C-10, un doblete centrado en 0.95 ppm ( $J=8$  Hz) para metilo sobre C-4, un doblete en 3.78 ppm ( $J=3$  Hz) para  $H_6$ , un doblete en 5.45 ppm para  $H_{13}$  ( $J=2$  Hz) y un doblete en 6.05 ppm para  $H_{13}$  ( $J=1.5$  Hz). El hidrógeno base del oxidrilo en C-3 aparece como un d,d,d en 4.17 ppm ( $J=8,8,4$  Hz).

Las fracciones poco polares se recromatografiaron en alúmina y se aisló la Zaluzanina B (1b) P.F.=128-220°C (Lit. P.F.= 233-235°C).

De acuerdo a las constantes físicas y datos espectroscópicos se comprobó la presencia de ésta.

En el espectro de IR (Espectro No. 3) se observa una banda a  $3390\text{ cm}^{-1}$  para hidroxilo. En 1730 y 1694 bandas del grupo acetato y lactona de 6 miembros y a 1638 bandas correspondientes a un doble enlace.

En el espectro de RMN (Espectro No. 4) se observan las mismas señales de la Zaluzanina A, siendo la Zaluzanina B un derivado de ésta. La diferencia es que la Zaluzanina B (1b) sostiene en el C-3 un grupo acetato cuyo protón base aparece en 5.25 ppm ( $J=8,8,4$  Hz).

De la *Zaluzania augusta* recolectada en Querétaro, se encontró como producto principal Zaluzanina A y en menor proporción el ácido  $16\alpha$ -hidroxi-(-)-kauran-19 oico (2). P.F.=279-280°C (Lit. P.F.= 281-283°C);  $[\alpha]_D = 85$

(Lit.  $[\alpha]_D = -92$ ).

Este ácido diterpénico se identificó como tal ya que presentó las siguientes características espectroscópicas; que corresponden a los descritos en la Lit. 17 para  $C_{20}H_{32}O_3$ . E.M.M<sup>+</sup> m/z 320.

En el espectro de IR (Espectro No. 5) aparece una banda a 3438 para un grupo oxidrilo. En 1694 se observa una banda para el carbonilo del C-19.

En el espectro de RMN (Espectro No. 6) se observan tres singuletes uno en 1.3 para el metilo en C-16, otro en 1.2 para el metilo en C-4 y en 0.95 ppm para el metilo sobre C-10.

Para poner en evidencia el grupo oxidrilo y el carbonilo se llevaron a cabo dos reacciones una de deshidratación y otra de metilación.

De la reacción de deshidratación con  $MgSO_4$  anh. en benceno se obtuvo una mezcla de dos compuestos correspondientes a las fórmulas (4) y (5).

En el espectro de RMN (Espectro No. 7) muestra una señal en 5.04 y 4.72 ppm. Correspondientes a un protón vinflico en el C-15(4) y un metileno exocíclico en el carbono 16(5) respectivamente. Aparece una señal a campo bajo a 1.24 correspondiente a un metilo en el C-4 y una señal en 0.96 para un metilo angular que sostiene el C-10, de acuerdo a estos datos espectroscópicos quedó comprobada la presencia de un grupo -OH en el C-16. Esta mezcla de

productos también se obtuvo al deshidratar con  $\text{POCl}_3/\text{Py}$ .<sup>18</sup>

La presencia del grupo carboxilo en el carbono 4 se comprobó por medio de una reacción de metilación con diazometano en MeOH.

Los datos de RMN (Espectro No. 8) mostraron una señal de metilo (singulete, 3H) a campo bajo correspondiente al ester metílico en 3.64. Unas señales a 1.36, 1.16 y 0.84 correspondientes a metilos en C-16, C-4 y C-10 respectivamente.

En el espectro de IR (Espectro No. 9) se observa una banda a 3600 para un grupo -OH, a 940 banda correspondiente a uniones C-H y una banda más a 1720 para carbonilo del ester metílico (6).

De un estudio previo de *Zaluzania augusta* recolectada en Tlaxcala<sup>19</sup> se aisló Zaluzanina A, el ácido 16 $\alpha$ -hidroxi-(-)-kauran-19 oico y además el ácido (-)-kaur-9(11)-16-dien-oico (7), el cual fue identificado estructuralmente en este estudio de acuerdo a constantes físicas y datos espectroscópicos reportados en la literatura.<sup>17</sup>

Este ácido mostró un análisis elemental para  $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_2$  E.M.  $M^+$   $m/z$  300.

En el espectro de IR (Espectro No. 10). Se observa una banda a 1650 de doble ligadura de metileno. En 1690 se observa una banda para grupo carbonilo y entre 3500 y 2300  $\text{cm}^{-1}$  una banda ancha para el -OH de un carbonilo.

En el espectro de RMN (Espectro No. 11) se

observan 2 singuletes en 1.0 y 1.23 ppm. para metilos; dos singuletes anchos en 4.76 y 4.86 ppm para el metileno del C-17 y un triplete ancho en 5.2 ppm para el protón vinílico del C-11 el espectro descrito es idéntico al informado en la literatura<sup>20</sup> para la misma sustancia, por lo tanto queda plenamente identificado el diterpeno obtenido.

### DETERMINACION DE LA ESTEREOQUIMICA DE LAS ZALUZANINAS A Y B

En 1966 se publicó el aislamiento de tres guayanólidas con un ciclopropano de *Ira axillaris*,<sup>21</sup> una de ellas fue la Axivalina, la estereoquímica de esta sustancia se determinó 6 años después<sup>22</sup> por medio de difracción de rayos X, representada por la fórmula 9.

Comparando los datos de la literatura<sup>22</sup> entre la Axivalina (9) y la Acetil Alozaluzanina (8b), se observó que eran muy similares P.F.=138-140°  $[\alpha]_D^{27} = -132.4$ , P.F.=138  $[\alpha]_D - 143^\circ\text{C}$  respectivamente.<sup>9</sup> En base a esta información se procedió a comparar la Acetil Aluzaluzanina A con una muestra auténtica de Axivalina y estos compuestos tienen los mismos grupos funcionales.

La zaluzanina A se trató con base (KOH) y posteriormente con ácido (HCl) para obtener la Alozaluzanina A (8a) según el método descrito en la literatura,<sup>16</sup> presentando los siguientes datos espectroscópicos : UV (Es-

pectro No. 12)  $\lambda_{\max}$  212  $\mu$ ;  $\epsilon$  13640.

En el espectro de IR (Espectro No. 13) muestra bandas a 1770 y 1665  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a una  $\alpha, \beta$ -lactona insaturadas de 5 miembros; la Alozaluzanina A se acetiló ( $\text{Ac}_2\text{O}/\text{Py}$ ) en condiciones suaves, obteniéndose la Acetil Alozaluzanina (8b) esta sustancia resultó ser idéntica a una muestra auténtica de Axivalina (9), ya que los espectros de IR y RMN se superpusieron.

El espectro de IR (Espectro No. 14) de la Acetil Alozaluzanina A todavía muestra una banda de hidroxilo a 3583  $\text{cm}^{-1}$ .

El espectro de RMN (Espectro No. 15) exhibe dos dobletes uno a 6.23 ( $J=2$  Hz) y otro a 5.73 ( $J=1.5$  Hz) correspondientes a los protones del metileno exocíclico, un triplete en 5.12 para hidrógeno base del grupo acetato, un doblete para el protón H-6 base de la lactona ( $J=6$  Hz), un singulete en 2.10 correspondiente al grupo acetato. Un multiplete en 0.48 evidencia de la presencia de un anillo de ciclopropano. Un singulete a 1.03 superpuesto a un doblete correspondiente a dos metilos uno terciario y otro secundario.

Finalmente pudimos concluir de acuerdo a las constantes físicas y datos espectroscópicos que la Acetil Alozaluzanina y la Axivalina corresponden a una misma sustancia (8b=9) y consecuentemente quedó establecida la estereoquímica de la zaluzanina A y B como lo indican las fór-

mulas 10a y 10b respectivamente.

Es necesario hacer notar que las transformaciones químicas que se llevaron a cabo con la zaluzanina A no modificaron ningún centro quiral.

#### FOTOQUIMICA DE LA ZALUZANINA A

Otro de los objetivos de la presente tesis fue el llevar a cabo la fotólisis de la zaluzanina A.

Se determinaron cantidades y condiciones de reacción. Se utilizó el metanol como disolvente de reacción y benzofenona como sensibilizador de la misma.

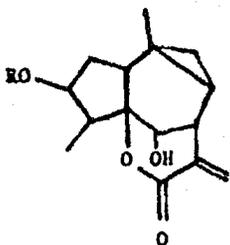
La fotólisis de la zaluzanina A se llevó a cabo 8 veces consecutivamente obteniéndose siempre el mismo producto de reacción con un P.F.= 201-203°C.

La estructura del compuesto de fotólisis no fue posible determinarla en esta tesis, pero se encuentra actualmente en estudio.

Es importante señalar que la recolección de *Zaluzania augusta* de dos estados diferentes, Tlaxcala y Querétaro se hizo con el propósito de determinar la diferencia que existe en la composición química de la planta. De acuerdo a un estudio previo, se observó que la *Zaluzania augusta* proveniente de Tlaxcala en estado de floración presentaba los dos diterpenos antes mencionados, además de la zaluzanina A. En esta ocasión la *Zaluzania augusta* recolectada en Tlaxcala no presentó dichos diterpenos, siendo la zaluzanina A el principal componente, además de que se encontró zaluzanina

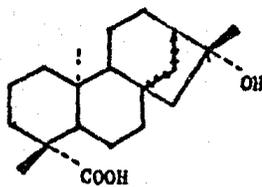
B pero en menor cantidad.

De acuerdo al rendimiento obtenido en cada caso, quedó comprobado una vez más que el lugar y la época de recolección es determinante en la composición de la planta.

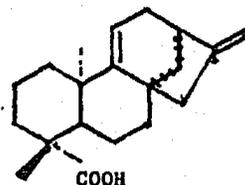


1a, R=H

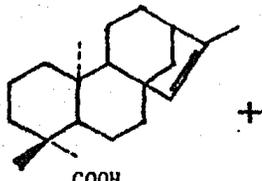
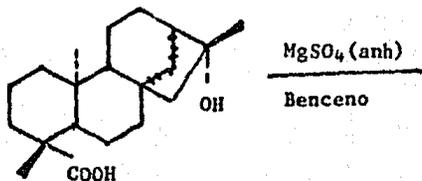
1b, R=Ac



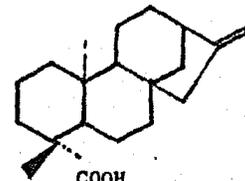
2



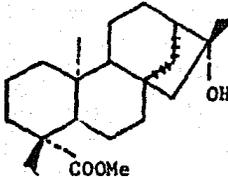
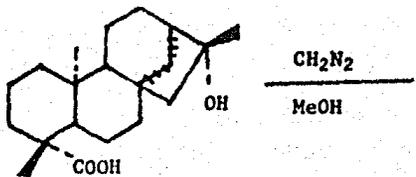
3



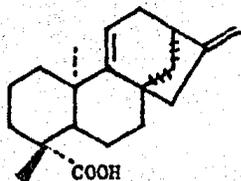
4



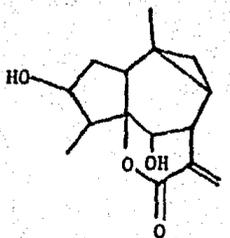
5



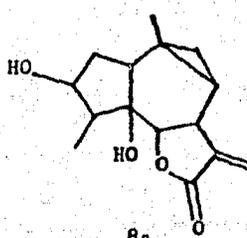
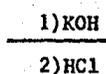
6



7

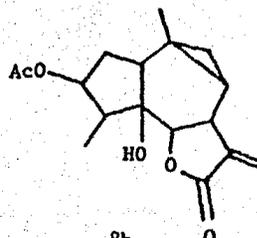
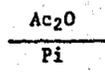


Zaluzanina A



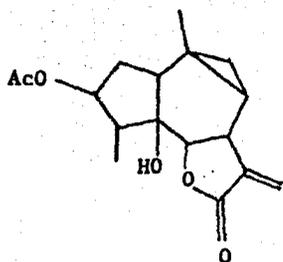
8a

Alozaluzanina



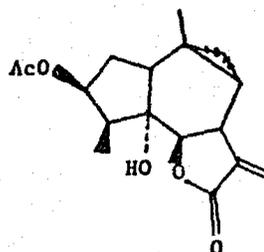
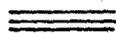
8b

Acetil  
Alozaluzanina



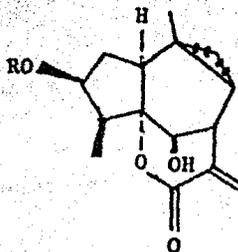
8b

Acetil  
Alozaluzanina



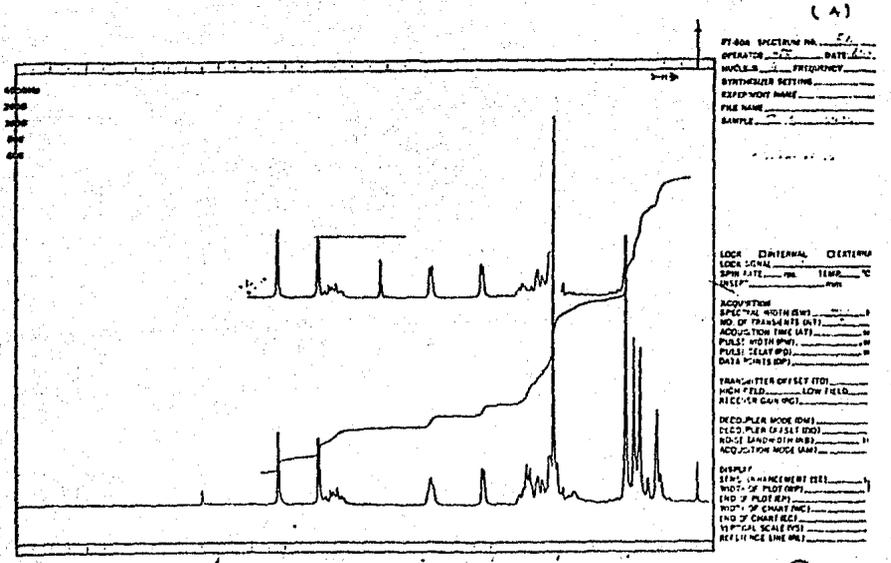
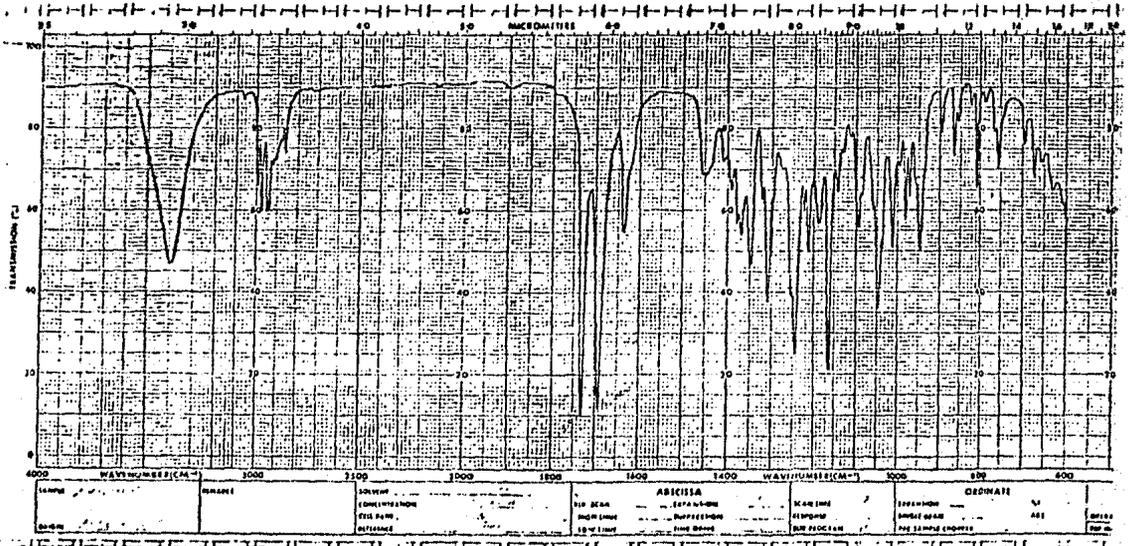
9

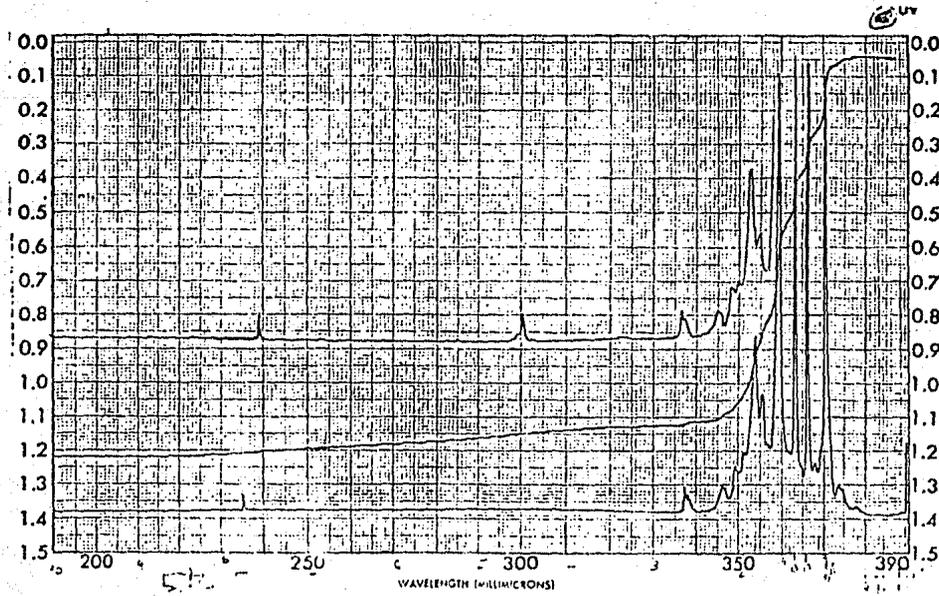
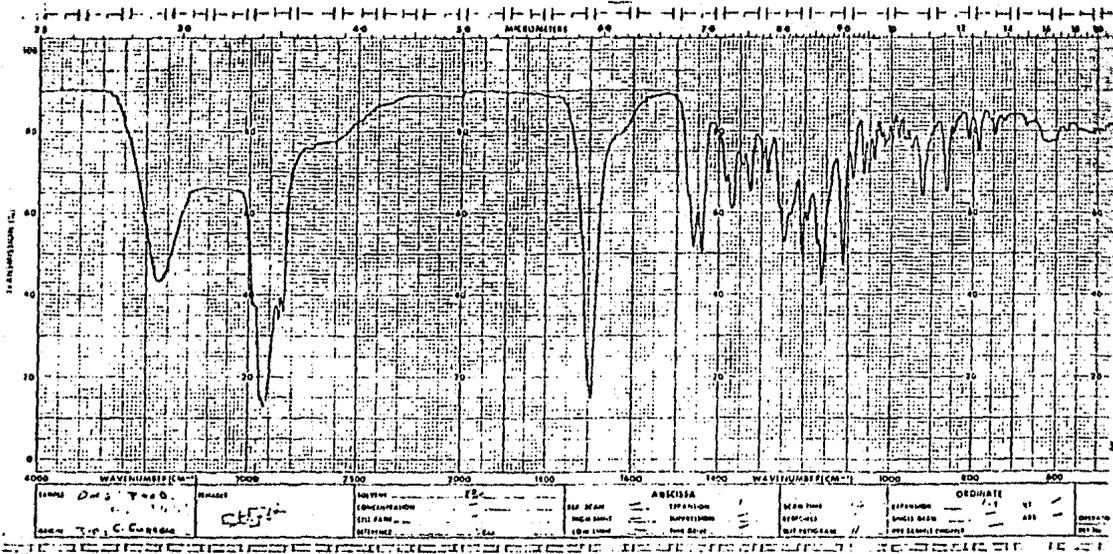
Axivalina



10a, R=H  
b, R=Ac





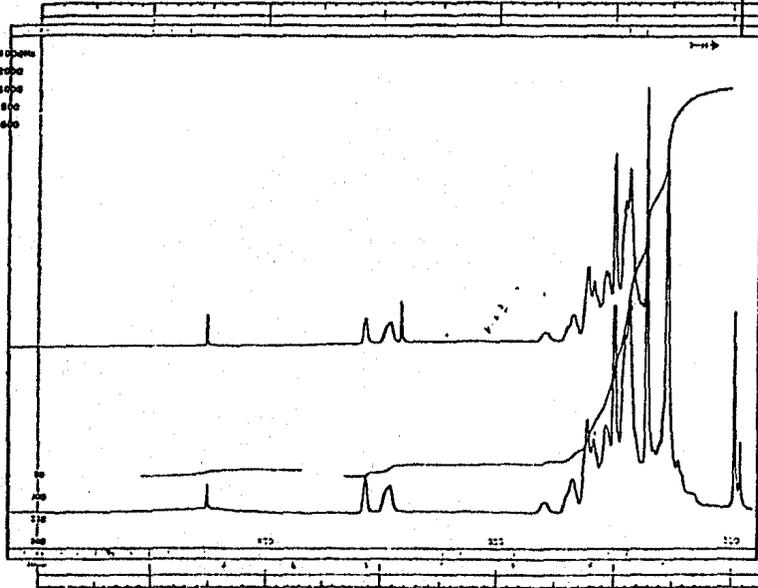


SAMPLE	PF 27711 C	CURVE NO.	1704	SCAN SPEED	1215	OPERATOR	JC
ORIGIN	C. GUERRERO	CONC.		DATE	12/11/83		
SOLVENT	CDCl <sub>3</sub> + BMSO	CELL PATH	1.5	REMARKS	N.A. OFF SET		
		REFERENCE					

PART NO. 702-1511

PERKIN-ELMER

(3)



PTDA SPECTRUM NO. \_\_\_\_\_ DATE \_\_\_\_\_

OPERATOR \_\_\_\_\_ NUCLEUS \_\_\_\_\_ FREQUENCY \_\_\_\_\_

SYNTHESIZER SETTING \_\_\_\_\_

EXPERIMENT NAME \_\_\_\_\_

FILE NAME \_\_\_\_\_

SAMPLE \_\_\_\_\_

LOCK  INTERNAL  EXTERNAL

LOCK SIGNAL \_\_\_\_\_

SPIN RATE \_\_\_\_\_ rpm TEMP \_\_\_\_\_ °C

INSERT \_\_\_\_\_

ACQUISITION

SPECTRAL WIDTH (SW) \_\_\_\_\_

NO. OF TRANSIENTS (NT) \_\_\_\_\_

ACQUISITION TIME (AT) \_\_\_\_\_

PULSE WIDTH (PW) \_\_\_\_\_

PULSE DELAY (PD) \_\_\_\_\_

DATA POINTS (DP) \_\_\_\_\_

TRANSMITTER OFFSET (TO) \_\_\_\_\_

HIGH FIELD \_\_\_\_\_ LOW FIELD \_\_\_\_\_

RECEIVER GAIN (RG) \_\_\_\_\_

DECOUPLER MODE (DM) \_\_\_\_\_

DECOUPLER OFFSET (DO) \_\_\_\_\_

NOISE BANDWIDTH (NB) \_\_\_\_\_

ACQUISITION MODE (AM) \_\_\_\_\_

DISPLAY

SENS ENHANCEMENT (SEL) \_\_\_\_\_

WIDTH OF PLOT (WP) \_\_\_\_\_

END OF PLOT (EP) \_\_\_\_\_

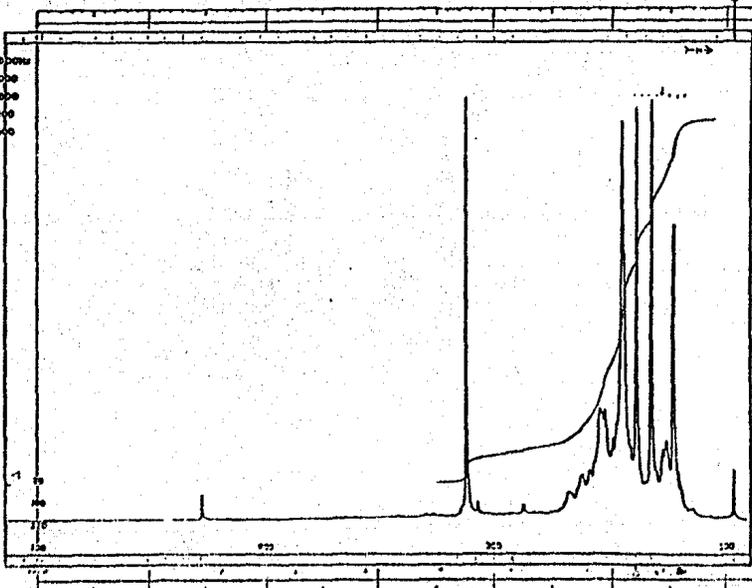
WIDTH OF CHART (WC) \_\_\_\_\_

END OF CHART (EC) \_\_\_\_\_

VERTICAL SCALE (VS) \_\_\_\_\_

REFERENCE LINE (RL) \_\_\_\_\_

(6)



PTDA SPECTRUM NO. \_\_\_\_\_ DATE \_\_\_\_\_

OPERATOR \_\_\_\_\_ NUCLEUS \_\_\_\_\_ FREQUENCY \_\_\_\_\_

SYNTHESIZER SETTING \_\_\_\_\_

EXPERIMENT NAME \_\_\_\_\_

FILE NAME \_\_\_\_\_

SAMPLE \_\_\_\_\_

LOCK  INTERNAL  EXTERNAL

LOCK SIGNAL \_\_\_\_\_

SPIN RATE \_\_\_\_\_ rpm TEMP \_\_\_\_\_ °C

INSERT \_\_\_\_\_

ACQUISITION

SPECTRAL WIDTH (SW) \_\_\_\_\_

NO. OF TRANSIENTS (NT) \_\_\_\_\_

ACQUISITION TIME (AT) \_\_\_\_\_

PULSE WIDTH (PW) \_\_\_\_\_

PULSE DELAY (PD) \_\_\_\_\_

DATA POINTS (DP) \_\_\_\_\_

TRANSMITTER OFFSET (TO) \_\_\_\_\_

HIGH FIELD \_\_\_\_\_ LOW FIELD \_\_\_\_\_

RECEIVER GAIN (RG) \_\_\_\_\_

DECOUPLER MODE (DM) \_\_\_\_\_

DECOUPLER OFFSET (DO) \_\_\_\_\_

NOISE BANDWIDTH (NB) \_\_\_\_\_

ACQUISITION MODE (AM) \_\_\_\_\_

DISPLAY

SENS ENHANCEMENT (SEL) \_\_\_\_\_

WIDTH OF PLOT (WP) \_\_\_\_\_

END OF PLOT (EP) \_\_\_\_\_

WIDTH OF CHART (WC) \_\_\_\_\_

END OF CHART (EC) \_\_\_\_\_

VERTICAL SCALE (VS) \_\_\_\_\_

REFERENCE LINE (RL) \_\_\_\_\_

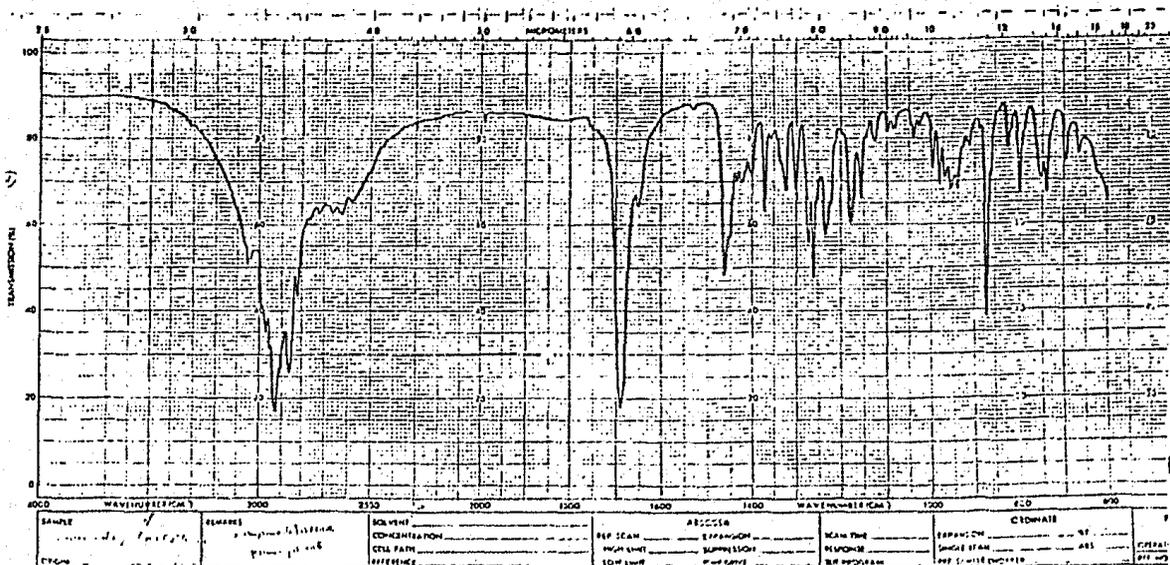


No. 111111

Dr. C. G. ...



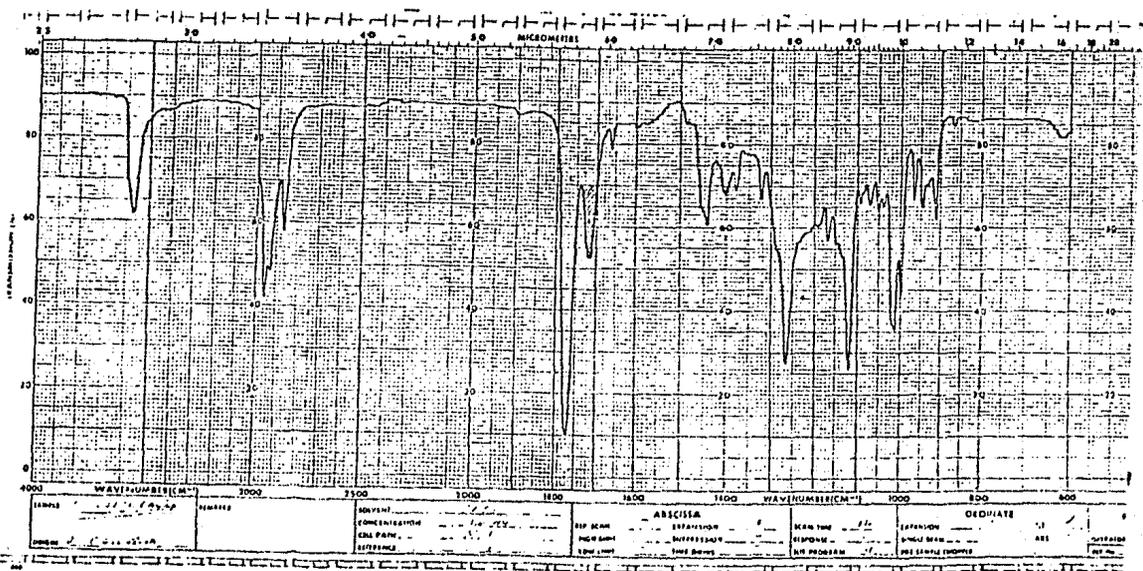
Sp. 11  
Spectrum  
444  
1111



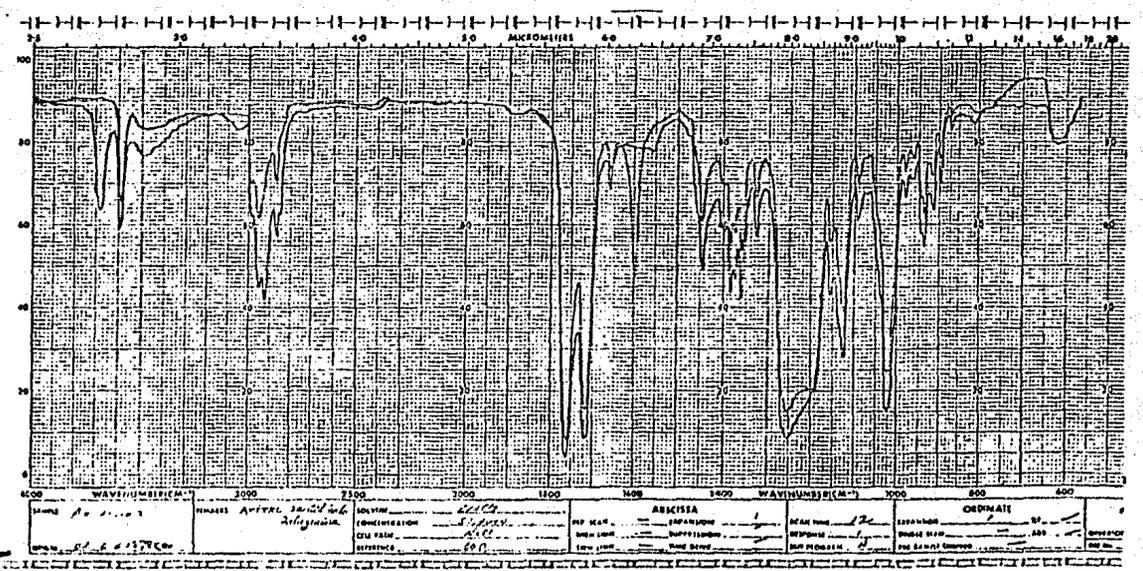
SAMPLE <i>...</i>	REMARKS <i>...</i>	SOLVENT CONCENTRATION CELL PATH REFERENCE	REF. SCAN PATH 10%	ABSCISSA EXPANSION SUPPRESSION REF. SCAN	SCAN TIME RESPONSE ILM POSITION	CROWN EXPANSION SAMPLE PATH REF. SCAN	GENERAL USE
----------------------	-----------------------	--	--------------------------	---	---------------------------------------	--	----------------



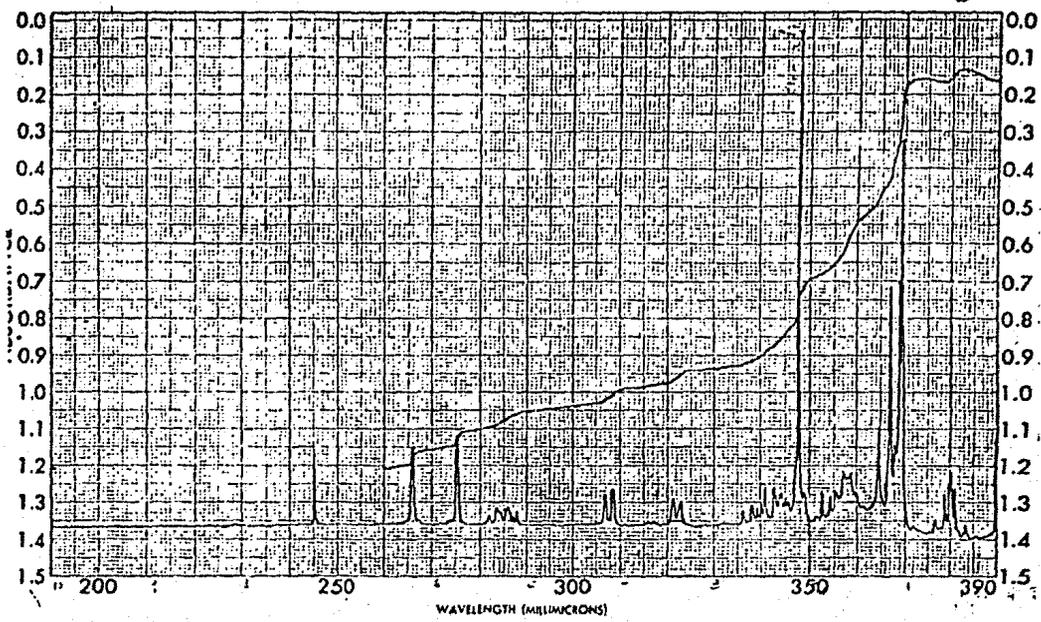
(13)



(14)



(15)



SAMPLE <i>caprylic diester</i>	CURVE NO. <i>112</i>	SCAN SPEED <i>1000</i>	OPERATOR <i>J.S.</i>
<i>1110A</i>	CONC. <i>1.0</i>	STIFF <i>1.0</i>	DATE <i>10-15-54</i>
ORIGIN <i>1110A</i>	CELL PATH <i>1.0</i>	REMARKS <i>1.0</i>	
SOLVENT <i>CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub></i>	REFERENCE <i>112</i>		

PART NO. 202-1511

PERKIN-ELMER

## 5. CONCLUSIONES

De la *Zaluzania augusta* recolectada en Querétaro se obtuvo además de la Zaluzanina A, dos diterpenos : El ácido 16 $\alpha$ -hidroxi-(-)-kauran-19 oico y el ácido (-)-kaur-9(11)-16-dien-oico los cuales fueron plenamente identificados en el presente estudio.

La presencia de estos diterpenos fue novedosa ya que no se habían encontrado antes en este género de *Zaluzania augusta*.

Con el objeto de comparar la Acetil Alozaluzanina A y la Axivalina. La Zaluzanina A se trató con base y después con ácido para obtener la Alozaluzanina A y se acetiló para obtener la Acetil-Alozaluzanina A que resultó ser idéntica a una muestra original de Axivalina. Por superposición de los espectros y reacciones químicas realizadas quedó establecida la estereoquímica de las zaluzaninas A y B.

El estudio químico de *Zaluzania augusta* de Tlaxcala presentó la Zaluzanina A y la Zaluzanina B, pero no los diterpenos antes mencionados; siendo la Zaluzanina A el principal componente.

El rendimiento obtenido de Zaluzanina A de Tlaxcala fue casi el doble del obtenido de Querétaro.

Un estudio adicional de la Zaluzanina A, fue

el llevar a cabo la fotoquímica de la misma, de la cual se obtuvo una mezcla de productos los cuales se encuentran actualmente en estudio.

Otro aspecto importante que se sabe se lleva a cabo con lactonas sesquiterpénicas es su actividad en células animales, se sabe que tienen efectos inhibidores sobre la reproducción celular a dosis muy bajas.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Tratado Elemental de Botánica.  
Manuel Ruiz Oroz, Daniel Nieto Roaro,  
Ignacio Larios Rodríguez.  
14 Ed. ECLALSA Librería Porrúa.  
México 1977.  
Pág.: 1,2,4,5,6.
2. Métodos de Investigación Fitoquímica.  
Domínguez A.X.  
Ed. Limusa.  
México 1975.  
Pág.: 45.
3. The Biology and Chemistry of the Compositae.  
Heywood, J. B. Harborne and B. L. Turner.  
Ed. Academic Press Inc. (London)  
Año : 1977.  
Vol. 1 págs.: 28,29,30,31,32.
4. La Flora del Valle de México.  
Oscar Sánchez Sánchez.  
Ed. Herrera, S. A. 39 Edición.  
Año : 1976.  
Pág.: 455.
5. Recent Advances in Phytochemistry Vol. 1.  
T. J. Mabry, R. E. Alston, V. C. Runeckles.  
Appleton-Century-Crofts.  
Año : 1968.  
Pág.: 14,15,16,35.

6. Natural Products.  
A Laboratory Guide.  
Raphael Ikan.  
Academic Press  
London and New York 1969.  
Pág.: 137.
  
7. Terpenes and Related Natural Products Inc.  
Allinger, N. L. Cara, M. P. Fough, D. C. Johnson,  
C. R. Lebel, N. A. Stevens, C. L.  
Organic Chemistry Worth Publishers,  
Inc. New York (1971).  
Pág.: 783.
  
8. The Chemistry of the Terpenes.  
Pinder A. R., J. Wiley.  
New York (1960).  
Pág.: 122-125, 137.
  
9. Romo de Vivar A.  
Ciencia. Revista de la Academia de la Investigación Científica, 32, pág.: 165, 166, 167 (1981).
  
10. Goro Yabuta, John S. Olsen and T. J.  
Revista Latinoamericana de Química 9, 83-85 (1978).
  
11. Chemistry of Terpens and Terpenoids.  
Newman, A. A.  
Academic Press, N. Y. (1972).  
Pág.: 194.
  
12. Organic Chemistry of Secondary Plants Metabolism.  
Geissman, T. A. and Crout, D. H. C.  
Cooper Co., California (1969).  
Pág.: cap. 10, 300.

13. A study on Phytotoxicity of Alanto lactone.  
Chem. Biol. Interactions 3:13-18.  
Dalvi, P. R., Singh, B. y Salunkhe  
D. F. 1971.
14. Recent Advances in the Chemistry of Tumor-inhibi-  
tors of plant origen.  
Kupchan, S. M. 1970.  
Trans N. Y. Acad. Sci. (2) 32:85-106.
15. Eloy Rodríguez.  
Revista Latinoamericana de Química, 8, 56-62 (1977).
16. J. Romo, A. Romo de Vivar and P. J. Nathan.  
Tetrahedron 23, 29 (1967).
17. A. Usubilaga, J. de Hernández, N. Pérez y M.  
Kiriakidis.  
Phytochem. 12, 2999 (1973).
18. E. P Serebryakov, N. S. Kobrina, A. V.  
Simolin y V. F. Kucherov.  
Chem. and Ind. 1770 (1968).
19. Tesis Profesional, Puebla, Pue. 1982.  
Estudio Químico de *Stevia lucida* y de *Zaluzania*  
*augusta* (Lag.) Schultz Bip.  
Cipriano Meléndez Saldaña.
20. Y. Caballero y F. Walls.  
Bol. Inst. Quím. Univ. Nacl. Autón. México.,  
22, 79 (1970).
21. W. Herz, V. Sudarsanam y J. J. Schmid  
J. Org. Chem., 31, 3232 (1966).

22. G. D. Anderson, R. S. Mc Ewen y W. Herz.  
Tetrahedron Letters, 43, 4423 (1972).